

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**VLIV KADMIA NA VYBRANÉ FYZIOLOGICKÉ
A ANATOMICKÉ CHARAKTERISTIKY A PRŮBĚH STRESOVÉ
REAKCE U ŘEPKY OLEJKY (*BRASSICA NAPUS* L.)**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Autor: Mgr. Martina Komárková (Benáková)
Studijní obor: Aplikovaná biologie a ekologie
Obor/kombinace: Aplikovaná biologie a ekologie (DR-BI)
Školitel: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.

Hradec Králové 2018

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Zadání dizertační práce

Autor: Mgr. Martina Komárková (Benáková)

Studijní program: Biologie D

Obor/kombinace: Aplikovaná biologie a ekologie (DR-BI)

Název dizertační práce: Vliv kadmia na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky a průběh stresové reakce u řepky olejky (*Brassica napus* L.)

Název dizertační práce AJ: Effect of cadmium on selected physiological and anatomical characteristics and on stress reaction in oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Cíl a metody práce: Cílem dizertační práce je objasnění příjmu, translokace a akumulace těžkých kovů v rostlině a jejich vliv na fyziologické a anatomické změny rostlin. Součástí výzkumu je také objasnění role benzoátu sodného v interakci s kadmiiem, patřícího mezi tzv. „vychytávače“ peroxidu vodíku. Měření výše zmíněných procesů bude probíhat s pomocí přístrojů LCpro+, fluorometru, chlorofylmetru, spektrofotometru a jiných. Dále bude zkoumáno rozložení těžkých kovů a minerálních prvků v jednotlivých částech rostlin, možné spojení transportu se zvýšeným obsahem specifických látek, např. antioxidantů, aminokyselin či kyseliny salicylové, a to využitím metod AAS, ICP, HPLC. V neposlední řadě bude zjišťována

lokalizace těžkých kovů v rostlině na buněčné úrovni s pomocí fluorescenční mikroskopie. Výzkum probíhá ve spolupráci s vybranými pracovišti v ČR i zahraničí.

Seznam doporučené literatury:

Chibuiké GU, Obiora SC (2014) Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Appl Environ Soil Sci* 2014:e752708. doi: 10.1155/2014/752708

Mourato MP, Moreira IN, Leitão I, et al (2015) Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus Brassica. *Int J Mol Sci* 16:17975–17998. doi: 10.3390/ijms160817975

Tran TA, Popova LP (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk J Bot* 37:1–13. doi: 10.3906/bot-1112-16

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D.

Oponenti: prof. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

doc. RNDr. Ivan Suchara, CSc.

Datum zadání práce:

Datum odevzdání práce:

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svoji dizertační práci na téma „Vliv kadmia na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky a průběh stresové reakce u řepky olejky (*Brassica napus* L.)“ zpracovala samostatně a uvedla citace všech použitých zdrojů. Výsledky v předložené práci jsou originálními údaji, získanými během prezenční formy doktorského studia.

V Hradci Králové, dne 13.3. 2018

Mgr. Martina Komárková (Benáková)

Anotace

Komárková, M. *Vliv kadmia na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky a průběh stresové reakce u řepky olejky (Brassica napus L.)*. Hradec Králové, 2018. Disertační práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí disertační práce doc. Ing. Jiří Tůma, CSc. 110 s.

Cílem disertační práce je zhodnotit vliv kadmia na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky u řepky olejky (*B. napus* L.). Kultivar, u kterého byl zaznamenán fytoextrakční potenciál, byl kultivar Ladoga. U vybraných kultivarů se dále neprokázal významný vliv Cd na obsah a tvorbu kyseliny salicylové a na množství základních aminokyselin. Přídavek Cd měl negativní vliv na většinu sledovaných fyziologických parametrů a také na anatomii a morfologii kořenů. Kořenové buňky dále reagovaly velmi citlivě na přítomnost Cd změnou chování mikrotubulárního cytoskeletu.

Sledována byla dále interakce mezi Cd a zinkem a benzoátem sodným. Pozitivní účinek Zn byl pozorován u kultivaru Navajo, a to během translokace Cd z kořenů do nadzemních částí rostlin. Přídavek BS do média s Cd vyvolal značnou změnu v příjmu Cd rostlinou. V kořenech se vyskytoval signifikantně vyšší obsah Cd, než v médiu se samotným Cd, v nadzemní části pak došlo naopak k výraznému úbytku Cd. U kořenů došlo ve všech případech k nárůstu příjmu minerálních prvků ve variantě s BS a Cd + BS oproti médiu se samotným Cd, v nadzemních částech pak naopak došlo k jejich snížení. Mikrotubulární cytoskelet po přidavku BS nereagoval tak vysokou mírou rozpadu MTs vláken, jako v případě média obohaceného pouze o Cd.

Klíčová slova

Fytoremediace, kadmium, řepka olejka, zinek

Annotation

Komarkova, M. *Effect of cadmium on selected physiological and anatomical characteristics and on stress reaction in oilseed rape (Brassica napus L.)*. Hradec Králové, 2018. Dissertation Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor doc. RNDr. Jiří Tůma, CSc. 110p.

The aim of the dissertation is to evaluate the effect of cadmium on selected physiological and anatomical characteristics of oilseed rape (*B. napus* L.). The only cultivar with a phytoextraction potential was the Ladoga. Selected cultivars showed no significant Cd effect on salicylic acid content and on basic amino acid content. The addition of Cd had a negative effect on most of the observed physiological parameters as well as on root anatomy and morphology.

Root cells responded very sensitively to the presence of Cd by changing the behavior of the microtubule cytoskeleton.

The interaction between Cd and zinc and sodium benzoate was also observed. The positive effect of Zn was observed in the Navajo cultivar during the translocation of Cd from the roots to the above-ground parts of the plants. The addition of BS to the Cd medium produced a significant change in Cd plant intake. In roots, there was a significantly higher Cd content than in Cd alone, in the above-mentioned part there was a significant decrease in Cd. The roots have in all cases increased intake of mineral elements in the variant with BS and Cd + BS compared to the medium with the Cd itself. In the above parts, mineral uptake was significantly reduced. After the addition of BS, the microtubule cytoskeleton did not respond with such high disintegration of MTs as in the case of Cd-enriched medium only.

Key words

Phytoremediation, cadmium, oilseed rape, zinc

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala mému školiteli, doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc., za jeho odborné vedení, rady a konzultace v průběhu celého doktorského studia. Velký dík patří také RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za její odborné rady, nápady na nové experimenty a pomoc při realizování veškerých pokusů. Za spolupráci při realizaci jednotlivých experimentů dále děkuji doc. RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. et Ph.D., Mgr. Jiřímu Šimkovi, Ph.D. a Mgr. Matěji Semerákovi. Za vedení a odborné rady s výzkumnou činností v průběhu mezinárodních a mimouniverzitních stáží též děkuji Prof. Stephanu Clemensovi, Prof. Nathalii Verbruggen, Dr. Paule Pongrac a RNDr. Editě Tylové, Ph.D. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celé své rodině, mému muži a přátelům za jejich nemalou podporu v průběhu celého trvání doktorského studia.

Veškeré experimenty, výjezdy na konference a zahraniční stáže, které proběhly v rámci mého studia, byly financovány z odborných grantů, bez nichž by nebylo možné výzkum provádět. Tímto děkuji za finanční podporu, která vznikla na základě následujících univerzitních grantů. Mechanizmy tolerance rostlin vystavených zvýšeným dávkám těžkých kovů – SV UHK 2014, 2015; Fluorescenční vizualizace lokalizace těžkých kovů a jejich vlivů na celkový fyziologický stav rostliny – SV UHK 2016 a SV katedry biologie 2017. Podpora pro výjezdy na zahraniční stáže vznikla na základě financování z projektu „Inovace studijních oborů zajišťovaných katedrami PřF UHK – Přífíno“ (stáž Brusel, Belgie) a z programu ERASMUS + (stáž Bayreuth, Německo).

ABSTRAKT

Cílem předkládané disertační práce je zhodnotit vliv kadmia (Cd) na vybrané fyziologické a anatomické charakteristiky u řepky olejky (*Brassica napus* L.). Pro tyto účely byly vypracovány čtyři experimenty, v rámci kterých bylo možné posoudit stresovou reakci pokusných rostlin a analyzovat změny v organismu způsobené toxicitou Cd.

Vzhledem k pestré škále kultivarů řepky olejky (*B. napus*) bylo možné testovat odolnost vůči Cd v závislosti na charakteristikách typických pro daný genotyp. Výsledky ukázaly, že u většiny testovaných kultivarů (CZL, Benefit, IWAS, ZhongZhuang9, Cadeli, Viking, Navajo, Ladoga) se nevyskytuje fytoextrakční potenciál, a to jak při testování rostlin pěstovaných v hydroponii, tak u rostlin rostoucích v substrátu. Jediný kultivar, u kterého jsme zaznamenali fytoextrakční potenciál založený na hodnotě TF nad hranicí „1“, byl kultivar Ladoga. Rostliny tohoto kultivaru akumulovaly do svých nadzemních částí srovnatelné, ba částečně vyšší množství Cd než do kořenů a můžeme tak předpokládat, že tento kultivar má genetický potenciál pro to být hyperakumulátorem Cd. U vybraných kultivarů se dále neprokázal významný vliv Cd na obsah a tvorbu kyseliny salicylové (SA) a na množství základních aminokyselin (AK). Vyšší závislost na koncentraci Cd byla pozorována pouze v případě obsahu prolinu a u pár vybraných AK.

Přídavek Cd do substrátu či hydroponického média měl značně negativní vliv na většinu sledovaných fyziologických parametrů (hmotnosti kořenů a nadzemních částí, obsah chlorofylu a karotenoidů, rozpustných proteinů, fenolů, flavonoidů) a také na anatomii a morfologii kořenů. Rostliny tvořily vlivem Cd více postranních kořenů, což se projevilo také zvýšením množství kořenových špiček. Průměr kořenů byl vlivem Cd oproti kontrole větší. Buňky pericyklu byly nápadně zvětšené a ve vnitřních vrstvách kořene (zejména kolem endodermis) se vyskytoval větší podíl ligninu či suberinu, představovaný autofluorescenčním materiálem. Kořenové buňky dále reagovaly velmi citlivě na přítomnost Cd změnou chování mikrotubulárního cytoskeletu (MTs). Mikrotubuly byly depolymerované a jejich organizace byla narušena. Testována byla také fluorescenční barva Leadmium™ green a její schopnost vizualizovat Cd v kořenech rostlin. Z výsledků však vyplývá, že barva se nespecificky váže kromě Cd také na jiné ionty a nelze ji proto pro detekci Cd u řepky olejky použít.

Sledována byla dále interakce mezi Cd a zinkem (Zn) a benzoátem sodným (BS). Jak Zn, tak BS by mohly při vhodných dávkách snižovat toxicitu Cd a zvyšovat schopnost tolerance vůči těžkému kovu. Pozitivní účinek Zn byl pozorován u kultivaru Navajo, a to během translokace Cd z kořenů do nadzemních částí rostlin. Tento kultivar translokoval do svých listů signifikantně méně Cd, pokud rostl v médiu s Cd + Zn, než když byl pěstován pouze v médiu s Cd. Na ostatní sledované fyziologické a anatomické parametry neměl přídavek Zn žádný pozitivní ani negativní vliv. Přídavek BS do média s Cd vyvolal značnou změnu v příjmu Cd

rostlinou. V kořenech se vyskytoval signifikantně vyšší obsah Cd, než v médiu se samotným Cd, v nadzemní části pak došlo naopak k výraznému úbytku Cd. Změny byly pozorovány také na úrovni příjmu vybraných minerálních prvků. U kořenů došlo ve všech případech k nárůstu příjmu minerálních prvků ve variantě s BS a Cd + BS oproti médiu se samotným Cd, v nadzemních částech pak naopak ke snížení obsahu K, Ca, Mg a Zn. Mikrotubulární cytoskelet po přidavku BS nereagoval tak vysokou mírou rozpadu MTs vláken, jako v případě média obohaceného pouze o Cd. Ostatní sledované parametry zahrnující obsahy signálních látek nebyly přidavkem BS do média obsahující Cd nijak ovlivněny.

Klíčová slova

Anatomie kořene; antioxidantní systémy; benzoát sodný; kadmium; kyselina salicylová; příjem a translokace kadmia; řepka olejka (*Brassica napus* L.); zinek

ABSTRACT

The aim of this dissertation is to evaluate the effect of cadmium (Cd) on selected physiological and anatomical characteristics of oilseed rape (*Brassica napus* L.). For this purpose, four experiments were conducted to assess the stress response and to analyze the changes caused by Cd toxicity in the tested plants.

Thanks to the variety of the oilseed rape (*B. napus*) cultivars, it was possible to test the resistance to Cd in respect to each genotype characteristics. The results showed that phytoextraction potential was absent in most cultivars tested (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9, Cadelì, Viking, Navajo, Ladoga), both in plants grown in hydropony and in plants grown in the substrate. The only cultivar with a phytoextraction potential based on the TF value above the "1" limit was the Ladoga cultivar. The plants of Ladoga cultivar have accumulated comparatively or partially higher amounts of Cd in their above-ground tissues than in the roots, and we assume that this cultivar has the genetic potential to be a Cd hyperaccumulator. No significant Cd effect on salicylic acid (SA) content and on basic amino acid (AK) content was measured in the tested cultivars. Higher dependence on Cd concentration was observed only for proline content and for a few selected aminoacids.

The addition of Cd to the substrate or hydroponic medium had a significant negative effect on most of the physiological parameters studied (root mass and above-ground parts of the plant, chlorophyll and carotenoid content, soluble proteins, phenols, flavonoids) as well as root anatomy and morphology. Under Cd toxicity roots formed more lateral roots, which resulted in increase of root tips number. The diameter of the roots was greater in Cd roots than in control

roots. The pericycle cells were enlarged and in the inner layers of the root (especially around the endodermis) there was a larger proportion of lignin or suberine, represented by autofluorescence material. Root cells responded very sensitively to the presence of Cd by changing the behavior of the microtubule (MTs) cytoskeleton. The microtubules were depolymerized and their organization was disturbed. The Leadmium™ green fluorescence dye was also tested for its ability to visualize Cd in plant roots. However, the results show non-specific nature of the Leadmium dye binding to Cd. The dye binds to other ions as well, and therefore it cannot be used for Cd detection in rapeseed.

The interaction between Cd and zinc (Zn) and sodium benzoate (BS) was also observed. Both Zn and BS should reduce the toxicity of Cd at appropriate doses and promote the growth of plants. The positive effect of Zn was observed on the ability to translocate Cd from the roots in the Navajo cultivar. This cultivar translocated significantly less Cd into its leaves if it was grown in Cd + Zn medium than when it was grown in Cd only. For other monitored physiological and anatomical parameters, the addition of Zn had neither positive nor negative effect. The addition of BS to the Cd medium produced a significant change in Cd intake. In roots, there was significantly higher Cd content in Cd + BS-medium than in Cd-medium alone, in the above-ground part there was a significant decrease in Cd content. Changes were also observed in the level of intake of selected mineral elements. In all cultivars roots showed an increased intake of mineral elements in the variant with BS and Cd + BS compared to the medium with Cd itself, on the other hand, in the above ground parts, the K, Ca, Mg and Zn content decreased. Upon the addition of BS microtubule cytoskeleton did not respond with such high desintegration of MTs as in the case of Cd-enriched medium only. Other tracking parameters including the content of the signal substances were not affected by the addition of BS to the medium containing Cd.

