

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**TOXICITA TĚŽKÝCH KOVŮ, JEJICH PŘÍJEM,
TRANSLOKACE A VLIV NA PRODUKCI
OCHRANNÝCH A SIGNÁLNÍCH LÁTEK U ROSTLIN**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Autor: Mgr. Jiří Šimek
Studijní program: Biologie D
Obor/kombinace: Aplikovaná biologie a ekologie (DR-BI)
Školitel: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.

Hradec Králové 2016

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Zadání dizertační práce

Autor: Mgr. Jiří Šimek
Studijní program: Biologie D
Obor/kombinace: Aplikovaná biologie a ekologie (DR-BI)

Název dizertační práce: Toxicita těžkých kovů, jejich příjem, translokace a vliv na produkci ochranných a signálních látek u rostlin

Název dizertační práce AJ: Heavy metals toxicity, their uptake, translocation and influence on the production of protective and signal substances by plants

Zásady pro vypracování:

Těžké kovy jsou významnými kontaminanty životního prostředí. Nepodléhají degradaci, jsou vysoce toxické a snadno se akumulují v různých organizmech a zatěžují potravní řetězce, proto jsou v popředí zájmu výzkumných kolektivů na celém světě. Jejich příjem, translokace i akumulace u rostlin je značně specifická. Bezprostředně ovlivňují fyziologické pochody i morfogenetické změny v rostlinách. Řada rostlin si vytvořila různé adaptační mechanismy na vysoké koncentrace těžkých kovů a často se využívají v tzv. fytořemediacích. Stresová reakce rostlin na působení těžkých kovů je spojena se syntézou specifických ochranných a signálních látek.

Cílem disertační práce je výzkum interakcí při příjmu vybraných těžkých kovů např. Cd, Zn, jejich translokace a akumulace. Výzkum toxicity na různé druhy rostlin, ovlivnění hlavních fyziologických pochodů – fotosyntézy, respirace, transpirace, syntézy chlorofylu a vyvolání

morfológických změn v pletivech rostlin. Zkoumán bude vliv těžkých kovů na obsah specifických látek např. organických kyselin i ochranných a signálních látek např. fenolické látky, thioly, antioxidační aktivita. Bude porovnána reakce u vybraných hospodářsky významných rostlin a přirozených rostlinných hyperakumulátorů. Výzkum bude probíhat prostřednictvím hydroponických pokusů v přesně definovaných podmínkách klimaboxu a nádobových pokusů ve skleníku. V průběhu vegetace proběhnou nedestruktivní měření specifickými přístroji např. LCpro+, fluorometr, chlorofylmetr aj., budou vyhodnoceny příznaky toxicity. Sklizeny budou odděleně jednotlivé části a vybraná pletiva rostliny a podrobena laboratorním analýzám, např. pomocí metod AAS, ICP, HPLC-ED, fotometrických aj. Výzkum bude probíhat ve spolupráci s vybranými pracovišti v ČR i zahraničí.

Seznam doporučené literatury:

Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (1999): Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystem. Springer-Verlag Berlin.

Sanita di Toppi L., Prasad M.N.V, Ottonello, S. (2002): Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Cobbett C.S. (2003): Metallothioneins and phytochelatins; the sulfur-containing, metal-binding ligands of plants. In, Sulphur In Plants. Eds. Y.P. Abrol, A. Ahmad. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. pp. 177-188.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Školitel: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.

Oponenti: prof. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

doc. RNDr. Ivan Suchara, CSc.

Datum zadání práce: 15. 10. 2012

Datum odevzdání práce:

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svoji dizertační práci na téma „Toxicita těžkých kovů, jejich příjem, translokace a vliv na produkci ochranných a signálních látek u rostlin“ zpracoval samostatně a uvedl citace všech použitých zdrojů. Výsledky v předložené práci jsou originálními údaji, získanými během prezenční formy doktorského studia.



V Hradci Králové, dne 30. 9. 2016

Mgr. Jiří Šimek

Poděkování:

Jednotlivé experimenty, které jsou součástí předkládané dizertační práce, byly realizovány za finanční podpory následujících grantových projektů Specifického výzkumu Univerzity Hradec Králové:

2108/2013	Vliv těžkých kovů na produkci ochranných látek u rostlin
2116/2014	Reakce rostlinných hyperakumulátorů na stresové působení těžkými kovy

Zahraniční stáže na Univerzitě v Bernu byly hrazeny z následujícího projektu:

CZ.1.07/2.2.00/28.0118	Inovace studijních oborů zajišťovaných katedrami PřF UHK
-------------------------------	--

Zapojení spoluautorů publikací Pavla Bučka a Vlastimila Dohnala bylo podpořeno projektem:

CZ.1.07./2.3.00/30.0052	Rozvoj výzkumu a vývoje na Univerzitě Hradec Králové za účasti post doktorandů
--------------------------------	--

Tímto bych rád také poděkoval mému školiteli, doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc., za jeho odborné vedení, rady a konzultace v průběhu celého doktorského studia, jakož i při zpracovávání mé dizertační práce. Za spolupráci při realizaci jednotlivých pokusů, popř. pomoc při stanovování některých specifických látek dále děkuji doc. RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. et Ph.D.; Ing. Karlu Musilovi; Mgr. Pavlu Bučkovi, Ph.D a RNDr. Zuzaně Dučaiové, Ph.D. Za vedení a odborné rady s výzkumnou činností v průběhu mezinárodních stáží též děkuji Prof. Dr. Ursu Fellerovi a Prof. Dr. Doris Rentsch. V neposlední řadě bych také rád poděkoval celé své rodině, a to především za jejich nemalou podporu v průběhu celého trvání doktorského studia.

ABSTRAKT

V rámci překládané dizertační práce je shrnuta aktuální situace kolem problematiky těžkých kovů (HM) v souvislosti se stresovým působením na rostliny. Práce rovněž obsahuje metodiky a výsledky celkem 4 experimentů, které proběhly v rámci doktorského studia. V těchto pokusech bylo pracováno s běžně pěstovanými a dostupnými rostlinami - fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), pšenice (*Triticum aestivum* L.), okurka setá (*Cucumis sativus*); léčivými rostlinami - kalisie vonná (*Calisia fragans*); dříve popsanými rostlinnými hyperakumulátory - zelenec (*Chlorophytum commosum*) a typicky pokusnými druhy - huseníček (*Arabidopsis* sp.).

Bylo využito jak hydroponického prostředí, tak nádobových experimentů ve skleníku. Z HM jsme se soustředili převážně na Cd, výběrově doplněné o esenciální prvek Zn. Kromě makroskopického hodnocení vlivu Cd na růst a vývoj rostlin, byly pomocí nedestruktivních měřicích metod zjišťovány i další proměnné, jako např. intenzita fotosyntézy, transpirace, vodivost průduchů či relativní obsah chlorofylu. Pomocí laboratorních metod pak byl zkoumán obsah Cd v jednotlivých částech rostlin, popřípadě zde byl sledován i pohyb dalších relevantních kationtů. Pro identifikaci a pochopení zapojení různých obranných mechanismů bylo v rostlinách rovněž stanovováno množství dalších signálních látek, jako např. organických kyselin, fenolických látek (PhC), thiolů či určena míra antioxidační kapacity (AOC). To vše v závislosti na různých doprovodných aniontech, poskytujících Cd uměle kontaminovaným půdám.

Během experimentů docházelo k ovlivnění produkce rostlinné biomasy, a to jak v pozitivním, tak negativním směru. Zatímco přídavek HM do živného média měl za následek snížení hmotnosti rostlinné hmoty u mladých rostlin fazole, pšenice a klíčících rostlin *Arabidopsis*, u rostlin okurky způsobily všechny varianty s přídavkem Cd naopak mírné zvýšení této produkce. Naopak zelenec a kalisie prokázaly vysokou schopnost odolávat toxicitě Cd a žádné snížení produkce biomasy nebylo pozorováno. Doprovodný aniont se rovněž v tomto ohledu jevil jako jeden z důležitých faktorů. Tím dalším, a neméně podstatným, byl pak samotný rostlinný druh.

K pozorovaným projevům toxicity patřily v našich experimentech listové chlorózy, popřípadě žloutnutí listů či znatelná ztráta pigmentů, popř. hnědnutí kolem listových žilek. Mnohem větší poškození pak bylo pozorováno u variant s doprovodným aniontem Cl⁻, než u aniontu SO₄²⁻. Potenciál fotochemické účinnosti systému PSII, byl jak inhibován, tak mírně posílen. Tento specifický účinek pak úzce závisel na druhu rostliny, ale i na dalších, pro rostlinu dostupných aniontech. Jednotným zjištěným byl fakt, že zvyšující se koncentrace Cd v médiu má rovněž za následek zvyšující se koncentraci kovu v rostlině. Vůbec nejvíce přijatého Cd rostlinami, bylo shodně akumulováno v kořenech. U rostlin okurky a fazole to bylo shodně více než 90 %, u pšenice okolo 60 %, u zelence 57 % a u kalisie 56 %. Zn pak zůstával v kořenech v menší části (přibližně 40 - 70 % u fazolí a 30 - 50 % u pšenice). Zn byl také, při pohybu z kořenů do nadzemních částí, mnohem mobilnější než Cd.

Signální, ale i obranný mechanismus kyseliny salicylové se lišil na úrovních kořene a listu, a to opět v závislosti na druhu rostliny. Fenolické látky vykazovaly zapojení do obranných reakcí rostlin, především díky kapacitě vázat na sebe kov. Rovněž zvýšení hodnot antioxidační kapacity, převážně v kořenech u zelence a kalisie, jako reakce na vyšší koncentrace Cd, zabraňuje zřejmě dalšímu oxidačnímu poškození rostliny. Velký nárůst ve vodě rozpustných thiolů zaznamenaly genotypy *Arabidopsis*, obsahující proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu. Přítomnost tohoto proteinu tak zřejmě hraje zásadní roli, jak v dostupnosti thiolů, tak celkové odolnosti rostlin vůči Cd. V neposlední řadě jsme ukázali, že vysoké hladiny organických kyselin nejsou samy o sobě hlavním důvodem pro hyperakumulaci a hypertoleranci vůči Cd.

Zjištění, že chemická forma přidaného Cd do živného roztoku ovlivňuje nejen úroveň akumulace Cd, ale i zapojení dalších obranných mechanismů v podobě syntézy specifických látek, v závislosti na druhu rostliny je informací, na základě které jsou velmi žádoucí další podobně zaměřené výzkumné studie.

Klíčová slova

Kadmium; zinek; fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*); pšenice (*Triticum aestivum* L.); okurka setá (*Cucumis sativus*); kalisie vonná (*Calisia fragans*); zelenec (*Chlorophytum comosum*); huseníček (*Arabidopsis* sp.); organické kyseliny, fenolické látky; antioxidační kapacita; thioly; toxicita těžkých kovů; fyziologické pochody rostlin

ABSTRACT

The aim of the present thesis was to summarize current information of actual problem of heavy metals (HM) in connection with their stress influence on plants. Thesis also includes the methodology and results of four experiments conducted during the doctoral studies. In these experiments, it was worked with available commonly grown plants – bean (*Phaseolus vulgaris*), wheat (*Triticum aestivum*), cucumber (*Cucumis sativus*); medical herbs – basket plant (*Calisia fragrans*); previously described metal hyperaccumulator – spider plant (*Chlorophytum comosum*); and typical experimental plant - *Arabidopsis*.

Hydroponic cultivation and pot experiments in the greenhouse were used. From heavy metals, we concentrated mainly on Cd, selectively supplemented with essential element Zn. In addition to macroscopic evaluation of the effect of Cd on plant growth and development, other variables were investigated using non-destructive measuring methods, such as the intensity of photosynthesis, transpiration, stomatal conductance, and relative chlorophyll content. Using laboratory methods, the amount of accumulated Cd in different parts of plants, or the movement of other relevant cations were examined. For the identification and understanding of the involvement of various defence mechanisms in plants, the amounts of other signal substances, *e.g.* organic acids, phenolic compounds, thiols or antioxidant capacity (AOC) were also determined. All measurements were done depending on a variety of accompanying anions of artificially contaminated soils with Cd.

During the experiments the production of plant biomass was affected, in both positive and negative direction. While the addition of HM to the nutrient medium resulted in a decrease in biomass weight of young bean, wheat and germinating *Arabidopsis* plants, on the contrary, the addition of Cd in cucumber caused a slight increase of biomass production. Conversely, spider plant and basket plant demonstrated a high ability to withstand the toxicity of Cd and no decrease in biomass production was observed. In this respect, the accompanying anion also appeared to be one of the important factors. Another, and equally less significant, was then plant species.

The observed signs of toxicity in our experiments included leaf chlorosis, yellowing leaves or noticeable loss of pigments, or browning around the leaf veins. Greater damage was then observed in variants with accompanied Cl⁻ anion than in variants with SO₄²⁻ anion. The potential of photochemical efficiency of PSII was both inhibited and slightly strengthened. This specific effect was closely depended not only on the plant species, but also on available anions for plants. Uniform finding was the fact that increasing concentration of Cd in the medium also resulted in increasing metal concentration in plant. Identically in all plant species, Cd was the most accumulated in roots. In cucumbers and beans it was similarly over 90 %, in wheat about 60 %, in spider plant 57 %, and in basket plant 56 %. Zn

remained in roots in smaller quantities (about 40 – 70 % in beans and 30 – 50 % in wheat). Zn was also in moving from roots to the aboveground parts much more mobile than Cd.

Signal, but also defence mechanism of salicylic acid varied at levels of roots and leaves, again depending on the plant species. Phenolic compounds showed involvement in plant defence reactions, mainly because of their capacity to bind metals. Also, an increase in antioxidant capacity, mostly in roots of spider plant and basket plant, as a reaction to elevated concentration of Cd prevents further oxidative damage of plants. The large increase in the water-soluble thiols was recorded in *Arabidopsis* genotypes containing carrier protein with high affinity to proline. The presence of this protein probably plays a crucial role, both in the availability of thiols, so in total resistance of plants to Cd. Finally, we showed that high levels of organic acids themselves are not the primary reason for hyperaccumulation and hypertolerance to Cd.

The finding that the chemical form of Cd added to the nutrient solution not only affects the level of accumulation of Cd, but also the involvement of other defence mechanisms in the form of synthesis of specific compounds, depending on the plant species, is the important result on the basis of which further studies are highly desirable.

Keywords

Cadmium; zinc; bean (*Phaseolus vulgaris*); wheat (*Triticum aestivum*); cucumber (*Cucumis sativus*); *Calisia fragans*; *Chlorophytum comosum*; *Arabidopsis*; organic acids, phenolic compounds; antioxidant capacity; thiols; heavy metal toxicity; physiological processes of plants

1. OBSAH

1.	OBSAH	1
2.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
3.	ÚVOD	5
4.	CÍLE PRÁCE	7
5.	AKTUÁLNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY	9
5.1	Kadmium	9
5.1.1	Charakteristika prvku	9
5.1.2	Vstup do půdy a její znečištění.....	10
5.1.3	Vliv půdních faktorů na dostupnost	12
5.1.4	Mechanismy příjmu a distribuce v rostlinách.....	13
5.2	Toxické účinky Cd na rostliny	17
5.2.1	Vliv na růst na vývoj rostlin	17
5.2.2	Vliv na fotosyntézu.....	18
5.2.3	Vliv na minerální výživu	19
5.2.4	Vliv na produkci reaktivních forem kyslíku.....	20
5.3	Zinek.....	23
5.4	Obranné mechanismy rostlin	26
5.4.1	Hyperakumulační mechanismus.....	28
5.5	Vybrané látky signalizující stresovou reakci.....	30
5.5.1	Organické kyseliny	30
5.5.1.1	Kyselina salicylová.....	30
5.5.2	Fenolické látky	31
5.5.3	Thioly	32
6.	METODIKA POKUSŮ	35
6.1	Experiment s okurkou setou	36
6.2	Experiment s hyperakumulátorem.....	37
6.3	Experiment s radionuklidy ¹⁰⁹ Cd a ⁶⁵ Zn	38
6.4	Experimenty s rostlinami <i>Arabidopsis</i> a jejich genotypy	39
6.4.1	Vliv kadmia na růst různých genotypů.....	39
6.4.2	Obsah thiolových sloučenin ve vztahu k bioakumulaci Cd.....	40
6.5	Stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	40
6.6	Stanovení antioxidační kapacity (AOC).....	41
6.7	Stanovení kyseliny salicylové	42
6.8	Stanovení organických kyselin.....	42

6.9	Stanovení celkového obsahu thiolových sloučenin	43
6.10	Statistické zpracování dat	43
7.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
7.1	Experiment s okurkou setou	44
7.1.1	Vliv kadmia na produkci biomasy	44
7.1.2	Viditelné symptomy toxicity	44
7.1.3	Obsah kadmia v jednotlivých částech rostliny	46
7.1.4	Obsah kyseliny salicylové v závislosti na kontaminaci kadmiem.....	47
7.1.5	Celkový obsah fenolických látek v závislosti na kontaminaci kadmiem	48
7.1.6	Vliv kadmia na intenzitu fluorescence chlorofylu.....	49
7.1.7	Vliv kadmia na obsah draslíku v jednotlivých částech rostlin	50
7.1.8	Vliv doprovodných aniontů na translokaci kadmia	51
7.2	Experiment se zelencem chocholatým a kalisí vonnou	53
7.2.1	Tolerance obou rostlin vůči růstu v kontaminované zemině	53
7.2.2	Vliv kadmia na intenzitu fluorescence chlorofylu.....	54
7.2.3	Vliv kadmia na intenzitu antioxidační aktivity.....	55
7.2.4	Translokace kadmia a jeho obsah v jednotlivých částech rostlin.....	56
7.2.5	Obsah kyseliny salicylové v závislosti na kontaminaci kadmiem.....	60
7.2.6	Obsah organických kyselin ve vztahu k bioakumulaci kadmia.....	61
7.3	Experiment s radionuklidy ⁶⁵ Zn and ¹⁰⁹ Cd.....	64
7.3.1	Viditelné projevy toxicity kadmia (pšenice a fazole).....	64
7.3.2	Změny množství sušiny v závislosti na působení kadmia	65
7.3.3	Transport radionuklidů ⁶⁵ Zn and ¹⁰⁹ Cd z kořene do nadzemní části.....	67
7.3.4	Relativní obsahy radionuklidů ⁶⁵ Zn and ¹⁰⁹ Cd v různých intervalech odběru	69
7.4	Experimenty s rostlinami <i>Arabidopsis</i> a jejich genotypy	73
7.4.1	Vliv kadmia na růst různých genotypů.....	73
7.4.2	Obsah thiolových sloučenin ve vztahu k bioakumulaci kadmia.....	75
7.5	Porovnání a shrnutí výsledků experimentů	77
7.5.1	Viditelné symptomy toxicity kadmia a jeho vliv na růst rostlin.....	77
7.5.2	Přijem a translokace kadmia do jednotlivých částí rostlin	79
7.5.3	Obsah specifických látek doprovázející stresovou reakci vůči kadmiu	80
8.	ZÁVĚRY	82
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83
10.	SEZNAM AUTOROVÝCH PUBLIKACÍ	108

2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	intenzita fotosyntézy
AAS	atomová absorpční spektrometrie
ABTS ⁺	[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] kationtový radikál
APS	adenosin 50-phosphosulfate
APX	askorbát peroxidáza
AsA	kyselina askorbová
ATP	adenosintrifosfát
BC	bioakumulační koeficient
CA	kyselina citrónová
CAT	isozymy kataláz
Dhar	dehydroascorbát reduktáza
DM	hmotnost sušiny (dry matter)
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
E	intenzita transpirace
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
FuA	kyselina fumarová
FW	hmotnost čerstvého vzorku (fresh weight)
GA3	kyselina gibberelová
GPX	glutathion peroxidáza
GR	glutathionreduktáza
G _s	vodivost průduchů
GSH	glutathion
HM	těžké kovy (heavy metals)
LMWT	thioly s nízkou molekulovou hmotností (low-molecular-weight thiols)
MDHAR	monodehydroascorbát reduktáza
MTs	metallothioneiny
NPK	kombinované granulované hnojivo (obsahující hlavní živiny - dusík, fosfor a draslík)
OEC	kyslík tvořící komplex
PC	fytochelatiny
PCS	fytochelatin syntázy
PEPC	fosfoenolpyruvát karboxyláza
PhC	fenolické látky
POD	skupina enzymů peroxidáz
PS2	fotosystém II

ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza
RWC	relativní obsah vody
SA	kyselina salicylová
SOD	superoxiddismutáza
TCA	kyselina trichloroctová

3. ÚVOD

Životní prostředí, jako nenahraditelný prostor k životu, potřebuje každý živý organismus. Ty tam jsou ale doby, kde byl svět tvořen jen přírodním a nedotčeným prostředím. V dnešním světě tvoří tyto prostory jen poslední ostrůvky naděje v tolik přetechnizovaném světě, v němž je antropogenní vliv naprostou dominantou. Přes světlé výjimky pozitivního vlivu člověka se stále častěji setkáváme spíše s negativním působením, které je prezentováno hlavně obrovským znečišťováním, což bezesporu ovlivňuje v první řadě půdu a rostliny, jakožto elementární součásti životního prostředí.

K vážným znečištěním životního prostředí, především pak HM, dochází díky typicky lidské činnosti (Hu et al. 2013). Oblastí takto kontaminovaných zemědělských půd začalo v poslední době na celém světě dramaticky přibývat. Důvodem jsou nejen nedávné pokroky v průmyslu a zemědělství (Lim et al. 2012), ale i další lidské činnosti, jako je nakládání s průmyslovými odpadními vodami z metalurgického a cementárenského průmyslu, odpady z těžebních prací, používání fosfátových hnojiv, pesticidů, čistírenských kalů a statkových hnojiv (Ok et al. 2011; Ahmad et al. 2012; Gallego et al. 2012; Sun et al. 2013; Khan et al. 2013; Lee et al. 2013). Těžební průmysl pak uvádí do pohybu velké množství hornin a odpadů ve formě hlušiny s vysokým obsahem HM (Wang et al. 2009). Bez systému ochrany tohoto důlního odpadu pak dochází k jeho přirozenému šíření větrem, vodou a srážkami do sousedních zemědělských půd. Kovy se následně v půdě a vegetaci hromadí, což představuje velká zdravotní rizika jak pro člověka, tak pro volně se pasoucí zvířata (Pál et al. 2006; Wang et al. 2008a). Ke zlepšení nastalé situace pak zrovna nepřispívají ani současné či minulé válečné konflikty nebo jaderné havárie, obdobné té z Černobylské jaderné elektrárny dne 26. dubna 1986 (Suchara et al. 2011; Suchara et al. 2016).

Většina z těchto rizikových kovů patří do skupiny přechodných prvků s neúplně zaplněnými d-orbitaly, s výjimkou Hg, Cd a Zn, které mají d-orbitaly zaplněné a málo se tedy podílejí na kovové vazbě. To se odráží i na jejich fyzikálních vlastnostech, např. nízké teplotě tání (Nies 2003). Mezi těmito kovy, jsou Fe, Mn Mo důležité stopové prvky, zatímco Zn, Ni, Cu, Co, Cr a V jsou potenciálně toxické stopové prvky. Prvky Ag, As, Hg, Cd, Pb a Sb však nemají žádnou známou funkci jako živiny a jsou více či méně toxické pro rostliny a mikroorganismy (Nies 1999). Vzhledem k relativní mobilitě, přetrvávání a široké distribuci HM v životním prostředí, je jejich odstranění vždy těžkým úkolem (Tao et al. 2013).

Kubo et al. (2008) a Casova et al. (2009) navíc předpokládají, že kontaminace kadmíem (Cd) v zemědělských půdách v budoucnu ještě poroste, především díky dlouhodobému používání fosfátových hnojiv s obsahem tohoto prvku, včetně využívání odpadních vod a čistírenských kalů pro účely zavlažování a hnojení. Právě toto jsou, spolu s atmosférickým spadem, dominantní vstupy Cd do půdy (Kirkham 2006). To je v půdě poměrně mobilní a přijatelné pro rostliny. Ke kontaminaci potravin a krmiv tak dochází již při nízkých koncentracích (Sarwar et al. 2010; Quinn et al. 2011).

Samotná akumulace rostlinou pak závisí jak na druhu rostliny, tak na účinnosti rostlin tento kov absorbovat. Pro hodnocení se pak používá hodnota příjmu kovu nebo převodní faktor pro transfer kovu

z půdy do rostliny (Rattan et al. 2005). Hodnocení biologické dostupnosti těžkých kovů (HM) poskytuje i informace o potenciálním přenosu a akumulaci kontaminující látky do potravinového řetězce (Chopin and Alloway 2007). Dominantním zdrojem Cd se tak staly pro člověka především kontaminované potraviny, z nichž jsou nebezpečné hlavně obiloviny (Clemens et al. 2013). Některé druhy obilovin, včetně rýže (*Oryza sativa*) a pšenice (*Triticum turgidum*) mohou akumulovat Cd ve svých zrnech, a to v úrovních, které překračují i mezinárodní obchodní normy (Liu et al. 2007a; Harris and Taylor 2013). Greger and Landberg (2008) uvádějí, že výrobky z obilovin tvoří v Evropě přibližně 40 % z příjmu Cd, s tím, že čísla budou i nadále narůstat v důsledku rostoucí spotřeby těstovin. Vědci v pokusech používali ale i další druhy plodin s cílem odhalit příjem a distribuci kovů. Jednalo se např. o řepku olejku (*Brassica napus*) (Baryla et al. 2001), slunečnici (*Helianthus* sp.) (Di Cagno et al. 2001), kukuřici (*Zea* sp.) (Krantev et al. 2008), hrách (*Pisum* sp.) (Popova et al. 2009), fazole mungo (*Vigna radiata*) (Wahid et al. 2008), len (*Linum* sp.) (Belkhadi et al. 2010), hořčici (*Brassica juncea*) (Ahmad et al. 2011) a další. I přes tyto výzkumy jsou ale v dané problematice jisté mezery, které mohou činit pochopení účinků kovů poměrně nejasné.

4. CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce bylo, zaměřit se na výzkum příjmu, translokace a akumulace vybraných HM u rostlin, v našem případě především Cd a Zn. Cd bylo zvoleno jednak z důvodu, že se jedná o jeden z nejagresivnějších a nejdéle přetrvávajících HM v přírodním prostředí, který může být, díky své rozpustnosti ve vodě, snadno absorbován rostlinnými pletivy, což je často reflektováno různými viditelnými fyto toxickými příznaky. Druhým důvodem byla jistá návaznost na problematiku týkající se tohoto prvku řešenou u rostlin fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) v diplomové práci. Spolu s Cd byl předmětem našeho výzkumu částečně i Zn, který vykazuje podobné vlastnosti jako Cd, má podobné mechanismy příjmu a translokace v rostlinách. Ovšem na rozdíl od Cd, je to důležitý stopový prvek, nutný pro výživu a růst rostlin.

V experimentech bylo nejprve pracováno s běžně pěstovanými rostlinami - fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), okurka setá (*Cucumis sativus*), pšenice (*Triticum aestivum*). Jelikož se jedná o plodiny, běžně pěstované ve velké části světa, bylo cílem zjistit, jak může toxický vliv kovu ovlivnit jejich výnos a kvalitu, popř. zda použití dílčích aniontů, např. v podobě hnojiv, nemůže znamenat riziko zvýšeného příjmu polutantu. Dále jsme pracovali s již dříve popsáním rostlinným hyperakumulátorem - zelencem chocholatým (*Chlorophytum commosum*). Tento pokus byl doplněn o léčivou rostlinu - kalisii vonnou (*Calisia fragans*). Vzhledem k podobnosti své rostlinné stavby a přítomnosti antioxidantních látek jsme předpokládali, že tyto dvě běžně dostupné pokojové rostliny mohou mít podobnou reakci na stres. V neposlední řadě jsme experimentu podrobily i různé genotypy rodu huseníček (*Arabidopsis* sp.). Tento druh je poměrně široce prozkoumán ve vztahu k HM, a tak nás zajímala odolnost i dalších odlišných genotypů, které obsahují různé proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu.

Výzkum probíhal jak prostřednictvím hydroponických pokusů v přesně definovaných podmínkách klimaboxu, tak v podobě nádobových skleníkových experimentů. Jednotlivé části rostlin byly sklizeny odděleně a vybraná rostlinná pletiva byla podrobena laboratorním analýzám.

Konkrétně jsme se v disertační práci zaměřili na:

- analýzu hlavních fyziologických pochodů rostlin při stresové reakci na HM – např. fotosyntézy, respirace, transpirace, syntézy chlorofylu (zjišťováno v průběhu vegetace nedestruktivním měřením specifickými přístroji např. LCpro+, fluorometr, chlorofylmetr)
- vyhodnocení příznaků toxicity, popř. vyvolaných morfologických změn v pletivech rostlin

-
- interakci Cd a Zn při příjmu a translokaci, a to jednak v závislosti na jejich rozdílné koncentraci, ale také na typu doprovodného aniontu
 - stanovení obsahu specifických látek např. organických kyselin, kyseliny salicylové i ochranných a signálních látek např. fenolických látek, thiolů a stanovení antioxidační kapacity s cílem odhalit zapojení jednotlivých mechanismů do obranných reakcí
 - u konzumovaných částí rostlin zjistit jejich potencionální nadměrnou akumulaci polutantů při jejich zvýšené koncentraci v médiu
 - zjistit možný potenciál jednotlivých rostlinných druhů pro možnost použití pro další výzkumy v oblasti případných fytoemediací

5. AKTUÁLNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY

5.1 Kadmium

5.1.1 Charakteristika prvku

Cd je relativně vzácný prvek, který se v přírodě nenachází v čistém stavu. Je prvkem neesenciálním a zároveň jedním z nejagresivnějších a nejdéle přetrvávajících HM v přírodním prostředí (Hu et al. 2013). V ovzduší rychle oxiduje na oxid kademnatý (CdO). Snadno reaguje s oxidem uhličitým (CO₂), vodní párou, oxidem siřičitým (SO₂), oxidem sírovým (SO₃), nebo chlorovodíkem (HCl), a kromě uhličitanu kademnatého (CdCO₃) se vyskytuje ještě jako hydroxid (Cd(OH)₂), sulfid (CdS) či chlorid (CdCl₂). Rovněž se může vázat slabou vazbu k uhlíku a dalším více elektronegativním prvkům (Tran and Popova 2013). Rovněž nemá amfoterní vlastnosti, a ačkoli jsou známy anionty Cd, prvek se v bázích nerozpouští (Borsari 2006). Jeho obrovská škodlivost spočívá v jeho snadném příjmu rostlinnými buňkami (Liu et al. 2007b). A to i přes to, že není nikterak nezbytný pro jejich růst (Gill et al. 2013). Díky rozpustnosti ve vodě, mohou být Cd²⁺ ionty snadno absorbovány pletivy, což často reflektují různé viditelné fytotoxické příznaky (Singh et al. 2008; Hu et al. 2009; Valentovičová et al. 2010; Gill et al. 2013). Ve srovnání s ostatními HM, má také vyšší tendenci hromadit se v požitelných částech plodin, které následně vstupují do potravního řetězce (Arao et al. 2003; Ishikawa et al. 2010). Kromě ovoce a obilovin, byly totiž popsány přirozeně vyšší koncentrace v listové zelenině a hlízách brambor (Tran and Popova 2013). Pro většinu rostlin je Cd totiž toxické již při nízkých koncentracích. K jeho rychlé absorpci dochází pomocí kořenů, následně přesunu do xylému a transportu do nadzemních částí rostlin. Zde způsobuje hlavně inhibici růstu a četné fyziologické a metabolické poruchy a to tak, že dochází ke změnám základních biochemických reakcí (Hermans et al. 2004; Benavides et al. 2005; Ishikawa et al. 2010). Na morfologické úrovni způsobuje Cd inhibici růstu kořenů, chlorózy listů (Nocito et al. 2002; Benavides et al. 2005; Pavlíková et al. 2008), inhibici otevírání průduchů (Perfus-Barbeoch et al. 2002), vadnutí a dokonce i smrt rostliny (Barceló and Poschenrieder 1990). Může též vyvolat celou řadu fyziologických změn, včetně inhibice fotosyntézy a transpirace (Nyitrai et al. 2003; Shi et al. 2010), indukci oxidačního stresu (Schützendübel et al. 2001), změny aktivity enzymů (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999; Hasan et al. 2009) či modifikace v expresi genů (Sarry et al. 2006; Herbette et al. 2006).

Ovlivněn je také příjem minerálních látek (Gouia et al. 2000; Zhang et al. 2002; Shukla et al. 2003; Kim et al. 2003; Dražić et al. 2004; Adhikari et al. 2006), metabolismus bílkovin a funkce membrán (Azevedo et al. 2005) nebo vodní provoz rostlin a klíčivost semen (Fayiga et al. 2004; Shweta and Agrawal 2006). Samotná citlivost rostlin vůči tomuto působení tak závisí na vzájemně propojené síti fyziologických a molekulárních mechanismů, které zahrnují příjem a akumulaci kovu přes

extracelulární prostory a buněčné stěny, tvorbu komplexů s ionty uvnitř buňky (např. organické kyseliny, aminokyseliny, fytochelatiny, apod.), obecné biochemické reakce jako indukci antioxidantních enzymů a aktivaci nebo úpravu metabolismu rostlin (Cho et al. 2003). Vzhledem k tomu, že se Cd přirozeně vyskytuje prakticky ve všech půdách, obsahují logicky i všechny potravinářské výrobky nějakou koncentraci tohoto prvku, a proto jsou všichni lidé vystaveni přirozené dávce Cd (Tran and Popova 2013).

5.1.2 Vstup do půdy a její znečištění

Samotný vstup Cd do půdy se neděje pouze antropogenní činností. Je zřejmé, že na vině jsou i zdroje přírodní. Těmi se rozumí především přirozené základní podloží či pohyb matečného substrátu, jako např. ledovcového a náplavového. Ovšem největšími přírodními zdroji mobilizace Cd v zemské kůře jsou sopky a zvětrávání hornin. Translokace prvku pak v rámci biosféry probíhá prostřednictvím rozdílných procesů. Ročně se na Zemi uvolňuje do životního prostředí poměrně velké množství Cd, asi 25 000 tun. Přibližně polovina tohoto množství se díky zvětrávání hornin dostane do řek a část se uvolní do ovzduší prostřednictvím lesních požárů a sopečné činnosti. Zbytek Cd má původ z lidské činnosti, a to především při činnostech produkujících průmyslový odpad z procesů jako jsou např. elektrolytické pokovování, výroba plastů a barevných pigmentů, těžba, příprava slitin a akumulátorů, výroba kompostů a hnojiv (Tran and Popova 2013). Dokonce i čistírenský kal, který vznikl v přísně kontrolovaných podmínkách, obsahuje Cd a přispívá tedy ke znečišťování, a to především podzemních vod (Moradi et al. 2005). Jako průměrná hodnota výskytu Cd v nekontaminovaných půdách je uváděno rozmezí od 0.1 do 1.5 mg.kg⁻¹. Pro tyto půdy se obsahy Cd v ČR pohybují v rozmezí od 0.18 do 0.26 mg.kg⁻¹ (ÚKZÚZ Brno, 2007). Nicméně hnojiva mohou obsahovat až 40 mg.kg⁻¹ Cd. Půdní roztoky neznečištěných půd pak obsahují koncentrace v rozmezí od 0.04 do 0.32 mM Cd. Obecně lze tak půdní roztoky o koncentraci 0.32 - 1 mM považovat již za středně znečištěné (Tran and Popova 2013). Cd se v půdě kumuluje nejvíce ve vrstvě 0 - 5 cm a s přibývajícím hloubkou jeho koncentrace klesá. Obsah Cd vyšší než 3 mg.kg⁻¹ je již považován za nadměrný s možností toxického působení (Beneš 1994).

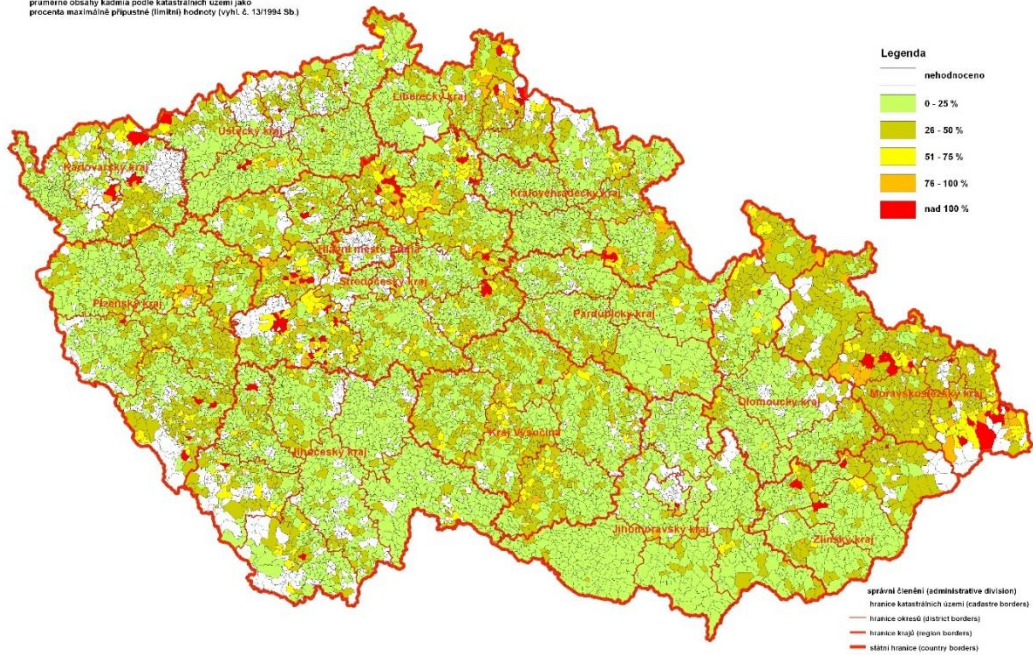
Situace v České republice je obdobná té světové. Zdrojem Cd jsou zde především odpadní vody z povrchových úprav kovů galvanickým pokovováním (kadmiováním), sklářského průmyslu, hutnictví neželezných rud, výroby hnojiv, fotografického a polygrafického průmyslu a průmyslu výroby plastických hmot. Největší množství Cd se pak u nás spotřebovává při výrobě záporné akumulátorové hmoty a výrobě nikl - kadmiových (Ni - Cd) článků. Velmi časté je též použití ve sklářském průmyslu při barvení skla a v povrchových úpravách kovů kadmiováním. K nejvíce znečištěným zemědělským půdám v ČR patří oblasti v Moravskoslezském, Karlovarském a Středočeském kraji, která do jisté míry odrážejí těžební oblasti. V procentech maximálně přípustné hodnoty zobrazuje situaci obr. 1. Ze situace v ovzduší pak stojí za zmínku především nadlimitní koncentrace v oblasti Tanvaldska (viz obr. 2). Příčinou lze hledat v zastoupení místního průmyslu, především pak skláren.

Obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách České republiky

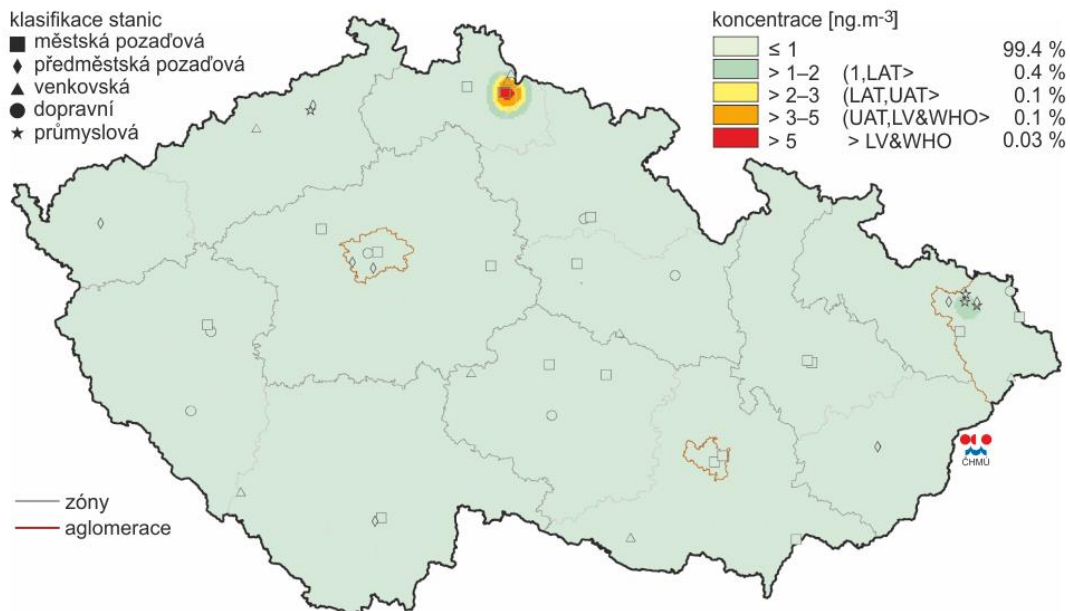
Kadmium (Cd) 2M HNO₃, mg.kg⁻¹

průměrné obsahy kadmia podle katastrálních území jako procenta maximálně přípustné (limitní) hodnoty (vyhl. č. 13/1994 Sb.)

Cd



Obr. 1: Obsahy Cd v zemědělských půdách ČR. Převzato z www stránek Ministerstva zemědělství (<http://eagri.cz/public/web/file/288302/cdus13cd.jpg>).



Obr. 2: Roční průměrné koncentrace Cd (ng.m³) v ovzduší ČR (rok 2014). Převzato z www stránek Českého hydrometeorologického ústavu (<http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/grafroc/14groc/gr14cz/png/oIV6-1.png>).

