

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Křemík jako ochrana při působení UV-B záření

Diplomová práce

Autor: Bc. Tereza Hurdálková
Studijní program: N0588A030001 - Biologie a ekologie
Studijní obor: NMBEEB Biologie a ekologie: spec. experimentální biologie
Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny ze kterých jsem vycházela.

Hradec Králové 01. 01. 2022

Tereza Hurdálková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé diplomové práce, RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D., za její trpělivost, vstřícnost a odborné rady, které mi poskytovala při psaní diplomové práce. Dále jí děkuji za ochotu, veškerou pomoc, asistenci a lidský a klidný přístup v laboratoři při experimentální části diplomové práce.

Velké díky patří i mé rodině za podporu během psaní i celého studia, a v neposlední řadě děkuji kolegovi a partnerovi Bc. Markovi Šourkovi za pomoc a vedení diskuzí při psaní výsledků a jiných částí diplomové práce.

ANOTACE

Hurdálková T. (2021): Křemík jako ochrana při působení UV-B záření, Hradec Králové. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Zuzana Kovalíková. 72 s.

Tato práce je zaměřena na studium vlivu křemíku na rostliny pšenice seté (*Triticum aestivum*, cv. *Granny*) v podmínkách abiotického stresu. Cílem práce bylo sepsat dostupné informace o UV-B záření, jako abiotickém stresoru, který působí změny na všech úrovních rostliny. Praktická část je zaměřena na studium křemíku, jako ochranného prvku při působení UV-B záření na pěstované hydroponicky rostliny pšenice seté. Změny, které nastaly po ozáření rostlin jednotnou dávkou UV-B zahrnují zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) následovanou peroxidací membránových lipidů, akumulaci fenolických sloučenin (fenoly, flavonoidy), které zabraňují pronikání UV-B záření do hlubších vrstev pletiv a vyšší aktivitu enzymatických antioxidantů (SOD, CAT, APX). Přídavek křemíku do kultivačního média měl tendenci snižovat jak produkci ROS, tak tvorbu malondialdehydu. Také se snížila produkce fenolických sloučenin. Křemík zapůsobil na aktivitu SOD nepřímo, zvýšením jeho aktivity. Naopak, snížením oxidačního stresu v křemíkem ošetřených rostlinách došlo ke snížení aktivity enzymů APX a CAT.

Klíčová slova

UV-B záření, křemík, oxidační stres, antioxidantní enzymy, pšenice setá (*Triticum aestivum*)

ANNOTATION

Hurdálková T. (2021): Silicon as a protective agent under UV-B radiation, Hradec Králové. Diploma thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Zuzana Kovalíková. 72 p.

This diploma thesis is focused on the study of the effect of silicon supplementation on wheat plants (*Triticum aestivum*, cv. *Granny*) exposed to abiotic stress factor. The aim of the work was to write a search from existing literature based on UV-B, as an abiotic stressor, which causes changes at all levels of plant. The practical part is focused on the study of silicon as a protective element in wheat plants hydroponically grown under UV-B radiation. Irradiation of plants with a single dose of UV-B, led to the following changes: increased production of reactive oxygen species (ROS) resulted in the peroxidation of membrane lipids; accumulation of phenolic compounds (phenols, flavonoids) which prevent the penetration of UV-B radiation into the deeper layers of tissues and higher activity of enzymatic antioxidants (SOD, CAT, APX). The supplementation of silicon successfully reduced both ROS production and production of malondiladehyde. The production of phenolic compounds was also reduced. Silicon indirectly affected SOD activity by increasing its activity. On the other hand, the reduction of the oxidative stress led to the decreased activity of APX and CAT enzymes in silicon-treated plants.

Key words

UV-B radiation, silicon, oxidative stress, antioxidant enzymes, wheat (*Triticum aestivum*)

Obsah

Úvod a cíle práce.....	8
1. Literární rešerše.....	10
1.1 UV-B záření.....	10
1.1.1 UV-B záření jako stresor pro rostliny.....	11
1.1.2 Změny v rostlině způsobené UV-B zářením.....	12
1.2 Regulace genové exprese UV-B zářením	13
1.2.1 UVR8 fotoreceptory	13
1.3 Změny v rostlině vyvolané vysokými dávkami UV-B záření.....	15
1.4 Oxidační stres a reaktivní formy kyslíku.....	18
1.5 Ochrana rostlin před UV-B.....	21
1.6 Enzymatické antioxidanty	22
1.6.1 Superoxid dismutáza (SOD).....	22
1.6.2 Kataláza (CAT).....	22
1.6.3 Peroxidázy.....	23
1.7 Neenzymatické antioxidanty.....	24
1.7.1 Askorbát (AsA).....	24
1.7.2 Gluthation	24
1.7.3 Karotenoidy	24
1.7.4 Tokoferoly	25
1.7.5 Fenolické sloučeniny.....	25
1.8 Křemík	27
1.8.1 Výskyt a transport v rostlině	27
1.8.2 Úloha křemíku v rostlinách	30
1.8.3 Role křemíku ve stresových podmínkách	30
1.8.4 Role křemíku při UV-stresu.....	33
2 Metodika.....	34
2.1 Metodika pěstování rostlin	34
2.2 Extrakce a kvantifikace ROS	35
2.3 Extrakce a kvantifikace malondialdehydu.....	37
2.4 Extrakce a kvantifikace fenolů a flavonoidů	37
2.5 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů.....	38
2.5.1 SOD	38
2.5.2 CAT	39
2.5.3 APX.....	40
2.6 Western blot analýza	41

2.6.1	Roztoky pro izolaci a stanovení koncentrace proteinů	41
2.6.2	Roztoky pro imunodetekci proteinů.....	42
2.6.3	Izolace a stanovení proteinů	43
2.6.4	SDS – PAGE.....	45
2.6.5	Imunodetekce proteinů – přenos proteinů na PVDF	46
2.6.6	Zpracování výsledků	48
2.7	Statistické analýzy	50
3	Výsledky.....	51
3.1	Stanovení obsahu ROS.....	51
3.2	Stanovení obsahu malondialdehydu (MDA)	53
3.3	Stanovení obsahu fenolických sloučenin.....	54
3.4	Aktivita antioxidantních enzymů.....	56
3.5	Western blot analýza exprese vybraných antioxidantních enzymů	59
4	Diskuze	63
	Závěr	66
	Seznam použité literatury.....	67

Úvod a cíle práce

Rostliny jsou vystaveny různým faktorům prostředí, které na ně v určitém množství působí jako stresory. Nejčastějšími stresory, které na rostliny mohou působit jsou sucho, slanost, nízká teplota, nedostatek minerálních živin, toxicita kovů, pesticidy a UV záření z nichž všechny mají nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin. Z hlediska antropogenních polutantů je UV-B záření jedním z hlavních environmentálních činitelů, který na rostlinu působí. V důsledku ztenčování a vyčerpání ozonové vrstvy se množství UV-B záření dopadající na povrch země zvyšuje a kvůli své vysoké energii negativně působí na živé organismy (Kataria 2017). Z tohoto důvodu se vědci snaží zjistit, jaký vliv má UV-B záření na rostliny a jaké ochranné prostředky má rostlina k dispozici.

Vhledem k tomu, že jsou vyšší rostliny imobilní, nemohou tomuto environmentálnímu stresoru uniknout, spíše naopak, světlo je pro rostliny z hlediska procesu fotosyntézy velice důležité. Aby mohly rostliny zvládnout stres vyvolaný UV-B zářením, disponují velmi dobrými obrannými mechanismy, které se snaží UV-B zachytit již při vstupu do rostliny a následně zmírnit poškození pletiv a odbourat látky, které vznikly jako reakce na stres. UV-screening je vlastnost, kterou rostliny disponují od začátku kolonizace suchozemského prostředí. Obecně jsou za to zodpovědné fenolické sekundární metabolity, zejména flavonoidy (Schaller et al. 2013). Kromě zvyšujícího se obsahu fenolických sloučenin byly pozorovány i další adaptivní reakce, jako je zvýšení kapacity zachycování volných radikálů, v důsledku skutečnosti, že UV-B záření způsobuje vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) na různých místech fotosyntetického a respiračního transportu elektronů a v buněčných systémech během různých biochemických reakcí. Aby bylo poškození ROS co nejmenší, rostliny mají enzymatické a neenzymatické antioxidační obranné systémy, které ROS vychytávají a přeměňují na netoxické látky (Singh et al. 2017).

Nedávné výzkumy ukazují, že existuje i další způsob, jak se rostliny mohou chránit proti biotickým a abiotickým stresorům. Bylo prokázáno, že křemík funguje jako ochranný a obranný prvek, který rostlině pomáhá vytvořit toleranci při nadměrném stresu, jako je sucho, vysoká koncentrace těžkých kovů, nedostatek živin, zasolení, záření, horko, mráz nebo při vysoké koncentraci chorob a škůdců. Z tohoto důvodu je skutečně v některých zemích využíván pro zlepšení výnosu zemědělských plodin, a to i přesto, že není zařazen mezi základními esenciálními prvky pro růst rostlin (Pozza et al. 2015; Wang et al. 2017; Yavaş et Ünay 2017; Olle 2020). Technologie, kdy dochází k umělému dodávání stabilních forem kyseliny křemičité se nazývá SAAT (Silic Acid Agro Technology). Tato technologie pomáhá ke zvětšení kořenového systému rostlin, prodloužení stonku, zvětšení plochy listů, zvýšení obsahu chlorofylu v rostlině a zlepšuje příjem živin. Navíc se jedná o možnost trvale

udržitelného pěstování plodin, jelikož jeho aplikací by mohlo docházet k redukci aplikace pesticidů a fungicidů (Olle 2020).

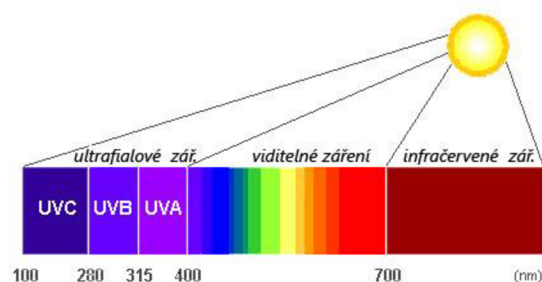
Přes všechny jeho kladné funkce, které na rostlinu má, je působení křemíku v rostlině nejasné. Obecně uznávaná hypotéza tvrdí, že křemík možná vytváří fyzikální bariéru v buněčných stěnách rostlin a to tak, že po absorpci křemíku kořeny rostlin dochází k apoplastickému pohybu z kořenů do listů, v mezibuněčných prostorech proběhne polymerace křemíku a křemík se naváže na stěny epidermálních buněk listů a xylému a dojde k vytvoření křemíkové dvojvrstvy. Tím se zabrání pronikání patogenu, i UV-B záření, do těla rostliny. Křemík ale i pravděpodobně zvyšuje aktivitu obranných enzymů, čímž vytváří chemickou bariéru rostliny (Pozza et al. 2015)

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na mechanismus vzájemného působení chemického i fyzikálního způsobu obrany rostliny. První polovina diplomové práce je zaměřena na sepsání poznatků o vlivu UV-B záření na rostliny a o křemíku jako ochranném prvku v boji proti nadměrnému ozáření rostlin a jeho dalších benefitech v ochraně a růstu rostlin. V praktické části jsem se zaměřila na fyziologické a biochemické změny v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*) po působení UV-B záření v čase a jaký vliv může mít přítomnost křemíku.

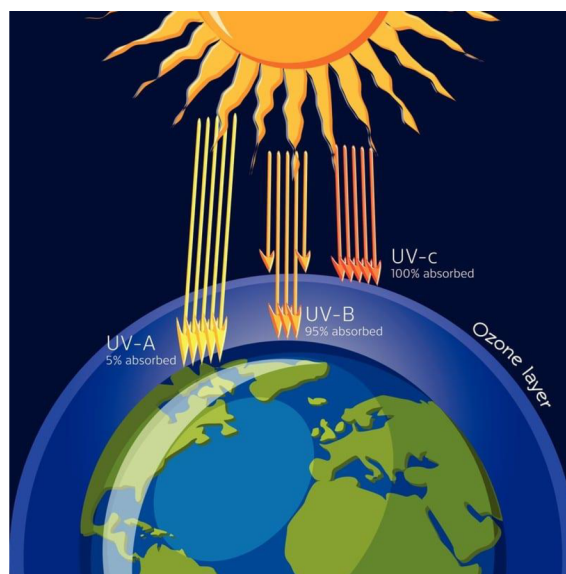
1. Literární rešerše

1.1 UV-B záření

UV-B záření je součástí UV záření, které se v elektromagnetickém spektru nachází mezi rentgenovým zářením a viditelným světlem. UV záření je složeno ze tří typů, které dělíme dle vlnové délky na UV-A, UV-B a UV-C (Obrázek 1). Nejkratší vlnovou délku (100-200 nm) má UV-C záření. Ačkoliv je UV-C záření nejvíce nebezpečné pro živé organismy, nemusíme se ho obávat, protože je kompletně pohlceno atmosférickým kyslíkem. Naopak nejdelší vlnovou délku (320-400 nm) má UV-A záření, které není v atmosféře pohlcováno a tvoří 99 % UV záření, které dopadne na zemský povrch. Ačkoliv je považováno za bezpečné, přímý pohled do zdroje světla nebo dlouhodobé vystavení se považují za nebezpečné. UV-B záření se nachází mezi UV-A a UV-C. Jeho vlnová délka je od 280 do 320 nm a představuje méně než 0,5 % celkové sluneční energie, které dopadá na zemský povrch (McKenzie et al. 2003). Dle Heijde et Ulm (2012) absorpční koeficient ozonu rapidně klesá s vlnovými délkami většími než 280 nm a dosahuje nuly při vlnové délce 300 nm. Z tohoto důvodu je UV-B záření částečně pohlceno ozonem a částečně dopadá na zemský povrch (Obrázek 2).



Obrázek 1: UV záření znázorněno na části elektromagnetického spektra (Optika Šafaříková.cz, 2021) (http://www.optika-safarikova.cz/slunecni_bryle.html)



Obrázek 2: Znázornění dopadu UV záření na zemský povrch (Volty.cz, 2021) (<https://www.volty.cz/2020/04/05/muze-uv-zareni-zabit-koronavirus/>)

1.1.1 UV-B záření jako stresor pro rostliny

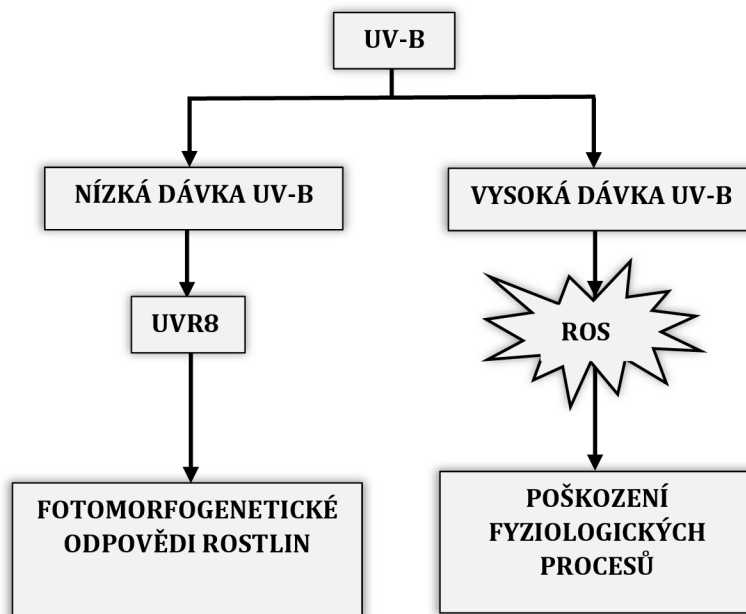
Za stresor se většinou považuje environmentální faktor, který způsobí jakoukoliv změnu v metabolické aktivitě, růstu nebo vývoji rostliny. Stres u rostlin může mít konstruktivní nebo destruktivní účinek nebo může působit jako selektivní faktor, který řídí adaptivní evoluci (Slováková et Mistrík 2007).

Vystavení rostlin stresu se může projevit jako vratný, pružný eustres, nebo může expozice překročit mez tolerance a pak nastává nevratný distres. Eustres je aktivující, stimulující stres, který je žádaným elementem ve vývoji rostlin. Říká se mu také dobrý stres nebo konstruktivní stres. Pokud rostlina zažije mírný, elastický eustres, metabolismus této rostliny je upraven a rostlina se aklimatizuje na nové podmínky. Opačným jevem je distres, těžký stres, který má převážně negativní účinky na rostliny a jejich vývoj. Nazýváme ho též destruktivní stres. Distres nastává, pokud se životní prostředí rostliny stane příliš nepříznivé a rostlina vyčerpá všechny možnosti obrany. K nástupu distresu však nemusí dojít vždy za stejných podmínek expozice stresoru. Rostliny mohou zvýšit pružnou a plastickou odolnost proti stresu prostřednictvím genetické adaptace anebo fyziologické aklimatizace (Hideg et al. 2013).

Piterková et al. (2005) uvádějí, že si rostliny vytváří mechanismy, které jim s nadměrným ozářením UV-B pomáhají bojovat. Tyto mechanismy dělíme do dvou kategorií na tzv. „avoidance mechanismy“ a aktivní obranu. Avoidance mechanismus má převážně dlouhodobý a pasivní charakter. Jeho úlohou je chránit rostlinu před vniknutím UV-B záření do pletiv tím, že si vytváří mechanickou bariéru jako je silná kutikula na listech, rezervoáry vody, impregnace buněčných stěn nebo syntéza řady organických látek. Druhý mechanismus aktivní obrany snižuje negativní dopad stresorů teprve až po jejich proniknutí do buňky. Stresová reakce, která následuje je závislá na mnoha faktorech jako je intenzita a délka působení stresového faktoru nebo vitalita, genotyp a adaptační schopnosti rostliny.

Ačkoliv je UV-B záření pouze malá složka slunečního záření, má velký dopad na fungování živých organismů na zemi. Představuje důležitý ekofyziologický faktor s potenciálem poškozovat růst a fotosyntézu rostlin. Rostliny jako fotoautotrofní, nepohyblivé organismy jsou tomuto vnějšímu, přírodnímu faktoru vystavené téměř po celou dobu své existence. Rostliny absorbují UV-B záření velkým počtem důležitých makromolekul jako jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy a fytohormony a pouze nepatrné zvýšení hladiny UV-B může mít značný dopad jak na tyto makromolekuly, tak na celou rostlinu. Bylo také dokázáno, že reakce rostliny na UV-B záření se liší podle dávky a délky expozice. Zatímco nízké hladiny

UV-B záření vyvolávají obranné fotomorfogenetické reakce, vysoké dávky záření vyvolávají mimo jiné vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) a syntézu hormonů jako je kyselina salicylová a kyselina jasmónová (Obrázek 3) (Kataria et al. 2014).



Obrázek 3: Reakce rostlin na rozdílné dávky UV-B záření (Singh et al. 2017)

1.1.2 Změny v rostlině způsobené UV-B zářením

Několik studií prokázalo, že UV-B záření indukuje specifické změny v genové expresi, zvyšuje akumulaci pigmentů vychytávající UV-B a mění fytochemický obsah. Mezi tyto tzv. UV-screening pigmenty patří sekundární metabolity jako fenolické látky, flavonoidy a estery hydroxyskořicových kyselin, které se akumulují ve vakuolách epidermálních buněk a snižují pronikání UV-B záření do hlubších vrstev pletiv (Frohnmeier et Staiger 2003). Tyto reakce jsou zprostředkovány fotoreceptorem UVR8 a jsou nutné pro aklimatizaci rostlin na UV-B. Většinou jsou indukovány nízkou, chronickou dávkou, která nezpůsobuje významné poškození. Proto je můžeme považovat za eustres. Na druhou stranu UV-B záření může způsobit akumulace poškozené DNA nebo inaktivaci fotosyntetických mechanismů, které již můžeme považovat za distres. Rovnováha mezi eustresem a distresem jednoduše nezáleží pouze na dávce záření nebo kvalitě spektra, ale důležité jsou i intenzita fotosynteticky aktivního světla (PAR), stádium aklimatizace rostliny nebo genotyp (Kataria et al. 2014).

Mnoho studií vlivu UV-B záření na rostliny ukázalo UV-B jako stresor způsobující distres. Dnes je ale známo, že dřívější experimenty byly prováděny v nereálných experimentálních

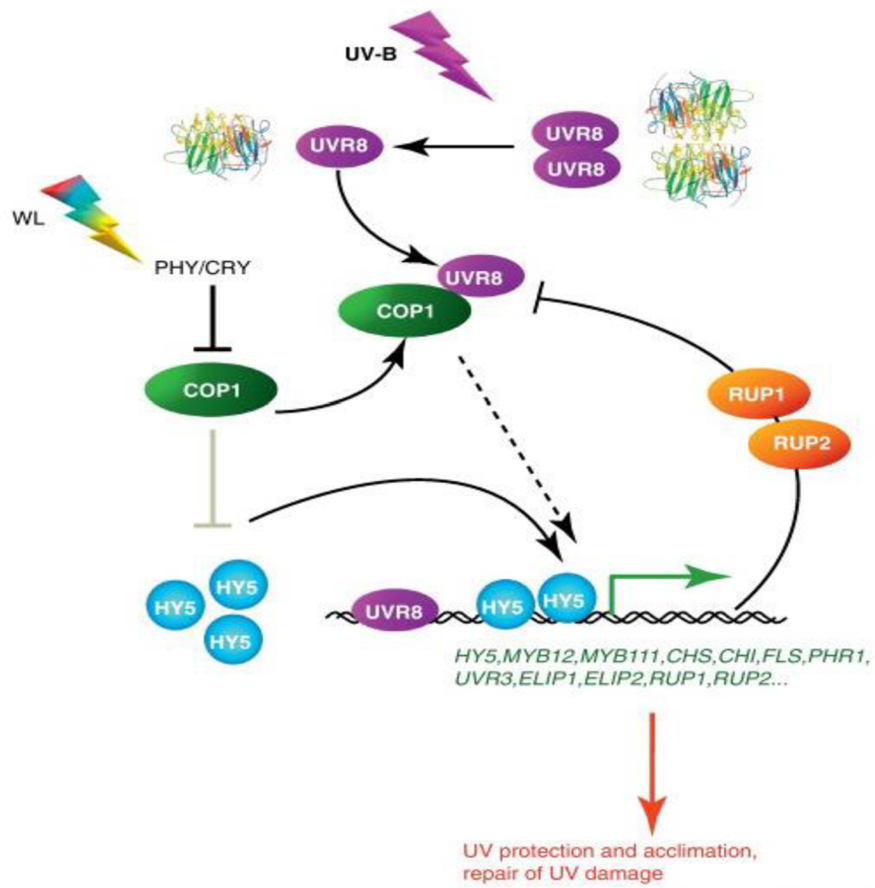
podmínkách, včetně vysokých hladin UV-B a nízkých hladin doprovodného PAR. Tudíž se dospělo k názoru, že UV-B záření působící na rostliny v přirozeném životním prostředí významně neovlivňuje růst ani produkci rostlin (Hideg et al. 2013).