Keywords

Root anatomy; antioxidative systems; Sodium benzoate; cadmium; salicylic acid; cadmium uptake and translocation; oilseed rape (*Brassica napus* L.); zinc

1. OBSAH

1.	OBSAH	1
2.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
3.	ÚVOD	6
4.	CÍLE PRÁCE	8
5.	AKTUÁLNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY	10
5.1	Těžké kovy	10
5.1.1	Kadmium, příjem a transport rostlinou	11
5.1.2	Vliv kadmia na růst rostlin a anatomii kořene	13
5.1.3	Způsoby detoxikace kadmia, aktivace chelatačních sloučenin a antioxidačních drah 15	
5.1.4	Vliv kadmia na příjem vybraných minerálních prvků	17
5.1.5	Vliv kadmia na vybrané stresové signální látky	19
5.2	Fytoremediace	21
5.3	Řepka olejka (<i>B. napus</i>) a její využití při fytoremediacích	23
6.	Metodika pokusů	25
6.1	Pokus č. 1 - Skleníkový experiment zaměřený na toleranci různých kultivarů řepky vůči kadmiumu	25
6.1.1	Způsob pěstování	25
6.1.2	Měření fotosyntetických parametrů	26
6.1.3	Mineralizace vzorků a měření obsahu kadmia pomocí AAS	26
6.1.4	Stanovení obsahu kyseliny salicylové	27
6.1.5	Stanovení obsahu aminokyselin	27
6.2	Pokus č. 2 – Spolupůsobení kadmia a zinku na fyziologické a anatomické parametry řepky olejky (<i>B. napus</i>)	28
6.2.1	Způsob pěstování	28
6.2.2	Mineralizace vzorků a analýza obsahu prvků	29
6.2.3	Stanovení obsahu chlorofylu	29
6.2.4	Anatomické analýzy	29

6.3	Pokus č. 3 - Vliv benzoátu sodného na stresovou odpověď vůči vyšším dávkám kadmia u řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	30
6.3.1	Způsob pěstování	30
6.3.1	Mineralizace vzorků a analýza obsahu prvků	30
6.3.2	Spektrofotometrické měření obsahu chlorofylu, reaktivních forem kyslíku, celkových rozpustných proteinů, obsahu celkových fenolů a flavonoidů.....	31
6.4	Pokus č. 4 - Anatomické experimenty a imunofluorescenční značení MTs v kořenech řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	32
6.4.1	Fluorescenční barvení příčných řezů kořenem řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	32
6.4.2	Imunofluorescenční značení kořenů řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	32
6.5	Statistické zpracování dat.....	33
7.	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
7.1	Skleníkový experiment zaměřený na toleranci různých kultivarů řepky vůči kadmiu ...	34
7.1.1	Vliv kadmia na růst rostlin a fotosyntetické parametry	34
7.1.2	Příjem kadmia kořeny a jeho translokace do nadzemních částí rostlin.....	38
7.1.3	Vliv kadmia na příjem a translokaci draslíku a vápníku	39
7.1.4	Vliv kadmia na obsah kyseliny salicylové	40
7.1.5	Vliv kadmia na obsah aminokyselin	42
7.1.6	Závěr	46
7.2	Hydroponický experiment zaměřený na spolupůsobení kadmia a zinku a na fyziologické a anatomické parametry řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	47
7.2.1	Testování vhodných koncentrací těžkých kovů	47
7.2.2	Vliv kadmia a zinku na růst kořenů a nadzemní části rostlin.....	48
7.2.3	Vliv kadmia a zinku na anatomii kořene.....	52
7.2.4	Příjem a translokace kadmia a zinku.....	56
7.2.5	Vliv kadmia a zinku na příjem a translokaci K, Mg, Ca a Na.....	58
7.2.6	Závěr	61
7.3	Vliv benzoátu sodného na stresovou odpověď vůči vyšším dávkám kadmia u řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	62
7.3.1	Vliv kadmia a benzoátu sodného na růst rostlin a fotosyntetické parametry	62
7.3.2	Akumulace Cd v kořenech a v nadzemních částech a vliv benzoátu sodného.....	63
7.3.3	Vliv kadmia a benzoátu sodného na příjem a translokaci K, Ca, Mg a Zn	65

7.3.4	Vliv kadmia a benzoátu sodného na obsah proteinů, superoxidového radikálu, fenolů a flavonoidů	66
7.3.5	Závěr	68
7.4.	Anatomické experimenty a imunofluorescenční značení MTs v kořenech řepky olejky (<i>B. napus</i>).....	69
7.4.1	Fluorescenční barvení kořenů řepky olejky	69
7.4.2	Imunofluorescenční detekce MTs v kořenech řepky olejky	71
7.4.3	Závěr	76
8.	Závěry	77
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
10.	Přílohy	97

2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
ABC přenašeče	ATP binding cassette
AK	aminokyselina/y
APX	askorbát peroxidáza
AsA	kyselina askorbová
BS	benzoát sodný
Cd	kadmium
E	intenzita transpirace
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FW	hmotnost čerstvého vzorku (fresh weight)
GR	glutathionreduktáza
GS	vodivost průduchů
GSH	glutathion
HM	těžké kovy (<u>h</u> eavy <u>m</u> etals)
MT	metallothioneiny
MTs	mikrotubuly/mikrotubulární cytoskelet
PC	fytochelatiny
PCS	fytochelatin syntázy
PSII	fotosystém II
ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RWC	relativní obsah vody
SA	kyselina salicylová

SOD

superoxiddismutáza

TF

translokační faktor

Zn

zinek

3. ÚVOD

Znečištění životního prostředí těžkými kovy patří mezi jeden z hlavních činitelů ohrožujících lidské zdraví. Těžké kovy se dostávají do životních cyklů rostlin a negativně tak ovlivňují výnosy plodin, zároveň se však také mohou v rostlinných pletivech nebezpečně hromadit a spolu s potravou být přijímány živočichy, včetně člověka. Tyto a mnohé další důvody vedly vědce k zahájení detailního popisu chování těžkých kovů v životním prostředí, v rostlinných orgánech a v živočišných tělech. Kompletní poznání jejich koloběhu může pomoci při hledání mechanismů redukce či eliminace těžkých kovů z životního prostředí.

Těžké kovy se dostávají do životního prostředí především vlivem člověka (tavení rud, galvanické pokovování, průmyslová výroba, výfukové plyny, výroba pohonných hmot, využívání hnojiv a pesticidů), ale také například během sopečné činnosti, uvolňováním z biosféry nebo vlivem válečných konfliktů. V České republice dochází k největšímu znečištění životního prostředí vlivem hutnictví a během zpracovávání kovů, a to především v krajích Moravskoslezském, Ústeckém a Středočeském. Kadmium (Cd) patří mezi jeden z nejtoxičtějších těžkých kovů. V České republice je maximální přípustná koncentrace Cd dle platné legislativy v lehkých půdách $0,4 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$ sušiny, v ostatních půdách pak $0,5 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$ sušiny (Vyhláška 153/2016 Sb.). Průměrné obsahy Cd se ve všech typech půd pohybovaly mezi lety 1998 - 2015 okolo $0,3 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$, nejvyšší nadlimitní hodnoty se vyskytovaly v kraji Moravskoslezském (Polakova et al. 2014). Nebezpečnost Cd spočívá v jeho dlouhodobém přetrvávání v půdě. U rostlin způsobuje například listové chlorózy, redukci růstu a množství rostlinné biomasy, má vliv na celkovou intenzitu fotosyntézy, respiraci, výměnu plynů, vodní potenciál, příjem a transport minerálních látek. Dále ovlivňuje celkovou anatomii a morfologii kořenů a působí na nejrůznější biochemické mechanismy související s aktivací antioxidantních enzymů, chelatačních látek a signálních sloučenin (Wojcik and Tukiendorf 2004; Sarwar et al. 2010; Lux et al. 2011; Kapoor et al. 2014).

Přestože existují různorodé technologie umožňující čištění zamořených půd, každá z nich má své výhody a nevýhody, které brání jejich využití ve větším měřítku. Rostliny, konkrétně jejich kořeny, jsou jedny z prvních orgánů, které přichází do styku s těžkými kovy vyskytujícími se v půdě. Díky tomu se v posledních letech zaměřuje výzkum právě na rostliny, jakožto na potenciální akumulátory kovů či inhibitory jejich vstupu do životních cyklů ostatních živých organismů. Metoda využití rostlin pro „ozdravování půd“ se nazývá fytoremediace, přičemž jejím nejběžnějším druhem je fytoextrakce. Podstatou fytoextrakce je využití takových rostlinných druhů, které mají prokázané hyperakumulační schopnosti vedoucí k hromadění těžkých kovů ve svých rostlinných tělech. Dané rostliny jsou přínosné nejen díky této vlastnosti, ale slouží také jako velmi cenný materiál pro zkoumání podstaty procesů příjmu, transportu a detoxikace těžkých kovů v rámci buněk, či na molekulární úrovni.

V rámci předkládané disertační práce byla zvolena jako pokusná rostlina zemědělsky a ekonomicky významná polní plodina řepka olejka (*B. napus*). Jedná se o samosprašnou rostlinu, která zaujímá jednu z největších zemědělsky využívaných ploch v České republice. Řepka olejka je zdrojem kvalitního řepkového oleje, zbytky vylisovaných semen slouží jako žádaná příměs do krmných směsí, její olej se využívá mimojiné také k výrobě bionafty. Vzhledem k dalším vlastnostem, jako jsou například rychlý růst a vysoká produkce biomasy, by byla řepka olejka vhodným kandidátem také pro využití při fytořemediacích. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na zkoumání vlivu Cd na tuto rostlinu a snažili jsme se prozkoumat míru její tolerance a potenciální schopnosti translokace Cd do nadzemní části. Vzhledem k pestré škále různých kultivarů řepky olejky jsme se snažili najít takové, které by se lišily svými charakteristikami a předpokládali jsme proto různé chování vůči toxicitě vyvolané Cd.

4. CÍLE PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo prozkoumat vliv těžkých kovů, a to konkrétně Cd, na vybrané anatomické a fyziologické charakteristiky u řepky olejky (*B. napus*) a vyhodnotit její potenciální schopnost detoxikace či tolerance vůči Cd. Zkoumán byl například vliv kovu na parametry růstu rostlin, fotosyntézu, obsah antioxidantů či zastoupení minerálních prvků. V rámci experimentů jsme se zaměřili také na interakce Cd s jinými látkami, které by mohly omezit negativní dopad těžkého kovu na rostlinu; jednalo se konkrétně o zinek (Zn) a benzoát sodný (BS). V neposlední řadě jsme zkoumali vliv Cd na vybrané anatomické charakteristiky kořene spolu s chováním mikrotubulárního (MTs) aparátu.

Pokusné rostliny byly pěstované jednak v nádobách se substrátem, tak pomocí hydroponie. Hydroponické experimenty nemohou sloužit k přesnému určení, zda je rostlina schopna hyperakumulovat kovy, protože je v jejich rámci zcela zanedbán vliv nejrůznějších činitelů, které působí na rostlinu ve vnějším prostředí. Naším záměrem však bylo testovat především genetický potenciál řepky olejky vypovídající o míře tolerance a schopnosti akumulace Cd kořeny.

Pracovní hypotézy:

- Různé kultivary řepky olejky mohou vykazovat rozdílné reakce na stres vyvolaný Cd a akumulovat různá množství kovu do svých nadzemních částí. Nalezneme vzhledem k rozdílným charakteristikám jednotlivých genotypů odolný kultivar vhodný pro využití při fytoremediacích?
- Povede přidavek Cd do substrátu ke zvýšené tvorbě a akumulaci kyseliny salicylové a ke změně obsahu základních aminokyselin, včetně prolinu?
- Způsobí přidavek Zn do média snížení toxického působení těžkého kovu (Cd) a podpoří zároveň růst rostlin, délku kořenů a tvorbu chlorofylu?
- Bude mít přítomnost Cd v růstovém médiu negativní efekt na růst kořenů, a odrazí se tento vliv nejen na jejich morfologii, ale také na anatomickém uspořádání vnitřních buněčných vrstev?
- Bude BS, jakožto prokázaný vychytávač peroxidu vodíku, aktivně redukovat negativní vliv Cd na rostliny a odrazí se to také v obsazích vybraných signálních látek?
- Dokáže BS působit protektivně také na buněčné úrovni, dokáže chránit konkrétně mikrotubulární cytoskelet (MTs) před toxickým působením Cd?

- Umožní nám fluorescenční barvivo Leadmium™ green specificky značit přítomnost Cd v rostlinách, díky čemuž bychom mohli pomocí mikroskopické analýzy tento kov v kořenech rostlin lokalizovat a vizualizovat?

Konkrétní cíle práce:

- Vliv Cd na fyziologické parametry řepky olejky, účinnost fotosyntézy a tvorbu chlorofylu. Analýza vybraných fyziologických parametrů bude zahrnovat nedestruktivní měření fotosyntetické aktivity a tvorby chlorofylu.
- Sledování negativního vlivu Cd pomocí změn obsahů specifických látek (kyselina salicylová, aminokyseliny, prolin) a signálních látek (chlorofyl, celkové rozpustné proteiny, superoxidový radikál, fenoly, flavonoidy), jejichž stanovení proběhne pomocí speciálních analýz. Dále sledování morfologických a anatomických změn v kořenech rostoucích v médiu s Cd.
- Translokace Cd z kořenů do nadzemní části v závislosti na kultivaru a stanovení fytoextračního potenciálu rostlin. Výsledek umožní nalézt vhodný kultivar pro budoucí testování fytoremediačních vlastností.
- Výzkum interakce Cd se Zn a BS. Zinek dokáže při vhodné dávce působit antagonisticky na příjem Cd kořeny, BS vychytává nadměrně se hromadící peroxid vodíku. Vliv obou látek na toxicitu Cd bude sledován a vyhodnocen.
- Chování BS a jeho potenciální ochranná funkce před toxicitou vyvolanou Cd. Zkoumání proběhne na úrovni MTs cytoskeletu pomocí imunofluorescenčního značení. Zároveň proběhne fluorescenční vizualizace Cd v kořenech rostlin, a to pomocí specifického komerčně dostupného fluoroforu.

5. AKTUÁLNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY

5.1 Těžké kovy

Rostliny využívají pro svůj růst a vývoj celou škálu půdních anorganických sloučenin. Kromě makrobiogenních prvků se v půdách nachází také prvky mikrobiogenní, jako je například Zn, Cu, Fe, Ni, Co či Mn, které jsou přijímány rostlinou v různé míře. Při nižších koncentracích hrají důležitou roli během růstu a vývoje v rozličných metabolických procesech (např. jako kofaktory enzymatických reakcí, součást fotosyntetických reakcí, účast na přepisu DNA, fixaci dusíku aj.), avšak vyšší koncentrace již mohou být pro rostliny toxické (Prasad 2008). V půdě se dále vyskytuje také určité procento prvků (méně jak $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Kabata-Pendias 2000) bez jakékoliv známé biologické funkce, jakými jsou například Hg, As, Li, Cd, Cr či Pb. Tyto prvky jsou známy pod pojmem „těžké kovy“, který získaly díky své vysoké relativní atomové hmotnosti a hustotě vyšší jak $5,0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (Raskin et al. 1994).

Těžké kovy mají ve většině případů negativní vliv na růst a vývoj rostlin, a to především kvůli jejich podobnosti s biogenními prvky a následné kompetici a záměně při příjmu či transportu rostlinou (Sarwar et al. 2010). V literatuře se můžeme setkat jak se synergistickými vztahy mezi příjmem biogenních prvků a těžkých kovů (Cherif et al. 2011; Cojocar et al. 2016), tak se vztahy antagonistickými (Balen et al. 2011; Tammam et al. 2016; Versieren et al. 2017). Individuálnímu působení kovu na rostlinu je věnováno mnoho odborných článků, problematika spolupůsobení více prvků je však často opomíjena. Tyto vzájemné interakce by však neměly být zanedbávány vzhledem k faktu, že v přírodních podmínkách se málokdy setkáváme s působením pouze jednoho stresoru. Vhodnými bioindikátory ukazujícími míru kontaminace prostředí mohou být například mechy či jehlice dřevin, jak bylo ukázáno ve studii analyzující zastoupení 39 vybraných prvků u tří různých druhů rostlin v České republice (Suchara et al. 2011).

V předkládané práci bude pojednáváno především o vlivu Cd na rostliny, nicméně toxicita Cd je značná také pro živočichy včetně člověka. Jakmile je Cd absorbováno, dokáže v organismu přetrvávat 25 - 30 let, což vede k chronické otravě, narušení metabolismu vápníku nebo k tvorbě ledvinových kamenů (Uraguchi and Fujiwara 2013). Ze studie z roku 2001 vyplývá, že množství Cd v krvi se u české populace pohybuje kolem $0,7 \mu\text{g Cd}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž u kuřáků je jeho koncentrace téměř dvojnásobná ($1,2 \mu\text{g Cd}\cdot\text{l}^{-1}$) (Cerná et al. 2001). Mezi jedno z nejznámějších onemocnění způsobené otravou Cd patří nemoc itai-itai, která sužovala především obyvatele Japonska konzumující rýži pocházející z polí zavlažovaných vodou z čistírny odpadních vod. Nemoc se vyznačuje odvápněním organismu vedoucím k nejrůznějším poruchám kostí a poškozením ledvinových tubulů. Jako kritická hodnota pro

zisk nemoci a přítomnost prvotních příznaků je stanovováno množství 0,2 mg Cd.kg⁻¹ v přijaté potravě (Nogawa et al. 2017).

5.1.1 Kadmium, příjem a transport rostlinou

Kadmium patří v periodické soustavě prvků do skupiny II B a v přírodě se vyskytuje vázané v oxidech, sulfidech či uhličitanech. Nejvyšší množství Cd se nachází v usazených horninách a mořských fosfátových horninách (15 mg Cd.kg⁻¹) (Tchounwou et al. 2012). Jedná se o jeden z nejtoxičtějších těžkých kovů vyskytující se na naší planetě. Běžný obsah Cd v sušině listů se u většiny druhů rostlin pohybuje v rozmezí 0,05 – 0,2 mg Cd.kg⁻¹, přičemž toxické hranice je dosaženo již při 5 - 10 mg Cd.kg⁻¹ (White and Brown 2010). Do životního prostředí se Cd dostává přirozenou cestou, jeho hlavním zdrojem je však antropogenní činnost.

Dostupnost Cd pro rostlinu je dána nejrůznějšími fyzikálními, chemickými a biologickými faktory půdy, jakými jsou například teplota, vlhkost, pH půdy, půdní druh, redoxní potenciál, hustota a náboj půdních částic, míra vazby s ligandy, provzdušnění půdy a složení mikrobiálního společenstva půdy, zastoupení minerálních prvků v půdě, rozpustnost kovu v půdním roztoku a mnoho dalších (Wenzel et al. 2003; Chibuike and Obiora 2014). Jeden z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících dostupnost Cd je pH půdy. V experimentu s nádobově pěstovanými rostlinami tabáku dochází podle Sappin-Didier et al. (2005) k výrazně vyššímu příjmu Cd do rostlin ze zeminy s nižším pH. Tento fakt je dán tím, že při snižujícím se pH dochází k nárůstu koncentrace H⁺, které se váží výměnou za ionty kovů na půdní částice. Kovové ionty se tak dostávají do půdního roztoku, odkud jsou přijímány kořeny rostlin. V přirozeném prostředí však na rostliny působí mnoho různých faktorů, které mohou být vzájemně provázány, a je proto důležité testovat výsledky nejen v laboratorních podmínkách, ale také v rámci polních experimentů. Mezi další důležité faktory hrající významnou roli při příjmu Cd patří například složení organické hmoty, zastoupení jílnatých částic a celkové množství Cd v půdě. Například Ziper et al. (1988) uvádí, že čím je větší obsah jílu a organických koloidních částic v půdě, tím je nižší koncentrace Cd v půdním roztoku. Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím schopnost přijímat kovy z půdy je také složení půdních mikroorganismů. Mikroorganismy podporují tvorbu rostlinné biomasy, čímž přispívají toleranci před negativním působením těžkých kovů. Na druhou stranu však významně zvyšují dostupnost kovu pro příjem kořeny a ty jsou tak snadněji absorbovány do rostlinných těl (Sheoran et al. 2016).