5.1.3 Vliv půdních faktorů na dostupnost

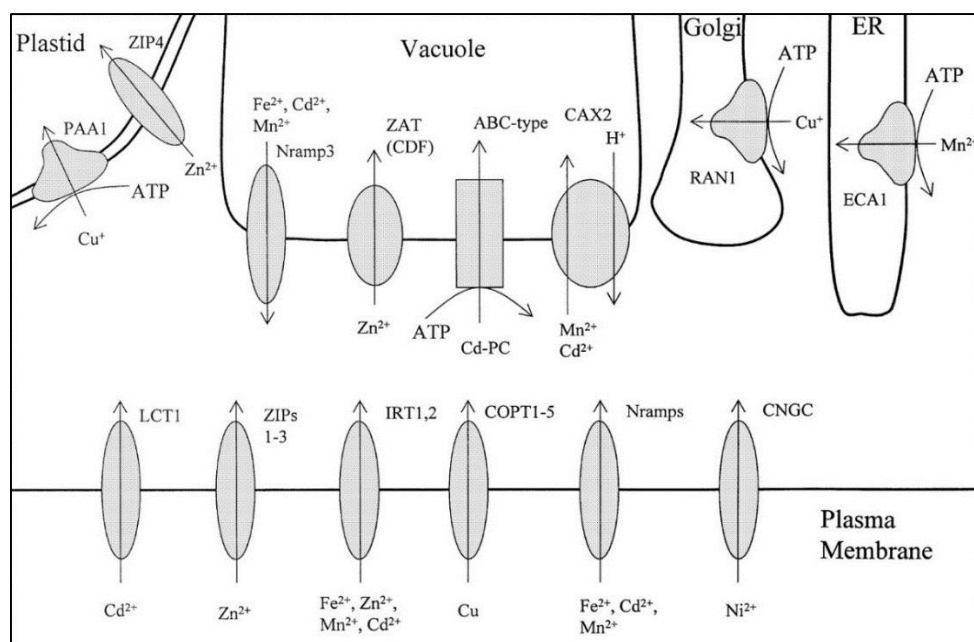
Je známo, že na míru příjmu Cd vyššími rostlinami má vliv hned několik různých půdních faktorů, jako např. samotná koncentrace kovu v půdě, jeho biologická dostupnost, přítomnost organických látek, redox potenciál (Liu et al. 2000) či teplota a koncentrace dalších prvků (Benavides et al. 2005). Dalším faktorem je půdní druh. Ten v půdní matici ovlivňuje především rychlost a cesty migrace kontaminantu a to nejen do spodních vod. V případě lehkých půd (písčité a hlinitopísčité) probíhá daleko rychlejší migrace prvku, zatímco těžké půdy jsou charakteristické větší sorpcí kontaminantu v půdě. V půdách se Cd vyskytuje v různých formách. Značná část prvku je v rizikových půdách zastoupena ve výměnné formě, u nekontaminovaných půd převládá forma vázána na oxidy železa a manganu. Vysoká mobilita Cd souvisí také s koncentrací chloridů v půdním roztoku. S fulvokyselinami tvoří rozpustné cheláty. Mobilita Cd je v půdách určována poměrem huminových kyselin a fulvokyselin. Převládají-li v půdě oxidační podmínky, má Cd tendenci tvořit málo pohyblivé sloučeniny. Nejvyšší zákonem přípustné koncentrace Cd pro základní druhy zemědělských půd upravuje v ČR vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 13/1994 Sb. Pro Cd je to 0.4 mg.kg^{-1} (lehké půdy) a 1.0 mg.kg^{-1} (ostatní půdy). Vyhláška udává shodné maximální přípustné obsahy jak pro rozklad lučavkou královskou tak pro 2M HNO_3 .

Nicméně, za vůbec nejdůležitější je právem považováno pH půdy (Adams et al. 2004; Li et al. 2005). Obsah Cd v bazických horninách je vyšší než v horninách kyselých (Adriano 2001). V alkalických půdách je Cd pak značně imobilní. Naopak při $\text{pH} < 5$ je Cd mobilnější než Zn. Existuje lineární trend mezi pH půdy a příjmem Cd - pokud se tedy jiné vlastnosti půdy nemění, vede klesající půdní pH ke zvyšující se koncentraci Cd v rostlinách (Norvell et al. 2000; Wu and Zhang 2002; Kirkham 2006). Vždy se ovšem jedná o komplexní působení všech proměnných, jelikož jen samotné zvýšení pH půdy nevede vždy k automatickému snížení příjmu Cd rostlinami (Eriksson 1989; Singh et al. 1995). Nicméně půdní reakce je jedním z důležitých faktorů, které upravují extrahovatelnost Cd v půdě - vyšší pH půdy zvyšuje jeho adsorpci v půdě a tím zároveň snižuje jeho extrahovatelnost (Christensen 1984). K tomu dochází pravděpodobně kvůli snížení v konkurenci o vazebná místa s ionty H^+ a zvýšení záporného náboje na povrchu půdních koloidů (Zemanová et al. 2014).

Dalšími stimuly vedoucí ke zvýšení příjmu a akumulaci Cd jsou např. acidifikace rhizosféry nebo činnost nitrát reduktáz (Clemens et al. 2002). Chaudri et al. (2007) pak přidávají další významný faktor, a sice obsah organického uhlíku v půdě. Přes všechna zjištěná fakta je ovšem jasné, že porovnat výsledky skleníkových a polních studií je přinejmenším složité. Zatímco použití NPK hnojiva ve skleníkových pokusech vedlo ke zvýšení obsahu Cd v plodinách, u polních plodin stejný efekt nenastal, pravděpodobně i v důsledku dlouhodobého používání fosfátových a organických hnojiv (He and Singh 1994). Nicméně, i mnoho skleníkových pokusů ukázalo obdobnou korelaci příjmu Cd a pH půdy (Tran and Popova 2013).

5.1.4 Mechanismy příjmu a distribuce v rostlinách

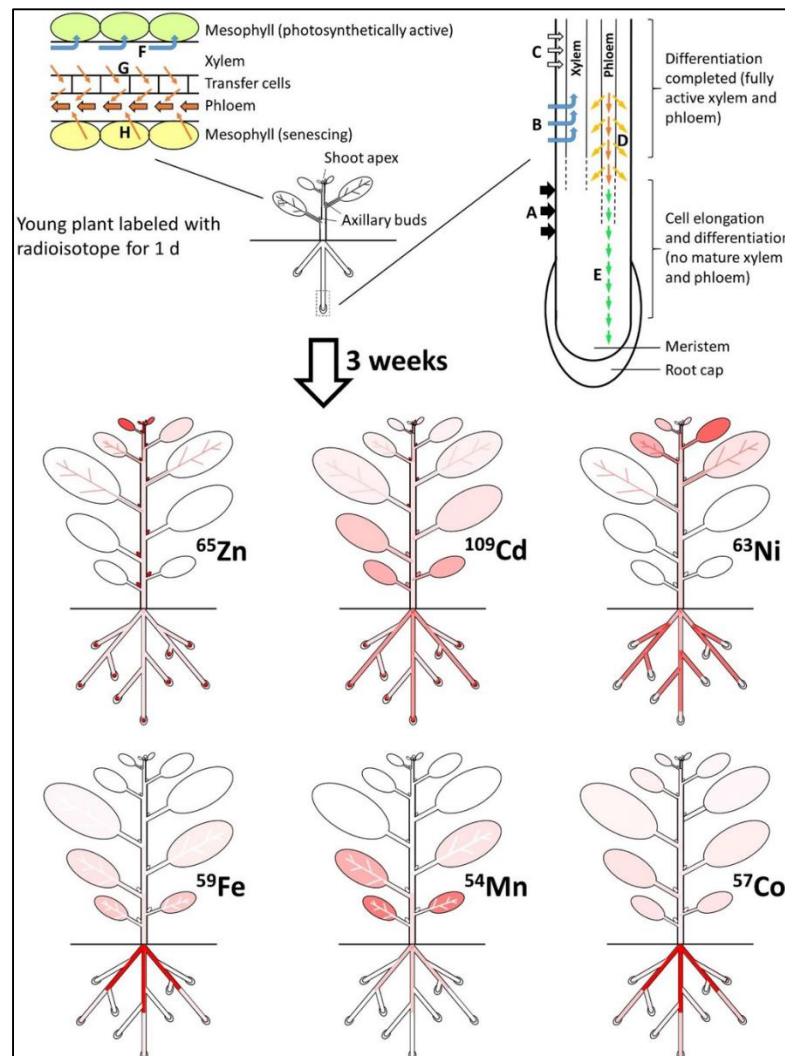
Jak již bylo uvedeno v kapitole 5.1.3, půda, environmentální a managementové faktory jsou tedy do jisté míry zodpovědné za množství nahromaděného Cd v rostlinách (Hart et al. 1998). Obecně platí, že ionty Cd se většinou nejprve absorbují v apoplastu kořenů rostlin. Potom vstupují do kořenových buněk a ovlivňují jejich metabolismus. Například v kukuřici (*Zea sp.*) působí silná adsorpce Cd na kořenovém apoplastu jako hlavní hnací síla k vychytávání tohoto kovu z půdy (Redjala et al. 2009). Nicméně tento závěr se např. u rýže (*Oryza sp.*) nepotvrdil (Lu et al. 2009). Studie o příjmu kovu ukazují, že systémy v podobě nespecifických přenašečů pro základní kationty v membránách, jako např. Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} a Zn^{2+} , také přispívají k příjmu Cd (Cohen et al. 1998; Clemens et al. 1998; Rascio and Navari-Izzo 2011), jak to ostatně shrnuje i obr. 3. V běžných rostlinách je tedy příjem Cd nespecifický. Předpokládá se, že vstup Cd do buňky je způsoben vysokou afinitou systému pro příjem kovů nebo nízkou afinitou systému pro příjem Ca nebo Zn (Lombi et al. 2002; Roosens et al. 2003).



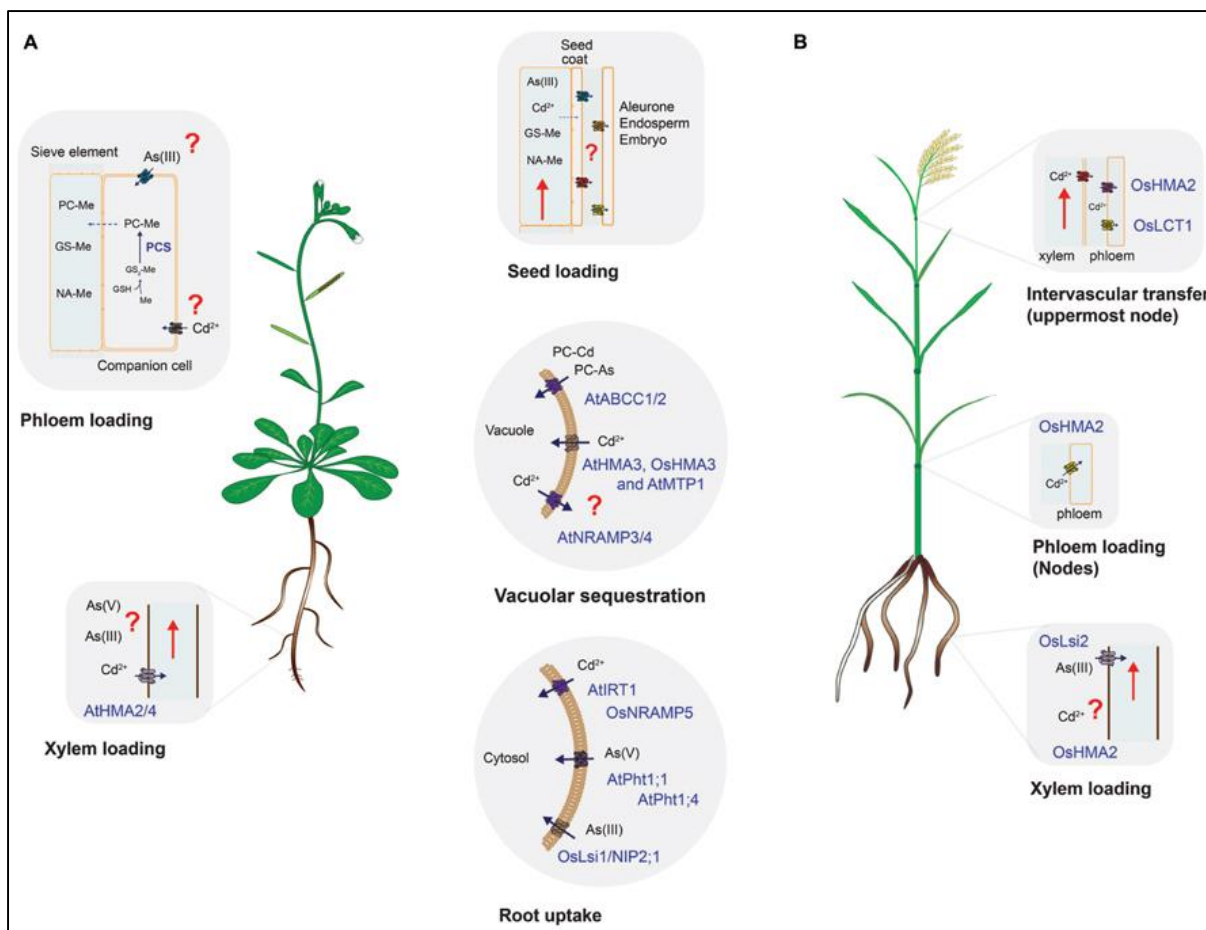
Obr. 3: Shrnutí identifikovaných transportérů kovů v rostlinách. Převzato z Hall and Williams (2003).

Po vstřebání pomocí kořenů, je Cd translokováno v iontové formě do prýtlů jak pomocí xylému, tak následně floému (Tudoreanu and Phillips 2004; Page and Feller 2015), a to buď pasivně, pomocí transpiračního proudu (Salt et al. 1995), nebo aktivně přes Fe přenašeče (Nakanishi et al. 2006). Schéma shrnující procesy podílejících se na distribuci a přerozdělení HM v rostlinách shrnuje obr. 4. Zastoupení jednotlivých přenašečů při příjmu a distribuci Cd a As u rostlin huseníčku (*Arabidopsis sp.*) a rýže (*Oryza sp.*) vystihuje obr. 5. Účinky transpirace na samotný příjem Cd však byly v historii jak potvrzeny (Hardiman and Jacoby 1984; Salt et al. 1995), tak vyvráceny (Perfus-Barbeoch et al. 2002). Je však jisté, že Cd při příjmu konkuruje ostatním minerálním prvkům (Dražić et al. 2004; Adhikari et al. 2006), a to

především Zn (Rivetta et al. 1997; Zhao et al. 2002; Tuma and Svojanovska 2015), P (Dheri et al. 2007), Ca (Rivetta et al. 1997; Choi and Harada 2005) a Cu (Rivetta et al. 1997; Kudo et al. 2011). Vliv na příjem a distribuci prvku může mít ale také aniont, který kov doprovází v jeho solích, nejčastěji Cl⁻ (Li et al. 1994; Oporto et al. 2008), SO₄²⁻ a NO₃⁻ (Tuma et al. 2008; Tuma et al. 2010; Tuma et al. 2014).



Obr. 4: Schéma shrnující procesy podílejících se na distribuci a přerozdělení těžkých kovů v rostlinách. Relativní rozptyly (červená barva) ⁶⁵Zn, ¹⁰⁹Cd, ⁶³Ni, ⁵⁹Fe, ⁵⁴Mn a ⁵⁷Co jsou založeny na autoradiografech různých druhů rostlin s důrazem na důležitá zjištění. Následující procesy se podílejí na specifické distribuci těchto kovů: (A) insolubilizace na povrchu kořenů a v kořenovém apoplastu; (B) příjem a ukládání do kořenového xylému; (C) příjem a uchovávání v kořenových buňkách; (D) basipetální transport ke kořenům přes floém; (E) transport z buňky do buňky v meristémeh a v místech bez funkčního lýka; (F) transport pomocí transpiračního proudu v xylému k mezofylovým buňkám; (G) transfer z xylému do lýka prostřednictvím transferových buněk v malých svazcích; a (H) remobilizace ze starších listů a transport do kanálků přes floém. Převzato z Page and Feller (2015).



Obr. 5: Příjem a distribuce kadmia a arsenu u rostlin (A) *Arabidopsis* a (B) rýže. Procesy společné pro oba druhy (kořenový příjem, vakuolární sekvestrace a ukládání do semen) jsou zobrazeny ve středu obrázku. Typické transportní bílkoviny pro konkrétní druhy jsou označeny At (*Arabidopsis*) nebo Os (rýže). Procesy, o kterých je zatím málo informací, chybí nebo které vyžadují další výzkum, jsou označeny červenými otazníky. Předpokládá se, že vychytávání a příjem molekul v reprodukčních pletivech, je zprostředkováno specifickými přenašeči, ale totožnost těchto proteinů zatím nebyla stanovena. Jsou zobrazeny pouze proteiny charakterizované *in vitro* a *in planta*. Pro jednoduchost byly vynechány co-substráty, jako je například H⁺ nebo ATP-Mg. Zkratky v obrázku: GSH = glutathion; Me = kov například Cd nebo As (III); PCS = fytochelatin syntázy; PC-Me = komplex fytochelatin-kov; GS-Me = komplex glutathion-kov; NA-Me = komplex NA-kov. Převzato z Khan et al. (2014).

Převážná část Cd, přijatého rostlinami, bývá sice zachycena v kořenech, nicméně část bývá translokována do nadzemních částí rostlin, potažmo semen. Celkové množství nahromaděného a translokovaného Cd v rostlinách se však může lišit podle druhu a kultivaru a to i v rámci jednoho druhu (Li et al. 2005; Benabid and Ghorab 2013; Tran and Popova 2013). Vždy to ale závisí i na účinnosti kořenových detoxikačních mechanismů (Benabid and Ghorab 2013). Maximální akumulaci v kořenech rovněž nemůžeme brát paušálně. Například Bosiacki (2009) zjistil, že Cd bylo translokováno především do listů a výhonků okrasných rostlin, pak do květenství a nejmenší množství tohoto kovu našel paradoxně v kořenech. Qiu et al. (2011) pak ve svých analýzách uvádí, že 70 % z celkového obsahu Cd

v listech bylo obsaženo v protoplastech, a více než 90 % Cd v protoplastech bylo lokalizováno ve vakuolách. Cd se v listech nahromadí především v buněčných stěnách, zatímco míra akumulace je relativně nezávislá na úrovni Cd v živném roztoku (Ramos et al. 2002).

V pokusech Page and Feller (2005) bylo ^{109}Cd , které se dostalo až do výhonků, rovnoměrně rozděleno mezi jednotlivé listy. Autoradiogramy navíc ukázaly, koncentrování kovu v centrálních žilách listů (Page and Feller 2005; Page et al. 2006). Dálkový transport z kořenů do výhonků se opět může lišit v závislosti na druhu rostliny, jak ukázali u lupiny bílé (*Lupinus albus*) a pšenice (*Triticum sp.*) např. Page and Feller (2005) a Page et al. (2006), s tím, že Cd může být translokováno i v zrnech (Herren and Feller 1997; Riesen and Feller 2005). U lupiny bílé pak autoři zjistili sice malé koncentrace ve výhoncích v porovnání s kořenem (Page and Feller 2005). Nicméně, toto malé množství ^{109}Cd , bylo přítomno ve všech částech plochy listu. Tato homogenní distribuce může být vysvětlena vychytáváním ^{109}Cd do mezofylu či epidermálních buněk. Rovněž byl i popsán pohyb Cd mezi různými částmi kořene, což nejde bez transportu pomocí floému, a to buď přímým spojení kořenových segmentů nebo sekundárně remobilizací Cd z výhonků (Welch et al. 1999). Podobně založený přenos radionuklidů ^{109}Cd a ^{65}Zn , které se šířily nahoru v xylému, pak byly přeneseny z xylému do floému a přepravovány floémem do kořenových špiček, pozorovali i Page and Feller (2005).

Přesto, že naše práce je především zaměřena na příjem HM prostřednictvím kořenů, existují i další cesty vstupu. Především se jedná o přímou depozici Cd ze vzduchu (Smolders 2001), kterou může Cd vstoupit až do lidského potravinového řetězce. Snadné hromadění touto cestou v případě Ni, Cd a Cu u zrn a slámy pšenice (*Triticum sp.*), rostlin jílku (*Lolium sp.*), bojínku (*Phleum sp.*) a hlávkového salátu (*Lactuca sativa*) pozoroval Ylärinta (2008). El Abidi et al. (2015) ve svém pokuse s rostlinami blahovičnicku (*Eucalyptus sp.*) pozorovali největší znečištění Pb, Cd a Zn kolem výroben keramiky, kde byly hlavním zdrojem znečištění usazeniny částic na listech a hodnoty klesali v pořadí $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Pb}$. I další autoři používají kontaminaci listů stromů kovovými sloučeninami pro biomonitoring znečištění ovzduší v městských oblastech (Fernández Espinosa and Oliva 2006; Arriagada et al. 2007). V posledních desetiletích pak bylo v celé Evropě úspěšně využito mechů k biomonitoringu depozice HM. To představuje, hlavně pro Cd a Pb, bezplatnou, časově nenáročnou a poměrně spolehlivou metodu monitoringu depozice z ovzduší (Harmens et al. 2010; Harmens et al. 2012), která je v evropském měřítku hlavním faktorem, který určuje hromadění Cd a Pb u mechů (Holy et al. 2009; Schröder et al. 2010). I z jiných zdrojů vyplývá, že dokonce i omyté plodiny mohou obsahovat Cd, které je zde uloženo ze vzduchu během růstu rostlin (Smolders 2001). Koncentrace pak závisí na druhu plodiny, půdě, schopnosti kořene absorbovat a samozřejmě na znečištění ovzduší (Hovmand et al. 1983; Harrison and Chirgawi 1989). Z různých experimentů však vyplývá, že tuto cestu lze zanedbat v oblastech s nízkou roční atmosférickou depozicí Cd ($< 2 \text{ g Cd ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$, typické pro většinu venkovských oblastí v Evropě). Nicméně, při zvýšené roční atmosférické depozici ($> 10 \text{ g Cd ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$), se může jednat o dominantní

zdroj Cd v plodinách, což je situace, která může nastat kolem metalurgickým hutí (Smolders 2001; Ylärinta 2008).

5.2 Toxické účinky Cd na rostliny

5.2.1 Vliv na růst na vývoj rostlin

Toxicita Cd způsobuje u mnoha rostlinných druhů nejenom inhibici, ale i četné abnormality růstu. K charakteristickým celkovým příznakům toxicity Cd patří redukce růstu kořenů a listů, buněčná smrt, svinování listů a chloróza, změny v respiraci, fotosyntéze a výměně plynů, ovlivnění příjmu dalších iontů, přenosu a využití živin a vody, poruchy v antioxidačně obranných procesech, generování oxidačního stresu a peroxidace lipidů, poškození buněčných membrán, inhibice enzymatické aktivity a narušení buněčných transportních procesů (Sharma and Dietz 2009; Rodríguez-Serrano et al. 2009). Snadný příjem rostlinami má za následek různé známky toxicity (Gill et al. 2013), projevující se negativně např. na klíčivosti semen (Bahmani et al. 2012; Siddhu and Ali Khan 2012), růstu (Bhardwaj et al. 2009; Popova et al. 2009; Aldoobie and Beltagi 2013; Zemanová et al. 2015a; Zemanová et al. 2015b), relativním obsahu vody (RWC) (Saifullah et al. 2013; Howladar 2014), rychlosti fotosyntézy (A), vodivosti průduchů (G_s) a transpiraci (E) (Seregin and Ivanov 2001; Ahmad et al. 2011; Saifullah et al. 2013), syntéze fotosyntetických pigmentů (Sbartai et al. 2012; Aldoobie and Beltagi 2013), a koncentraci minerálních iontů v listech (Saidi et al. 2013). Toxicita může také vyplývat z vazby kovů na sulfhydrylové skupiny proteinů, což vede k inhibici jejich aktivity či přímo k narušení struktury. Může docházet i k náhradě esenciálního prvku, což později vede k nedostatečnému účinku proteinů (Capuana 2011).

Kořeny při dlouhodobé expozici slizovatí, hnědnou, a dochází ke změnám v jejich morfogenezi (Rascio et al. 2008). Pozorována byla rovněž inhibice tvorby bočních kořenů, zatímco u hlavního kořene docházelo k hnědnutí, tuhnutí a kroucení (Krantev et al. 2008; Yadav 2010; Rascio and Navari-Izzo 2011). Autoři vidí hlavní důvody v neuspořádaném rozdělení a abnormálním rozšíření epidermis a kortikální vrstvy buněk v apikální oblasti. V rostlinách hrachu (*Pisum* sp.) způsobilo Cd poruchy v prodloužení kořenů a mitotickém procesu a způsobilo chromozomální aberace kořenových špiček (Siddiqui et al. 2009). Vysoká koncentrace Cd (250 μ M) pak měla u této rostliny za následek velmi rychlou poruchu mitózy kořenů, a to již po 24 hodinách od vystavení toxicitě. Výsledkem jsou rovněž i neobvykle vysoké počty nukleových populací v diferencovaném kořenovém systému (Fusconi et al. 2006; Fusconi et al. 2007). Kromě toho bylo pozorováno i poškození DNA v buňkách kořenové čepičky (Seth et al. 2008).

V listech naopak dochází ke změnám ultrastruktury chloroplastů, potažmo nízkému obsahu chlorofylu, což vede k chlorózám a omezené činnosti fotosyntézy (Rascio et al. 2008; He et al. 2008; Lee et al. 2010; Miyadate et al. 2011). Častý výskyt listových chloróz naznačuje, že metabolismus Cd

je realizován především v listech, které jsou více citlivé na Cd než ostatní části rostlin (Benabid and Ghorab 2013). Kov v listech také indukuje tenčí listovou čepel, což vyplývá z menší vrstvy buněk palisádového parenchymu a sníženého počtu a velikosti houbového parenchymu (Gratao et al. 2009). Nicméně mechanismus toxicity je stále sporný, jelikož např. Bosiacki (2008); Bosiacki (2009); Siddhu and Ali Khan (2012) pozorovali i mírně stimulační účinky, a to především nízkých koncentrací Cd.

5.2.2 Vliv na fotosyntézu

Bylo prokázáno, že fotosyntéza, jako jeden z hlavních faktorů ovlivňující produkci biomasy, je velmi citlivým procesem, vůči přítomnosti Cd v pletivech vyšších rostlin (Ekmekeçi et al. 2008). Nadměrné koncentrace HM v rostlinách mohou způsobit nejen oxidační stres, ale i poškození funkce průduchů (Fayiga et al. 2004; Shah et al. 2008), což má za následek silné ovlivnění fotosyntézy a fluorescenčních procesů chlorofylu (Monni et al. 2001). Velký počet studií identifikovalo fotosyntetické pigmenty jako primární místo působení Cd, zejména pak biosyntézu chlorofylu (Baszyński et al. 1980) a karotenoidů (Prasad 1995). Baryla et al. (2001) pak vidí původ chlorózu nikoliv v důsledku přímé interakce Cd s biosyntézou chlorofylu, ale pravděpodobně ve snížení hustoty chloroplastů. Takto indukovaný pokles obsahu pigmentu byl silnější na povrchu listů (stomata, svěrací buňky), než tomu bylo v mezofylu. Kromě toho byla pozorována změna velikosti buněk, a snížení hustoty průduchů v epidermis, pravděpodobně díky možnému zásahu Cd přímo do replikace chloroplastů a dělení buněk v listech. Autoři také ukázali silné snížení vodivosti průduchů.

Je známo, že Cd²⁺ ionty ovlivňují strukturu a funkci chloroplastů u mnoha rostlinných druhů, jako jsou např. pšenice setá (*Triticum aestivum*) (Atal et al. 1991), řepa červená (*Beta vulgaris*) (Greger and Ögren 1991), fazole mungo (*Vigna radiata*) (Keshan and Mukherji 1992), špenát setý (*Spinacea oleracea*) (Šeršeň and Král'ová 2001), a fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*) (Padmaja et al. 1990). Samotnou inhibici fotosyntézy pak prokázaly výzkumy při dlouhodobé i krátkodobé expozici např. u řepky olejky (*Brassica napus*) (Baryla et al. 2001), slunečnice (*Helianthus annuus*) (Di Cagno et al. 2001), penízku modravého (*Thlaspi caerulescens*) (Küpper et al. 2007), kukuřice (*Zea* sp.), hrachu (*Pisum* sp.), ječmene (*Hordeum* sp.) (Popova et al. 2008), fazole mungo (*Vigna radiata*) (Wahid et al. 2008), a pšenice (*Triticum* sp.) (Moussa and El-Gamal 2010).

Hlavním cílem působení Cd jsou 2 klíčové enzymy fixace CO₂: ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza (RuBisCO) a fosfoenolpyruvát karboxyláza (PEPC). Bylo prokázáno, že Cd²⁺ ionty snižují aktivitu RuBisCO a poškozují jejich strukturu nahrazením Mg iontů, které jsou důležitými kofaktory karboxylačních reakcí. Cd též způsobilo nevratnou disociaci velkých i malých podjednotek RuBisCO, což vedlo k celkové inhibici tohoto enzymu (Stiborova 1988; Malik et al. 1992). Jako místo mechanismu inhibice, je obecně uznáván oxidační komplex (OEC) který je součástí fotosystému 2 (PS2). Cd ovlivňuje tento komplex tím, že nahradí Ca²⁺ v Ca/Mn shlucích, tvořící centra vývoje kyslíku (Sigfridsson et al. 2004). Popřípadě může docházet k některým modifikacím ve vazebných místech

plastochinonu Qb, který je rovněž součástí PS2 (Geiken et al. 1998). Cd způsobuje také změny ve funkčnosti membrán a to především tím, že indukuje změny jejich lipidů a složení mastných kyselin (Ouariti et al. 1997; Popova et al. 2009).

5.2.3 Vliv na minerální výživu

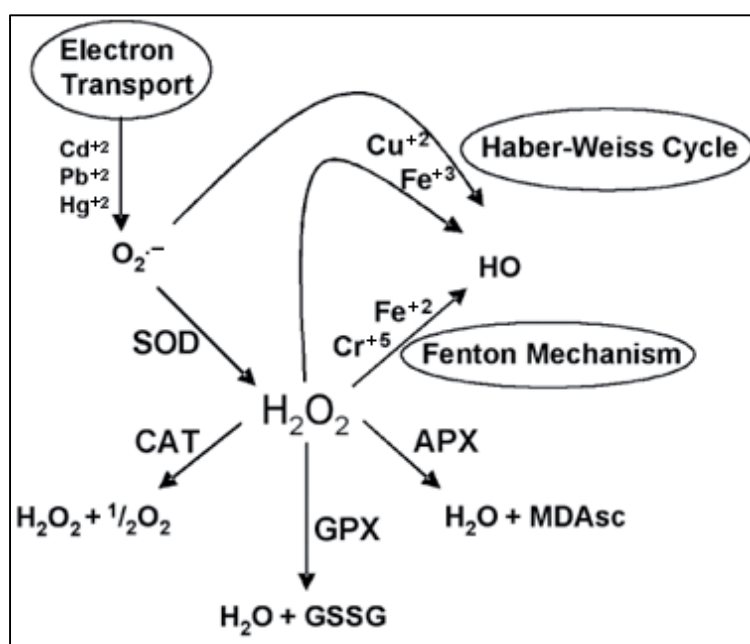
Přítomnost Cd^{2+} iontů může silně ovlivnit nejen příjem, transport, ale i následnou distribuci mnoha minerálních prvků v rostlinách (Zemanová et al. 2015b). V kořenech cukrové řepy (*Beta vulgaris*) byl pozorován nedostatek Fe vyvolaný právě přítomností Cd (Chang et al. 2003). V rostlinách hrachu (*Pisum sp.*), bylo silně inhibováno využití P, K, S, Ca, Zn, Mn a B po expozici Cd (Metwally et al. 2005). Již koncentrace 1,0 μM Cd snížila koncentrace P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, a B v kořenech ječmene (*Hordeum sp.*), a to i přes to, že koncentrace těchto prvků nebyla ve výhoncích nijak ovlivněna (Guo et al. 2007). Nedjimi and Daoud (2009) našli pokles příjmu Ca a K díky Cd i u hyperakumulujících druhů lebedy slanomilné (*Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii*). Cd také snižuje absorpci dusičnanu a jejich transport z kořenů do výhonků, tím, že inhibuje aktivitu reduktázy nitrátoreduktázy ve výhoncích (Hernandez et al. 1996). I samotná fixace dusíku a primární asimilace amoniaku byla v kořenových hlízkách rostlin sóji (*Glycine sp.*) vlivem Cd výrazně snížena (Karina et al. 2003).

Pozorování ukázalo, že došlo ke zvýšení lakázové aktivity (lakázy jsou odpovědné za biosyntézu ligninu), během rané fáze působení Cd, přičemž Cd vyvolalo syntézu ligninu v raném stádiu růstu kořenů, což ve výsledku mohlo způsobit inhibici prodloužení kořenů (Yang et al. 2007). Jak Cd inhibuje vychytávání dalších prvků, není ještě zcela jasné. Nicméně např. u rostlin kukuřice (*Zea sp.*) indukovalo Cd inhibici H^+ ATPázy v kořenových buňkách. H^+ ATPázy vytvářejí na plasmatické membráně odpovídající elektrochemický gradient, který umožňuje průchod iontů přes jednotlivé přenašeče. Tím může být inhibována absorpce některých základních prvků (Astolfi et al. 2005). Kromě toho, výzkumy na topolu (*Populus jaquemontiana* var. *Glauca*) ukázaly, že Cd může inhibovat minerální výživu kompeticí mezi tímto kovem a dalšími kovovými ionty (Solti et al. 2011). Autoři naznačili 2 mechanismy a to ve využití přenašečů pro Fe či Ca.

Několik rostlinných živin má na druhou stranu mnoho přímých či nepřímých účinků na dostupnost Cd a tím i vliv na jeho toxicitu. Přímé účinky zahrnují snížení rozpustnosti Cd v půdě tím, že podporují srážecí reakci (Matusik et al. 2008), případně konkurují s Cd o stejné membránové přenašeče (Zhong-qiu et al. 2005), a sekvestrují Cd ve vegetativních částech, čímž se snaží vyhnout se jeho hromadění v zrnech či obdobných jedlých částech rostlin (Hall 2002). K nepřímým účinkům patří ředění koncentrace Cd zvýšením rostlinné biomasy a tak zmírnění fyziologického stresu.

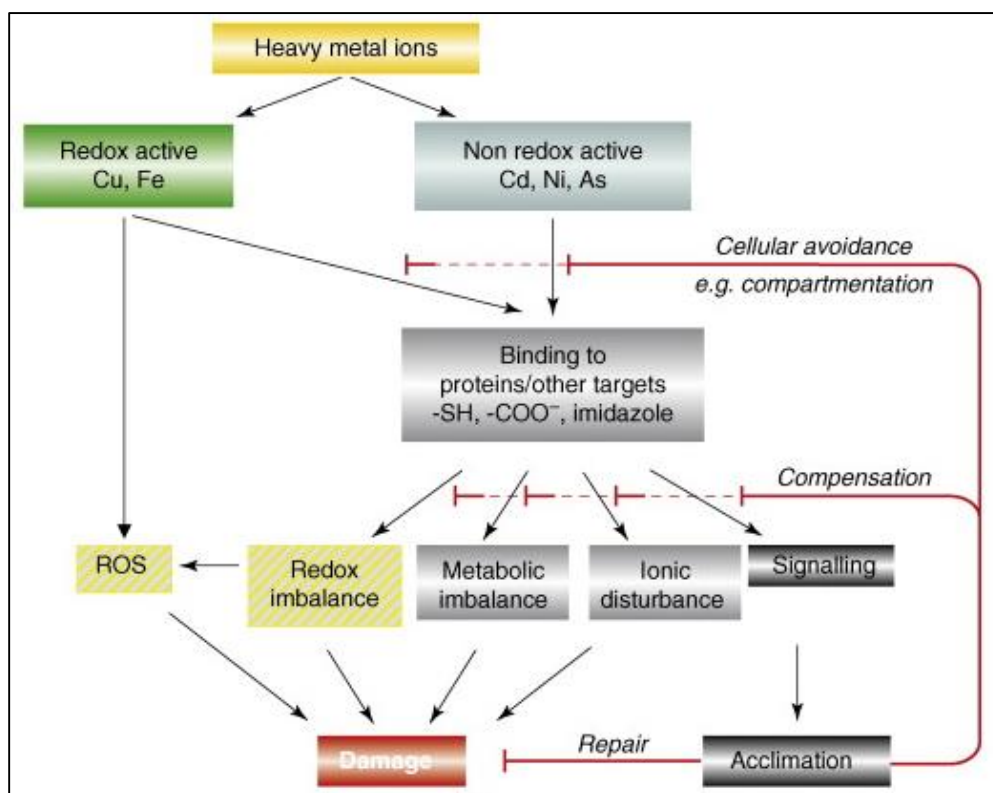
5.2.4 Vliv na produkci reaktivních forem kyslíku

Současný životní styl a rozvoj automobilové dopravy vedou mimo jiné ke zvyšující se koncentraci škodlivin v atmosféře potažmo k fotochemickému vzniku přízemního ozónu. Pokud k tomu připočteme zeslabování ozonosféry a průnik UV záření, máme tu významné faktory tvorby reaktivního kyslíku a oxidačního stresu v pletivech rostlin. K obdobně vážné situaci ale může v rostlinách docházet i vlivem toxického působení HM. Obecně platí, že HM způsobují oxidační poškození rostlin, a to buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím formování reaktivních forem kyslíku (ROS) (Schützendübel et al. 2001; Cho and Seo 2005; Sandalio et al. 2009; Gill et al. 2013; Tran and Popova 2013). Do tohoto procesu jsou zapojeny různé typy mechanismů generující ROS. Jejich přehled uvádí obr. 6.



Obr. 6: Generování ROS působením těžkými kovy. Převzato z Pinto et al. (2003).

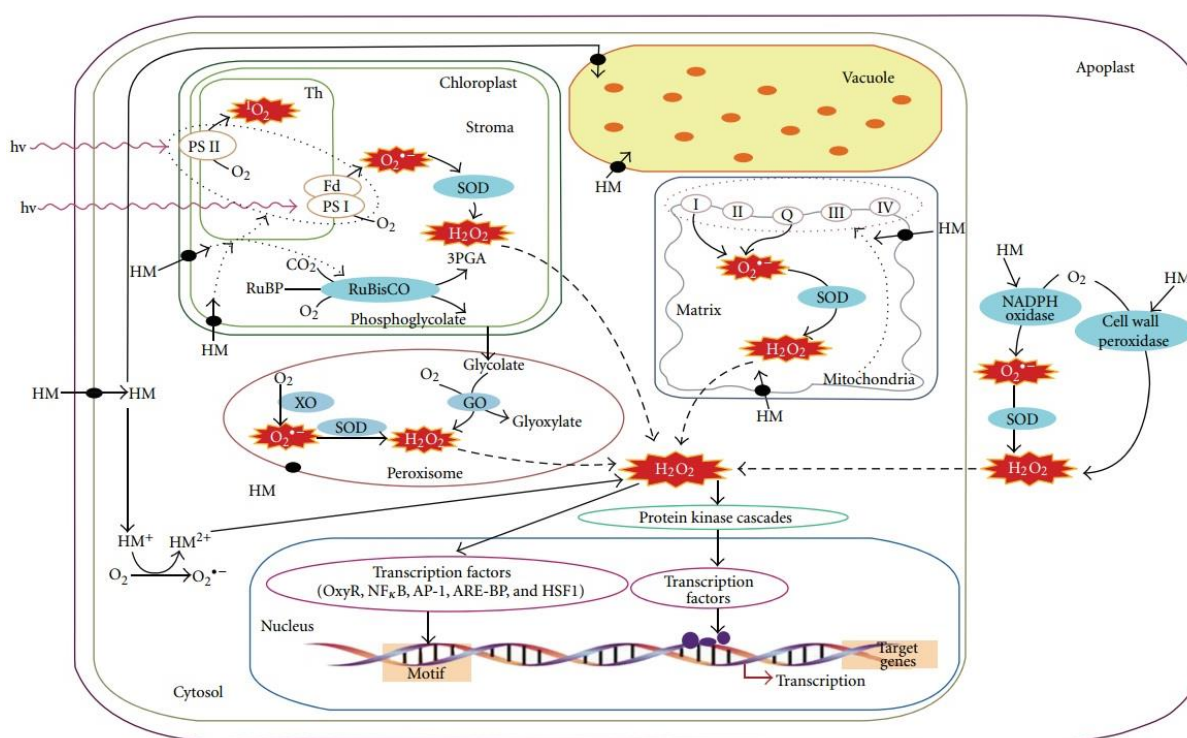
Některé HM, jako je Cu a Fe mohou být toxické prostřednictvím jejich účasti v redox cyklech a přímo způsobovat ROS. Naopak Cd, Ni a As jako neredukující kovy nemohou vykonávat jednotlivé reakce přenosu elektronů, ale generují oxidační stres tím, že manipulují s antioxidačním obranným systémem (Gratão et al. 2005; Cho and Seo 2005; Benavides et al. 2005). Hlavní mechanismy působení HM a vývoj škod u citlivých rostlin, včetně aklimace u tolerantních rostlin představuje obr. 7.



Obr. 7: Hlavní mechanismy působení těžkých kovů a vývoj škod u citlivých rostlin, včetně aklimace u tolerantních rostlin. Redox-aktivní HM vyvolávají přímo generaci ROS. Mohou se vázat a zasahovat či soutěžit o vazebná místa (-SH představuje thiohy, -COO- představuje karboxylové kyseliny a imidazole představuje histidinové zbytky), a tím mění funkce cílového proteinu, což způsobuje změny v buněčném metabolismu nebo spouští kaskádu signálních drah, které mohou vést k aklimaci. Aktivace aklimační reakce způsobuje zpětnou vazbu do míst s různým působením HM, což vede např. k opravě poškozených makromolekul, posílení antioxidačního obranného systému a snížení koncentrací HM v plazmatických kompartmentech. Převzato z Sharma and Dietz (2009).

Tento stres je charakteristický prudkou a přechodnou tvorbou velkého množství ROS jako je superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2) či hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) (Mittler 2002; Hsu and Kao 2007). Tyto radikály jsou také generovány rostlinnými buňkami během normálních metabolických procesů, jako je dýchání a fotosyntéza a některé z nich mohou fungovat jako důležité signální molekuly, které mění expresi genu a modulují aktivitu specifických obranných proteinů. Ovšem při vysokých koncentracích mohou být všechny ROS pro organismy velmi škodlivé (Benavides et al. 2005). Organely s vysokou oxidační metabolickou aktivitou nebo s intenzivní rychlostí toku elektronů jsou např. chloroplasty, mitochondrie a peroxisomy, které jsou tak převládajícím zdrojem tvorby ROS v rostlinné buňce (Mhamdi et al. 2010; Hossain et al. 2012). Chloroplasty jsou pak hlavním zdrojem ROS s kapacitou produkovat vysoké množství $O_2^{\cdot-}$ přes Mehlerovu reakci a H_2O_2 , v podstatě během snížené fotosyntetické fixace uhlíku, typické během abiotických stresů (Takahashi and Murata 2008). Dochází tak k porušení rovnováhy mezi produkcí a odbouráváním ROS (Neill et al. 2002).

Zdrojem ROS je řada redoxních reakcí jako např. redukce kyslíku v průběhu elektronového transportu v mitochondriích nebo fotolýza vody v chloroplastovém elektrotransportním řetězci. Produkce tzv. excitovaného kyslíku (reaktivní forma kyslíku, která vzniká při některých reakcích v organismu a vzhledem ke svému relativně dlouhému poločasu rozpadu může způsobit poškození buněčných struktur) následně stimuluje vznik dalších aktivních forem kyslíku, tj. $O_2^{\cdot-}$; 1O_2 ; H_2O_2 ; OH^{\cdot} (Vranová et al. 2002). Při této disbalanci může docházet k oxidaci proteinů, lipidů a nukleových kyselin, což často vede ke změnám ve struktuře a mutagenězi buněk (Benavides et al. 2005). Cd inhibuje fotoaktivaci PS2 o zabraňuje přenosu elektronů. Tím by Cd mohlo vést k nepřímé tvorbě ROS, způsobující poruchy v chloroplastech. Kromě toho, může Cd stimulovat produkci ROS v mitochondriálních elektronových řetězcích (Heyno et al. 2008). HM indukovanou produkci ROS v různých organelách rostlinných buněk pak znázorňuje obr. 8.



Obr. 8: Těžkými kovy indukovaná produkce ROS v různých organelách rostlinných buněk a ROS-indukovaná signalizace v genové obranné expresi. Oranžové kruhy ve vakuole představují depozici HM. Převzato z Hossain et al. (2012).