1.2 Regulace genové exprese UV-B zářením

UV-B záření v rostlinách vyvolává modifikace v genové expresi, které jsou velmi složité a specifické. Genová exprese může být up-regulována i down-regulována expozicí UV-B. UV-B ovlivňuje genovou expresi na transkripční, translační i posttranslační úrovni. UV-B reguluje sady obranných a dalších genů, které jsou aktivovány prostřednictvím různých signálních drah zahrnujících ROS, kyselinu salicylovou (SA), kyselinu jasmonovou (JA) a etylén. Vystavení rostlin nízkému působení UV-B podporuje expresi řady genů zapojených do UV-B ochrany, včetně genů odpovědných za produkci flavonoidů a několika fenolických sloučenin, zatímco vysoké koncentrace ROS mohou vést k fytotoxicitě. Protein UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR 8) funguje jako UV-B specifická signální složka kontrolující expresi řady genů nezbytných pro UV-B ochranu (Hideg et al. 2013).

1.2.1 UVR8 fotoreceptory

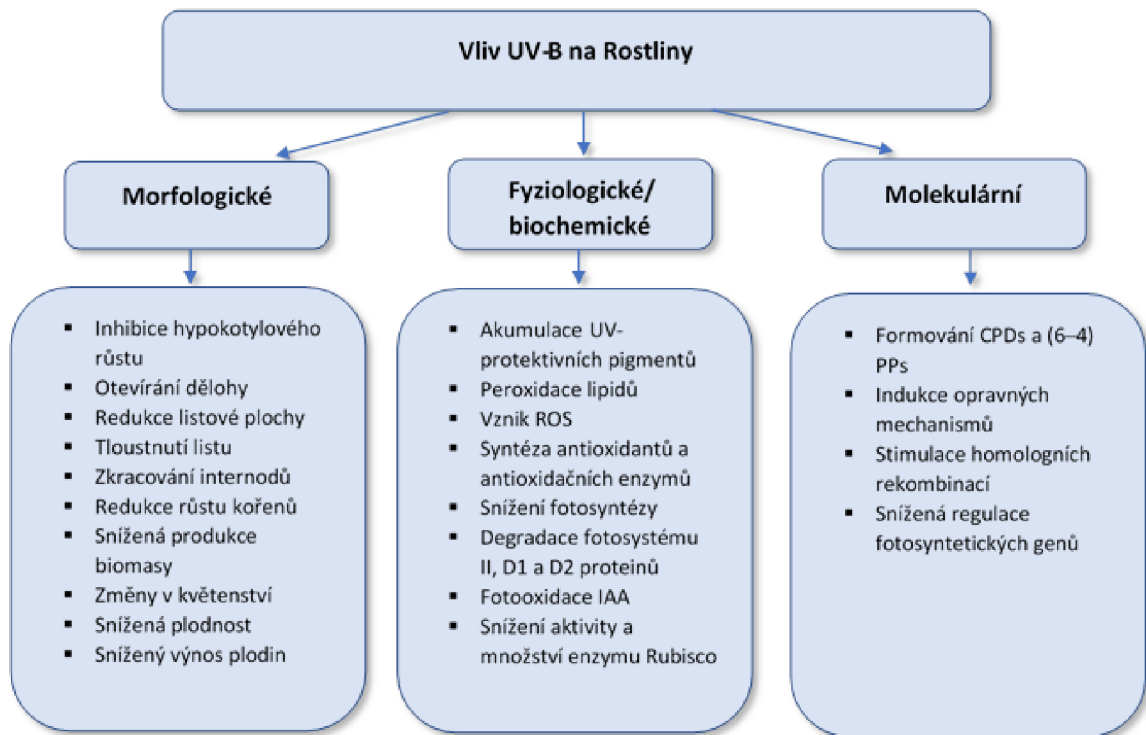
Fotoreceptory UVR8 jsou proteiny, které přijímají UV-B záření a iniciují stresové odpovědi. Poprvé byly objeveny v mutantní rostlině rodu huseníček (*Arabidopsis*), která byla přecitlivělá na světlo (Kataria et al. 2014). Zatímco většina receptorů používá k absorpci světla chromofory, UVR8 je závislý na vnitřních tryptofanech (Ulm a Jenkins 2015). Tyto proteiny jsou v rostlině přítomny jako homodimer, který po expozici UV-B prochází okamžitou monomerizací, proniká do cytoplazmy, kde se spojí s E3 ubikvitin ligázou COP1 aby zahájil cestu molekulární signalizace, která vede ke změnám genové exprese (Obrázek 4). Výsledkem je exprese souboru genů, která brání potencionálnímu poškození způsobeném UV-B zářením. Především to jsou geny kódující enzymy biosyntézy flavonoidů, enzymů pro opravu DNA a také proteinů podílejících se na zmírnění oxidačního stresu. Monomer UVR8 je redimerizován působením proteinů RUP1 a RUP2, které přerušují interakci UVR8 - COP1, čímž deaktivují signální dráhu a znovu regenerují homodimer UVR8 (Heijde et Ulm 2012).



Obrázek 4: Model signalizace zprostředkované UVR8 (Heijde a Ulm 2012)

1.3 Změny v rostlině vyvolané vysokými dávkami UV-B záření

Bylo dokázáno, že vysoké dávky UV-B záření způsobují u rostlin změny na morfologické, biochemické a molekulární úrovni (Obrázek 5). Dané změny závisí na variacích genotypu rostliny a experimentálních podmínkách (Kataria et al. 2014).

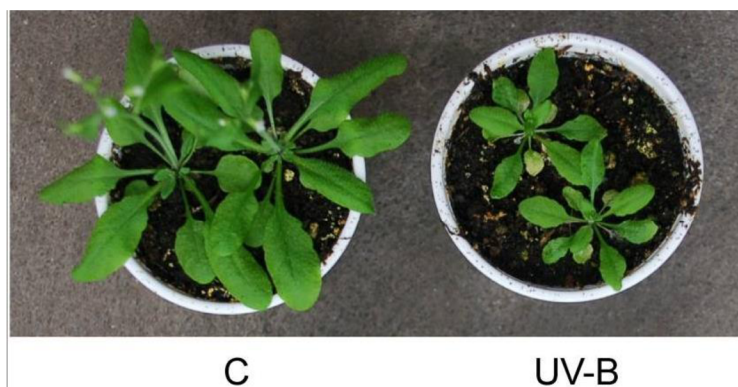


Obrázek 5: UV-B indukované morfologické, fyziologické, biochemické a molekulární změny v rostlinách; převzato a upraveno dle (Kataria et al. 2014)

Dle Jansen et al. (1998) ovlivňují vysoké dávky UV-B fotomorfogenezi – inhibují prodloužení hypokotylu a způsobují otevření kotyledonů. Dále uvádí změny ve složení epikutikulárních vosků, zmenšení povrchu listů a zvýšení tloušťky listů, zkrácení internodů a změny ve větvení rostlin. V rámci celé rostliny a ekosystému se UV-B záření podílí na snížení biomasy, snížení výnosu plodin, změnách v kvetení a snížené plodnosti. Fina et al. (2017) zkoumali vliv vysokých dávek UV-B na kukuřici (*Zea mays*) a zjistili, že dochází ke změně výšky rostlin a zmenšení velikosti listů (Obrázek 6) kvůli snížené produkci buněk, snížené velikosti dělicí zóny a přechodu buněk z proliferace na expanzi nastávající blíže k bázi listu. K podobným výsledkům došli i Casadevall et al. (2013), kteří u huseníčku (*Arabidopsis*) ozářeného UV-B prokázali zmenšení velikosti rostliny a zmenšení plochy listů v důsledku snížení počtu buněk v proliferační zóně (Obrázek 7).

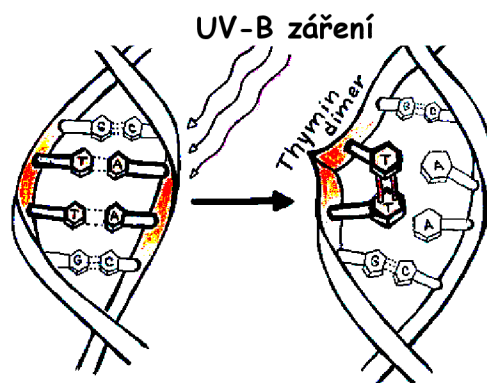


Obrázek 6: Rozdíl mezi listem ozářené (UV-B) a neozářené (Control) kukuřice (Fina et al. 2017)



Obrázek 7: Rozdílná velikost kontrolní rostliny (*Arabidopsis*) a rostliny ozářené UV-B zářením (UV-B) (Casadevall et al. 2013)

Další změny, které v rostlině ozářené vysokou dávkou UV-B pozorujeme jsou změny v biomolekulách. UV-B záření, které je absorbováno molekulami DNA vyvolává přerušování jejich řetězců, inserci párových bází a fototransformaci. Pod pojmem fototransformace DNA si můžeme představit vznik cyklobutanových pyrimidinových dimerů a pyrimidin (6-4) pyrimidinových dimerů (6-4 PP) (Obrázek 8). Hlavním problémem vzniku fototransformací je neschopnost polymeráz číst tyto fotoprodukty, což vede k narušení procesu replikace a transkripce a ohrožení správného fungování rostliny (Mackerness 2000).



Obrázek 8: Vznik Thymin dimeru po ozáření UV-B

Vysoké dávky UV-B záření ovlivňují i proteiny, které podléhají destrukci při UV fotolýze aromatických aminokyselin nebo vznikem reaktivní sulfhydrylové skupiny u cystinu. V souvislosti s aromatickými aminokyselinami můžeme zmínit například enzym Rubisco, který právě tyto aminokyseliny ve své struktuře obsahuje. Vysoké dávky UV-B záření způsobují jak snížení aktivity, tak snížení obsahu enzymu Rubisco, čímž dochází ke snížené tvorbě asimilátů (Hollósy 2002).

Velmi náchylné k poškození UV-B zářením jsou lipidy, zejména fosfolipidy a glykolipidy, které při ozáření UV-B za přítomnosti kyslíku podléhají lipoperoxidaci. Lipoperoxidace je destruktivní proces membránových lipidů, který vede ke vzniku sekundárních metabolitů jako jsou 4-hydroxy-2-alkenaly, hydroxyaldehydy, 4-hydroxy-2-nonenaly (HNE) nebo 4-hydroxy-2-hexenaly (HHE), které umocňují míru oxidativního stresu v rostlině. Poškození membránových lipidů je dnes snadno stanovitelné pomocí kvantifikace markeru oxidativního poškození membrán – malondialdehydů (MDA). Malondialdehydy deaktivují proteiny membrán a narušují tak její fluiditu (Hollósy 2002).

Ačkoliv má UV-B záření dopad na mnoho struktur v rostlině, zdá se, že jedním z důležitějších cílů UV-B záření je fotosyntetický aparát, který zodpovídá za fotosyntetické funkce. Hlavními negativními dopady na fotosyntetický aparát jsou inhibice biosyntézy chlorofylu, inaktivace fungování reakčních center LHCII, fotosystému PSII a toku elektronů. Vysoce citlivé struktury fotosyntetického aparátů na UV-B záření jsou thylakoidová membrána a OEC (oxygen evolving complex). U OEC je to především Mn klastr, který je nejlabilnějším prvkem elektronového transportního řetězce. V PSII jsou velmi citlivé na UV-B záření proteiny D1 a D2 – hlavní proteiny reakčního centra. Za normálních podmínek je tvorba a degradace těchto proteinů v rovnováze, ale se zvýšenou expozicí UV-B záření dochází ke zvýšené degradaci, což narušuje celou rovnováhu systému (Singh et al. 2017).

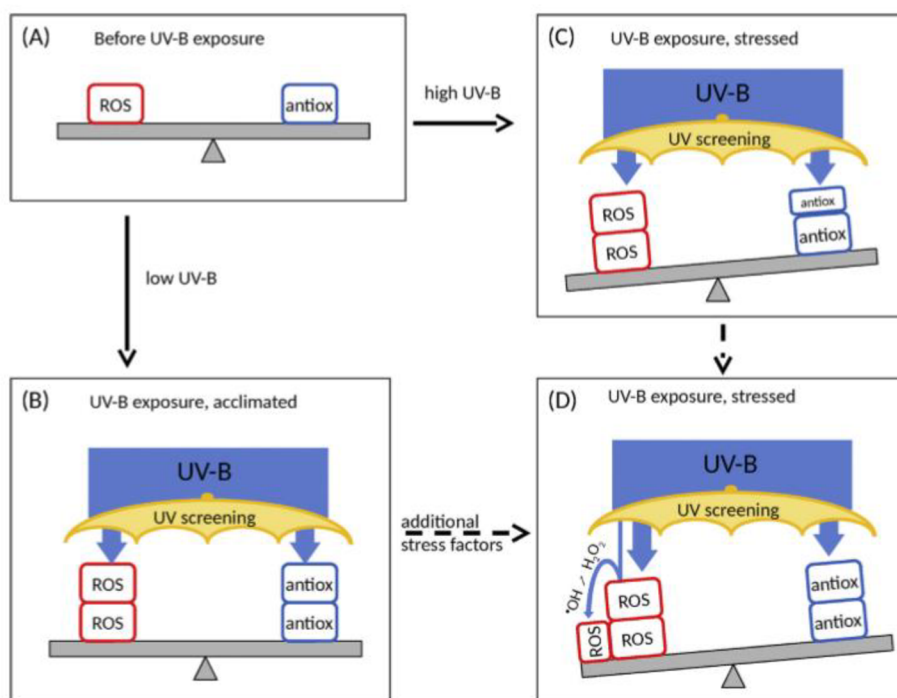
UV-B může také ovlivnit množství průduchů, jejich zavírání a vodivost ve smyslu snížení asimilace oxidu uhličitého (CO₂). Vysoké dávky UV-B přímo ovlivňují průduchy působením na mechanismy svěracích buněk (Nogués et al. 1999).

1.4 Oxidační stres a reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou nejdůležitější skupinou reaktivních molekul, které zahrnují jak volné radikály, tak neradikálové formy. Volné radikály byly původně popsány jako meziprodukty v organické a anorganické chemii. Mají jeden nebo více nepárových elektronů, což vede k vysoké reaktivitě. Vznikají, když atom nebo molekula ztratí nebo získá jeden elektron, nebo během homolitického štěpení kovalentní vazby. Pokud však dva volné radikály sdílejí své nepárové elektrony, vytvoří se neradikálový druh. Z fyziologického hlediska je nejvýznamnější hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), superoxidový aniontový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$), organické alkoxylové ($\text{RO}\bullet$) a organické peroxylové ($\text{ROO}\bullet$) radikály. Neradikálové formy nemají nepárové elektrony, ale jsou také vysoce reaktivní. Patří mezi ně peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), kyselina chlorná (HClO) a ozón (O_3) (Apel et Hirt 2004).

ROS jsou běžnými produkty metabolismu, které vznikají nejčastěji v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech a endoplasmatickém retikulu. Hlavním zdrojem ROS v rostlinách je fotosyntéza, přesněji elektronový transportní řetězec (ETC) a fotorespirace v peroxisomech. Fotosystémy v ETC, PSII a PSI generují $^1\text{O}_2$ a $\text{O}_2^{\bullet-}$ v rámci tzv. Mehlerovy reakce (Apel et Hirt 2004).

V místě vzniku ROS by se měly vyskytovat anioxidanty, které zabraňují interakci volných radikálů s biologickými molekulami. Tvorba ROS a jejich následná eliminace antioxidačními procesy jsou v rovnováze, pokud na rostlinu nepůsobí stres. Tato rovnováha může být narušena různými environmentálními faktory, a pokud míra stresového faktoru a s ním spojená tvorba ROS převažuje nad antioxidačními procesy, dochází k oxidaci biomolekul jako je peroxidace lipidů, poškození proteinů, oxidaci jednotlivých nukleotidů DNA a RNA, inhibici enzymů a aktivaci apoptózy (Obrázek 9) (Dumanović et al. 2021).

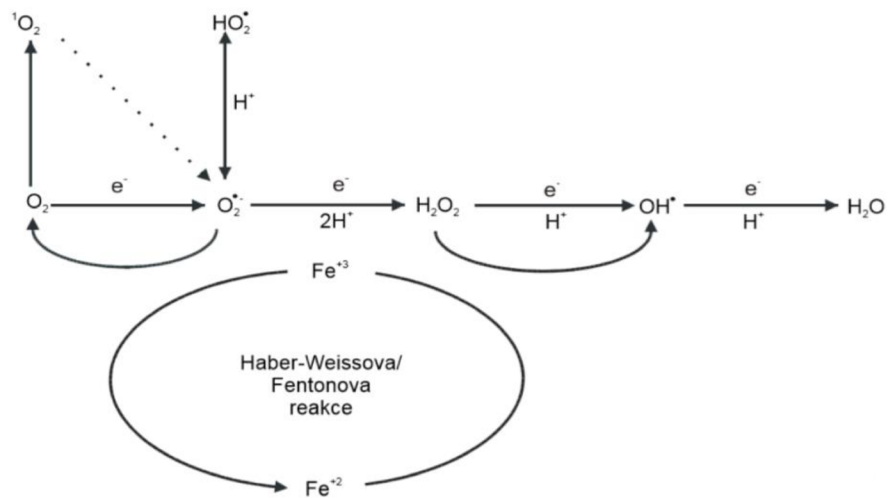


Obrázek 9: Rovnováha mezi produkcí ROS a aktivitou a kapacitou antioxidantů před (A) a během (B-D) ozáření UV-B (Czégény 2016)

Jeden z předně studovaných ROS je peroxid vodíku. Množství H_2O_2 v peroxisomech se za fyziologických podmínek pohybuje kolem $1 \mu\text{mol}$ na gram čerstvé hmotnosti, tj. $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Černý et al. 2018). Dále se přirozeně vyskytuje v apoplastu, kde se účastní oxidace fenolických sloučenin a následně polymerizace a tvorby ligninu v buněčné stěně. V nízkých koncentracích může fungovat jako difúzní signální molekula, která se účastní přenosu signálů a zprostředkovává aktivaci exprese genů. Ve vysokých koncentracích, tedy v rozmezí $10\text{--}100 \mu\text{mol l}^{-1}$ je pro buňky ale už toxický a způsobuje stárnutí nebo apoptózu buňky. Peroxid vodíku je velmi nebezpečný, protože dokáže procházet přes buněčné membrány přes peroxiporiny a jeho reakce s Fe^{2+} nebo Cu^+ vede k tvorbě silnějších toxických látek, jako je $\bullet\text{OH}$. Kromě toho je H_2O_2 již dlouho uznáván jako silný inhibitor fotosyntézy, protože i při nízkých koncentracích ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$) může inhibovat fixaci CO_2 oxidačními enzymy zahrnutými v Calvinově cyklu o 50 % (Foyer a Noctor 2016; Apel a Hirt 2004).

Hydroxylový radikál je považován za nejúčinnější oxidant, protože má krátký poločas rozpadu, velmi pozitivní redoxní potenciál a vysokou, neselektivní afinitu k biomolekulám. Oxiduje DNA, proteiny, lipidy, aminokyseliny, cukry nebo kovy, čímž způsobuje rozsáhlé poškození a genetickou nestabilitu. Vzniká ve Fentonově reakci z H_2O_2 v přítomnosti iontů železa nebo mědi (Obrázek 10) (Apel et Hirt 2004).

Superoxidový aniontový radikál ($O_2^{\bullet-}$) je krátce žijící a málo reaktivní forma kyslíku, která není schopna prostupovat přes buněčné membrány (Slováková et Mistrík 2007). Je to buňkou generovaný ROS, který spouští kaskádu reakcí a tím i tvorbu sekundárních ROS přímo, nebo prostřednictvím enzymatických a kovem katalyzovaných procesů. Vzniká jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku v buňce a rychle se mění na H_2O_2 a O_2 aktivitou superoxid dismutázy, která zabraňuje jeho hromadění (Dumanović et al. 2021).



Obrázek 10: Vzájemná konverze reaktivních forem kyslíku (ROS) odvozených z molekuly kyslíku (Piterkova et al. 2005)

1.5 Ochrana rostlin před UV-B

Pokud jsou rostlinné buňky vystaveny UV-B záření, pak se stejně jako při jakémkoliv jiném environmentálním stresu aktivují obranné mechanismy. Tyto mechanismy působí buď tak, aby zabránily absorpci škodlivého a nadměrného záření, nebo aby zmírnily škody, které záření může způsobit, jakmile je absorbováno. Obranné mechanismy na morfologické a anatomické úrovni zahrnují zvýšení obsahu epikutikulárních vosků, zvětšení tloušťky kutikuly, širší vrstvu epidermis a palisádového mezofylu nebo zvýšení tvorby trichomů (Singh et al. 2017).

Ochranné reakce vznikající na cytologické úrovni zahrnují sadu opravných komplexů, mezi které patří fotoreaktivace, nebo opravy vyřezáváním a rekombinacemi DNA. Fotoreaktivace kombinací UV-A a modrého světla způsobuje monomerizaci dimerů pomocí fotolyázy, která pomocí světelné energie ruší vazby mezi cyklobutanovými kruhy, čímž se obnovuje základní integrita. Zatímco vyřezávání se provádí endonukleolytickým štěpením, kterým se uvolní nukleotidy poškozené UV-B zářením, a potom se řetězec resyntetizuje. (Parihal et al. 2015).

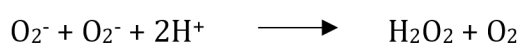
Další reakcí při působení UV-B záření je produkce sekundární metabolitů, především fenolových sloučenin, které hrají hlavní roli při ochraně rostlin před poškozením tím, že UV-B záření absorbují. Nejběžnějšími fenolickými sloučeninami jsou flavonoidy produkované fenypropanoidovou cestou. Flavonoidy jsou ve vodě rozpustné flavonové a flavonolové glykosidy nebo jejich deriváty – zejména kaempferol a kvercetin. Nacházejí se ve vakuolách a jsou produkovány především v epidermálních vrstvách listů. Kromě toho, že jsou schopny absorbovat UV-B záření, umožňují pronikat PAR vnějšími vrstvami buněk až do chloroplastů, aby podporovaly fotosyntézu v mezofylu listu. Další protektivní vlastností fenolických sloučenin je jejich antioxidační schopnost.

Aktivace antioxidačního systému je druhou obrannou reakcí na zvýšené ozáření UV-B. Tento systém se skládá z enzymatických a neenzymatických vychytávajících procesů ROS, čímž se rostlinné buňky chrání před oxidačním poškozením. Neenzymatický vychytávající systém zahrnuje antioxidanty s nízkou molekulovou hmotností jako je askorbát (AsA), glutathion (GSH), karotenoidy, prolin a fenolové sloučeniny (Apel a Hirt 2004). V enzymatickém antioxidačním systému jsou zapojeny superoxid dismutáza (SOD), askorbát peroxidáza (APX), glutathion peroxidáza (GPX) a kataláza (CAT). V rostlinách se nachází více než 150 genů kódujících různé antioxidační enzymy, přičemž všechny jsou kódované jaderným genomem. Změny v expresi těchto genů slouží jako mechanismus na úpravu hladiny antioxidantů (Apel et Hirt 2004).

1.6 Enzymatické antioxidanty

1.6.1 Superoxid dismutáza (SOD)

Enzym SOD se vyskytuje ve všech aerobních buňkách a subcelulárních kompartmentech citlivých na oxidační stres (Obrázek 12). Považuje se za první úroveň ochrany proti ROS. Geny, které kódují SOD jsou citlivé na environmentální stresory a zvýšená aktivita obvykle koreluje se zvýšenou tolerancí rostlin na daný environmentální stres. SOD je schopna katalyzovat rychlou dismutaci $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 (Obrázek 11) a tím snižuje nebezpečí tvorby $\bullet OH$ prostřednictvím reakcí katalyzovaných kovy.