Prvním krokem v příjmu Cd je jeho mobilizace a přenos přes buněčnou stěnu a plasmatickou membránu buněk kořene. K mobilizaci kovu dochází pomocí chelatačních látek produkovaných jako kořenové exsudáty do půdní rhizosféry. Složení chelatačních látek v exsudátech se liší u jednotlivých druhů rostlin a také v závislosti na podmínkách prostředí.

Nejčastěji se jedná o ionty H^+ , anorganické ionty, vodu či sloučeniny odvozené od produktů fotosyntézy (Pinton et al. 2007). Úvodní bariérou omezující vstup Cd do symplastu je buněčná stěna, která hraje významnou roli ve vazbě a akumulaci kovu na své stavební komponenty, jakými jsou například polysacharidy, fenoly, proteiny či aminokyseliny (Krzesłowska 2011). Bylo prokázáno, že míra methylesterifikace pektinu v buněčné stěně souvisí se schopností tolerovat vyšší dávky těžkých kovů (Eticha et al. 2005). Dle Lux et al. (2011b) patří mezi úvodní obranné mechanismy také tvorba sekundární suberinové vrstvy či suberinových derivátů kolem buněčné stěny, což vede k omezení přenosu Cd do xylému a následně do nadzemních částí rostlin. Buněčná stěna a její vlastnost zvyšovat odolnost jedince vůči toxickému působení Cd je však velmi komplexní a záleží na mnoha různých faktorech, jakými jsou například morfologie orgánu, který je vystaven účinku kovu (například kořen), míra propustnosti a transportní kapacita kovu či síla a schopnost vazby kovu na polysacharidy nebo stěnové proteiny (Parrotta et al. 2015).

Poté, co dojde k mobilizaci Cd kořeny a kov překoná také buněčnou stěnu, dojde k jeho přenosu přes buněčnou plasmatickou membránu, a to nejrozličnějšími transportními proteiny zahrnujícími například protonové pumpy, přenašeče nebo kanály (Rascio and Navari-Izzo 2011). Kadmium pro svůj vstup do buněk nevyužívá žádný specifický transportní systém, přijímán je pomocí přenašečů pro minerální látky. V rámci čeledě *Brassicaceae* jsou známy například HMA, NRAMP, ZIP, ABC a CET přenašeče či například sulfátové přenašeče (BnSultr2) (Sun et al. 2007; Bhuiyan et al. 2011; Lang et al. 2011; Babula et al. 2012). Vliv na příjem a distribuci Cd mohou mít také doprovodné anionty vyskytující se spolu s kovem v jeho soli (Tuma et al. 2014). Jakmile projde kov přes plasmatickou membránu, vede v buňce k narušení metabolismu, k redukci rostlinného růstu, k redukci akumulace biomasy či k tvorbě listových chloróz. Na molekulární a buněčné úrovni pak působí příjem Cd negativně například na dozrávání semen, syntézu pigmentů, fotosyntézu, výměnu plynů, respiraci, hormonální vyváženost či DNA replikaci (například Møller et al. 2007; Nada et al. 2007; Peleg and Blumwald 2011).

Schopnost translokace Cd do nadzemních částí je vyvinutá především u rostlin zvaných hyperakumulátory, které na rozdíl od ostatních rostlin nezadržují většinu kovů v kořenech, ale transportují je xylémem do stonku a listů. Aby byl kov v kořenech hyperakumulátorů efektivně translokován do xylému, aktivita vakuolárního systému zajišťující jeho sekvestraci v kořenech je snížena (Lasat et al. 2000). Obecně se předpokládá, že translokace Cd do nadzemních částí je oproti přenosu minerálních prvků pomalejší a úzce souvisí s listovou transpirací (Ueno et al. 2008). Pro vstup do xylému však hrají důležitou roli také přenašeče a kanály na plasmatické membráně xylémových buněk. Jeden z významných přenašečů je například HMA4, jehož genová exprese je během výskytu Cd či Zn v kořenech *Thlaspi caerulescens* výrazně zvýšena (Papoyan and Kochian 2004). Jakmile se kov dostane do xylému, je transportován v komplexu

s různými chelatačními látkami, kterými mohou být například organické kyseliny (citrát), aminokyseliny nebo peptidy. Kovy se v nadzemní části ukládají častěji spíše ve starších listech, a to ve vrstvách buněčných stěn kolenchymatických buněk, které jsou bohaté na pektiny (Vollenweider et al. 2006). Mechanismus translokace kovů do nadzemní části není stále zcela objasněn a popsán, ačkoliv se jedná o jeden z nejvýznamnějších kroků v průběhu hyperakumulace. Situace je ztížena také tím, že každá rostlina je svým chováním v určitém ohledu specifická, což je dáno rostlinným druhem, klonem či například místem, na kterém rostlina roste.

5.1.2 Vliv kadmia na růst rostlin a anatomii kořene

Fytotoxicita vyvolaná Cd zasahuje rostliny na mnoha úrovních jejich růstu a vývoje. Mezi vnější symptomy toxicity patří například tendence k rolování listů, přítomnost listových chloróz a nekrotizací či redukovaný elongační růst stonku i kořene s následnou nižší akumulací biomasy (Choppala et al. 2014). Zasažena je také činnost průduchů, tvorba chlorofylu, elektronový transportní řetězec, tvorba vitamínu D a celý fotosyntetický aparát (Ali et al. 2014; Yan et al. 2016). Záměna iontů Mg^{2+} v molekule chlorofylu za ionty Cd^{2+} vede jednak k narušení stability celého pigmentu, dochází však také k poškození celkové morfologie samotných chloroplastů (Zhang and Chen 2011; Parmar et al. 2013).

Kadmium působí četná poškození také u ostatních organel a komponent rostlinných buněk, včetně pro život nezbytného cytoskeletálního aparátu. Mikrotubuly jsou nedílnou součástí cytoskeletu buněk, ve kterých zajišťují správný buněčný růst, diferenciaci, dělení buněk, pohyb organel a přenos buněčného materiálu (Collings 2008). Pro správnou funkci těchto dynamických vláken jsou nezbytné nejrůznější druhy proteinů asociovaných s MTs, které dokáží stejně jako MTs reagovat velmi rychle na změny prostředí (Krtková et al. 2016). Mikrotubulární cytoskelet je oproti aktinovému cytoskeletu výrazně citlivější na přítomnost Cd, jak bylo popsáno například u zelených řas (Příbyl et al. 2005). Zvýšená hladina reaktivních forem kyslíku (ROS), navozená během Cd stresu, vede k přestavbám a modifikacím MTs a má výrazný vliv na genovou expresi a posttranslační modifikace tubulinu (Gzyl et al. 2015). V kořenových špičkách cibule stresované Cd dochází k výrazné depolymeraci MTs, snížení mitotického indexu a nepravidelnému uspořádání jaderných MTs (Xu et al. 2009b). Mezi další defekty vyvolané Cd patří reorientace kortikálních MTs, narušení dělicího vřetenka a následné zpoždění mitózy nebo tvorba polyploidů (Siddiqui et al. 2009). Podstatou těchto defektů je vazba iontů Cd^{2+} na β -tubulin, což vede k neschopnosti tvořit správné mikrotubulární struktury (Parween et al. 2011).

Kořeny rostlin přichází jako první rostlinné orgány do styku s těžkými kovy v půdě. U většiny rostlin nacházíme vyšší koncentrace Cd v kořenech ve srovnání s nadzemní částí, což

svědčí o tom, že cesta Cd je úspěšně zastavena již na úrovni xylému. Těžké kovy mají značný vliv na chování a vitalitu kořenů, dochází například k inhibici růstu postranních kořenů, zatímco kořen hlavní má často předčasně ukončený růst a dochází u něj k výraznému tloušťnutí. Na kořenech se také v některých případech vyskytují hnědé nekrotické skvrny (Wojcik and Tukiendorf 2004). Nejaktivnější jsou v příjmu minerálních látek apikální a subapikální vrstvy kořene (Sun et al. 2013), představované buňkami kořenové čepičky, které chrání citlivé buňky kořenového apikálního meristému.

Příjem Cd kořeny a přenos do xylému probíhá apoplastem i symplastem (Song et al. 2017). Jako jedno z hlavních apoplastických vstupních míst pro Cd je považován apikální meristém kořenové špičky, a to především v těch případech, kdy je suberinová lamela vyvinutá až ve větší vzdálenosti od špičky (Lux et al. 2004; Tao et al. 2017). Během apoplastické cesty poté přichází kovy do styku s vnější částí kořene zvanou rhizodermis. Rhizodermis je vrstvou, která slouží především k absorpci vody spolu s rozpuštěnými soluty z půdy. Její absorpční kapacita je velmi často zvýšena tvorbou kořenových vlásků, které přijímají nejen minerální látky, ale také látky toxické. U mnoha různých druhů rostlin bylo prokázáno, že Cd vede ke zvýšené produkci kořenových vlásků v blízkosti kořenové špičky, což je zřejmě způsobeno vlivem rychlejšího dozrávání rhizodermálních buněk a také jako důsledek redukce prodlužovacího růstu kořene vlivem toxického působení Cd (Seregin and Ivanov, 2001; Vitória et al. 2003; Ďurčková et al. 2007).

Apoplastická cesta pokračuje dále kortexem, na nějž navazuje endodermis vyztužená Caspariho proužky, chránící cévní svazky kořene. Vrstva přiléhající ke xylému se nazývá pericykl. V oblasti kortexu dochází vlivem Cd k rozpadu buněk, což vede k tvorbě intracelulárních trhlin a vzniku buněk s nepravidelnou stavbou (Lunáčková et al. 2003). Souběžně s endodermis se u části krytosemenných rostlin tvoří vrstva exodermis, jejíž role a stavba je v porovnání s endodermis téměř totožná (Ma and Peterson 2003). Právě tyto tři vrstvy, rhizodermis, endodermis a exodermis, tvoří hlavní bariéry pro vstup těžkých kovů do xylému (Lux et al. 2011a). V některých případech se u rostlin stresovaných těžkými kovy včetně Cd můžeme setkat s vyšší aktivitou ukládání ligninu či suberinových lamel v oblasti rhizodermis, pericyklu, nebo endodermis, což vede k ještě větší ochraně cévních svazků kořene (Lunáčková et al. 2003; Lux et al. 2004). V případě, že dojde k poškození endodermis, či k absenci Caspariho proužků, může Cd procházet ve větší míře nekontrolovaně do xylému, jak bylo popsáno například v publikaci od Lux et al. (2004).

Transport Cd pomocí symplastu, tedy skrz plasmodesmata, není přesně prozkoumaný, ale předpokládá se, že je možný (Verbruggen et al. 2009). Hlavní roli v redukci průchodu Cd symplastem hrají fytochelatiny (PC), zajišťující následnou sekvestraci kovu ve vakuole (Lux et al. 2011a). Apoplastická cesta je však dominantním mechanismem transportu Cd kořenem, o čemž svědčí také již výše zmíněný fakt, že u většiny rostlin nacházíme jen malou koncentraci

Cd v nadzemní části, a to právě díky účinným bariérám ve vnitřní struktuře kořene, které brání vstupu Cd do cévních svazků kořene.

5.1.3 Způsoby detoxikace kadmia, aktivace chelatačních sloučenin a antioxidačních drah

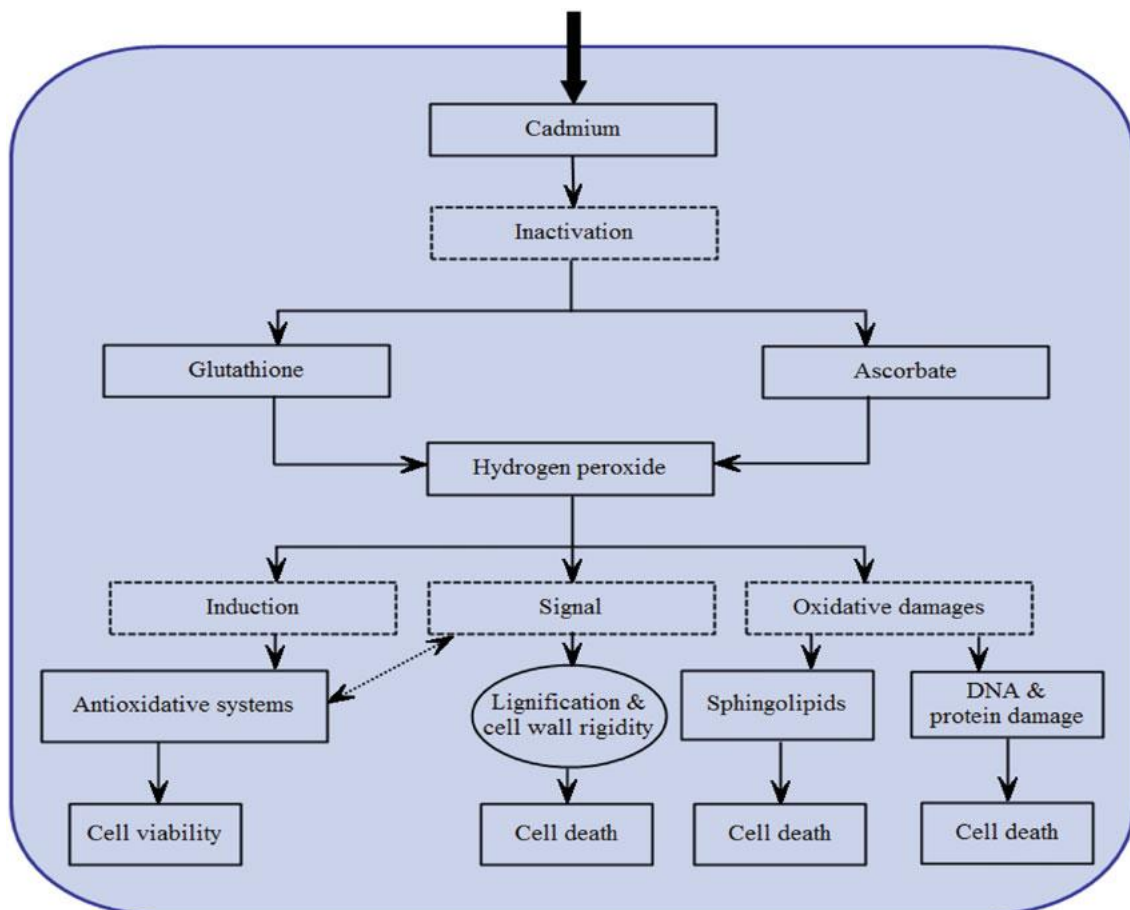
Rostliny si v průběhu evoluce dokázaly vyvinout účinné mechanismy obrany před těžkými kovy již na úrovni buněk kořenů. Jsou například schopné adsorbovat kovy na záporných skupinách sloučenin buněčných stěn kořenových buněk (pektiny, homogalakturonany, extracelulární uhlíkaté sloučeniny) (Krzesłowska 2011), hromadit kov ve svých vakuolách a omezit tak jeho toxické působení (Sharma et al. 2016), aktivovat antioxidační systémy či zpevnit vrstvu exodermis nebo endodermis s Caspariho proužky a zabránit tak vstupu kovů apoplastem do xylému (Gomes et al. 2011). Některé rostliny jsou dokonce schopné uvolňovat do půdy organické látky, které mohou vázat a izolovat těžké kovy v půdě (Schwab et al. 2005). Tento mechanismus tak může chránit kořeny před toxickým působením těžkých kovů včetně Cd (Liao and Xie 2004).

V případě, že koncentrace těžkého kovu dosáhne v buňce svého maximálního limitu, dojde k aktivaci metabolických drah, jejichž úkolem je tvorba chelatačních látek detoxikujících přítomný kov a bránících tak jeho toxickému působení na rostlinu. Během detoxikace dochází k přednostní vazbě kovu na chelatační látku, nejčastěji na síru (S) obsahující ligand. Komplex chelátor-kov může být následně deponován do vakuoly, kde je zabráněno jeho toxickému působení (Clemens 2006). Je známo několik přenašečů a pump transportující tyto komplexy přes tonoplast. Jedná se například o H^+/Cd^{2+} antiportéry CAX či například nejružnější P-ATPázy (Morel et al. 2009; Korenkov et al. 2009; Verbruggen et al. 2009).

Jedněmi z nejdůležitějších chelatačních sloučenin jsou PC, peptidy odvozené od glutationu (GSH), obsahující vyšší množství cysteinu. PC slouží převážně pro detoxikaci Cd a As (Cobbett and Goldsbrough 2002). Jsou syntetizovány v cytosolu a jako komplex transportovány do vakuoly. Jejich aktivace je spuštěna přítomností těžkých kovů, a to především Cd (Seregin and Kozhevnikova 2008). Ionty Cd^{2+} se váží k PC pomocí thiolové – SH skupiny na cysteinu a jsou přenášeny ABC přenašeči do vakuoly (Di Toppi and Gabrielli 1999). Podle Zhang et al. (2010) slouží PC k detoxikaci spíše ve stoncích, než v kořenech. Další důležité a efektivní chelátory Cd jsou metalothioneiny (MT), na cystein bohaté peptidy obsahující obvykle 45 - 85 aminokyselin. Chemická struktura MT a jejich celkový obsah v organismu se mezi rostlinami a savci značně liší (Zimeri et al. 2005). MT jsou v buňce syntetizované v různé míře nejen během stresu, ale také v závislosti na vývojovém stádiu rostliny (Rauser 1999). V detoxikaci Cd zřejmě MT nemají tak dominantní roli jako PC, ale

předpokládá se, že dokáží regulovat toleranci vůči těžkým kovům a chránit buňky před vyšším obsahem (ROS) (Leitenmaier and Küpper 2013). Neméně důležitou chelatační sloučeninou, a zároveň jedním z nejdůležitějších rostlinných antioxidantů, je tripeptid GSH, který slouží mimo jiné také jako prekurzor syntézy PC (Rauser 1999). GSH je vysoce mobilní sloučenina s thiolovou skupinou a její výskyt, často i ve vyšších dávkách, je možný detekovat v kterémkoliv rostlinném pletivu včetně xylému a floému. GSH efektivně snižuje koncentrace ROS v rostlinách, podílí se na detoxikaci těžkých kovů a na správném fungování sacharidového metabolismu, účastní se také regulace aktivity enzymů fotosyntetického aparátu (Schurmann and Jacquot 2000; Pietrini et al. 2003). Aplikace redukováného GSH rostlinám stresovaným Cd výrazně omezuje příjem Cd z hydroponického média a translokaci kovu do nadzemních částí rostlin (Nakamura et al. 2013).