Specifické hladiny ROS jsou důležité pro buněčné funkce, jako je přenos signálu (Smeets et al. 2008), ovšem nadprodukce ROS vyvolává různé stresové vlivy, díky nimž může dojít až k poškození biomolekul a buněčných struktur. H_2O_2 je hlavním ROS, tvořící se ze superoxidového radikálu (Mittler 2002; Wójcik et al. 2006). Různé proteiny fungují jako jejich lapače/zhášedce. Mezi ně, mimo jiné, patří např. superoxidodismutáza (SOD), isozymy kataláz (CAT), askorbát peroxidáza (APX),

monodehydroascorbát reduktáza (MDHAR), dehydroascorbát reduktáza (Dhar), skupina enzymů peroxidáz (POD), a glutathionreduktáza (GR), a non-enzymatické lapače, včetně glutathionu (GSH), kyseliny askorbové (AsA), karotenoidů a tokoferolů (Mittler 2002; Wójcik et al. 2006; Tran and Popova 2013). Pro fyziologické zdraví organismů je proto regulace produkce ROS a udržení jisté "homeostázy" nezbytné (Valavanidis et al. 2006).

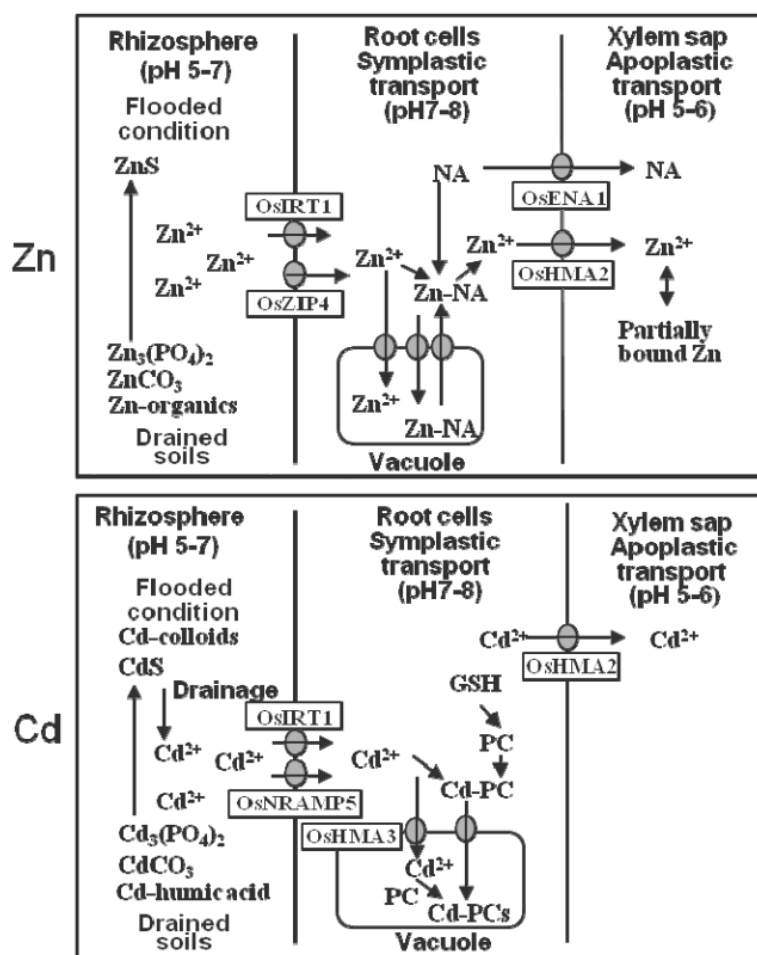
Zvýšená koncentrace GSH byla pozorována s rostoucí koncentrací Cd u rostlin hrachu (*Pisum* sp.), rozchodníku (*Sedum alfredii*) a fazolí (*Phaseolus* sp.). Naopak pokles GSH, který by mohl oslabit antioxidační odezvu a obranné síly u citlivějších genotypů, byl také nalezen u některých rostlin hrachu (*Pisum* sp.) (Metwally et al. 2005).

I akumulace velkého množství osmolytů (např. prolinu) je adaptivní odpovědí rostlin vystavených stresujícímu životní prostředí, např. za podmínek zasolení, sucha, intenzivního osvětlení a ultrafialového záření a stresu HM, jakož i v odezvě na oxidační a biotický stres (Haudecoeur et al. 2009; Yang et al. 2009). Prolin se podílí nejen na syntéze proteinů, ale také udržuje osmotický nebo buněčný turgor, snižuje únik elektrolytu a stabilizací membrán chrání rostliny před oxidačním stresem, tak že snižuje koncentrace ROS (Xu et al. 2008; Hayat et al. 2012). Jeho úloha, jako antioxidantu, byla též popsána u buněk tabáku (*Nicotiana tabacum*) vystavených působení Cd. Islam et al. (2009) uvádějí, že tabákové buňky vystavené působení Cd, nahromadili vysoké úrovně prolinu, čímž mohlo dojít ke zmírnění inhibičního účinku Cd na buněčný růst.

5.3 Zinek

Zinek (Zn) patří mezi nezbytné stopové prvky, a to jak pro rostliny, tak i zvířata (Gupta et al. 2016). S Cd ho pojí především jejich podobné geochemické a environmentální vlastnosti. Jejich vzájemná asociace v prostředí a celková chemická podobnost může vést, až k vzájemným interakcím během jejich příjmu rostlinami, transportu z kořenů do nadzemních částí rostlin či akumulaci v jedlých částech (Ducsay 2011). Vyšší obsah organické hmoty v půdě zvyšuje přijatelnost a dostupnost Zn rostlinami (Obrador et al. 2003). Kromě toho, pH půdy a redox potenciál, silně ovlivňují rychlost a intenzitu humifikačního procesu a celkového redoxního stavu rhizosféry a tím i mobilitu Zn (Gupta et al. 2016). Řada studií také ukázala, že koncentrace Cd a Zn v půdě, stejně jako jejich samotný poměr, jsou klíčové faktory v příjmu Cd rostlinami. Cd je vlastně vstřebáváno kořeny pomocí Zn přenašečů, takže nízká dostupnost Zn podporuje akumulaci Cd rostlinami. Vhodná aplikace Zn hnojiv pak potlačuje příjem Cd a jeho translokaci v rostlinách pšenice (*Triticum* sp.) (Khoshgoftar et al. 2004; Wang et al. 2011a). Z tohoto hlediska je alarmující fakt, že až 50 % obdělávané půdy, používané pro pěstování obilnin trpí deficitem Zn (Das and Green 2013), což bezpochyby ovlivňuje růst a vývoj plodin. Kromě toho, v rozmezí pH 5.5 - 7.0, významně klesá koncentrace Zn v půdním roztoku (rozpuštěného Zn), a to až o 30 - 45-ti násobek pro každé zvýšení jednotky pH půdy (Gupta et al. 2016).

Při studiu Zn/Cd příjmu přes plasmatickou membránu kořenových buněk se zjistilo, že absorpce Zn je řízena saturovatelným transportérem s vysokou afinitou k Zn, zatímco pro Cd byly transportéry nesaturující (Kochian et al. 2002). Obecně jsou ZIP transportéry považovány za jedny z hlavních přenašečů zapojených v příjmu Zn rostlinami, které mají rovněž schopnost přenášet Cd či ostatní HM. Srovnání přenašečů je patrné z obr. 3 v kapitole 5.1.4. Další porovnání pak nabízí obr. 9, který znázorňuje modely příjmu a transportu Zn a Cd v kořenech rýže, a to při situacích odvodněné a zatopené půdy. Zn se v obou půdách nachází z velké části v podobě iontů (Zn^{2+}), i když malá část Zn může být vázána i na organické látky, a imobilizována jako sulfid (ZnS) v anaerobním vrstvě (Yoneyama et al. 2015). Cd se v odvodněných kyselých půdách ionizuje jako Cd^{2+} , zatímco v zatopených půdách je přítomno v podobě $CdCO_3$ nebo vázáno na huminové kyseliny (Khaokaew et al. 2011). Zaplavení půdy tak váže Cd v podobě sulfidu (Hashimoto and Yamaguchi 2013), naopak odvodnění převádí Cd do formy Cd^{2+} a výrazně tak zvyšuje jeho dostupnost pro rostliny.



Obr. 9: Modely příjmu a transportu Zn a Cd v kořenech rýže (*GSH*-glutathion; *NA*-nicotianamin; *PC*-fytochelatin). Šipky ukazují toky látek a šedivé elipsy označují přenašeče. Převzato z Yoneyama et al. (2015).

Samotná absorpce Zn je komplexní fyziologický proces, který je řízen především přenašeči tohoto prvku a chelátory kovu napříč celým rostlinným systémem. Na samotnou účinnost Zn u

jednotlivých druhů rostlin mají pak vliv např. etapa růstu rostlin, edafické faktory, sezónní období atd. Molekulární studie hyperakumulátů Zn rovněž prokázaly účast specifických přenašečů, vakuolární sekvestraci a detoxikační mechanismy, které jsou zodpovědné za udržení vhodné homeostázy Zn (Gupta et al. 2016). Ta je totiž nezbytná, jelikož i Zn je při vyšších koncentracích značně toxický (Rout and Das 2009), což se na rostlinách většinou brzy projeví především inhibicí růstu (Vaillant et al. 2005; Tuma and Svojanovska 2015). Přesto má Zn roli v membránové integritě a stabilizaci (Disante et al. 2011), rovněž zmírňuje oxidační stres (Cakmak 2000) a funguje jako intracelulární druhý posel (Yamasaki et al. 2007). Je zapojen v řadě rostlinných fyziologických procesů, jako je regulace hormonů (např. syntéza tryptofanu), přenos signálu prostřednictvím mitogenem aktivované proteinkinázy (Hänsch and Mendel 2009), opravné procesy komplexu PS II během fotoinhibice (Bailey et al. 2002; Hänsch and Mendel 2009) a udržování koncentrace CO₂ v mezofylu.

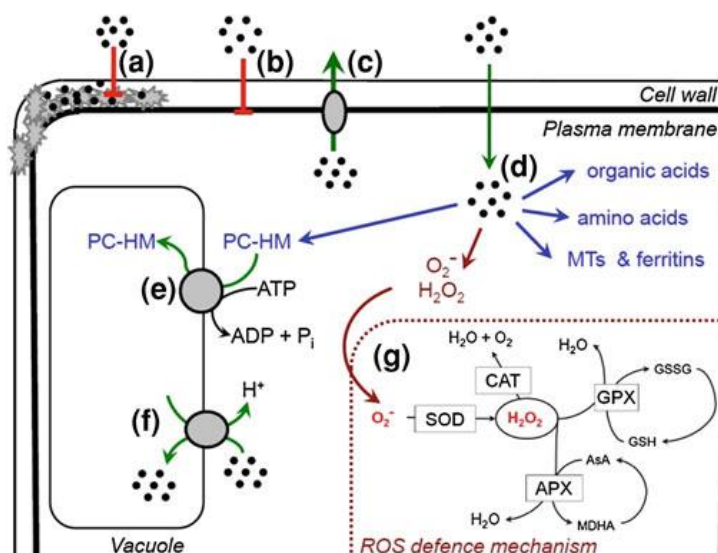
Zn je kořeny rostlin přijímán zejména jako dvojmocný kation (Zn²⁺). Nicméně v některých případech jsou také absorbovány komplexy organického ligandu a Zn. V závislosti na ligandu vylučovaného kořeny rostlin, existují dvě fyziologické strategie, které se podílejí na vychytávání dvojmocných kationtů. Strategie I zahrnují sekreci reduktantů, organických kyselin a H⁺ iontů, které zvyšují rozpustnost Zn komplexů (Zn fosfáty, hydroxidy, atd.), čímž uvolňují Zn ionty pro absorpci rhizodermálními buňkami kořene. Strategie II zahrnuje sekreci nízkomolekulárních organických sloučenin, které tvoří stabilní komplexy s Zn a jejich následný vstup do kořenových rhizodermálních buněk. Nicméně, tento absorpční mechanismus je omezen převážně na kořeny obilovin (Gupta et al. 2016). Po přijetí kořeny musí Zn, předtím než dosáhne xylému a je transportován do nadzemních částí, projít několika pletivy. Ačkoliv jsou přítomny specializované transportní proteiny na buněčných membránách příslušných pletiv, rozhoduje v konečném důsledku o intracelulárním obsahu Zn, přísná regulace jejich exprese a aktivity. Transport Zn do xylému probíhá přes dvě hlavní trasy: symplastickou a apoplastickou. Oba transporty přispívají k nárůstu obsahu Zn ve výhoncích. Apoplastický transport zahrnuje vstup Zn z rozhraní buněčné stěny a plasmatické membrány do cytosolu. Tento proces je méně selektivní. Na rozdíl od symplastického transportu, který se vyznačuje selektivitou a tedy i velikostí dodávky živin (Clemens et al. 2002). Po překonání bariéry Caspariho proužků v kořenové endodermis, vstupují Zn ionty symplasticky do živých buněk pericyklu a parenchymem lemovaného xylému. Další překážkou je pak soustavná činnost H⁺-ATPasy, která v xylémovém parenchymu způsobuje hyperpolarizaci membrány, což omezuje pohyb kladných iontů z cytosolu. Z tohoto hlediska je přenos od parenchymu xylému / pericyklu buněk pomocí apoplastu aktivním procesem (Sondergaard et al. 2004). Zn vstupuje i do floému, a může být touto cestou dále transportován do různých rostlinných částí. Mobilita Zn je navíc vyšší ve floému než v xylému, především v důsledku zvýšené koncentrace rozpuštěných látek schopných chelatace (peptidy, organické kyseliny, aj.), obsažených ve floémové míze. Zn je transportován buď v iontové formě nebo jako komplex např. Zn-nicotianamin, Zn-malát, Zn-histidin. Přestože xylém obsahuje nižší koncentraci rozpuštěných látek, hraje důležitou roli v

přenosu živin do různých orgánů. Především mladá rostlinná pletiva, jako jsou např. vyvíjející se zrna či hlízy, jsou zásobena hlavně floémem (Gupta et al. 2016). Mobilita Zn je tedy závislá na schopnosti výše jmenovaných látek vytvořit se Zn mobilní nebo naopak nerozpustný komplex. Ve starších listech je Zn již poměrně imobilní. To bývá vysvětlováno reakcí s fosforem a vznikem sraženiny $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (Tuma et al. 2008). Nejvyšší obsah přijatého Zn bývá většinou akumulován, podobně jako v případě Cd, v kořenech. Nicméně často bývá Zn mnohem mobilnější, i když reakce u různých druhů rostlin může být poměrně odlišná (Tuma et al. 2008; Ducsay 2011).

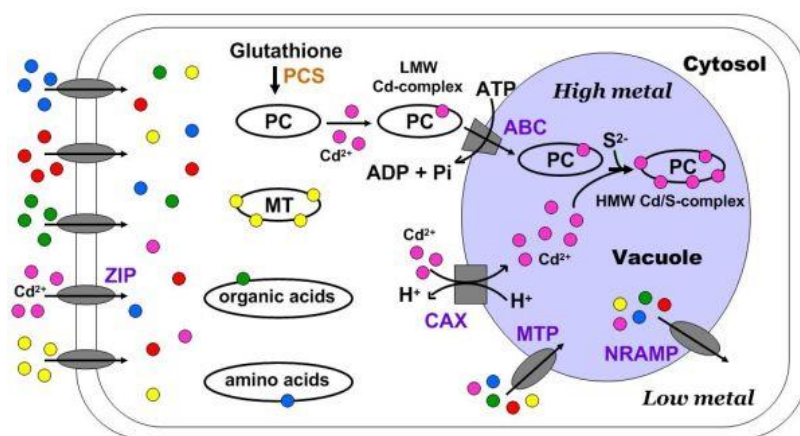
5.4 Obranné mechanismy rostlin

Oxidační stres, způsobený přítomností Cd, inhibuje aktivitu i mnoha enzymů (Aravind and Prasad 2003). I z tohoto důvodu jsou HM zapojeny do aktivity a produkce významných sloučenin, např. fytochelatinů. K prokázaným indikátorům rostlin vystavených stresu HM pak patří obsah chlorofylu, kyseliny abscisové, organických kyselin, fenolických sloučenin a celkový vodní potenciál (Terry and Stone 2002).

Mnohé rostliny však mohou přežít, růst a vyvíjet se i na Cd-znečištěných půdách, a to i při vysokých koncentracích tohoto prvku. Mechanismy vedoucí k toleranci vůči HM můžeme rozdělit na strategie zamezující vstup kovu do rostlin a strategie jejich tolerance. První vedou k samotnému omezení příjmu Cd. Mezi mechanismy tolerance rostlin patří hromadění a skladování Cd s vazbou na aminokyseliny, proteiny a peptidy (Pál et al. 2006). Reakce na toxicitu HM u vyšších rostlin a případné strategie obrany jsou patrné z obr. 10. Vakuolární sekvestraci HM po jejich proniknutí do rostlinné buňky, včetně přenašečů, shrnuje obr. 11. Další mechanismy, které si rostliny vyvinuly, s cílem vyrovnat se se škodami způsobenými Cd, je spojení s některými signálními molekulami, jako je například kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová, oxid dusnatý a ethylen. Mezi velmi účinnou strategií, jak se rostliny přizpůsobily životu při stresování HM, je tvorba komplexů organických ligandů, schopných vázat kov a jejich následná detoxikace (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999). Jako tyto ligandy mohou vystupovat např. organické kyseliny, peptidy a proteiny, u kterých bylo zjištěno, že se váží na kov u hyperakumulačních druhů (Sun et al. 2010). Z organických kyselin, byly popsány zejména kyseliny - šťavelová, jablečná, a CA, které jsou schopny tvořit chelát s HM v rostlinách či přímo v rhizosféře (Chai et al. 2012). Rovněž regulování akumulace aminokyselin, popř. metabolismus jejich produktů může hrát důležitou roli v rezistenci na stresové působení (Pavlíková et al. 2014). Syntéza všech těchto sloučenin může být vyvolána působením Cd, což naznačuje, že jsou tyto látky zapojeny do buněčné odpovědi na toxicitu Cd (Rodríguez-Serrano et al. 2006).



Obr. 10: Reakce vyšších rostlin na toxicitu těžkých kovů. Rostlinné reakce zahrnují: (a) vazbu kovového iontu v buněčné stěně pomocí kořenových exudátů; (b) snížení příjmu kovu přes plasmatickou membránu; (c) membránový výdej čerpáním do apoplastu; (d) chelataci kovu v cytosolu pomocí ligandů, jako jsou fytochelatiny, metalothioneiny, organické kyseliny a aminokyseliny; (e) transport komplexů kov-ligand přes tonoplast a akumulaci ve vakuolách; (f) zadržení ve vakuolách prostřednictvím transportérů tonoplastu; (g) indukci ROS a oxidačního stresu a zapojení obranných mechanismů; kovové ionty jsou zobrazeny jako černé tečky. Převzato z Manara (2012).



Obr. 11: Vakuolární sekvestrace těžkých kovů v rostlinné buňce. Přenesením Cd přes buněčnou blánu pomocí např. přenašeče ZIP (zinek/železo-regulovaný přenašeč), vstupují ionty HM, jako je např. Cd^{2+} , do cytosolu a stimulují syntézu derivátů glutathionu - fytochelatinů (PC) pomocí PC syntáz (PCS). PC poté váží Cd^{2+} z cytosolu za vzniku komplexu o nízké molekulové hmotnosti (LMW), který je transportován do vakuoly přes tonoplast-lokalizované ATP-vázající-kazety (ABC-přenašeče). Ve vakuolách, jsou pak komplexy LMW-Cd akumulovány za vzniku komplexů o vysoké molekulové hmotnosti (HMW) s více ionty Cd^{2+} , které mohou vstupovat do vakuoly prostřednictvím přímé výměny s protony díky v tonoplastu lokalizovaným kationt/proton (CAX) transportérům. Přenašeče MTPs (metal tolerance protein) a NRAMPs (natural resistance associated macrophage protein) s trvalým působením v tonoplastu zprostředkovávají průchod kovových iontů pro kompartmentaci nebo remobilizaci. Ostatní chelátory včetně metalothioneinů (MTs), organických kyselin a aminokyselin pomáhají tlumit koncentrace kovu v cytosolu do bezpečně nízké úrovně. Převzato z Yang and Chu (2011).

Některé druhy rostlin vykazují dokonce hypertolerantní kapacitu svých organel a pletiv. Tuto strategii, která se vyrovná s toxicitou Cd, a která zahrnuje příjem a především přerozdělení Cd v rostlinách, můžeme definovat jako "hyperakumulační". Na druhou stranu, některé rostliny zvyšují produkci antioxidantů, což vede k ochraně buněk a pletiv před zničením. To znamená, že mechanismus tolerance Cd u rostlin může zahrnovat nejen antioxidační, ale i hyperakumulační obranu (Rascio and Navari-Izzo 2011).

Objev různých rostlin, které mají schopnost akumulovat a tolerovat vysoké koncentrace HM, vedl k vývoji nové technologie na rostlinné bázi, známé jako fyto Remediacce (Entry et al. 1999). Technologie fyto Remediacce jsou definovány jako využití zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agrotechnických opatření pro odstranění či transformaci kontaminantů z životního prostředí (Soudek et al. 2008). Po transportu kontaminantů do kořenů, stonku a listů jsou pak rostliny následně sklizeny a zlikvidovány. Bylo zkoumáno již více než 400 druhů rostlin na jejich potenciál fyto Remediacce HM. Většina z těchto rostlin patří k druhům *Arabidopsis*, *Brassica*, *Sedum* a *Thlaspi* (Lone et al. 2008).

Rostliny pěstované na kovem znečištěných půdách často vykazují pomalý růst a nižší biomasu, v níž se logicky i hromadí nižší koncentrace kovu (Persans and Salt 2000). Pro efektivní fyto Remediacce HM, by rostliny měly mít vysokou produkci biomasy a také schopnost tolerovat a hromadit vysoké koncentrace toxického kovu ve svých pletivech. Tolerantní rostliny mají obecně nižší produkci biomasy a naopak většina rostlin vykazující vysokou produkci biomasy zase nevykazuje toleranci k HM. Možným řešením je například použití hormonů a kovových chelátorů (Hadi and Bano 2009). Vědci v tomto experimentu použili jako hormon kyselinu giberelovou (GA3), a syntetické chelatační činidlo kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA), což vedlo ke zvýšení fyto Remediacce potenciálu Cd-ošetřených rostlin. GA3 podporuje růst a biomasu, zatímco EDTA zvyšuje biologickou dostupnost kovu v půdě tvorbou komplexů s kovy (Hadi et al. 2010).

5.4.1 Hyperakumulační mechanismus

"Hyperakumulátor" je termín, používaný pro rostliny, které aktivně přijímají mimořádně vysoké množství jednoho nebo více HM z půdy. Kromě toho, tento kov neuchovávají v kořenech, ale translokují ho do prýtlů a akumulují v nadzemních orgánech, a to zejména listech (Zemanová et al. 2015a). Koncentrace jsou pak 100 - 1000x vyšší než u obdobných neakumulujících druhů. To odpovídá alespoň 100 mg.g⁻¹ (0.01 % suš.) Cd, As nebo 1000 mg g⁻¹ (0.1 % suš.) Co, Cu, Cr, Ni, Pb nebo 10000 mg g⁻¹ (1 % suš.) Mn a Ni (Reeves and Baker 2000). Hyperakumulační rostliny navíc nevykazují žádné příznaky fyto toxicity (Tran and Popova 2013). Podle Rascio and Navari-Izzo (2011) je definováno asi 450 druhů krytosemenných rostlin jako hyperakumulátor HM (As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, TI a Zn), což je orientačně 0.2 % všech známých druhů. Nicméně, i díky vědecké činnosti jsou stále objevovány nové hyperakumulační rostliny (Rascio and Navari-Izzo 2011; Altinözölü et al. 2012).

V hyperakumulačních rostlinách jsou toxické účinky HM při jejich vysoké akumulaci minimalizovány vlivem detoxikačních mechanismů. Tyto mechanismy mohou být založeny zejména na chelatační a sub-buněčné kompartmentalizaci (Yadav 2010).

Transport HM z kořenů do nadzemních částí, je v hyperakumulačních rostlinách odlišný. Tato strategie zachovává v kořenových buňkách většinu iontů HM, které přebírají z půdy, detoxikuje je chelatací v cytoplasmě nebo je ukládá do vakuol, a rychle přemísťuje tyto prvky do prýtlů prostřednictvím xylému. Jedná se o specifické vlastnosti buněk tonoplastu kořene, které umožňují pohotově uvolnit ionty HM z vakuol (Rascio and Navari-Izzo 2011). Mimoto je v kořenech přítomno mnoho malých organických molekul (např. fytochelatinů, metalothioneinů,...), které mohou pracovat jako kov-vázající ligandy. Důležitou roli v hyperakumulaci HM také hrají volné aminokyseliny, jako jsou například histidin a nicotinamin, které tvoří stabilní komplexy s dvojmocnými kationty (Hassan and Aarts 2011). Nicméně míra příspěvku různých prvků v této strategii nebyla dosud stanovena (Tran and Popova 2013).

Vylepšený přenos kovu xylémem a translokace do prýtlů je dalším klíčovým fyziologickým krokem v hyperakumulaci, která odpovídá za zvýšené proudění kovu směrem k výhonkům. Ukládání a detoxikace HM právě ve výhoncích jsou onou klíčovou strategií hyperakumulačních rostlin. Detoxikace či izolace HM se vyskytuje v místech, jako jsou epidermis, trichomy a dokonce i pokožka. V mnoha případech jsou HM také vyloučeny pomocí obou pomocných a svěracích buněk průduchů. To umožňuje zachovat funkční průduchové buňky oproti fytotoxickým účinkům. Detoxikační a sekvestrační mechanismy v nadzemních orgánech hyperakumulátorů se skládají především z tvorby komplexů HM s ligandy či jejich odstranění z metabolicky aktivní cytoplazmy a jejich přesunutí do neaktivních oddílů, zejména vakuol a buněčné stěny (Rascio and Navari-Izzo 2011).

K detoxikaci nedůležitých kovů také slouží syntéza specifických chelátorů s nízkou molekulární hmotností, aby se zabránilo vázání kovů k fyziologicky důležitým bílkovinám a k usnadnění jejich přepravy do vakuol. Favorizovanými ligandy As a Cd jsou thioly, přítomné v glutathionu a fytochelatinech (PC). Tripeptid glutathion (Glu-Cys-Gly), GSH, se může vázat na několik kovů a polokovů, včetně Cd, a je také zapojen do redox obrany. Avšak pouhé zvýšení množství GSH a syntéza PCs se sama o sobě nezdá být dostatečnou pro dosažení více než marginálního vylepšení v toleranci či akumulaci Cd a As. Transportér Cd-GS2, který provádí přenos Cd, byl nalezen u rostlin huseníčku (*Arabidopsis* sp.) (Verbruggen et al. 2009). Malé ligandy, jako jsou organické kyseliny, mají důležitou roli jako detoxikační faktory. Tyto ligandy mohou být nástrojem, vedoucím k zabránění přetrvávání HM ve formě volných iontů v cytoplasmě a jsou dokonce i více odpovědné za jejich zachycení ve vakuolách, kde se tyto cheláty kov-organická kyselina primárně nachází. Například v listech penízku (*Thlaspi goesingense*), je citrát hlavním ligandem Ni; v listech lilku černého (*Solanum nigrum*) je Cd vázáno pomocí citrátu a acetátu; zatímco většina Zn v huseníčku (*Arabidopsis halleri*) a Cd v penízku modravém (*Thlaspi caerulescens*) jsou v komplexu s malátem (Rascio and Navari-Izzo 2011).

5.5 Vybrané látky signalizující stresovou reakci

5.5.1 Organické kyseliny

Jak již bylo zdůrazněno, možností jak zneprístupnit HM v pletivech rostlin je např. začlenění do buněčných stěn, akumulace ve vakuolách nebo také tvorba komplexů s některými organickými kyselinami nebo proteiny (Lin and Kao 2000). Organické kyseliny se většinou běžně podílí na mnoha pochodech v kořenech rostlin, včetně příjmu živin, zmírnění anaerobního napětí v kořenech, minerálním zvětrávání či reakci na patogen (Tlustoš et al. 2006). Kromě toho obvykle v rostlinách chelatují s HM. V oblasti rhizosféry je tento proces indukován převážně šťavelovou, jablečnou a citrónovou kyselinou (CA) (Krämer et al. 1996). Organické kyseliny v kombinaci s nežádoucími HM, snižují možnost jejich kombinace s mobilními proteiny a enzymy, čímž zmírňují škody, které tyto kovy způsobují (Zhu et al. 2006). Kromě toho, organické kyseliny hrají důležitou roli v absorpci HM, jejich přenosu a akumulaci v rostlinách (Sun et al. 2010). Ovšem i k tomuto faktu jsou některé vědecké práce skeptické, např. Boominathan and Doran (2003) uvádějí, že i když vlasové kořínky penízku modravého (*Thlaspi caerulescens*) a tařinky (*Alyssum bertolonii*) obsahovaly vysoké úrovně kyselin CA, jablečné a malonové, pouze 13 % Cd a 28 % Ni bylo na tyto organické kyseliny v kořenech vázáno.

5.5.1.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) je jednoduchou fenolickou sloučeninou, která je považována za signální molekulu, která hraje důležitou úlohu při regulaci množství fyziologických procesů a rostlinné rezistence vůči stresovým podmínkám (Saruhan et al. 2011). Hayat et al. (2007) navrhli, že by tato molekula mohla být novým rostlinným regulátorem. Hayat et al. (2010) a Saruhan et al. (2011) popsali, že SA vyvolává antioxidační odpověď při různém stresovém působení. A to i v případě účinků HM (Agami and Mohamed 2013; Kovács et al. 2014). Metwally et al. (2003) však dospěli k závěru, že SA nezmírňuje toxicitu Cd v kořenech ječmene (*Hordeum sp.*) na úrovni antioxidační obrany, ale tím, že ovlivňuje další mechanismy zapojené do detoxikace Cd. Nicméně předchozí studie ukázaly, že SA může zmírnit inhibici růstu způsobenou toxicitou Cd u různých druhů rostlin, jako jsou např. ječmen (*Hordeum sp.*) (Metwally et al. 2003), rýže (*Oryza sp.*) (Chao et al. 2009), kukuřice (*Zea sp.*) (Krantev et al. 2008), pšenice (*Triticum sp.*) (Moussa and El-Gamal 2010), hořčice (*Sinapis sp.*) (Ahmad et al. 2011), konopí (*Cannabis sp.*) (Shi et al. 2009), soja (*Glycine sp.*) (Drazic and Mihailovic 2005), hrách (*Pisum sp.*) (Popova et al. 2009), len (*Linum sp.*) (Belkhadi et al. 2010) a sazenice okurky (*Cucumis sp.*) (Çanakci and Karaboga 2013). SA se v rostlinách hromadí v reakci na oxidační stres, čímž je přímo zapojena do různých signalizačních a antioxidačních odpovědí (Larkindale and Knight 2002). Rápidní zvýšení množství organických kyselin v rostlinách při stresovém působení HM, může být spojeno s těmito kyselinami, které mají toleranční a stavební účinky u rostlin, právě proti oxidačnímu poškození (Anwer et al. 2012). Ivanova et al. (2008) navrhli, že SA chrání lipidové membrány listů proti působení

Cd. SA rovněž podporuje fotosyntetický aparát, pomocí navýšení počtu buněčných antioxidantů a podpory syntézy nových proteinů (Avancini et al. 2003). Nicméně, mechanismus SA-indukované rezistence je stále nejasný (Li et al. 2013).

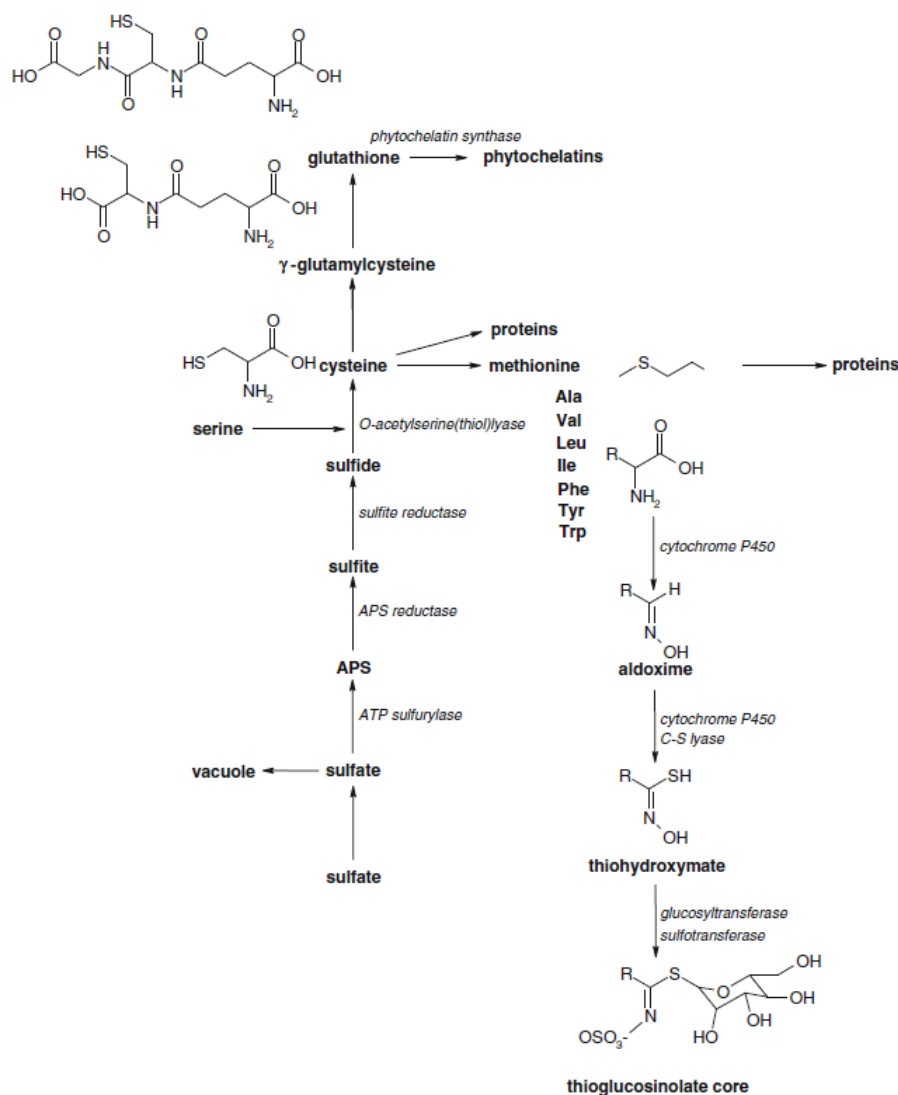
5.5.2 Fenolické látky

Ve stresových podmínkách mohou rostliny také syntetizovat antioxidační látky, jako jsou např. glutathion, aminokyseliny (jako je např. prolin), askorbát a fenolické látky (metabolity) (Sakihama and Yamasaki 2002; Mittler 2002; Wang et al. 2008b). Fenolické sloučeniny (PhC) jsou důležité rostlinné složky, které jsou potřebné pro syntézu ligninu a pigmentů, ale také poskytují konstrukční celistvost celé rostlině. U vyšších rostlin, jsou tyto sloučeniny považovány za sekundární metabolity, které se, mimo jiné, podílejí na obranných mechanismech (Boudet 2007; Gill and Tuteja 2010). Antioxidační vlastnosti fenolických metabolitů spočívají především v dostupnosti fenolických vodíků (Rice-Evans et al. 1996). Vasconcelos et al. (1999) a Zagorskina et al. (2007) vidí jejich funkci hlavně jako chelátorů kovů, s nimiž dokáží interagovat. Důležitost jejich role v rostlinách při obranných mechanismech vůči toxicitě kovů byla již několikrát pozorována (Gill and Tuteja 2010; Márquez-García et al. 2012; Ali and Hadi 2015). I díky tomu mohou působit jako biomarkery expozice kovu (Białońska et al. 2006). Celkový obsah fenolických látek tak dovoluje odhadnout redukční schopnosti rostlin, vyjádřit jejich antioxidační potenciál a odolnost vůči stresovému působení (Biolley et al. 1998; Giertych et al. 1999). Tyto látky se také, spolu s antioxidačními enzymy, podílejí na vychytávání ROS, např. H₂O₂ ve spolupráci se skupinou enzymů peroxidáz (Sgherri et al. 2003). Antioxidační aktivita a kapacita kovové vazby mohou odpovídat za ochranné účinky těchto sloučenin (Llugany et al. 2013). Díky možnosti vystupovat jako činidla poskytující elektron, mohou působit jako antioxidanty (Michalak 2006). Zvýšená tvorba ROS může sloužit jako signál pro zvýšení syntézy PhC, které se na druhé straně podílí na vychytávání ROS, aby se zabránilo nadprodukci těchto forem kyslíku a poškození konstrukce rostlin v důsledku přítomnosti kovů (Babu et al. 2003; Cohen and Kennedy 2010; Yuan et al. 2010; Atkinson et al. 2011). Dále působí jako redukční činidla, donory vodíku, a zhaščeče singletového kyslíku, čímž zabraňují vzniku volných oxidačních radikálů a reaktivních forem získaných z kovové katalýzy při Fentonově reakci (Jung et al. 2003). Mají intra- a inter- specifickou kompetitivní kapacitu, čímž nejvýznamněji přispívají k antioxidační aktivitě rostlin vázající HM (Ferrat et al. 2003). Hned několik studií pak ukázalo, že rostliny mohou za různých stresových podmínek, především vlivem expozice HM (Cd, Cu, Ni a Zn), hromadit fenolické sloučeniny (Sivaci et al. 2007; Kovácik et al. 2008; Kovácik and Klejduš 2008; Kovácik et al. 2009b; Sivaci and Elmas 2012; Dutta and Maharia 2012). Lavid et al. (2001) zjistili u vodních rostlin, zachycení Cd polymerovanými fenoly. Vysoké koncentrace PhC byly popsány u různých rostlin, jako např. v případě pšenice (*Triticum* sp.) a Ni, fazolu (*Phaseolus vulgaris*) a Cd, *Phyllanthus tenellus* a Cu a kukuřice (*Zea* sp.) a Al (Winkel-Shirley 2002; Ali and Hadi 2015). Nicméně i v tomto případě se odpověď rostlin může lišit v závislosti na druhu rostliny a chemickém prvku (Sgherri

et al. 2003; Kováčik et al. 2008; Kováčik and Klejdus 2008; Kováčik et al. 2009b; Kováčik et al. 2009a; Kováčik et al. 2010; Kováčik et al. 2011), ale obvykle bývá velmi zesílena v přítomnosti směsi HM (Michalak 2006; Gratao et al. 2009).

5.5.3 Thioly

Thioly s nízkou molekulovou hmotností (LMWT), jsou třída vysoce reaktivních sloučenin podílejících se masivně na udržování buněčné redox-homeostázy. Vzhledem ke svým jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem zahrnují širokou skupinu biologicky významných látek (Supalkova et al. 2007). Také se podílejí na odpovědi rostlin na téměř všechny stresové faktory, jakož i na regulaci buněčného metabolismu. Mezi široce studované LMWT patří např. glutathion a jeho biosynteticky příbuzné sloučeniny (cystein, c-glutamylcystein, cysteinylglycin a fytochelatin). Mezi další popsané LMWT patří např. thiocystein, cysteamin, homocystein, kyselina lipoová a mnoho dalších druhově specifických těkavých thiolů (Pivato et al. 2014). Jedná se o skupinu biologicky reaktivních látek, především díky reaktivitě své nukleofilní -SH skupiny. Ta je jednou z nejsilnějších nukleofilních skupin v rostlinné buňce. Podílí se na řadě chemických reakcí, které poskytují thiolové molekuly. Thioly pak mohou konjugovat či tvořit komplexy s cizorodými a toxickými látkami, a tím je deaktivovat, popř. i post-translačně modifikovat regulační enzymy (Pivato et al. 2014), stejně jako tvořit disulfidické vazby, potřebné pro určení strukturální charakteristiky a regulačních vlastností některých bílkovin (Haugaard 2000). Sulfhydrylové (thiolové) skupiny slouží jako donor protonu, čímž hrají podstatnou úlohu v ochranné funkci (Babula et al. 2012). Obecně se tedy jedná o látky úzce spjaté s metabolismem síry (S). S patří do skupiny nejdůležitějších základních živin v organismech. Rostlinami je S přijímána zejména ve formě anorganického sulfátu. Po redukci je, v procesech primární asimilace síranu, začleněna do cysteinu. Cystein slouží jako donor S pro biosyntézu methioninu (hlavní aminokyselina obsahující S v rostlinách) a také jako prekurzor biosyntézy glukosinolátů a glutathionu, což jsou nejdůležitější thiolové ochranné sloučeniny (Mugford et al. 2011). Tyto pochody jsou dobře patrné ze schématu na obr. 12. Činnost adenosin 50-phosphosulphate (APS) kinázy pak omezuje dostupnost S pro biosyntézu sirných sekundárních metabolitů (Babula et al. 2012).



Obr. 12: Biosyntéza thiolů a glukosinolátů (*APS* - adenosin 50-phosphosulfát; *ATP* – adenosintrifosfát).
Převzato z Babula et al. (2012).

Thiolové sloučeniny hrají obecně důležitou roli v tolerančních mechanismech rostlin před nepříznivými faktory životního prostředí, zejména pak stresovým působením HM (Zenk 1996). Některé studie uvádějí, že expozice Hg a Cd mají za následek významné zvýšení indukce obsahu thiolů jak u vodních rostlin v případě laboratorních pokusů (Tripathi et al. 1996; Gupta et al. 1998), tak i u dalších druhů rostlin v rámci polních pokusů (Supalkova et al. 2007; Gonçalves et al. 2007; Guo et al. 2012; Weng et al. 2012). Thioly a antioxidační enzymy jsou úzce spojeny s detoxikací Cd a eliminací ROS (Semane et al. 2007). Tyto obranné látky jsou schopné vázat HM, což je jeden z nejdůležitějších mechanismů jejich detoxikace, a transportovat je do "bezpečných" prostor buněk, především pak do vakuol (Hernández-Allica et al. 2006; Babula et al. 2012; Weng et al. 2012). Vakuoly jsou obecně považovány za hlavní úložiště pro kovy a vakuolární kompartmentace je hlavní součástí mechanismu tolerance (Tong et al. 2004; Song et al. 2010). Jako nejnámější je v tomto ohledu známa skupina tzv. fytochelatinů (PC), které jsou hlavními thiolovými peptidy a chelátory kovů v rostlinné cytoplazmě

(Zitka et al. 2011; Brunetti et al. 2011), jak bylo ostatně ukázáno i na obr. 9 v kapitole 5.4 a obr. 11 v kapitole 5.4. Vznikající vazba protein-kov pak koordinuje řadu fyziologických pochodů kovových iontů, jako je Fe, Zn, Cu, stejně jako xenobiotik Co, Ag, Cd a Hg (Jacob et al. 2003). Dále byla popsána skupina tzv. metalothioneinů, které tvoří skupina na cystein bohatých proteinů, podílejících se na transportu kovů, jejich ukládání a detoxikaci nepodstatných kovů či nadměrného množství základních kovů. Spolu s PC pak v případě nadměrného zatížení HM tvoří „bezpečné“ cheláty (Hassinen et al. 2011). Je tedy jasné, že řada rozličných skupin thiolů, spolu se sítí molekul obsahujících S a jejich příbuzných sloučenin, zásadním způsobem přispívá k toleranci rostlin vůči rozličnému stresu (Meyer and Hell 2005; Colville and Kranner 2010).