V rostlinách se SOD vyskytuje ve třech formách metaloenzymů, které se liší kovovým kofaktorem přítomným v aktivním centru. Nejhojnějším izoenzymem, nacházejícím se ve stromatu chloroplastů, cytosolu, peroxisomech a apoplastu je Cu/Zn-SOD. Druhou formou je Mn-SOD, který je exprimován hlavně v mitochondriích a peroxisomech, ale byl také detekován v apoplastu a buněčné stěně. Třetí typ je Fe-SOD přítomný v menší míře především v chloroplastovém stroma určitých druhů rostlin (Dumanović et al. 2021). Všechny tři typy SOD jsou kódované jádrem. Regulace všech izoenzymů je nezávislá na stupni oxidačního stresu působícího v jednotlivých subcelulárních částech, ale mechanismus na molekulární úrovni je doposud neznámý. Předpokládá se, že reakci spouští produkty peroxidace lipidů, které difundují z místa poškození k jádru a vyvolávají transkripci specifických SOD genů. Jednotlivé typy SOD odpovídají různě na různé stresy a pravděpodobně se účastní přenosu signálů v intracelulárních signálních drahách (Slováková et Mistrík 2007).

1.6.2 Kataláza (CAT)

Kataláza je enzym, který má schopnost regulovat intracelulární hladiny H_2O_2 jeho rozkladem na vodu a kyslík.

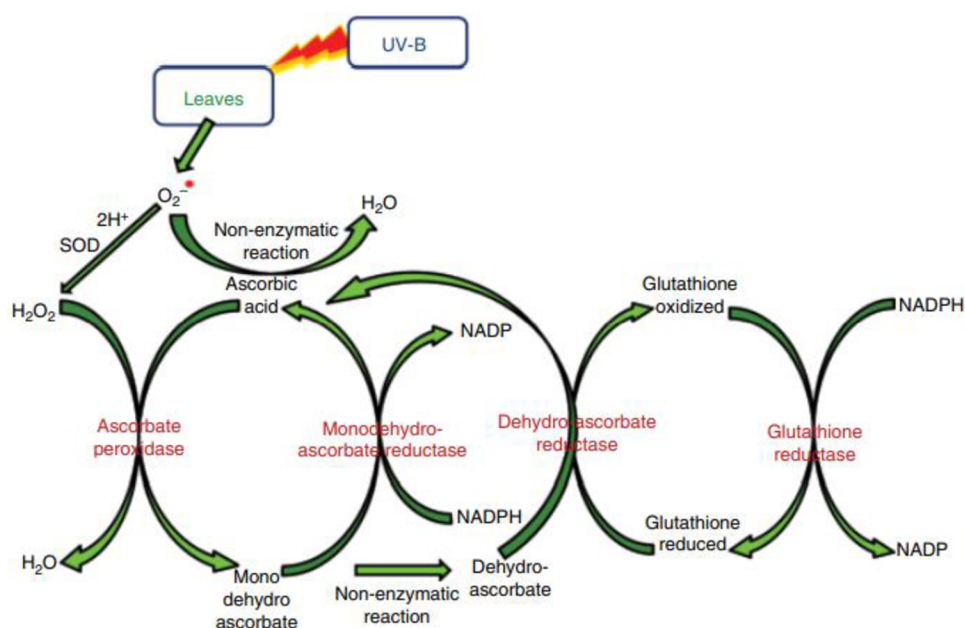


Ve velkém množství se vytváří v peroxisomech, kde zachycuje H_2O_2 , který zde vzniká procesem fotorespirace a β -oxidace mastných kyselin (Obrázek 12). Katalázy obsahují čtyři hemové podjednotky s Fe^{2+} ionty, které procházejí oxidací a katalyzují disociaci dvou molekul H_2O_2 na vodu a kyslík. Jedna molekula katalázy dokáže za jednu sekundu rozložit až 0,1 miliónu molekul H_2O_2 na vodu a kyslík, přičemž se její afinita k této molekule pohybuje řádově v mM (Arora et al. 2002).

1.6.3 Peroxidázy

Peroxidázy jsou oxidoreduktázy, které katalyzují oxidaci rozličných skupin organických látek s využitím H_2O_2 jako konečného akceptoru elektronů. Dle sekvence aminoalkanové kyseliny se dělí do tří tříd. Nejvýznamnější z nich je askorbát peroxidáza (APX) a to zejména kvůli distribuci svých izoenzymů až do pěti buněčných kompartmentů: stroma (sAPX) a tylakoidy (tAPX) v chloroplastech, mikrotělíška (včetně glyoxysomů a peroxisomů; mAPX), cytosol (cAPX) a mitochondrie (mitAPX), jako membránově vázaná forma (Obrázek 12). V porovnání s CAT, APX má nižší afinitu k H_2O_2 (řádově v μM) a sehrává významnější úlohu v regulaci tvorby ROS. Podílí se na tzv. jemném modulování hladiny ROS, které následně plní důležitou signální úlohu v rámci rostlinného organismu. APX využívá askorbát (AsA) v askorbát-glutathionovém cyklu jako svého specifického donora elektronů k redukci H_2O_2 na vodu se současnou generací monodehydroaskorbátu (MDAsA). MDAsA reduktáza (MDAR) redukuje MDAsA na AsA s pomocí NAD(P)H. Dehydroaskorbát (DHA) je produkován spontánně MDAsA a může být redukován na askorbát DHA reduktázou (DHAR) s pomocí redukovaného glutathionu (GSH), který je oxidován na GSSG (oxidovaný glutathion). Cyklus je zakončen glutathion reduktázou (GR), která mění GSSG zpátky na GSH za pomoci NAD(P)H (Obrázek 11) (Dumanović et al. 2021).

Glutathion peroxidáza (GPX) následně mění H_2O_2 na vodu za použití redukujících ekvivalentů z GSH. Oxidovaný GSSG je znovu přeměněn pomocí GR a NAD(P)H na GSH a NAD(P) (Obrázek 11). GPX mimo jiné odstraňuje také produkty peroxidace lipidů a zároveň představuje hlavní zdroj ochrany proti nízkým hladinám oxidačního stresu (Shigeoka et al. 2002).



Obrázek 11: Schéma vychytávání kyslíkových radikálů v askorbát-glutathionovém cyklu (Kataria 2017)

1.7 Neenzymatické antioxidanty

1.7.1 Askorbát (AsA)

Kyselina askorbová neboli askorbát, je díky své schopnosti darovat elektrony v enzymatických i neenzymatických reakcích považován za velmi silný antioxidant. Může přímo zachycovat $\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2\bullet$ a také redukovat H_2O_2 na vodu prostřednictvím askorbát-glutathionového cyklu. AsA se vyskytuje ve všech subcelulárních kompartmentech – cytoplazmě, buněčné stěně nebo stromatu chloroplastů (Obrázek 12). Výjimku tvoří vakuola, kde je přítomen pouze v nízkých koncentracích (Dumanović et al. 2021)

1.7.2 Glutathation

Tripeptid, γ -glutamyl-cysteinyl glycin, nejhojnější thiol, byl nalezen ve velkém množství v každém buněčném kompartmentu: cytosolu, chloroplastech, endoplazmatickém retikulu, vakuolách a mitochondriích (Obrázek 12). Redukovaná forma glutathionu, GSH, hraje důležitou roli v různých biologických procesech, včetně buněčného růstu, vývoje, regulace transportu síry, signální transdukce, syntézy proteinů a nukleových kyselin, syntézy fytochelatinů pro chelataci kovů, xenobiotické detoxikace a exprese genů odpovědných za stres. Jako antioxidant, GSH spolu se svou oxidovanou formou GSSG udržuje redoxní rovnováhu v buňce. GSH má nízkou relativní molekulovou hmotnost a vysoký redukční potenciál. Mohl by tedy vychytávat H_2O_2 nebo reagovat neenzymaticky s $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2\bullet$ a $\bullet\text{OH}$. Jeho hlavní úlohou je ale napomáhat regeneraci jiného, silného, hydrofilního antioxidantu AsA prostřednictvím askorbát-glutathionového cyklu tím, že pomáhá recyklovat oxidovaný AsA do redukovaného stavu (Dumanović et al. 2021).

1.7.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou skupinou isoprenoidních sloučenin zahrnujících širokou škálu struktur, u kterých rozlišujeme dvě hlavní třídy. Neokysličené karotenoidy nazývané karoteny (např. β -karoten a lykopen) a jejich deriváty obsahující kyslík, nazývané xantofyly (např. lutein a zeaxanthin) (Havaux 2014). Karotenoidy jsou lipofilní antioxidanty schopné detoxikovat ROS. Zachycují lipidový peroxylový radikál (LOO), se kterým reagují a tvoří lipidový hydroperoxid (LOOH) a karotenoidní radikál. Karotenoidní radikál je následně regenerován tokoferolem (Dumanović et al. 2021). Nedávno se objevila nová funkce karotenoidů, která souvisí s reakcí rostlin na environmentální stresy. Reaktivní formy kyslíku, zejména $^1\text{O}_2$ produkované v chloroplastech za stresových podmínek, mohou oxidovat karotenoidy, což vede k řadě oxidovaných produktů, včetně aldehydů, ketonů, endoperoxidů a laktonů. Některé z těchto derivátů karotenoidů, jako je těkavý β -cyklocitral, odvozený z oxidace β -

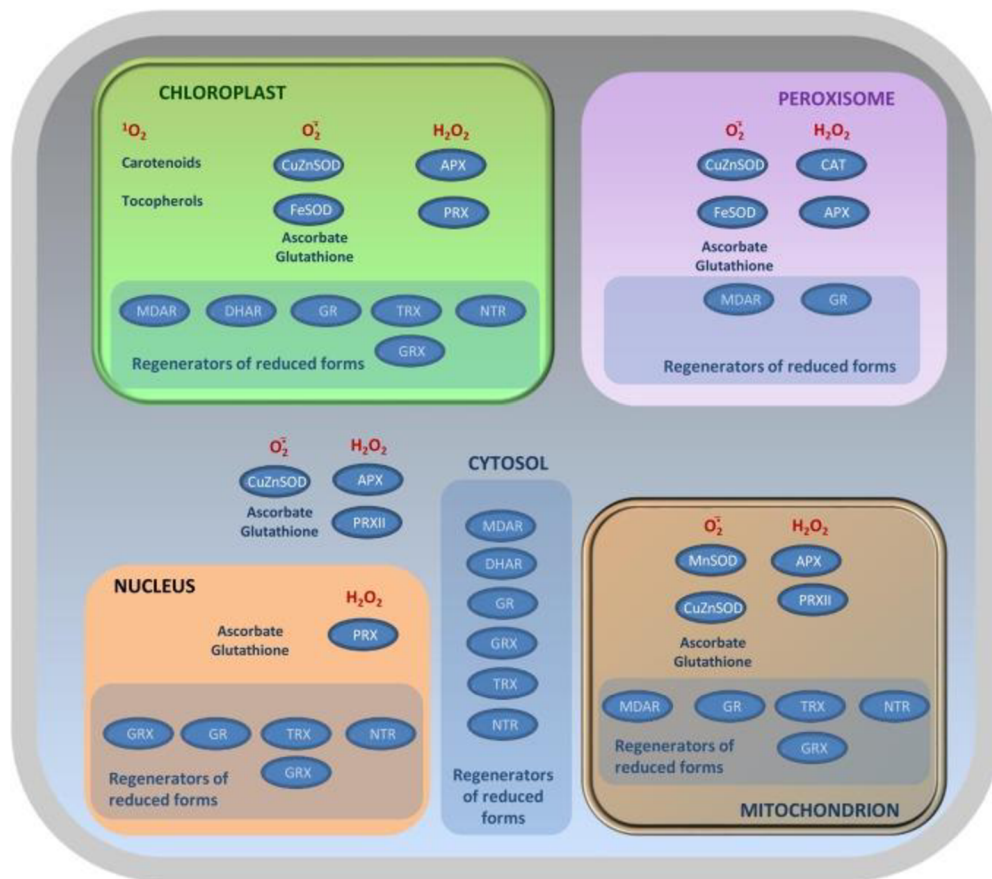
karotenu, jsou reaktivní elektrofilní druhy, které jsou bioaktivní a mohou vyvolat změny v genové expresi, vedoucí k aklimatizaci na stresové podmínky (Obrázek 12) (Havaux 2014).

1.7.4 Tokoferoly

Tokoferoly jsou molekuly rozpustné v tucích, které patří do skupiny sloučenin vitamínu E. Tokoferoly jsou syntetizovány fotosyntetickými organismy a jsou přítomny pouze v zelených, fotosynteticky aktivních částech rostliny (Obrázek 12). Antioxidační aktivita tokoferolu je dána vlastnostmi donoru elektronů chromanolového kruhu. Tyto antioxidanty chrání lipidy a další membránové složky fyzikálním zachycením a chemickou reakcí s $^1\text{O}_2$ v chloroplastech, čímž zachovávají strukturu a výkonnost PSII. Metoda zachytu $^1\text{O}_2$ je extrémně účinná a bylo odhadnuto, že 1 molekula α -tokoferolu může *in vitro* neutralizovat až 220 molekul $^1\text{O}_2$ před jeho degradací (Dumanović et al. 2021). Rozlišujeme čtyři formy tokoferolů (α -, β -, γ -, δ -) na základě počtu a polohy methylových substituentů na aromatickém kruhu. Nejvyšší biologickou aktivitou disponuje α -tokoferol, který obvykle tvoří více než 90 % listového obsahu vitamínu E. Z těchto charakteristik vyplývá, že je α -tokoferol pro rostliny nezbytný, především díky svým antioxidačním aktivitám, které udržují integritu buněčných membrán při konfrontaci se stresy a v reakci na oxidační stres (Ma et al. 2020).

1.7.5 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou rozmanitou skupinou sekundárních metabolitů (flavonoidy, taniny, hydroxyskořicové estery, lignin atd.) produkované rostlinou. Fenoly se vyznačují alespoň jedním aromatickým kruhem nesoucím jednu nebo více hydroxylových skupin. Jsou syntetizovány především z kyseliny skořicové. Antioxidační kapacita fenolů souvisí s jejich strukturou, která je velmi vhodná k zachycování volných radikálů. V porovnání s AsA nebo α -tokoferolem mají mnohem větší aktivitu, protože mají schopnost darovat atom elektronu nebo vodíku a následně rychle stabilizovat vzniklý fenolový radikál. Rostliny akumulují UV-absorbující flavonoidy a další fenolické sloučeniny především ve vakuolách epidermálních buněk, aby se zabránilo pronikání UV-B do hlubších tkání rostliny (Dumanović et al. 2021).



Obrázek 12: Umístění antioxidačního systému v rostlinné buňce. APX, askorbát peroxidáza; CAT, kataláza; DHAR, dehydroaskorbát reduktáza; MDAR, monodehydroaskorbát reduktáza; GR, glutathion reduktáza; GRX, glutaredoxin; SOD, superoxid dismutáza; NTR, NADPH-thioredoxin reduktáza; PRX, peroxiredoxin; TRX, thioredoxin (Noctor et al. 2018)

1.8 Křemík

Křemík (chemická značka Si, latinsky *Silicium*) je polokovový, po kyslíku druhý nejhojnější prvek na zemi, hojně se vyskytující v zemské kůře. V přírodě je všudypřítomný v různých chemických formách a jeho obsah v půdách se liší od <1 do 45 % suché hmotnosti. Rostliny jsou schopny přijímat Si ve formě kyseliny křemičité $[\text{Si}(\text{OH})_4]$, nebo v její ionizované formě $\text{Si}(\text{OH})_3\text{O}^-$. Ačkoliv se Si nepovažuje za prvek nezbytný pro životní cyklus rostliny, nachází se v nich v koncentracích od 0,1 do 10 %, což je ekvivalentní nebo dokonce větší množství, než je zastoupení některých makroživin (Currie et Perry 2007).

1.8.1 Výskyt a transport v rostlině

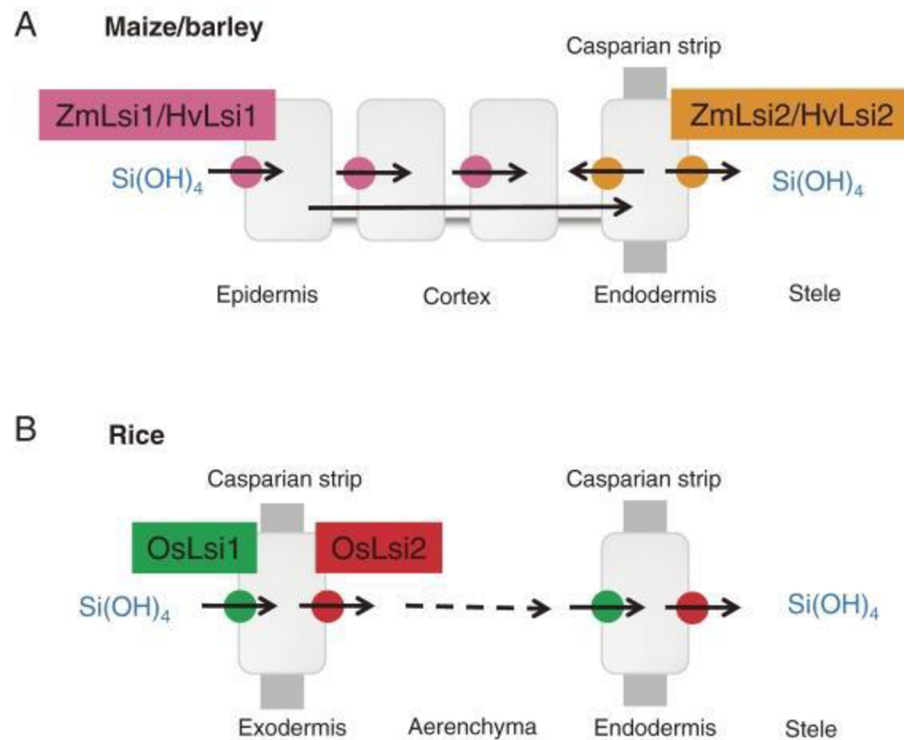
Výskyt Si v rostlině je výsledkem jeho absorpce ve výše uvedených formách z půdy a jeho řízená polymerace na konečném místě. Rozdíl mezi akumulací Si různými rostlinnými druhy je speciální schopnost kořenů přijímat Si. Schopnost rostlin akumulovat Si se výrazně liší mezi jednotlivými druhy, ale bylo zjištěno, že akumulace křemíku je ve větší míře v jednoděložných rostlinách. Rostliny čeledí Poaceae, Equisetaceae a Cyperaceae vykazují vysoké akumulace Si (0,4% Si v sušině), Cucurbitales, Urticales a Commelinaceae vykazují střední akumulaci Si (2 - 4% Si v sušině), zatímco většina ostatních druhů vykazuje malou akumulaci (Hodson et al. 2005). Velký rozdíl v akumulaci Si byl pozorován také v různých částech stejné rostliny. Dobrým příkladem je variace obsahu Si v rýži - 0.5 g kg⁻¹ v leštěné rýži, 50 g kg⁻¹ v otrubách, 130 g kg⁻¹ ve slámě, 230 g kg⁻¹ v rýžových slupkách a 350 g kg⁻¹ v rýžových nodech (Van Hoest 2006).

Při příjmu Si do rostliny se tvoří fytolity nebo křemičitá tělesa, která vyplňují buněčné stěny a lumen určitých rostlinných buněk (Currie et Perry 2007). Křemík se sdružuje s rostlinnými pletivy jako amorfní hydratovaný opalinový oxid křemičitý ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$) a ukládá se v celé rostlině: buněčných stěnách, lumenech, intracelulárních prostorech, kořenech, listech a reprodukčních orgánech (Richmond et Sussman 2003). Rostlinný oxid křemičitý se ukládá *in situ* a po uložení se již nepřemísťuje (Cooke et Leishman 2011). Proces srážení biogenního oxidu křemičitého je označován jako silicifikace. Silicifikace koreluje s rychlostí transpirace pletiva, pravděpodobně pasivním pohybem kyseliny křemičité s vodou a polymerací oxidu křemičitého, jak se voda odpařuje. Je známo, že oxid křemičitý se asociuje s buněčnou stěnou a že specifické makromolekuly mohou určovat jeho uložení. Ukázalo se, že s ukládáním oxidu křemičitého jsou spojeny celulózové a necelulózové polysacharidy a aromatická makromolekula ligninu (Guerriero et al. 2020). Law et Exley (2011) ve své studii zkoumali roli kalózy (polysacharidu buněčné stěny) při určování depozice oxidu křemičitého a prokázali, že silicifikace v přesličce rolní (*Equisetum*

arvense) následuje úložiště kalózy. Mechanismus ukládání buněčné stěny může být pasivní a podporovaný gelovou povahou specifických složek buněčné stěny (jako je kalóza), které zachycují kyselinu křemičitou v mikroprostředí příznivém pro autokondenzaci na oxid křemičitý (Law a Exley 2011). Zatím není známo, zda silicifikace „upřednostňuje“ konkrétní makromolekuly buněčné stěny, nebo zda může být proces spuštěn jakýmkoli typem makromolekuly buněčné stěny (Guerriero et al. 2020).

Schopnost rostlin absorbovat oxid křemičitý se liší podle druhu. Původně Takahashi et al. (1990) navrhl tři metody absorpce křemíku: aktivní, pasivní a odmítavý. Podrobnější zkoumání absorpce Si u několika druhů rostlin vedlo k objasnění různých způsobů absorpce a transportu kyseliny křemičité. Transportní a distribuční systém ve vyšších rostlinách by se dal rozdělit na tři části: 1. příjem a radiální transport v kořeni, 2. xylémový a mezivaskulární transport a 3. přechod Si z xylému a ukládání v listu na základě spolupráce influx a eflux transportních proteinů (Yan et al. 2018). Podrobněji se zkoumal příjem Si v rostlinách rýže. Bylo zjištěno, že za příjem Si v rýži jsou zodpovědné dva geny (*Lsi1* a *Lsi2*) kódující transportéry Si (Ma et Yamaji 2006). Transportér s nízkou afinitou *Lsi1* patří do hlavní podrodiny vnitřních proteinů podobných Nod26 v aquaporinu. Je lokalizován na distální straně exodermis a endodermis v kořenech rýže. *Lsi1* je zodpovědný za absorpci kyseliny křemičité z vnějšího roztoku do kořenových kortikálních buněk. *Lsi2* je lokalizován ve stejných buňkách jako *Lsi1*, ale na proximální straně. Představuje efluxní transportér odpovědný za transport Si z kořenových buněk do apoplastu, je tedy zodpovědný za odtokovou transportní aktivitu. Pro efektivní příjem Si v rýži je nutné spojení *Lsi1* s *Lsi2* (Ma et Yamaji 2008). Bylo zjištěno, že influxní a efluxní transportní proteiny v ječmeni a kukuřici (*HvLsi1/ZmLsi1* a *HvLsi2/ZmLsi2*, v pořadí) jsou lokalizovány v odlišných buňkách než u rýže (Obrázek 13). *HvLsi1/ZmLsi1* je polárně lokalizován v epidermálních, hypodermálních a kortikálních buňkách na distální straně, zatímco *HvLsi2/ZmLsi2* je lokalizován výhradně v endodermis bez polarity. Tím, že se liší lokalizace transportních proteinů, liší se i dráhy transportu Si z vnějšího prostředí do xylému. V rýži je Si přijímán z vnějšího prostředí transportérem *OsLsi1* na distální straně a uvolněn do apoplastu aerenchymu transportérem *OsLsi2* na proximální straně exodermálních buněk. Do stéle je Si transportován jak *OsLsi1*, tak *OsLsi2* skrz endodermální buněčnou vrstvu. U kořenů ječmene a kukuřice je Si přijímán z vnějšího roztoku pomocí *HvLsi1/ZmLsi1* lokalizovaného na distální straně epidermálních a kortikálních buněk a poté je symplasticky transportován do endodermis a následně uvolněn efluxním *HvLsi2/ZmLsi2* transportérem s následným apoplastickým transportem do stéle (Yan et al. 2018).

