

## Vplyv arzénu a kremíka na vybrané enzýmy a metabolity fenylopropanoidnej dráhy v kukurici siatej (*Zea mays*)

Effect of arsenic and silicon on selected enzymes and metabolites of phenylpropanoid pathway in maize (*Zea mays*)

ADRIANA MIŠÚTHOVÁ<sup>1</sup>, ZUZANA LUKAČOVÁ<sup>1</sup> & MAREK VACULÍK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava; zuzana.lukacova@uniba.sk, misuthova3@uniba.sk

<sup>2</sup> Botanický ústav, Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava; marek.vaculik@uniba.sk

**Abstract:** Approximately 475 million years ago, one of the most fundamental evolutionary steps in the plant kingdom was the creation of the phenylpropanoid pathway and the formation of lignified cell walls. These brought them various benefits when they moved from the aquatic environment to the land where they withstand various unfavourable conditions. One of the biggest problems in the world today is environmental pollution caused by toxic elements that organisms encounter daily. The aim of our work was to monitor the processes associated with the lignification of the maize plants under stress induced by toxic metalloid arsenic (As) and to observe whether silicon (Si) helps the plant defend itself at the molecular and biochemical levels. On the basis of the results of monitored parameters, we found that As significantly enhances the activity of two important enzymes, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and guaiacol peroxidase (G-POX), primarily in the second leaf, where we also observed a significant increase in activity after the addition of Si to the media. The activity of the enzymes monitored in the roots varied depending on the category of roots, and the effect of Si was not observed. Subsequent monitoring of PAL gene expression showed that As significantly increases PAL expression in the second leaf, which is further enhanced by the addition of Si. In almost all of the root parts and categories monitored, gene expression was significantly down-regulated in all treatments. Finally, monitoring the concentration of anthocyanins in the second leaf revealed an increased concentration in the As treatments. We conclude that the above-ground part of the plant responded more intensively to As toxicity by increasing the activity of important enzymes, the expression of relevant genes, and important non-enzymatic antioxidant molecules, where the addition of Si amplified this defense response.

**Key words:** anthocyanins, arsenic, lignin, maize, PAL (phenylalanine ammonia-lyase), silicon.

## Úvod

Kukurica siata (*Zea mays* L.) je po pšenici druhou najhlavnejšou potravinárskou plodinou a kŕmnomu prísadom na svete. Jej kvalita úzko súvisí s kvalitou mäsa, vajec a mlieka, čím vplýva aj na kvalitu a bezpečnosť potravín. Okrem svojho agronomického významu slúži tiež ako modelový organizmus biologických výskumov, ktoré sa venujú domestikácii rastlín, vývoju genómu, vývinovej fyziológii, epigenetike, rezistencii voči škodcom (biotický stres), heteróze a mnohým ďalším oblastiam (Strable & Scanlon 2009). Táto plodina

sa pestuje aj na pôdach kontaminovaných polokovom arzénom (As), ktorý je celosvetovo považovaný za jeden z významných pôdnych kontaminantov (Kumar et al. 2019). Arzén je kvôli svojej vysokej toxicite, karcinogenite a bioakumulácii považovaný za potenciálnu hrozbu nielen pre životné prostredie, ale aj pre pôdno-rastlinný ekosystém a taktiež pre ľudí (Amen et al. 2020; Natasha et al. 2021). Stres spôsobený ťažkými kovmi alebo polokovmi sa na rastlinách prejavuje na všetkých úrovniach, či už anatomickej, morfolologickej alebo fyziologickej.

Kukurica zároveň predstavuje rastlinný druh, ktorý sa ukázal ako významný v schopnosti prijať a zhromažďovať kremík (Si) vo svojich pletivách, a to či už v nadzemných alebo podzemných orgánoch. V mnohých štúdiách sa Si ukázal ako prospešný pri biotickom či abiotickom strese, napríklad pri vytváraní bariér v bunkovej stene pri vrastaní patogénu do hostiteľa (Bathóová et al. 2018), taktiež zabraňoval prenikaniu parazitickej rastliny kukučiny do hostiteľskej rastliny tabaku (Lukačová et al. 2019), či zmiernoval stres z ťažkých a toxických kovov a polokovov (Lukačová et al. 2013; Mišúthová et al. 2021).