6. METODIKA POKUSŮ

V rámci prezenční formy doktorského studia byly provedeny celkem 4 experimenty, at' již v rámci specifických výzkumů Univerzity Hradec Králové, nebo jako součást mezinárodních stáží na Univerzitě v Bernu. V těchto pokusech bylo pracováno s běžně pěstovanými a dostupnými rostlinami - fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), pšenice (*Triticum aestivum*), okurka setá (*Cucumis sativus*); léčivými rostlinami - kalisie vonná (*Calisia fragans*); dříve popsány rostlinnými hyperakumulátory - zelenec (*Chlorophytum commosum*) a typicky pokusnými druhy - huseníček (*Arabidopsis* sp.). Bylo využito jak hydroponického prostředí, tak nádobových experimentů ve skleníku. Z HM jsme se soustředili převážně na Cd, výběrově doplněný o esenciální prvek Zn. Kromě makroskopického hodnocení vlivu Cd na růst a vývoj rostlin, byly pomocí nedestruktivních měřících metod zjišťovány i další proměnné, jako např. intenzita fotosyntézy, transpirace, vodivost prùduchů či relativní obsah chlorofylu. Pomocí laboratorních metod pak bylo zkoumáno množství akumulovaného Cd v jednotlivých částech rostlin, popřípadě zde byl sledován i pohyb dalších relevantních kationtů. Pro identifikaci a pochopení zapojení různých obranných mechanismů bylo v rostlinách rovněž stanovováno množství dalších signálních látek, jako např. organických kyselin, kyseliny salicylové (SA), fenolických látek (PhC), thiolů či určena míra antioxidační kapacity (AOC). To vše v závislosti na různých doprovodných aniontech, poskytujících Cd uměle kontaminovaným půdám.

Metodiky jednotlivých experimentů jsou uvedeny níže. Metodiky týkající se stanovení SA, PhC a informace týkající se statistického zpracování, byly společné pro všechny pokusy a jsou uvedeny pod jednotlivými metodikami experimentů.

6.1 Experiment s okurkou setou

Experiment byl proveden formou nádobového pokusu, který probíhal ve skleníku Botanické zahrady v Hradci Králové (východní Čechy, 278 m.n.m.). Fotoperioda byla úměrná klimatickým podmínkám stanoviště (50° 10' 34" N; 15° 50' 19" E), relativní vlhkost vzduchu byla stanovena na 60 % a průměrná teplota ve dne 26 °C, a v noci 17 °C.

Rostliny okurky seté (*Cucumis sativus* L. var. Charlotte) rostly v plastových nádobách (7.5 L), po 4 rostlinách v každém květináči, který byl naplněn 7.5 kg zeminy (půdní druh – jílovitohlinitá půda). Agrochemická charakteristika zeminy byla následující: pH/KCl - 7.20; množství přístupného P 23.0; Cu 1.88; Al 20.1; Ca 1985.0; Mg 42.3; Fe 71.5; Mn 20.3; K 76 mg.kg⁻¹ (výluh Mehlich III). Obsah HM v zemině ve výluhu lučavkou královskou byl následující: Cd 0.5; Zn 143.0, Pb 34.0, As 6.0, Hg 0.1, Cr 43.00 mg.kg⁻¹. Bylo zvoleno 7 variant, každá ve 4 opakováních. První variant byla variantou kontrolní, bez přidaného Cd. Další obsahovaly uměle přidané Cd o koncentracích 40, 160 a 320 mg.kg⁻¹; vždy se stejným doprovodným aniontem (Cl⁻, SO₄²⁻). Pro přehlednost byly tyto varianty v textu a grafech značeny následovně: kontrola (control), Cd40S, Cd40Cl, Cd160S, Cd160Cl, Cd320S a Cd320Cl. Specifický obsah chemikálií a značení všech variant je uvedeno v tab. 1. Navážené množství chemikálií bylo rozpuštěno v 300 ml destilované vody a takto připravené roztoky byly aplikovány do zeminy v experimentálních nádobách k plně vyvinutým rostlinám, 35 dní po výsevu.

Varianty	Označení	Koncentrace Cd mg . kg ⁻¹ / aniont	Chemikálie (g . nádobu ⁻¹)	
			CdCl ₂	CdSO ₄
1	control	---	---	---
2	Cd40Cl	Cd 40 / Cl ⁻	0.60945	---
3	Cd160Cl	Cd 160 / Cl ⁻	2.43780	---
4	Cd320Cl	Cd 320 / Cl ⁻	4.87560	---
5	Cd40S	Cd 40 / SO ₄ ²⁻	---	0.6846
6	Cd160S	Cd 160 / SO ₄ ²⁻	---	2.7385
7	Cd320S	Cd 320 / SO ₄ ²⁻	---	5.4770

Tab. 1: Jednotlivé varianty experimentu s okurkou setou - specifický obsah chemikálií a značení všech variant.

Růst rostlin byl determinován pomocí čerstvé hmotnosti (FW) každé rostliny. Fluorescence chlorofylu byla měřena fluorometrem OS1p (Opti-Sciences, USA). Plně vyvinuté rostliny včetně plodů byly sklizeny v jednom dni, 49 dní po kontaminaci Cd. Kořeny byly omyty v destilované vodě a osušeny na filtračním papíru. Při sklizni byly rovněž vyhodnoceny a zdokumentovány symptomy toxicity. Každá rostlina byla rozdělena na kořenovou, stonkovou, listovou a plodovou část. Části byly homogenizovány na malé části a sušeny do konstantní hmotnosti (cca 48 h) při 65°C (Venticell 707; Ilabo, Borsovska, Kyjov, CZ). Poté byly zpracovány na jemný prášek. Mineralizace sušených vzorků byla provedena pomocí suché metody spalování v muflové peci (CALOR SN 305; MIWY, Lipník n. Běčvou, CZ).

Vzorky o hmotnosti 1 - 50 g byly umístěny do pece v křemenném (platinovém) kelímku. Byl nastaven spalovací program podle charakteru vzorků – ty byly pomalu spalovány (maximální teplota 450°C) do podoby bílého prášku. Vzorky byly poté rozpuštěny v 10 % HNO₃. Koncentrace Cd a K byly stanoveny pomocí atomové absorpční spektroskopie na zařízení AAS SOLAAR M5 (Thermo Electron Spectroscopy Ltd., Solaar House, Cambridge, UK). Vzorky byly zmlžovány v plameni acetylen-vzduch, a absorbance byla měřena při specifické vlnové délce. Pro Cd 228.8 nm. Příslušné koncentrace byly pomocí softwaru zařízení odečítány metodou kalibrační křivky. Odhad nejistoty na základě výpočtu experimentálních dat byly pro referenční materiál v případě Cd 20 %.

6.2 Experiment s hyperakumulátorem

Experiment byl proveden formou nádobového pokusu, který probíhal ve skleníku Botanické zahrady v Hradci Králové (východní Čechy, 278 m. n. m.). Fotoperioda byla úměrná klimatickým podmínkám stanoviště (50° 10' 34" N; 15° 50' 19" E) v období od března do května. Relativní vlhkost vzduchu byla stanovena na 60 % a průměrná teplota ve dne 24 °C, a v noci 15 °C.

Rostliny zelence chocholátého (*Chlorophytum comosum*) a kalisie vonné (*Calisia fragans*) byly pěstovány v plastových nádobách (průměr 12.5 cm), po 1 rostlině v každém květináči, který byl naplněn 1.5 kg pěstebního rašelinového substrátu RS II od firmy Agro. Agrochemická charakteristika zeminy byla následující: pH/KCl - 6.20; množství přístupného P 91.4; Cu 0.69; Al 74.86 Ca 1840; Mg 202; Fe 48.7; Mn 6.6; K 203.0 mg.kg⁻¹ (výluh Mehlich III). Obsah HM v zemině ve výluhu lučavkou královskou byl následující: Cd 0.1; Zn 38.0, Pb 7.0, As 1.0, Cu 15.0, Cr 12.00 mg.kg⁻¹. Byly zvoleny 4 varianty pro každý rostlinný druh, každá varianta ve 4 opakováních. První varianta byla variantou kontrolní, bez přidaného Cd. Další obsahovaly uměle přidané Cd o koncentracích 40, 160 a 320 mg.kg⁻¹; vždy se stejným doprovodným aniontem (Cl⁻). Pro přehlednost byly tyto varianty v textu a grafech značeny následovně: kontrola (control), Cd40Cl, Cd160Cl a Cd320Cl. Specifický obsah chemikálií a značení všech variant je uvedeno v tab. 2. Navážené množství chemikálií bylo rozpuštěno v 300 ml destilované vody a takto připravené roztoky byly aplikovány do zeminy v experimentálních nádobách k plně vyvinutým rostlinám, 45 dní po jejich oddělení od mateřské rostliny a přesazení do květináčů.

Varianty	Označení	Koncentrace Cd (mg · kg ⁻¹) / aniont	Chemikálie (g.nádoby ⁻¹)
			CdCl ₂ · 2.5 H ₂ O
1	control	---	---
2	Cd40Cl	Cd 40 / Cl ⁻	0.12195
3	Cd160Cl	Cd 160 / Cl ⁻	0.48750
4	Cd320Cl	Cd 320 / Cl ⁻	0.97500

Tab. 2: Jednotlivé varianty experimentu s zelencem chocholatým a kalisií vonnou - specifický obsah chemikálií a značení všech variant.

Růst rostlin byl determinován pomocí čerstvé hmotnosti (FW) každé rostliny. Fluorescence chlorofylu byla měřena fluorometrem OS1p (Opti-Sciences, USA). Intenzita fotosyntézy (P_N), transpirace (E) a vodivost průduchů (G_s) byla v měřena pomocí nedestruktivních metod přístrojem LCpro+ (ADC BioScientific Ltd., United Kingdom). Relativní obsah chlorofylu byl měřen pomocí přístroje Chlorophyll Content Meter CCM-200 (Opti-Sciences, USA). Obě měření probíhala 26 dní po kontaminaci rostlin Cd.

Plně vyvinuté rostliny byly sklizeny v jednom dni, 29 dní po kontaminaci Cd. Kořeny byly omyty v destilované vodě a osušeny na filtračním papíru. Při sklizni byly rovněž vyhodnoceny a zdokumentovány symptomy toxicity. Každá rostlina byla rozdělena na kořenovou (podzemní), výhonkovou (nadzemní) a šlahounovou část. Části rostlin byly homogenizovány na malé části a sušeny do konstantní hmotnosti (cca 48 h) při 65°C (Venticell 707; Ilabo, Borsovska, Kyjov, CZ). Poté byly zpracovány na jemný prášek. Vzorky sušiny o hmotnosti 250 mg byly rozpuštěny ve 4 ml koncentrované HNO₃. Poté byly vzorky vloženy do reakčních nádob a umístěny mikrovlnného systému Ethos UP 182 (Milestone, Sorisole, Italy) s rotorem SK-15. Mineralizační program byl nastaven na 15 min se stálým nárůstem výkonu na 1800 W a poté 15 minut konstantně 1800 W; referenční teplota nádoby byla stanovena na 200 °C. Nádoby s mineralizovanými vzorky byly odebrány z mikrovlnného reaktoru a ochlazeny na teplotu pod 55 °C. Po mineralizaci vzorky nevykazovaly žádné významné zbytky organických látek (čiré roztoky). Všechny nádoby pro odběr vzorků byly opláchnuty a vzorky zředěny 1 % HNO₃ na 10 ml celkového objemu vzorku pro analýzu AAS. Mineralizované vzorky byly analyzovány metodou AAS s elektrotermickou atomizací (model ContrAA 700 spectrometer, Analytik Jena, Jena, Germany). Teplotní kroky a další parametry byly nastaveny dle doporučených hodnot výrobce. Data byla sbírána a vyhodnocována v softwaru Aspect CS (Analytik, Jena, Německo). Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních. Obsah Cd byl vypočítán metodou kalibrační křivky.

6.3 Experiment s radionuklidy ¹⁰⁹Cd a ⁶⁵Zn

Experiment byl veden jako hydroponický, v laboratořích Univerzity Bern. Zrna pšenice (*Triticum aestivum* L. „Rubli“) a fazole (*Phaseolus vulgaris* L. „Saxa“) se nechala vyklíčit na mokřém

filtračním papíře v plastové misce při teplotě 19 - 23 °C. Rostliny pšenice tu byly po dobu 14 dnů. Rostliny fazolu pouze 2 dny a pak byly přeneseny do křemičitého písku na dobu 12 dní. Plastová miska měla sklon 30°. Všechny rostliny byly po této době převedeny do živného roztoku. Po 5 dnech v živném roztoku byly rostliny vloženy do nádoby se 125 ml živného roztoku obsahujícího radionuklidy a to po dobu 2 dnů. V každé nádobě byly 3 rostliny, fazole a pšenice odděleně. Po uplynutí této doby byly rostliny přeneseny z radioaktivně značeného živného roztoku, opláchnuty destilovanou vodou, a vloženy do inkubačního roztoku. Tento roztok obsahoval 5.8 mM KH₂PO₄, 1.3 mM Ca(NO₃)₂, 0.88 mM KNO₃, 64 μM Fe-EDDHA, 0.98 μM MnCl₂, 4.93 μM H₃BO₃, 0.17 μM ZnSO₄, 0.2 μM Na₂MoO₄, 0.05 μM Ni(NO₃)₂, 0.11 μM CuSO₄.

Šest značených rostlin (3 fazole a 3 pšenice) byly společně hydroponicky kultivovány v nádobách obsahujících 900 ml živného roztoku (již bez radionuklidů). Rostliny byly pěstovány v kultivační místnosti s fotoperiodou 14 hodin (150 μmol photons.m⁻².s⁻¹ ze dvou zářivek Osram FQ 49W / 830 teplá bílá a dvou OSRAM FQ 49W / 840 studená bílá; měřeno 20 cm nad nádobami). Teplota boxu byla nastavena na 23 °C během dne a 19 °C v noci. Relativní vlhkost během dne byla 30 – 33 % a během noci 36 – 39 %. Postupně, po 3, 6 a 12 dnech od radioaktivního značení, byla sklizena jedna rostlina z každé varianty a druhu rostliny. V pokusu byly použity 3 varianty - kontrola (bez přidaného Cd či Zn), 2Cd (přidány 2 μM Cd), 20Zn (přidáno 20 μM Zn). Každá varianta měla 4 opakování.

Koncentrační aktivity ¹⁰⁹Cd a ⁶⁵Zn byly stanoveny detektorem záření gama 1480 Wizard 3' (Wallac Oy, Turku, Finland, Institute of Plant Sciences, University of Bern) s dobou počítání 40 min na vzorek.

Pro analýzu translokace použitých radionuklidů u obou rostlinných druhů, byly rostliny sklizeny v různých časových intervalech po fázi značení (3, 6, a 12 dní po značení radionuklidy, jeden exemplář z každé varianty). Poté byly rostliny rozděleny na jednotlivé části. U rostlin pšenice na kořeny, list 1 (nejstarší) až list 6 (nejmladší). V případě rostlin fazolu pak na kořeny, primární listy, stonky a trojčetné listy (trifoliolate 1 – nejstarší; až trifoliolate 4 - nejmladší). Různé části rostlin byly sušeny v sušárně přes noc při 60 °C. Po detekci záření gamma, byla na analytických vahách zjištěna hmotnost sušiny všech jednotlivých částí rostlin.

6.4 Experimenty s rostlinami *Arabidopsis* a jejich genotypy

6.4.1 Vliv kadmia na růst různých genotypů

Semena různých ekotypů rodu *Arabidopsis* sp. (Col-O; ProT_{1,2,3}; ProT_{1,2}; ProT_{2,3}; WS) byla vyseta do 200 μl čirých PCR zkumavek (BioConcept, Switzerland). Genotypy označené ProT_{1,2,3}; ProT_{1,2} a ProT_{2,3} obsahují různé proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu. Každá zkumavka byla naplněna 300 μl živného média. Jako živné médium bylo zvoleno ½ Murashige-Skoog (MS) médium (Dufecha Biochemie, Netherlands) s 0.65 % agarem (Becton, Dickinson and Company, France). Každá

zkumavka obsahovala 1 semeno. Pro pokus klíčivosti / úmrtnosti byly zvoleny 3 varianty experimentu. První byla variantou kontrolní, bez přidaného Cd. Další varianty obsahovaly uměle přidané Cd do živného média a to v koncentracích 10 μM a 50 μM $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Každá varianty čítala u každého genotypu vzorek o velikosti 32 rostlin. Všechny 3 varianty od jednoho genotypu (96 zkumavek) byly vloženy do příslušného stojanu těchto zkumavek v podobě boxu s uzavíratelným víčkem. To bylo zvoleno ke snížení výparu a ovlivnění dalších podmínek uvnitř klimaboxu. Takto připravené boxy byly umístěny na 2 dny do kultivační místnosti s fotoperiodou 14 hodin (150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ze dvou zářivek Osram FQ 49W / 830 teplá bílá a dvou OSRAM FQ 49W / 840 studená bílá; měřeno 20 cm nad nádobami). Teplota boxu byla nastavena na 23 °C během dne a 19 °C v noci. Relativní vlhkost během dne bylo 30 – 33 % a během noci 36 – 39 %. Poté byly rostliny na 12 dní přemístěny do klimaboxu (Percival Scientific) s fotoperiodou 12 hodin světla / 12 hodin tmy, teplotou během dne 22° C, v noci 20° C, relativní vlhkostí konstantně 75 % a s intenzitou světla 110 $\mu\text{Mm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Vyhodnocení pokusu proběhlo 14 dní od výsevu rostlin.

6.4.2 Obsah thiolových sloučenin ve vztahu k bioakumulaci Cd

Rostlinky různých ekotypů rodu *Arapidopsis* sp. (Col-O; Col-O: Hajnalka ; ProT_{1,2,3}; ProT_{1,2}; ProT_{2,3}; WS) byly pěstovány v 200 μl čirých PCR zkumavkách, kterým byla odstrižena špička a byly vloženy do 1.5 ml černých zkumavek (BioConcept, Switzerland). Čiré zkumavky byly naplněny živným médiem - ½ Murashige-Skoog (MS) médium (Dufecha Biochemie, Netherlands) s 0.65 % agarem (Becton, Dickinson and Company, France). V černých zkumavkách byla pravidelně kontrolována a doplňována hladina MS média. Každá zkumavka obsahovala 1 rostlinu. Takto připravené rostliny byly pěstovány v klimaboxu (Percival Scientific) s fotoperiodou 12 hodin světla / 12 hodin tmy, teplotou během dne 22 °C, v noci 20 °C, relativní vlhkostí konstantně 75 % a s intenzitou světla 110 $\mu\text{Mm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Pro pokus produkce thiolů byly zvoleny 3 varianty experimentu. První byla variantou kontrolní, bez přidaného Cd. Další varianty byly vystaveny přidanému Cd do živného média a to v koncentracích 100 μM (po dobu 24 h) a 200 μM (po dobu 48 h) $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Rostliny byly sklizeny po 26 dnech od vysetí. Celkové množství ve vodě rozpustných thiolů v nadzemních částech rostlin bylo stanovováno spektrofotometricky na přístroji DU 640 (Beckman, USA), dle metodiky popsané níže.

6.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Z namletých vzorků bylo odebráno 0.5 g sušiny a extrahováno v 10 ml 75 % HPLC metanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Extrakce vzorků probíhala pomocí třepačky Multi Reax (Heidolph, Schwabach, Germany) po dobu 24 h. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při frekvenci 1024 rpm pomocí centrifugy MPW 223a (MPW, Warsaw, Poland), aby došlo ke zmenšení objemu pevné složky a bylo možné odlít pouze extrakt. Ten byl přefiltrován přes mikroporézní

stříkačkový filtr 0.45 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 5.0 ml bylo odebráno do 50 ml odměrné baňky a doplněno po rysku 75 % metanolem. Z filtrátu bylo pipetováno 1.0 ml do 50 ml odměrné baňky, do které se dále přidalo 9.0 ml destilované vody a 1.0 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 5 minutách bylo přidáno 10.0 ml 7 % roztoku Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený vzorek byl ponechán 90 minut stát.

Absorbance paralelních vzorků byla měřena pomocí UV/VIS spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) při vlnové délce 765 nm. Koncentrace vzorků byla vypočtena pomocí kalibrační křivky. Zjištěné hodnoty byly přepočteny na 100 g sušené hmoty a vyjádřeny v gramech standardu kyseliny gallové. Výsledná kontrakce originálního vzorku byla vypočtena podle vzorce:

$$m = \frac{c_g \times V_c \times m_r \times V_{ex}}{m_s \times V_p}$$

kde m je hmotnost PC ve 100 g původní rostlinné sušiny (g), c_g je koncentrace PhC v měřeném vzorku získaného z výpočtů z kalibrační křivky (g/ml), V_c je objem kalibračního roztoku použitého k reakci (1 ml), m_r je hmotnost referenčního vzorku použitého k výpočtu (100 g), V_{ex} je objem extrakčního roztoku (10 ml), m_s je hmotnost vzorku použitého pro extrakci a V_p je objem extraktovaného vzorku použitého v reakci (1 ml).

6.6 Stanovení antioxidační kapacity (AOC)

Antioxidační kapacita (AOC) byla stanovována pomocí testu antioxidační kapacity ekvivalentu Troloxu (TEAC). Výsledky pak byly vypočteny jako aktivita ABTS^{++} zachycovačů radikálů (%). Zkouška na kationtový radikál ABTS, způsobující během tohoto testu odbarvení vzorku, byla provedena podle metodiky autorů Re et al. (1999) and van den Berg et al. (1999), pouze s několika modifikacemi. Z chemikálií byly použity: Trolox ((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) a ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), které byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Ke stanovení AOC byly použity metanolové extrakty sušiny rostlin (0.5 g sušiny / 5 ml metanolu). Zkoušavky byly umístěny do třepačky Multi Reax shaker (Heidolph, Schwabach, Germany) po dobu 24 hodin při 1600 rpm a následně odstředěny v centrifuze (15 minut při 4500 rpm). Vzorky pro zkoušku odbarvování, byly připraveny do 1 cm polystyrénových kyvet. Nejprve byly smíchány 3 ml roztoku radikálu ABTS s 40 μl metanolového extraktu vzorku či standardu Troloxu a ponecháno dobu 20 minut při laboratorní teplotě, aby bylo možné důkladné odbarvování v reakční směsi. Následně byla odečtena absorbance při 734 nm na přístroji Agilent Cary 60 spektrofotometer. Ke stanovení kalibrační křivky bylo použito 5-ti bodů (koncentrace Troloxu 0, 5, 10, 15 a 20 mM). Aktivita ABTS^{++} zachycovačů radikálů (%) byla vypočtena, jak popsali Šiler et al.

(2014), pomocí vzorce: $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$; kde A_{sample} je absorbance roztoku, kam byl přidán extrakt / referenční sloučenina a A_{control} je absorbance roztoku ABTS⁺⁺ bez přidaného extraktu.

6.7 Stanovení kyseliny salicylové

Ke stanovení obsahu SA byl použit kapalinový chromatograf Agilent složený z kvarterní pumpy série 1260 (G1311B), automatického dávkovače vzorků série 1260 (G1329B), termostatu automatického dávkovače série 1290 (G1330B), termostatu kolony série 1260 (G1316A), detektoru UV/VIS oblasti série 1260 (G4212B), fluorescenčního detektoru série 1260 (G1321B). Řízení HPLC a zpracování výsledků probíhalo pomocí programu OpenLab CDS, v. C.01.01 (Agilent Technologies, USA).

Jemně namletá sušina o hmotnosti 0.5 g byla smíchána s 5 ml 75 % HPLC roztokem metanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Extrakce vzorků probíhala pomocí třepačky Multi Reax (Heidolph, Schwabach, Germany) po dobu 24 h. Poté byly vzorky 15 minut centrifugovány při frekvenci 3000 rpm pomocí centrifugy MPW 223a (MPW, Warsaw, Poland). Poté bylo 1.5 ml vzorku po dobu cca 4 hod. odpařováno pod proudem dusíku (30 °C) na odparce NDK 200-2 (Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd). Byl použit dusík čistoty 4.0 (SIAD). Před analýzou byly pevné zbytky rozpuštěny v metanolu a odstředěny za použití Lab dancer minishaker (IKA).

Separace probíhala na chromatografické koloně Kinetex C18, 150 x 4.6 mm o velikosti částic 5 μm, umístěné v termostatu při teplotě 25 °C. Dávkovaný objem vzorku byl 10 μl. Mobilní fáze byla složena ze směsi acetonitril/3.35 % kyselina fosforečná v poměru 40/60 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1.5 ml/min. Celková doba analýzy byla 6 minut. Detekce byla v UV oblasti při 235 nm.

Každý vzorek byl analyzován ve dvojím opakování. Pro vyhodnocení obsahu SA ve vzorku byla použita metoda kalibrační křivky.

6.8 Stanovení organických kyselin

Ke stanovení obsahu kyseliny šťavelové, CA, AsA a FuA bylo použito 0.5 g zmrazeného čerstvého rostlinného materiálu, který byl homogenizován s 10 ml 0.01mol/l K₂HPO₄-PBS (pH 2.5). Poté byly vzorky umístěny do vodní lázně a zahřívány na 75 °C, po dobu 45 min. Homogenáty byly odstředěny při 3000 rpm, a supernatanty byly odfiltrovány přes 0.45 μm mikroporézní filtr a použity pro chromatografickou analýzu. Organické kyseliny byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) (detaily přístroje viz výše). Vzorky byly separovány koloně Kinetex C18, 150 x 4.6 mm o velikosti částic 5 μm, umístěné v termostatu při teplotě 30 °C. Mobilní fáze byla složena ze směsi 97 % 0.01mol/l K₂HPO₄-PBS (pH 2.5) a 3 % metanolu. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Celková doba analýzy byla 6 minut. Detekce byla v UV oblasti při 210 nm.

Každý vzorek byl analyzován ve dvojitěm opakování. Pro vyhodnocení obsahu organických kyselin ve vzorku byla použita metoda kalibrační křivky.

6.9 Stanovení celkového obsahu thiolových sloučenin

Ke stanovení celkového obsahu ve vodě rozpustných thiolů byl použit UV/VIS spektrofotometr DU 640 (Beckman, USA). Pro analýzu byly využity chemikálie: 0.1mM Na₂EDTA; 10 % TCA; DTNB (90 mg/250 ml 0.2 M Phosphatbuffer, pH 7.0); 0.2 M Phosphatbuffer pH 7.0 (KH₂PO₄, Na₂HPO₄ · 2H₂O) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Čerstvé rostlinné vzorky o hmotnosti 200 mg byly homogenizovány s 2 ml EDTA: 10 % TCA (poměr 10:2). Homogenizace probíhala pomocí homogenizátoru Polytron (Kinematica, Switzerland) s plastovým nástavcem pro homogenizaci přímo uvnitř zkumavky. Během vážení a homogenizace byly vzorky uchovávány v ledu. Poté byly vzorky přeneseny do 2 ml zkumavek a 15 minut centrifugovány při frekvenci 13 600 rpm a teplotě 4 °C pomocí centrifugy Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Germany). Supernatanty byly odebrány do 2 ml čistých zkumavek, odkud bylo postupně odebíráno 1.5 ml k spektrofotometrické analýze. Měřeními byly získány 2 hodnoty, z kterých probíhal konečný výpočet, a sice:

- a) 1 ml extraktu + 1 ml DTNB
1 ml extraktu + 1 ml Phosphatbuffer = Blank
- b) 1 ml H₂O + 1 ml DTNB
1 ml H₂O + 1 ml Phosphatbuffer = Blank

Detekce probíhala pomocí měření absorbance při 412 nm v kyvetách o objemu 100 µl. Každý vzorek byl analyzován ve dvojitěm opakování. Pro vyhodnocení celkového obsahu ve vodě rozpustných thiolů ve vzorku, byla použita metoda kalibrační křivky. Výsledná koncentrace ve vzorku byla vypočtena dle vzorců:

$$\Delta OD = OD a) - OD b)$$

$$[SH] = \frac{\Delta OD \times 2}{13\,600} = \text{Mol/l Extraktu}$$

6.10 Statistické zpracování dat

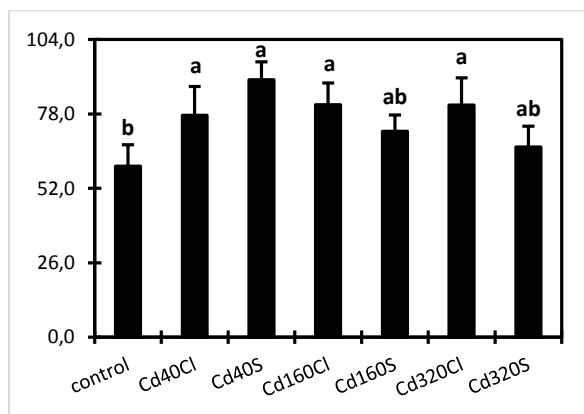
K přehlednosti obsahu Cd v jednotlivých částech rostlin, jakožto i dalších obsahových látek, byly zpracovány tabulky a grafy v programu Excel (Microsoft, USA). Konkrétní statistické zpracování probíhalo pomocí programu Statistica (Statsoft, ČR). Byla použita metoda jedno faktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Tukeyho testem, na hladině významnosti P = 0,05. Pro odhalení vzájemného vztahu různých stresových indikátorů a obsahu Cd, byla použita také korelační analýza.

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Experiment s okurkou setou

7.1.1 Vliv kadmia na produkci biomasy

U variant s přidavkem Cd byla pozorována stimulace v produkci biomasy a růstu nadzemních částí a kořenů rostlin (obr. 13). Všechny varianty s přidavkem Cd v tomto případě zvýšily produkci čerstvé hmoty (FW). A to konkrétně v průměru o 30 % oproti kontrolní variantě. Mezi variantami, kde byl jako doprovodný aniont použit Cl^- , nebyl v tomto směru pozorován žádný významnější rozdíl. Naproti tomu, u variant s doprovodným aniontem SO_4^{2-} , došlo po úvodním silném nárůstu k postupnému snižování produkce FW s narůstající hodnotou Cd. Z tohoto pohledu dosáhla nejvyšších hodnot mezi těmito variantami varianta Cd40S, kde byla hodnota FW zvýšena v průměru o 50 % ve srovnání s kontrolní variantou. Pozitivní efekt nízkých koncentrací Cd na rostlinný růst byl dříve popsán autory Shamsi et al. (2007). Cd, přestože není potřebné, je rostlinami přijímáno a jedná se o jeden z nejvíce toxických kovů pro cévnaté rostliny. Velmi nízké koncentrace Cd, by mohly mít dočasné stimulační účinky na růst rostlin, ale při vysokých a velmi vysokých koncentracích, se jedná již o velmi toxickou látku (Liu et al. 2003). Naopak při nižších dávkách Cd, probíhají zřejmě detoxikační reakce, které mimo jiné stimulují metabolismus.

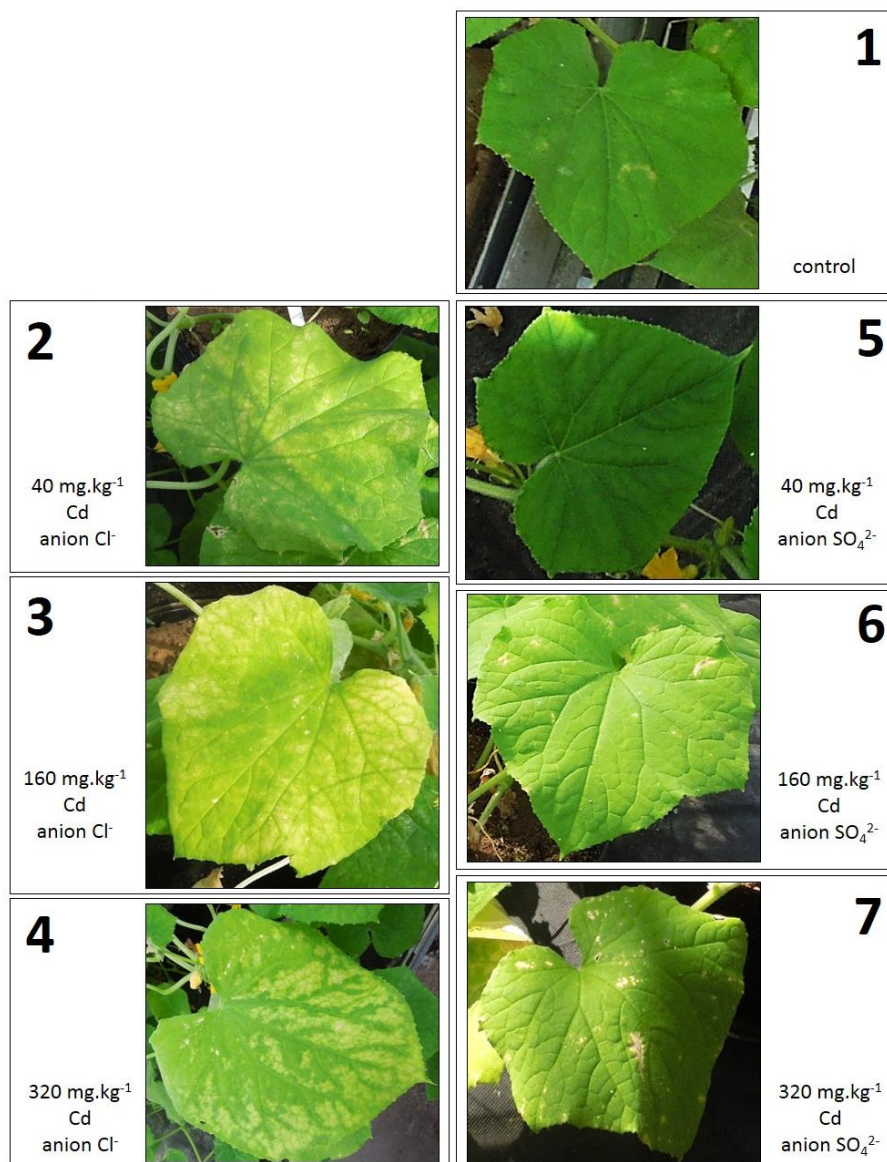


Obr. 13: Vliv přidaného Cd na produkci čerstvé hmotnosti (FW) v gramech z 1 kompletní rostliny okurky seté. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 16$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) významně odlišné.

7.1.2 Viditelné symptomy toxicity

Prokazatelné symptomy toxicity byly pozorovány u všech variant s přidavkem Cd. Ty se projeví nejčastěji v podobě listových chloróz, popřípadě žloutnutím listů. Zmíněné projevy

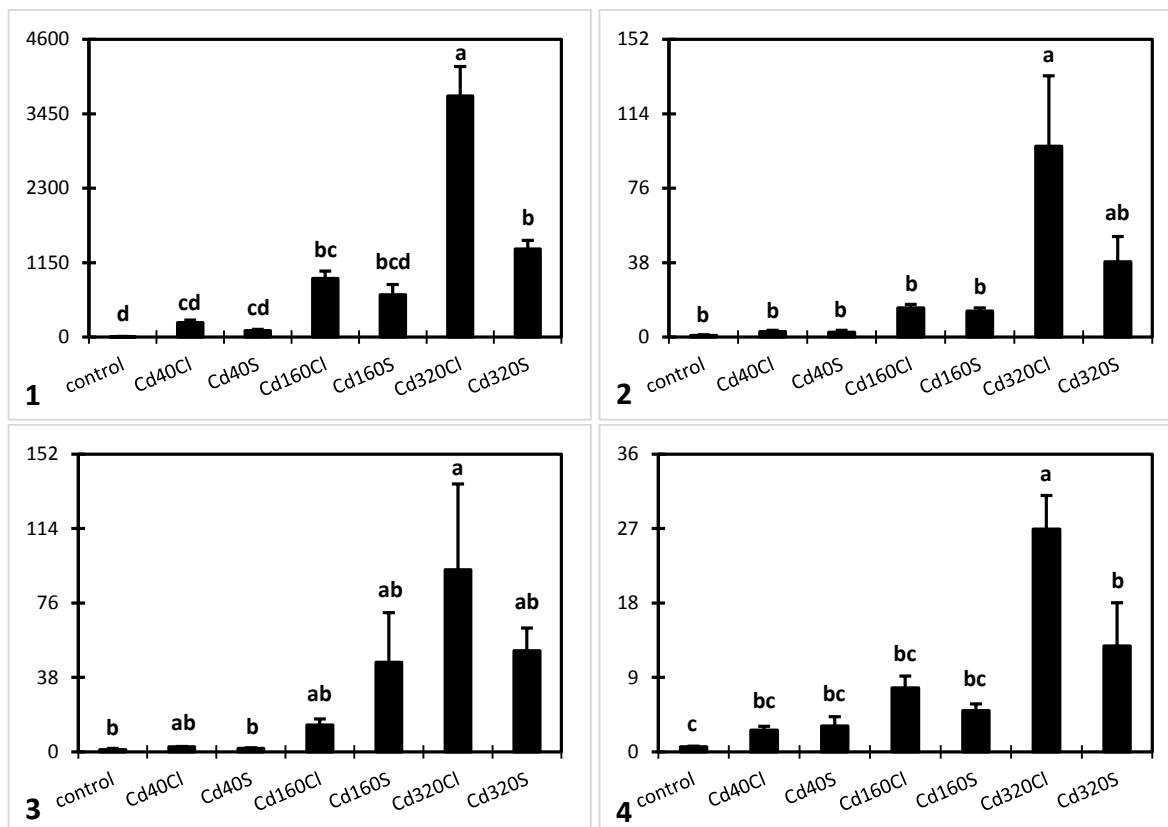
negativního působení Cd byly mnohem více patrné u variant s doprovodným aniontem Cl^- , především v kontrastu s variantami s doprovodným aniontem SO_4^{2-} . Reprezentativní snímky listů pro všechny realizované varianty s viditelnými rozdíly mezi použitými doprovodnými anionty jsou zobrazeny v obr. 14. Nejmarkantnějšího a nejvážnějšího poškození dosáhla varianta Cd320Cl. Listové chlorózy a ztráta pigmentů, způsobená toxicitou Cd byla obdobně dokumentována u různých rostlinných druhů (Gao et al. 2011), dokonce i u okurky (Yu et al. 2013). Vyšší projevy toxicity u variant s Cl^- , lze vysvětlit např. podle práce autorů López-Chuken et al. (2010), kteří demonstrovali, že právě chloridový aniont (Cl^-) je zodpovědný za zvýšení dostupnosti Cd pro rostliny z půdy.



Obr. 14: Vliv rozdílných doprovodných aniontů na viditelné projevy toxicity Cd u reprezentativních zástupců listů z jednotlivých variant experimentu. Snímky byly pořízeny 23 dní po umělé kontaminaci rostlin Cd.

7.1.3 Obsah kadmia v jednotlivých částech rostliny

Nejvíce přijatého Cd bylo akumulováno u všech variant v kořenech. To ostatně shrnuje i obr. 15. Konkrétně se v podzemních částech rostlin nacházelo více než 90 % z celkového obsahu kovu. Zvyšující se koncentrace Cd v médiu měla rovněž za následek zvyšující se koncentraci kovu ve všech částech rostliny. Podobné výsledky ohledně depozice v kořenech prezentují např. Lin et al. (2012). Autoři pozorovali rovněž vliv množství obsahu kovu v půdě na koncentraci kovu v pletivech rostlin. Na druhou stranu, zvýšená koncentrace Cd může mít za následek i sníženou možnost absorpčního potenciálu kořenů, čímž naopak zvyšuje persistenci tohoto prvku na povrchu kořene (Jia et al. 2008). V našem pokusu se aniont Cl^- promítl do mnohem vyšší koncentrace Cd v kořenech, především oproti variantám s aniontem SO_4^{2-} . Tento efekt byl pozorovatelný u všech variant, které obsahovaly uměle přidané Cd, ovšem u těch nejvyšších koncentrací byl tento rozdíl daleko více patrný a markantní. Makovnikova et al. (2006) spatřují možný důvod ve faktu, že právě aniont Cl^- má pravděpodobně tendenci přesunout Cd z vázaných míst v půdě a tím ho učinit lépe dostupným pro příjem rostlinami. Podle Lin et al. (2012) je pořadí v distribuci Cd v rostlinách okurky následující: kořen > list > stonek. Toto pravidlo však bylo v našem experimentu potvrzeno jen u variant s vyššími dávkami Cd a doprovodným aniontem SO_4^{2-} (obr. 13). Speciálně varianty Cd160S a Cd320S obsahovaly v listech v průměru o 4 % více Cd než ostatní srovnatelné varianty. Ostatní varianty, včetně té kontrolní, měly přerozdělení Cd ve svých částech rozdílné, a sice: kořen > stonek > list > plod. Nejméně Cd bylo obsaženo v plodech, konkrétně maximálně okolo 1 % z celkového obsahu HM v rostlině. Obě varianty s vyššími dávkami přidaného Cd byly však i v tomto ohledu signifikantně odlišné od ostatních variant. Nejvyšší obsah Cd byl nalezen ve variantě Cd320Cl, konkrétně 26.93 mg.kg^{-1} , což je v průměru o 110% více, ve srovnání s obdobnou variantou s odlišným aniontem (Cd320S).

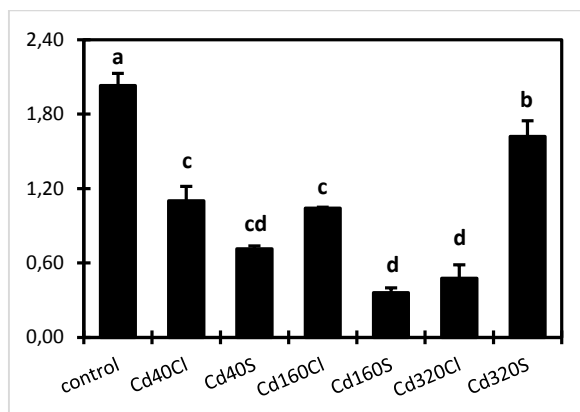


Obr. 15: Obsah kadmia (mg.kg^{-1}) v rostlinách okurky seté, pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a 2 rozdílnými doprovodnými anionty (Cl^- a SO_4^{2-}). 1-kořeny, 2-stonky, 3-listy, 4-plody. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 4$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

7.1.4 Obsah kyseliny salicylové v závislosti na kontaminaci kadmíem

Obsah SA (obr. 16) byl redukován u všech variant s přidavkem Cd. Toto zjištění je poměrně v kontrastu s autory Pál et al. (2006), kteří při svém experimentu pozorovali naopak zvýšení endogenního obsahu SA po vystavení rostlin působení Cd. Nicméně, Kovács et al. (2014), podobně jako my, popsali indukovanou syntézu SA po expozici Cd u rostlin pšenice (*Triticum* sp.), nicméně autoři nenalezli žádné přímé spojení mezi počáteční úrovní SA a tolerancí vůči Cd. Li et al. (2013) již pozorovali zvýšenou toleranci k oxidačnímu poškození způsobeného Cd, a to zejména vzhledem ke zvýšenému počtu antioxidantních enzymů právě díky nové syntéze SA. V našem experimentu, varianty Cd40S a Cd160S obsahovaly mnohem menší množství SA, v porovnání se stejnými variantami s anionty Cl⁻. Odlišné chování nastalo u varianty Cd320S, která nejenže obsahovala mnohem více SA než obdobná varianta Cd320Cl, ale zároveň měla výrazně vyšší obsah SA i než všechny ostatní varianty s přidavkem Cd. A to vše navzdory skutečnosti, že SA byla v průběhu stresových reakcí popsána jako signální molekula, která je zapojena do obranných reakcí. I proto je, díky našim a dalším protichůdným výsledkům (Li et al. 2013), velmi těžké nějak přesněji určit samotnou roli SA v obranné reakci na HM. Skutečná podstata

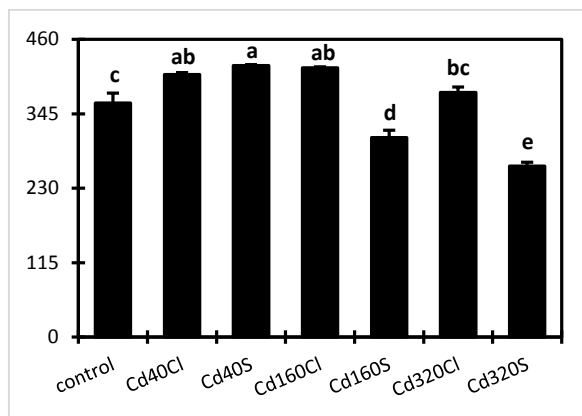
obranného mechanismu SA při různých stresových působeních v oblasti životního prostředí je tak stále nejasná a vyžaduje další výzkumné studie.