Za transport kyseliny křemičité z xylému do buněk xylémového parenchymu je zodpovědný specifický transportér Lsi6. Gen kódující transportér Lsi6 byl charakterizován u rýže (*OsLsi6*) (Yamaji et al. 2008), ječmene (*HvLsi6*) (Yamaji et al. 2012) a kukuřice (*ZmLsi6*) (Mitani et al. 2009). Stejně jako *OsLsi6*, *ZmLsi6* a *HvLsi6* se také exprimují v kořenech i výhoncích a vykazují polární lokalizaci v buňkách xylémového parenchymu, které sousedí s cévami jak v pochvách listů, tak v listových čepelích (Yan et al. 2018).



Obrázek 13: Schematický model transportního systému Si v kukuřici/ječmeni a rýži (Mitani et al. 2009)

Poté co byla kyselina křemičitá translokována do výhonků, jak je uvedeno výše, je dále koncentrována ztrátou vody odvozené z transpiračního procesu a poté polymerována na amorfní oxid křemičitý $(\text{SiO}_2)_n \times n\text{H}_2\text{O}$. Amorfní oxid křemičitý se zdá být prakticky jedinou formou Si nahromaděného hlavně na buněčných stěnách listů, stonků a slupek. V menší míře může být také uložen v buněčné stěně buněk endodermis kořenů a hlíz. V buněčných stěnách pokožky listů může hydratovaný amorfní polymer tvořit dvojité vrstvy kutikuly a může být také uložen ve specifických silicifikovaných buňkách (Yan et al. 2018).

Dalšími rostlinami zkoumanými pro jejich absorpci kyseliny křemičité byly okurky a rajčata, akumulátory střední a nízké úrovně. Bylo zjištěno, že u obou druhů je příjem kyseliny křemičité z prostředí zprostředkován transportérem se stejnou afinitou ke kyselině

křemičité jako $\text{Lsi}1$. Za nižší absorpci Si v těchto rostlinách odpovídají rozdíly v hustotě transportéru v postranních kořenech. Rostliny jako okurky a rajčata používají pro transport Si do xylému pasivní difuzi (Mitani 2005).

1.8.2 Úloha křemíku v rostlinách

Křemík si v posledních letech získává pozornost v zemědělství kvůli mnoha příznivým účinkům na rostliny. Byla provedena stovka studií s několika druhy rostlin a za různých růstových podmínek, které prokázaly příznivé účinky hnojení Si, zejména při zmírňování biotických a abiotických stresorů. Křemík zvyšuje odolnost vůči chorobám způsobeným houbami, bakteriemi a škůdci (Wang et al. 2017). Může pomoci zmírnit vliv abiotických stresových faktorů na rostliny jako jsou poléhání, sucho, radiace, vysoká teplota, mráz nebo UV záření. Bylo prokázáno zmírnění negativního dopadu salinity v rýži a pšenici, toxicity Mn ve fazolích, toxicity Al v rýži, toxicity Fe v cukrové třtině nebo toxicity Cd u pšenice, rýže a kukuřice (Olle 2020). Od roku 2006, kdy došlo k objevu genů vysvětlujících molekulární mechanismy absorpce a transportu Si v rostlinách, se provedlo mnoho dalších výzkumů, které se pokouší vysvětlit, jak a proč přítomnost Si v rostlinách přináší výhody. Nejnáročnější aspekt spočívá v definování mechanistického modelu vysvětlujícího přesné mechanismy podílející se na toleranci stresu odvozené od Si. Bylo navrženo mnoho hypotéz, které se snažily vysvětlit jakou roli hraje Si v toleranci vůči stresu. Zatím ale neexistují žádné přesvědčivé důkazy, které by přesně ukazovaly na tyto mechanismy a současné úsilí o vyřešení této záhady zahrnuje komplexní analýzy vlivu suplementace Si na různé abiotické a biotické zátěže, biochemické a fyziologické parametry, společnou lokalizaci a distribuci minerálů a transkriptomické a metabolické reakce (Deshmukh et al. 2017).

1.8.3 Role křemíku ve stresových podmínkách

Role křemíku v abiotické stresové toleranci

Abiotický stres je jedním z nejzávažnějších omezení v růstu rostlin, zejména v této době, kdy kvůli změnám klimatu a nepředvídatelnému počasí jsou abiotické faktory stále běžnější a náročnější. Abiotický stres významně ovlivňuje fyziologické procesy vedoucí ke změně metabolických aktivit a celkovému zdraví rostlin. První reakce na většinu abiotických stresorů jako je například: slanost, sucho, UV stres nebo stres z těžkých kovů je generování ROS. Je známo, že tato reakce způsobuje vážné poškození buněčných struktur a organel a mění normální funkci buněk (Deshmukh et al. 2017).

Studie naznačují, že by aplikace Si mohla zmírnit toxicitu kovů, stres ze zasolení, sucha, teploty nebo UV-B záření. Prostředky, kterými Si tyto ochranné účinky aplikuje jsou stále předmětem zkoumání. Toxicita kovů včetně Mn, Cd, Al a Zn byla studována a navrhované

mechanismy působení Si zahrnují: akumulaci Zn jako silikátu, snížení peroxidace lipidů a zvýšení enzymatických a neenzymatických antioxidantů proti toxicitě Mn, zvýšené uvolňování fenolických látek se silnou chelatační schopností pro toleranci Al. Snížená transpirace a přítomnost silicifikovaných struktur může snížit tepelnou zátěž listů a poskytnou vyšší toleranci rostlin k vysokým teplotám. Bylo zjištěno, že odolnost vůči solnému stresu je způsobena posílením enzymů, jako je SOD a CAT, které brání oxidativnímu poškození membrány. A schopnost některých rostlin akumulovat Si a vytvářet dvojitou křemíkovou vrstvu v epidermis snižuje pronikání UV-B záření do hlubších vrstev buněk listu (Currie a Perry 2007).

Pro zkoumání pasivní a aktivní regulace přenosu Si, McLarnon et al. (2017) hodnotili některé fyziologické parametry u tří genotypů píce, lišících se schopností akumulovat Si. Jejich výsledky naznačují, že za normálních podmínek (kontrola) se rozdíly v odrůdách připisují vodivosti a transpiraci průduchů. Avšak při stresu (poranění) byla u všech tří genotypů zaznamenána zvýšená hladina Si. Tato reakce byla přičítána vyšší expresi genů transportéru Si. Tyto výsledky naznačují aktivní režim regulace absorpce Si za stresových podmínek. Stále však neexistují přesvědčivé důkazy o přímém aktivním zapojení Si do jakýchkoli metabolických procesů, které by mohly systematicky vysvětlit, jak Si reguluje buněčné procesy.

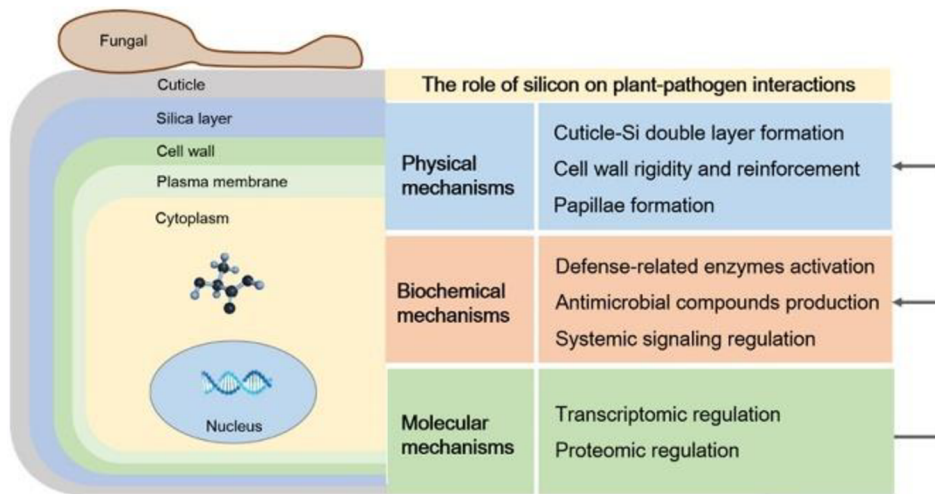
Role křemíku v biotické stresové toleranci

Role Si ve zvýšení tolerance na nemoci a patogeny jsou velmi dobře popsány. Wang et al. (2017) popsali ochranu rostlin zprostředkovanou Si na třech základních mechanismech (Obrázek 14). Za prvé, fyzikální mechanismy zahrnují tvorbu ochranných bariér. Křemíkem zvýšená odolnost je spojena s hustotou silicifikovaných dlouhých a krátkých epidermálních buněk, silnou vrstvou oxidu křemičitého pod kutikulou, dvojitou kutikulární vrstvou, zesílenou Si celulózovou membránou, tvorbou papil a komplexů vytvořené s organickými sloučeninami v epidermálních buňkách stěny, které rostliny mechanicky zpevňují. Fyzikální bariéry inhibují pronikání patogenů a činí rostlinné buňky méně náchylnými k enzymatické degradaci způsobené invazí houbových patogenů. Křemík se hromadí, a když se uloží pod kutikulu, může vytvořit dvojitou vrstvu kutikula-Si, aby se zabránilo pronikání patogenů, a tím se snížil výskyt onemocnění (Obrázek 15).

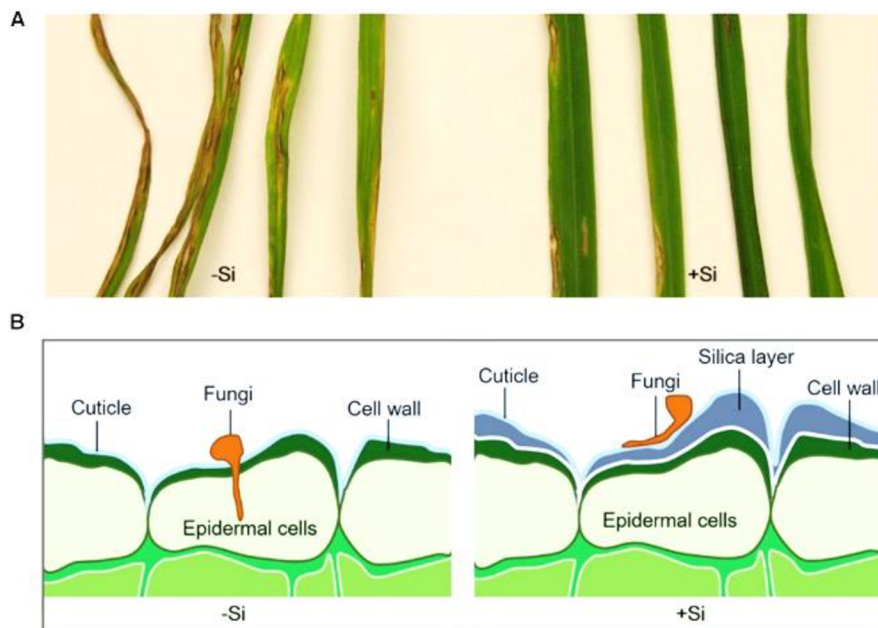
Druhý mechanismus je Si indukovaná biochemická rezistence během interakce rostlina-patogen, která zahrnuje: 1. zvýšení aktivity enzymů souvisejících s obranou, jako je polyfenol oxidáza, glukonáza, peroxidáza a fenylalaninamonium lyáza (PAL); 2. indukce produkce antimikrobiálních sloučenin, jako jsou fenolické látky, flavonoidy, fytoalexiny a

proteiny související s patogenezí (PR) v rostlinách; a 3. regulace syntézy systémových signálů, jako je kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) a etylén.

Za třetí se Si podílí na metabolických procesech interakce rostlina-patogen, aktivuje obranné geny hostitelských rostlin prostřednictvím řady fyziologických a biochemických reakcí a signálních transdukcí a také indukuje rezistentní reakci rostlin k prevenci chorob rostlin. Křemík může působit v primární odpovědi a modulovat aktivitu post-elicitačních, intracelulárních signálních systémů, které regulují expresi obranných genů souvisejících se strukturálními modifikacemi buněčných stěn, hypersenzitivními reakcemi, syntézou hormonů, syntézou antimikrobiálních sloučenin a PR proteinů (Wang et al. 2017).



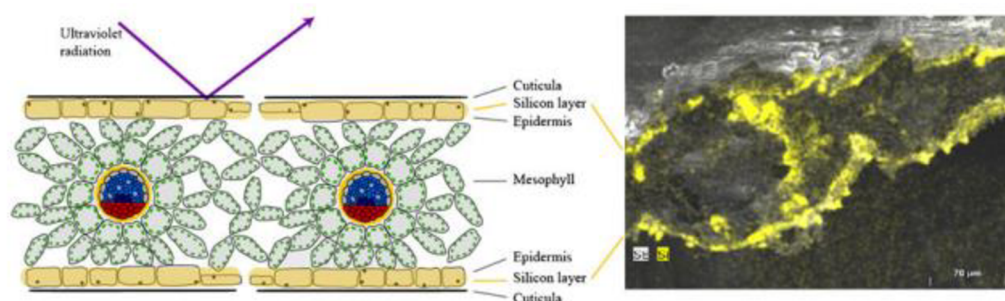
Obrázek 14: Tři základní úrovně ochrany rostlin zprostředkované křemíkem (Wang et al. 2017)



Obrázek 15: A) listy rýže naočkované *Magnaporthe grisea*; +Si -ošetřené křemíkem a -Si- neošetřené křemíkem; B) schéma vytvoření křemíkové vrstvy zvyšující odolnost vůči infekci (Wang et al. 2017)

1.8.4 Role křemíku při UV-stresu

Je dobře zdokumentováno, že zvýšený příjem Si snižuje negativní dopad UV-B záření u různých druhů rostlin včetně sóji, rýže a pšenice (Goto et al. 2003; Shen et al. 2010; Yao et al. 2011). Křemík může být imobilizován biomineralizací jako rostlinné opály (fytolity) v buněčné stěně, buněčném lumenu a v mezibuněčných prostorech nebo v amorfní formě jako dvouvrstva Si v epidermis (Currie a Perry 2007). Tato křemíková dvojvrstva je vyrobena z amorfního oxidu křemičitého, látky podobné sklu. O látkách podobných sklu je známo, že snižují propustnost UV záření, což ukazuje na potenciál Si pro UV-screening. Není však stále jasné, zda je zvýšená tvorba ochranné dvojvrstvy Si vytvářena v reakci na UV-B nebo je to pouze vedlejší účinek druhově specifických variací Si nahromaděných v rostlinách (Liang et al. 2015). Shena et al. (2010) prokázali, že aplikace Si snížila peroxidaci lipidů, aktivitu antioxidantních enzymů a tvorbu H_2O_2 v sazenicích sóji vystavených stresu z UV-B záření. Je také možné, že Si působí nepřímo zvýšením antioxidantních enzymových aktivit a tím přispívá k vyšší míře zhášení ROS. Dále by akumulace Si a tvorba ochranné dvojvrstvy mohla hrát roli v energetické bilanci rostliny. S ohledem na energetickou náročnost výroby látek absorbujících UV-B by mohla být tato vrstva alternativní ochranné opatření proti UV záření (Obrázek 16) (Schaller et al. 2013).



Obrázek 16: Vlevo: schéma řezu listu s křemíkovou vrstvou; vpravo: rozložení křemíku (žlutá barva) v suchých listech *Phragmites australis* zachycené elektronovým mikroskopem JEOL T 330A (Schaller et al. 2013)

2 Metodika

2.1 Metodika pěstování rostlin

Semena pšenice (*Triticum aestivum*, cv. Granny) jsme sterilizovali v 5% roztoku Sava po dobu 10 minut a promyli v destilované vodě. Následně jsme je nechali přes noc imbibovat v destilované vodě (Obrázek 17). Takto připravená semena jsme vyseli do písku a nechali klíčit 2 dny v růstové komoře ve tmě a následně 3 dny na světle (Obrázek 18). Po vyklíčení jsme uniformní jedince přenesli do polovičního Hoaglandova média, ve kterém jsme upravili pH na hodnotu 6,0. Po dvou dnech jsme poloviční médium vyměnili za celé Hoaglandovo medium, které jsme pak měnili každý druhý den po dobu osmi dnů. Pěstování probíhalo v růstové komoře Binder (KBW 720, Binder GmnH, Tuttlingen, Německo) za následujících podmínek: fotoperioda 12 h den/12 h tma, teplota 25 °C/20 °C, relativní vlhkost 60 %. Desátý den od nasazení sazenic byly rostliny ozářeny UV-B zářením využitím speciálních trubic (Repti Glo 5.0 30 W, Hagen, Německo) po dobu 30 minut a byly provedeny analýzy v časových intervalech 15, 30, 60 a 120 minut od orážení. Celková dávka záření představovala $0,7 \text{ W m}^{-2}$ ($1,3 \text{ kJ m}^{-2}$).

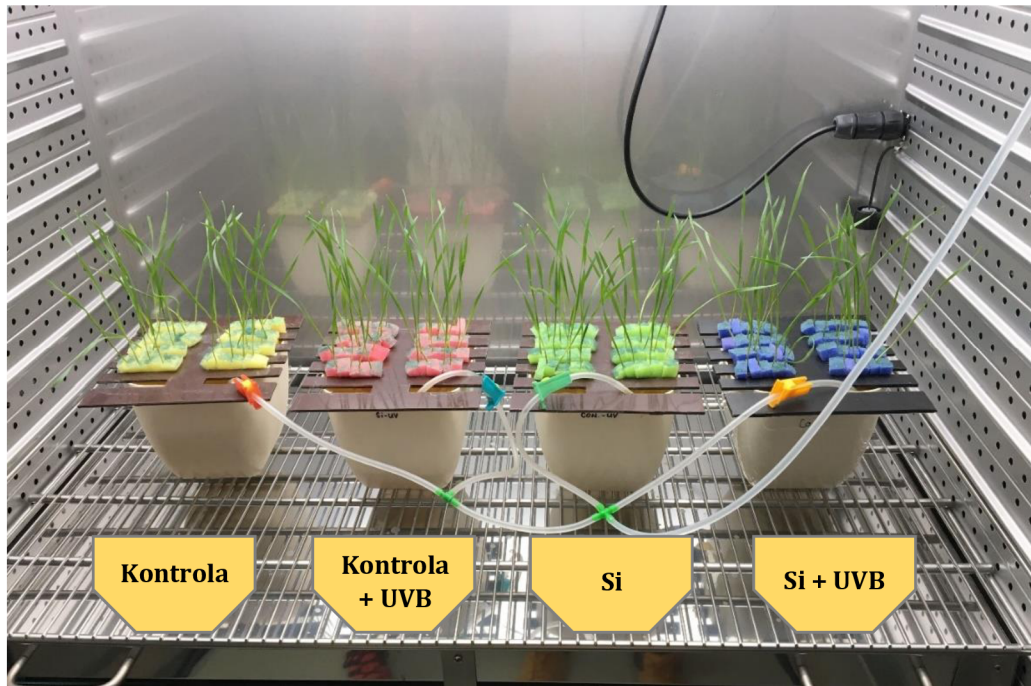
Celkově jsme připravili 4 varianty. První květináč sloužil jako kontrola a druhý květináč jsme později ozářili UV-B zářením. Do třetího a čtvrtého květináče jsme přidali křemík ($0,4 \text{ ml l}^{-1}$ media) ve formě křemičitého skla. Čtvrtý květináč jsme opět později ozářili UV-B (Obrázek 19).



Obrázek 17: Imbibace semen pšenice seté



Obrázek 18: Klíčení semen pšenice seté

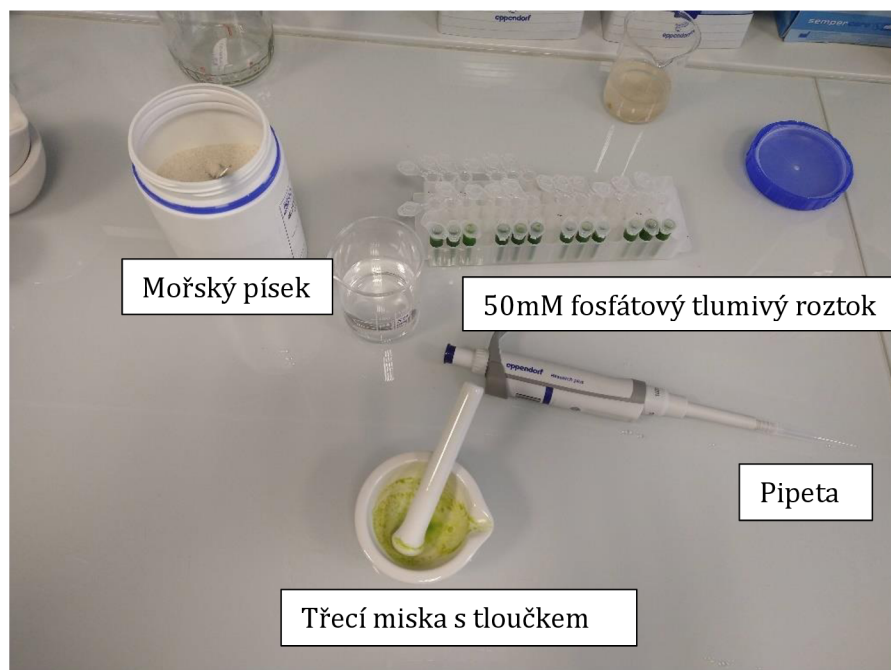


Obrázek 19: Vypěstované rostliny s vyobrazenými varianty

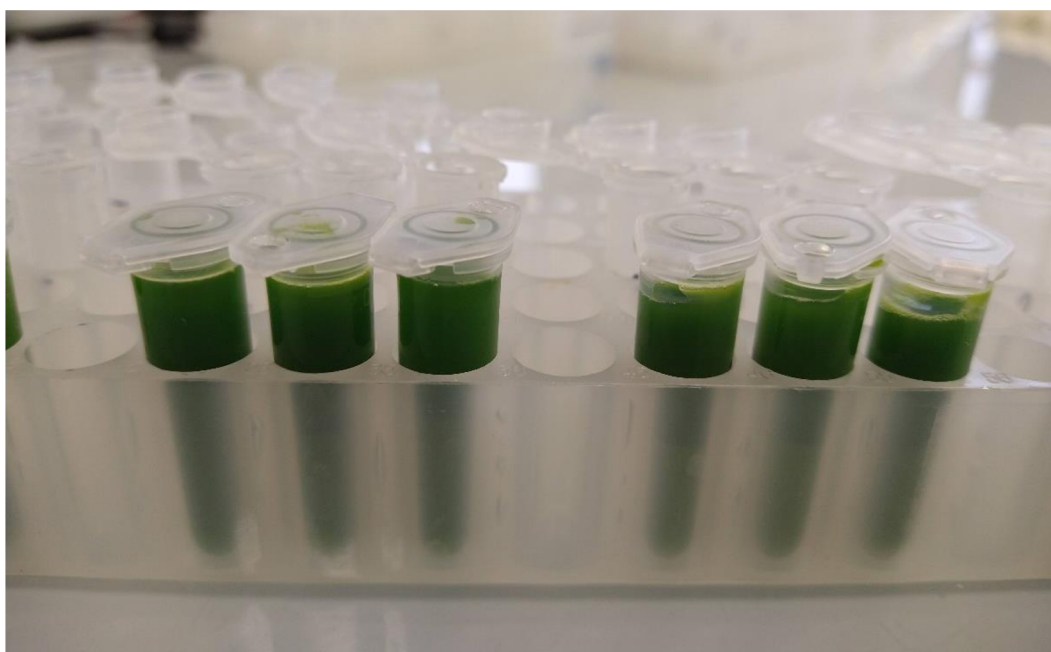
2.2 Extrakce a kvantifikace ROS

V rámci ROS jsme stanovili obsah peroxidu vodíku a superoxidového radiálu pomocí spektrofotometrické metody. 100 mg listové čepele jsme homogenizovali v třecí misce s trochou mořského písku a 50 mM fosfátovým tlumivým roztokem (pH 7,0) ve výsledném ředění 1 g 20 ml⁻¹ (Obrázek 20, 21). Homogenizáty jsme centrifugovali 15 min při 14000 rpm a 4 °C v chlazené centrifuze (Eppendorf 5804 R).