Pred takmer 475 miliónmi rokov došlo k významnému evolučnému míľniku – prechodu zelenených rias na súš. Tento prechod si vyžadoval spevnenie bunkových stien, čo viedlo k ich lignifikácii a tým pádom formovaniu polymérnych fenolových látok, ktoré pomáhali rastlinám odolávať vonkajším vplyvom prostredia (Cosgrove 2005). Množstvo a zloženie lignínu sa líši medzi taxónmi, typmi buniek a jednotlivými vrstvami bunkovej steny a ovplyvňujú ho tiež vývinové a environmentálne podnety. Lignín je fyzikálne a chemicky heterogénny materiál a jeho štruktúrna rozmanitosť vyplýva hlavne z kombinácie troch derivátov fenylylpropanu, známych ako monolignoly/monoméry (H, G a S podjednotky), ktoré vznikajú v cytoplazmatickom priestore. Akonáhle sú lignínové monoméry transportované do apoplazmatického priestoru, podliehajú oxidácii, ktorá je sprostredkovaná lakázami a/alebo peroxidázami za vzniku voľných radikálov a následne spontánne polymerizujú na lignín (Meents et al. 2018). Fenoly, flavonoidy, rôzne hormóny, pigmenty či vitamíny sú neodlúčiteľnou súčasťou pre správny vývin rastliny a tiež jej obranný systém. Vznikajú prostredníctvom fenylylpropanoidnej dráhy, ktorá je súčasťou cesty kyseliny šikimovej. Tá premieňa jednoduché prekurzory sacharidov odvodené z glykolýzy na aromatické aminokyseliny ako L-fenylalanín, L-tyrozín a L-tryptofán (Herrmann & Weaver 1999). Prvým krokom fenylylpropanoidnej dráhy vo vyšších rastlinách je deaminácia aminokyseliny L-fenylalanínu (prípadne tyrozínu) za vzniku kyseliny trans-škoricevej a amoniaku. Táto

reakcia je katalyzovaná fenylalanín amónium-lyázou (PAL, alternatívne tyrozin amónium-lyázou, TAL) a často sa považuje za kľúčový krok v biosyntéze flavonoidov (Vogt 2010; Smirnov et al. 2012). Enzým PAL je prvým enzýmom v ceste syntézy ochranných pigmentov, hormónov či polymérov ukladaných v bunkových stenách. Tým, že tieto látky podliehajú jednej syntetickej dráhe naznačuje medzi nimi koreláciu a koordináciu, a preto môže PAL v rastlinnom organizme hrať mimoriadne dôležitú úlohu pri riadení mechanizmov rezistencie voči toxickým účinkom stresových faktorov, vrátane ťažkých a toxických kovov či polokovov (Pawlak-Sprada et al. 2011; Smirnov et al. 2015).

## Metodika

V našich experimentoch sme pracovali so zrnami kukurice siatej (*Zea mays* L. hybrid Valentína), ktoré poskytla firma RWA Slovakia, s. r. o., ktoré sa uskladňovali na suchom mieste pri teplote 4 °C.

Zrná sme nechali imbibať približne 1 – 2 hodiny v destilovanej vode a následne sme povrchovo sterilizovali 10 % roztokom Sava (0,47 % chlórnan sodný), približne 2 minúty. Takto pripravené zrná sme zabalili do papierových roliek, ktoré boli permanentne vlhčené vodou z kadičky, v ktorej boli umiestnené. Následne rastliny klíčili po dobu 3 dní v termostate pri teplote 25 °C. Z vyklíčených rastlín sme vyseletovali nepoškodené klíčence s približne rovnakou veľkosťou. Rastliny sa pestovali v 3 litrových kadičkách zafarbených čiernu farbou, 12 rastlín na nádobu, zachytené v polystyrénových plávajúcich plošinách. Rastliny sme pestovali 10 dní v Hoaglandovom živnom roztoku (Hoagland & Arnon, 1950), ktorý sme vymieňali každý druhý deň, nakoľko roztok nebol prevzdušňovaný. Hoaglandov živný roztok bol obohatený aj o As a Si. Pracovali sme so 6 variantami, a to: kontrola (K), kremíkový variant (Si 2,5 mM), arzénový variant s 2 rôznymi koncentraciami (As75 µM a As150 µM) a arzénovo-kremíkové varianty (As75 µM + Si 2,5 mM a As150 µM + Si 2,5 mM). Arzén sa do roztoku pridával vo forme anorganickej soli  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) a Si vo forme roztoku kremičitanu sodného (Sigma). Pomocou zriedenej HCl (1 : 1) alebo KOH sme upravovali pH v roztokoch na hodnotu 6,2. Rastliny sa kultivovali v kultivačnej miestnosti pri teplote 25/23 °C deň/noc, 60 % vlhkosti vzduchu, pri svetelnom režime 16/8 h svetlo/tma a intenzite žiarenia 200 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Po uplynutí kultivačnej periódy sme rastliny rozdelili na nadzemnú a podzemnú časť, pričom pre analýzy sme používali druhý list, keďže prvý bol už senescentný aj v kontrolných podmienkach. Koreňovú sústavu sme pre následné analýzy rozdelili na primárny koreň, primárne adventívne korene a nodálne korene.