Obr. 16: Účinek přidaného kadmia na obsah kyseliny salicylové ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) v listech okurky seté. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 4$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) významně odlišné.

7.1.5 Celkový obsah fenolických látek v závislosti na kontaminaci kadmíem

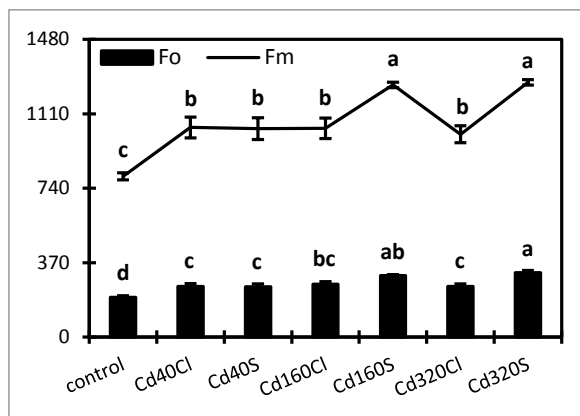
Zvýšený obsah Cd v listech u variant s aniontem SO_4^{2-} , ve srovnání se stonkem, vedl u těchto variant k významnému snížení obsahu PhC (obr. 17). Ostatní varianty s přidavkem Cd vykazovaly naopak vyšší obsah PhC ve srovnání s kontrolní variantou. Sivaci and Elmas (2012) ukázali, že rostliny mohou akumulovat PhC v rámci různých stresových podmínek. Podle Gill and Tuteja (2010), jsou PhC součástí sekundárních metabolitů, které jsou spolu s ostatními, součástí složitých obranných reakcí rostlin. Rovněž byla popsána jejich antioxidační aktivita a kapacita vázat na sebe kov (Llugany et al. 2013). I to může být důvodem, proč došlo v našem experimentu ke snížení obsahu PhC. U těchto variant jednoduše nebylo detekováno tolik volných PhC, protože díky velkému nadbytku Cd, je i většina PhC na tento kov navázána. V tomto případě se tak může jednat o jeden z obranných systémů, které rostliny aktivně používají proti stresu HM. Tyto látky tak mohou hrát nejen roli antioxidantů, ale lze je jistě využít i jako biomarkery expozice kovů. S obdobnou formulací souhlasí i Michalak (2006) a Białońska et al. (2006). Na druhou stranu, ještě vyšší obsah Cd v listech varianty Cd320Cl ke stejnému masivnímu snížení obsahu PhC nevedl. I z tohoto faktu, včetně našich výsledků a dalších zjištění uvedených výše, můžeme předpokládat, že doprovodný aniont a forma Cd, ve které se kov vyskytuje, mohou mít poměrně zásadní vliv na zapojení odlišných obranných antioxidačních mechanismů.



Obr. 17: Účinek přidaného kadmia na obsah fenolických látek (mg.100 g⁻¹) v listech okurky seté. Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 4). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu (P < 0.05) signifikantně odlišné.

7.1.6 Vliv kadmia na intenzitu fluorescence chlorofylu

Podobný účinek, jako u PhC, na zvýšení účasti obranných mechanismů je zřejmý také z hodnot fluorescence chlorofylu (obr. 18). Všechny varianty s přidavkem Cd vykazovaly vyšší hodnoty minimální a maximální fluorescence oproti kontrolní variantě. U nízkých koncentrací Cd (5 - 15 μmol. L⁻¹) byl již podobný účinek na zvýšení parametrů fluorescence chlorofylu pozorován, např. v publikaci Li et al. (2015). Podle Sofo et al. (2010), se ve fotosystému, díky toxickému působení Cd, tvoří velmi vysoké množství energie. Této nastalé situaci se rostliny obvykle snaží zabránit právě tím, že zvýší intenzitu maximální fluorescence chlorofylu. V našem pokusu varianty Cd160S a Cd320S dosáhly v listech v průměru o 23 % vyšší intenzity F₀ a F_m oproti variantám se stejnou dávkou Cd, ale rozdílným aniontem (Cl⁻). Vyšší obsah Cd v listech u těchto variant, snížení obsahu PhC a naopak vyšší intenzita fluorescence chlorofylu, může znamenat zapojení různých obranných mechanismů rostlin, a to především v závislosti na formě Cd.



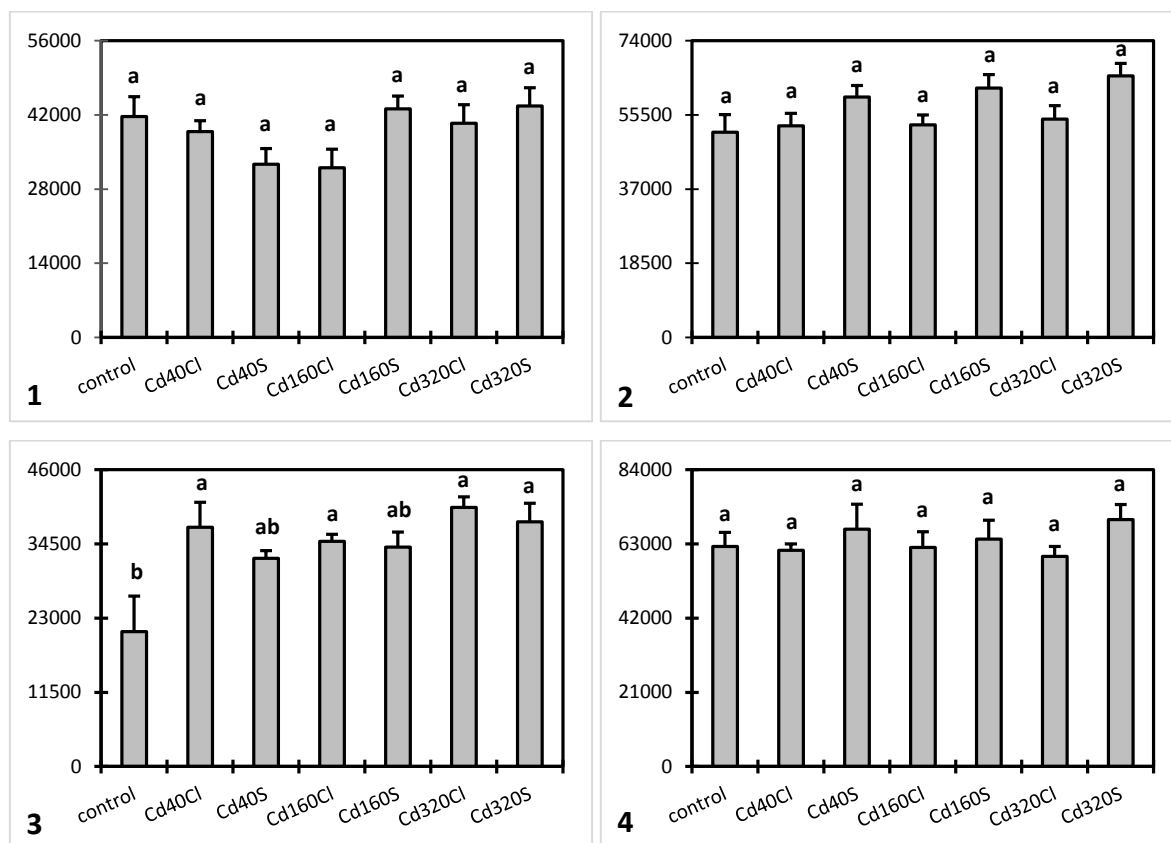
Obr. 18: Účinek přidaného kadmia na bazální (F_o) a maximální fluorescence chlorofylu (F_m) v listech okurky seté. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 20$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) významně odlišné.

7.1.7 Vliv kadmia na obsah draslíku v jednotlivých částech rostlin

Nejvíce K bylo obsaženo u všech variant v plodech (obr. 19). Nicméně, celkově nebyly pozorovány žádné velké rozdíly mezi kontrolní a experimentálními variantami. Ve stoncích byl zaznamenán nevýznamně vyšší obsah K u variant s aniontem SO_4^{2-} , než u stejných variant s aniontem Cl. Varianty s chloridem se pak nelišily od kontrolní varianty.

Významné rozdíly v obsahu K vykazovaly všechny varianty s přidaným Cd, a to právě v listech, v porovnání s kontrolou. Všechny tyto varianty měly v tomto směru vyšší hodnoty. Obdobný nárůst obsahu K, vlivem stresového působení Cd našlo již několik autorů, například u rostlinek *in vitro* (Gonçalves et al. 2009b), v nadzemních částech jarního ječmene (*Hordeum* sp.) (Wyszkowski and Wyszkowska 2006) nebo u rostlin mrkve (*Daucus* sp.) (Auda and Ali 2010). V kontrastu s tím, je dobře zdokumentován i výrazný pokles koncentrace K vlivem stresu Cd u různých druhů rostlin – fazole (*Phaseolus* sp.) a hrách (*Pisum* sp.) (Obata and Umebayashi 1997), pšenice (*Triticum* sp.) (Veselov et al. 2003), oves (*Avena* sp.) (Ciečko et al. 2005), kukuřice (*Zea* sp.) (Kurtyka et al. 2008), fazole mungo (*Vigna radiata*) (Wahid et al. 2008) či brambory (*Solanum tuberosum*) (Gonçalves et al. 2009a). Obsah K u rostlin pěstovaných na půdách, kontaminovaných Cd závisí na podle Wyszkowski and Wyszkowska (2009) na půdním druhu (množství a kvalitě jílových minerálů), celkovém obsahu a poměru mezi jednotlivými makroživinami, a také na druhu rostlin a orgánu rostliny. Rozmanitý vliv Cd na různé rostliny, může v tomto případě pocházet z toho, že může docházet k poškození buněčné plasmatické membrány v kořenech citlivých rostlin, což může mít za následek sníženou absorpci nejen vody ale také prvků (Wyszkowski and Wyszkowska 2009). Zde může být dobré spojení právě s Cd. Obecně platí, že nadzemní části, převážně pak listy jsou více náchylné k toxicitě Cd. Nápadné listové chlorózy pak naznačují, že metabolismus Cd probíhá hlavně v těchto částech. Přesto nesmíme zapomenout na skutečnost, že různé rostliny mohou mít vyvinuté různé mechanismy tolerance a jejich reakce na HM se tak může značně lišit (Benabid and Ghorab 2013).

Zvýšený obsah K v kontaminovaných listech může znamenat zapojení tohoto prvku do obranných mechanismů proti Cd stresu. Zapojení tohoto prvku bylo pozorováno speciálně při výzkumu intenzity fotosyntézy, růstu rostlin a jejich výnosu (Umar and Moinuddin 2002). Příjem Cd může být rovněž také zmírněn vhodnou koncentrací K v živném médiu (Zhao et al. 2004). Na druhou stranu, nízké koncentrace Cd mohou pozitivně ovlivnit nárůst příjmu některých kationtů rostlinami. Gonçalves et al. (2009b) vidí hlavní důvod v hyperpolarizaci plazmatických membránách, což má za následek zvýšení transmembránového potenciálu.



Obr. 19: Obsah draslíku (mg.kg^{-1}) v rostlinách okurky seté, pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a 2 rozdílnými doprovodnými anionty (Cl^- nebo SO_4^{2-}). 1-kořeny, 2-stonky, 3-listy, 4-plody. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 4$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

7.1.8 Vliv doprovodných aniontů na translokaci kadmia

Rozdílný vliv aniontů Cl^- a SO_4^{2-} na translokaci Cd může být způsoben jejich rozdílnou chemickou strukturou a vytvořeným efektem uvnitř rostlin. Samotná přítomnost Cl^- iontů v rostlinných pletivech je relativně důležitá. Tento prvek nejenže stabilizuje membránový potenciál, ale také reguluje aktivitu mnoha důležitých enzymů (White and Broadley 2001). Ve vztahu k HM je zajímavý především efekt vazby Cl na Cd. Tato kombinace výrazně zvyšuje průchod kovu skrz rostlinné membrány, a to

především v důsledku zvýšené vodivosti Cd (Ozkutlu et al. 2007). Podobně bylo popsáno i spojení metabolických drah rostlin s prvkem S, dokonce i v souvislosti s obrannými mechanismy proti toxicitě Cd (Küpper and Kochian 2010). PC hrají zásadní úlohu v obranných mechanismech proti HM. Především thiolové skupiny jsou pak místem navázání Cd. Tento fakt byl pozorován především u mladých listů (Küpper et al. 2004), kořenů a semen (Vogel-Mikuš et al. 2010). Rozdíl mezi těmito dvěma solemi Cd je také evidentní z detailní translokace (obr. 15). Koren et al. (2013) pozorovali rozdíl u akumulace Cd v mezofylových buňkách. To se ukládalo především do vakuol (v případě CdCl_2), popř. do apoplastu (v případě CdSO_4). Zatímco v symplastu měla zvyšující se koncentrace Cd za následek stimulační efekt na počet O-ligandů, v apoplastu se vyskytovaly především ligandy na bázi S. Autoři také ukázali, že v žilkách rostlin kontaminovaných CdSO_4 a CdCl_2 nejsou žádné výrazné rozdíly v chemickém stavu Cd, takže mechanismy absorpce, transportu a přesunu na úrovni kořene, pravděpodobně upravují hladinu translokace Cd do výhonků. V naší studii jsme pozorovali podobné rozdíly chování rostlin v závislosti na použité soli Cd, a to zejména v obsahu PhC a fluorescence chlorofylu. Z těchto výsledků můžeme předpokládat, že i doprovodný aniont a forma, ve které se Cd vyskytuje, mohou mít dopad na zapojení různých antioxidačních systémů. Zjištění, že chemická forma přidané Cd do živného roztoku ovlivňuje úroveň akumulace Cd je v tomto směru zásadní a novou informací, na základě které jsou nutné další studie v lokalizaci a chemickém stavu Cd.

7.2 Experiment se zelencem chocholatým a kalisií vonnou

7.2.1 Tolerance obou rostlin vůči růstu v kontaminované zemině

V našem experimentu se zelencem chocholatým (*Ch. comosum*) a kalisií vonnou (*C. fragrans*) nebyl pozorován, shodně pro oba rostlinné druhy, žádný z viditelných příznaků, typických pro toxicitu Cd (obr. 20). Řadíme sem např. listové chlorózy a snížení produkce biomasy, popsané již dříve u různých druhů rostlin (Ekmekçi et al. 2008; Chao et al. 2010; Malčovská et al. 2014; Zhang et al. 2014; Tuma and Svojanovska 2015; Chen et al. 2015; Hammami et al. 2016). Obecně platí, že nadzemní části a převážně pak listy jsou více náchylné k toxicitě Cd. Nápadné listové chlorózy také mohou naznačovat, že metabolismus Cd probíhá hlavně v těchto částech. Z absence těchto zmíněných příznaků, můžeme konstatovat, že oba druhy rostlin mají dobrou odolnost proti toxickému účinku Cd, a to i na úrovni svých nadzemních částí. Podobný závěr rovněž uvedli Wang et al. (2011), kteří ve svém pokusu ocenili především vysokou toleranci vůči Cd a zároveň vysokou okrasnou hodnotu druhu *Ch. comosum*. Ve srovnání s tímto experimentem jsme za účelem zjištění tolerance výše zmíněných druhů použili ještě vyšší koncentrace Cd (jmenovitě 320 mg.kg⁻¹ namísto 200 mg.kg⁻¹). Hledání nových rostlinných druhů s vysokou schopností odolností proti toxicitě HM je základní nezbytností pro úspěšné použití fytoremediace. Tyto druhy musí zvládat nejen vychytávání velkého množství kovu do svých pletiv, ale zároveň nesmí být toxicitou HM v podobě kontaminovaných půd retardován jejich růst. V tomto ohledu působí oba druhy, *Ch. comosum* a *C. fragrans*, velmi slibně, a to i při tak vysokých koncentracích Cd v půdě, které jsme v našem experimentu použili.

A: *Chlorophytum comosum*



B: *Callisia fragrans*



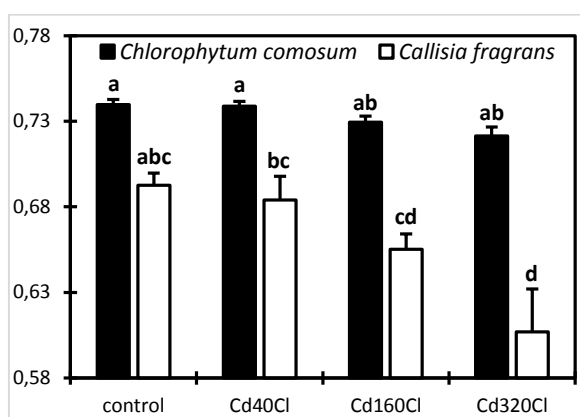
Obr. 20: Porovnání všech variant experimentu. Ty postrádají jakékoliv viditelné příznaky toxického působení Cd, a to shodně u obou druhů - A: *Chlorophytum comosum*; B: *Callisia fragrans*. Snímky byly pořízeny 26 dní po umělé kontaminaci půdy Cd.

7.2.2 Vliv kadmia na intenzitu fluorescence chlorofylu

V rostlinách se vyskytuje mnoho citlivých fyziologických procesů, které jsou velmi postižitelné toxicitou HM, zejména se pak jedná především o procesy fotosyntézy (Ekmekçi et al. 2008; Malčovská et al. 2014; Tuma and Svojanovska 2015). Navzdory faktu, že experiment neodhalil žádné viditelné známky toxicity Cd, mělo vystavení rostlin *Ch. comosum* a *C. fragrans*, při různých úrovních Cd za následek změny parametrů fluorescence chlorofylu, zejména pak poměru F_v/F_m , jak je ostatně patrné z obr. 21. Tento poměr popisuje možný výtěžek fotochemické reakce, a je často používán jako indikátor stresu (Mallick and Mohn 2003). Naše hodnoty F_v/F_m v kontrolních variantách, průměrně kolísaly okolo 0.74 (*Ch. comosum*) a 0.69 (*C. fragrans*). Tyto hodnoty jsou o něco málo nižší, než hodnoty, běžně známé pro zdravé rostliny, které se pohybují kolem 0.80 (Zhori et al. 2015). Ovšem i přes to, byla účinnost fluorescence chlorofylu prokazatelně ovlivněna působením Cd, protože vlivem toxicity kovu došlo k významnému snížení těchto hodnot.

Samotné poměry F_v/F_m pro *Ch. comosum* a *C. fragrans* klesly o 2.6 %, respektive o 12.4 %, při nejvyšší koncentraci Cd v porovnání s variantou kontrolní. Tyto naše výsledky ukazují, že nejvyšší toxická koncentrace Cd silněji postihla fotochemickou účinnost v *C. fragrans*, než je tomu u *Ch. comosum*. Bylo publikováno, že k poklesu hodnot F_v/F_m může docházet, pokud je reoxidace Q_A limitována snížením či částečnou blokadou transportu elektronů z PSII do PSI (Mallick and Mohn 2003;

Ekmeççi et al. 2008; Zhang et al. 2014). V našem experimentu jsme ukázali, že toxicita Cd pravděpodobně způsobila vážnější oxidační poškození, nicméně i přes to nedošlo k fatálnímu omezení činnosti PSII u obou rostlin, protože viditelné poškození či dokonce smrt rostlin nebyla pozorována ani při nejtoxičtější variantě. Tak jak jsme ukázali, Cd může inhibovat aktivitu a potenciál fotochemické účinnosti systému PSII, který hraje důležitou roli v ovlivnění vlastnosti růstu rostlin, ale specifický účinek pak úzce závisí na druhu rostliny.

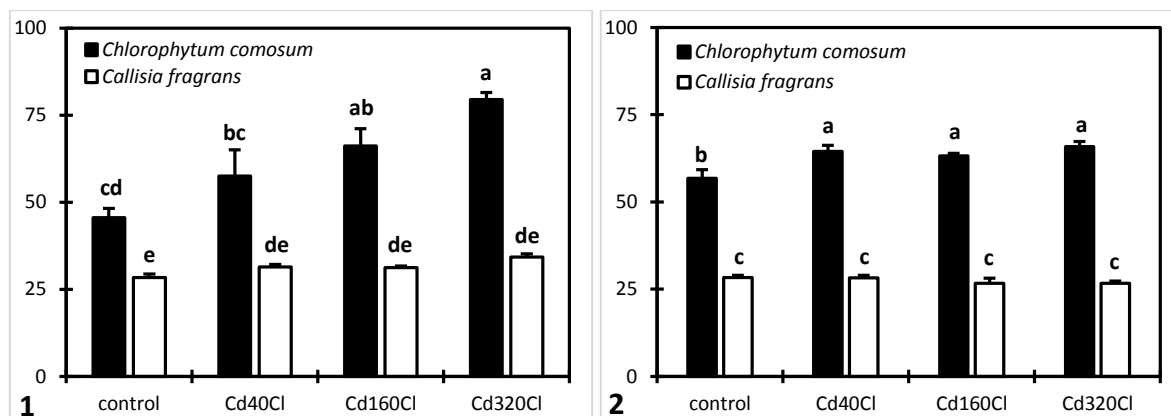


Obr. 21: Vliv uměle přidaného Cd na fotochemickou účinnost fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin *Chlorophytum comosum* a *Callisia fragrans*. Rostliny byly pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a doprovodným aniontem Cl⁻. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 20$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

7.2.3 Vliv kadmia na intenzitu antioxidační aktivity

Je již poměrně dobře známo, že v důsledku toxicity Cd, dochází v rostlinách ke tvorbě ROS, což následně vede k oxidačnímu stresu (Malčovská et al. 2014). Tímto procesem je aktivována kaskáda antioxidační obraných reakcí, která slouží jako adaptační odpověď (Zhang et al. 2014). Velmi často a běžně používanou metodou pro stanovení AOC je test AOC ekvivalentu Troloxu (TEAC). Tento test ukázal schopnost různého rostlinného materiálu k vylučování ABTS^{•+} radikálů (van den Berg et al. 1999). V naší studii jsme měřili AOC metanolových extraktů z *Ch. comosum* a *C. fragrans*. Ty byly měřeny s použitím TEAC testu a výsledky byly vypočteny jako aktivita ABTS^{•+} zachycovačů radikálů (%). Přehled výsledků je uveden na obr. 22. Naše výsledky prokázaly vylepšení těchto hodnot v kořenech a výhoncích pokusných rostlin. Zvláště pak reakce v kořenech, prvního orgánu, který má v půdě kontakt s Cd, je silně posílena intenzivnější koncentrací tohoto kovu. V našem experimentu došlo u vysoké koncentrace Cd ($320 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), k mnohem výraznějšímu zvýšení aktivity AOC v kořenech u *Ch. comosum* než v *C. fragrans* vzhledem ke kontrolám. AOC se významně zvyšovala s rostoucí koncentrací Cd. AOC pro *Ch. comosum* a *C. fragrans* vzrostla o 42.6 %, respektive o 9.9 %, ve srovnání

s kontrolními hodnotami. Ve výhoncích pak také lépe reagoval *Ch. comosum* než *C. fragrans*. V případě *C. fragrans* nebyl u výhonků sledován žádný zjevný nárůstu AOC v závislosti na Cd. Ve výhoncích *Ch. comosum* vedla aplikace Cd k mírnému zvýšení AOC, nicméně, mezi jednotlivými koncentracemi Cd již nebyly podstatné rozdíly. AOC pro *Ch. comosum* vzrostla o 13.8 %, ve srovnání s kontrolami. Podobné zvýšení antioxidační úrovně, nebo vysoká AOC může zabránit oxidačnímu poškození a zlepšit toleranci rostlin vůči oxidačnímu stresu (Ekmekçi et al. 2008). V našem případě se hodnoty AOC lišily u různých druhů a různých pletiv. *Ch. comosum* má lepší adaptaci antioxidační obrany i pro vysoce toxické úrovně Cd a tato aktivita je výrazně posílena v kořenech v porovnání s výhonky. Příznivé hodnoty AOC získané z testu TEAC v našem případě znamenají, že antioxidanty obsažené v této rostlině jsou schopny vychytávat volné radikály (ABTS⁺). Nicméně je zřejmé, že změny v antioxidační mašinérii mohou záviset na rostlinném druhu, věku, a délce trvání působení stresoru či na celkových experimentálních podmínkách (Ekmekçi et al. 2008). Naše výsledky ukazují, že tolerance rostlin vůči Cd velmi dobře koreluje s fotosyntetickou účinností a činností antioxidačního systému. Právě tyto body jsou důležité k udržení vysoké úrovně antioxidačního obranného systému a toleranci fotosyntetických systémů rostliny, což jim umožňuje přežít stres Cd. Z námi získaných hodnot AOC a F_v/F_m , je patrné, že *Ch. comosum* je mnohem více rezistentní na působení Cd než *C. fragrans*. Tyto rozdíly by mohly vyplývat z různých antioxidačních mechanismů a antioxidantů, které obsahují, což je jistě směr, který stojí za to být dále zkoumán.

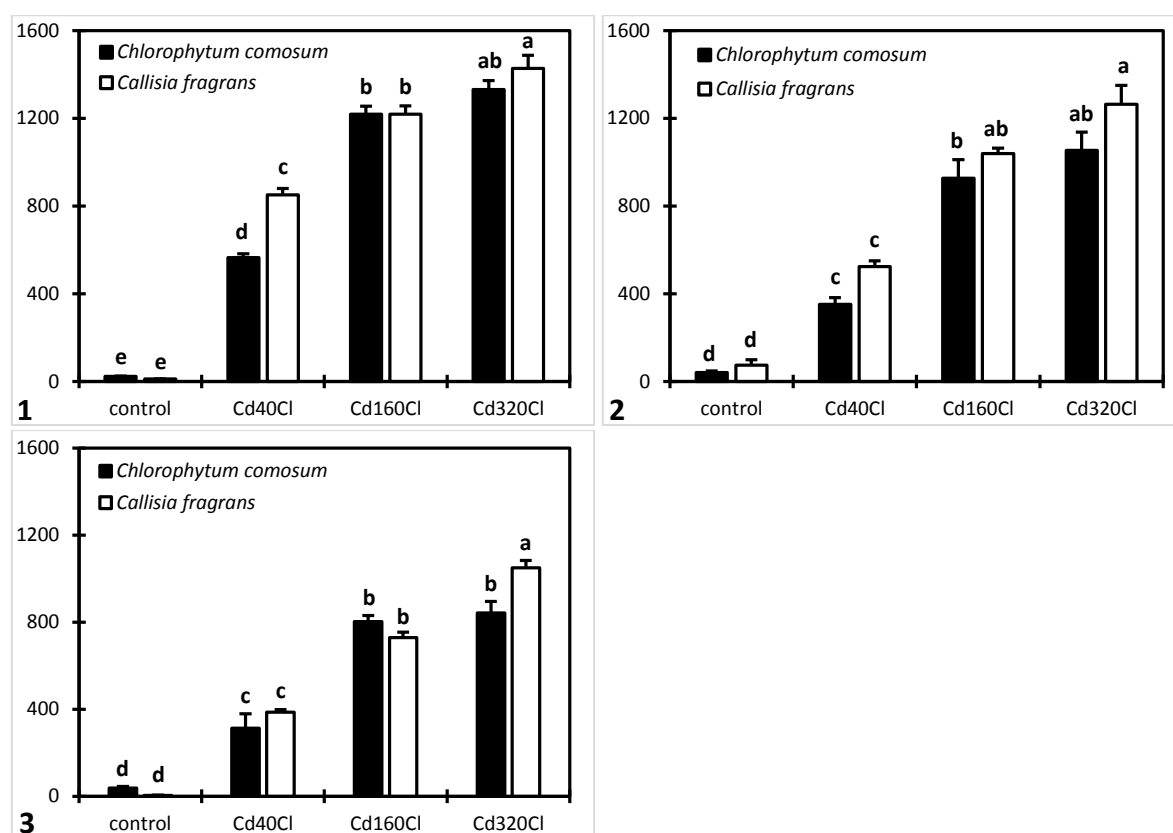


Obr. 22: Vliv uměle přidaného Cd na hodnoty antioxidační kapacity (ABTS⁺ radical scavenging activity) v % u rostlin *Chlorophytum comosum* a *Callisia fragrans*. Rostliny byly pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a doprovodným aniontem Cl⁻. 1-kořeny, 2-výhonky. Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 4). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu (P < 0.05) signifikantně odlišné.

7.2.4 Translokace kadmia a jeho obsah v jednotlivých částech rostlin

Vhodný výběr rostlinného druhu je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících efektivní fytoextrakci. Její úspěch tkví nejen ve vysoké toleranci vůči kovům, což bylo uvedeno a diskutováno

výše, ale zejména na příjmu a translokaci velkého množství kovů z kontaminovaného půdního prostředí do nadzemních pletiv. V našem nádobovém experimentu měla zvyšující se koncentrace Cd v půdě, výrazný pozitivní vliv na akumulaci Cd v pletivech *Ch. comosum* i *C. fragrans*, což je přehledně znázorněno na obr. 23. Tato zvýšená akumulace Cd byla zřejmá a patrná pro oba druhy a to ve všech jejich částech. Distribuce Cd v různých orgánech obou rostlin měla následující pořadí: kořeny > výhonky > šlahouny. I přes vysoké koncentrace Cd v nadzemních částech, zůstávalo stále nejvíce kovu v kořenech. Tento fakt by mohl být potenciální překážkou v použití obou druhů pro případné fytoremediace, jelikož sklizeň podzemních částí může být za určitých podmínek poměrně obtížná. Oba druhy se nicméně v tomto ohledu chovají velmi podobně. Mírný rozdíl se projevuje pouze při nejvyšší koncentraci Cd, kde *C. fragrans* dosahuje ještě lepší akumuláčnické schopnosti než *Ch. comosum*.



Obr. 23: Obsah kadmia (mg.kg⁻¹) v *Chlorophytum comosum* a *Callisia fragrans*. Rostliny byly pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a doprovodným aniontem Cl⁻. 1-kořeny, 2-výhonky, 3-šlahouny. Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 4). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu (P < 0.05) signifikantně odlišné.

Je známo, že pro správně fungující remediaci kovů, je důležité pochopit detailní akumulaci a distribuci HM v rostlinách (Wang et al. 2011b). Důležité indexy týkající se distribuce Cd v našem experimentu jsou uvedeny v tab. 3 (*Ch. comosum*) a v tab. 4 (*C. fragrans*). Z těchto tabulek můžeme vidět, že dochází k nárůstu koncentrací Cd v kořenech a nadzemních částech se zvyšujícím se nárůstem

Cd v půdě. Zároveň jsou, v případě *C. fragrans*, všechny varianty v koncentračním gradientu Cd od sebe významně odlišné. Avšak v případě *Ch. comosum*, neexistuje žádný statistický rozdíl mezi koncentrací Cd 160 a 320 mg.kg⁻¹. Vysvětlením by mohla být již těsná blízkost akumulační limitu pro Cd u této rostliny. Obsah Cd u *Ch. comosum* při nejvyšší dávce kovu (320 mg.kg⁻¹ Cd) dosáhl v kořenech, respektive nadzemních částech hodnot 1331 a 1054 mg.kg⁻¹, a v případě *C. fragrans* to bylo 1427 a 1263 mg.kg⁻¹, což jsou hodnoty poměrně blízké úrovni hyperakumulátorů. Transport a distribuci HM v rostlinách odráží translokační faktor (TF) a schopnost akumulace rostliny odráží tzv. bioakumulační koeficient (BC) (Wang et al. 2011b; Hammami et al. 2016). Tito autoři zjistili zvýšení BC u nižších koncentrací Cd v půdě (až 50 mg.kg⁻¹), a snížení BC při vyšších koncentracích Cd. V naší tabulce můžeme vidět pouze pokles BC u *Ch. comosum*, kde byly hodnoty nižší než u kontrolní skupiny, protože naše koncentrace Cd byla ještě mnohem vyšší. V *C. fragrans* byla situace velmi podobná. Pouze při nejnižší koncentraci Cd v kořenech a šlahounech došlo k nárůstu hodnot oproti kontrolní skupině. Tento nárůst v BC se odrazil také i v množství nahromaděného Cd, které dosáhlo v *C. fragrans* při koncentraci 40 mg.kg⁻¹ o 33.7 % vyšších hodnot než u *Ch. comosum*, což byl největší rozdíl mezi rostlinami napříč všemi částmi rostlin. Translokační faktory u různých koncentrací Cd byly vždy v rozmezí 0.62 – 0.79 v případě *Ch. comosum*, respektive 0.62 – 0.89 v případě *C. fragrans*. Tyto hodnoty vykazovaly, v závislosti na množství Cd v půdě, stále rostoucí trend. To ukazuje, že obě rostliny mají velký akumulační potenciál, a že jsou schopné transportovat velké množství absorbovaného Cd do svých nadzemních částí. Lze tedy předpokládat přítomnost poměrně dobrých transportních mechanismů, což podobně popisuje i Wang et al. (2011) při nízkých koncentracích Cd u *Ch. comosum*. Autoři předpokládají, že množství Cd transportovaného do nadzemních částí klesá v případě vyššího stresu Cd (tedy jeho vyšší koncentrace), s cílem zabezpečit normální růst rostliny. Na základě našich výsledků, všechny tyto zmíněné charakteristiky silně naznačují, že *Ch. comosum* a *C. fragrans* mohou být velmi ceněnými druhy pro další výzkumy v oblasti případných fytořemediací. Ovšem k tomuto potvrzení jsou jistě nutné další, převážně pak polní, experimenty přímo na Cd-kontaminovaných půdách.

Tab. 3: Koncentrace a distribuce Cd v *Chlorophytum comosum*

Varianta	Koncentrace v kořenech (mg.kg ⁻¹)		Koncentrace ve výhoncích (mg.kg ⁻¹)		Koncentrace ve šlahounech (mg.kg ⁻¹)		BC ²			TF ³
							kořeny	výhonky	šlahouny	
Kontrola	23.52 ± 1.18	c ¹	40.28 ± 8.27	c	37.84 ± 7.42	c	39.21	67.14	63.07	
Cd40Cl	564.55 ± 18.08	b	351.70 ± 30.97	b	312.44 ± 66.11	b	14.11	8.79	7.81	0.623
Cd160Cl	1218.08 ± 37.15	a	926.59 ± 84.19	a	803.18 ± 27.69	a	7.61	5.79	5.02	0.761
Cd320Cl	1331.71 ± 40.40	a	1054.27 ± 82.06	a	842.71 ± 51.97	a	4.16	3.29	2.63	0.792

Tab. 4: Koncentrace a distribuce Cd v *Callisia fragrans*

Varianta	Koncentrace v kořenech (mg.kg ⁻¹)		Koncentrace ve výhoncích (mg.kg ⁻¹)		Koncentrace ve šlahounech (mg.kg ⁻¹)		BC ²			TF ³
							kořeny	výhonky	šlahouny	
Kontrola	10.76 ± 0.96	d ¹	74.56 ± 24.78	d	4.03 ± 0.81	d	17.93	124.27	6.72	
Cd40Cl	850.67 ± 29.21	c	524.26 ± 25.36	c	385.65 ± 12.74	c	21.27	13.11	9.64	0,616
Cd160Cl	1218.31 ± 38.60	b	1038.87 ± 24.98	b	728.80 ± 25.93	b	7.61	6.49	4.55	0,853
Cd320Cl	1427.49 ± 59.56	a	1263.30 ± 87.07	a	1049.21 ± 34.90	a	4.46	3.95	3.28	0,885

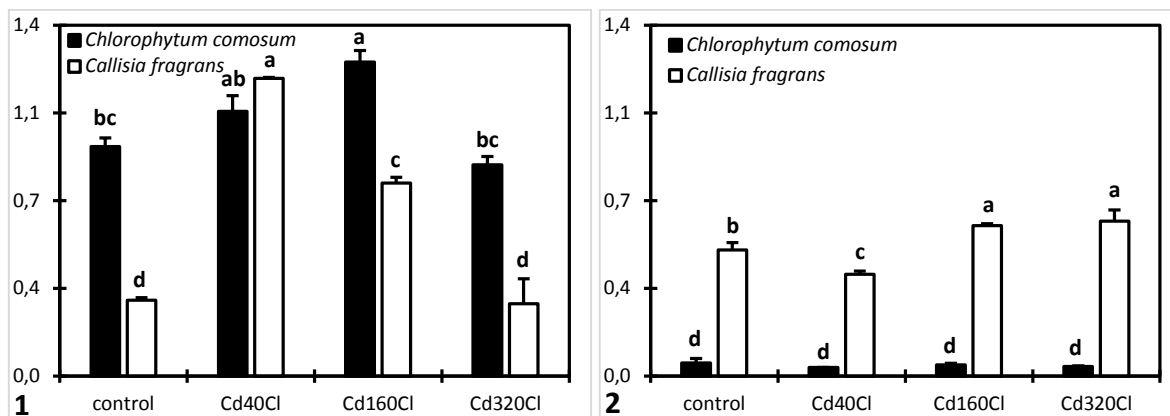
¹ Hodnoty představují průměry ± SE (n = 4). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu (P < 0.05) signifikantně odlišné.

² BC bioakumulační koeficient (koncentrace HM v rostlině / koncentrace HM v půdě)

³ TF translokační faktor (koncentrace HM v nadzemní části / koncentrace HM v kořenech)

7.2.5 Obsah kyseliny salicylové v závislosti na kontaminaci kadmíem

SA může být použita jako transduktor signálu během stresových podmínek, a to zejména pokud je na ochranu rostliny zapojeno mnoho obranných mechanismů či antioxidačních změn (Horváth et al. 2007; Szalai et al. 2013; Dučaiová et al. 2013). V tomto experimentu probíhalo měření zvláště pro kořeny a nadzemní části rostlin a tyto výsledky jsou shrnuty na obr. 24. Z obrázku je patrné, že vyšší hodnoty SA byly nalezeny v kořenech, kde se ostatně nahromadila větší část přijatého Cd. Na druhou stranu, Kovács et al. (2014) naopak našli zvýšené hladiny SA v listech, a tvrdí, že to může být v důsledku tvorby jejích prekurzorů v kořenech a jejich následnou přepravou do listů, kde jsou zapojeny do metabolismu HM. I z tohoto hlediska je jasné, že signální a obranný mechanismus SA, se může lišit na různých úrovních, tedy v listech a kořenech. Zjistili jsme, že přibližně o 67 % více volné SA bylo identifikováno u *Ch. comosum* v porovnání s *C. fragrans* u kontrolních variant. Tím je logicky dán i fakt, že nárůst hodnot po přidání Cd, je mnohem vyšší v *C. fragrans* – oproti kontrole je to o 74.5 % více při nejnižší koncentraci Cd. Nicméně jsme také zaznamenali, že dochází k nárůstu hodnot volné SA v kořenech u obou druhů rostlin při koncentracích 40 a 160 mg.kg⁻¹ Cd, ve srovnání s kontrolou. Naopak nejvyšší koncentrace Cd měla za následek snížení hodnot volné SA, přičemž tyto hodnoty odpovídají množství u kontrolních variant. Důvodem může být navázání této látky na Cd ionty. Rostlina inaktivuje tyto ionty právě tímto způsobem, aby tak ochránila další důležité molekuly před toxickým účinkem. V případě výhonků, pak nebyl nalezen žádný rozdíl u *Ch. comosum* mezi kontrolou a variantami s přidavkem Cd. *C. fragrans* pak vykazuje zvýšení hodnot volné SA při nejvyšších koncentracích Cd. Nicméně, tyto hodnoty jsou podstatně nižší než v případě kořenů. Z toho můžeme vyvodit, že obranná funkce SA je aktivována u těchto druhů rostlin převážně v kořenovém systému, který je prvním orgánem přicházejícím do kontaktu s Cd v půdě. Naše zjištění naznačují, že SA může chránit buňky před Cd-indukovaným oxidačním poškozením. S tímto tvrzením ostatně souhlasí i publikace autorů Szalai et al. (2013). Obdobnou ochranou funkci pozorovali i Dučaiová et al. (2013), především pak ve stimulačním účinku na biosyntézu obranných látek. Inaktivací v kořenech rostlin může rostlina značně ochránit důležité fotosynteticky aktivní nadzemní části, které jsou obecně citlivější na působení HM. Horváth et al. (2007) tvrdí, že může působit přímo jako předem vytvořený antioxidant k vázání ROS a/nebo nepřímo měnit rovnováhu v redoxní aktivaci antioxidační odpovědi. Ačkoli se obě rostliny v našem experimentu chovaly v tomto ohledu podobně, zásady, jak je tato endogenní signální molekula v rostlinách syntetizována a regulována v reakcích na stres, zůstává stále otevřenou otázkou, jak shrnují i Kovács et al. (2014) v případě kulturních plodin. Nicméně, ukázali jsme, že tolerance vůči Cd u našich pokusných rostlin by mohla být vysvětlena změnami v kořenech, a to velkou indukcí syntézy SA a změnami v činnosti AOC.