Reakční směs na stanovení peroxidu vodíku obsahovala 500 µl supernatantu a 250 µl 0,5% roztoku TiCl₄ v 20% H₂SO₄. Následně jsme vzorky promíchali a opět centrifugovali při nastavení uvedených výše. Absorbanci jsem měřili při vlnové délce 410 nm (Cintra 101, Dandenong, Australia) a výsledky jsme přepočítali na jednotku čerstvé hmotnosti a vyjádřili jako množství peroxidu vodíku v µmol g⁻¹ čerstvé hmotnosti (FW) (Dučaiová et al. 2016).



Obrázek 20: Pomůcky na homogenizaci listů pšenice seté



Obrázek 21: Homogenizáty listů pšenice seté

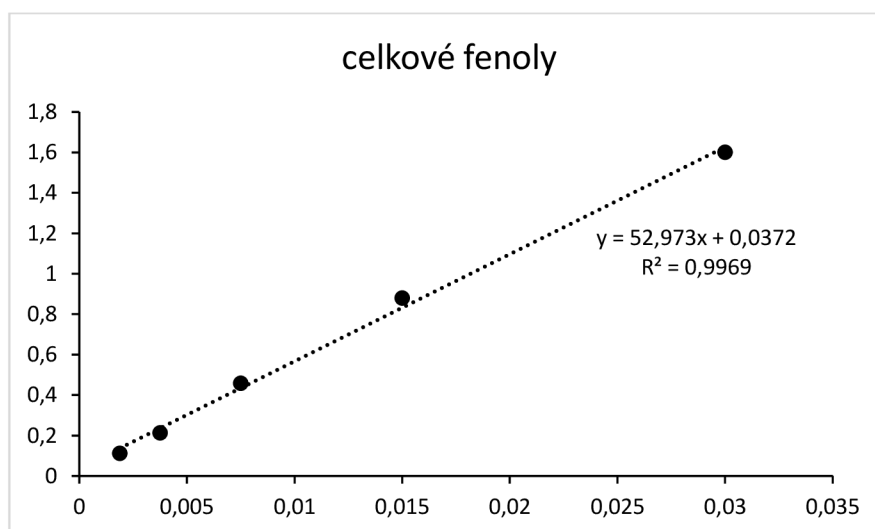
Obsah superoxidového radikálu jsme stanovili jako množství nitritu uvolněného z hydroxylaminu (Ducaiova et al. 2016). K reakční směsi obsahující 300 μ l supernatantu, 270 μ l 50 mM fosfátového tlumivého roztoku (pH = 7,0) a 30 μ l 10 mM hydroxylaminu jsme postupně po 15 min intervalech inkubace při laboratorní teplotě přidávali 300 μ l 17 mM sulfanilamidu, 300 μ l 7 mM α -naftylaminu a 300 μ l dietyléteru. Absorbanci výsledné reakční směsi jsme měřili při 530 nm. Výsledky jsme přepočítali na jednotku suché hmotnosti a vyjádřili jako množství superoxidového radikálu v μ g g^{-1} FW.

2.3 Extrakce a kvantifikace malondialdehydu

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

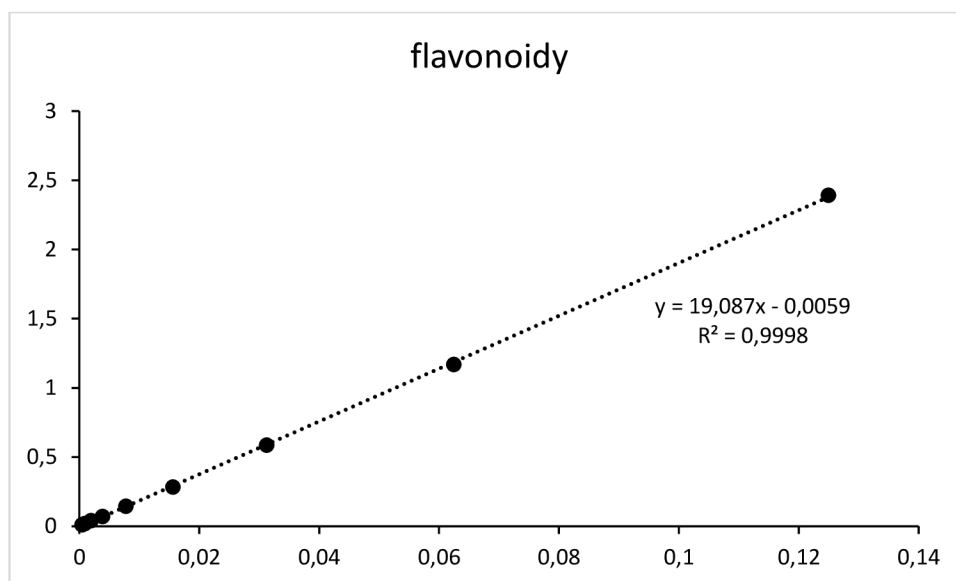
2.4 Extrakce a kvantifikace fenolů a flavonoidů

Alikvotní část listů jsme homogenizovali ve vychlazených třecích miskách s 80% metanolem ve výsledném ředění 1 g FW na 10 ml. Homogenáty jsme centrifugovali 15 min při 10 °C a 14 000 rpm. Obsah rozpustných fenolů jsme stanovili Folin-Ciocalteuvou metodou (Ducaiova et al. 2016). Reakční směs se skládala z 30 μl supernatantu, 470 μl destilované vody, 975 μl 2% Na_2CO_3 a 25 μl 2N Folin-Ciocalteuva činidla. Vzorky jsme inkubovali jednu hodinu při 45 °C a jejich absorbanci jsme měřili při 750 nm. Jako standardní látku na sestavení kalibrační křivky jsme použily kyselinu gallovou (Sigma-Aldrich) (Obrázek 22). Výsledky jsme vyjádřili v mg g^{-1} FW.



Obrázek 22: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro kvantifikaci celkových fenolů

Obsah flavonoidů jsme stanovili reakcí s ionty hliníku, které specificky interagují s keto- nebo hydroxy-skupinou (Ducaiova et al. 2016). Reakční směs, obsahující 500 μ l supernatantu a 500 μ l 2% roztoku hliníku (AlCl_3 v 100% metanole), jsme inkubovali jednu hodinu při laboratorní teplotě. Absorbanci vzorků jsme měřili při 420 nm. Jako standardní látku na sestavení kalibrační křivky jsme použili kvercetin (Obrázek 23). Výsledky jsme vyjádřili jako mg g^{-1} FW.



Obrázek 23: Kalibrační křivka kvercetinu pro kvantifikaci flavonoidů

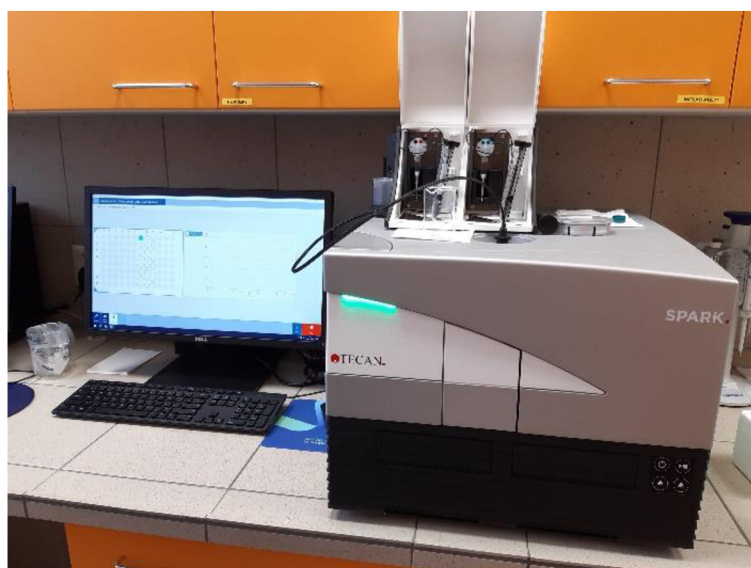
2.5 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

Pro přípravu vzorků ke stanovení aktivity vybraných antioxidantních enzymů (superoxid dismutázy, katalázy a askorbát peroxidázy) jsme ve vychlazené třecí misce ponořené v ledové drti homogenizovali 0,2 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu se 1,5 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0). Homogenát jsme centrifugovali 15 min při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Vzorky je nutné po celou dobu práce uchovávat na ledu.

2.5.1 SOD

Superoxid dismutáza katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík. Celková aktivita SOD se běžně stanovuje pomocí komerčně dostupných kitů. My jsme pro stanovení aktivity SOD postupovali dle návodu příslušného kitu (19160 Sigma-Aldrich SOD Determination Kit). Principem stanovení v daném kitu je inhibice tvorby superoxidových iontů generovaných během oxidace xantinu a tyto superoxidové ionty

redukuje „tetrazolium nitroblue“ na „tetrazolium nitroblue - diformazán“. Přítomnost SOD snižuje hladinu superoxidu, čímž klesá i tvorba zmíněného diformazán-derivátu jež je následně spektrofotometricky měřen. Aktivita SOD měřená v mikrotitračních destičkách byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm (SPARK® Tecan Trading AG, Männedorf City, Switzerland) (Obrázek 24).



Obrázek 24: Přístroj, kterým jsme měřili aktivitu SOD (Spark®, Tecan)

2.5.2 CAT

Stanovení katalázy stojí na principu přeměny peroxidu vodíku na vodu a kyslík. V průběhu měření je sledován úbytek peroxidu vodíku v důsledku poklesu absorbance směsi vzorku s H_2O_2 při vlnové délce 240 nm.

Ke stanovení aktivity katalázy jsme do skleněné kyvety postupně přidávali 2,45 ml fosfátového pufru a 0,05 ml supernatantu. Enzymatickou reakci jsme zahájili přidáním 0,55 ml 100 mM H_2O_2 (Obrázek 25). Změnu absorbance (na základě rozkladu peroxidu vodíku) jsme zaznamenali při vlnové délce 240 nm (Genesys 150 UV-VIS, Thermo Scientific) na začátku reakce a po jedné minutě průběhu. Aktivitu CAT jsme vypočítali s použitím molárního absorpčního koeficientu $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a vyjádřili jako $\mu\text{mol za min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$.



Obrázek 25: Pomůcky na měření aktivity CAT a APX; skleněná kyveta, pipety, buďík, spektrofotometr a chemikálie

2.5.3 APX

Pro stanovení aktivity askorbát peroxidázy jsme do skleněné kyvety postupně přidávali 0,68 ml fosfátového pufru, 0,1 ml 100 mM kyseliny askorbové, 0,1 ml 100 mM EDTA a 0,02 ml supernatantu. Enzymatickou reakci jsme zahájili přidáním 0,1 ml 10 mM H_2O_2 . Pokles absorbance jsme zaznamenali při vlnové délce 290 nm na začátku reakce a po jedné minutě průběhu. Aktivitu APX jsme vypočítali s použitím molárního absorpčního koeficientu $\epsilon = 2,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a vyjádřili jako $\mu\text{mol za min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$.

2.6 Western blot analýza

2.6.1 Roztoky pro izolaci a stanovení koncentrace proteinů

DTE extrakční tlumivý roztok

28 mM DTT (dithiotreitol)

28 mM Na₂CO₃

175 mM sacharóza

5 % SDS (dodecylsírán sodný)

10 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)

30 % Akrylamid

29,2 g AA (akrylamid)

0,8 g bisAA (bisakrylamid)

100 ml deionizovaná H₂O

1,5 M Tris - HCl pH = 8,8

18,18 g Tris base (trisaminomethan)

80 ml deionizovaná H₂O

upravit pH s HCl a doplnit do 100 ml

0,5 M Tris - HCl pH = 6,8

6,06 g Tris base

80 ml deionizovaná H₂O

upravit pH s HCl a doplnit do 100 ml

Elektrodový tlumivý roztok pro SDS - PAGE (10x koncentrovaný, pH = 8,3)

30 g Tris base

144 g Glycin

10 g SDS

900 ml deionizovaná H₂O

upravit pH s HCl a doplnit do 1000 ml

12 % separační gel (2 gely)

2,5 ml Tris - HCl (pH = 8,8)

3,5 ml dH₂O

4 ml 30 % AA/bisAA

100 µl 10 % SDS

100 µl 10 % persíran amonný

10 µl TEMED (tetreamethylethylenndiamin)

5 % startovací gel (2 gely)

1,25 ml Tris - HCl (pH = 6,8)

3,05 ml dH₂O

650 µl 30 % AA/bisAA

50 µl 10 % SDS

50 µl 10 % persíran amonný

6 µl TEMED

2.6.2 Roztoky pro imunodetekci proteinů**Blotovací roztok (10x koncentrovaný)**

15,1 g Tris base

72 g Glycín

0,01 g SDS doplnit do 1000 ml dH₂O

Transferový roztok

700 ml dH₂O

100 ml 10x blotovací roztok

200 ml metanol

TBS (10x konc., pH = 7,4)

7,5 g Tris base

44 g NaCl

500 ml dH₂O

upravit pH s HCl TBST

(TBS - TWEEN 20)

100 ml 10x TBS

1 ml Tween 20

900 ml dH₂O

Blokovací roztok

100 ml TBST

5 g sušené odtučněné mléko (Blotting-Grade Blocker, Bio-RAD)

2.6.3 Izolace a stanovení proteinů

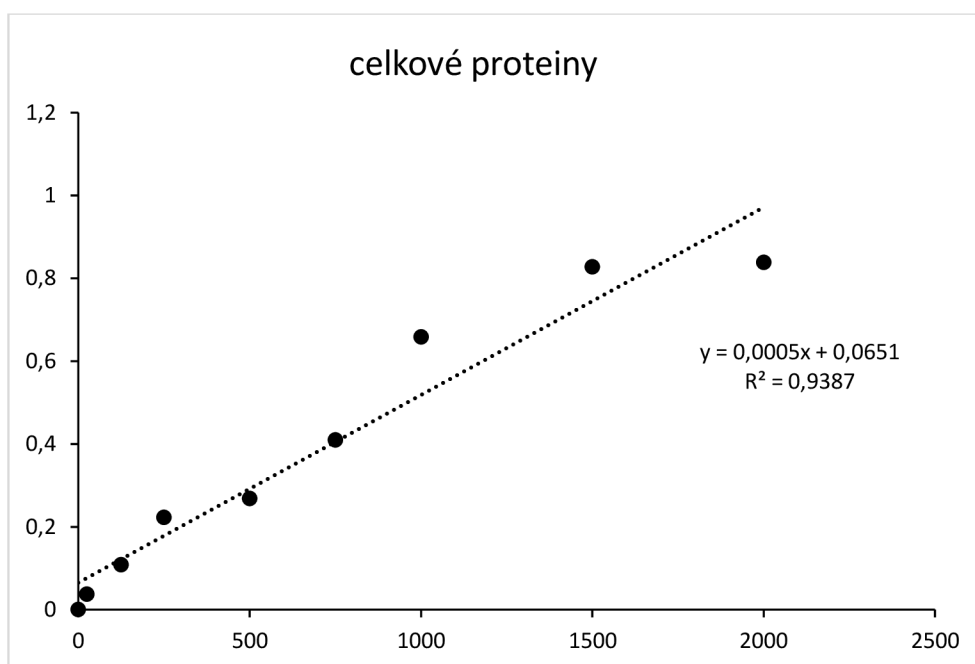
Rostlinný materiál jsme zmrazili v tekutém dusíku a do doby analýz uskladnily při -80 °C. Do 1,5 ml ependorfových zkumavek jsme si napipetovali 700 µl DTE extrakčního roztoku. Následně jsme vzorky homogenizovali za pomoci tekutého dusíku ve vychlazených třecích miskách na prášek, který jsme přenesli do zkumavek s extrakčním roztokem. Vzorky jsme míchali 10 min na třepačce při 1500 rpm (Multi Speed Vortex MSV-3500, Biosan, Litva) a následně jsme je vložili do termobloku, kde se vzorky denaturovaly 30 min při 70 °C (Thermo Block TDB-120, Biosan, Litva). Poté jsme denaturované vzorky centrifugovali 10 min při 14000 rpm. Supernatant jsme odpipetovali do čistých zkumavek.

Proteiny jsme stanovovali pomocí spektrofotometrie. Nejdříve jsme odpipetovali 50 µl vzorku do 500 µl 10 % kyseliny trichloroctové a centrifugoval 10 min při 13000 rpm. Vzniklý supernatant jsme vylili a pelet vysušili v termobloku při 40 °C (otevřené zkumavky) a následně rozpustili ve 100 µl 0,1M NaOH. Poté jsme si připravili kalibrační řadu bovinního sérového albuminu (BSA) v NaOH dle tabulky 1. Z každé zkumavky kalibrační řady jsme si odpipetovali 50 µl do nové zkumavky označené A - I. Do každého vzorku i zkumavky s kalibrační řadou jsme napipetovali 1 ml vyvíjecího roztoku (BCA kit- Biochromic Acid Kit for Protein Determination, Sigma - Aldrich, USA) a inkubovali 30 min při 37°C. Po inkubaci jsme měřili absorbanci při 562 nm na spektrofotometru. Jako slepý vzorek jsme použili destilovanou vodu a následně jsme začali měřit od zkumavky I-A a poté vzorky. Z naměřených výsledku jsme si vytvořili kalibrační křivku, ze které jsem vypočítali

koncentraci proteinů ve vzorku (Obrázek 26). Zároveň jsme si vypočítali množství proteinů potřebné pro SDS – PAGE na nanášky, dle nejnižší koncentrace proteinů ve vzorkách.

Tabulka 1: Kalibrační řada BSA (2 mg ml⁻¹) v NaOH

Zkumavka	0,1M NaOH	BSA	Výsledná konc. BSA
A	0 µl	300 µl	2000 µg ml ⁻¹
B	125 µl	375 µl	1500 µg ml ⁻¹
C	325 µl	275 µl	1000 µg ml ⁻¹
D	175 µl	275 µl ze zkumavky B	750 µg ml ⁻¹
E	325 µl	325 µl ze zkumavky C	500 µg ml ⁻¹
F	325 µl	325 µl ze zkumavky E	250 µg ml ⁻¹
G	325 µl	325 µl ze zkumavky F	125 µg ml ⁻¹
H	400 µl	100 µl ze zkumavky G	25 µg ml ⁻¹
I	400 µl	0 µl	0 µg ml ⁻¹



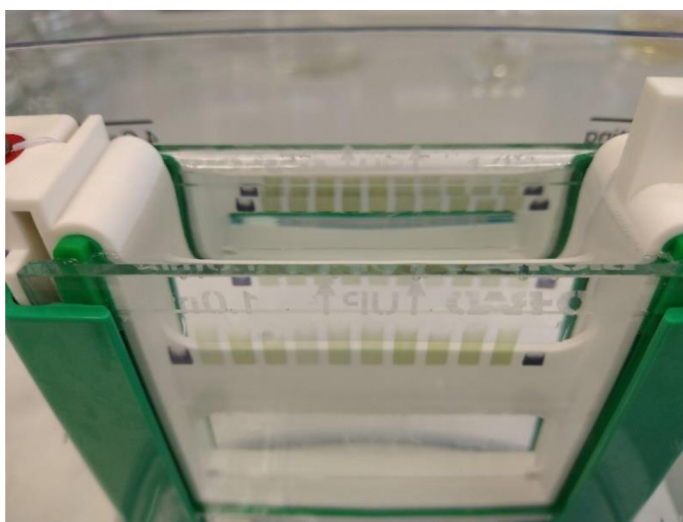
Obrázek 26: Kalibrační křivka BSA pro kvantifikaci proteinů

2.6.4 SDS – PAGE

Proteiny v připravených vzorkách jsme separovali pomocí metody SDS – PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek) následujícím způsobem. Zmražené vzorky jsme nechali inkubovat 10 min při 70 °C na třepačce (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Na separaci jsme použili přístroj Mini - Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, USA) a postupovali podle Laemmliho (1970). Po přípravě separačních polyakrylamidových gelů a sestrojení aparatury jsme nanесли vypočítané množství proteinu do gelu. Jako marker molekulových hmotností jsme použili 5 μ l PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Kanada). Elektroforéza probíhala v elektrodovém tlumivém roztoku při konstantním napětí 200 V po dobu 60 min (Power/Pac 300, Bio – Rad, USA) (Obrázek 27, 28).



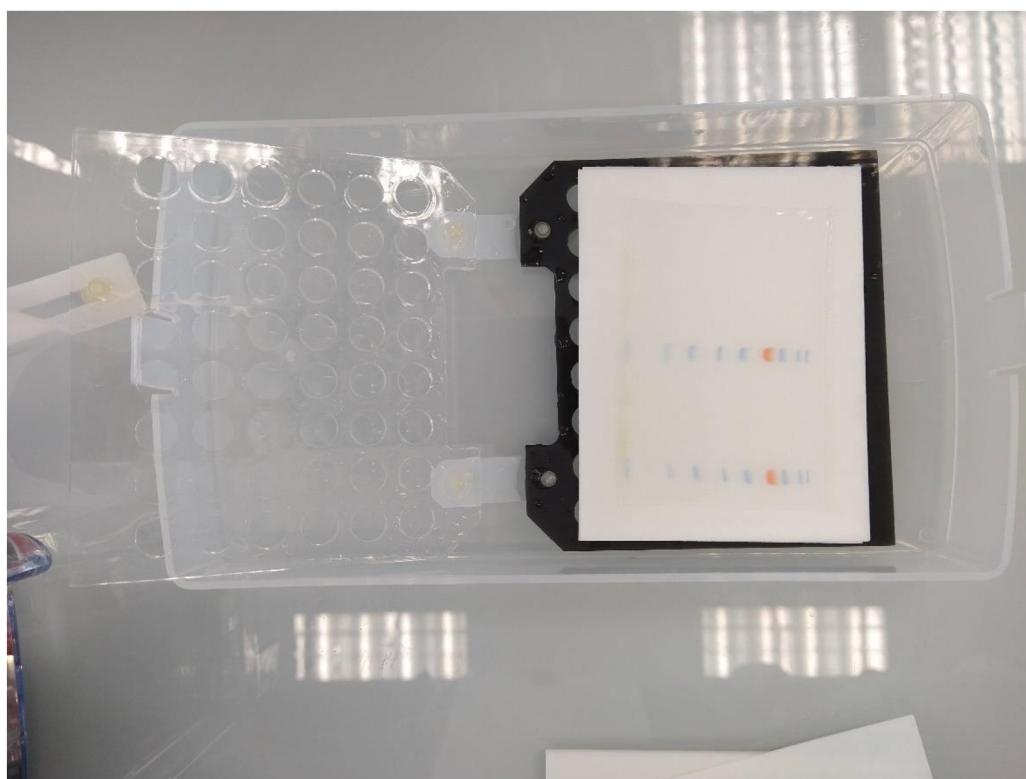
Obrázek 27: Přístroj na separaci proteinů: Mini - Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)



Obrázek 28: Zachycení probíhající separace proteinů. Černá barva – marker molekulových hmotností; zelená barva – jednotlivé vzorky

2.6.5 Imunodetekce proteinů – přenos proteinů na PVDF

Na blotovací zařízení jsme si naskládali jednotlivé komponenty v následujícím pořadí – spodní část kazety na blotování, poduška namočená v transferovém roztoku, filtrační papír namočený v transferovém roztoku, gel z elektroforézy, membrána, opět filtrační papír namočený v transferovém roztoku a poduška namočená v transferovém roztoku (Obrázek 29). Nakonec jsme vytlačili vzduchové bubliny skleněnou tyčinkou a zavřeli blotovací kazetu. PVDF membránu (Immun-Blot® PVDF membrane, 0,2 μm , Bio-RAD) jsme aktivovali 30 s v methanolu a následně propláchli 3 x 10 min v transferovém roztoku. Blotování proteinů probíhalo v blotovacím roztoku v blotovacím zařízení (Trans Blot SD Cell, Bio-Rad, USA) 60 min při 100 mA.