Na stanovenie enzymatických aktivít v druhom liste kukurice a tiež v jednotlivých kategóriách koreňov sme určili celkový obsah rozpustných proteínov. Postupovali sme podľa protokolu Bradford (1976). Proteíny sme vyzolovali z približne 5-tich rastlín pre každý variant. Z extraktu sme následne stanovili aktivitu guajakol peroxidázy (G-POX), ktorú sme stanovili spektrofotometricky podľa Frič a Fuchs (1970) a následne vypočítali podľa Chance a Maehly (1955). Podobne aj aktivitu enzýmu PAL sme stanovili spektrofotometricky. Postupovali sme podľa protokolu Hodgins (1971) a Havir a Hanson (1970). Spektrofotometrické analýzy sme využili tiež pri stanovení koncentrácie antokyánov, ktorú sme vykonali len na druhom liste kukurice, kde sme postupovali podľa protokolu Neff a Chory (1998).

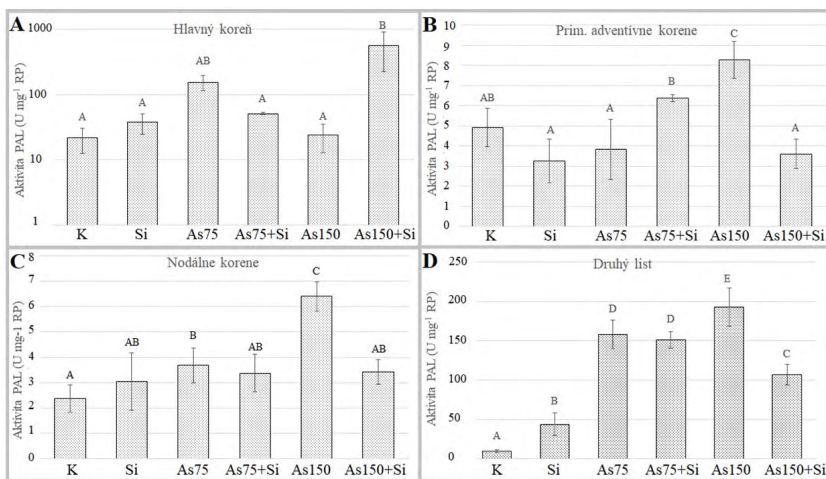
Na stanovenie expresie vybraných izoenzýmov PAL (*PAL2*, *PAL3* a *PAL9*), sme z nadzemných aj podzemných častí rastliny izolovali a purifikovali celkovú RNA použitím Plant RNA purifikačného kitu Canvax a RNA Clean & Concentrator-5 kitu. Zvyšky genomickej DNA sme odstránili DN-ázou I (Zymo Research). Koncentráciu a čistotu RNA vzoriek sme odmerali na spektrofotometri NanoDrop™ 1000. Následne sme 500 ng RNA prepísali do cDNA s primermi špecificky navrhnutými pre dané gény a určili relatívnu génovú expresiu pomocou Real-time PCR (RT-PCR). Výsledky sme vyhodnotili a analyticky spracovali pomocou protokolu Livak a Schmittgen (2001).

Výsledky sme štatisticky spracovali a vyhodnotili v programoch Microsoft Excel (Office 365) a STATGRAPHICS Centurion XV (Statgraphics Technologies, verzia 15.2.05), a to pomocou jednofaktorového ANOVA testu a Fisherovho LSD testu na hladine preukaznosti  $P < 0,05$ . Všetky pokusy a analýzy sme opakovali minimálne trikrát.

## **Výsledky a diskusia**

Enzým PAL je prvým a kľúčovým enzýmom pri biosyntéze flavonoidov, lignínov, fytoalexínov či antokyánov, ktoré hrajú podstatnú úlohu pri obrane rastlín (Vogt 2010). V rámci jednotlivých kategórií koreňov sme najvyššiu aktivitu tohto enzýmu zaznamenali v hlavnom koreni (obr. 1A), kde výrazné zvýšenie aktivity enzýmu PAL bolo pri vyššej koncentrácii As v kombinácii s Si (As150+Si). Naopak v primárnych adventívnych koreňoch sme pozorovali pri As150 signifikantné zníženie aktivity v kombinácii s Si (obr. 1B). Pri As75 pridanie Si zvýšilo aktivitu PAL. V nodálnych koreňoch (obr. 1C) sa zvýšila aktivita PAL nad úroveň kontroly len vo variante As150, kde vplyvom Si aktivita PAL klesala. Tú istú situáciu sme pozorovali aj v prípade druhého listu kukurice (obr. 1D), čo zaznamenalo viacero autorov pri strese z rôznych iných toxických prvkov (Li et al. 2008; Khandekar et al. 2011).