Dalším způsobem, jak lze redukovat negativní dopad kovu a tvorbu ROS v rostlině, je aktivace antioxidantních systémů. ROS slouží v menší míře jakožto důležité signální molekuly, jejichž produkce je za normálních podmínek pod přísným dohledem organismu. Jakmile je však tvorba ROS vyšší než aktivita antioxidantních systémů a detoxikačních mechanismů, dochází v rostlinném těle k nejrůznějším druhům poškození. Těžké kovy vedou k oxidativnímu stresu a produkci ROS, které vznikají jako intermedie během excitace kyslíku (O_2) na singletový kyslík (1O_2). Mezi ROS řadíme například peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) nebo hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) (Kapoor et al. 2014). Cd způsobuje oxidativní stres a zvýšenou tvorbu ROS pravděpodobně skrze interakci s antioxidantními systémy, narušením elektronového transportního řetězce či indukci lipidové peroxidace. Rostlinné antioxidantní systémy jsou schopné účinně vychytávat volné radikály kyslíku a redukovat tak vznikající oxidativní stres. Antioxidant je molekula schopná účinně zabraňovat oxidaci ostatních molekul tak, že je oxidována ona sama. Nejčastěji se proto setkáme s antioxidanty v podobě redukováných molekul. Mezi nejznámější antioxidantní enzymy rostlin patří například superoxid dismutáza (SOD), která přeměňuje $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 , z něhož následně vzniká redukcí voda a kyslík. Na ni navazují různé druhy peroxidáz, kataláz a reductáz, které eliminují množství peroxidů v organismu. Nejčastějším místem vzniku ROS jsou u rostlin chloroplasty, mitochondrie a peroxisomy. Mezi neenzymatické antioxidanty řadíme již zmíněný GSH, kyselinu askorbovou, thioly, karotenoidy, tokoferoly či fenolické látky (Bhaduri and Fulekar 2012). Stručné schéma znázorňující působení Cd na oxidačně redukční mechanismy buněk shrnuje obr. 1.



Obr. 1: Schématický (hypotetický) diagram působení Cd na oxidačně redukční procesy v rostlinných buňkách. Příjem Cd kořeny vede k inaktivaci GSH a askorbátu, čímž vzniká peroxid vodíku. Ten může jednak indukovat antioxidantní systémy a zvýšit tak životaschopnost buněk, může se však také stát signální látkou, podporovat lignifikaci a vést tak k buněčné smrti. Peroxid vodíku způsobuje rovněž oxidativní poškození sfingolipidů, DNA a proteinů, což vede opět k buněčné smrti. Převzato z Choppala et al. (2014).

5.1.4 Vliv kadmia na příjem vybraných minerálních prvků

Složení a vyváženost minerální výživy je důležitá pro správný růst a vývoj rostlin, stejně jako pro jejich maximální výnos a kvalitu produkce. Minerální látky jsou také přínosné pro správnou aktivitu antioxidantních systémů, nezbytných během redukce stresu vyvolaného těžkými kovy. Kadmium působí negativně jak na příjem minerálních látek, tak na jejich rozložení v rostlinném těle. Příjem Cd kořeny rostlin je dán nespecifitou kationtových přenašečů na plasmatické membráně, mezi něž patří například rodina ZIP či NRAMP (Clemens 2006).

Draslík (K) je důležitý kationt zajišťující například rovnováhu vnitřního pH, buněčný růst, správnou osmoregulaci či aktivitu velkého množství enzymů (Mengel 2006). Dále má také pozitivní vliv na ochranu rostlin před oxidačním stresem vyvolaným toxicitou Cd, zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů, tvorbu chlorofylu a produkci prolinu. Nejvyšších koncentrací dosahuje K ve vakuole, kde velkou měrou řídí osmotický potenciál (Carroll et al. 1994) a v cytosolu, kde se účastní především aktivace enzymů, energetického metabolismu či transportu minerálních prvků (Szczërba et al. 2009). Některé studie uvádí, že obsah Cd klesá v listech rostlin ošetřených vyššími dávkami K (Siddiqui et al. 2012). Vzhledem k vysokému příjmu dokáže K nespécificky omezovat příjem některých mikroelementů, těžkých kovů a ostatních kationtů, jakými jsou například Mg^{2+} , Ca^{2+} (Tuma et al. 2014) a ovlivňuje také ostatní druhy abiotického stresu včetně sucha, chladu, tepla či nadměrného ozáření (Cakmak 2005).

Vápník (Ca) má stejně jako K pozitivní vliv na fyziologické parametry, antioxidantní aktivitu nebo eliminaci peroxidace lipidových membrán (Khan et al. 2010). Vápník patří mezi prvky, u nichž existuje antagonistický vztah v příjmu vůči Cd. Tyto dva ionty spolu díky vzájemné podobnosti kompetují o vazebná místa a je prokázáno, že vyšší dávky Ca mohou výrazně redukovat příjem Cd z půdy (Avelar Ferreira et al. 2013).

Hořčík (Mg) patří mezi důležité makroelementy sloužící například k aktivaci enzymů Rubisco, glutaminsyntasy, fruktosylbisfosfatasy, je důležitým vazebným komponentem mezi ATP a enzymy protonových pump, je nezbytnou součástí molekuly chlorofylu a slouží ke správnému přenosu uhlíkatých sloučenin, produkci tuků nebo aktivaci enzymů důležitých pro syntézu nukleových kyselin (Marschner 1995; Hermans et al. 2013). Množství Mg se v nadzemních částech rostlin vlivem působení Cd zvyšuje, což může být dáno snahou o znovuoobnovení či opravu fotosyntetického aparátu narušeného působením Cd (Nikolić et al. 2014).

Sodík (Na) je prvek hojně se vyskytující v půdách i ve vodě, kde vede jeho přítomnost k různým stupňům salinity (NaCl). Nezbytnost Na byla prokázána u malé skupiny C_4 rostlin, kde je nutná jeho přítomnost pro transport pyruvátu do chloroplastů (Furumoto et al. 2011). Pro většinu rostlin však není Na esenciálním makrobiogenním prvkem, ale stává se důležitým pouze při nedostatku K, který v rostlinném těle díky chemické podobnosti může zastoupit (Maathuis 2013). Transportní protein LCT1 je schopný přenášet jak ionty Na^+ , K^+ a Ca^{2+} , tak zřejmě i ionty Cd^{2+} , což může mít vliv na zastoupení Na v rostlinách stresovaných vyššími dávkami Cd (Antosiewicz and Hennig 2004).

Zinek (Zn) patří mezi mikroprvky, při vyšších dávkách však může přispívat k toxicitě a způsobovat v rostlině podobné reakce jako stres vyvolaný těžkými kovy. Zinek je důležitý pro správný růst kořenů, syntézu chlorofylu, metabolismus auxinu, kontroluje správnou funkci pylu a zároveň je také důležitou katalytickou součástí více jak 300 enzymů (Pandey et al. 2006; Hänsch and Mendel 2009; Emamverdian et al. 2015). Během stresu vyvolaného Cd dokáže Zn

snižovat rozpad molekul chlorofylu, degradaci DNA, lipidovou peroxidaci a indukovat syntézu PC a MT (Taspinar et al. 2011; Vurro et al. 2011). Při příjmu dochází mezi Zn a Cd k výrazné kompetici. Aravind et al. (2009) zjistili, že Zn, na rozdíl od Cd, inhibuje u rostlin stresovaných Cd oxidaci NADPH a brání tak vzniku ROS. Ionty Zn^{2+} jsou chemicky podobné iontům Cd^{2+} a mohou být tímto těžkým kovem zaměněny na svých vazebných místech. Navíc bylo zjištěno, že příjem Cd kořeny sdílí stejné transportní mechanismy jako Zn, u čeledi *Brassicaceae* je známo hned několik společných přenašečů (HMA2, 3, 4; NRAMP4, YSL) (Kleckerova et al. 2011). Vzhledem k tomuto faktu je možné se domnívat, že by vyšší koncentrace Zn mohly negativně ovlivňovat příjem Cd kořeny. V literatuře se setkáme se studii zabývajícími se interakcí Cd a Zn, přičemž je nutné brát zřetel především na použitou koncentraci Zn. Jak uvádí Cherif et al. (2011), vysoké koncentrace Zn vedou spolu s přidavkem Cd ke zvyšujícímu se oxidačnímu stresu, zatímco nižší dávky Zn snižují toxicitu Cd. Ke stejnému závěru došli například Balen et al. (2011), Tuma and Svojanovska (2015) či Aravind and Prasad (2003), v jejichž experimentech působil Zn pozitivně na redukcii lipidové peroxidace, aktivitu peroxidáz, nebo poškození DNA vlivem Cd a zároveň vedl k redukcii příjmu Cd kořeny.

Studium příjmu minerálních látek a jejich interakce s Cd je důležitá oblast výzkumu, která by neměla být opomíjena. Jak potvrzují některé studie, akumulace Cd a dalších těžkých kovů rostlinou lze účinně redukovat pomocí správné minerální výživy (Sarwar et al. 2010).

5.1.5 Vliv kadmia na vybrané stresové signální látky

Toxický vliv Cd na rostliny je značný, ovlivněna je nejen fyziologie či anatomie rostliny, ale také produkce stresových signálních látek. Uvedme například zvýšenou produkci ROS, zvýšenou aktivitu peroxidace membránových lipidů spojenou s hromaděním malondialdehydu (MDA), vliv na zastoupení základních aminokyselin a koncentraci prolinu, glutationu, kyseliny salicylové (SA), karotenoidů či fenolických látek (lignin, tanin, flavonoidy).

Významnou signální molekulou stresu vyvolaného Cd je MDA. Jedná se o vedlejší produkt vznikající aktivitou volných radikálů kyslíku během peroxidace lipidových membrán. Rostliny stresované Cd vykazují ve svých pletivech vyšší obsah ROS, zvýšený je proto také obsah MDA a H_2O_2 , díky čemuž lze dobře studovat stresovou reakci. Toto chování bylo popsáno v mnoha studiích (Schützendübel et al. 2001; Olmos et al. 2003; Rodríguez-Serrano et al. 2006), na druhou stranu však můžeme najít také experimenty, ve kterých nebyl prokázán vliv Cd na hromadění MDA nebo i H_2O_2 (Zornoza et al. 2002; Bianucci et al. 2012) a je proto důležité dbát na pozadí experimentů popsaných v literatuře.

Další významnou molekulou, kterou rostliny produkují při Cd stresu, je prolin. Aminokyselina prolin funguje nejen jako signální molekula, ale také jako antioxidant

a chelátor kovů. Prolin vzniká pomocí dvou biochemických drah, a to buď pomocí glutamátové, nebo ornithinové dráhy. Důležitým enzymem podílejícím se na vzniku prolinu během glutamátové dráhy je enzym glutamát kináza, jejíž aktivita je regulována na základě zpětné vazby informující o obsahu prolinu v organismu. V případě zvýšeného stresu u rostlin špenátu vyvolaného přidáním Zn a Cd docházelo ke snížení aktivity glutamát kinázy. Aktivita tohoto enzymu byla navíc specifická pro různé růstové fáze a závisela na schopnosti rostliny adaptovat se na stresovou situaci (Pavlíková et al. 2008). Dále bylo popsáno, že exogenní přírůstek prolinu zmírňuje stresovou reakci při stresu Cd a redukuje množství ROS v rostlinném těle (Xu et al. 2009a). U rostlin vystavených vyšším dávkám Cd dochází k vyšší akumulaci prolinu (Canakci and Dursun 2013). Stejně jako prolín, také některé ostatní aminokyseliny hrají důležitou roli ve stresové odpovědi na Cd, přičemž jejich hladiny se mohou v reakci na kov zvyšovat, či snižovat. Xie et al. (2014) uvádí, že příjem Cd vedl k vyšší produkci asparaginu a domnívají se, že vyšší koncentrace této aminokyseliny může hrát roli v detoxikačních procesech nebo během biosyntézy chelatačních látek. Dalším příkladem důležitosti aminokyselin je například analýza jejich obsahu v xylému řepky olejky (*B. napus*), která odhalila, že při stresu Cd dochází ke zvýšení koncentrace prolinu, cysteinu a glutationu a zároveň ke snížení obsahu kyseliny asparagové (Nakamura et al. 2008). Jedna z hypotéz přisuzuje významnou roli také histidinu, aminokyselině objevující se ve vyšších množstvích v kořenech rostlin hyperakumulujících nikl (Ni). Histidin tvoří komplexy s bivalentními kationty včetně Ni, které jsou pak přepravovány do xylému a dále do nadzemních částí rostlin (Callahan et al. 2006).

Kyselina salicylová je významnou signální sloučeninou a růstovým hormonem ovlivňujícím toleranci a vývoj rostlin během nepříznivých podmínek, jako je teplotní či osmotický stres, zasolení nebo různé biotické stresy včetně stresu vlivem těžkých kovů (Liu et al. 2016). Existuje mnoho studií dokládající aktivaci antioxidantních systémů díky exogenně přidané SA k růstovému médiu a následnou redukcí oxidačního poškození vlivem těžkých kovů. Takto přidaná SA dokáže redukovat příjem a akumulaci Cd a zpevňovat buněčné membrány či chránit fotosyntetický aparát během Cd stresu (Zhang and Chen 2011; Wang et al. 2013). Ali et al. (2015) uvádí, že exogenní aplikace SA vedla u rostlin řepky olejky (*B. napus*) stresovaných Cd k redukcí ROS, aktivaci antioxidantních systémů a obnově správného redoxního potenciálu, snížení koncentrace MDA a regulaci výměny plynů. Již méně studií se zabývá pochopením funkce a vlivu endogenní SA na stresový stav v rostlině. Například Zawoznik et al. (2007) uvádí, že endogenní SA může být důležitou signální molekulou pro udržování či dokonce zesilování Cd vyvolaného oxidativního stresu. Z výsledků nedávných experimentů také vyplývá, že hladina endogenní SA je úzce spojena s mírou exprese genu pro GSH syntetázu, enzymu katalyzujícího tvorbu GSH a výrazně se tak podílí na regulaci stresu vyvolaného například těžkými kovy (Guan et al. 2015). Kyselina salicylová se vyskytuje u rostlin jednak ve volné formě, a jednak ve formě vázané. Krantev et al. (2008) pozorovali

v listech kukuřice, že koncentrace volné SA po aplikaci Cd mírně poklesla, zatímco hodnota vázané SA vzrostla téměř 10x oproti kontrole. V experimentu od Metwally et al. (2003) bylo dále popsáno, že aplikace Cd vedla ke zvýšení obsahu volné SA v kořenech ječmene. Tyto výsledky ukazují, že nadbytek volné SA dokáže inhibovat toxicitu Cd tvorbou komplexů Cd-SA.

Dalším faktorem, který může hrát důležitou roli při snižování stresu vlivem Cd, je přítomnost sloučenin, které dokáží vychytávat ROS. Jak již bylo zmíněno, přítomnost Cd vede ke zvýšené tvorbě ROS, jejichž působením dochází k rozličným negativním efektům uvnitř rostlinných těl. Jednou ze sloučenin, která je schopná vychytávat H_2O_2 , je benzoát sodný (BS). Benzoát sodný, podobně jako antioxidanty, chrání molekuly chlorofylu před degradací, snižuje lipidovou peroxidaci a reguluje koncentraci GSH u rostlin stresovaných těžkými kovy (Gallego et al. 1996; Chien et al. 2001). Kořeny rýže ošetřené aplikací BS vykazovaly v růstovém médiu obohaceném o Cd nižší aktivitu MAP kinázové dráhy, která je spouštěna při nejrůznějších stresech vedoucích k produkci ROS (Yeh et al. 2007). Tyto poznatky vedou k domněnce, že BS by mohl účinně chránit rostliny stresované těžkými kovy před produkcí ROS a omezovat tak jejich toxicitu již na buněčné úrovni.

5.2 Fytoremediace

Škodlivé látky v půdách nelze ve většině případů degradovat biologicky, jejich přítomnost se proto stává velkým problémem pro mnoho lidí i živočichů. Těžké kovy se často nachází na rozsáhlých plochách a jejich odstranění je časově i finančně náročné. Legislativa ČR udává jako preventivní hodnotu obsahu Cd v běžných půdách $0,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ sušiny a v lehkých půdách $0,4 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ sušiny (Vyhláška 153/2016 Sb.). Vzhledem k těmto skutečnostem se stává metoda fytoextrakce velmi efektivní a ekonomicky výhodná. Jedná se o metodu využívající přirozenou schopnost některých druhů rostlin akumulovat těžké kovy z půd a následně je skladovat ve svém těle. První zmínka o možnosti využít rostliny pro tyto účely se objevila již v roce 1983 (Chaney 1983). Kromě fytoextrakce lze redukovat negativní vliv těžkých kovů v půdě také například pomocí rhizofiltrace, fytostabilizace nebo fytovolatilizace (Obr. 2).