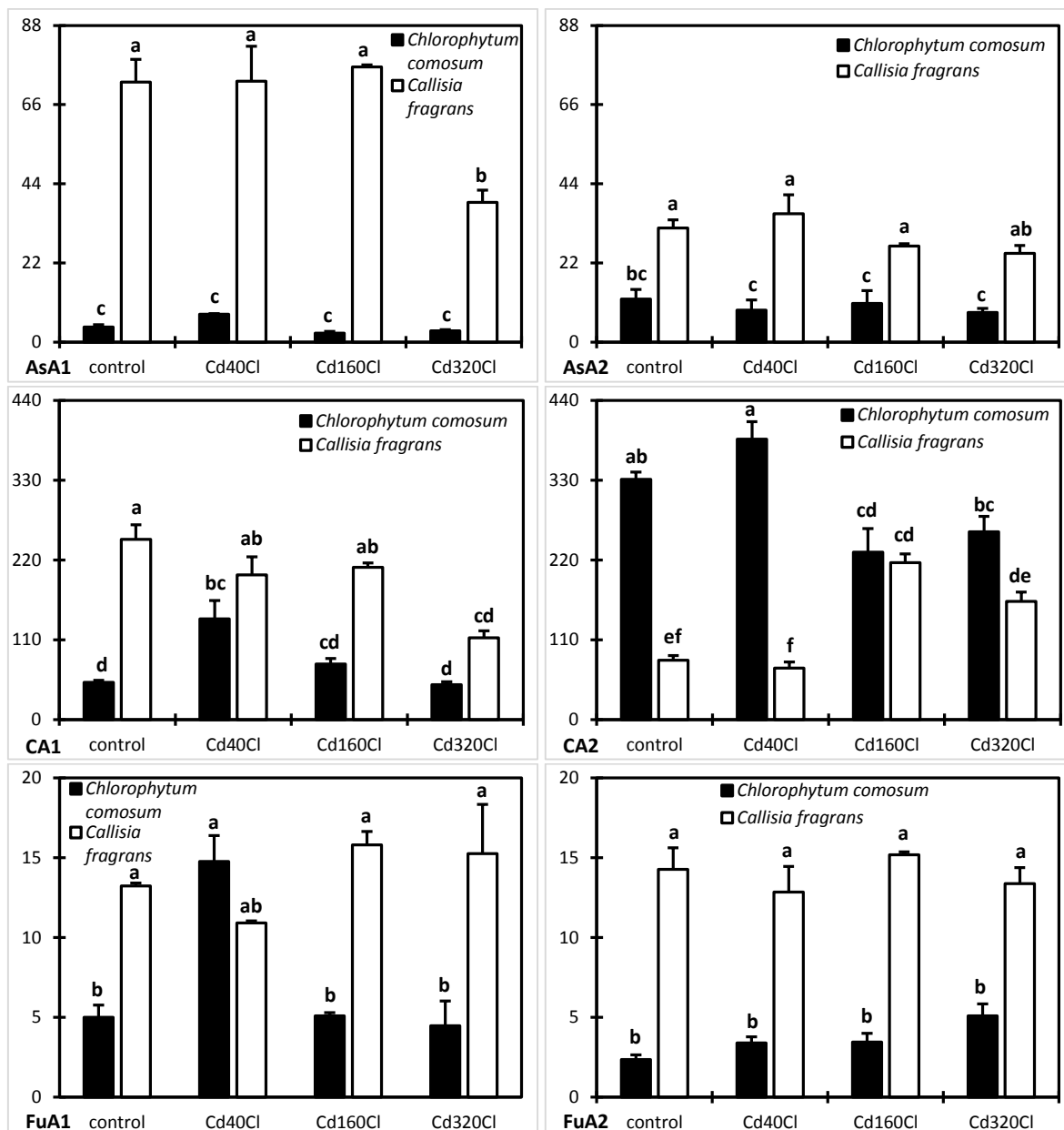


Obr. 24: Vliv uměle přidaného Cd na obsah kyseliny salicylové ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) u rostlin *Chlorophytum comosum* a *Callisia fragrans*. Rostliny byly pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a doprovodným aniontem Cl⁻. 1-kořeny, 2-výhonky. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 4$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) významně odlišné.

7.2.6 Obsah organických kyselin ve vztahu k bioakumulaci kadmia

V našem experimentu jsme zkoumali vliv Cd na obsah tří organických kyselin, jmenovitě AsA, CA and FuA. Stanovené hodnoty těchto kyselin ve výhoncích a šlahounech jsou uvedeny na obr. 25. Oba druhy rostlin vytvářejí šlahouny s malými rostlinkami, které představují nejmladší částí rostlin s možností reprodukce. Zkoumali jsme, zda kombinace kovu a organické kyseliny mohou existovat již i na této úrovni. AsA se hromadila ve vyšším množství u *C. fragrans*, kde byl její obsah následně snížen až o 46 % při nejvyšší koncentraci Cd. V *Ch. comosum* nebylo množství AsA významně ovlivněno množstvím Cd a ve srovnání s *C. fragrans* byly zde nalezené hodnoty obecně velmi nízké. Ve šlahounech nebyl dopad Cd na akumulaci AsA u obou druhů patrný. Akumulace CA byla ovlivněna u výhonků *Ch. comosum* při nejnižší koncentraci Cd, a vykazovala klesající tendenci s rostoucími koncentracemi Cd. Prokazatelně vyšší koncentrace byly nalezeny ve šlahounech tohoto rostlinného druhu a akumulací trend byl podobný. Důvodem může být vazba této látky na Cd ionty, přičemž se tento mechanismus více zapojuje u mladších částí rostlin *Ch. comosum*. Rovněž bychom na základě toho mohli předpokládat, že CA se může účastnit chelatace s Cd a působit jako nosič pro transport Cd z výhonků do šlahounů. Obdobné spojení totiž pozorovali Chai et al. (2012) v případě kyseliny šťavelové a jejího transportu z podzemí do nadzemní části rostlin. Irtelli and Navari-Izzo (2006) pozorovali nárůst množství organických kyselin při přidávku Cd, což je mimo jiné důkaz pro Cd-zprostředkovanou indukci metabolické cesty, která vede k syntéze organických kyselin, jež hrají roli v imobilizaci a detoxikaci kovu. V *C. fragrans* byla koncentrace CA snížena tím, že došlo k nárůstu množství přijatého Cd do nadzemní části. Při nejvyšší koncentraci Cd bylo množství CA asi o 55 % nižší ve srovnání s kontrolou. Ve šlahounech se množství CA zvyšovalo s vyšší koncentrací Cd. Nejmenší množství a citlivost vůči Cd byla pozorována v našem pokuse v případě FuA. Ve výhoncích a šlahounech nebyly

pozorovány prakticky žádné rozdíly v koncentraci FuA v závislosti na koncentraci Cd, a to u obou rostlinných druhů. Pouze ve výhoncích *Ch. comosum* se množství FuA významně zvýšilo s nejnižší koncentrací Cd. I v dalších obdobných experimentech byla FuA nejméně citlivou a detekovanou organickou kyselinou (Chai et al. 2012). Někteří autoři naznačují, že při detoxikaci kovu pomocí vazby polutantu na organické kyseliny, je důležitá vakuolární sekvestrace, čímž dochází k dostatečné ochraně dalších důležitých látek (Irtelli and Navari-Izzo 2006; Sun et al. 2010). Nicméně v našem experimentu jsme ukázali, že vysoké hladiny organických kyselin nejsou samy o sobě hlavním důvodem pro hyperakumulaci a hypertoleranci vůči Cd. Podobně také Callahan et al. (2006) pozorovali nízkou asociační konstantou organických kyselin a kovů. Tito autoři také argumentují proti roli organických kyselin v mechanismu hyperakumulace (například v případě dálkového transportu), a to navzdory jejich konstitutivně zvýšených koncentracích v hyperakumulátorech. Možná i právě proto jsou další studie v tomto ohledu stále nezbytné, zejména ve směru určení akumulačních forem Cd a mobilní distribuce v těchto hyperakumulačních druzích rostlin.



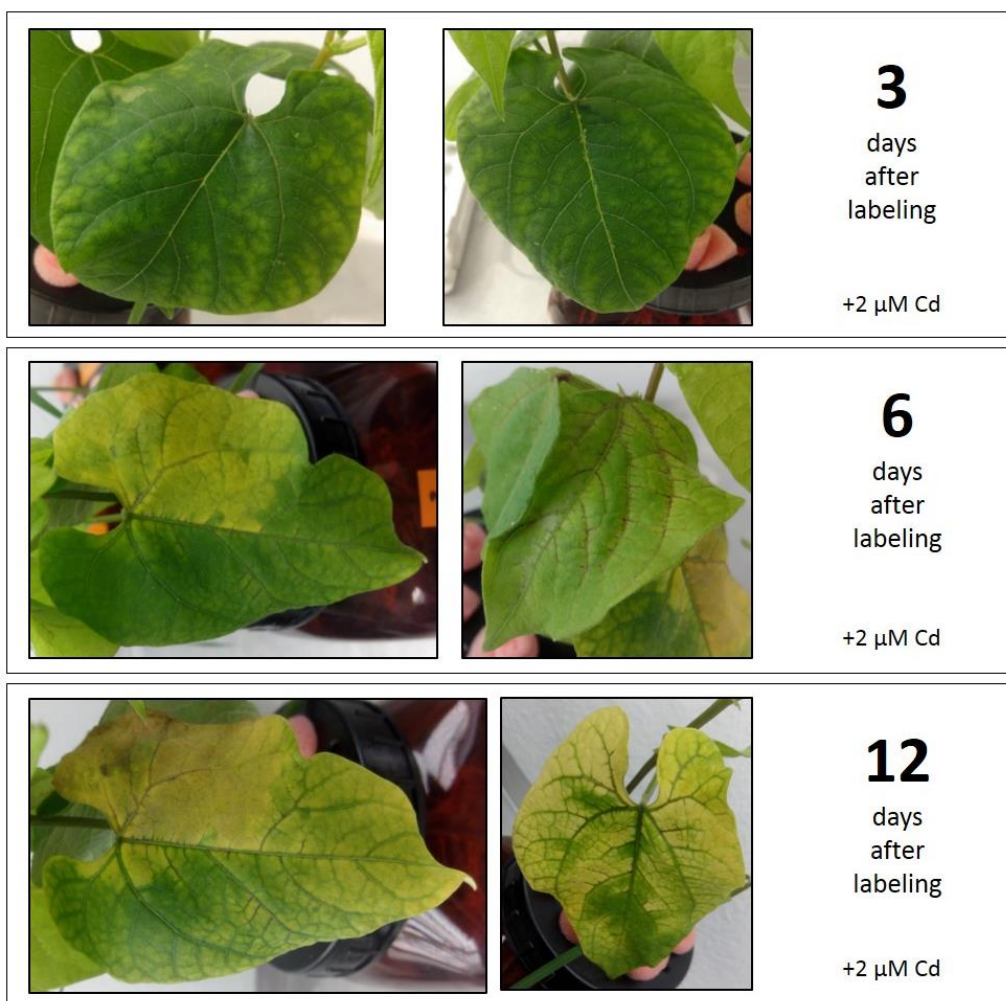
Obr. 25: Vliv uměle přidaného Cd na obsah organických kyselin ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) u rostlin *Chlorophytum comosum* a *Callisia fragrans*. Rostliny byly pěstované na uměle kontaminovaných půdách se 3 rozdílnými koncentracemi Cd a doprovodným aniontem Cl⁻. AsA-kyselina askorbová, CA-kyselina citrónová, FuA-kyselina fumarová. 1-výhonky, 2-šlahouny. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 4$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

7.3 Experiment s radionuklidy ^{65}Zn and ^{109}Cd

7.3.1 Viditelné projevy toxicity kadmia (pšenice a fazole)

Viditelné příznaky toxicity HM byly pozorovány v průběhu tohoto experimentu u obou druhů rostlin. Listové chlorózy byly patrné již třetí den po značení radionuklidy, a to především u varianty 2Cd a rostlin fazolu. Zmíněné příznaky nabývaly v průběhu času na intenzitě a nakonec vedly k masivnímu žloutnutí listů. Listy rostlin u varianty 2Cd byly také výrazně menší a jejich stárnutí či degradace byly rychlejší, než u kontrolních rostlin. Toto poškození bylo pozorováno jak u primárních listů, tak i prvních trojčetných listů. Kromě toho, u rostlin fazolu, bylo též pozorováno ztmavnutí a zhnědnutí kolem listových žilek. Některé listy dokonce odumřely do 12 dnů od značení nuklidy. Všechny tyto viditelné příznaky toxicity Cd u rostlin fazolu jsou uvedeny na obr. 26. Viditelné příznaky toxicity HM zde byly zřetelnější v případě Cd, oproti Zn. Nebyly zjištěny žádné viditelné rozdíly mezi kontrolou a variantou 20Zn u rostliny fazolu. Obecně v našem experimentu platilo, že viditelné příznaky byly u pšenice méně výrazné než u rostliny fazolu. U rostlin pšenice ošetřených 20 μM Zn, byla pouze pozorována o něco menší velikost rostlin, oproti ostatním variantám. Tato varianta se také vyznačovala světlejší barvou listů.

Podobné příznaky toxicity byly již dříve popsány autory (Benabid and Ghorab 2013; Aldoobie and Beltagi 2013; Tuma and Svojanovska 2015). V experimentu reagovaly listy na toxicitu Cd mnohem rychleji než ostatní části rostlin, a to zejména v případě fazolu. Výskyt listových chloróz nám i v tomto případě naznačuje, že toxický účinek Cd se viditelně projevuje v těchto orgánech, a že listy jsou mnohem více citlivé na Cd, než ostatní části rostlin fazole. Kromě toho jsme u listů fazole pozorovali i tmavnutí a hnědnutí okolo listových žilek. To je v souladu s Page et al. (2006), kteří pozorovali celkově malé množství ^{109}Cd ve všech částech listů, ale naopak velmi vysoké množství tohoto prvku pak lokalizovali v hlavních listových žilkách. Je také dokumentováno, že mezi obecné příznaky přebytku Zn patří listové chlorózy, hnědnutí kořene, zakrnění výhonků, kroucení a rolování mladých listů, smrt listů a celkové snížení obsahu chlorofylu (Rout and Das 2009; Tuma and Svojanovska 2015). V našem experimentu však byla reakce obou druhů k přidanému Zn odlišná. V případě rostlin pšenice jsme pozorovali jen jemné zesvětlení listů.



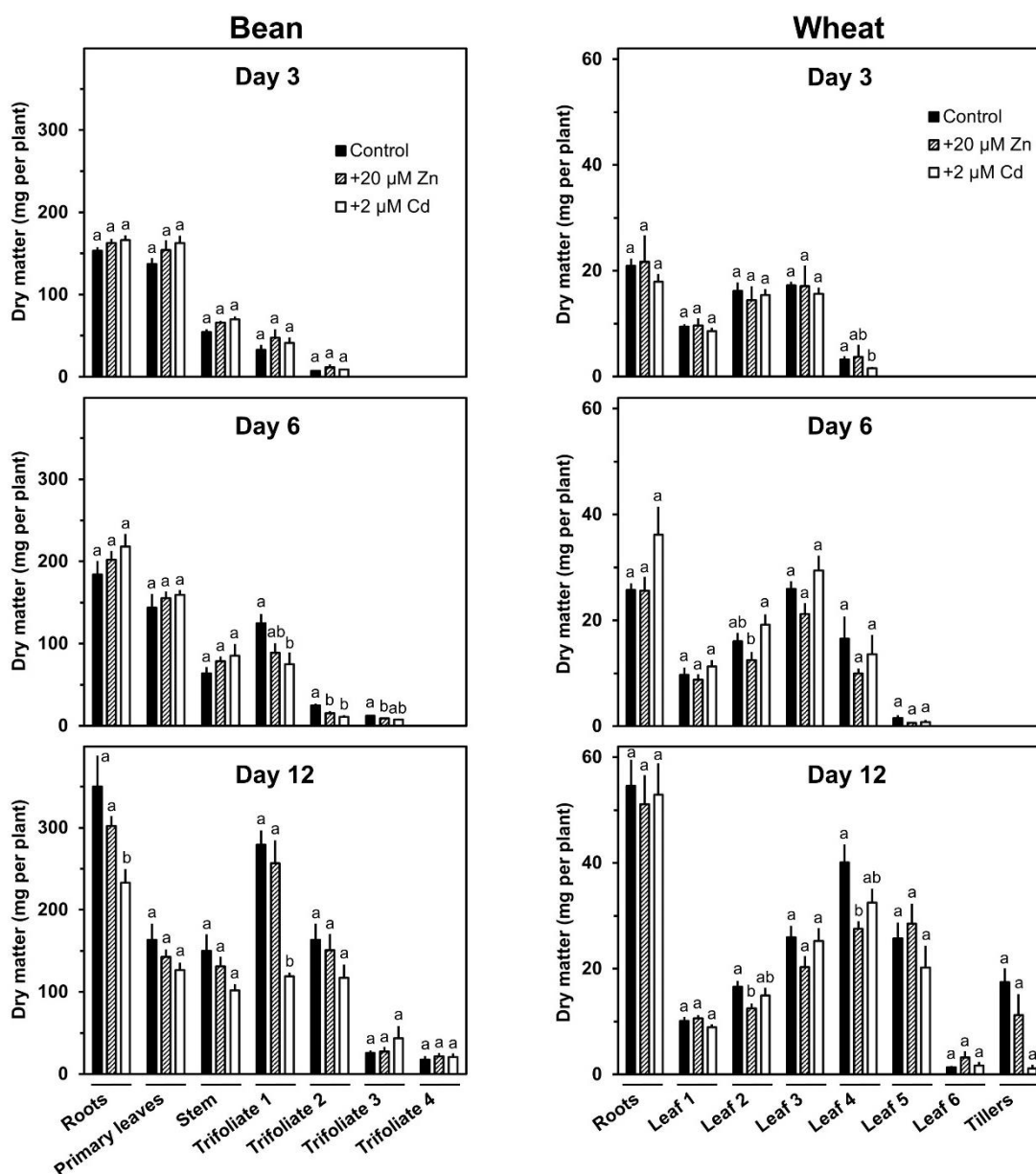
Obr. 26: Vliv přidaného Cd na viditelné projevy toxicity kovu u reprezentativních zástupců listů rostlin fazole (*Phaseolus vulgaris* L.), za jednotlivá časová období po značení radionuklidu.

7.3.2 Změny množství sušiny v závislosti na působení kadmia

Toxicita HM je ještě více patrná, pokud se podíváme na změny v hodnotách sušiny (DM). Změny v DM vztažené na jednotlivé části rostlin při vystavení zvýšené koncentraci Cd nebo Zn v živném roztoku jsou, pro oba druhy rostlin, shrnuty na obr. 27. Přídavek HM do živného média má za následek snížení DM u několika variant listů. Je zajímavé a důležité si povšimnout, že přídavek Cd do živného média způsobil u rostlin fazole mnohem silnější pokles v DM (zejména u 1. trojčetných listů), než přídavek Zn, zatímco u pšenice byl přídavek Zn v tomto ohledu daleko účinnější než Cd (zvláště v listech 2, 3 a 4). Negativní účinky na množství DM byly detekovatelné již po 6 dnech od značení a maximální projev nastal po 12 dnech.

Snížení celkového vzrůstu rostlin a redukce v produkci biomasy je považován za první projev toxicity Cd, tak jak publikovali např. Ekmekçi et al. (2008). Vzhledem k tomu, že příznaky toxicity se mohou objevit až během různých vývojových stádií (Sarwar et al. 2010), byly pro náš experiment zvoleny různé časové období sklizně po značení s radionuklidu. I v našem pokuse, byl tento negativní

efekt detekovatelný až po delší době. Kolbert et al. (2012) argumentují, že rostliny za stresových podmínek využívají většinu svých prostředků na aktivaci a zlepšení svých detoxikačních mechanismů, spíše než na růst a vývoj. Na druhou stranu, v našem případě nebyl tento fakt pro rostlinky pšenice příliš patrný. Zde bylo snížení produkce DM způsobeno pouze přidavkem Zn. Je známo, že Zn patří mezi základní živiny, nutné pro růst rostlin. Ovšem i on je při vyšších koncentracích značně toxický. Vysoce fytotoxický může být, zejména pokud je akumulován ve větší míře rostlinami v jejich časně fázi vývoje (Rout and Das 2009). Tato vlastnost fytotoxického účinku Zn je dobře zdokumentována u mnoha rostlinných druhů a je obvykle reprezentována právě inhibicí růstu (Vaillant et al. 2005; Tuma and Svojanovska 2015).

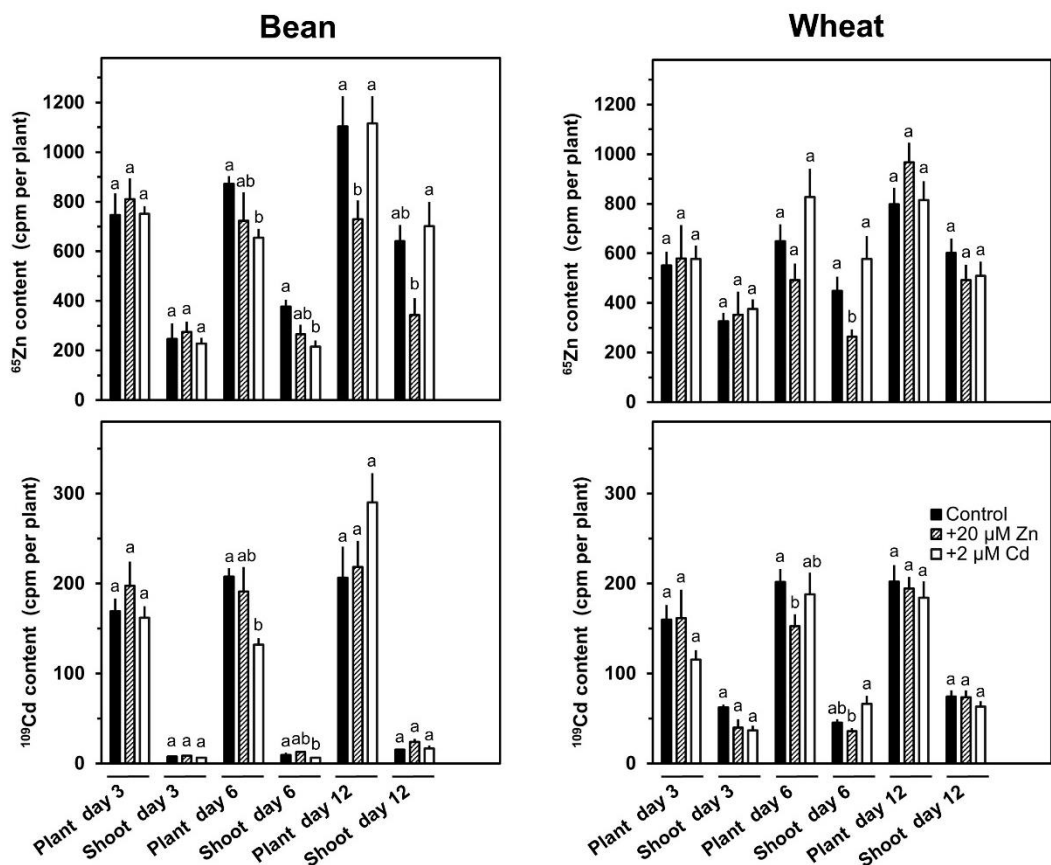


Obr. 27: Změny v hodnotách sušiny u jednotlivých částí rostlin fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) a pšenice (*Triticum aestivum* L.) během zvýšené expozice Cd nebo Zn v živném médiu. Trojčetné listy fazole jsou číslovány od nejstaršího (Trifoliolate 1) k nejmladšímu (Trifoliolate 4) a listy pšenice jsou číslovány počínaje nejstarším listem. Hodnoty představují průměry \pm SE ($n = 4$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, patří ke stejnému datu sklizně a stejné části rostliny se nijak výrazně neliší na úrovni $P < 0,05$.

7.3.3 Transport radionuklidů ^{65}Zn and ^{109}Cd z kořene do nadzemní části

Rozdíly v účinku obou HM na hodnoty DM a rozdílná fyziologická aktivita u rostlin fazole a pšenice mohou být způsobeny druhově specifickou translokací z kořenů do nadzemních částí rostlin. Tento transport z kořene do nadzemních částí pro radionuklidy ^{65}Zn and ^{109}Cd je znázorněn na obr. 28. Tento obrázek jasně ukazuje, že u ^{65}Zn dochází k rychlejšímu transportu z kořenů do nadzemních částí

než ^{109}Cd , a to shodně pro oba rostlinné druhy. Tento přenos je však mnohem účinnější u pšenice, než u fazolí. Cd bylo silně akumulováno v kořenech (okolo 90 % u fazole a kolem 60 % u pšenice). Různé varianty experimentu měly významný vliv především na obsah ^{65}Zn a to u rostlin fazole. Rychlejší translokace ^{65}Zn , ve srovnání s ^{109}Cd , a to z kořenů do nadzemních částí u obou druhů, může být způsobena různými mechanismy přenosu, které jsou patrně účinnější u pšenice, než u fazole. Podle Sarwar et al. (2010), toxicita Cd nejenže snižuje produkci rostlinné biomasy, ale zároveň také může zvýšit přesun Cd do nadzemních částí. Podobně Ekmekçi et al. (2008) navrhli, že nedostatek potřebné energie pro sekvestraci Cd v kořenech může být také odpovědné za jeho následnou nadlimitní translokaci z kořenů do nadzemních částí. Můžeme tedy předpokládat, že pšenice a fazole mají různé translokační procesy, jako je např. transport Cd z parenchymálních buněk do xylémového systému, nebo jeho vstup a výstup z lýka. Dalším vysvětlením je fakt, že Cd bývá již na úrovni kořene rozpoznáno jako toxická sloučenina, a to jak u pšenice, tak fazole, což vede k aktivaci obranných mechanismů, jako je sekvestrace do vakuol či buněčných stěn (Tudoreanu and Phillips 2004; Page and Feller 2005; Page et al. 2006; Sanaeiostovar et al. 2011). Důvodem pro tuto silnou retenci ^{109}Cd v kořenech může být i zapojení obranných mechanismů již na povrchu kořene a v kořenovém apoplastu, jejichž činnost vede k přechodu kovu do nerozpustné formy. I kompartmentace v kořenových pletivech může přispět k tomu, aby se zabránilo uvolňování HM do xylému (Page and Feller 2015). Obecně však platí, že kořeny akumulují nejvyšší procento přijatého Cd v porovnání s jinými rostlinnými pletivy (Arao and Ishikawa 2006; Page et al. 2006; Sanaeiostovar et al. 2011; Tuma et al. 2014). Vždy je to ale závislé na druhu rostliny a účinnosti kořenových detoxikačních mechanismů (Benabid and Ghorab 2013). Dynamika pohybu Cd v plodinách je relevantní pro vstup do potravinového řetězce a závisí na různých fyziologických procesech včetně produkce komplexů s organickými kyselinami, fytochelatinu a nicotianaminy, jež vystupují jako ligandy (Tudoreanu and Phillips 2004; Sanaeiostovar et al. 2011; Page and Feller 2015).



Obr. 28: Obsah ^{65}Zn a ^{109}Cd v celých rostlinách a výhoncích fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) a pšenice (*Triticum aestivum* L.) během zvýšené expozice Cd nebo Zn v živném médiu. Hodnoty představují průměry \pm SE ($n = 4$). Sloupce se stejným písmenem ve stejném tripletu nejsou významně odlišné při $P < 0,05$ úrovni.

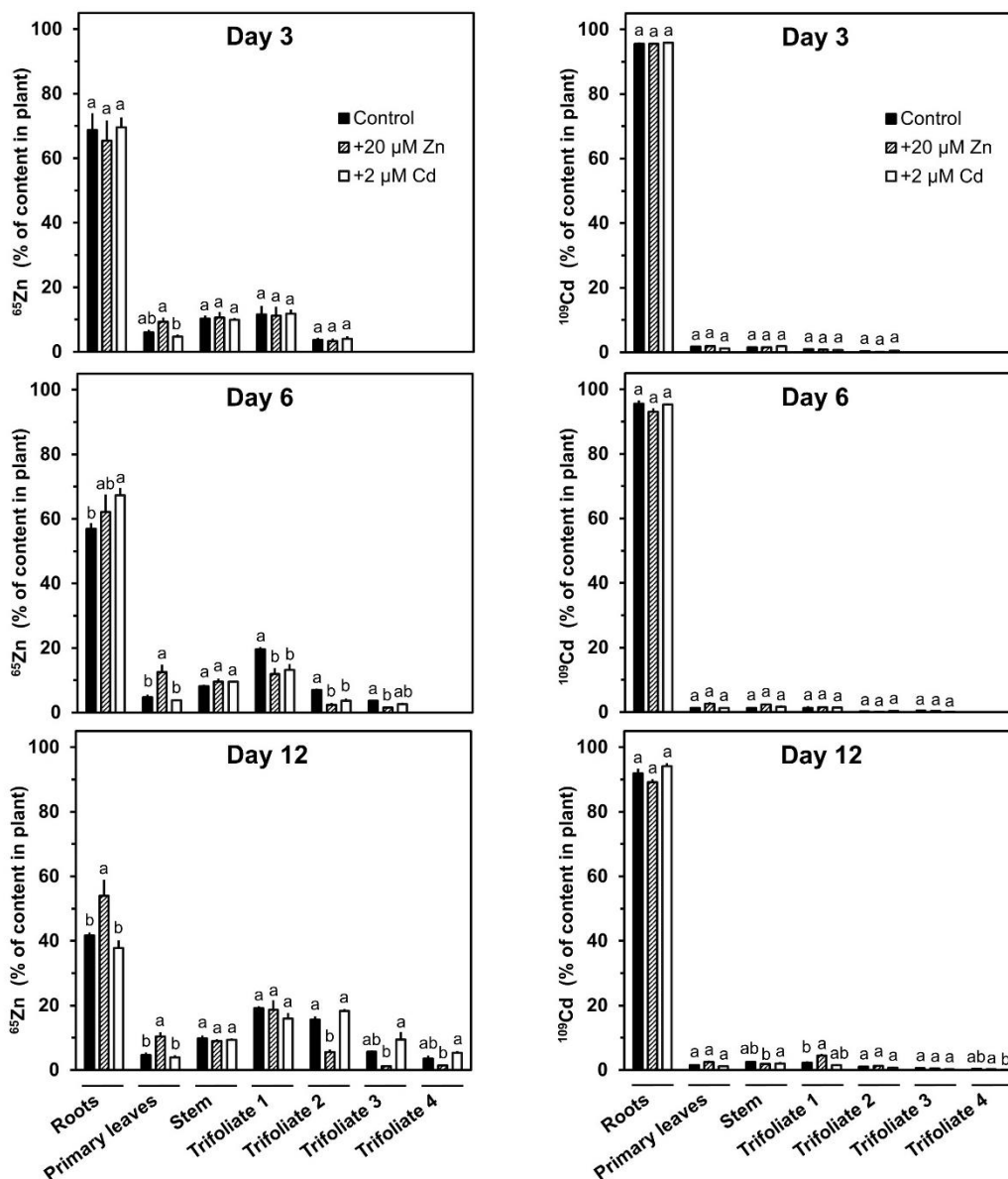
7.3.4 Relativní obsahy radionuklidů ^{65}Zn and ^{109}Cd v různých intervalech odběru

Po translokaci z kořenů do výhonků je důležité vyhodnotit následnou redistribuci prvků v rámci nadzemních částí rostlin. Relativní obsah ^{65}Zn a ^{109}Cd v různých částech rostlin a v různých časových intervalech je uveden na obr. 29 (fazole) a obr. 30 (pšenice). Obr. 27 znázorňuje, že zvýšená hladina Zn (ale nikoliv zvýšená hladina Cd) v médiu, negativně ovlivňuje transfer Zn z kořene do výhonků rostlinek fazolu (viz. dny 6 a 12). Kromě toho bylo také ovlivněno přerozdělení prvku z primárních listů do nejmladších trojčetných listů. Přibližně 40 – 70 % ^{65}Zn bylo akumulováno v kořenech. Rozdíly v retenci v kořenovém systému jsou mezi ^{65}Zn a ^{109}Cd rovněž zřejmé. Přibližně 90 % ^{109}Cd setrvalo v kořenech fazole nezávisle na použité variantě experimentu či čase sklizně.

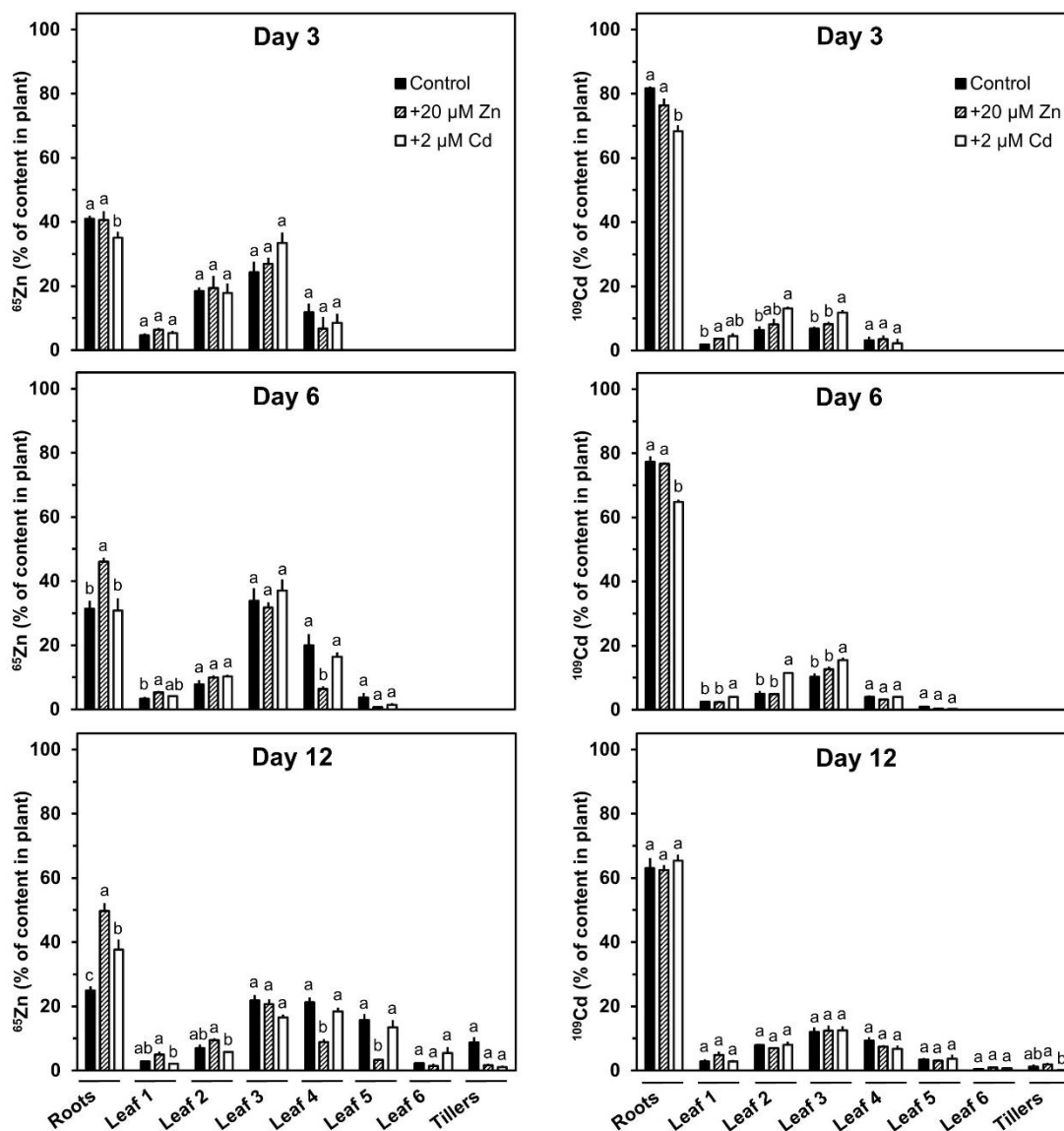
Obr. 29 ukazuje, že zvýšená hladina Zn v médiu negativně ovlivnila i transfer Zn z kořene do výhonků rostlinek pšenice (viz dny 6 a 12). Kromě toho bylo také ovlivněno přerozdělení z listů č.1 a č.2 do nejmladších listů. Přibližně 30 – 50 % ^{65}Zn bylo zjištěno v kořenech. Přesto došlo k pohybu velkého množství ^{65}Zn směrem do listů, především při jejich postupném vývoji. Radionuklid ^{109}Cd byl

v rostlinách pšenice pohyblivější než v případě fazolu. Přibližně 60 – 80 % z ^{109}Cd zůstávalo kořenech. Zvýšená hladina Cd v médiu pozitivně ovlivnila přenos prvku z kořene do výhonků rostlinek pšenice (viz dny 3 a 6). Radionuklid ^{109}Cd byl v pšenici mnohem rychleji translokován z kořenů do vyvíjejících se listů než případě fazole. ^{109}Cd s mnohem menší efektivitou vstupoval do lýka a následně přepravován ze starších do mladších listů rostlin pšenice v porovnání s ^{65}Zn .

Negativní vliv zvýšené hladiny Zn v médiu na přenos prvku z kořene do výhonků u rostlin fazole a negativní vliv zvýšené hladiny Cd v médiu na přenos prvku z kořene do výhonků pšenice může být spojen s detoxikačními mechanismy v kořenech. Hassan et al. (2005) popsali, že Zn může minimalizovat akumulaci Cd v rostlinách. Rovněž kořenový příjem, distribuce a následná akumulace Zn a Cd v rostlinných pletivech, se může výrazně lišit v závislosti na genotypu plodin, a to nejen na úrovni druhů (Arao and Ishikawa 2006; Li and Zhou 2012). Nicméně, s postupným stárnutím listů dochází ke snížení obsahu ^{65}Zn v listech pšenice. S tímto zjištěním korespondují i výsledky Page et al. (2006). Jak již bylo dříve zjištěno autory Page and Feller (2015), HM jsou transportovány transpiračním proudem do výhonků a hromadí se především ve fotosynteticky aktivních (transpirujících) listech, a to hlavně v situacích, kdy nedochází ještě k následné redistribuci. Export z těchto listů prostřednictvím lýka umožňuje přerozdělení kovů ze stárnoucích listů do míst jejich metabolismu či uložení (sink), ale další možností je také transfer do lýka ještě předtím než xylémová míza dosáhne mezofylových buněk v listech pomocí přímého transferu z xylému do lýka v oblasti cévních svazků (Riesen and Feller 2005; Page and Feller 2015). Takovýto selektivní přenos může následně způsobit různorodost v modelech distribuce pro různé HM, a to především během a po transportu z kořenů do výhonků.



Obr. 29: Relativní obsahy ^{65}Zn a ^{109}Cd (v % z celkového obsahu v rostlině) v různých částí rostlin fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) při vystavení zvýšené hladině Cd nebo Zn v živném médiu. Trojčetné listy jsou číslovány od nejstaršího (Trifoliolate 1) po nejmladší (Trifoliolate 4). Hodnoty představují průměry \pm SE ($n = 4$). Sloupce se stejným písmenem, ve stejné trojici, nejsou významně odlišné při $P < 0,05$ úrovni.

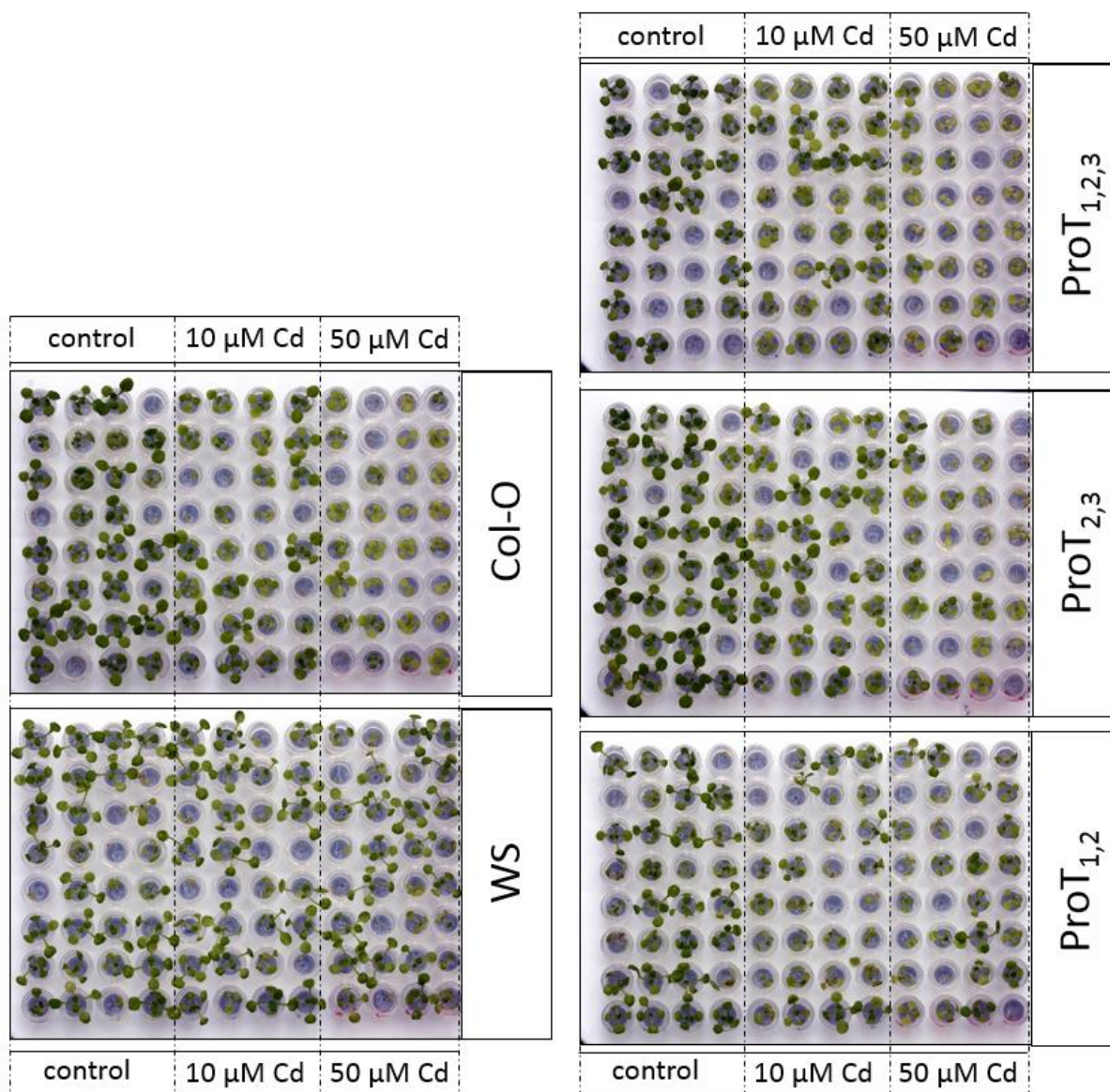


Obr. 30: Relativní obsahy ^{65}Zn a ^{109}Cd (v % z celkového obsahu v rostlině) v různých částí rostlin pšenice (*Triticum aestivum* L.) při vystavení zvýšené hladině Cd nebo Zn v živném médiu. Trojčetné listy jsou číslovány od nejstaršího (Trifoliolate 1) po nejmladší (Trifoliolate 4). Hodnoty představují průměry \pm SE ($n = 4$). Sloupce se stejným písmenem, ve stejné trojici, nejsou významně odlišné při $P < 0,05$ úrovni.