V rôznych kategóriách koreňov sme najvyššiu aktivitu enzýmu G-POX zaznamenali v hlavnom koreni a primárnych adventívnych koreňoch (obr. 2A a 2B). V hlavnom koreni a rovnako aj v primárnych adventívnych koreňoch sa aktivita G-POX signifikantne znížila v oboch As variantoch a pridanie Si nemalo na ňu žiaden efekt. Naopak, najnižšie aktivity G-POX boli v nodálnych koreňoch a v druhom liste (obr. 2C a 2D). Nodálne korene boli v rámci nášho rozdelenia koreňov zo všetkých najmladšie, tým pádom pravdepodobne aj najmenej lignifikované. Enzým G-POX sa uplatňuje nielen pri odstraňovaní prebytočného peroxidu vodíka, ktorý vzniká v nadbytku ako dôsledok stresu z As v priestore bunkových stien, ale súčasne je dôležitý aj pri polymerizácii lignínu, čo je proces, ktorý je významnejšie zastúpený v ontogeneticky starších koreňoch (Almagro et al. 2009). Samostatné pridanie Si do média signifikantne zvýšilo aktivitu daného enzýmu v nodálnych koreňoch, rovnako ako pri variantoch As150 a As150+Si v porovnaní s kontrolou. Signifikantne pozitívny účinok

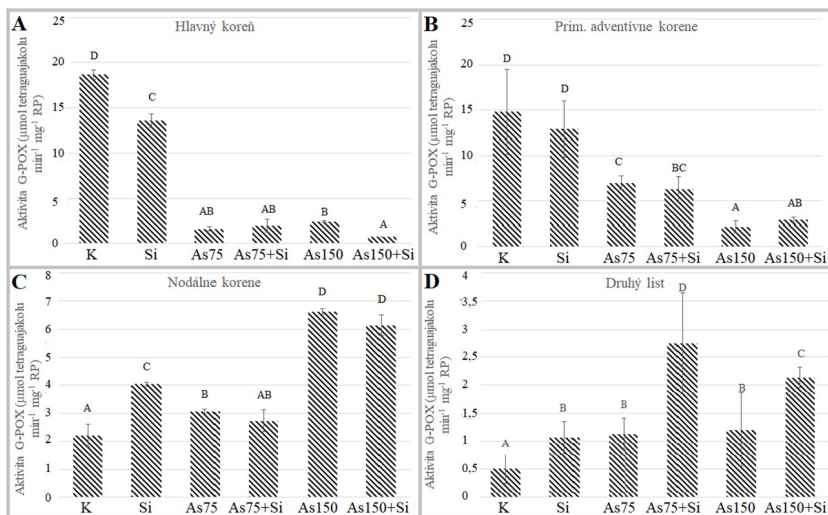


Obr. 1. Aktivita fenylalanín amónium-lyázy (PAL) v jednotkách aktivity  $\text{mg}^{-1}$  rozpustných proteínov ( $\text{U mg}^{-1}$  RP) v rôznych kategóriách koreňov (A – C) a v druhom liste kukurice sietej (D). Údaje sú priemery  $\pm$  SD. Rôzne písmená predstavujú signifikantné rozdiely medzi variantmi na úrovni preukaznosti  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

Fig. 1. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in activity unit  $\text{mg}^{-1}$  soluble proteins ( $\text{U mg}^{-1}$  RP) in different categories of roots (A – C) and in second leaf of maize (D). Values represent means  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences between different treatments at  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

Si na aktivitu G-POX pri As variantoch sme pozorovali v druhom liste kukurice (obr. 1D). Kremík zvýšil aktivitu enzýmu G-POX ako pri nižšej koncentrácii As (As75), tak aj pri vyššej koncentrácii As (As150), čím výrazne prispieva k antioxidačnej odpovedi na stres z toxického polokovu As. Takýto pozitívny účinok Si na zvýšenie obrannej reakcie rastlín pomocou stimulácie aktivity antioxidačných enzýmov pozorovalo viacero autorov pri rôznych druhoch stresov (Lukačová et al. 2013; Mandlík et al. 2020; Vaculík et al. 2020; Mišúthová et al. 2021).