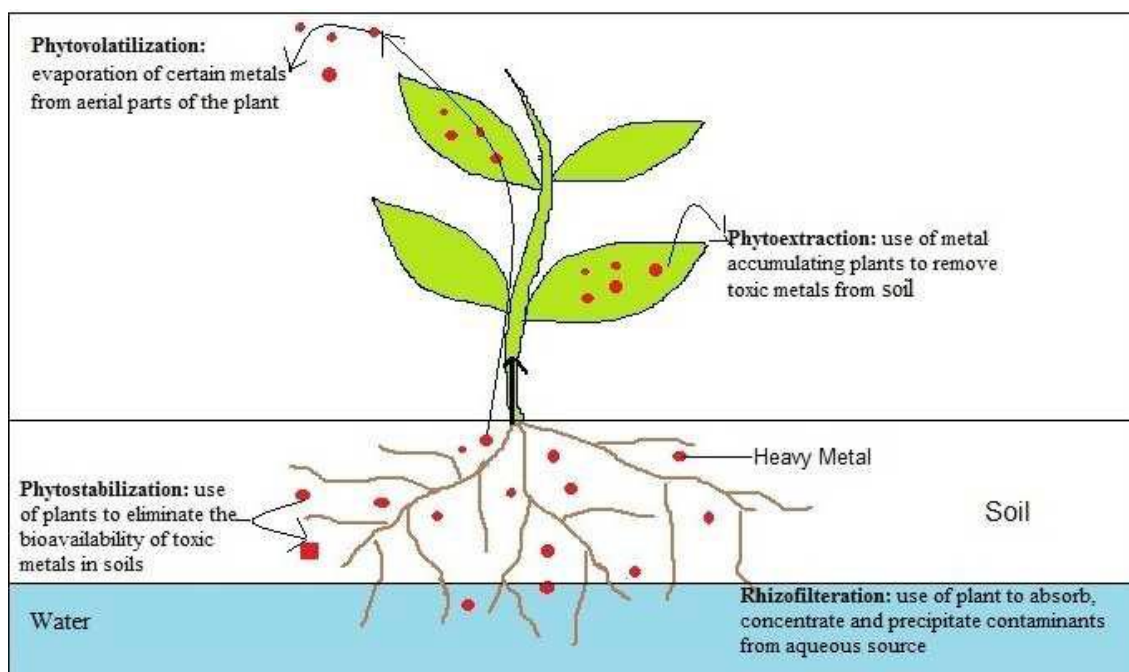
Rostlinné druhy, které dokáží tolerovat a prospívat na toxických půdách, se nazývají metalofyty. Jedná se často o endemity vázané na půdy obohacené o velké množství iontů kovů (Raskin and Ensley 2000). Některé metalofyty dokáží akumulovat do svých těl enormní množství kovů ($> 10\,000 \text{ Mn}$, Zn , $> 1\,000 \text{ Ni}$, Co $> 100 \text{ Cd mg.kg}^{-1}$) (Robinson et al. 1999; Escarré et al. 2000; Boyd and Jaffré 2009; Pollard et al. 2009; Wang et al. 2009; Krämer 2010) a v případě, že kovy translokují z kořenů do svých nadzemních částí, nazýváme tyto rostliny

hyperakumulátory. Kritériem pro získání označení „rostlinný hyperakumulátor“ je schopnost akumulovat kovy v koncentraci, která je stonásobně vyšší, než koncentrace daného kovu u ostatních rostlin rostoucích na stejné půdě (Ent et al. 2013). Charakteristickým znakem pro hyperakumulátory je také hodnota poměru obsahu kovů v nadzemní/kořenové části, která by měla být vyšší jak „1“. V současné době je známo více než 400 rostlinných druhů, které jsou popsány jakožto hyperakumulátory (Reeves et al. 2018).

Rostlinný druh vhodný pro fytoextrakce by měl splňovat určité vlastnosti, jako je vysoká odolnost vůči toxicitě vyvolané těžkými kovy, rychlý růst s dostatečným množstvím biomasy, rozsáhlý kořenový systém, nízké nároky na pěstování a v neposlední řadě schopnost akumulace vyšších dávek těžkých kovů do svých nadzemních částí spolu s vysokým translokačním faktorem (Garbisu et al. 2002). Tyto vlastnosti je však těžké zkombinovat. Rostliny využívají většinou pouze dvě hyperakumulační strategie. Jedna skupina akumuluje vysoká množství kovů do svých těl, avšak objem jejich biomasy je malý a většinou dokáží přijímat pouze jeden či dva druhy kovů, které jsou pro ně specifické (*Thlaspi caerulescens*). Druhá skupina zahrnuje rostliny s velkou biomasou, schopné akumulovat vícero druhů těžkých kovů, avšak příjem těchto iontů kořeny není velký (Raskin and Ensley 2000).

Nejznámějším a pravděpodobně nejvíce studovaným hyperakumulátorem je *Noccaea caerulescens* (*Thlaspi caerulescens*), rostlina schopná akumulovat do svých nadzemních částí významná množství Zn a Cd (Hernández-Allica et al. 2006). Potenciál pro akumulaci Zn a Cd se vyskytuje také u neméně známé *Arabidopsis halleri* (Tlustoš et al. 2016). Prokázanými hyperakumulátory niklu (Ni) jsou například zástupci rodu *Alyssum* (Broadhurst and Chaney 2016), hyperakumulátorem arsenu (As) je pak kapradina *Pteris vitata* (Huang et al. 2016). Mezi hyperakumulátory Cd patří například *Amaranthus mangostanus*, *Sedum alfredii* a mnoho dalších (He et al. 2015). Velký potenciál představují díky svému rychlému růstu, rozsáhlému kořenovému systému a vysoké schopnosti akumulovat Cd také dřeviny v čele s některými druhy topolů (He et al. 2013).

Přestože je metoda fytoextrakce příznivá po estetické, environmentální i ekonomické stránce a je velmi dobře přijímána širší veřejností, jejím značným omezením a nedostatkem je bohužel dlouhá doba, za kterou jsou těžké kovy efektivně odstraněny z půdy, a to především ze značně zamořených lokalit. Metodu fytoextrakce lze sice zefektivnit přidáním chelatačních látek a hormonů (kyselina giberelová, auxin, EDTA), půdních mikroorganismů, rhizobakterií či mykorhizních hub do půdy (He et al. 2015), zároveň s tím však přichází riziko vyvazování kovů a jejich uvolnění například do spodních vod (Wenzel et al. 2003). Je také důležité dodat, že u výsledků fytoextrakčních experimentů je nutné sledovat způsob pěstování pokusných rostlin. Hydroponické pěstování nám dává celkový obraz o možném genetickém předpokladu a potenciální toleranci dané rostliny vůči těžkým kovům, neukazuje však, zda rostlina bude v polních pokusech opravdu schopná hyperakumulace.



Obr. 2: Způsoby fytoremediace. Rhizofiltrace – příjem těžkých kovů a znečišťujících látek kořeny rostlin prorůstajících do kontaminovaných vodních zdrojů. Fytostabilizace – imobilizace kovů v půdě pomocí kořenů rostlin. Fytoextrakce – využití rostlinných hyperakumulátorů pro akumulaci těžkých kovů do svých nadzemních částí. Fytovolatilizace – akumulace těžkých kovů (Hg, Se) rostlinou spolu s jejich následnou přeměnou na těkavou formu a uvolnění do atmosféry. Převzato z Kushwava et al. (2015).

5.3 Řepka olejka (*B. napus*) a její využití při fytoremediacích

Pokusnou rostlinou používanou při experimentech v rámci předkládané disertační práce byla řepka olejka (*B. napus*). Jedná se o běžně pěstovanou a hospodářsky významnou plodinu se schopností tolerovat vyšší dávky Cd (Hernández-Allica et al. 2008). Výhodou této dvouděložné rostliny je její rychlý růst, rozsáhlý kořenový systém, již zmíněná odolnost vůči vyšším dávkám těžkých kovů, nenáročné pěstování a v neposlední řadě ekonomický přínos. Řepka olejka je významnou plodinou především díky produkci značného množství oleje ve svých semenech. Park et al. (2012) ukázali, že je možné pěstovat řepku na kontaminovaných půdách, jež dokáží rostliny částečně ozdravit, a zároveň je možné využít olej z jejich semen pro výrobu biopaliv. Cd se do oleje produkovaného semeny řepky nedostává, jak vyplývá z experimentu provedeného v okolí íránských továren, během něhož bylo množství Cd v tomto oleji analyzováno (Palizban et al. 2015). Schopnost hyperakumulace Cd řepkou olejkou nebyla v některých případech v rámci polních pokusů prokázána (pokusy probíhaly v kontaminovaných

oblastech Číny) (Yu et al. 2012). Zde bychom však měli zřejmě brát ohled na použitý kultivar, který by mohl hrát roli ve schopnosti akumulace kovů. Dokladem toho je nádobový experiment od Cojocararu et al. (2016), Rossi et al. (2002), Li et al. (2017) či od Szulc et al. (2015), kteří uvádí, že na základě jejich výsledků je *B. napus* schopná být potenciálním hyperakumulátorem Cd. Také Ben Ghnaya et al. (2009) a Touiserkani and Haddad (2012) ukázali, že rostlinný kultivar je důležitý detail sehrávající svoji roli ve schopnosti hyperakumulace Cd. První zmiňovaní ve svém hydroponickém experimentu zkoumali 4 různé kultivary řepky olejky a zjistili, že dva z nich jsou vůči stresu Cd mnohem více tolerantní, a že dokáží akumulovat do svých nadzemních částí více kovu, než zbylé dva kultivary. Zajímavý experiment testující schopnost akumulovat Cd provedli Grispén et al. (2006), kteří testovali 77 rostlin řepky olejky nasbíraných z různých lokalit po celém světě. Během hydroponického experimentu ukázali, že obsah Cd v biomase může být sice malý, ale celkový obsah Cd záleží na produkci dané rostliny. Na základě tohoto hydroponického experimentu dále vybrali 18 rostlin, které vykazovaly nejvyšší zastoupení Cd v nadzemních částech, a převedli experiment do polních podmínek. Rostliny pěstovali na dvou stanovištích, která se lišila obsahem Cd, Zn a hodnotami pH v půdě. Výsledek pokusu ukázal, že rostliny rostoucí v půdě s nižším obsahem Cd ($2,5 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$) a vyšším pH (5,7), akumulovaly do nadzemních částí více Cd, než rostliny v půdě o pH 4,2 a obsahu $5,5 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$. Toto zjištění vede k myšlence, že celková efektivita fytoremediace je u rostlin velmi komplexní záležitost závislá na mnoha nejrůznějších půdních faktorech a rostlinném genotypu.

V literatuře se můžeme setkat s mnoha nejrůznějšími experimenty využívajícími řepku jakožto pokusný materiál pro zkoumání toxicity Cd. Ali et al. (2014) například zkoumali vliv Cd na semenáčky *B. napus*. Nižší dávka Cd ($100 \mu\text{M}$) podle nich vedla k podpoře růstu rostlin, zatímco vyšší dávka Cd ($500 \mu\text{M}$) již způsobovala klasické symptomy toxicity (inhibovaný růst, nižší množství chlorofylu, vyšší obsah MDA a ROS nebo vyšší aktivita antioxidantních enzymů). Významný negativní dopad Cd na fotosyntetický aparát (Benyas et al. 2013), složení membránových lipidů (Nouairi et al. 2006) či hromadění MDA (M-Kalantari and Oloumi 2005) u *B. napus*, byl popsán v mnoha nejrůznějších experimentech. Mnoho studií se zabývá také možnostmi redukce Cd stresu aplikací nejrůznějších růstových regulátorů, nebo chelatačních látek. Kyselina 5-aminolevulinová dokáže účinně snižovat příjem Cd kořeny a podporuje funkci fotosyntetického aparátu a antioxidantních systémů (Ali et al. 2015). Podobných výsledků bylo dosaženo také aplikací kyseliny citronové (Ehsan et al. 2014), oxidu dusného (NO) (Jhanji et al. 2012) či GSH (Nakamura et al. 2013). Aplikace kyseliny ethylendiamin-tetraoctové (EDTA) naopak vede ke zvýšené dostupnosti těžkých kovů pro rostliny a k jejich vyššímu příjmu kořeny (Turan and Esringu 2007).

6. Metodika pokusů

Experimenty provedené v průběhu doktorského studia probíhaly nejen na Univerzitě Hradec Králové, ale také na jiných specializovaných pracovištích (University of Bayreuth, státní podnik Povodí Labe v Hradci Králové, Katedra experimentální biologie rostlin Karlovy Univerzity). Jako pokusná rostlina byla zvolena řepka olejka (*B. napus*). Mezi používané metody patřilo například nedestruktivní měření intenzity fotosyntézy, transpirace či relativního obsahu chlorofylu, dále metody měření obsahu těžkých kovů a biogenních prvků v jednotlivých částech rostlin, měření obsahu jednotlivých aminokyselin, SA, celkového obsahu chlorofylu, superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a dalších stresových markerů. Anatomická část experimentů zahrnovala analýzu fixovaných kořenů a vizualizaci ligninu, detekci Cd na příčných řezech kořeny a imunofluorescenční barvení MTs.

6.1 Pokus č. 1 - Skleníkový experiment zaměřený na toleranci různých kultivarů řepky vůči kadmiu

6.1.1 Způsob pěstování

Experiment byl proveden formou nádobového pokusu. Semena byla získána z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze. Plastové květináče o objemu 10 l byly umístěny v průběhu měsíce dubna ve skleníku Botanické zahrady v Hradci Králové (východní Čechy, 278 m. n. m.), fotoperioda odpovídala klimatickým podmínkám stanoviště (50° 10' 34" N; 15° 50' 19" E), průměrná teplota se pohybovala ve dne v rozmezí 23 – 26 °C, v noci kolem 16 °C, relativní vlhkost dosahovala zhruba 60%.

Pro experiment byly vybrány 4 kultivary (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9) řepky olejky (*B. napus*) s odlišnými charakteristikami růstu, jejich vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 1. Do každého květináče bylo naseto deset semen, která se nechala naklíčit, a poté se jejich počet v každé nádobě zredukoval na tři rostliny. Zvolený pěstební rašelinový substrát (RS II) byl zakoupen od firmy Agro a jeho agrochemické složení bylo následující: pH/KCl – 6,20; množství přístupného P 91,4; K 203,0; Mg 202; Ca 1840; Al 74,86; Fe 48,7; Mn 6,6; Cu 0,69 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.

Pro účely experimentu byly zvoleny čtyři varianty se třemi opakováními. Jednalo se o variantu kontrolní, dále o varianty s uměle přidaným Cd (ve formě CdCl₂·2H₂O) o koncentracích 50, 100 a 150 mg Cd.kg⁻¹ půdy. Pro přehlednost byly tyto varianty značeny v textu a grafech následovně: Kontrola, 50 Cd, 100 Cd a 150 Cd. Navážené Cd bylo rozpuštěno v destilované vodě a ve formě roztoku rovnoměrně aplikováno do nádoby se zeminou ještě před

samotným klíčením semen. Zálivky, které následovaly během experimentu, již neobsahovaly žádné příměsi těžkých kovů. Jednalo se o běžně dostupnou pitnou vodovodní vodu. Rostliny byly pěstované v nádobách po dobu 30 dní.

Tab. 1: Charakteristika použitých kultivarů řepky olejky (*B. napus*)

Genotyp	Tvůrce	Provenience	Typ	Charakteristika	Poznámka
CZL-20/1	VÚRV, v.v.i.	Čína/ČR	ozim	šlechtitelský materiál (linie)	raný, nízká mrazuvzdornost, žlutosemennost
Benefit	SELGEN, a.s.	ČR	ozim	kultivar (linie)	odlišné spektrum proteinů (tzv. dehydrinů)
Iwas	?	Japonsko	jařina	kultivar (linie)	odlišný habitus, není odolná k mrazu
ZhongZhuang9	?	Čína	poloozim	kultivar (linie)	raný, velmi nízká mrazuvzdornost

6.1.2 Měření fotosyntetických parametrů

Fluorescence chlorofylu a relativní množství chlorofylu bylo měřeno pomocí přístrojů fluorometru OS1p (Opti-Sciences, USA) a přístrojem Chlorophyll Content Meter CCM-200 (Opti-Sciences, USA), intenzita fotosyntézy byla měřena pomocí unfracervného analyzátoru plynů LCpro+. Všechna měření probíhala 24 hodin před sklizní. Během sklizně byly dokumentovány vnější příznaky stresu vyvolaného těžkým kovem.

6.1.3 Mineralizace vzorků a měření obsahu kadmia pomocí AAS

Kořeny a nadzemní části byly sklizeny a omyty destilovanou vodou. Jednotlivé části rostlin byly poté vysušeny do konstantní hmotnosti při 65 °C (Venticell 707; Ilabo, Borsovska, Kyjov, CZ) a homogenizovány pomocí laboratorního mlýnku na jemný prášek.

Mineralizace vzorků proběhla v laboratoři státního podniku Povodí Labe v Hradci Králové. 0,3 g jemně namletého vzorku bylo smícháno s 1 ml H₂O₂ a 3 ml HNO₃

a rozloženo v mineralizačním zařízení (Berghof Speedwave MWS-4). Program sestával z třístupňového teplotního rozkladu (180 °C 20 min, 190 °C 30 min, 100 °C 10 min). Vzorky byly poté doplněny destilovanou vodou na objem 15 ml. Stanovení obsahu Cd, K, Ca a Na proběhlo na Univerzitě Hradec Králové za pomoci atomového absorpčního spektroskopu AAS SOLAAR M5 (Thermo Electron Spectroscopy Ltd., Solaar House, Cambridge, UK).