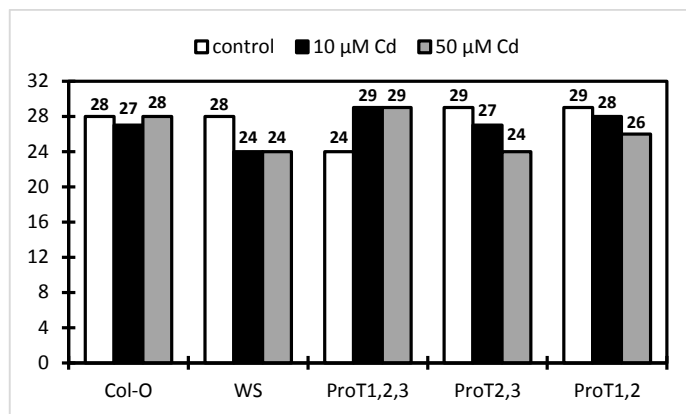
7.4 Experimenty s rostlinami *Arabidopsis* a jejich genotypy

7.4.1 Vliv kadmia na růst různých genotypů

Uměle přidané Cd do živného média mělo za následek výrazné ovlivnění jak raného růstu rostlinek *Arabidopsis*, tak jejich následného vývoje. Viditelný rozdíl mezi kontrolními variantami a oběma koncentracemi Cd - 10 μ M a 50 μ M je patrný z obr. 31. Kromě genotypu WS, který je na první pohled tím nejvíce odolným, zaznamenaly všechny ostatní genotypy výraznou růstovou retardaci a prokazatelné příznaky fytotoxicity. Prokazatelně světlejší listové plochy byly patrné již při koncentraci 10 μ M Cd. Vyšší koncentrace, tedy 50 μ M Cd, se pak kromě masivního zesvětlení listů projevila i podstatným snížením produkce biomasy až smrtí jednotlivých rostlin. I v tomto ohledu byl nejvíce odolný genotyp WS, přestože to z počtu přeživších rostlinek po 14 dnech není příliš patrné, jak udává obr. 32. Přestože klíčení nebylo prakticky ovlivněno, následný vývoj rostlinek již Cd inhibovalo markantně. Obecně je právě klíčivost semen prvním projevem toxicity Cd u semen (Shweta and Agrawal 2006; Siddhu and Ali Khan 2012). U přeživších rostlin je pak hojně dokumentováno celkové snížení růstu (Aldoobie and Beltagi 2013; Zemanová et al. 2015a). Podobné projevy jsou pak popsány i u druhu *Arabidopsis*. Martínez-Peñalver et al. (2012) pozorovali nejen snížení množství pigmentů a inhibici fotosyntetické účinnosti, ale rovněž zvýšení H₂O₂ v žilkách listů. Autoři celkově odhalili u tohoto druhu dobrou translokaci Cd do nadzemních orgánů, což předpokládá výskyt účinných transportních mechanismů. Ve světle předchozích výsledků však můžeme vidět fakt, že k toxicitě Cd jsou mnohem více náchylné mladé rostliny, především v jejich časně fázi vývoje, než vyvinutější a zralejší exempláře. I když i zde lze s úspěchem nalézt odolnější a tolerantnější genotypy, a to i od jednoho druhu rostliny.



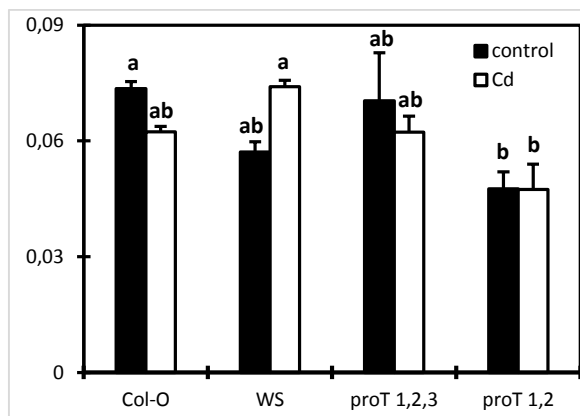
Obr. 31: Vliv uměle přidaného Cd (10μM a 50μM) na klíčivost a vývoj jednotlivých genotypů rostlin *Arabidopsis*. Každá varianta obsahovala celkem 32 semen. Snímky byly pořízeny 14 dní po vysetí do agarového média, ve dvou případech s přidavkem Cd. Zkratky Col-O; WS označují jednotlivé genotypy. Zkratky ProT_{1,2,3}; ProT_{1,2} a ProT_{2,3} jsou označením pro genotypy obsahující různé proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu.



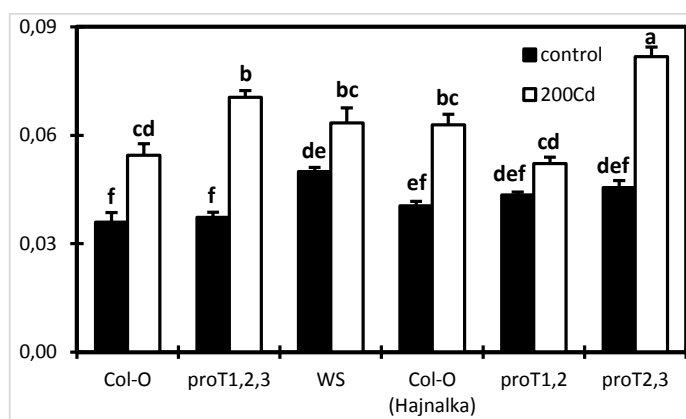
Obr. 32: Vliv uměle přidaného Cd (10μM a 50μM) na úmrtnost jednotlivých genotypů rostlin *Arabidopsis*. Každá varianta obsahovala celkem 32 semen. Čísla ukazují počet přeživších jedinců 14 dní po vysetí do agarového média, ve dvou případech s přidavkem Cd. Zkratky Col-O; WS označují jednotlivé genotypy. Zkratky ProT_{1,2,3}; ProT_{1,2} a ProT_{2,3} jsou označením pro genotypy obsahující různé proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu.

7.4.2 Obsah thiolových sloučenin ve vztahu k bioakumulaci kadmia

Celkový obsah ve vodě rozpustných thiolů byl u jednotlivých genotypů rostlin *Arabidopsis* zkoumán ve 2 časových intervalech a dvou koncentracích Cd. Situaci po 24 hodinách a koncentraci 100μM CdCl₂ · 2.5 H₂O znázorňuje obr. 33 a situaci po 48 hodinách a koncentraci 200μM CdCl₂ · 2.5 H₂O znázorňuje obr. 34. V prvním případě zaznamenal zvýšení obsahu thiolů po přidání Cd pouze genotyp WS, konkrétně o 29.6 % oproti kontrole. Ostatní genotypy nebyly v tomto ohledu významněji ovlivněny, některé zaznamenaly dokonce mírný pokles. Odlišná situace však nastala po dvojnásobné době a dvojnásobné koncentraci Cd. V tomto případě byl celkový obsah ve vodě rozpustných thiolů zvýšen v případě všech genotypů, a to v průměru o 53.7 % oproti kontrole. Výrazný nárůst zaznamenaly genotypy proT_{2,3} (o 79.6 % oproti kontrole) a proT_{1,2,3} (o 89.0 % oproti kontrole), tedy typy obsahující protein přenašeče s velkou afinitou k prolinu. V námi pozorovaných genotypech by tak přítomnost tohoto proteinu mohla hrát zásadní roli, jak v dostupnosti thiolů, tak celkové odolnosti rostlin vůči Cd.



Obr. 33: Celkový obsah ve vodě rozpustných thiolů (μ mol/g FW), 24 hodin po expozici Cd (100μ M $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$) u jednotlivých genotypů rostlin *Arabidopsis*. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné. Zkratky Col-O; WS označují jednotlivé genotypy. Zkratky $\text{ProT}_{1,2,3}$; $\text{ProT}_{1,2}$ jsou označením pro genotypy obsahující různé proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu.



Obr. 34: Celkový obsah ve vodě rozpustných thiolů (μ mol/g FW), 48 hodin po expozici Cd (200μ M $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$) u jednotlivých genotypů rostlin *Arabidopsis*. Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 6$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné. Zkratky Col-O; Col-O (Hajnalka); WS označují jednotlivé genotypy. Zkratky $\text{ProT}_{1,2,3}$; $\text{ProT}_{1,2}$ a $\text{ProT}_{2,3}$ jsou označením pro genotypy obsahující různé proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu.

Tyto různé typy prolin transportérů zprostředkovávají transport prolinu, popř. glycinu a mohou být zapojeny do transportu těchto látek na dlouhé vzdálenosti, jakož i do vstupu a výstupu z floému a také do přenosu z xylému do floému. Akumulace velkého množství těchto osmolytů, pak může být adaptivní odpovědí rostlin vystavených stresovému působení (Haudecoeur et al. 2009; Yang et al. 2009). Prolin se podílí nejen na syntéze proteinů, ale také udržuje osmotický nebo buněčný turgor, snižuje únik elektrolytu a stabilizací membrán chrání rostliny před oxidačním stresem, tak že snižuje koncentrace ROS (Xu et al. 2008; Hayat et al. 2012). Drobné změny v genové expresi nebo redoxním stavu by tak

mohli být oním rozdílem mezi tolerantními a senzitivními genotypy či druhy (Zagorchev et al. 2013). Podobné zvýšení obsahu thiolových sloučenin v *Arabidopsis thaliana* pozorovali i Babula et al. (2012), u dalších rostlinných druhů pak např. Tiryakioglu et al. (2006); Mishra et al. (2006a) a Mishra et al. (2006b). Důvod tohoto zvýšení vidí autoři především ve snížení aktivity APS kinázy, která omezuje dostupnost S pro biosyntézu sirných sekundárních metabolitů (Babula et al. 2012). Noctor et al. (1998) a Mugford et al. (2011) přidávají, že nadměrná exprese enzymu APS reduktázy nemá sice žádný vliv na produkci glukosinolátů, ale výrazně zvyšuje tvorbu právě thiolových sloučenin. Chelatace kovů pomocí thiolů, pak představuje další potencionální možnou strategii v obranných buněčných mechanismech. Nicméně, je nutné rozlišovat indukovanou tvorbu thiolů bezprostředně po vystavení stresovému působení, tak jako v našem experimentu, a „pozdní“ zvýšení celkového obsahu thiolů. To pak již nelze považovat za následek obranných mechanismů vůči Cd, ale spíše za následek zvýšené asimilace síranu, jak dokládá i Schützendübel et al. (2001). Na druhou stranu, bylo také doloženo, že vysoké koncentrace thiolových sloučenin samy o sobě neochrání před toxicitou Cd (Arisi et al. 2000). I zde je proto jistě na místě uvažovat o soustavném zapojení komplexní sítě možných obranných mechanismů.

7.5 Porovnání a shrnutí výsledků experimentů

7.5.1 Viditelné symptomy toxicity kadmia a jeho vliv na růst rostlin

Během experimentů docházelo k ovlivnění produkce rostlinné biomasy, a to jak v pozitivním, tak negativním směru. Zatímco přidavek HM do živného média měl za následek snížení hmotnosti u mladých rostlin fazole a pšenice, u rostlin okurky, způsobily všechny varianty s přidavkem Cd naopak mírné zvýšení produkce. Vzhledem k tomu, že v druhém případě se jednalo ještě o vyšší dávky Cd, nabízí se hledat vysvětlení v různém stádiu a vývoji rostlin, v kterém byl do jejich prostředí přidán HM. Zatímco rostliny fazole a pšenice byly dávce Cd vystaveny již po 17 dnech od klíčení, rostliny okurky byly kontaminovány až po 35 dnech od vysetí. Jejich vyspělejší habitus a celkově větší množství nadzemní hmoty, tak bylo schopné lépe odolat efektu Cd. Naopak použitými koncentracemi Cd, došlo k zintenzivnění činnosti metabolických drah, jako výsledek snahy se vyrovnat s toxickým působením kovu. Vedlejším projevem bylo pak mírné a krátkodobé zvýšení produkce biomasy. Tomuto tvrzení nahrává i fakt, že v případě klíčících semen rostlin *Arabidopsis* byla masivně snížena produkce biomasy, což vedlo až ke smrti jednotlivých rostlin. Rozdílný vliv měly v tomto ohledu i doprovodné anionty. Zatímco doprovodný aniont Cl⁻, nijak významně nekorespondoval s narůstajícím množstvím Cd, a všechny varianty s tímto aniontem zaznamenaly v průměru o 30 % vyšších hodnot oproti kontrolní variantě, aniont SO₄²⁻ rezultoval v úvodní silný nárůst (varianta Cd40S - v průměru o 50 % více ve srovnání s kontrolou), který pokračoval postupným snižováním produkce FW s narůstající koncentrací Cd v živném médiu. Doprovodný aniont se tak v tomto ohledu jeví jako jeden z důležitých faktorů. Tím

dalším, a neméně podstatným, je pak samotný rostlinný druh. Zatímco v našich experimentech, způsobilo Cd u rostlin fazole mnohem silnější pokles v DM, než přídavek Zn. U rostlin pšenice to byl naopak přídavek Zn, který způsobil daleko silnější pokles v DM, než přídavek Cd. Naopak *Ch. comosum* a *C. fragrans*, patřily k druhům s vysokou schopností odolávat toxicitě HM a žádné snížení produkce biomasy, navzdory vysokým koncentracím HM, nebylo pozorováno.

K dalším viditelným projevům toxicity HM patřil v našich experimentech výskyt listových chloróz, popřípadě žloutnutí listů či znatelná ztráta pigmentů. Prokazatelně světlejší listové plochy byly u rostlin *Arabidopsis* patrné již při koncentraci 10 μ M Cd a koncentrace 50 μ M Cd pak rezultovala v masivní zesvětlení listů. Mnohem větší poškození pak bylo pozorovatelné u variant s doprovodným aniontem Cl⁻, než u aniontu SO₄²⁻. Chloridový aniont (Cl⁻) je tedy zřejmě zodpovědný za zvýšení dostupnosti Cd pro rostliny z půdy. Cd pak, oproti Zn, výrazněji poškozovalo fazole ve srovnání s pšenicí. U fazolí bylo navíc pozorováno i tmavnutí a hnědnutí kolem listových žilek. Zn pak u rostlin způsobil menší vzrůst rostlin a lehce světlejší barvu listů. V experimentech tak listy reagovaly na toxicitu Cd mnohem rychleji než ostatní části rostlin. Metabolismus přijatých HM tak probíhá s největší pravděpodobností právě v těchto orgánech. Naopak naprostá absence výše zmíněných příznaků u druhů *Ch. comosum* a *C. fragrans*, znamená velmi dobrou odolnost proti toxickému účinku Cd, a to i na úrovni nadzemních částí. To, v kombinaci s okrasnou hodnotou, může tyto rostlinné druhy učinit velmi ceněnými pro další výzkumy v oblasti případných fytořemediací. Je ovšem ale namístě si uvědomit, že porovnávat výsledky hydroponických a nádobových experimentů je v tomto směru přinejmenším složité, stejně jako vyslovovat v tomto ohledu rozsáhlejší závěry, na základě tohoto základního výzkumu.

Ovlivnění fotosyntetických pochodů rostlin bylo krom viditelných příznaků pozorováno i ze změn hodnot fluorescence chlorofylu. Všechny varianty s přídavkem Cd vykazovaly u rostlin okurky vyšší hodnoty F₀ a F_m oproti kontrolní variantě. Rostlina se takto brání nadměrně vysoké tvorbě energie ve fotosystému, popř. ROS, vznikajících v důsledku působení Cd. Varianty s vysokými dávkami Cd a aniontem SO₄²⁻, zaznamenaly ještě v průměru o 23 % vyšší intenzity F₀ a F_m oproti obdobným variantám s aniontem Cl⁻. Naopak u námi použitých tolerantních druhů *Ch. comosum* a *C. fragrans* došlo k prokazatelnému snížení účinnosti fluorescence chlorofylu právě působením Cd. Samotné poměry F_v/F_m pro *Ch. comosum* a *C. fragrans* klesly o 2.6 %, respektive o 12.4 %, při nejvyšší koncentraci Cd v porovnání s variantou kontrolní. V tomto experimentu tak bylo naopak ukázáno, že toxicita Cd pravděpodobně sice způsobila vážnější oxidační poškození, nicméně i přes to nedošlo k fatálnímu omezení činnosti PSII, protože u těchto rostlin v průběhu pokusu nedošlo k jejich viditelnému poškození či dokonce smrti. Potenciál fotochemické účinnosti systému PSII, který hraje důležitou roli v ovlivnění vlastnosti růstu rostlin, tak může být jak inhibován, tak mírně posílen. Tento specifický účinek pak úzce závisí na druhu rostliny, ale i na dalších, pro rostlinu dostupných aniontech.

7.5.2 Příjem a translokace kadmia do jednotlivých částí rostlin

Shodným zjištěným, platným pro všechny experimenty, je fakt, že zvyšující se koncentrace Cd měla rovněž za následek zvyšující se koncentraci kovu v rostlině. Rovněž rostoucí translokační faktory v případě *Ch. comosum* a *C. fragrans* vykazovaly, v závislosti na množství Cd v půdě, stále zvyšující se trend. To ukazuje na velký akumulací potenciál, který nemůže fungovat bez přítomnosti poměrně dobrých transportních mechanismů pro HM.

Vůbec nejvíce přijatého Cd rostlinami, bylo shodně akumulováno v kořenech, a to nezávisle na variantě experimentu. U rostlin okurky a fazole to bylo shodně více než 90 % z celkového obsahu kovu a v případě pšenice okolo 60 %. Ještě méně Cd pak v kořenech akumulovaly oba tolerantní druhy - *Ch. comosum* 57 % a *C. fragrans* 56 %. I v tomto ohledu měl pak důležitý vliv použitý doprovodný aniont. Aniont Cl^- se promítl do mnohem vyšších koncentrací Cd v kořenech okurky, oproti aniontu SO_4^{2-} . V případě aniontu SO_4^{2-} byla distribuce Cd následující: kořen > list > stonek > plod. Zatímco u ostatních variant to bylo rozdílné: kořen > stonek > list > plod. Obdobná distribuce Cd byla pozorována i v *Ch. comosum* a *C. fragrans*: kořeny > výhonky > šlahouny. Nejméně Cd bylo obsaženo v plodech (max. 1 %). I zde byl velký rozdíl mezi anionty. U variant s nejvyšší dávkou kovu, měla varianta s Cl^- v průměru o 110 % více Cd, než obdobná varianta s aniontem SO_4^{2-} . Tento rozdílný vliv aniontů na translokaci Cd může být způsoben jejich rozdílnou chemickou strukturou, pohyblivostí a způsobeným efektem uvnitř rostlin.

Zn zůstával v kořenech v menší části (přibližně 40 – 70 % u fazolí a 30 – 50 % u pšenice). Prvek pak zaznamenal mnohem rychlejší transport z kořenů do nadzemních částí než Cd. Zmíněná distribuce byla pak účinnější u pšenice, než u fazolí. Rychlejší translokace může být způsobena různými mechanismy přenosu, které jsou patrně účinnější u pšenice, než u fazole. Důvodem silné retence Cd v kořenech může být i zapojení obranných mechanismů již na povrchu kořene a v kořenovém apoplastu, jejichž činnost vede k insolubilizaci kovu. Námi pozorovaný negativní vliv zvýšené hladiny Zn v médiu na přenos prvku z kořene do výhonků u rostlin fazole a negativní vliv zvýšené hladiny Cd v médiu na přenos prvku z kořene do výhonků pšenice může být spojen právě s detoxikačními mechanismy na úrovni kořene.

Ke známému vlivu Cd na příjem dalších kationtů, jsme v experimentech přispěli zjištěními týkajícími se K. Cd ovlivnilo hodnoty obsahu K především v listech okurky. Všechny kontaminované varianty, vykazovaly mnohem vyšší hodnoty K. Zvýšený obsah K právě v silněji kontaminovaných listech může znamenat zapojení tohoto prvku do obranných mechanismů. Tomuto zjištění nahrává i fakt, že prvek vystupuje v důležitých úlohách fotosyntézy a růstu rostlin a především jeho úloha související s transportem látek ve vodivých pletivech, popř. také, že vhodná koncentrace K může zmírnit příjem Cd.

7.5.3 Obsah specifických látek doprovázející stresovou reakci vůči kadmii

SA byla popsána jako signální molekula, která je zapojena do obraných činností v průběhu stresových reakcí. V našem případě byl její obsah v listech okurky redukován u všech variant s přidavkem Cd. Vyšší hodnoty jsme pak našly v kořenech *Ch. comosum* a *C. fragrans*, kde se ostatně nahromadila větší část přijatého Cd. Tyto druhy také disponovaly v porovnání s okurkou mnohem větší vitalitou. Největší efekt byl pozorován u nižších koncentrací Cd (oproti kontrole až o 74.5 % více SA). Vyšší koncentrace Cd naopak, patrně z důvodu inaktivace Cd navázáním právě na výše zmíněnou molekulu, obsahovaly množství volné SA již v podobném množství jako kontrolní varianty. Výrazně nižší hodnoty ve výhoncích obou tolerantních rostlin pak nahrává fakt, že obraná funkce SA je aktivována u těchto druhů rostlin převážně v kořenovém systému, který je prvním orgánem přicházejícím do kontaktu s Cd v půdě. I z tohoto hlediska je jasné, že nejen signální, ale i obranný mechanismus SA, se může lišit na různých úrovních, tedy v listech a kořenech, a to opět v závislosti na druhu rostliny. Kromě toho varianty s aniontem SO_4^{2-} obsahovaly mnohem menší množství SA, v porovnání se stejnými variantami s anionty Cl^- . Role této látky v obranném mechanismu při různých stresových působeních je tak stále otevřenou a vyžaduje další výzkumné studie.

Zvýšený obsah Cd v listech okurky u variant s aniontem SO_4^{2-} , vedl k významnému snížení obsahu PhC. Ostatní varianty s přidavkem Cd vykazovaly naopak vyšší obsah PhC ve srovnání s kontrolní variantou. Z charakteristik těchto látek je poměrně pravděpodobné jejich zapojení do obranných reakcí rostlin, především díky kapacitě vázat na sebe kov. I to může být důvodem, proč došlo v našem experimentu ke snížení obsahu PhC. U těchto variant jednoduše nebylo detekováno tolik volných PhC, protože díky velkému nadbytku Cd, je i většina PhC na tento kov navázána. Na druhou stranu, obdobné varianty s aniontem Cl^- , ke stejnému masivnímu snížení obsahu PhC nevedly. I z tohoto zjištění, můžeme předpokládat, že doprovodný aniont a forma Cd, ve kterém se kov vyskytuje, mohou mít poměrně zásadní vliv na zapojení odlišných obranných antioxidačních mechanismů.

Naše výsledky dále prokázaly vylepšení hodnot AOC v kořenech a výhoncích *Ch. comosum* a *C. fragrans*. Zvláště pak reakce v kořenech byla silně posílena vyšší koncentrací Cd. Z organických kyselin se u *C. fragrans* hromadila ve vyšším množství AsA. Nejmenší množství a citlivost vůči Cd byla pozorována u FuA. Nicméně, v našem experimentu jsme ukázali, že vysoké hladiny organických kyselin nejsou samy o sobě hlavním důvodem pro hyperakumulaci a hypertoleranci vůči Cd. Celkový obsah ve vodě rozpustných thiolů zaznamenal po 48 hodinách a koncentraci $200\mu\text{M}$ CdCl_2 výrazný nárůst. Drobné změny v genové expresi nebo redoxním stavu by podle našich výsledků, mohli být oním rozdílem mezi tolerantními a senzitivními genotypy či druhy.

Naše výsledky obecně ukazují, že tolerance rostlin vůči Cd velmi dobře koreluje s fotosyntetickou účinností a činností antioxidačního systému. Právě tyto body jsou důležité k udržení vysoké úrovně antioxidačního obranného systému a toleranci fotosyntetických systémů rostliny, což jim umožňuje přežít stres Cd. Rovněž můžeme předpokládat, že i doprovodný aniont a forma, ve které se

Cd vyskytuje, mohou mít dopad na zapojení různých antioxidačních systémů. Zjištění, že chemická forma přidaného Cd do živného roztoku ovlivňuje úroveň akumulace Cd je informací, na základě které jsou nutné další studie v lokalizaci a chemickém stavu Cd.

8. ZÁVĚRY

Z výsledků výše popsaných experimentů, které probíhaly v rámci doktorského studia, lze učinit následující závěry:

- Zvyšující se koncentrace Cd v živném médiu měla za následek zvyšující se koncentraci kovu v rostlině.
- Nejvíce přijatého Cd rostlinami, bylo shodně akumulováno v kořenech.
- Přídavek Cd do živného média ovlivnil produkci rostlinné biomasy, a to jak v pozitivním, tak negativním směru (u mladých rostlin působil inhibičně, u vyspělejších stimulačně).
- Zelenec a kalisie prokázaly vysokou schopnost odolávat toxicitě Cd.
- Toxicita Cd se projevila vznikem listových chloróz, popřípadě žloutnutím listů či znatelnou ztrátou pigmentů, popř. hnědnutím kolem listových žilek.
- Zn byl při pohybu z kořenů do nadzemních částí mnohem mobilnější než Cd.
- Mnohem větší poškození rostlin bylo pozorováno u variant s doprovodným aniontem Cl⁻, oproti aniontu SO₄²⁻.
- Potenciál fotochemické účinnosti systému PSII, byl jak inhibován, tak mírně posílen, a to v úzké souvislosti s rostlinným druhem a dalšími, pro rostlinu dostupnými, anionty.
- Signální a obranný mechanismus kyseliny salicylové se lišil na úrovni kořene a listu, a to opět v závislosti na druhu rostliny.
- Fenolické látky vykazovaly zapojení do obranných reakcí rostlin, především díky kapacitě vázat na sebe kov.
- Zvýšené hodnoty antioxidační kapacity, převážně v kořenech zelence a kalisie, zabraňují dalšímu oxidačnímu poškození rostlin.
- Velký nárůst ve vodě rozpustných thiolů zaznamenaly genotypy *Arabidopsis*, obsahující proteinové přenašeče s velkou afinitou k prolinu.
- Vysoké hladiny organických kyselin nejsou samy o sobě hlavním důvodem pro hyperakumulaci a hypertoleranci vůči Cd.
- Chemická forma přidaného Cd do živného roztoku ovlivňuje nejen úroveň akumulace Cd, ale i zapojení dalších obranných mechanismů v podobě syntézy specifických látek, v závislosti na druhu rostliny.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams ML, Zhao FJ, McGrath SP, et al (2004) Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties. *J Environ Qual* 33:532–541.
- Adhikari T, Tel-Or E, Libal Y, Shenker M (2006) Effect of Cadmium and Iron on Rice (*Oryza Sativa* L.) Plant in Chelator-Buffered Nutrient Solution. *J Plant Nutr* 29:1919–1940. doi: 10.1080/01904160600927435
- Adriano DC (2001) Trace elements in terrestrial environment; biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer New York
- Agami RA, Mohamed GF (2013) Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* 94:164–171. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.013
- Ahmad M, Usman ARA, Lee SS, et al (2012) Eggshell and coral wastes as low cost sorbents for the removal of Pb²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ from aqueous solutions. *J Ind Eng Chem* 18:198–204. doi: 10.1016/j.jiec.2011.11.013
- Ahmad P, Nabi G, Ashraf M (2011) Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *South Afr J Bot* 77:36–44. doi: 10.1016/j.sajb.2010.05.003
- Aldoobie NF, Beltagi MS (2013) Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. *Afr J Biotechnol* 12:4614–4622. doi: 10.5897/AJB2013.12387
- Ali N, Hadi F (2015) Phytoremediation of cadmium improved with the high production of endogenous phenolics and free proline contents in *Parthenium hysterophorus* plant treated exogenously with plant growth regulator and chelating agent. *Environ Sci Pollut Res* 22:13305–13318. doi: 10.1007/s11356-015-4595-3
- Altinözlü H, Karagöz A, Polat T, Ünver İ (2012) Nickel hyperaccumulation by natural plants in Turkish serpentine soils. *Turk J Bot* 36:269–280.
- Anwer S, Ashraf MY, Hussain M, et al (2012) Citric acid mediated phytoextraction of cadmium by maize (*Zea mays* L.). *Pak J Bot* 44:1831–1836.
- Arao T, Ae N, Sugiyama M, Takahashi M (2003) Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. *Plant Soil* 251:247–253. doi: 10.1023/A:1023079819086
- Arao T, Ishikawa S (2006) Genotypic differences in cadmium concentration and distribution of soybean and rice. *Jpn Agric Res Q JARQ* 40:21–30.
- Aravind P, Prasad MNV (2003) Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiol Biochem* 41:391–397. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00035-4
- Arisi ACM, Mocquot B, Lagriffoul A, et al (2000) Responses to cadmium in leaves of transformed poplars overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Physiol Plant* 109:143–149. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.100206.x

-
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA (2007) Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *J Environ Manage* 84:93–99. doi: 10.1016/j.jenvman.2006.05.005
- Astolfi S, Zuchi S, Passera C (2005) Effect of cadmium on H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci* 169:361–368. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.03.025
- Atal N, Saradhi PP, Mohanty P (1991) Inhibition of the Chloroplast Photochemical Reactions by Treatment of Wheat Seedlings with Low Concentrations of Cadmium: Analysis of Electron Transport Activities and Changes in Fluorescence Yield. *Plant Cell Physiol* 32:943–951.
- Atkinson NJ, Dew TP, Orfila C, Urwin PE (2011) Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Agric Food Chem* 59:9673–9682. doi: 10.1021/jf202081t
- Auda MA, Ali ES (2010) Cadmium and zinc toxicity effects on growth and mineral nutrients of carrot (*Daucus carota*). *Pak J Bot Pak* 42:341–351.
- Avancini G, Abreu IN, Saldaña MDA, et al (2003) Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry* 63:171–175. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00102-X
- Azevedo H, Pinto CGG, Santos C (2005) Cadmium Effects in Sunflower: Membrane Permeability and Changes in Catalase and Peroxidase Activity in Leaves and Calluses. *J Plant Nutr* 28:2233–2241. doi: 10.1080/01904160500324816
- Babu TS, Akhtar TA, Lampi MA, et al (2003) Similar Stress Responses are Elicited by Copper and Ultraviolet Radiation in the Aquatic Plant *Lemna gibba*: Implication of Reactive Oxygen Species as Common Signals. *Plant Cell Physiol* 44:1320–1329. doi: 10.1093/pcp/pcg160
- Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R (2012) Cadmium Accumulation by Plants of *Brassicaceae* Family and Its Connection with Their Primary and Secondary Metabolism. In: Anjum NA, Ahmad I, Pereira ME, et al. (eds) *The Plant Family Brassicaceae*. Springer Netherlands, pp 71–97
- Bahmani R, Bihanta MR, Habibi D, et al (2012) Effect of cadmium chloride on growth parameters of different bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.). *ARPN J Agric Biol Sci* 7:35–40.
- Bailey S, Thompson E, Nixon PJ, et al (2002) A Critical Role for the Var2 FtsH Homologue of *Arabidopsis thaliana* in the Photosystem II Repair Cycle in Vivo. *J Biol Chem* 277:2006–2011. doi: 10.1074/jbc.M105878200
- Barceló J, Poschenrieder C (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *J Plant Nutr* 13:1–37. doi: 10.1080/01904169009364057
- Baryla A, Carrier P, Franck F, et al (2001) Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212:696–709.
- Baszyński T, Wajda L, Król M, et al (1980) Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol Plant* 48:365–370. doi: 10.1111/j.1399-3054.1980.tb03269.x
- Belkhadi A, Hediji H, Abbes Z, et al (2010) Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1004–1011. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.03.009
-

-
- Benabid H, Ghorab MF (2013) Study of the Translocation and Distribution of Cadmium into Bean Plants (*Phaseolus vulgaris*) Using Labelled Cd-109. *World J Nano Sci Eng* 3:108–111. doi: 10.4236/wjnse.2013.33015
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005) Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:21–34. doi: 10.1590/S1677-04202005000100003
- Beneš S (1994) Obsahy a bilance prvků ve sférách životního prostředí. II. část. MZe ČR
- Bhardwaj P, Chaturvedi AK, Prasad P (2009) Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. *Nat Sci* 7:63–75.
- Białońska D, Zobel AM, Kuraś M, et al (2006) Phenolic Compounds and Cell Structure in Bilberry Leaves Affected by Emissions from a Zn–Pb Smelter. *Water Air Soil Pollut* 181:123–133. doi: 10.1007/s11270-006-9284-x
- Biolley JP, Lauga B, Cagnon C, et al (1998) Phenolic Pattern of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an Indicator of Chronic Ozone Stress. *Water Air Soil Pollut* 106:355–368. doi: 10.1023/A:1005050805136
- Boominathan R, Doran PM (2003) Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *J Biotechnol* 101:131–146.
- Borsari M (2006) Cadmium: Inorganic & Coordination Chemistry. In: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd,
- Bosiacki M (2009) Phytoextraction of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part II. Contents of Cd and Pb in plants. *Acta Sci Pol - Hortorum Cultus* 8:15–26.
- Bosiacki M (2008) Accumulation of cadmium in selected species of ornamental plants. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 21–31.
- Boudet A-M (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68:2722–2735. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.012
- Brunetti P, Zanella L, Proia A, et al (2011) Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene AtPCS1. *J Exp Bot* 62:5509–5519. doi: 10.1093/jxb/err228
- Cakmak I (2000) Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146:185–205. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00630.x
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem* 11:2–12. doi: 10.1007/s00775-005-0056-7
- Çanakcı S, Karaboga Z (2013) Some physiological and biochemical responses to cadmium in salicylic acid applied cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Pak J Bot* 45:1963–1968.
- Capuana M (2011) Heavy metals and woody plants - biotechnologies for phytoremediation. *IForest - Biogeosciences For* 4:7–15. doi: 10.3832/ifor0555-004
- Casova K, Cerny J, Szakova J, et al (2009) Cadmium balance in soils under different fertilization managements including sewage sludge application. *Plant Soil Environ* 353–361.

-
- Chai M-W, Li R-L, Shi F-C, et al (2012) Effects of cadmium stress on growth, metal accumulation and organic acids of *Spartina alterniflora* Loisel. *Afr J Biotechnol* 11:6091–6099. doi: 10.4314/ajb.v11i22.
- Chang Y-C, Zouari M, Gogorcena Y, et al (2003) Effects of cadmium and lead on ferric chelate reductase activities in sugar beet roots. *Plant Physiol Biochem* 41:999–1005. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.07.007
- Chao Y-Y, Chen C-Y, Huang W-D, Kao CH (2009) Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant Soil* 329:327–337. doi: 10.1007/s11104-009-0161-4
- Chao Y-Y, Hong C-Y, Kao CH (2010) The decline in ascorbic acid content is associated with cadmium toxicity of rice seedlings. *Plant Physiol Biochem* 48:374–381. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.01.009
- Chaudri A, McGrath S, Gibbs P, et al (2007) Cadmium availability to wheat grain in soils treated with sewage sludge or metal salts. *Chemosphere* 66:1415–1423. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.09.068
- Chen Z, Zhao Y, Fan L, et al (2015) Cadmium (Cd) Localization in Tissues of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), and Its Phytoremediation Potential for Cd-Contaminated Soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 95:784–789. doi: 10.1007/s00128-015-1662-x
- Cho M, Chardonens AN, Dietz K-J (2003) Differential heavy metal tolerance of *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*: a leaf slice test. *New Phytol* 158:287–293. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00746.x
- Cho U-H, Seo N-H (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci* 168:113–120. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.021
- Choi Y-E, Harada E (2005) Roles of calcium and cadmium on Cd-containing intra-and extracellular formation of Ca crystals in tobacco. *J Plant Biol* 48:113–119. doi: 10.1007/BF03030570
- Chopin EIB, Alloway BJ (2007) Distribution and Mobility of Trace Elements in Soils and Vegetation Around the Mining and Smelting Areas of Tharsis, Riotinto and Huelva, Iberian Pyrite Belt, SW Spain. *Water Air Soil Pollut* 182:245–261. doi: 10.1007/s11270-007-9336-x
- Christensen TH (1984) Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH, and calcium. *Water Air Soil Pollut* 21:105–114. doi: 10.1007/BF00163616
- Ciećko Z, Kalembasa S, Wyszowski M, Rolka E (2005) The magnesium content in plants on soil contaminated with cadmium. *Pol J Environ Stud* 14:365–370.
- Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N (2013) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci* 18:92–99. doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.003
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, et al (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12043–12048.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* 7:309–315.
- Cohen null, Fox null, Garvin null, Kochian null (1998) The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* 116:1063–1072.

-
- Cohen SD, Kennedy JA (2010) Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50:620–643. doi: 10.1080/10408390802603441
- Colville L, Kranner I (2010) Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regul* 62:241–255. doi: 10.1007/s10725-010-9482-9
- Das S, Green A (2013) Importance of zinc in crops and human health. *J SAT Agric Res* 11:1–7.
- Dheri GS, Singh Brar M, Malhi SS (2007) Influence of phosphorus application on growth and cadmium uptake of spinach in two cadmium-contaminated soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 170:495–499. doi: 10.1002/jpln.200625051
- Di Cagno R, Guidi L, De Gara L, Soldatini GF (2001) Combined cadmium and ozone treatments affect photosynthesis and ascorbate-dependent defences in sunflower. *New Phytol* 151:627–636. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00217.x
- Disante KB, Fuentes D, Cortina J (2011) Response to drought of Zn-stressed *Quercus suber* L. seedlings. *Environ Exp Bot* 70:96–103. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.08.008
- Dražić G, Mihailović N (2005) Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci* 168:511–517. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.09.019
- Dražić G, Mihailović N, Stojanović Z (2004) Cadmium Toxicity: The effect on Macro- and Micro-Nutrient Contents in Soybean Seedlings. *Biol Plant* 48:605–607. doi: 10.1023/B:BIOP.0000047160.79306.b7
- Dučaiová Z, Petruřová V, Repčák M (2013) Salicylic acid regulates secondary metabolites content in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biologia (Bratisl)* 68:904–909. doi: 10.2478/s11756-013-0217-z
- Ducsay L (2011) Obsah chlorofylu, kadmia a zinku v listoch slnečnice v podmienkach Cd a Zn stresu. *Chem Listy* 105:269–272.
- Dutta RK, Maharia RS (2012) Antioxidant responses of some common medicinal plants grown in copper mining areas. *Food Chem* 131:259–265. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.075
- Ekmekçi Y, Tanyolaç D, Ayhan B (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J Plant Physiol* 165:600–611. doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.017
- El Abidi A, Barcha S, Fekhaoui M, et al (2015) Biomonitoring of atmospheric lead, cadmium and zinc using *Eucalyptus* leaves in Rabat Salé City, Morocco. *Arab J Chem Environ Res* 2:72–83.
- Entry JA, Watrud LS, Reeves M (1999) Accumulation of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. *Environ Pollut* 104:449–457. doi: 10.1016/S0269-7491(98)00163-8
- Eriksson JE (1989) The influence of pH, soil type and time on adsorption and uptake by plants of Cd added to the soil. *Water Air Soil Pollut* 48:317–335. doi: 10.1007/BF00283334
- Fayiga AO, Ma LQ, Cao X, Rathinasabapathi B (2004) Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 132:289–296. doi: 10.1016/j.envpol.2004.04.020

-
- Fernández Espinosa AJ, Oliva SR (2006) The composition and relationships between trace element levels in inhalable atmospheric particles (PM10) and in leaves of *Nerium oleander* L. and *Lantana camara* L. *Chemosphere* 62:1665–1672. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.038
- Ferrat L, Pergent-Martini C, Roméo M (2003) Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquat Toxicol Amst Neth* 65:187–204.
- Fusconi A, Gallo C, Camusso W (2007) Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 632:9–19. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.03.012
- Fusconi A, Repetto O, Bona E, et al (2006) Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. *Frisson* seedlings. *Environ Exp Bot* 58:253–260. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.09.008
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, et al (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ Exp Bot* 83:33–46. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.04.006
- Gao C, Wang Y, Xiao D-S, et al (2011) Comparison of cadmium-induced iron-deficiency responses and genuine iron-deficiency responses in *Malus xiaojinensis*. *Plant Sci* 181:269–274. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.05.014
- Geiken B, Masojíddek J, Rizzuto M, et al (1998) Incorporation of [³⁵S]methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant Cell Environ* 21:1265–1273. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00361.x
- Giertych MJ, Karolewski P, Temmerman LO de (1999) Foliage Age and Pollution Alter Content of Phenolic Compounds and Chemical Elements in *Pinus nigra* Needles. *Water Air Soil Pollut* 110:363–377. doi: 10.1023/A:1005009214988
- Gill SS, Anjum NA, Gill R, et al (2013) Mechanism of Cadmium Toxicity and Tolerance in Crop Plants. In: Tuteja N, Gill SS (eds) *Crop Improvement Under Adverse Conditions*. Springer New York, pp 361–385
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale* 48:909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gonçalves JF, Antes FG, Maldaner J, et al (2009a) Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiol Biochem* 47:814–821. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.04.002
- Gonçalves JF, Becker AG, Cargnelutti D, et al (2007) Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Braz J Plant Physiol* 19:223–232. doi: 10.1590/S1677-04202007000300006
- Gonçalves JF, Nicoloso FT, Becker AG, et al (2009b) Photosynthetic pigments content, δ-aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities and mineral nutrients concentration in cadmium-exposed *Cucumis sativus* L. *Biologia (Bratisl)* 64:310–318. doi: 10.2478/s11756-009-0034-6
-

-
- Gouia H, Habib Ghorbal M, Meyer C (2000) Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol Biochem* 38:629–638. doi: 10.1016/S0981-9428(00)00775-0
- Gratao PL, Monteiro CC, Rossi ML, et al (2009) Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. *Environ Exp Bot* 67:387–394. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.06.017
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481–494.
- Greger M, Landberg T (2008) Role of rhizosphere mechanisms in Cd uptake by various wheat cultivars. *Plant Soil* 312:195–205. doi: 10.1007/s11104-008-9725-y
- Greger M, Ögren E (1991) Direct and indirect effects of Cd²⁺ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol Plant* 83:129–135. doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb01291.x
- Guo J, Xu W, Ma M (2012) The assembly of metals chelation by thiols and vacuolar compartmentalization conferred increased tolerance to and accumulation of cadmium and arsenic in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J Hazard Mater* 199–200:309–313. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.008
- Guo T-R, Zhang G-P, Zhou M-X, et al (2007) Influence of Aluminum and Cadmium Stresses on Mineral Nutrition and Root Exudates in Two Barley Cultivars. *Pedosphere* 17:505–512. doi: 10.1016/S1002-0160(07)60060-5
- Gupta M, Tripathi RD, Rai UN, Chandra P (1998) Role of glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (i.f.) Royle and *Vallisneria spiralis* L. under mercury stress. *Chemosphere* 37:785–800. doi: 10.1016/S0045-6535(98)00073-3
- Gupta N, Ram H, Kumar B (2016) Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15:89–109. doi: 10.1007/s11157-016-9390-1
- Hadi F, Bano A (2009) Utilization of *Parthenium hysterophorus* for the remediation of lead-contaminated soil. *Weed Biol Manag* 9:307–314. doi: 10.1111/j.1445-6664.2009.00355.x
- Hadi F, Bano A, Fuller MP (2010) The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays* L.): the role of plant growth regulators (GA3 and IAA) and EDTA alone and in combinations. *Chemosphere* 80:457–462. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.020
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11. doi: 10.1093/jexbot/53.366.1
- Hall JL, Williams LE (2003) Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot* 54:2601–2613. doi: 10.1093/jxb/erg303
- Hammami H, Parsa M, Mohassel MHR, et al (2016) Weeds ability to phytoremediate cadmium-contaminated soil. *Int J Phytoremediation* 18:48–53. doi: 10.1080/15226514.2015.1058336
- Hänsch R, Mendel RR (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* 12:259–266. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.006
- Hardiman RT, Jacoby B (1984) Absorption and translocation of Cd in bush beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant* 61:670–674. doi: 10.1111/j.1399-3054.1984.tb05189.x
-