Vzhľadom na výsledky aktivity PAL, sme sa rozhodli sledovať relatívnu expresiu génov kódujúcich niektoré izoformy tohto enzýmu. V kukurici je totižto známych mnoho izoenzýmov PAL, z ktorých sme vybrali tri kódujúce gény (*PAL9*, *PAL3* a *PAL2*). Ich relatívnu expresiu sme sledovali v hlavnom koreni a druhom liste, keďže tieto orgány vykazovali najvyššie aktivity tohto enzýmu. Gén *PAL2* v druhom liste kukurice vo výsledkoch nie je zobrazený, nakoľko jeho expresia bola veľmi nízka, čo môže tiež značiť absenciu pro-

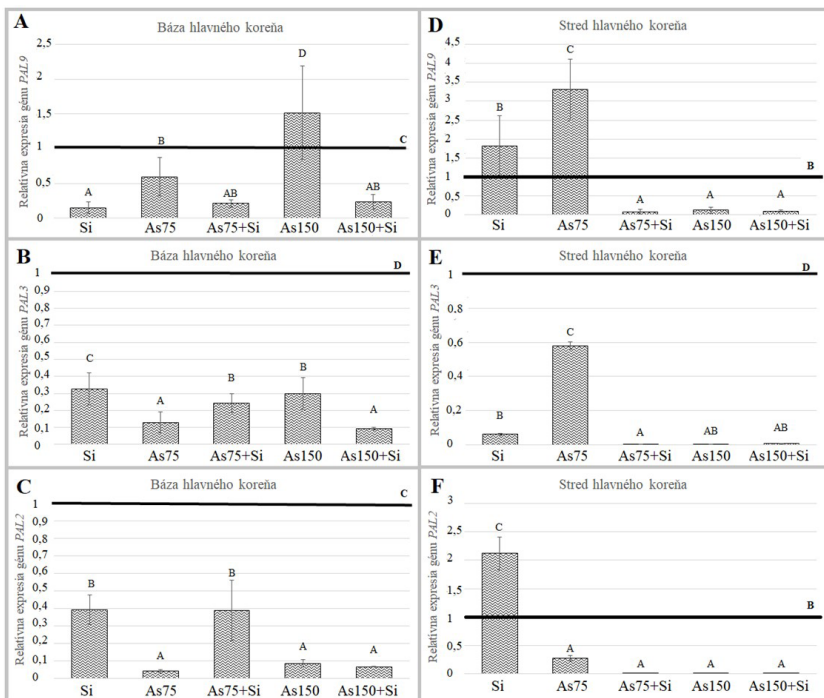


Obr. 2. Aktivita guajakol peroxidázy (G-POX) v  $\mu\text{mol tetraguaiakolu min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  rozpustných proteínov (RP) v rôznych kategóriách koreňov (A – C) a v druhom liste kukurice siatej (D). Údaje sú priemery  $\pm$  SD. Rôzne písmená predstavujú signifikantné rozdiely medzi variantmi na úrovni preukaznosti  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

Fig. 2. Activity of guaiacol peroxidase (G-POX) in  $\mu\text{mol tetraguaiakolu min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  soluble proteins in different categories of roots (A – C) and in second leaf of maize (D). Values represent means  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences between different treatments at  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

teínového produktu. Jednotlivé izoenzýmy PAL majú zjavne odlišné úlohy pri prekonávaní rôznych biotických a abiotických stresorov a rovnako ich expresia je ako vývinovo, tak aj priestorovo riadená (Vogt 2010).

V rámci jednotlivých zón hlavného koreňa sme sa primárne sústredili na stredovú a bazálnu oblasť, nakoľko apikálna zóna hlavného koreňa vykazovala známky poškodenia a odumierania buniek, pravdepodobne v dôsledku dlhodobého pôsobenia vysokých koncentrácií As. Preukazne zvýšenú expresiu vplyvom pôsobenia As sme zaznamenali iba pri *PAL9* v báze pri As150 a v strede hlavného koreňa pri As75, pričom v oboch prípadoch prídanie Si znížilo expresiu daného génu hlboko pod úroveň kontroly. Ostatné izoenzýmy v rôznych častiach hlavného koreňa vykazovali výrazne zníženú expresiu v porovnaní s kontrolou. Vzhľadom na to, že presný počet izoforiem PAL vplyvom stresu spôsobeného ťažkými kovmi a polokovmi v kukurici nie je

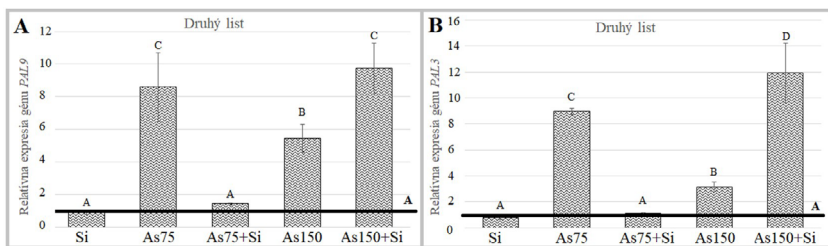


Obr. 3. Relatívna expresia génov *PAL9* (A, D), *PAL3* (B, E) a *PAL2* (C, F) v báze a strede hlavného koreňa kukurice zistená pomocou RT-qPCR. Kontrolný variant je znázornený čiernou čiarou (hodnota 1). Údaje sú priemery ± SD. Rôzne písmená predstavujú signifikantné rozdiely medzi variantmi na úrovni preukaznosti  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

Fig. 3. Relative expression of *PAL9* (A, D), *PAL3* (B, E) and *PAL2* (C, F) in base and middle part of maize main root detected by RT-qPCR. Control treatment is represented by a black line (value 1). Values represent means ± SD. Different letters indicate significant difference between different treatments at  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

známy, nedá sa jednoznačne predpokladať účasť konkrétneho izoenzýmu pri danom type stresu.