6.1.4 Stanovení obsahu kyseliny salicylové

Pro stanovení celkového obsahu SA ve vzorcích bylo použito 0,5 g jemně namleté sušiny, která byla smíchána s 5 ml 75% methanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Vzorky byly poté umístěny na třepačku MultiReax (Heidolph, Schwabach, Germany) a třepány po dobu 24 hodin. Následovala centrifugace 15 min při 3000 g (MPW 223a, Warsaw, Poland). Ze vzorků se odebralo 1,5 ml a tento objem byl po dobu cca 2 hodin odpařován pod proudem dusíku (30 °C) (NDK 200-2, Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd). Před samotnou analýzou byly zbytkové pevné nečistoty ještě jednou rozpuštěny v methanolu a odstředěny pomocí centrifugace (Labdancer minishaker IKA).

Ke stanovení obsahu SA byl použit kapalinový chromatograf Agilent a zpracování výsledků probíhalo pomocí programu OpenLab CDS, v. C.01.01 (Agilent Technologies, USA). Dávkovaný objem vzorku činil 10 µl, jeho separace probíhala s využitím chromatografické kolony (Kinetex C18) umístěné v termostatu při teplotě 25 °C. 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⁻¹. Celková doba analýzy byla 6 min. Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 235 nm. Vzorky byly analyzovány ve dvou opakováních a pro vyhodnocení analýzy byla použita metoda kalibrační křivky použitím standardu kyseliny salicylové (Sigma Aldrich).

6.1.5 Stanovení obsahu aminokyselin

Stanovené množství sušiny (100 mg) bylo rozpuštěno v 1,5 ml 70% nedenaturovaného etanolu a extrahováno 15 min na třepačce. Poté byla sušina povařena 10 min v termobloku vyhřátém na 120 °C a po vychladnutí centrifugována 5 min na 4000 g. Vzniklý supernatant byl převeden do 1,5 ml eppendorfky, centrifugován 3 min na 13000 g a přepipetován do 1,8 ml vialky. Vzorky byly následně odpařovány pod tlakem v termobloku vyhřátém na 60 °C po dobu cca 60 min. Vzniklý pelet byl rozpuštěn v 1 ml 70% etanolu. Celý postup se z důvodu získání vyššího výtěžku opakoval ještě dvakrát. Vybrané aminokyseliny (Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Cys, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu, Lys, Pro a vnitřní standard norvalin) byly detekovány pomocí chromatografického systému HPLC s fluorescenční detekcí (Agilent

1260 Series) s kolonou Zorbax Eclipse Plus RRHT C18 (4.6×50 mm, 1.8 µm). Metoda měření byla zvolena dle návodu výrobce (Application Note 5990-4547EN) a přizpůsobena podmínkám systému.

6.2 Pokus č. 2 – Spolupůsobení kadmia a zinku na fyziologické a anatomické parametry řepky olejky (*B. napus*)

6.2.1 Způsob pěstování

Semena tří různých kultivarů řepky olejky (Cadeli, Viking, Navajo) byla získána z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze, jejich charakteristika je uvedena v Tab. 2. Klíčení probíhalo po dobu 6 dní, semenáčky byly poté přeneseny do hydroponického média a kultivovány v klimaboxu s fotoperiodou 16/8 den/noc a teplotou 21 °C. Celková doba pěstování byla 14 dní. Jako hydroponické médium bylo použito modifikované Hoagland medium s následujícím složením roztoků: 0,1 mM (NH₄)₂HPO₄; 0,28 mM Ca(NO₃)₂; 0,6 mM KNO₃; 0,2 mM MgSO₄; 5 mM komplex Fe(III) a N,N'-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylenediamin-N,N'-diacetat (HBED); 4,63 mM H₃BO₃, 0,032 mM CuSO₄; 0,915 mM MnCl₂; 0,011 mM MoO₃ a 0,077 mM ZnSO₄, pH roztoku bylo 5,7. Médium bylo měněno každé 3 dny. Roztok těžkých kovů byl přidáván do média v koncentraci 5 µM Cd (562 µg Cd v CdCl₂·2H₂O) a 10 µM Zn (693,9 µg Zn v ZnSO₄·5H₂O). Jednotlivé varianty byly pro přehlednost označené jako kontrola, 5 µM Cd, 10 µM Zn, 5 µM Cd + 10 µM Zn a každá varianta byla pěstována ve třech opakováních. Po 14 dnech kultivace byly rostliny sklizeny, zváženy, změřeny a vysušeny pro následné analýzy.

Tab. 2: Charakteristika použitých kultivarů řepky olejky (*B. napus*)

Genotyp	Tvůrce	Provenience	Typ	Charakteristika	Poznámka
Cadeli	Monsanto SAS	Francie	ozim	kultivar (linie)	předpokládaná suchovzdornost
Viking	Norddeutsche Pflanzenzucht	Německo	ozim	kultivar (linie)	předpokládaná nižší odolnost k suchu
Navajo	CPB Twyford Ltd	Velká Británie	ozim	kultivar (linie)	vysoká mrazuvzdornost

6.2.2 Mineralizace vzorků a analýza obsahu prvků

Pro analýzu akumulace prvků v rostlinách byly kořeny a nadzemní části rostlin sklizeny zvlášť. 0,1 g vysušeného rostlinného materiálu bylo rozloženo ve 3 ml HNO₃ v mineralizačním zařízení (Start 1500, MLS GmbH) s využitím postupného teplotního gradientu s maximem 210 °C. Obsah Cd, Zn, K, Mg, Ca a Na ve vzorcích byl měřen pomocí přístroje ICP-OES (iCAP 6500 Series spectrometer, Thermo-Fisher).

6.2.3 Stanovení obsahu chlorofylu

Stanovení obsahu chlorofylu v listech probíhalo pomocí metody od Wellburn (1994). Vzorky čerstvých listů o hmotnosti 0,1 g byly homogenizovány ve 2 ml 80% acetonu za pokojové teploty a následně centrifugovány po dobu 15 minut. Měření vlnových délek (663 nm, 646 nm, chlorofyl a, chlorofyl b) probíhalo na spektrofotometru Agilent Cary 60 (Agilent Technologies, USA).

6.2.4 Anatomické analýzy

Fixace kořenů probíhala dle protokolu v publikaci Roschztardt et al. (2009). Kořeny byly nejprve fixovány za sníženého tlaku ve fixačním roztoku (2% (v/w) paraformaldehyd, 1% (v/v) glutaraldehyd, 1% (w/v) kafein a 0,01% Triton-X v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7) po dobu 30 minut. Fixované kořeny byly poté třikrát promyty 0,1 M fosfátovým pufrům (pH 7,4) a dehydratovány pomocí následující alkoholové řady: 50%, 70%, 90%, 95% a 100% ethanol, ethanol/butanol 1:1, 100% butanol. Závěrečná fixáž kořenů byla provedena podle instrukcí v návodu pro kit Technovit 7100 resin (Kulzler).

Příprava vzorků příčných řezů kořenů probíhala s pomocí mikrotomu Leica RM2265. Jednotlivé řezy (7 μm) byly zhotoveny jednak z kořenové špičky, ale také ze střední části fixovaného kořene. Příčné řezy byly vizualizovány na mikroskopu Olympus Provis AX 70 (Olympus Optical Co., Ltd., Japan). Autofluorescence ligninu byla detekována v oblasti UV spektra při excitaci 330-385 nm.

Měření průměru kořenových špiček a středních částí kořenů probíhalo v programu NIS Elements. Pro určení počtu kořenových špiček byly kořeny naskenovány a analyzovány v rámci obrazové analýzy v programu NIS Elements AR 3.22.05.

6.3 Pokus č. 3 - Vliv benzoátu sodného na stresovou odpověď vůči vyšším dávkám kadmia u řepky olejky (*B. napus*)

Cílem experimentu bylo zjistit, zda je BS schopný redukovat stres vzniklý vlivem Cd u hydroponicky pěstovaných rostlin řepky olejky (*B. napus*). V rámci experimentu byly změřeny délky kořenů a zváženy nadzemní a podzemní části rostlin. Dále byl analyzován obsah stresových signálních látek, jako je například peroxid vodíku, superoxidový radikál, fenoly či flavonoidy.

6.3.1 Způsob pěstování

Semena kultivaru řepky olejky (Ladoga) byla získána z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze, charakteristika daného kultivaru je uvedena v Tab. 3. Klíčení probíhalo po dobu 6 dní, semenáčky byly poté přeneseny do hydroponického média a kultivovány v klimaboxu s fotoperiodou 16/8 den/noc a teplotou 22 °C. Hydroponické médium bylo modifikované Hoagland medium s následujícím složením roztoků: 0,2 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM KNO_3 , 3,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,18 mM fericitrát, 0,046 mM H_3BO_3 , 0,01 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,07 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH 5,7. Médium bylo měněno každé 3 dny. Roztok těžkých kovů byl přidáván do média v koncentraci 5 μM Cd (562 μg Cd v $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), koncentrace BS pak byla 10 μM (1441,1 μg BS). Byly připraveny čtyři následující varianty, každá ve třech opakováních: kontrola, Cd, BS a Cd+BS. Po 14 dnech kultivace byly rostliny sklizeny, zváženy, změřeny a připraveny pro následné analýzy.

Tab. 3: Charakteristika použitých kultivarů řepky olejky (*B. napus*)

Genotyp	Tvůrce	Provenience	Typ	Charakteristika	Poznámka
Ladoga	Saatbau Linz	Německo	ozim	kultivar (linie)	výnosný kultivar

6.3.1 Mineralizace vzorků a analýza obsahu prvků

Pro analýzu akumulace prvků v rostlinách byly sklizeny zvlášť kořeny a nadzemní části. 0,1 g vysušeného rostlinného materiálu bylo rozloženo ve směsi HNO_3 a H_2O_2 v poměru 9:2 v mineralizačním zařízení (Start 1500, MLS GmbH) s využitím postupného teplotního gradientu. Obsah Cd, Zn, K, Mg a Ca ve vzorcích byl měřen pomocí přístroje ICP-OES (GBC INTEGRA XL, Austrálie) v laboratoři státního podniku Povodí Labe v Hradci Králové.

6.3.2 Spektrofotometrické měření obsahu chlorofylu, reaktivních forem kyslíku, celkových rozpustných proteinů, obsahu celkových fenolů a flavonoidů

Stanovení obsahu chlorofylu probíhalo stejným způsobem, jak je popsáno v bodě 6.2.3.

Čerstvý rostlinný materiál byl rozdělen na kořeny a nadzemní část. Vzorky byly homogenizovány s pomocí mořského písku v 50 mM fosfátovém pufru (pH 7,0), poté byly přeneseny do zkumavek a centrifugovány po dobu 15 min při 15 000 rpm. Pro analýzu peroxidu vodíku byl přidán k supernatantu 0,5% roztok TiCl_4 v 20% H_2SO_4 , směs byla promíchána a centrifugována za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Absorbance byla měřena při 410 nm, dle metodiky popsané v publikaci Sasadhar and Choudhuri (1982), na UV-VIS spektrometru Cintra 101 (GBC). Obsah peroxidu vodíku byl stanoven na základě porovnání s kalibrační křivkou sestavenou pomocí příslušného činidla (H_2O_2).

Vzorky pro analýzu superoxidového radikálu byly připraveny stejným způsobem jako v předešlém měření. Supernatant byl poté smíchán s fosfátovým puftrem a 10 mM hydroxylaminem a inkubován 15 min při RT. Dále byl po 15 min intervalech postupně přidán 17 mM sulfanylamid, 7 mM α -naftylamin a diethyléter pro stabilizaci směsi. Absorbance byla měřena při 530 nm dle metodiky v článku od Elstner and Heupel (1976). Obsah superoxidového radikálu byl určen na základě porovnání s kalibrační křivkou připravenou s různými koncentracemi příslušného činidla (NaNO_2).

Obsah celkových rozpustných proteinů v homogenátech byl stanoven metodou podle Bradforda (Bradford 1976). K 970 μl Bradfordového roztoku (BIO-RAD) bylo přidáno 30 μl supernatantu a po promíchání a inkubaci 10 minut byla změřena absorbance vzorků při vlnové délce 595 nm. Jako standard pro tvorbu kalibrační křivky byl použit komerčně dostupný hovězí sérový albumin (BIO-RAD).

Pro stanovení obsahu celkových fenolů a flavonoidů bylo homogenizováno 0,15 g (kořeny) či 0,2 g (listy) čerstvé hmotnosti v 1,5 ml 80% methanolu. Následovala centrifugace po dobu 15 minut při 14000 rpm. Reakční směs pro analýzu fenolů sestávala ze supernatantu, destilované H_2O , Na_2CO_3 a Folin - Ciocalteuova činidla. Směs se inkubovala 1 hodinu při 45 °C, absorbance byla změřena při 750 nm. Pro analýzu obsahu celkového množství flavonoidů ve vzorcích byl supernatant inkubován s 2% roztokem AlCl_3 v 100% metanole po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Absorbance byla měřena při 420 nm. Koncentrace fenolů a flavonoidů byla stejně jako v předchozím případě určena na základě porovnání hodnot s kalibrační křivkou připravenou s činidly pro příslušné analýzy (kyselina galová a kvercetin).

6.4 Pokus č. 4 - Anatomické experimenty a imunofluorescenční značení MTs v kořenech řepky olejky (*B. napus*)

Cílem tohoto pokusu bylo jednak zkoumání anatomie kořenů řepky olejky a dále také detekce mikrotubulárního systému ovlivněného kovem spolu s BS. Experimenty probíhaly na Katedře biologie na UHK (růst rostlin), na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové (mikroskopie) a na Katedře experimentální biologie rostlin na UK (barvení, imunofluorescenční značení, mikroskopie).

6.4.1 Fluorescenční barvení příčných řezů kořenem řepky olejky (*B. napus*)

Kořeny 14 denních rostlin, které byly pěstovány stejně jako u předchozího experimentu testujícího vliv BS na toxicitu Cd, byly omyty v destilované vodě. Z jejich středů byly odřezány zhruba 2 cm segmenty, které byly nařezány pomocí ručního mikrotomu na tloušťku 100 μm . Vzniklé příčné řezy poté byly vloženy do speciálního barvicího košíčku. Pro zjištění lokalizace Cd v příčném řezu kořene byla použita fluorescenční barva LeadmiumTM green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), barvení probíhalo podle návodu od výrobce. Mikroskopické pozorování probíhalo na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E, zpracování obrazu proběhlo pomocí softwaru NIS elements (Nikon).

6.4.2 Imunofluorescenční značení kořenů řepky olejky (*B. napus*)

V prvním kroku experimentu byly testovány nejprve tři různé dávky Cd, a to 50, 100 a 150 μM Cd (5620 μg , 1124,1 μg , 16860 μg Cd v $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Po 6 dnech klíčení byly rostliny přeneseny do Hoagland média spolu s přísadkou Cd. Růst rostlin v testovacích médiích probíhal po dobu 48 hodin. Kořeny byly poté omyty destilovanou vodou a připraveny pro následné analýzy.

V rámci druhého pokusu byl použit stejný postup pěstování jako u předcházejícího experimentu testujícího vliv BS na rostliny stresované Cd. Pro následné analýzy tak byly připraveny kořeny varianty kontrolní, varianty s 5 μM Cd, 10 μM BS a 5 μM Cd + 10 μM BS.

Imunofluorescenční značení MTs proběhlo podle modifikované metody od Sugimoto et al. (2000). Kořenové špičky byly fixovány 4% paraformaldehydem v MTSB pufru (50 mM PIPES; 5 mM EGTA; 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1% Triton-X100; pH 7,0) za nízkého tlaku (400-500 kPa) po dobu 2,5 hodin. Kořeny byly promyty MTSB (3x10 min) a na 1,5 hodiny vystaveny působení 0,05% pektolyázy Y-23 (Kyowa Chemical Products Co., Ltd, Osaka,

Japan) v MTSB obsahujícím 0,4 M manitol a inhibitory proteáz (0,3 mM PMSF, 10 μ M leupeptin a 1,25 μ M pepstatin). Po promytí MTSB (3x10 minut) byly kořeny 15 minut inkubovány v metanolu při -20 °C a rehydratovány 10 minut v PBS (NaCl 8 g.l⁻¹; KCl 0,2 g.l⁻¹; KH₂PO₄ 0,158 g.l⁻¹; NaHPO₄.12H₂O 2,31 g.l⁻¹). Následovala inkubace ve 2% hovězím albuminovém séru v PBS po dobu 30 minut a poté inkubace přes noc ve 4 °C v primární monoklonální myší protilátce anti- α -tubulinu DM1A (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA) ředěné 1:1000 v PBS. Po promytí PBS (3x5 minut) byly vzorky inkubovány 3 hodiny při 37 °C v anti-myší protilátce konjugované s TRITC, ředěné v PBS 1:300. Nakonec byly kořeny promyty PBS (5x5 minut) a montovány do 50% glycerolu v PBS. Vzorky byly analyzovány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880 a upraveny v programu ZEN (Zeiss) na Karlově Univerzitě.

6.5 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování dat proběhlo s pomocí programu Statistica (Statsoft, ČR, verze 10), použita byla jednorozměrná Anova s Tukeyho testem na hladině významnosti $P = 0,05$. Pro zjištění závislosti mezi koncentrací Cd a obsahem SA a jednotlivých AK byl použit výpočet pro korelační koeficient r . Tabulky a grafy byly zpracovány v programu Excel (Microsoft, USA).

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Skleníkový experiment zaměřený na toleranci různých kultivarů řepky vůči kadmiu

Cílem skleníkového nádobového experimentu bylo zjistit, zda je některý z pokusných kultivarů řepky olejky odolnější vůči vyšším dávkám Cd, a zda je schopný hyperakumulace Cd z půdy, jak uvádí některé literární zdroje. Závěrečné analýzy zahrnovaly nejen zhodnocení akumulace Cd rostlinou, ale také vyhodnocení dalších biochemických odpovědí rostlin na stres vyvolaný těžkým kovem (fotosyntetické parametry, obsah SA, AK).