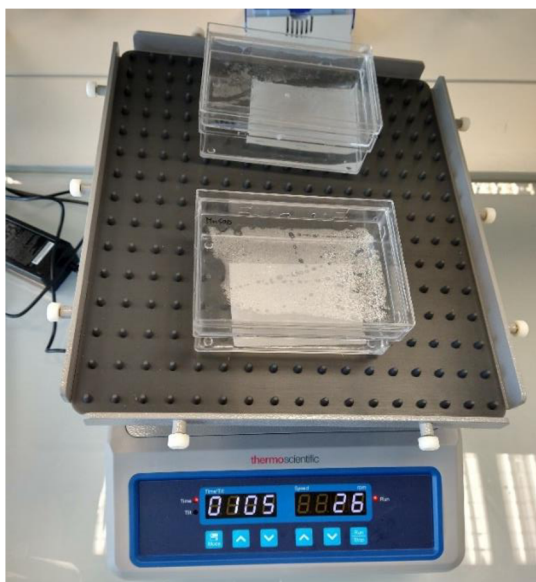
Obrázek 29: Skládání blotovacího „sendviče“

Po přeblotování jsme membrány 10 min blokovali v blokovacím roztoku a následně promývali 10 min v TBS. Membrány jsme vložili do vhodně naředěné primární protilátky a inkubovali přes noc na třepačce při 4 °C. Jako primární protilátky jsme použili: CAT, cAPX, MnSOD a FeSOD (Agrisera AB, Sweden). Primární protilátky jsme ředili v TBS s 5% odtučněným sušeným mlékem (Tabulka 2).

Tabulka 2: Ředění primárních protilátek

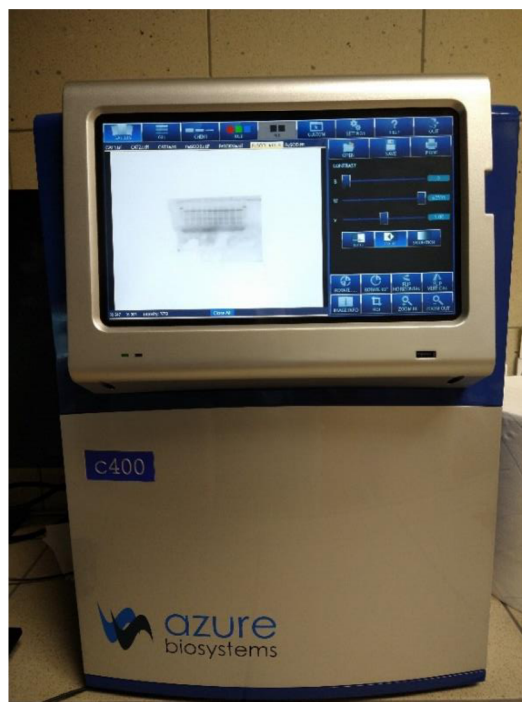
protilátka	ředění
CAT	1:1000
APX	1:5000
MnSOD	1:2000
FeSOD	1:2000

Primární protilátky jsme následně vymývali na třepačce 7x 10 min v TBST a po osmé v TBS. Po vmytí primární protilátky jsme membránu inkubovali v sekundární protilátce (Goat anti Rabbit IgG, USA) po dobu 60 min. Sekundární protilátku jsme ředili 1:3000. Sekundární protilátku jsme opět vymývali na třepačce stejnou technikou jako primární protilátku (Obrázek 30).



Obrázek 30: Vymývání membrán na třepačce

Na vmytou membránu jsme nanесли 1 ml Immobilon™ Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) a nechali jsme ho 1 minutu působit. Chemiluminiscenční signál jsme zachytili přístrojem Azure c400 (Azure Biosystems Inc., Dublin, CA, USA) (Obrázek 31).



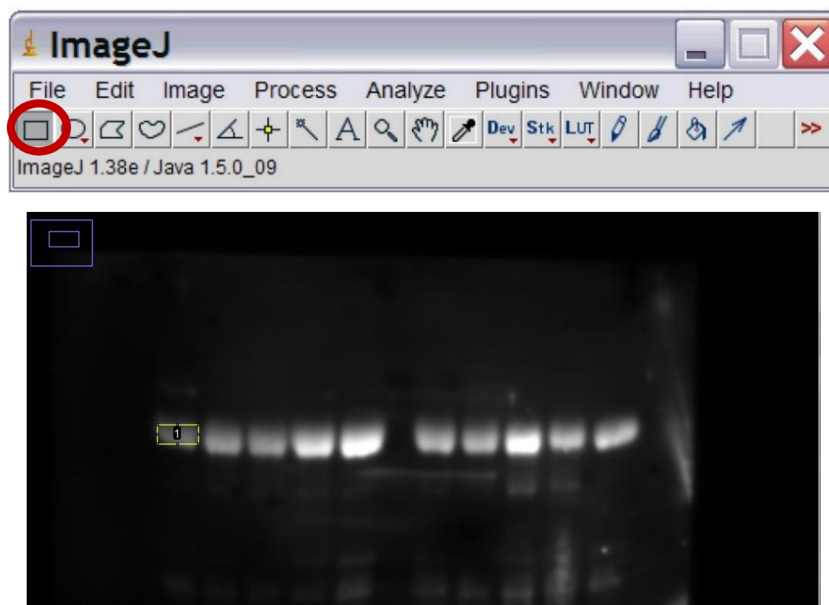
Obrázek 31: Zachycení chemiluminiscenčního signálu přístrojem Azure c400 (Azure Biosystems Inc., Dublin, CA, USA)

2.6.6 Zpracování výsledků

Pro zpracování výsledků jsme použili program ImageJ, bezplatný program, který běží na všech operačních systémech od Wayne Rasbanda z National Institute of Health (USA) a je k dispozici ke stažení na adrese: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

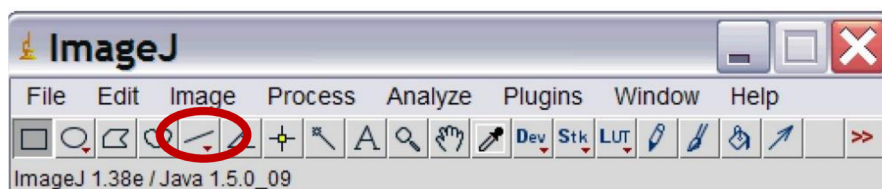
Tento program nám umožnil relativně kvantifikovat proteinové bandy z membrány jako poměr každého proteinového bandu vzhledem ke kontrolnímu bandu následujícím způsobem.

1. Nejdříve jsme si do programu nahráli obrázek gelu.
2. Čtvercovým výběrem jsme ohraničili první, kontrolní proužek (Obrázek 32) zvolili Analyze → Gels → Select first lane.



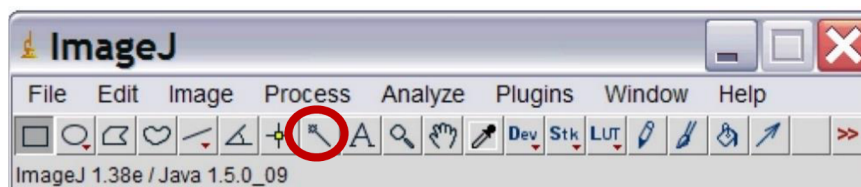
Obrázek 32: Ohraničení prvního kontrolního bandu

3. Tento první čtverec jsme postupně použili pro zpracování výsledků ze vzorků, Analyze → Gels → Select next lane.
4. Po označení posledního bandu jsme zvolily Analyze → Gels → Plot lanes. Následně se objevily grafy s píky.
5. Z výběru nástrojů jsme si vzali výběr čáry (Obrázek 33) a nakreslily jsme čáru pod píkem, kterou jsme definovali prostor pod křivkou. Tento krok jsme provedli u všech grafů.



Obrázek 33: Výběr čáry

6. Na závěr jsme použily kouzelnou hůlku (Obrázek 34) kterou jsme zvýraznili píky žlutou barvou a v dalším okně se načetla jejich změřená hodnota.



Obrázek 34: Výběr kouzelné hůlky

7. Naměřené hodnoty jsme použili pro další statistické zpracování.

2.7 Statistické analýzy

Všechna data jsme vyhodnotili jednorozměrnou analýzou rozptylu ANOVA (GraphPad Prism 9 Software, LLC, San Diego, CA, USA). Významné rozdíly mezi kontrolními a stresovanými vzorky jsme analyzovali pomocí Tukeyho testu s hladinou významnosti $p < 0,05$. Chybové úsečky v každém grafu znázorňují standartní odchylky. Sloupce označeny stejným písmenem se výrazně neliší.

3 Výsledky

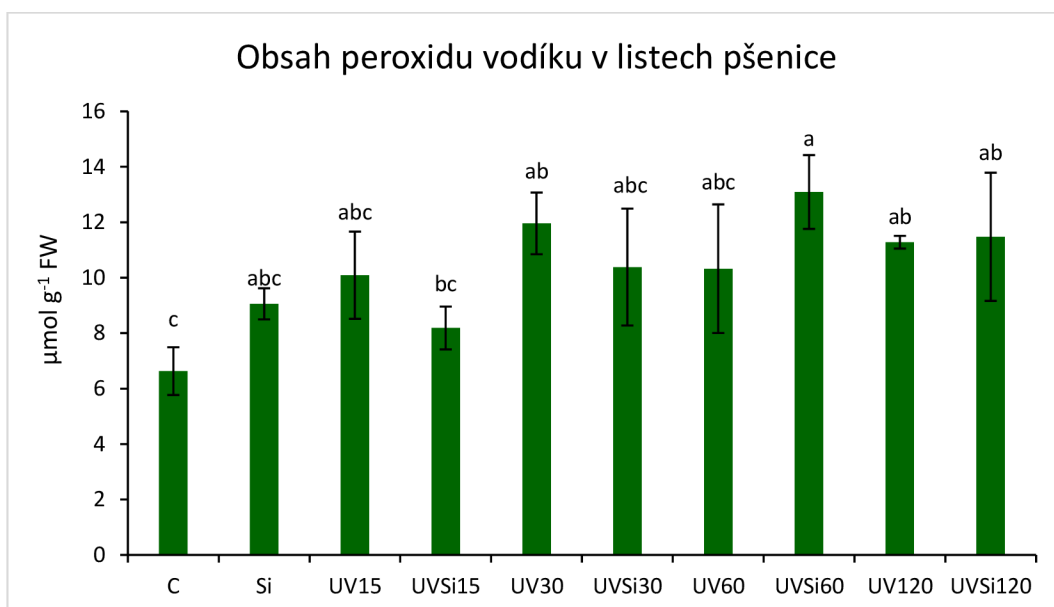
Cílem práce bylo zhodnotit celkový fyziologický a biochemický stav rostlin po 15, 30, 60 a 120 min po ozáření jednotnou dávkou UV-B záření a vzhledem ke kontrolní rostlině zjistit, jak rostlina na stresor reaguje a za jak dlouhou dobu se vrátí stav rostliny do doby před ozářením. Dalším cílem bylo zhodnotit, jaké účinky měla aplikace křemíku.

3.1 Stanovení obsahu ROS

Tvorba ROS je jedna z hlavních reakcí, kterou lze pozorovat míru stresového zatížení rostliny při ozáření UV-B. V rámci práce jsme stanovovali obsah peroxidu vodíku a superoxidového radikálu v listech pšenice spektrofotometrickými metodami v časových intervalech 15, 30, 60 a 120 min po ozáření.

Vliv UV-B záření na obsah peroxidů vodíku v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

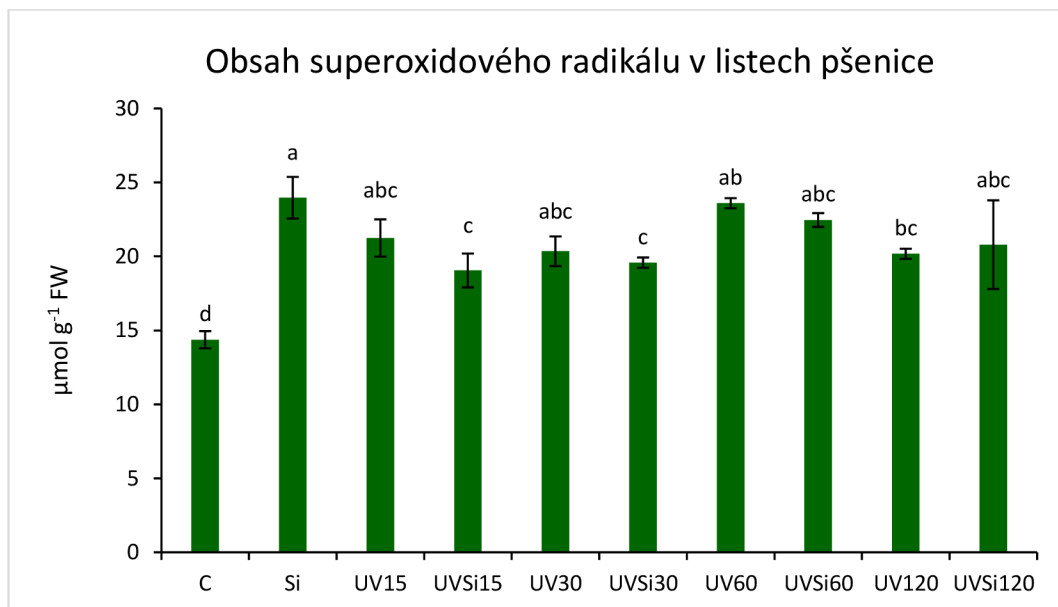
Ozářené i/anebo křemíkem ošetřené rostliny vykazovaly vyšší obsah H_2O_2 než kontrolní vzorky. Hladina H_2O_2 u rostlin ošetřených Si měřena 15 a 30 min po ozáření byla nižší než u rostlin, které nebyly ošetřeny Si. Avšak u vzorků, které byly měřeny 60 a 120 min od ozáření, toto pravidlo neplatilo. Dokonce u vzorku UVSi60 byla naměřena nejvyšší hladina H_2O_2 ze všech. U vzorků UV120 a UVSi120 nebyl zaznamenán významný rozdíl v hladině peroxidu (Obrázek 35).



Obrázek 35: Obsah peroxidu vodíku v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

Vliv UV-B záření na obsah superoxidového radikálu v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

Hladina superoxidového radikálu u kontrolních vzorků byla výrazně nižší než u vzorků ošetřených Si a/nebo ozářených UV-B zářením. Neozářené rostliny ošetřeny Si obsahovaly nejvyšší hladinu superoxidového radikálu (23,97 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW). U ozářených vzorků platilo, že přítomnost Si snižovala obsah superoxidového radikálu v listech pšenice. Výjimku představoval vzorek UVSi120, který naopak vykazoval vyšší hladinu superoxidového radikálu než rostliny varianty UV120. Statisticky stejné hodnoty byly měřeny u vzorků UV15, UV30, UVSi60 a UVSi120 (Obrázek 36). Hladina superoxidového radikálu se v ozářených Si neošetřených rostlinách zvýšila a dosáhla maxima 60 min po ozáření, následně se zase začala snižovat.



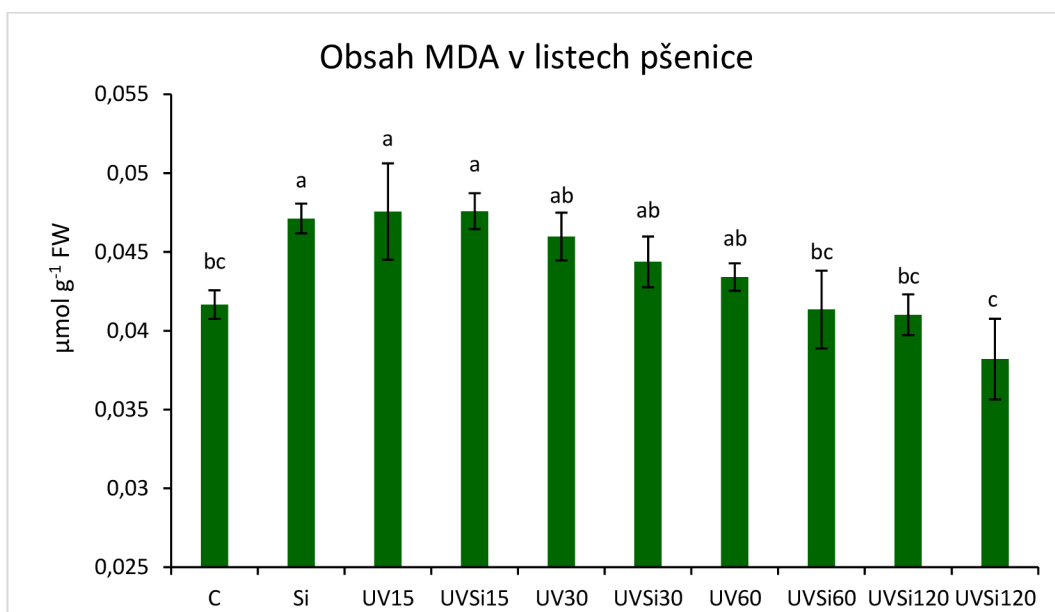
Obrázek 36: Obsah superoxidového radikálu v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

3.2 Stanovení obsahu malondialdehydu (MDA)

Malondialdehyd je látka, která vzniká degradací polynenasycených lipidů působením ROS. Tato sloučenina je reaktivní aldehyd a je jedním z mnoha reaktivních elektrofilních druhů, které způsobují toxický stres v buňkách a tvoří koncové produkty lipoxidace. Produkce tohoto aldehydu se tedy používá jako biomarker pro měření úrovně oxidačního poškození membránových lipidů.

Vliv UV-B záření na obsah MDA v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

Z měřených vzorků vykazovaly nejvyšší hodnoty MDA vzorky UV15, UVSi15 a vzorek, který nebyl ozářen UV-B a byl ošetřen křemíkem (vzorek Si). Postupná měření po prodlužujících se časových úsecích ukazovala na snižující se hladinu MDA v listech. V měřeních krátce po ozáření (do 30 min) byl zaznamenán stejný obsah MDA u vzorků ošetřených Si jako u jejich neošetřené varianty. Avšak při měření po delším časové úseku po ozáření (více než 60 min) se ukázalo, že vzorky doplněné o Si vykazovaly nižší obsah MDA než jejich neošetřené varianty (Obrázek 37).

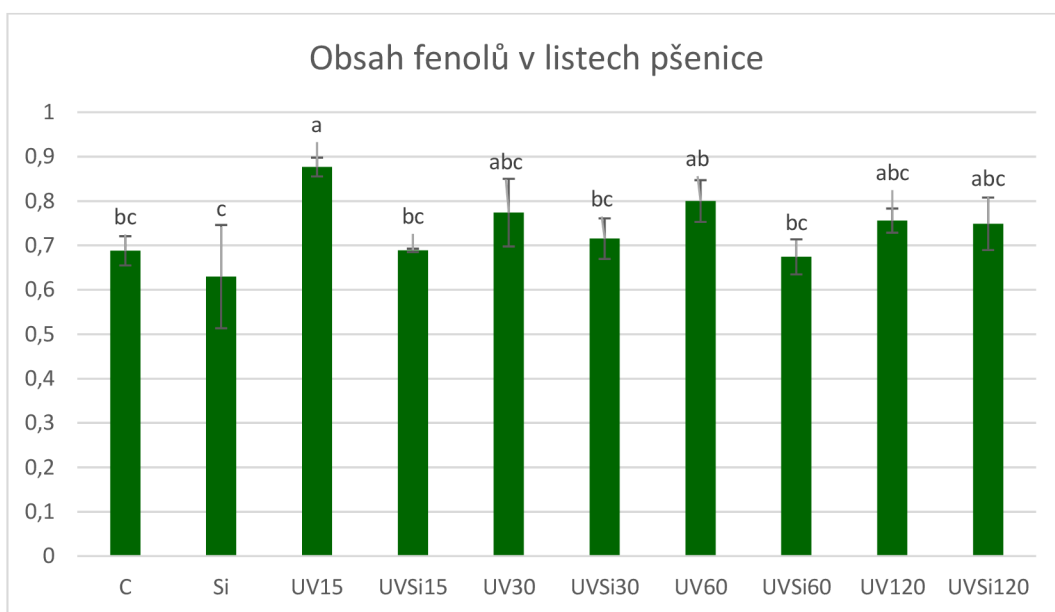


Obrázek 37: Obsah MDA v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

3.3 Stanovení obsahu fenolických sloučenin

Vliv UV-B záření na obsah celkových rozpustných fenolů v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

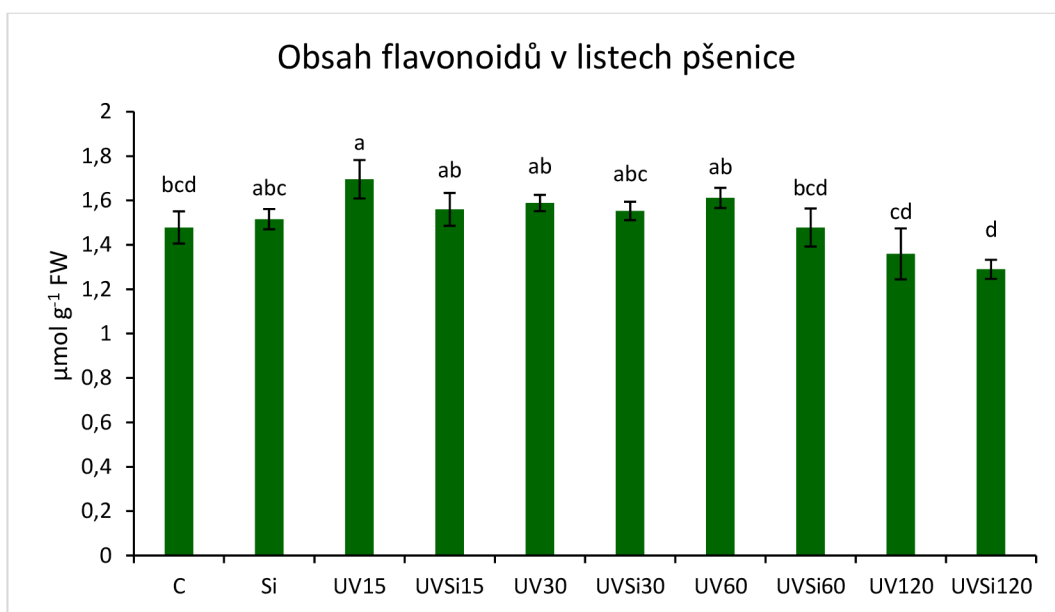
Po ozáření vykazovaly rostliny vyšší obsah fenolů v listech než kontrolní neozářené vzorky. Nejvyšší obsah fenolů byl změřen v rostlině 15 min po ozáření. Tato hladina se následně snížila. Rostliny, které byly ošetřeny Si, obsahovaly méně fenolů než jejich neošetřené varianty. Výjimku tvoří vzorky měřené po 120 min (UV120 a UVSí120), u kterých byl obsah fenolů téměř totožný. Z výsledků měření vychází, že u ozářených, Si ošetřených rostlin v různých časových intervalech je hladina fenolů nižší ve srovnání s rostlinami pěstovanými v médiu bez Si. Avšak signifikantně pouze u vzorků analyzovaných po 15 min (Obrázek 38).