Pri oboch As variantoch, no najmä pri slabšom strese z As (As75) sme zistili zvýšenú relatívnu expresiu génov *PAL9* a *PAL3* v druhom liste kukurice v porovnaní s kontrolou (obr. 4). Pri menšej arzénovej koncentrácii v kombinácii s Si (As75+Si), v porovnaní s variantom bez Si (As75), sledujeme výrazný pokles v expresii oboch sledovaných génov *PAL9* aj *PAL3* na úroveň kontrolných rastlín. Naopak, pri vyššej koncentrácii As pridanie



Obr. 4. Relatívna expresia génov *PAL9* (A) a *PAL3* (B) v druhom liste kukurice zistená pomocou RT-qPCR. Kontrolný variant je znázornený čiernou čiarou (hodnota 1). Údaje sú priemery  $\pm$  SD. Rôzne písmená predstavujú významné rozdiely medzi variantmi na úrovni preukaznosti  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

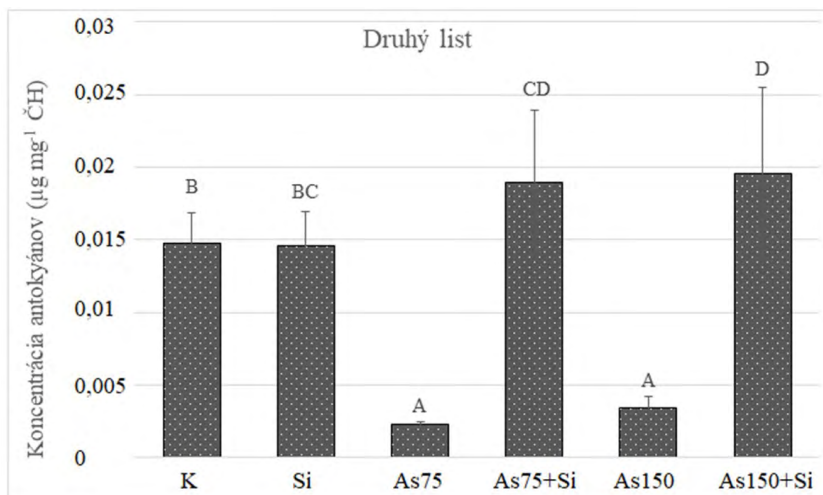
Fig. 4. Relative expression of *PAL9* (A) and *PAL3* (B) in second leaf of maize detected by RT-qPCR. Control treatment is represented by a black line (value 1). Values represent means  $\pm$  SD. Different letters indicate significant difference between different treatments at  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

Si významne zvýšilo mieru expresie *PAL9* a *PAL3* na transkripčnej úrovni. To naznačuje, že Si pri vyššej koncentrácii As pôsobí pozitívne a zvyšuje tak sekundárnu metabolickú kapacitu v kukurici, čo potvrdili aj Luan et al. v uhorku (2022) či Soukup et al. v ciroku (2017).

Z neenzymatických antioxidantov sme sledovali tvorbu antokyánov (obr. 5). Pri ich syntéze hrá enzým PAL opäť dôležitú úlohu, keďže ide o jedny z produktov fenylypropanoidnej biosynthetickej dráhy. Antokyány pomáhajú rastliny chrániť pred poškodením reaktívnymi formami kyslíka, ktoré sa tvoria pri biotických aj abiotických stresoch (Gould et al. 2002; Nagata et al. 2003). Koncentrácia antokyánov v druhom liste kukurice výrazne klesla v oboch As variantoch v porovnaní s kontrolným a Si variantom (obr. 5). V obrannom antioxidačnom mechanizme mohlo dôjsť buď k poškodeniu samotného systému, alebo antioxidačnú odpoveď prebrali enzymatické antioxidanty ako napríklad superoxid dismutáza (SOD), guajakol peroxidáza (G-POX) alebo askorbát peroxidáza (APX). Zároveň sme pozorovali, že prídanie Si k As stresovaným rastlinám významne zvýšilo tvorbu antokyánov na úroveň kontrolných rastlín (As75+Si) alebo i viac (As150+Si). Takto pozitívny vplyv kremíka na antioxidačný obranný mechanizmus formou stimulácie tvorby antokyánov pozorovali aj viacerí autori (Amiri et al. 2012; Karagiannis et al. 2021; Dar et al. 2022).