7.1.1 Vliv kadmia na růst rostlin a fotosyntetické parametry

Při vizuálním porovnání jednotlivých variant nebyl celkový vzrůst rostlin u variant s přidaným Cd (Obr. 3B-D, F-H, J-L) oproti kontrole (Obr. 3A, E, I, M) nijak výrazně redukován. Mezi příznaky toxicity vyvolané Cd patří listové chlorózy, které se objevovaly v našem experimentu u rostlin až během vyšších dávek těžkého kovu, tedy nejvíce u rostlin v substrátu se 150 mg Cd.kg⁻¹. Častější byla jejich přítomnost také u mladých listů (Obr. 3 N, O). Chlorózy nebyly nijak výrazné, jednalo se spíše o různě rozsáhlé nažloutlé oblasti v okolí listové žilnatin. Listové chlorózy patří mezi jeden z nejčastějších jevů, který souvisí s výskytem toxicity Cd a v minulosti byly popsány nejen u různých kultivarů řepky olejky (Baryla et al. 2001; Carrier et al. 2003), ale také u mnoha dalších rostlinných druhů.

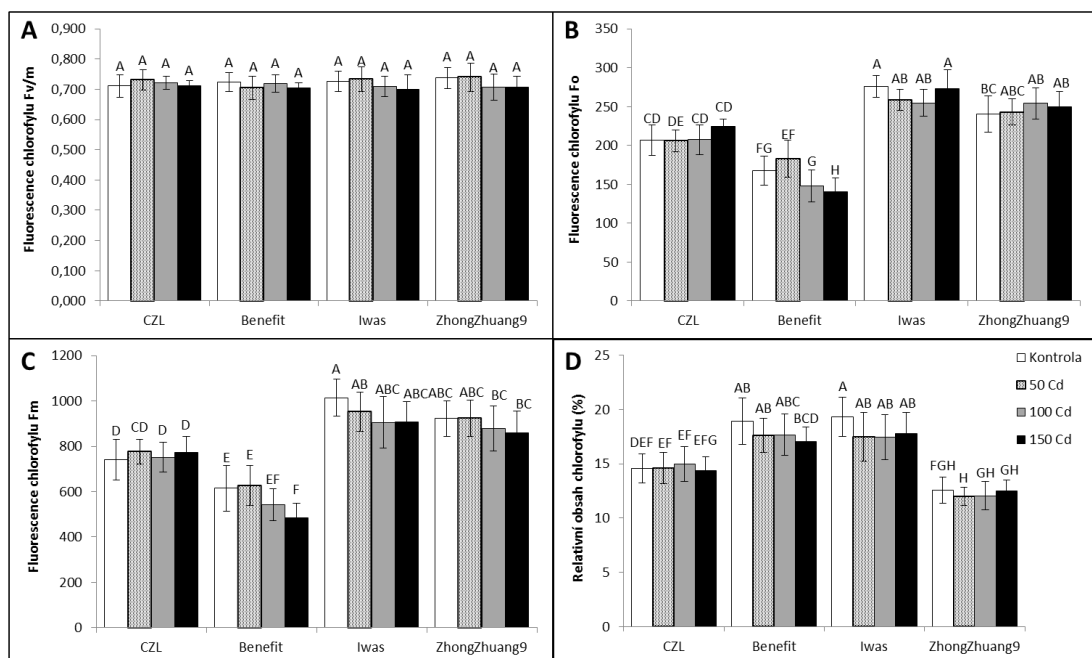




Obr. 3: Různé kultivary řepky olejky (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9) rostoucí v substrátu spolu či bez přidavku Cd. A, B, C, D – kultivar CZL, kontrola, 50 μM Cd, 100 μM Cd, 150 μM Cd; E, F, G, H – kultivar Benefit, kontrola, 50 μM Cd, 100 μM Cd, 150 μM Cd; I, J, K, L – kultivar Iwas, kontrola, 50 μM Cd, 100 μM Cd, 150 μM Cd; M – kultivar ZhongZhuang9, kontrola; N, O – detail listů kultivaru ZhongZhuang9, 150 μM Cd.

Monitorována byla dále fluorescence chlorofylu, vyjádřená hodnotami F_0 (bazální fluorescence), F_m (maximální fluorescence) a F_v/m (výtěžek fotochemické reakce). Vzhledem k tomu, že Cd způsobuje narušení biosyntézy chlorofylu a vede k jeho degradaci (Muradoglu et al. 2015), patří měření fluorescence chlorofylu mezi citlivý a přesný indikátor toxicity vyvolané těžkými kovy (Strasser et al. 2000). Fluorescence chlorofylu souvisí s mnoha pochody primárních procesů fotosyntézy, jako je například absorpce sluneční energie, přenos excitační energie, protonový gradient, syntéza ATP, fixace CO_2 a mnoho dalších (Tung et al. 2013). Narušení PSII vlivem stresu indikují vyšší hodnoty F_m a F_0 , a naopak pokles hodnot F_v/m (Qiu

et al. 2013). Z obr. 4 je patrné, že hodnoty Fo a Fm se od sebe příliš nelišily v závislosti na přídatku Cd, ale byly rozdílné u jednotlivých kultivarů (Obr. 4B,C). Nejvyšších hodnot Fo a Fm dosahovaly kultivary Iwas a ZhongZhuang9, následované kultivary CZL a Benefit. Poslední jmenovaný kultivar měl hodnoty Fo a Fm značně redukované také v závislosti na koncentraci Cd (Obr. 4B,C). Výsledky jiných experimentů popisují jak zvyšující se hodnoty Fo a Fm se vzrůstající dávkou Cd (Baumann et al. 2009; Li et al. 2015), tak minimální vliv Cd na fluorescenci chlorofylu (Dezhban et al. 2015). Efektivita primárních fotochemických reakcí, vyjádřená pomocí Fv/m, se pohybovala u všech kultivarů a koncentrací Cd na stejných hodnotách (Obr. 4A), které však byly nižší, než uváděná optimální hodnota 0,83 (Jones et al. 1999). Ke stejnému závěru došli také Krupa et al. (1992), kteří nepotvrdili změnu ve fluorescenci Fv/m u rostlin fazole, či Benyas et al. (2013), kteří zkoumali vliv Cd na řepku olejků. Z našich výsledků se dá vyvodit vyšší citlivost vůči Cd u kultivarů Iwas a ZhongZhuang9. Naopak kultivar Benefit teoreticky vykazoval poměrně vysokou odolnost vůči Cd, a to i při nejvyšší aplikované koncentraci. Tyto závěry částečně potvrzuje také relativní obsah chlorofylu u jednotlivých kultivarů, který byl naměřený pomocí nedestruktivní metody (Obr. 4D). Kultivar Benefit obsahuje spolu s kultivarem Iwas nejvyšší množství chlorofylu, na rozdíl od kultivaru ZhongZhuang9 (Obr. 4D). Tato metoda měření je srovnatelná s jinými postupy stanovení obsahu chlorofylu, které nicméně vyžadují destrukci rostlinného materiálu (Gonçalves et al. 2008).

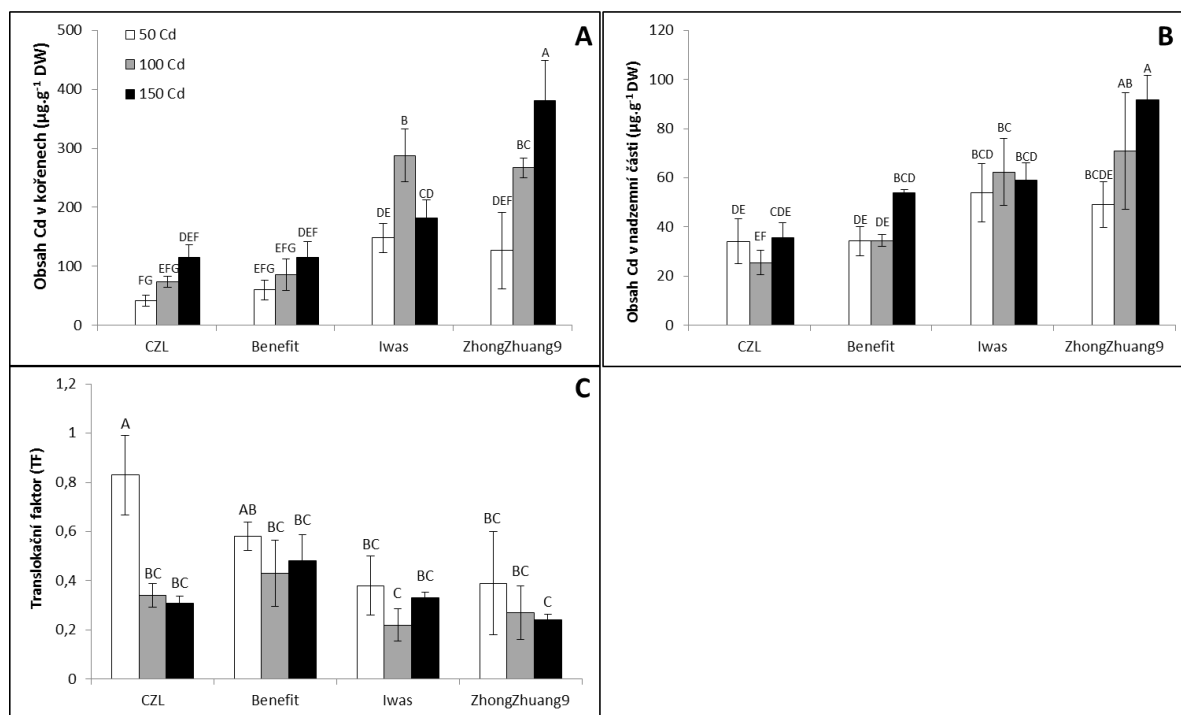


Obr. 4: Vliv Cd na fotochemickou účinnost PSII (Fv/m), fluorescenci chlorofylu (Fo, Fm) a relativní množství chlorofylu u různých kultivarů řepky olejků (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9). Rostliny rostly 30 dní na půdách s různými koncentracemi přidávaného Cd (0-

Cont, 50, 100, 150 mg Cd.kg⁻¹). A – výtěžek fotochemické reakce Fv/m; B – bazální fluorescence Fo; C – maximální fluorescence Fm; D – relativní obsah chlorofylu (%). Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 5). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu (P < 0.05) signifikantně odlišné.

7.1.2 Příjem kadmia kořeny a jeho translokace do nadzemních částí rostlin

Obsah Cd byl u všech kultivarů vyšší v kořenech než v nadzemních částech rostlin (Obr. 5A). Spolu se vzrůstající dávkou Cd rostl také obsah Cd naměřený v kořenech, pouze u kultivaru Iwas byla detekována nejvyšší hodnota obsahu Cd u varianty se 100 mg Cd.kg⁻¹. Kultivar ZhongZhuang9 obsahoval v kořenech jednoznačně nejvyšší množství Cd ve variantě se 150 mg Cd.kg⁻¹, akumuloval konkrétně o 69,5% více Cd, než kultivary CZL a Benefit. Podobná situace byla také u hodnot Cd v nadzemní části, kde kultivar ZhongZhuang9 akumuloval při dávce 150 µM přidaného Cd nejvyšší množství tohoto kovu, které bylo vyšší o 61% oproti CZL, o 41,4% oproti Benefitu a o 35,6% oproti Iwas (Obr. 5B). Přestože kultivar ZhongZhuang9 akumuloval největší množství Cd, jeho TF patřily mezi nejnižší (Obr. 5C), což mu dává předpoklad pro uplatnění například při fytostabilizacích. Nejvyšší hodnotu TF vykazoval kultivar CZL, a to při nejnižší testované dávce Cd. Hodnota TF sice nebyla vyšší jak „1“, ale této hranici se oproti ostatním kultivarům významně blížila. Experimenty věnující se potenciální schopnosti fytoextrakce u řepky olejky se často rozcházejí ve svých výsledcích, což je dáno například pozadím pokusu (hydroponické pěstování, polní pokusy), formou přidaného Cd (CdCl₂, CdSO₄) či zvoleným kultivarem. Ve větší části publikací se autoři přiklání k tomu, že řepka olejka dokáže tolerovat vyšší dávky Cd, ale její schopnost fytoextrakce není vysoká (Marchiol et al. 2004; Nouairi et al. 2006; Grispen et al. 2006; Hernández-Allica et al. 2008; Ehsan et al. 2014), můžeme se však setkat také s výsledky, které schopnost fytoextrakce nevyklučují (Szulc et al. 2015; Cojocar et al. 2016).

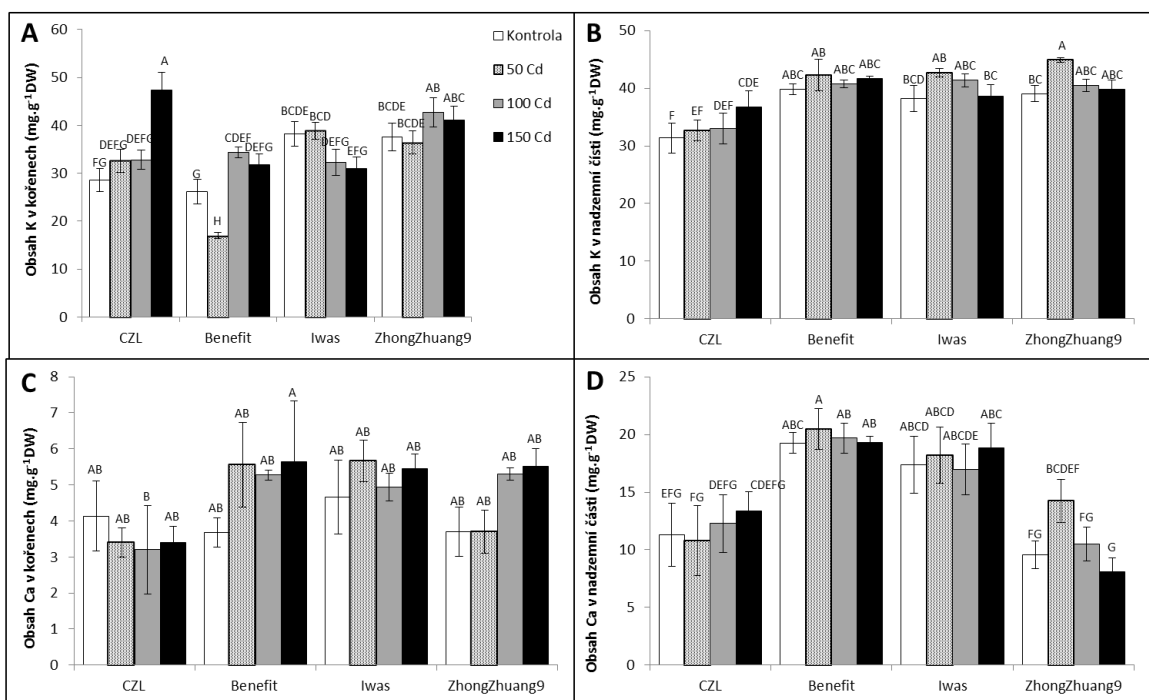


Obr. 5: Obsah Cd v kořenech (A) a nadzemních částech rostlin (B) a translokační faktor (C) [TF= $C_{\text{nadzemní část}} / C_{\text{kořen}}$] u řepky olejky (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9). Rostliny rostly 30 dní na půdách s různými koncentracemi přidaného Cd (0-Cont, 50, 100, 150 mg Cd.kg⁻¹). Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u Obr 4.

7.1.3 Vliv kadmia na příjem a translokaci draslíku a vápníku

Jak již bylo popsáno, Cd způsobuje mnoho nejrůznějších negativních změn v rostlinném organismu, mezi které patří narušení příjmu a přenosu mikroprvků, což vede k narušení minerální výživy dané rostliny. Pokusit se objasnit chování rostlin v souvislosti s minerální výživou a stresem vyvolaným Cd je proto důležitý předpoklad pro volbu vhodného opatření ve výživě rostlin, které zajistí co nejnižší negativní dopady na výnos a produkci. Obsah K a Ca v kořenech a nadzemních částech rostlin je uveden na Obr 6. Obsahy K byly srovnatelné v kořenech a nadzemních částech, přičemž reakce na Cd byla u jednotlivých kultivarů rozdílná a nevyrovnaná. Množství K v kořenech u kultivarů CZL a ZhongZhuang9 rostla s vyšší dávkou Cd, zatímco u kultivaru Iwas byl trend opačný (Obr. 6A). V nadzemních částech rostlin se chovaly všechny kultivary téměř stejně, jejich reakce na Cd nebyla výrazná (Obr. 6B). Podobné nevyrovnané výsledky byly získány také u obsahu Ca. Vyšší množství tohoto mikroprvku bylo nalezeno v nadzemních částech, což bylo znát především u kultivaru Benefit a Iwas (Obr. 6C, D). V reakci na Cd nebyly výsledky u jednotlivých kultivarů jednotné a ve většině případů

nevykazovaly žádný vzestupný či sestupný trend v závislosti na zvyšující se dávce Cd. Jak uvádí například Mwamba et al. (2016), přidavek Cd k hydroponicky pěstovaným rostlinám řepky olejky vedl k redukcí obsahu K v listech, zatímco obsah Ca nebyl vlivem kovu nijak narušen. Opačným výsledkem je experiment testující vliv Cd na obsah minerálních látek u mrkve a salátu, kde autoři zjistili, že vyšší obsah Cd ve většině případů koreluje s vyššími obsahy minerálních prvků v rostlinách, včetně K a Ca (Yang et al. 2016). Jak je vidět z výše uvedených příkladů, výsledky v literatuře popisující vliv Cd na příjem minerálních prvků jsou nekonzistentní, což je dáno mnoha faktory, jakými jsou například zvolený pokusný materiál, jeho stáří, rozdílná přijímaná množství mikroprvků, způsob pěstování, koncentrace Cd, složení živného média (hydroponie) či substrátu, odběr jednotlivých živin a mnoho dalších.