-
- Harmens H, Ilyin I, Mills G, et al (2012) Country-specific correlations across Europe between modelled atmospheric cadmium and lead deposition and concentrations in mosses. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 166:1–9. doi: 10.1016/j.envpol.2012.02.013
- Harmens H, Norris DA, Steinnes E, et al (2010) Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: spatial patterns and temporal trends in Europe. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 158:3144–3156. doi: 10.1016/j.envpol.2010.06.039
- Harris NS, Taylor GJ (2013) Cadmium uptake and partitioning in durum wheat during grain filling. *BMC Plant Biol* 13:103. doi: 10.1186/1471-2229-13-103
- Harrison RM, Chirgawi MB (1989) The assessment of air and soil as contributors of some trace metals to vegetable plants I. Use of a filtered air growth cabinet. *Sci Total Environ* 83:13–34. doi: 10.1016/0048-9697(89)90003-X
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, et al (1998) Characterization of Cadmium Binding, Uptake, and Translocation in Intact Seedlings of Bread and Durum Wheat Cultivars. *Plant Physiol* 116:1413–1420.
- Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, et al (2009) Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J Environ Biol Acad Environ Biol India* 30:165–174.
- Hashimoto Y, Yamaguchi N (2013) Chemical Speciation of Cadmium and Sulfur K-Edge XANES Spectroscopy in Flooded Paddy Soils Amended with Zerovalent Iron. *Soil Sci Soc Am J* 77:1189. doi: 10.2136/sssaj2013.01.0038
- Hassan MJ, Zhang G, Wu F, et al (2005) Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. *J Plant Nutr Soil Sci* 168:255–261. doi: 10.1002/jpln.200420403
- Hassan Z, Aarts MGM (2011) Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environ Exp Bot* 72:53–63. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.04.003
- Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat H, Kärenlampi SO (2011) Plant metallothioneins--metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol Stuttg Ger* 13:225–232. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x
- Haudecoeur E, Planamente S, Cirou A, et al (2009) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci* 106:14587–14592. doi: 10.1073/pnas.0808005106
- Haugaard N (2000) Reflections on the role of the thiol group in biology. *Ann N Y Acad Sci* 899:148–158.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ Exp Bot* 68:14–25. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.08.005
- Hayat S, Ali B, Ahmad A (2007) Salicylic Acid: Biosynthesis, Metabolism and Physiological Role in Plants. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer Netherlands, pp 1–14
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, et al (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav* 7:1456–1466. doi: 10.4161/psb.21949

-
- He J, Ren Y, Zhu C, Jiang D (2008) Effects of Cadmium Stress on Seed Germination, Seedling Growth and Seed Amylase Activities in Rice (*Oryza sativa*). *Rice Sci* 15:319–325. doi: 10.1016/S1672-6308(09)60010-X
- He QB, Singh BR (1994) Crop uptake of cadmium from phosphorus fertilizers: I. Yield and cadmium content. *Water Air Soil Pollut* 74:251–265. doi: 10.1007/BF00479793
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, et al (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* 88:1751–1765. doi: 10.1016/j.biochi.2006.04.018
- Hermans C, Johnson GN, Strasser RJ, Verbruggen N (2004) Physiological characterisation of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220:344–355. doi: 10.1007/s00425-004-1340-4
- Hernandez LE, Carpena-Ruiz R, Gárate A (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr* 19:1581–1598. doi: 10.1080/01904169609365223
- Hernández-Allica J, Garbisu C, Becerril JM, et al (2006) Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* 29:1422–1429.
- Herren T, Feller U (1997) Transport of Cadmium via Xylem and Phloem in Maturing Wheat Shoots: Comparison with the Translocation of Zinc, Strontium and Rubidium. *Ann Bot* 80:623–628. doi: 10.1006/anbo.1997.0492
- Heyno E, Klose C, Krieger-Liszkay A (2008) Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol* 179:687–699. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02512.x
- Holy M, Pesch R, Schröder W, et al (2009) First thorough identification of factors associated with Cd, Hg and Pb concentrations in mosses sampled in the European Surveys 1990, 1995, 2000 and 2005. *J Atmospheric Chem* 63:109–124. doi: 10.1007/s10874-010-9160-3
- Horváth E, Szalai G, Janda T (2007) Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *J Plant Growth Regul* 26:290–300. doi: 10.1007/s00344-007-9017-4
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, et al (2012) Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation, Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J Bot J Bot* 2012, 2012:e872875. doi: 10.1155/2012/872875, 10.1155/2012/872875
- Hovmand MF, Tjell JC, Mosbaek H (1983) Plant uptake of airborne cadmium. *Environ Pollut Ser Ecol Biol* 30:27–38. doi: 10.1016/0143-1471(83)90029-6
- Howladar SM (2014) A novel *Moringa oleifera* leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 100:69–75. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.11.022
- Hsu YT, Kao CH (2007) Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Soil* 298:231–241. doi: 10.1007/s11104-007-9357-7

-
- Hu P-J, Qiu R-L, Senthilkumar P, et al (2009) Tolerance, accumulation and distribution of zinc and cadmium in hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *Environ Exp Bot* 66:317–325. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.02.014
- Hu YF, Zhou G, Na XF, et al (2013) Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Physiol* 170:965–975. doi: 10.1016/j.jplph.2013.02.008
- Irtelli B, Navari-Izzo F (2006) Influence of sodium nitrilotriacetate (NTA) and citric acid on phenolic and organic acids in *Brassica juncea* grown in excess of cadmium. *Chemosphere* 65:1348–1354. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.014
- Ishikawa S, Abe T, Kuramata M, et al (2010) A major quantitative trait locus for increasing cadmium-specific concentration in rice grain is located on the short arm of chromosome 7. *J Exp Bot* 61:923–934. doi: 10.1093/jxb/erp360
- Islam MM, Hoque MA, Okuma E, et al (2009) Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol* 166:1587–1597. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.002
- Ivanova A, Krantev A, Stoyanova ZH, Popova L (2008) Cadmium-induced changes in maize leaves and the protective role of salicylic acid. *Gen Appl Plant Physiol* 34:149–158.
- Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H (2003) Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. *Angew Chem - Int Ed* 42:4742–4758. doi: 10.1002/anie.200300573
- Jia Y, Zhang Y, Li H (2008) Translocation and allocation of cadmium in cucumber and rape seedlings. *Chin J Ecol* 27:117–121.
- Jung C, Maeder V, Funk F, et al (2003) Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 252:301–312. doi: 10.1023/A:1024775803759
- Karina B, Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2003) Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Funct Plant Biol* 30:57–64.
- Keshan U, Mukherji S (1992) Effect of cadmium toxicity on chlorophyll content, hill activity and chlorophyllase activity in *Vigna radiata* L. Leaves. *Indian J Plant Physiol India* 225–230.
- Khan K, Lu Y, Khan H, et al (2013) Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 58:449–458. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.014
- Khan MA, Castro-Guerrero NA, Mendoza-Cozatl D (2014) Moving toward a precise nutrition: preferential loading of seeds with essential nutrients over non-essential toxic elements. *Plant Nutr* 5:51. doi: 10.3389/fpls.2014.00051
- Khaokaew S, Chaney RL, Landrot G, et al (2011) Speciation and Release Kinetics of Cadmium in an Alkaline Paddy Soil under Various Flooding Periods and Draining Conditions. *Environ Sci Technol* 45:4249–4255. doi: 10.1021/es103971y
- Khoshgoftar AH, Shariatmadari H, Karimian N, et al (2004) Salinity and zinc application effects on phytoavailability of cadmium and zinc. *Soil Sci Soc Am J* 68:1885–1889.
- Kim C-G, Bell JNB, Power SA (2003) Effects of soil cadmium on *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Plant Soil* 257:443–449. doi: 10.1023/A:1027380507087
-

-
- Kirkham MB (2006) Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137:19–32. doi: 10.1016/j.geoderma.2006.08.024
- Kochian LV, Pence NS, Letham DLD, et al (2002) Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant Soil* 247:109–119. doi: 10.1023/A:1021141212073
- Kolbert Z, Pető A, Lehotai N, et al (2012) Long-term copper (Cu²⁺) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Growth Regul* 68:151–159. doi: 10.1007/s10725-012-9701-7
- Koren Š, Arčon I, Kump P, et al (2013) Influence of CdCl₂ and CdSO₄ supplementation on Cd distribution and ligand environment in leaves of the Cd hyperaccumulator *Noccaea (Thlaspi) praecox*. *Plant Soil* 370:125–148. doi: 10.1007/s11104-013-1617-0
- Kováčik J, Backor M, Kaduková J (2008) Physiological responses of *Matricaria chamomilla* to cadmium and copper excess. *Environ Toxicol* 23:123–130. doi: 10.1002/tox.20315
- Kováčik J, Grúz J, Hedbavny J, et al (2009a) Cadmium and nickel uptake are differentially modulated by salicylic acid in *Matricaria chamomilla* plants. *J Agric Food Chem* 57:9848–9855. doi: 10.1021/jf902645c
- Kováčik J, Grúz J, Klejdus B, et al (2010) Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: Role of H₂O₂ and NO in this process. *Plant Sci* 179:383–389. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.06.014
- Kováčik J, Klejdus B (2008) Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep* 27:605–615. doi: 10.1007/s00299-007-0490-9
- Kováčik J, Klejdus B, Backor M (2009b) Phenolic metabolism of *Matricaria chamomilla* plants exposed to nickel. *J Plant Physiol* 166:1460–1464. doi: 10.1016/j.jplph.2009.03.002
- Kováčik J, Klejdus B, Hedbavny J, Zoň J (2011) Significance of phenols in cadmium and nickel uptake. *J Plant Physiol* 168:576–584. doi: 10.1016/j.jplph.2010.09.011
- Kovács V, Gondor OK, Szalai G, et al (2014) Synthesis and role of salicylic acid in wheat varieties with different levels of cadmium tolerance. *J Hazard Mater* 280:12–19. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.07.048
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, et al (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379:635–638. doi: 10.1038/379635a0
- Krantev A, Yordanova R, Janda T, et al (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol* 165:920–931. doi: 10.1016/j.jplph.2006.11.014
- Kubo K, Watanabe Y, Oyanagi A, et al (2008) Cadmium Concentration in Grains of Japanese Wheat Cultivars: Genotypic Difference and Relationship with Agronomic Characteristics (Genetic Resources Evaluation). *Plant Prod Sci* 11:243–249.
- Kudo H, Kudo K, Ambo H, et al (2011) Cadmium sorption to plasma membrane isolated from barley roots is impeded by copper association onto membranes. *Plant Sci* 180:300–305. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.09.008
- Küpper H, Kochian LV (2010) Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi*
-

-
- caerulescens* (Ganges population). *New Phytol* 185:114–129. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03051.x
- Küpper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH (2004) Tissue- and Age-Dependent Differences in the Complexation of Cadmium and Zinc in the Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) Revealed by X-Ray Absorption Spectroscopy. *Plant Physiol* 134:748–757. doi: 10.1104/pp.103.032953
- Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, et al (2007) Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175:655–674. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x
- Kurtyka R, Malkowski E, Kita A, Karcz W (2008) Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Pol J Environ Stud* 1:51–56.
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Abscisic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiol* 128:682–695. doi: 10.1104/pp.010320
- Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E, Tel-Or E (2001) Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae) and *Nymphaeae* (Nymphaeaceae). *Planta* 214:189–195.
- Lee K, Bae DW, Kim SH, et al (2010) Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *J Plant Physiol* 167:161–168. doi: 10.1016/j.jplph.2009.09.006
- Lee SS, Lim JE, El-Azeem SAMA, et al (2013) Heavy metal immobilization in soil near abandoned mines using eggshell waste and rapeseed residue. *Environ Sci Pollut Res* 20:1719–1726. doi: 10.1007/s11356-012-1104-9
- Li DD, Zhou DM (2012) Acclimation of wheat to low-level cadmium or zinc generates its resistance to cadmium toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 79:264–271. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.01.012
- Li S, Yang W, Yang T, et al (2015) Effects of Cadmium Stress on Leaf Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis of *Elsholtzia argyi*--A Cadmium Accumulating Plant. *Int J Phytoremediation* 17:85–92. doi: 10.1080/15226514.2013.828020
- Li XM, Ma LJ, Bu N, et al (2013) Effects of salicylic acid pre-treatment on cadmium and/or UV-B stress in soybean seedlings. *Biol Plant* 58:195–199. doi: 10.1007/s10535-013-0375-4
- Li Y-M, Chaney RL, Schneiter AA (1994) Effect of soil chloride level on cadmium concentration in sunflower kernels. *Plant Soil* 167:275–280. doi: 10.1007/BF00007954
- Li Z, Li L, Chen GPJ (2005) Bioavailability of Cd in a soil–rice system in China: soil type versus genotype effects. *Plant Soil* 271:165–173. doi: 10.1007/s11104-004-2296-7
- Lim JE, Ahmad M, Usman ARA, et al (2012) Effects of natural and calcined poultry waste on Cd, Pb and As mobility in contaminated soil. *Environ Earth Sci* 69:11–20. doi: 10.1007/s12665-012-1929-z
- Lin CC, Kao CH (2000) Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regul* 30:151–155. doi: 10.1023/A:1006345126589
-

-
- Lin L, Liao M, Mei L (2012) A Review of Cucumber under Cadmium Stress. 2012 Asia Pacific Conference on Environmental Science and Technology(APEST 2012), Kuala Lumpur, Malaysia. *Adv Biomed Eng* 6:443–447.
- Liu D, Jiang W, Gao X (2003) Effects of Cadmium on Root Growth, Cell Division and Nucleoli in Root Tip Cells of Garlic. *Biol Plant* 47:79–83. doi: 10.1023/A:1027384932338
- Liu J, Qian M, Cai G, et al (2007a) Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. *J Hazard Mater* 143:443–447. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.09.057
- Liu W, Zhang X, Zhang F (2000) The mobilization of root exudates on CdS in rice rhizosphere and their effect on Cd uptake and transport. *Acta Ecol Sin* 20:448–451.
- Liu Y, Wang X, Zeng G, et al (2007b) Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckmeria nivea* (L.) Gaud. *Chemosphere* 69:99–107. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.04.040
- Llugany M, Tolrà R, Martín SR, et al (2013) Cadmium-induced changes in glutathione and phenolics of *Thlaspi* and *Noccaea* species differing in Cd accumulation. *J Plant Nutr Soil Sci* 176:851–858. doi: 10.1002/jpln.201300096
- Lombi E, Tearall KL, Howarth JR, et al (2002) Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 128:1359–1367. doi: 10.1104/pp.010731
- Lone MI, He Z, Stoffella PJ, Yang X (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:210–220. doi: 10.1631/jzus.B0710633
- López-Chuken UJ, Young SD, Sánchez-González MN (2010) The use of chloro-complexation to enhance cadmium uptake by *Zea mays* and *Brassica juncea*: testing a “free ion activity model” and implications for phytoremediation. *Int J Phytoremediation* 12:680–696. doi: 10.1080/15226510903353161
- Lu L, Tian S, Yang X, et al (2009) Cadmium uptake and xylem loading are active processes in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J Plant Physiol* 166:579–587. doi: 10.1016/j.jplph.2008.09.001
- Makovnikova J, Barancikova G, Dlapa P, Dercova K (2006) Anorganické kontaminanty V pôdnom ekosystéme. *Chem Listy* 100:424–432.
- Malčovská SM, Dučaiová Z, Maslaňáková I, Bačkor M (2014) Effect of Silicon on Growth, Photosynthesis, Oxidative Status and Phenolic Compounds of Maize (*Zea mays* L.) Grown in Cadmium Excess. *Water Air Soil Pollut* 225:1–11. doi: 10.1007/s11270-014-2056-0
- Malik D, Sheoran IS, Singh R (1992) Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings. *Plant Physiol Biochem* 30:223–229.
- Mallick N, Mohn FH (2003) Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:64–69. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00122-7
- Manara A (2012) Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. In: Furini A (ed) *Plants and Heavy Metals*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 27–53

-
- Márquez-García B, Fernández-Recamales MÁ, Córdoba F, et al (2012) Effects of Cadmium on Phenolic Composition and Antioxidant Activities of *Erica andevalensis*. J Bot J Bot 2012, 2012:e936950. doi: 10.1155/2012/936950, 10.1155/2012/936950
- Martínez-Peñalver A, Graña E, Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras AM (2012) The early response of *Arabidopsis thaliana* to cadmium- and copper-induced stress. Environ Exp Bot 78:1–9. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.017
- Matusik J, Bajda T, Manecki M (2008) Immobilization of aqueous cadmium by addition of phosphates. J Hazard Mater 152:1332–1339. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.08.010
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz K-J (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiol 132:272–281. doi: 10.1104/pp.102.018457
- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz K-J (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. J Exp Bot 56:167–178. doi: 10.1093/jxb/eri017
- Meyer AJ, Hell R (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. Photosynth Res 86:435–457. doi: 10.1007/s11120-005-8425-1
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, et al (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. J Exp Bot 61:4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Pol J Environ Stud 15:523–530.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, et al (2006a) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale 44:25–37. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.01.007
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, et al (2006b) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. Chemosphere 65:1027–1039. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.033
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 7:405–410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Miyadate H, Adachi S, Hiraizumi A, et al (2011) OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. New Phytol 189:190–199. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03459.x
- Monni S, Uhlig C, Hansen E, Magel E (2001) Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. Environ Pollut 112:121–129. doi: 10.1016/S0269-7491(00)00125-1
- Moradi A, Abbaspour KC, Afyuni M (2005) Modelling field-scale cadmium transport below the root zone of a sewage sludge amended soil in an arid region in Central Iran. J Contam Hydrol 79:187–206. doi: 10.1016/j.jconhyd.2005.07.005
- Moussa HR, El-Gamal SM (2010) Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat. Biol Plant 54:315–320. doi: 10.1007/s10535-010-0054-7
- Mugford SG, Lee B-R, Koprivova A, et al (2011) Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism. Plant J Cell Mol Biol 65:96–105. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04410.x

-
- Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, et al (2006) Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Sci Plant Nutr* 52:464–469. doi: 10.1111/j.1747-0765.2006.00055.x
- Nedjimi B, Daoud Y (2009) Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 204:316–324. doi: 10.1016/j.flora.2008.03.004
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5:388–395.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:730–750.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27:313–339.
- Nocito FF, Pirovano L, Cocucci M, Sacchi GA (2002) Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol* 129:1872–1879. doi: 10.1104/pp.002659
- Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, et al (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 49:623–647. doi: 10.1093/jxb/49.321.623
- Norvell WA, Wu J, Hopkins DG, Welch RM (2000) Association of Cadmium in Durum Wheat Grain with Soil Chloride and Chelate-Extractable Soil Cadmium. *Soil Sci Soc Am J* 64:2162. doi: 10.2136/sssaj2000.6462162x
- Nyitrai P, Bóka K, Gáspár L, et al (2003) Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *J Plant Physiol* 160:1175–1183. doi: 10.1078/0176-1617-00770
- Obata H, Umebayashi M (1997) Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *J Plant Nutr* 20:97–105. doi: 10.1080/01904169709365236
- Obrador A, Novillo J, Alvarez JM (2003) Mobility and Availability to Plants of Two Zinc Sources Applied to a Calcareous Soil. *Soil Sci Soc Am J* 67:564. doi: 10.2136/sssaj2003.5640
- Ok YS, Usman ARA, Lee SS, et al (2011) Effects of rapeseed residue on lead and cadmium availability and uptake by rice plants in heavy metal contaminated paddy soil. *Chemosphere* 85:677–682. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.073
- Oporto C, Smolders E, Degryse F, et al (2008) DGT-measured fluxes explain the chloride-enhanced cadmium uptake by plants at low but not at high Cd supply. *Plant Soil* 318:127–135. doi: 10.1007/s11104-008-9823-x
- Ouariti O, Boussama N, Zarrouk M, et al (1997) Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* 45:1343–1350.
- Ozkutlu F, Ozturk L, Erdem H, et al (2007) Leaf-applied sodium chloride promotes cadmium accumulation in durum wheat grain. *Plant Soil* 290:323–331. doi: 10.1007/s11104-006-9164-6
- Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK (1990) Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* 24:399–405.
- Page V, Feller U (2015) Heavy Metals in Crop Plants: Transport and Redistribution Processes on the Whole Plant Level. *Agronomy* 5:447–463. doi: 10.3390/agronomy5030447
-

-
- Page V, Feller U (2005) Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Ann Bot* 96:425–434. doi: 10.1093/aob/mci189
- Page V, Weisskopf L, Feller U (2006) Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol* 171:329–341. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01756.x
- Pál M, Horváth E, Janda T, et al (2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J Plant Nutr Soil Sci* 169:239–246. doi: 10.1002/jpln.200520573
- Pavlíková D, Pavlík M, Staszková L, et al (2008) Glutamate kinase as a potential biomarker of heavy metal stress in plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 70:223–230. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.07.006
- Pavlíková D, Zemanová V, Procházková D, et al (2014) The long-term effect of zinc soil contamination on selected free amino acids playing an important role in plant adaptation to stress and senescence. *Ecotoxicol Environ Saf* 100:166–170. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.028
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J Cell Mol Biol* 32:539–548.
- Persans MW, Salt DE (2000) Possible Molecular Mechanisms Involved in Nickel, Zinc and Selenium Hyperaccumulation in Plants. *Biotechnol Genet Eng Rev* 17:389–416. doi: 10.1080/02648725.2000.10647999
- Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitão MAS, et al (2003) Heavy Metal–Induced Oxidative Stress in *Algae*1. *J Phycol* 39:1008–1018. doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
- Pivato M, Fabrega-Prats M, Masi A (2014) Low-molecular-weight thiols in plants: Functional and analytical implications. *Arch Biochem Biophys* 560:83–99. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.018
- Popova L, Maslenkova L, Yordanova R, et al (2008) Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity I pea plants. *Gen Appl Plant Physiol* 34:133–148.
- Popova LP, Maslenkova LT, Yordanova RY, et al (2009) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale* 47:224–231. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.11.007
- Prasad MNV (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ Exp Bot* 35:525–545. doi: 10.1016/0098-8472(95)00024-0
- Qiu R-L, Thangavel P, Hu P-J, et al (2011) Interaction of cadmium and zinc on accumulation and sub-cellular distribution in leaves of hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *J Hazard Mater* 186:1425–1430. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.014
- Quinn CJ, Mohammad A, Macfie SM (2011) Accumulation of cadmium in near-isogenic lines of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*): the role of transpiration. *Physiol Mol Biol Plants Int J Funct Plant Biol* 17:317–325. doi: 10.1007/s12298-011-0086-2
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Gárate A (2002) Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction. *Plant Sci* 162:761–767. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00017-1

-
- Rascio N, Dalla Vecchia F, La Rocca N, et al (2008) Metal accumulation and damage in rice (cv. *Vialone nano*) seedlings exposed to cadmium. *Environ Exp Bot* 62:267–278. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.09.002
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci* 180:169–181. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.08.016
- Rattan RK, Datta SP, Chhonkar PK, et al (2005) Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater—a case study. *Agric Ecosyst Environ* 109:310–322. doi: 10.1016/j.agee.2005.02.025
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Redjala T, Sterckeman T, Morel JL (2009) Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. *Environ Exp Bot* 67:235–242. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.05.012
- Reeves RD, Baker AJM (2000) Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*. New York, John Wiley and Sons, pp 29–38
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9
- Riesen O, Feller U (2005) Redistribution of Nickel, Cobalt, Manganese, Zinc, and Cadmium via the Phloem in Young and Maturing Wheat. *J Plant Nutr* 28:421–430. doi: 10.1081/PLN-200049153
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M (1997) Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ* 20:600–608. doi: 10.1111/j.1365-3040.1997.00072.x
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, et al (2009) Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol* 150:229–243. doi: 10.1104/pp.108.131524
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, et al (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* 29:1532–1544.
- Roosens N, Verbruggen N, Meerts P, et al (2003) Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant Cell Environ* 26:1657–1672. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.01084.x
- Rout GR, Das P (2009) Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, et al. (eds) *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, pp 873–884
- Saidi I, Ayouni M, Dhieb A, et al (2013) Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants: Protective role of salicylic acid. *South Afr J Bot* 85:32–38. doi: 10.1016/j.sajb.2012.12.002

-
- Saifullah, Sarwar N, Bibi S, et al (2013) Effectiveness of zinc application to minimize cadmium toxicity and accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Earth Sci* 71:1663–1672. doi: 10.1007/s12665-013-2570-1
- Sakihama Y, Yamasaki H (2002) Lipid Peroxidation Induced by Phenolics in Conjunction with Aluminum Ions. *Biol Plant* 45:249–254. doi: 10.1023/A:1015152908241
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I (1995) Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol* 109:1427–1433. doi: 10.1104/pp.109.4.1427
- Sanaeiostovar A, Khoshgoftarmanesh AH, Shariatmadari H (2011) Effects of zinc activity in nutrient solution on uptake, translocation, and root export of cadmium and zinc in three wheat genotypes with different zinc efficiencies. *Soil Sci Plant Nutr* 57:681–690. doi: 10.1080/00380768.2011.617290
- Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Río LA del, Romero-Puertas MC (2009) Reactive Oxygen Species and Signaling in Cadmium Toxicity. In: Río LA, Puppo A (eds) *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*. Springer Berlin Heidelberg, pp 175–189
- Sanità di Toppi L, Gabrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41:105–130. doi: 10.1016/S0098-8472(98)00058-6
- Sarry J-E, Kuhn L, Ducruix C, et al (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6:2180–2198. doi: 10.1002/pmic.200500543
- Saruhan N, Saglam A, Kadioglu A (2011) Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. *Acta Physiol Plant* 34:97–106. doi: 10.1007/s11738-011-0808-7
- Sarwar N, Saifullah, Malhi SS, et al (2010) Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *J Sci Food Agric* 90:925–937. doi: 10.1002/jsfa.3916
- Sbartai H, Djebbar MR, Sbartai I, Berrabbah H (2012) Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.). *C R Biol* 335:585–593. doi: 10.1016/j.crv.2012.08.001
- Schröder W, Holy M, Pesch R, et al (2010) Are cadmium, lead and mercury concentrations in mosses across Europe primarily determined by atmospheric deposition of these metals? *J Soils Sediments* 10:1572–1584. doi: 10.1007/s11368-010-0254-y
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, et al (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol* 127:887–898.
- Semane B, Cuyppers A, Smeets K, et al (2007) Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol Plant* 129:519–528. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00822.x
- Seregin IV, Ivanov VB (2001) Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ J Plant Physiol* 48:523–544. doi: 10.1023/A:1016719901147
- Šeršeň F, Král'ová K (2001) New Facts about CdCl₂ Action on the Photosynthetic Apparatus of Spinach Chloroplasts and Its Comparison with HgCl₂ Action. *Photosynthetica* 39:575–580. doi: 10.1023/A:1015612330650
-

-
- Seth CS, Misra V, Chauhan LKS, Singh RR (2008) Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:711–716. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.02.003
- Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118:21–28. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00068.x
- Shah BA, Shah AV, Singh RR (2008) Sorption isotherms and kinetics of chromium uptake from wastewater using natural sorbent material. *Int J Environ Sci Technol* 6:77–90. doi: 10.1007/BF03326062
- Shamsi IH, Wei K, Jilani G, Zhang G (2007) Interactions of cadmium and aluminum toxicity in their effect on growth and physiological parameters in soybean. *J Zhejiang Univ Sci B* 8:181–188. doi: 10.1631/jzus.2007.B0181
- Sharma SS, Dietz K-J (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14:43–50. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.007
- Shi G, Liu C, Cai Q, et al (2010) Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:256–263. doi: 10.1007/s00128-010-0067-0
- Shi GR, Cai QS, Liu QQ, Wu L (2009) Salicylic acid-mediated alleviation of cadmium toxicity in hemp plants in relation to cadmium uptake, photosynthesis, and antioxidant enzymes. *Acta Physiol Plant* 31:969–977. doi: 10.1007/s11738-009-0312-5
- Shukla UC, Singh J, Joshi PC, Kakkar P (2003) Effect of bioaccumulation of cadmium on biomass productivity, essential trace elements, chlorophyll biosynthesis, and macromolecules of wheat seedlings. *Biol Trace Elem Res* 92:257–274. doi: 10.1385/BTER:92:3:257
- Shweta M, Agrawal SB (2006) Interactive effects between supplemental ultraviolet-B radiation and heavy metals on the growth and biochemical characteristics of *Spinacia oleracea* L. *Braz J Plant Physiol* 18:307–314. doi: 10.1590/S1677-04202006000200007
- Siddhu G, Ali Khan MA (2012) Effects of cadmium on growth and metabolism of *Phaseolus mungo*. *J Environ Biol Acad Environ Biol India* 33:173–179.
- Siddiqui S, Meghvansi MK, Wani MA, Jabee F (2009) Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Physiol Plant* 31:531–536. doi: 10.1007/s11738-008-0262-3
- Sigfridsson KGV, Bernát G, Mamedov F, Styring S (2004) Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1659:19–31. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.07.003
- Šiler B, Živković S, Banjanac T, et al (2014) Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem* 147:367–376. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.007
- Singh BR, Narwal RP, Jeng AS, Almas Å (1995) Crop uptake and extractability of cadmium in soils naturally high in metals at different pH levels. *Commun Soil Sci Plant Anal* 26:2123–2142. doi: 10.1080/00103629509369434
- Singh HP, Batish DR, Kaur G, et al (2008) Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ Exp Bot* 63:158–167. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.12.005
-

-
- Sivaci A, Elmas E (2012) The combined effects of cadmium and salinity on some pigments and total phenolic compounds of *Myriophyllum heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. *Afr J Agric Res* 26:3813–3818.
- Sivaci A, Sivaci ER, Sökmen M (2007) Changes in antioxidant activity, total phenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* Orchard exposed to cadmium. *Ecotoxicol Lond Engl* 16:423–428. doi: 10.1007/s10646-007-0145-1
- Smeets K, Ruytinx J, Semane B, et al (2008) Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ Exp Bot* 63:1–8. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.10.028
- Smolders E (2001) Cadmium uptake by plants. *Int J Occup Med Environ Health* 14:177–183.
- Sofo A, Dichio B, Montanaro G, Xiloyannis C (2010) Photosynthetic performance and light response of two olive cultivars under different water and light regimes. *Photosynthetica* 47:602–608. doi: 10.1007/s11099-009-0086-4
- Solti Á, Sárvári É, Tóth B, et al (2011) Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar. *Plant Physiol Biochem* 49:494–498. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.01.011
- Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG (2004) Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 136:2475–2482. doi: 10.1104/pp.104.048231
- Song W-Y, Park J, Mendoza-Cózatl DG, et al (2010) Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci* 107:21187–21192. doi: 10.1073/pnas.1013964107
- Soudek P, Petrová Š, Benešová D, et al (2008) Phytoremediation and Possibilities of Increasing Its Effectivity. *Chem Listy* 102:346–352.
- Stiborova M (1988) Cd²⁺ Ions Affect the Quaternary Structure of Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase from Barley Leaves. *Biochem Physiol Pflanz* 183:371–378. doi: 10.1016/S0015-3796(88)80045-3
- Suchara I, Rulík P, Hůlka J, Pilátová H (2011) Retrospective determination of ¹³⁷Cs specific activity distribution in spruce bark and bark aggregated transfer factor in forests on the scale of the Czech Republic ten years after the Chernobyl accident. *Sci Total Environ* 409:1927–1934. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.02.019
- Suchara I, Sucharová J, Holá M, et al (2016) Long-term retention of ¹³⁷Cs in three forest soil types with different soil properties. *J Environ Radioact* 158–159:102–113. doi: 10.1016/j.jenvrad.2016.04.010
- Sun C, Liu J, Wang Y, et al (2013) Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and sources of heavy metals in agricultural soil in Dehui, Northeast China. *Chemosphere* 92:517–523. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.063
- Sun R, Zhou Q, Wei S (2010) Cadmium Accumulation in Relation to Organic Acids and Nonprotein Thiols in Leaves of the Recently Found Cd Hyperaccumulator *Rorippa globosa* and the Cd-accumulating Plant *Rorippa islandica*. *J Plant Growth Regul* 30:83–91. doi: 10.1007/s00344-010-9176-6

-
- Supalkova V, Huska D, Diopan V, et al (2007) Electroanalysis of Plant Thiols. *Sensors* 7:932–959. doi: 10.3390/s7060932
- Szalai G, Krantev A, Yordanova R, et al (2013) Influence of salicylic acid on phytochelatin synthesis in *Zea mays* during Cd stress. *Turk J Bot* 37:708–714.
- Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci* 13:178–182. doi: 10.1016/j.tplants.2008.01.005
- Tao S, Sun L, Ma C, et al (2013) Reducing basal salicylic acid enhances *Arabidopsis* tolerance to lead or cadmium. *Plant Soil* 372:309–318. doi: 10.1007/s11104-013-1749-2
- Terry PA, Stone W (2002) Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. *Chemosphere* 47:249–255. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00303-4
- Tiryakioğlu M, Eker S, Ozkutlu F, et al (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS* 20:181–189. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.12.004
- Tlustoš P, Száková J, Kořínek K, et al (2006) The effect of liming on cadmium, lead, and zinc uptake reduction by spring wheat grown in contaminated soil. *Plant Soil Env* 52:16–24.
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG (2004) Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Sci* 9:7–9. doi: 10.1016/j.tplants.2003.11.009
- Tran TA, Popova LP (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk J Bot* 37:1–13.
- Tripathi RD, Rai UN, Gupta M, Chandra P (1996) Induction of phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) royle under cadmium stress. *Bull Environ Contam Toxicol* 56:505–512.
- Tudoreanu L, Phillips CJC (2004) Modeling Cadmium Uptake and Accumulation in Plants. In: *Agronomy B-A* in (ed). Academic Press, pp 121–157
- Tuma J, Skalicky M, Tumova L, et al (2008) The Translocation of Zinc in *Avena Sativa* L. Depending on Fertilisation with Zinc and Mobile Anions. *Cereal Res Commun* 36:1083–1086.
- Tuma J, Skalicky M, Tumova L, Flidr J (2014) Influence of Cadmium Dose and Form on the Yield of Oat (*Avena Sativa* L.) and the Metal Distribution in the Plant. *J Elem* 19:795–809. doi: 10.5601/jelem.2014.19.3.448
- Tuma J, Skalicky M, Tumova L, Safrankova M (2010) Translocation of nickel in *Avena sativa*: The effect of accompanying mobile anions. *Fresenius Environ Bull* 19:2974–2980.
- Tuma J, Svojanovska H (2015) *Avena Sativa* Cadmium Content, Distribution and Toxicity in Dependence on Concentration of Zinc and Nickel in Nutrient Medium. *Fresenius Environ Bull* 24:1798–1803.
- Umar S, Moinuddin V (2002) Genotypic Differences in Yield and Quality of Groundnut as Affected by Potassium Nutrition Under Erratic Rainfall Conditions. *J Plant Nutr* 25:1549–1562. doi: 10.1081/PLN-120005407
- Vaillant N, Monnet F, Hitmi A, et al (2005) Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59:1005–1013. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.030

-
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:178–189. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
- Valentovičová K, Halušková L, Šubica, Huttová J, et al (2010) Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *J Plant Physiol* 167:10–14. doi: 10.1016/j.jplph.2009.06.018
- van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 66:511–517. doi: 10.1016/S0308-8146(99)00089-8
- Vasconcelos MT, Azenha M, de Freitas V (1999) Role of Polyphenols in Copper Complexation in Red Wines. *J Agric Food Chem* 47:2791–2796. doi: 10.1021/jf981032x
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12:364–372. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.001
- Veselov D, Kudoyarova D, Symonyan M, Veselov S (2003) Effect Of Cadmium on ion uptake, transpiration and Cytokinin Content in Wheat Seedling. *Bulg J Plant Physiol* 29:353–359.
- Vogel-Mikuš K, Arčon I, Kodre A (2010) Complexation of cadmium in seeds and vegetative tissues of the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as studied by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Soil* 331:439–451. doi: 10.1007/s11104-009-0264-y
- Vranová E, Inzé D, Breusegem FV (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53:1227–1236. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1227
- Wahid A, Ghani A, Javed F (2008) Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. *Agron Sustain Dev* 28:273–280. doi: 10.1051/agro:2008010
- Wang GS, Ottman M, Chaney RL (2011a) Effects of Zn fertilizer on cadmium accumulation in durum wheat. *Forage Grain Coll Agric Life Sci Rep* 58–62.
- Wang J, Zhang CB, Jin ZX (2009) The distribution and phytoavailability of heavy metal fractions in rhizosphere soils of *Paulownia fortunei* (seem) Hems near a Pb/Zn smelter in Guangdong, PR China. *Geoderma* 148:299–306. doi: 10.1016/j.geoderma.2008.10.015
- Wang X, Liu Y, Zeng G, et al (2008a) Pedological characteristics of Mn mine tailings and metal accumulation by native plants. *Chemosphere* 72:1260–1266. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.001
- Wang Y, Yan A, Dai J, et al (2011b) Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator. *Environ Monit Assess* 184:929–937. doi: 10.1007/s10661-011-2010-1
- Wang Z, Zhang Y, Huang Z, Huang L (2008b) Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil* 310:137–149. doi: 10.1007/s11104-008-9641-1
- Welch RM, Hart JJ, Norvell WA, et al (1999) Effects of nutrient solution zinc activity on net uptake, translocation, and root export of cadmium and zinc by separated sections of intact durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) seedling roots. *Plant Soil* 208:243–250. doi: 10.1023/A:1004598228978

-
- Weng B, Xie X, Weiss DJ, et al (2012) *Kandelia obovata* (S., L.) Yong tolerance mechanisms to Cadmium: Subcellular distribution, chemical forms and thiol pools. *Mar Pollut Bull* 64:2453–2460. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.07.047
- White PJ, Broadley MR (2001) Chloride in Soils and its Uptake and Movement within the Plant: A Review. *Ann Bot* 88:967–988. doi: 10.1006/anbo.2001.1540
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:218–223. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X
- Wójcik M, Skórzyńska-Polit E, Tukiendorf A (2006) Organic Acids Accumulation and Antioxidant Enzyme Activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd Stress. *Plant Growth Regul* 48:145–155. doi: 10.1007/s10725-005-5816-4
- Wu F, Zhang G (2002) Genotypic Variation in Kernel Heavy Metal Concentrations in Barley and as Affected by Soil Factors. *J Plant Nutr* 25:1163–1173. doi: 10.1081/PLN-120004380
- Wyszkowski M, Wyszkowska J (2006) The content of macroelements in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and theirs relations with above-ground parts mass of plants and the enzymatic activity of heavy metal contaminated soil. *Pol J Environ Stud* 15:212–221.
- Wyszkowski M, Wyszkowska J (2009) The effect of soil contamination with cadmium on the growth and chemical composition of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and its relationship with the enzymatic activity of soil. *Parlar Scientific Publications*, pp 1046–1053
- Xu J, Yin H, Li X (2008) Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep* 28:325–333. doi: 10.1007/s00299-008-0643-5
- Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr J Bot* 76:167–179. doi: 10.1016/j.sajb.2009.10.007
- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, et al (2007) Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol* 177:637–645. doi: 10.1083/jcb.200702081
- Yang S-L, Lan S-S, Gong M (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J Plant Physiol* 166:1694–1699. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.006
- Yang Y-J, Cheng L-M, Liu Z-H (2007) Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci* 172:632–639. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.11.018
- Yang Z, Chu C (2011) Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. In: Shanker A (ed) *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech,
- Ylärinta T (2008) Uptake of heavy metals by plants from airborne deposition and polluted soils. *Agric Food Sci* 5:431–447.
- Yoneyama T, Ishikawa S, Fujimaki S (2015) Route and Regulation of Zinc, Cadmium, and Iron Transport in Rice Plants (*Oryza sativa* L.) during Vegetative Growth and Grain Filling: Metal Transporters, Metal Speciation, Grain Cd Reduction and Zn and Fe Biofortification. *Int J Mol Sci* 16:19111–19129. doi: 10.3390/ijms160819111

-
- Yu L, Gao R, Shi Q, et al (2013) Exogenous application of sodium nitroprusside alleviated cadmium induced chlorosis, photosynthesis inhibition and oxidative stress in cucumber. *Pak J Bot* 45:813–819.
- Yuan G, Wang X, Guo R, Wang Q (2010) Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chem* 121:1014–1019. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.040
- Zagorchev L, Seal CE, Kranner I, Odjakova M (2013) A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *Int J Mol Sci* 14:7405–7432. doi: 10.3390/ijms14047405
- Zagoskina NV, Goncharuk EA, Alyavina AK (2007) Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant. *Russ J Plant Physiol* 54:237–243. doi: 10.1134/S1021443707020124
- Zemanová V, Pavlík M, Kyjaková P, Pavlíková D (2015a) Fatty acid profiles of ecotypes of hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* growing under cadmium stress. *J Plant Physiol* 180:27–34. doi: 10.1016/j.jplph.2015.02.012
- Zemanová V, Pavlík M, Pavlíková D, et al (2015b) Responses to Cd Stress in Two *Noccaea* Species (*Noccaea praecox* and *Noccaea caerulescens*) Originating from Two Contaminated Sites in Mežica, Slovenia and Redlschlag, Austria. *Arch Environ Contam Toxicol* 70:464–474. doi: 10.1007/s00244-015-0198-8
- Zemanová V, Trakal L, Ochevcova P, et al (2014) A model experiment: competitive sorption of Cd, Cu, Pb and Zn by three different soils. *Soil Water Res* 9:97–103.
- Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* 179:21–30. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00422-2
- Zhang G, Fukami M, Sekimoto H (2002) Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. *Field Crops Res* 77:93–98. doi: 10.1016/S0378-4290(02)00061-8
- Zhang Y, Xu S, Yang S, Chen Y (2014) Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma* 252:911–924. doi: 10.1007/s00709-014-0732-y
- Zhao F-J, Hamon RE, Lombi E, et al (2002) Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 53:535–543.
- Zhao Z-Q, Zhu Y-G, Li H-Y, et al (2004) Effects of forms and rates of potassium fertilizers on cadmium uptake by two cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum*, L.). *Environ Int* 29:973–978. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00081-3
- Zhong-qiu Z, Yong-guan Z, Yun-long C (2005) Effects of zinc on cadmium uptake by spring wheat (*Triticum aestivum*, L.): long-time hydroponic study and short-time ¹⁰⁹Cd tracing study. *J Zhejiang Univ Sci A* 6:643–648. doi: 10.1007/BF02856167
- Zhori A, Meco M, Brandl H, Bachofen R (2015) In situ chlorophyll fluorescence kinetics as a tool to quantify effects on photosynthesis in *Euphorbia cyparissias* by a parasitic infection of the rust fungus *Uromyces pisi*. *BMC Res Notes*. doi: 10.1186/s13104-015-1681-z
- Zhu Y, Wei Y, Ye Z, Yang X (2006) Function of organic acids in heavy metal tolerance mechanism in hyperaccumulator. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric For Sci Ed* 34:121–126.

Zitka O, Krystofova O, Sobrova P, et al (2011) Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution. *J Hazard Mater* 192:794–800. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.05.088

10. SEZNAM AUTOROVÝCH PUBLIKACÍ

Přijaté a vydané publikace v mezinárodních časopisech s impakt faktorem:

- **Simek, J.**, Tuma, J., Dohnal, V., Musil, K., Ducaiova, Z. (2016): Salicylic acid and phenolic compounds under cadmium stress in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.), *Acta Physiologiae Plantarum* 38, 7: 172, doi: 10.1007/s11738-016-2192-9
- **Simek, J.**, Tuma, J. (2016): Response of *Phaseolus vulgaris* plants to cadmium with different accompanying anions exposure, *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol. 25 - No. 9/2016, 3781-3788

Publikace v probíhající redakční řízení v mezinárodních časopisech s impakt faktorem:

- **Simek, J.**, Tuma, J., Feller, U.: Influence of zinc and cadmium concentrations in the root medium on distribution of ^{109}Cd and ^{65}Zn in wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants, *Acta Physiologiae Plantarum*
- **Simek, J.**, Tuma, J., Dohnal, V., Bucek, P., Ducaiova, Z.: Accumulation of cadmium in potential hyperaccumulators *Chlorophytum comosum* and *Callisia fragrans* and role of organic acids under stress conditions, *International Journal of Phytoremediation*

Příspěvky z mezinárodních vědeckých konferencí:

- **Simek, J.**, Moravcova, S., Benakova, M., Tuma, J.: Represent the crops growing on contaminated soil a serious problem for healthy and high quality food?, *Alps-Adria Scientific Workshop*, 11th - 16th May 2015, Neum, Bosnia and Herzegovina