Z našich výsledkov je zjavné, že As znižoval aktivitu peroxidázy v hlavných a primárnych adventívnych koreňoch a rovnako negatívne vplýval na tvorbu





Obr. 5. Koncentrácia antokyánov v  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  v čerstvej hmotnosti (ČH) v druhom liste kukurice. Údaje sú priemery  $\pm$  SD. Rôzne písmená predstavujú signifikantné rozdiely medzi variantmi na úrovni preukaznosti  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

Fig. 5. Concentration of anthocyanins in  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  fresh weight in second leaf of maize. Values represent means  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences between different treatments at  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test).

antokyánov v listoch. Zároveň sa vplyvom As výrazne zvyšovala expresia *PAL* v hlavnom koreni a *PAL9* a *PAL3* v druhom liste, ako aj stúpala aktivita samotného enzýmu. Kremík pridaný k As signifikantne zvýšil syntézu antokyánov a aktivitu enzýmu G-POX v listoch a zároveň signifikantne stimuloval expresiu *PAL9* a *PAL3* v druhom liste kukurice, avšak len pri vyššom strese z As. V prípade koreňov exogénne pridaný kremík k As nemal vplyv na aktivitu G-POX. Zistili sme, že aktivita jednotlivých enzýmov, ako aj expresia génov pre PAL je do veľkej miery rozdielna medzi jednotlivými kategóriami koreňov, čo môže súvisieť s ich funkciou, rozdielnou anatomicou štruktúrou a ontogenetickým stupňom vývinu jednotlivých pletív. Na základe našich výsledkov môžeme tiež povedať, že Si má potenciál na zmiernenie určitých foriem stresu z toxického polokovu As, no na jeho aplikáciu do praxe je potrebné vykonať ďalšie štúdie súvisiace s objasnením mechanizmu jeho pôsobenia.

## Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore Agentúry pre podporu výskumu a vývoja, grant č. APVV-17-0164 a APVV SK-CN-21-0034, Vedeckej grantovej agentúry VEGA, grant č. VEGA 1/0472/22, vďaka podpore Grantu Univerzity Komenského č. UK/232/2021 a UK/190/2022 a bola súčasťou riešenia COST CA19116 akcie. Táto publikácia tiež vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Zvýšenie kapacít a kompetencií Univerzity Komenského vo výskume, vývoji a inováciách, ITMS2014+: 313021BUZ3, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Literatúra

- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. & Pedreño, M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions, *J. Exp. Bot.* 60: 377–390.
- Amen, R., Bashir, H., Bibi, I., Shaheen, S. M., Niazi, N. K., Shadid, M., Hussain, M. M., Antoniadis, V., Shakoor, M. B., Al-Solaimani, S. G., Wang, H., Bundschuh, J. & Rinklebe, J. 2020. A critical review on arsenic removal from water using biochar-based sorbents: The significance of modification and redox reactions. *Chem. Eng. J.* 396: 125195.
- Amiri, J., Entesari, S., Delavar, K., Saadatmand, M. & Rafie, N. A. 2012. The effect of silicon on cadmium stress in *Echium amoenum*. *World Acad. Sci. Eng. Technol* 62: 242–245.
- Bathoova, M., Bokor, B., Soukup, M., Lux, A. & Martinka, M. 2018. Silicon-mediated cell wall modifications of sorghum root exodermis and suppression of invasion by fungus *Alternaria alternata*. *Plant Pathol.* 67: 1891–1900.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* 6: 850–861.
- Dar, F. A., Tahir, I., Hakeem, K. R. & Rehman, R. 2022. Silicon application enhances the photosynthetic pigments and phenolic/flavonoid content by modulating the phenylpropanoid pathway in common buckwheat under aluminium stress. *Silicon.* 14: 323–334.
- Frič, F. & Fuchs, W. H. 1970. Veränderungen der aktivität einiger enzyme im weizenblatt in abhängigkeit von der temperaturlabilen verträglichkeit für *Puccinia graminis tritici*. *J. Phytopathol.* 67: 161–174.
- Gould K. S., Mckelvie J. & Markham, K. R. 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury. *Plant. Cell. Environ.* 25: 1261–1269.
- Havr E. A. & Hanson K. R. 1970. L-Phenylalanine ammonia-lyase (potato tubers). In: Tabor H., Tabor C. W. (eds.) *Methods in Enzymology*. Vol. 17A. Academic Press, New York, USA, p. 575
- Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. 1999. The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant. Phys.* 50: 473–503.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil: circular. *Calif. Aes. Bull.* 347: 1–32.
- Hodgins D. S. 1971. Yeast phenylalanine ammonia-lyase: purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J. Biol. Chem.* 246: 2977–2985.
- Chance, B. & Maehly, A. C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Method. Enzymol.* 5: 764–775.
- Karagiannis, E., Michailidis, M., Skodra, C., Molassiotis, A. & Tanou, G. 2021. Silicon influenced ripening metabolism and improved fruit quality traits in apples. *Plant Physiol. Bioch.* 166: 270–277.