Obrázek 38: Obsah fenolů v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

Vliv UV-B záření na obsah flavonoidů v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

U rostlin ozářených UV-B zářením se hladina flavonoidů zvýšila. Nejvyšší hladina flavonoidů byla 15 min po ozáření a s přibývajícím časem odběru se u ozářených rostlin obsah flavonoidů snižoval až pod úroveň kontrolního vzorku. Rostliny, které byly stresovány UV-B zářením, obsahovaly při suplementaci Si nižší obsah flavonoidů než varianty bez Si. Tento trend je patrný při všech časových měřeních. Není tomu tak u rostlin, které ozářeny nebyly. Zde rostliny pěstovány v médiu s Si obsahovaly o něco více flavonoidů než rostliny pěstovány bez Si (Obrázek 39).

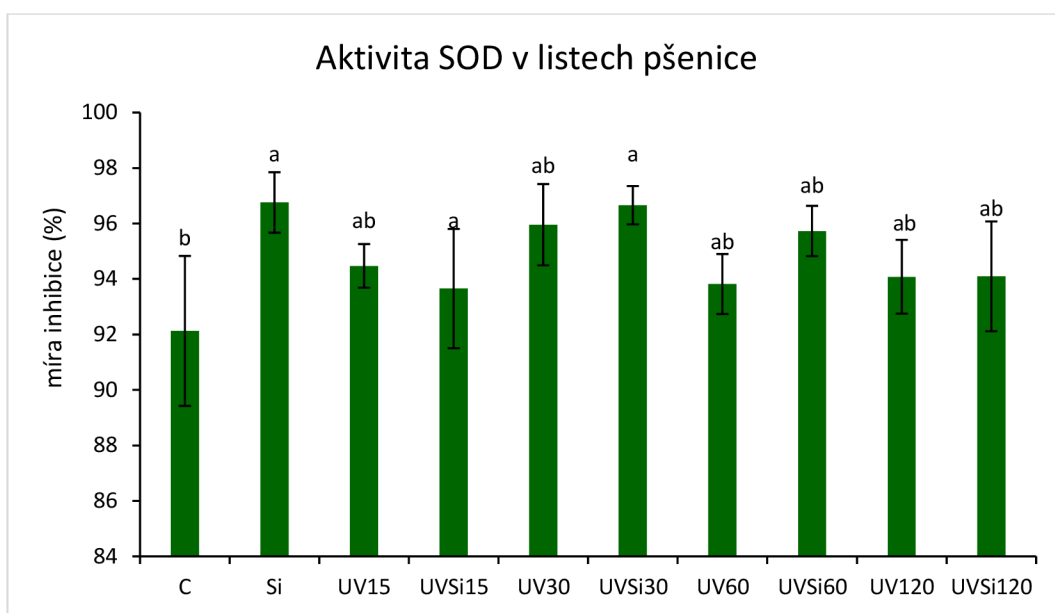


Obrázek 39: Obsah flavonoidů v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

3.4 Aktivita antioxidantních enzymů

Vliv UV-B záření na aktivitu superoxid dismutázy (SOD) v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

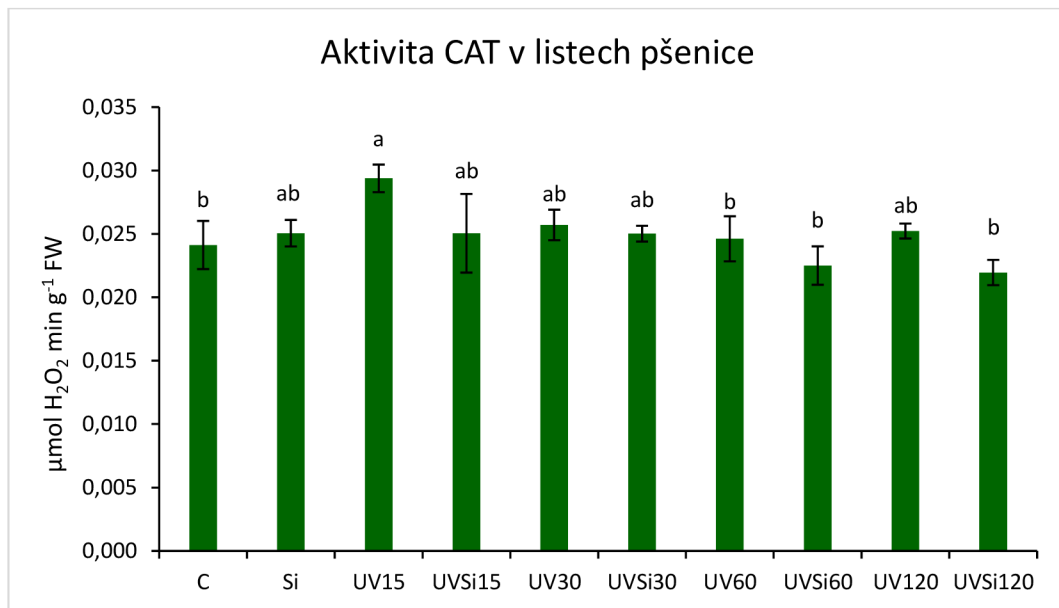
Aktivita SOD (vyjádřeno jako míra inhibice vzniku superoxidového radikálu) v listech pšenice seté se po ozáření UV-B zvýšila oproti kontrolnímu vzorku a zůstala neměnná po celou dobu měření (Obrázek 40). Přídavek Si do média se projevil variabilně a nižší aktivita SOD (avšak ne statisticky) byla zaznamenána pouze u časového intervalu 15 min po ozáření.



Obrázek 40: Aktivita SOD v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

Vliv UV-B záření na aktivitu katalázy (CAT) v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

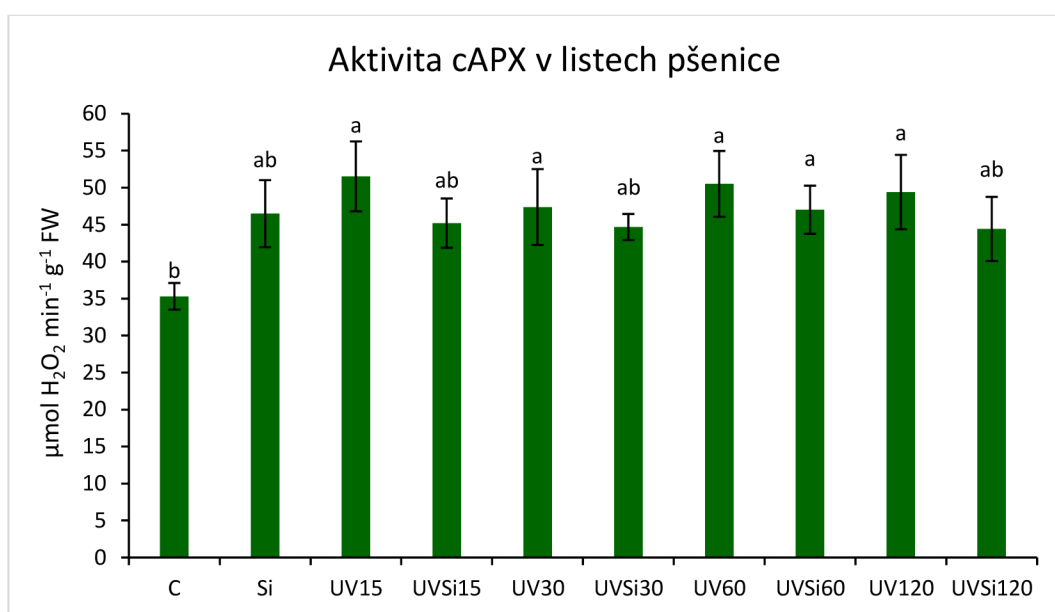
Aktivita CAT se u křemíkem neošetřených rostlin, krátce po ozáření (vzorek UV15) zvýšila oproti kontrolním rostlinám. Po dalších časových intervalech se aktivita CAT v listech snižovala až na úroveň kontrolního vzorku a zůstala více méně neměnná, kdy se měřené hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,022 až 0,025 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$. U rostlin suplementovaných Si byla aktivita CAT statisticky stejná nebo menší (UVSi60) než v rostlinách neošetřených Si (Obrázek 41).



Obrázek 41: Aktivita CAT v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

Vliv UV-B záření na aktivitu askorbát peroxidázy (APX) v listech pšenice seté (*Triticum aestivum*)

Při ozáření rostlin UV-B došlo k stimulaci aktivity APX v listech pšenice oproti kontrolnímu vzorku. Tento nárůst byl po celou dobu pokusu ale neměnný a ani po 120 min se nesnížil. Křemíkem ošetřené rostliny dosahovaly při ozáření nižších hodnot aktivity APX v listech než rostliny, které nebyly ošetřené Si. Tato hodnota ale také zůstala po celou dobu pokusu neměnná. Aktivita APX v neozářených rostlinách ošetřených samotným Si byla obdobná jako aktivita enzymu v ozářených rostlinách ošetřených Si (Obrázek 42).



Obrázek 42: Aktivita APX v listech pšenice. Údaje představují průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl dle Tukeyovho testu ($p < 0,05$).

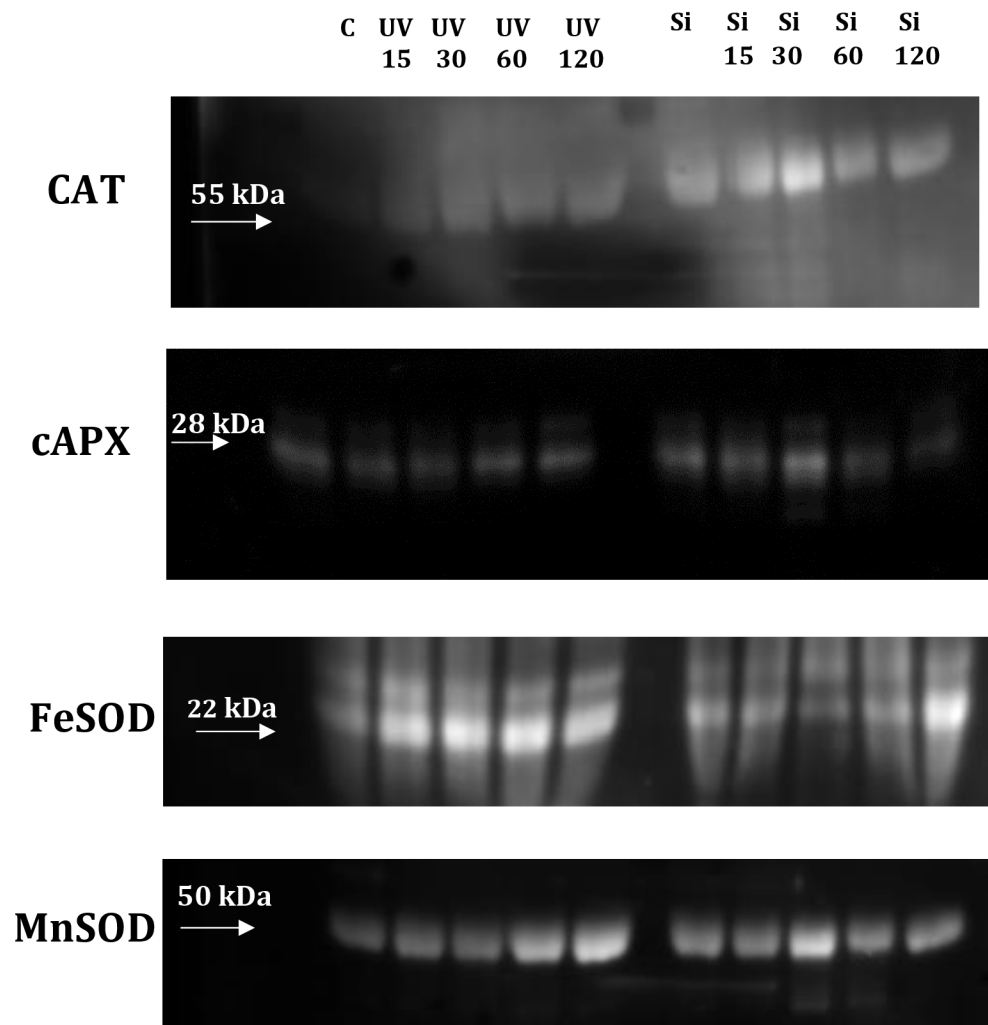
3.5 Western blot analýza exprese vybraných antioxidantních enzymů

Ve všech vzorcích byla pomocí western blot analýzy potvrzena přítomnost sledovaných proteinů (CAT, FeSOD, MnSOD a cAPX) podílejících se na antioxidantních procesech v rostlinách (Obrázek 43). Exprese sledovaných enzymů závisela na typu vzorku a použitého stresoru. Relativní hodnoty pro všechny vzorky jsou uvedeny v tabulce 3.

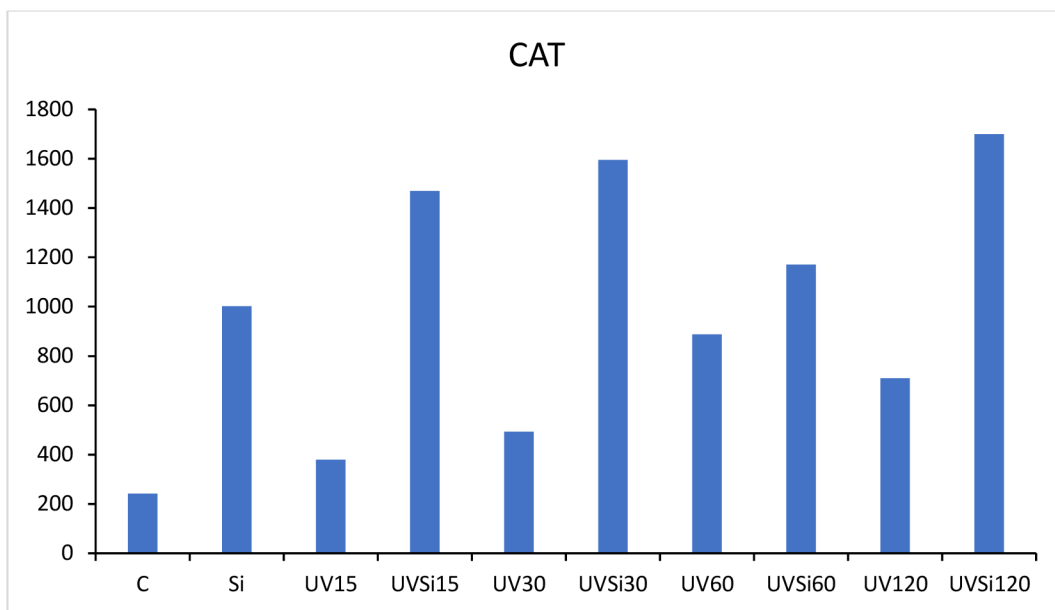
Tabulka 3: Relativní kvantifikace proteinů z fotek membrán po western blotu. Hodnoty v tabulce jsou vyjádřeny v hustotě pixelů s využitím programu ImageJ

	CAT	cAPX	FeSOD	MnSOD
C	241,991	1679,134	1797,589	6489,731
Si	1001,477	6386,622	2518,347	10725,702
UV15	378,991	498,263	3412,154	7187,217
UVSi15	1468,619	7200,401	1703,569	7791,095
UV30	493,477	2203,761	2608,853	5288,853
UVSi30	1595,305	9098,409	984,983	12999,238
UV60	887,276	4640,945	2349,953	10562,409
UVSi60	1170,104	5096,338	1613,69	8625,924
Si120	709,406	5212,167	5677,397	16786,48
UVSi120	1699,983	3429,882	3764,53	11078,752

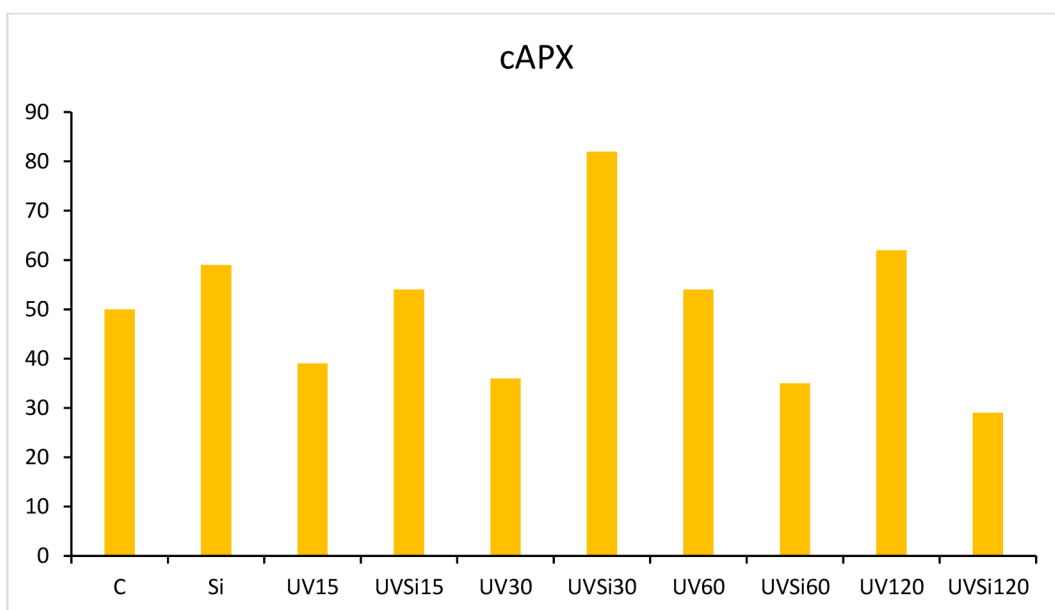
V případě CAT jsme vyšší intenzitu signálu zaznamenali ve vzorcích rostlin ozářených UV-B zářením a současně pěstovaných v médiu obohaceném o Si. S prodlužující se dobou odběru tyto hodnoty narůstali. Výjimkou je UVSi60, kde hodnoty mírně poklesli (Obrázek 44). U cAPX jsme zaznamenali výrazný nárůst relativní exprese u křemíkem ošetřených rostlin (maxima u varianty UVSi30), zejména u neošetřených rostlin, nebo u rostlin analyzovaných 15 minut po aplikaci UV-B. S prodlužující se dobou analýzy se rozdíly mezi Si ošetřenými a neošetřenými rostlinami zmenšovaly (Obrázek 45). V případě FeSOD a MnSOD jsme pozorovali u neošetřených rostlin s prodlužující se dobou odběru nárůst intenzity signálů (Obrázek 46 a 47). Aplikace Si se projevila variabilně a není možné určit jednoznačný trend. Avšak intenzita signálu byla nižší jako u neošetřených rostlin v případě FeSOD a vyšší v případě MnSOD.



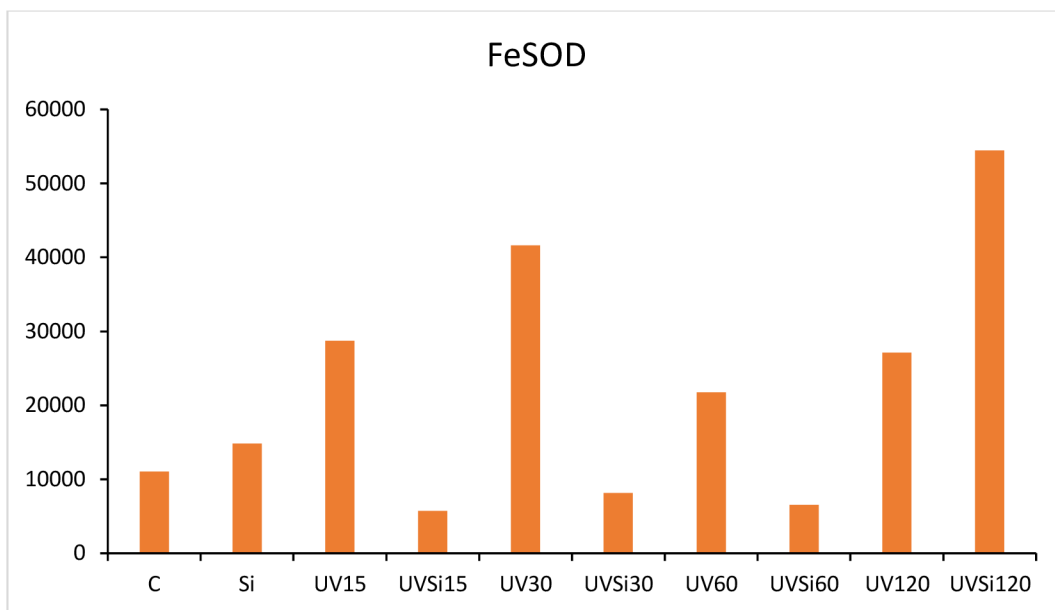
Obrázek 43: Imunolokalizace proteinů CAT, cAPX, FeSOD a MnSOD v listech pšenice seté



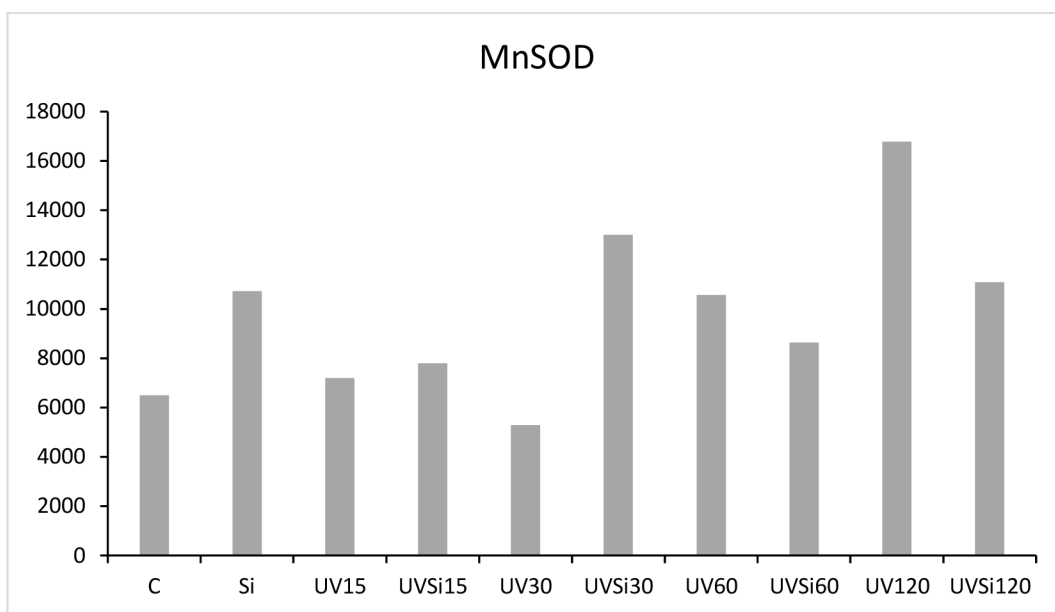
Obrázek 44: Relativní kvantifikace CAT pomocí programu ImageJ. Hodnoty jsou uvedeny v hustotě pixelů.