- Khandekar, S. & Leisner, S. 2011. Soluble silicon modulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes involved in copper stress. *J. Plant. Physiol.* 168: 699–705.
- Kumar, V., Singh, J., Kumar, P. 2019. Heavy metals accumulation in crop plants: Sources, response mechanisms, stress tolerance and their effects. *Agr. Environ.* 1: 38–57.
- Li, J., Leisner, S. & Frantz, J. 2008. Alleviation of copper toxicity in *Arabidopsis thaliana* by silicon addition to hydroponic solutions. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133: 670–677.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402–408.
- Luan, H., Niu, C., Nie, X., Li, Y. & Wei, M. 2022. Transcriptome and physiological analysis of rootstock types and silicon affecting cold tolerance of cucumber seedlings. *Plants* 11: 445.
- Lukačová, Z., Švubová, R., Kohanová, J. & Lux, A. 2013. Silicon mitigates the Cd toxicity in maize in relation to cadmium translocation, cell distribution, antioxidant enzymes stimulation and enhanced endodermal apoplasmic barrier development. *Plant. Growth. Regul.* 70: 89–103.
- Lukačová, Z., Švubová, R., Janikovičová, S., Volajova, Z. & Lux, A. 2019. Tobacco plants (*Nicotiana benthamiana*) were influenced by silicon and were not infected by dodder (*Cuscuta europaea*). *Plant. Physiol. Biochem.* 139: 179–190.
- Mandlik, R., Thakral, V., Raturi, G., Shinde, S., Nikolić, M., Tripathi, D. K., Sonah, H. & Deshmukh, R. 2020. Significance of silicon uptake, transport, and deposition in plants. *J. Exp. Bot.* 71: 6703–6718.
- Meents, M. J., Watanabe, Y. & Samuels, A. L. 2018. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Ann. Bot.* 121: 1107–1125.
- Mišúthová, A., Slovákova, L., Kollárová, K & Vaculík, M. 2021. Effect of silicon on root growth, ionomics and antioxidant performance of maize roots exposed to As toxicity. *Plant. Physiol. Biochem.* 168: 155–166.
- Nagata, T., Todoriki, S., Masumizu, T., Suda, I., Furuta, S., Du, Z. J. & Kikuchi, S. 2003. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 2992–2999.
- Natasha, Bibi, I., Shadid, M., Niazi, N. K., Younas, F., Naqvi, S. R., Shaheen, S. M., Imran, M., Wang, H., Hussaini, K. M., Zhang, H. & Rinklebe, J. 2021. Hydrogeochemical and health risk evaluation of arsenic in shallow and deep aquifers along the different floodplains of Punjab, Pakistan. *J. Hazard. Mater.* 402: 124074.
- Neff, M. M. & Chory J. 1998. Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 118: 27–35.
- Pawlak-Sprada, S., Arasimowicz-Jelonek, M., Podgórska, M. & Deckert, J. 2011. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochimica Polonica.* 58: 211–216.
- Smirnov, O., Kosyan, A. & Kosyk, O. 2012. The cycocel effect on flavonoids content and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) plant. *Stud. Biol.* 6: 247–252.
- Smirnov, O. E., Kosyan, A. M., Kosyk, O. I. & Taran, N. Y. 2015. Response of phenolic metabolism induced by aluminium toxicity in *Fagopyrum esculentum* Moench. plants. *Ukr. Biochem. J.* 87: 129–135.

- Soukup, M., Martinka, M., Bosnic, D., Čaplovičová, M., Elbaum, R. & Lux, A. 2017. Formation of silica aggregates in sorghum root endodermis is pre-determined by cell wall architecture and development. *Ann. Bot.* 120: 739–753.
- Strable, J. & Scanlon, M. J. 2009. Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold. Spring. Harb. Protoc.* 4: 1–7.
- Vaculík, M., Lukačová, Z., Bokor, B., Martinka, M., Tripathi, D. K. & Lux, A. 2020. Alleviation mechanisms of metal(loid) stress in plants by silicon: a review. *J. Exp. Bot.* 71: 6744–6757.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* 3: 2–20.

Došlo 16. 2. 2024

Prijaté 12. 11. 2024