Obrázek 45: Relativní kvantifikace cAPX pomocí programu ImageJ. Hodnoty jsou uvedeny v hustotě pixelů.



Obrázek 46: Relativní kvantifikace FeSOD pomocí programu ImageJ. Hodnoty jsou uvedeny v hustotě pixelů.



Obrázek 47: Relativní kvantifikace MnSOD pomocí programu ImageJ. Hodnoty jsou uvedeny v hustotě pixelů.

4 Diskuze

Rostliny jsou schopné vnímat intenzitu, trvání i kvalitu světla. Tyto signály mají potenciál přímo ovlivňovat klíčení, rychlost růstu, produktivitu, reprodukci a přežití rostlin. Světlo je pro rostliny životně důležité, a proto již od dob, kdy vystoupily na terestrický povrch, musely považovat UV-B záření za základní stresový signál. Mnoho studií zabývajících se tematikou vlivu UV-B záření na rostliny potvrdilo, že rostliny umí toto záření rozeznat, přijmout speciálním receptorem a vytvořit si ochranu proti jeho nadměrnému působení (Heijde et Ulm 2012; Kataria et al. 2014; Ulm et Jenkins 2015). Z provedených výzkumů, při různých experimentálních podmínkách vyplývá, že nadměrné ozáření UV-B způsobuje změny u rostlin na morfologické, fyziologické i molekulární úrovni (Hollósý 2002; Jansen et al. 1998).

V naší studii nebyly pozorovány žádné morfologické změny způsobené UV-B zářením, a to zřejmě z důvodu použití nízké dávky UV-B ($1,3 \text{ kJ m}^{-2}$) a krátkému času expozice (30 min). Morfologické změny ve svém výzkumu mohl pozorovat např. Shen et al. (2010) u rostlin sóji. Při ozařování vyšší dávkou UV-B ($2,7 \text{ kJ m}^{-2}$ nebo $5,4 \text{ kJ m}^{-2}$) po dobu jednoho týdne vyzoroval snížení délky výhonků, plochy listů a celkové suché hmotnosti. Stejně odlišnosti, včetně změny barvy a tvaru listů, pozoroval i Kakani et al. (2003) u sóji pěstované pod dávkou 16 kJ m^{-2} .

Jedinou pozorovatelnou morfologickou změnou byla pevnější struktura a větší ostrost listů rostlin ošetřených Si. Studie prokazují, že rostliny, které jsou schopny zabudovat křemík ve své struktuře (pšenice, kukuřice, sója), mají v ochraně proti nadměrnému UV-B záření velkou výhodu (Goto et al. 2003; Yao et al. 2011). V listech se Si ukládá v prostoru bezprostředně pod vrstvou kutikuly a vytváří dvojitou vrstvu kutikula-Si (Ma et Yamaji 2006; Currie et Perry 2007; Schaller et al. 2012). Taková Si dvojitá vrstva může působit jako skleněná vrstva a snižovat další přenos UV záření z epidermis (Gatto et al. 1998).

Naše studie byla zaměřena především na sledování fyziologických a molekulárních změn, mezi které patří: změna v obsahu ROS, MDA, UV-B absorbujících látek a aktivity antioxidantních enzymů CAT, SOD a APX.

UV-B záření jako abiotický stresor narušuje rovnováhu mezi produkcí ROS a antioxidantní obranou, což způsobuje akumulaci ROS, které vyvolávají oxidační poškození funkčních molekul (Yao et al. 2011). Obsah peroxidu vodíku i superoxidového radikálu se v naší studii po ozáření UV-B zvýšil, což koreluje s výsledky podobných experimentů: zvýšený obsah O_2^- • při vysoké dávce ozáření byl pozorován u špenátu (*Spinacia oleracea*) (Hideg et Vass

1996), v listech bobu obecného (*Vicia faba*) (Barta et al. 2004) a také v izolovaných tylakoidech rýže seté (*Oryza sativa*) (Lidon et al. 2012). Protektivní roli Si zkoumal Yao et al. (2011) u sazenic pšenice vystavených UV-B záření, kde suplementace Si významně snižovala rychlost produkce superoxidových radikálů. V naší studii se protektivní role Si prokázala zejména u prvních dvou intervalů.

Míra poškození membránových lipidů byla stanovena na základě obsahu MDA, produktů jejich peroxidace (Hollósy 2002). V našem experimentu se hladina MDA po ozáření zvýšila. Vznik MDA po ozáření UV-B pozorovali v listech rýže Dai et al. (2006), v listech vitánie snodárné (*Withania somnifera*) Takshak et Agrawal (2014) a u sazenic pšenice seté (*Triticum aestivum*) Yao et al. (2011). S rostoucím časem se hladina MDA v listech snižovala a ochranné vlastnosti křemíku se projeví až hodinu po ozáření. Obdobně, Yao et al. (2011) prokázal protektivní funkci křemíku u sazenic pšenice seté ozařované UV-B a to při zkoumané koncentraci křemíku v půdě (100-400 mg SiO₂ kg⁻¹).

Produkce fenolů a flavonoidů v listovém pletivu je velmi dobře zdokumentovaná a považuje se za adaptivní mechanismus proti UV-B záření. Je to jedna z prvních obranných reakcí, která snižuje pronikání UV-B záření do hlubších vrstev pletiv a zároveň plní antioxidační funkci (Hollósy 2002; Goto et al. 2003). V naší studii se produkce fenolů i flavonoidů dle předpokladu po ozáření zvýšila. Křemíkem ošetřené rostliny vykazovaly nižší obsah fenolických látek. Ke stejnému závěru došel i Shen et al. (2010), který prováděl podobný pokus se sazenicemi sóji, kde se obsah fenolických látek po ozáření zvýšil o více než 90%. Oproti tomu u sazenic pěstovaných s křemíkem se obsah zvýšil pouze o 10%. Dle těchto výsledků by UV-B screening Si vrstvou mohl být výhodou s ohledem na energetickou náročnost biosyntézy fenolických látek. Zatím ale není jasné, zda jsou rostliny schopny aktivně tvořit Si dvojvrstvou, nebo jde pouze o vedlejší efekt akumulace Si. (Schaller et al. 2013).

Aktivace antioxidačního systému je druhou obrannou reakcí na zvýšené ozáření UV-B. Tento systém se skládá z enzymatických a neenzymatických vylučujících procesů ROS, čímž se rostlinné buňky chrání před oxidačním poškozením (Apel et Hirt 2004). Běžnou strategií pro studium metabolismu ROS je kvantifikovat aktivitu enzymatických složek antioxidačního systému. Interpretace dat je však komplikovaná kvůli rozdílům v antioxidačních odpovědích mezi druhy, genotypy stejného druhu a listy různého stáří a/nebo vývojového stadia (Hideg et al. 2013). Přesto existuje určitá shoda. Například Agrawal et al. (2009) ve své práci shrnul výsledky studií vlivu UV-B záření na aktivitu enzymatického oxidačního systému SOD, CAT, APX a GSH u různých druhů rostlin. Zvýšená aktivita těchto enzymů byla pozorována u rostlin: *Triticum aestivum* (4.2 nebo 10.3 kJ m⁻²

d⁻¹), *Cassia auriculata* (7.5 kJ m⁻² nebo 15 kJ m⁻²), *Zea mays* (8.35 kJ m⁻² d⁻¹) a dalších. Dle předpokladů se i v našem experimentu aktivita všech tří zkoumaných enzymů po ozáření zvýšila. Vliv křemíku se na aktivitu různých enzymů však lišil. Aktivita SOD byla ve variantách s Si stejná nebo vyšší což může naznačovat, že Si působí nepřímo zvýšením antioxidantních enzymových aktivit a tím přispívá k vyšší míře zhášení ROS. Aktivita CAT a APX byla u rostlin ošetřených křemíkem stejná nebo nižší než u neošetřených rostlin. Zřejmě z důvodu nižšího stupně oxidace. Podobně v experimentu Shen et al. (2010) aplikace Si snížila aktivitu antioxidantních enzymů a tvorbu H₂O₂ u sazenic sóji vystavených stresu z UV-B záření.

Všeobecně má křemík řadu funkcí ve fyziologii rostlin. Důležitou úlohou křemíku při snižování nepříznivých účinků stresu může být zlepšování půdních podmínek. Proto by křemík mohl být v budoucnu používán ke zlepšení růstu rostlin a odolnosti ve stresových podmínkách. Avšak, je potřeba mnoho dalších aplikovaných výzkumů a na více plodinách pro hodnocení účinnosti křemíku jako ochranné látky vůči environmentálním faktorům.

Závěr

Cílem předložené diplomové práce bylo podrobněji prozkoumat vliv křemíku na vybrané fyziologické, stresové a metabolické aspekty nadměrného UV-B záření v hydroponicky pěstovaných rostlinách pšenice seté (kultivar Granny). Analýzy probíhaly ve čtyřech časových intervalech (15, 30, 60 a 120 min) po 30ti-minutovém ozáření UV-B.

Z výsledků je patrné, že UV-B jako abiotický stresor vyvolává následující změny v rostlině:

- nadměrnou produkci ROS (H_2O_2 a $O_2^{\cdot-}$), které způsobují oxidaci buněčných struktur,
- zvýšenou syntézu MDA – produktu peroxidace buněčných membránových lipidů,
- akumulaci UV-absorbujících sekundárních metabolitů (fenoly, flavonoidy), které snižují pronikání UV-B záření do hlubších vrstev rostliny,
- zvýšenou aktivitu enzymů (CAT, SOD, APX), které fungují jako antioxidanty redukující ROS,
- časové hledisko analýz od ozáření nemělo významný vliv na akumulaci ROS nebo aktivitu antioxidačních enzymů.

Přídavek Si do kultivačního média se pozitivně projevil u následujících parametrů:

- obsah ROS byl ve většině rostlin ošetřených Si nižší nebo stejný jako v neošetřených variantách.
- obsah MDA v Si ošetřených ozářených listech byl nižší nebo stejný jako u rostlin neošetřených Si,
- obsah fenolů a flavonoidů byl u Si ošetřených variant téměř vždy nižší
- aktivita SOD byla ve variantách s Si stejná nebo vyšší,
- aktivita CAT a APX byla ve variantách s Si stejná nebo nižší
- vedl ke zmírnění, resp. pozdějšímu nástupu oxidačního stresu a nadměrné tvorby fenolových látek jako odpověď na nadměrné UV-B záření.

Shrnutí výsledků této diplomové práce potvrzuje tvrzení, že aplikace Si do kultivačního média může mít pozitivní vliv na rostliny pšenice seté vystavené krátkodobému UV-B záření.

Seznam použité literatury

Agrawal S. B., Singh S., et Agrawal M., 2009. Ultraviolet-B induced changes in gene expression and antioxidants in plants. *Advances in Botanical Research*, 52, 47-86. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(10\)52003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(10)52003-2)

Apel K. et Hirt H., 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399. doi: [10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701).

Arora A., Sairam R. K. et Srivastava G. C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82(10), 13. doi: <https://www.jstor.org/stable/24107045>.

Barta C., Kálai T., Hideg K., Vass I. et Hideg É., 2004. Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Functional Plant Biology*, 31(1), 23-28. doi: <https://doi.org/10.1071/FP03170>

Casadevall R., Rodriguez R. E., Debernardi J. M., Palatnik J. F., et Casati, P. 2013. Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in *Arabidopsis* leaves. *The Plant cell*, 25(9), 3570-3583. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117473>.

Cooke J. et Leishman M. R., 2011. Is plant ecology more siliceous than we realise? *Trends in Plant Science*, 16, 61-68. doi: [10.1016/j.tplants.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.10.003).

Currie H. A. et Perry C. C., 2007. Silica in Plants: Biological, Biochemical and Chemical Studies. *Annals of Botany*, 100(7), doi: [1383-1389. doi:10.1093/aob/mcm247](https://doi.org/10.1093/aob/mcm247).

Czégény G., Máta A., et Hideg É., 2016. UV-B effects on leaves-Oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Science*, 248, 57-63. doi: [10.1016/j.plantsci.2016.04.013](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.04.013).

Černý M., Habánová H., Berka M., Luklová M. et Brzobohatý B., 2018. Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2812. doi: [10.3390/ijms19092812](https://doi.org/10.3390/ijms19092812).

Dai Q., Yan B., Huang S., Liu X., Peng S., Miranda M., Chavez A., Vergara B. et Olszyk D., 2006. Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 101, 301-308. doi: [10.1111/j.1399-3054.1997.tb01000.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01000.x).

- Deshmukh R. K., Ma J. F., et Bélanger R. R., 2017. Editorial: Role of Silicon in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1858. doi:10.3389/fpls.2017.01858.
- Dučaiová Z., Sajko M., Mihaličová S., et Repčák M., 2016. Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regulation*, 79, 81–94. doi: 10.1007/s10725-015-0114-2.
- Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K. et Jačević V., 2021. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science*, 11, 552969. doi: 10.3389/fpls.2020.552969.
- Fina J., Casadevall R., Abdelgawad H., Prinsen E., Markakis M. N., Beemster G. et Casati P., 2017. UV-B Inhibits Leaf Growth through Changes in Growth Regulating Factors and Gibberellin Levels. *Plant Physiology*, 174(2), 1110–1126. doi: 10.1104/pp.17.00365.
- Foyer C. H. et Noctor G., 2016. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSPect? *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 951–964. doi:10.1111/pce.12621.
- Frohnmeier H. et Staiger D., 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology*, 133(4), 1420–1428. doi:10.1104/pp.103.030049.
- Gatto A, Escoubas L, Roche P. et Commandre M., 1998. Simulation of the degradation of optical glass substrates caused by UV irradiation while coating. *Optics Communications*, 148 347–354. doi: 10.1016/S0030-4018(97)00651-2.
- Goto M., Ehara H., Karita S., Takabe K., Ogawa N., Yamada Y., Ogawa S., Yahaya M.S. et Morita O., 2003. Protective effect of silicon on phenolic biosynthesis and ultraviolet spectral stress in rice crops. *Plant Science*, 164: 349–356. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00419-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00419-3).
- Guerriero G., Stokes I., Valle N., Hausman J-F. et Exley C., 2020. Visualising Silicon in Plants: Histochemistry, Silica Sculptures and Elemental Imaging. *Cells*, 9(4), 1066. doi: 10.3390/cells9041066.
- Havaux M., 2014. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 597–606. doi: 10.1111/tpj.12386.
- Heijde M. et Ulm R., 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science*, 17(4), 230–237. doi: 10.1016/j.tplants.2012.01.007.

- Hideg E. et Vass I., 1996. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Science*. 115, 251–260. doi: 10.1016/0168-9452(96)04364-6.
- Hideg É., Jansen M. A. K. et Strid A., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, 18(2), 107–115. doi: 10.1016/j.tplants.2012.09.003.
- Hodson M. J., White P. J., Mead A. et Broadley M. R., 2005. Phylogenetic Variation in the Silicon Composition of Plants. *Annals of Botany*, 96(6), 1027–1046. doi: 10.1093/aob/mci255.
- Hollósy F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33(2), 179–197. doi: 10.1016/S0968-4328(01)00011-7.
- Jansen M. A. K., Gaba V. et Greenberg B. M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3, 131-135. doi: 10.1016/s1360-1385(98)01215-1.
- Kakani V. G., Reddy K.R., Zhao D. et Sailaja K., 2003. Field Crop Responses To Ultraviolet-B Radiation: A Review. *Agricultural And Forest Meteorology*, 120, 191-218. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.08.015>.
- Kataria S., 2017. Oxidative stress and antioxidative defence system in plants in response to UV-B stress – In: Singh V. P., Singh S., Prasad S. M. et Parihar P., 2017. *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth*. Chichester, UK: John. doi: 10.1002/9781119143611.ch3.
- Kataria S., Jajoo A. et Guruprasad K. N., 2014. Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137: 55-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.02.004>.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 685. doi: 10.1038/227680a0.
- Law C. et Exley C., 2011. New insight into silica deposition in horsetail (*Equisetum arvense*). *BMC Plant Biology*, 11, 112. doi: 10.1186/1471-2229-11-112.
- Liang Y., Nikolic M., Bélanger R., Gong H. et Song A., 2015. *Silicon in Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-017-9978-2.

- Lidon F. J. C., Teixeira M. et Ramalhoet J. C., 2012. Decay of the chloroplast pool of ascorbate switches on the oxidative burst in UV-B-irradiated rice. *Journal of Agronomy and Crop Science* 198, 130–144. doi: 10.1111/j.1439-037X.2011.00489.x.
- Ma J. F. et Yamaji N., 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, 11(8), 392–397. doi: 10.1016/j.tplants.2006.06.007.
- Ma J. F. et Yamaji N., 2008. Functions and transport of Silicon in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 65 (19): 3049-3057.
- Ma J., Qiu D., Pang Y., Gao H., Wang X. et Qin Y., 2020. Diverse roles of tocopherols in response to abiotic and biotic stresses and strategies for genetic biofortification in plants. *Molecular Breeding* [online]. 40(2), 18. ISSN 1380-3743, 1572-9788. Dostupné z: doi:10.1007/s11032-019-1097-x.
- Mackerness S. A. H., 2020. Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280–320 nm) stress: What are the key regulators?. *Plant Growth Regulation* 32, 27–39. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1006314001430>.
- Mckenzie R. L., Björn L. O., Bais A. et Ilyasd M., 2003. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem. Photobiol. Sci.* [online]. 2(1), 5–15. ISSN 1474-905X, 1474-9092. Dostupné z: doi:10.1039/B211155C.
- Mclarnon E. S., Mcqueen M., Lenk I. et Hartley S. E., 2017. Evidence for Active Uptake and Deposition of Si-based Defenses in Tall Fescue. *Frontiers in Plant Science* [online]. 8, 1199. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2017.01199.
- Mitani N., 2005. Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany* [online]. 56(414), 1255–1261. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/eri121.
- Mitani N., Chiba Y., Yamaji N. et Ma J. F., 2009. Identification and Characterization of Maize and Barley Lsi2-Like Silicon Efflux Transporters Reveals a Distinct Silicon Uptake System from That in Rice. *The Plant Cell* [online]. 21(7), 2133–2142. ISSN 1532-298X, 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.109.067884.
- Noctor G., Reichheld J-P. et Foyer C. H., 2018. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 80, 3–12. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.013.

Nogués S., Allen D. J., Morison J. I. L. et Baker N. R., 1999. Characterization of Stomatal Closure Caused by Ultraviolet-B Radiation. *Plant Physiology* [online]. 121(2), 489–496. ISSN 1532-2548, 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.121.2.489.

Olle M., 2020. Silicon in a Sustainable Cropping System. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. [online]. 74(3), 165–170. ISSN 1407-009X. Dostupné z: doi:10.2478/prolas-2020-0027.

Parihar P., Singh S., Singh R., Singh V. P., et Prasad S. M., 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research international*, 22(6), 4056–4075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>.

Piterková J., Tománková I., Luhová L. et Pet M., 2005. Oxidativní Stres: Lokalizace Tvorby Aktivních Forem Kyslíku A Jejich Degradace V Rostlinném Organismu. *Chem. Listy*. 12.

Pozza, E., Pozza, A. et Botelho D., 2015. Silicon in plant disease control. *Revista Ceres*. 62. 323-331. 10.1590/0034-737X201562030013.

Richmond K. E. et Sussman M., 2003. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 6(3), 268–272. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00041-4.

Schaller J., Brackhage C. et Dudel E., 2012. Silicon availability changes structural carbon ratio and phenol content of grasses. *Environmental and Experimental Botany*, 77 283–287. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.009.

Schaller J., Brackhage C., Bäucker E. et DudeL E. G., 2013. UV-screening of grasses by plant silica layer? *Journal of Biosciences*, 38(2), 413–416. doi: 10.1007/s12038-013-9303-1.

Shen X., Zhou Y., Duan L., Li Z., Eneji A. E. et Li J. 2010. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology*, 167(15), 1248–1252. doi: 10.1016/j.jplph.2010.04.011.

Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. et Yoshimura K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305–1319. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1305.

- Singh V. P., Singh S., Prasad S. M. et Parihar P., 2017. UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth. Chichester, UK: John. doi: 10.1002/9781119143611.ch3.
- Slováková L. et Mistrík I., 2007: Fyziologické procesy rastlín v podmienkach stresu. Univerzita Komenského v Bratislave. Vydavateľstvo UK. ISBN 978-80-223-2322-2.
- Takahashi E., Ma J. F. et Miyake Y., 1990. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. *Comments on Agricultural and Food Chemistry*, 2, 99–102.
- Takshak S. et Agrawal S. B., 2014. Effect of ultraviolet-B radiation on biomass production, lipid peroxidation, reactive oxygen species, and antioxidants in *Withania somnifera*. *Biologia Plantarum*, 58, 328–334. doi: 10.1007/s10535-014-0390-0.
- Ulm R. et Jenkins G. I., 2015. Q&A: How do plants sense and respond to UV-B radiation? *BMC Biology*, 13(1), 45. doi: 10.1186/s12915-015-0156-y.
- Van Hoest P. J., 2006. Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 137–171. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.01.023.
- Wang M., Gao L., Dong S., Sun Y., Shen Q. et Guo S., 2017. Role of Silicon on Plant–Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 701. doi: 10.3389/fpls.2017.00701.
- Yamaji N., Mitatni N. et Ma J. F., 2008. A Transporter Regulating Silicon Distribution in Rice Shoots. *The Plant Cell*, 20(5), 1381–1389. doi: 10.1105/tpc.108.059311.
- Yamaji N., Chiba Y., Mitani-Ueno N. et Ma J. F., 2012. Functional Characterization of a Silicon Transporter Gene Implicated in Silicon Distribution in Barley. *Plant Physiology*, 160(3), 1491–1497. doi: 10.1104/pp.112.204578.
- Yan G-Ch., Nikolic M., Ye M-j., Xiao Z-X. et Liang Y-Ch., 2018. Silicon acquisition and accumulation in plant and its significance for agriculture. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(10), 2138–2150. doi: 10.1016/S2095-3119(18)62037-4.
- Yao X., Chu J., Cai K., Liu L., Shi J. et Geng W., 2011. Silicon improves the tolerance of wheat seedlings to ultraviolet-B stress. *Biological Trace Element Research*, 143(1), 507–517. doi: 10.1007/s12011-010-8859-y.
- Yavaş İ. et Ünay A., 2017. The Role of Silicon under Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Türkisch Journal of Agricultural Research*, 4, 204-209. doi: 10.19159/tutad.300023.