Obr. 6: Obsah K v kořenech (A) a nadzemních částech (B) a obsah Ca v kořenech (C) a nadzemních částech (D) u řepky olejky (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9). Rostliny rostly 30 dní na půdách s různými koncentracemi přidaného Cd (0-Cont, 50, 100, 150 mg Cd.kg⁻¹). Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u Obr. 4.

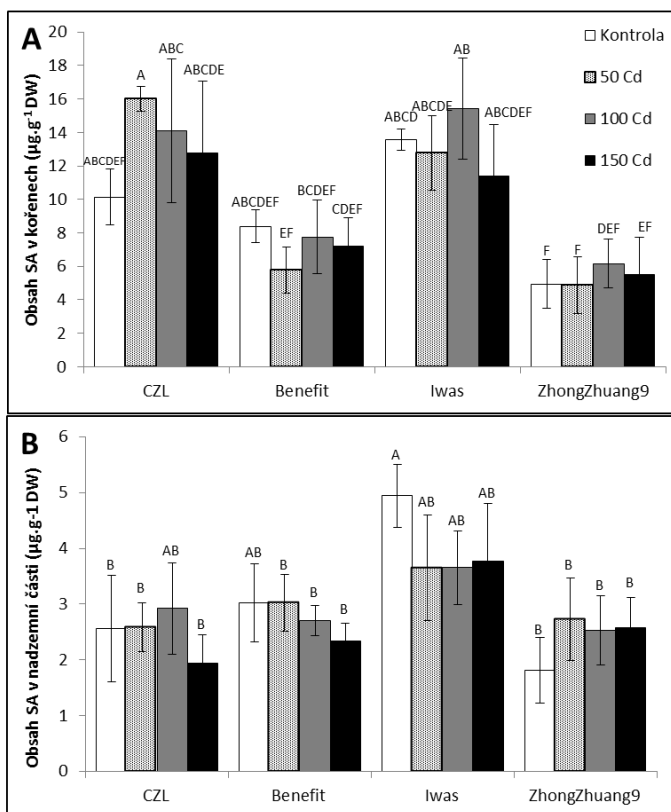
7.1.4 Vliv kadmia na obsah kyseliny salicylové

Kyselina salicylová patří mezi jednu z hlavních signalizačních fenolických sloučenin majících vliv na metabolismus a fyziologické procesy v buňkách. Její účinek je úzce spojený s obrannými mechanismy buňky vůči nejruznějším patogenům (Kawano and Bouteau 2013), ale

také vůči abiotickým stresům, včetně toxicity Cd (Guo et al. 2013). V minulosti bylo popsáno mnoho případů, kdy vedla přidaná SA ke zmírnění oxidačního stresu, k redukci translokace Cd do nadzemních částí rostlin či k podpoře aktivity antioxidačních enzymů (shrnuto v Asgher et al. 2015). V našem experimentu jsme nepoužívali exogenně přidanou SA, ale sledovali jsme její endogenní množství a změny po aplikaci Cd, jak je uvedeno na Obr 7. Vzhledem k použité metodě byla u rostlin stanovována volná SA.

Všechny kultivary vykazaly vyšší obsahy SA v kořenech, což je popsáno také u kořenů ječmene, v nichž došlo po aplikaci Cd ke zvýšení množství SA (Metwally et al. 2003). Nejvyšší obsah SA v kořenech měly kultivary CZL a Iwas, následované kultivarem Benefit a ZhongZhuang9 (Obr. 7A). U posledního jmenovaného kultivaru se množství SA pohybovalo v průměru okolo $5,4 \mu\text{g SA}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$, kdežto u kultivaru CZL dosahovaly průměrné hodnoty až $13,2 \mu\text{g SA}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$, což je o 59% více. Tyto výsledky mohou ukazovat na efektivnější mechanismy obrany u kultivarů CZL a Iwas vůči toxicitě Cd, zahrnující buď vyšší konstantní obsah SA v kořenech anebo lepší schopnost biosyntézy SA během stresu. V reakci na Cd nebyly zaznamenány žádné větší změny související s obsahem SA, a to nejen v případě kořenů, ale také u nadzemních částí rostlin (Obr. 7B).

Obsahy SA se u nadzemních částí mezi jednotlivými kultivary téměř nelišily, vyšší hodnoty byly naměřeny pouze u kultivaru Iwas, což by opět ukazovalo na schopnost vyšší tolerance tohoto kultivaru vůči Cd. U ZhongZhuang9 se vyskytuje nízký obsah SA jak v kořenech, tak v nadzemní části rostlin, v porovnání s ostatními kultivary. Výsledek je zajímavý vzhledem k tomu, že tento kultivar vykazoval signifikantně nejvyšší hodnoty akumulace Cd. Tyto nízké hodnoty SA by mohly naznačovat, že kultivar nedokáže lépe reagovat na stres Cd zvýšením obsahu SA, nespouští příslušné mechanismy obrany, a to vše vede k vyšší akumulaci Cd v kořenech i v nadzemní části.



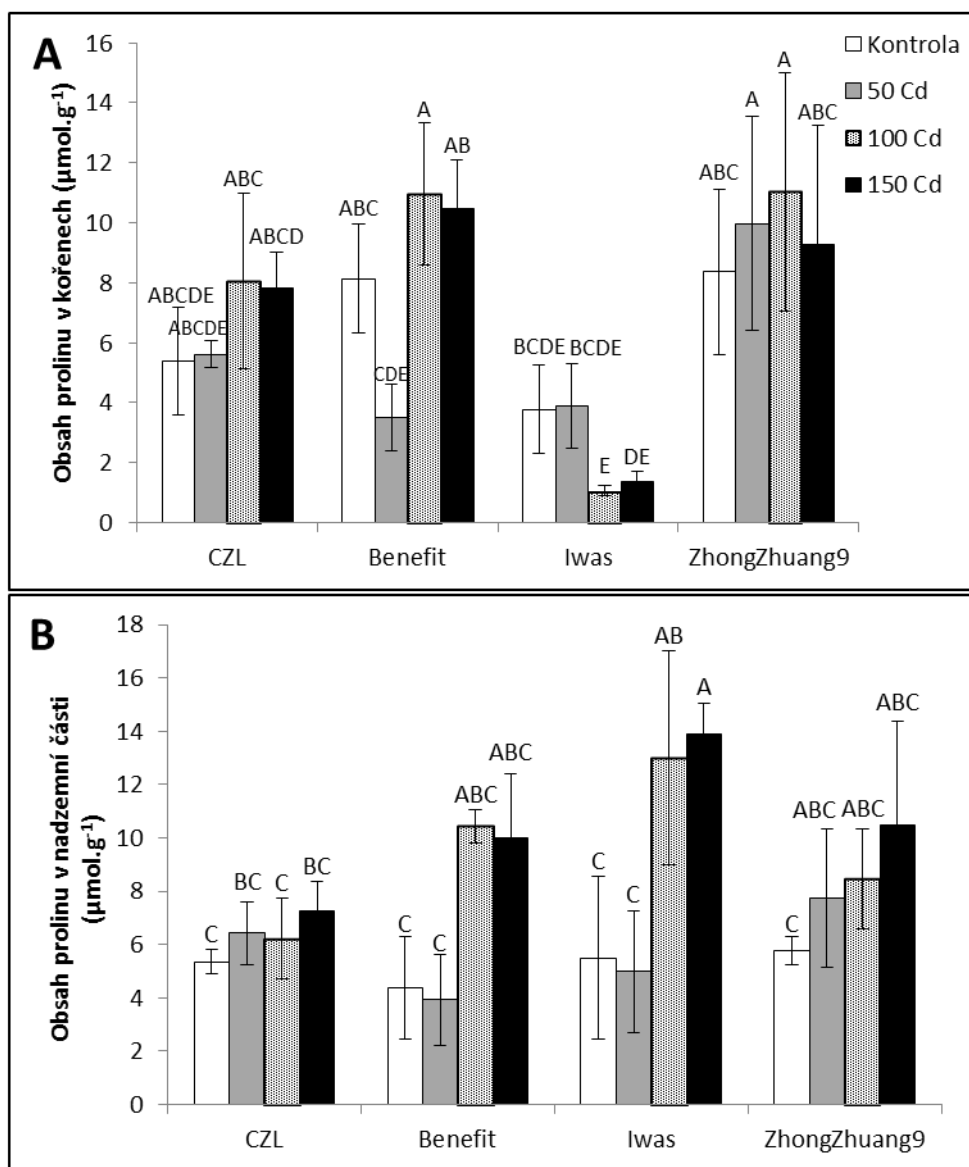
Obr. 7: Obsah SA v kořenech (A) a nadzemních částech (B) u řepky olejky (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9). Rostliny rostly 30 dní na půdách s různými koncentracemi přidaného Cd (0-Cont, 50, 100, 150 mg Cd.kg⁻¹). Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u Obr 4.

7.1.5 Vliv kadmia na obsah aminokyselin

Stres těžkými kovy způsobuje u rostlin změny v produkci nejrůznějších metabolitů, včetně glutathionu, fytochelatinů, prolinu, histidinu a dalších AK. V našem experimentu jsme se pokusili analyzovat celkem 20 AK (Příloha 1), a to včetně prolinu. Právě obsah prolinu, jakožto důležité molekuly, která se v buňkách hromadí během různých stresů, je zobrazen také na grafu na Obr. 8. Z výsledků je patrné, že hodnoty obsahu prolinu se pohybovaly zhruba na stejných hladinách v kořenech i v nadzemních částech rostlin. Nejvýraznější změna byla pozorována u kultivaru Iwas, kdy při koncentracích 100 a 150 Cd výrazně klesl obsah prolinu v kořenech a naopak vzrostl v nadzemní části. Tento nárůst prolinu v nadzemní části rostlin by odpovídal jeho roli coby antioxidantu, který je schopný chránit buňky před vysokou hladinou ROS a ostatních volných radikálů (Xu et al. 2009a). Celkem výrazný nárůst obsahu prolinu byl zaznamenán také v nadzemní části kultivaru Benefit, a to při dávce 100 a 150 Cd. Pro biosyntézu prolinu je důležitý glutamin, kyselina glutamová a ornithin, který vzniká hydrolýzou argininu. V našem experimentu však obsahy glutaminu a výše uvedených dvou aminokyselin

nevykazovaly žádný výraznější trend související s koncentrací přidaného Cd. Závislost koncentrace Cd na obsahu prolinu ukazuje Tab. 5, z níž je patrné, že vzájemná závislost těchto dvou veličin je spíše vyšší. Můžeme tak tvrdit, že vzrůstající koncentrace Cd má vliv na obsah prolinu, a u každého kultivaru kromě Iwasu vidíme, že čím vyšší koncentrace Cd, tím vyšší obsah prolinu.

Biotický stres významně ovlivňuje metabolismus rostlin, a to například na úrovni tvorby a aktivity stresových proteinů, organických kyselin či aminokyselin. Chování aminokyselin v reakci na stres Cd se u různých studií často velmi liší a nelze vypožorovat jednotné chování. Xu et al. (2012) ve svém experimentu porovnávali transkripční profily u dvou druhů rostlin, a to u hyperakumulátoru Cd, *Solanum nigrum* a u *Solanum torvum*, druhu akumulujícího Cd ve velmi malé míře. Autoři zjistili, že hyperakumulátor Cd vykazuje oproti druhému zkoumanému druhu vyšší expresi genů souvisejících s biosyntézou některých AK (Asp, Ser, Cys) a předpokládají, že jejich vyšší obsahy souvisí se schopností hyperakumulace. Výsledky našich analýz jsou velmi nekonzistentní, nelze vypožorovat žádný vztah mezi koncentrací Cd a množstvím určité AK u jednotlivých kultivarů. Patrné je to také z Tab. 4, kde jsou zaznamenány korelační koeficienty ukazující závislost mezi koncentrací Cd a obsahem AK u jednotlivých kultivarů. Některé závislosti jsou sice v pár případech vyšší (červeně zvýrazněná čísla), ale jedná se často o samostatně se vyskytující hodnoty, které nevykazují podobný trend v obou testovaných částech rostlin (kořeny – nadzemní část). Některé ze signifikantních hodnot určující závislost mezi koncentrací Cd a obsahem AK jsou získána u AK Arg, Ala, Val, Met, Lys a Pro. S ohledem na výše popsanou studii transkripčních profilů lze předpokládat, že naše výsledky jsou ovlivněny tím, že nemáme mezi testovanými kultivary žádný hyperakumulátor. Je možné, že pokud bychom zahrnuli do analýz kultivar s prokázanou schopností fytoextrakce Cd, reagovaly by některé AK zvýšením svých obsahů.



Obr. 8: Obsah prolinu v kořenech (A) a nadzemních částech (B) u řepky olejky (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9). Rostliny rostly 30 dní na půdách s různými koncentracemi přidaného Cd (0-Kontrola, 50, 100, 150 mg Cd.kg⁻¹). Chybové úsečky představují průměry \pm SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u Obr. 4.

Tab. 4: Korelační tabulka vyjadřující závislost mezi koncentrací Cd a obsahem aminokyselin u testovaných kultivarů (n = 12), koeficient je vypočítán zvlášť pro kořeny a nadzemní části rostlin. Hodnoty nad kritickou hodnotou korelačního koeficientu (0,576) jsou pro přehlednost zvýrazněny červeně.

	CZL	Benefit	Iwas	ZhongZhuang9
Asp kořeny	0,202	-0,233	-0,011	-0,017
Asp listy	0,250	-0,173	0,156	0,244
Glu kořeny	-0,192	-0,364	0,354	0,038
Glu listy	0,085	0,163	-0,047	-0,025
Asn kořeny	0,500	0,386	0,096	-0,085
Asn listy	0,527	0,269	-0,006	0,422
Ser kořeny	0,569	0,164	0,356	-0,021
Ser listy	0,524	0,457	0,017	0,361
Gln kořeny	0,321	-0,087	0,236	-0,028
Gln listy	-0,034	0,368	0,111	0,561
His kořeny	0,182	-0,058	0,499	-0,267
His listy	0,350	0,212	-0,014	0,413
Gly kořeny	0,433	0,083	0,391	-0,064
Gly listy	0,479	0,199	0,089	0,084
Thr kořeny	0,350	-0,263	0,105	0,175
Thr listy	0,127	-0,031	-0,120	-0,002
Arg kořeny	0,516	0,157	0,287	0,053
Arg listy	0,614	0,184	0,221	0,467
Ala kořeny	0,375	-0,129	0,285	-0,201
Ala listy	0,647	0,126	-0,049	0,357
Tyr kořeny	0,400	-0,155	0,153	0,239
Tyr listy	0,252	-0,058	0,034	0,131
Cys kořeny	0,504	-0,068	0,048	0,174
Cys listy	0,414	0,143	0,235	0,272
Val kořeny	x	0,655	x	0,302
Val listy	-0,492	x	x	x
Met kořeny	0,380	-0,095	-0,275	-0,074
Met listy	0,700	0,167	0,182	0,227
Trp kořeny	-0,345	0,034	0,529	x
Trp listy	x	x	x	x
Phe kořeny	0,394	-0,084	0,151	0,392
Phe listy	0,299	-0,044	0,091	0,230
Ile kořeny	0,460	-0,089	-0,026	0,189
Ile listy	0,533	0,114	0,238	0,274
Leu kořeny	0,492	-0,132	0,102	0,103
Leu listy	0,567	0,133	0,195	0,190
Lys kořeny	0,341	-0,075	0,282	-0,555
Lys listy	0,630	0,024	-0,131	0,220
Pro kořeny	0,555	0,493	-0,754	0,076
Pro listy	0,529	0,776	0,786	0,622

7.1.6 Závěr

Pro zjištění fytoextrakčního potenciálu a schopnosti hyperakumulace Cd byly vybrány čtyři kultivary řepky olejky, které se lišily ve svých růstových vlastnostech. Testovány byly také tři různé dávky Cd, které byly přidávány formou zálivky do substrátu. Na listech pokusných rostlin byly vidět listové chlorózy, a to zejména u variant s nejvyšší dávkou Cd. Měření fotosyntetických parametrů a relativního obsahu chlorofylu naznačuje, že kultivar Benefit patří mezi odolnější genotypy, naopak ZhongZhuang9 se zdá být citlivým na aplikované dávky Cd.

Analýzy neprokázaly významný fytoextrakční potenciál u žádného testovaného kultivaru. Rostliny akumulovaly více Cd v kořenech, než v nadzemních částech. Nejvyšší translokační faktor byl zaznamenán u kultivaru CZL, ovšem ani zde nedosahoval hranice nutné pro validaci rostliny jakožto hyperakumulátoru. Obsahy minerálních prvků, konkrétně K a Ca se výrazněji neměnily, pouze u kultivaru CZL byla opět naměřena vyšší hodnota K v kořenech u varianty s nejvyšší dávkou Cd.

Obsah SA byl u všech testovaných kultivarů vyšší v kořenech, než v nadzemních částech. Nejvyšších hodnot dosahovat kultivar CZL, nejnižší obsahy SA byly naměřeny u ZhongZhuang9. V reakci na koncentraci Cd však nebyly na základě spočítaných korelačních koeficientů patrné žádné větší změny.

Hodnoceny byly také obsahy jednotlivých AK včetně prolinu. Obsah prolinu se pohyboval na podobných hodnotách jak v kořenech, tak v nadzemních částech. Nárůst jeho obsahu byl zaznamenán především u kultivaru Iwas, kde souvisel s poklesem jeho množství v kořenech, a také u kultivaru Benefit. Korelační analýza ukazuje, že závislost obsahu prolinu na koncentraci Cd je u všech kultivarů silná. Hodnoty ostatních AK se vlivem přidání Cd příliš nelišily.

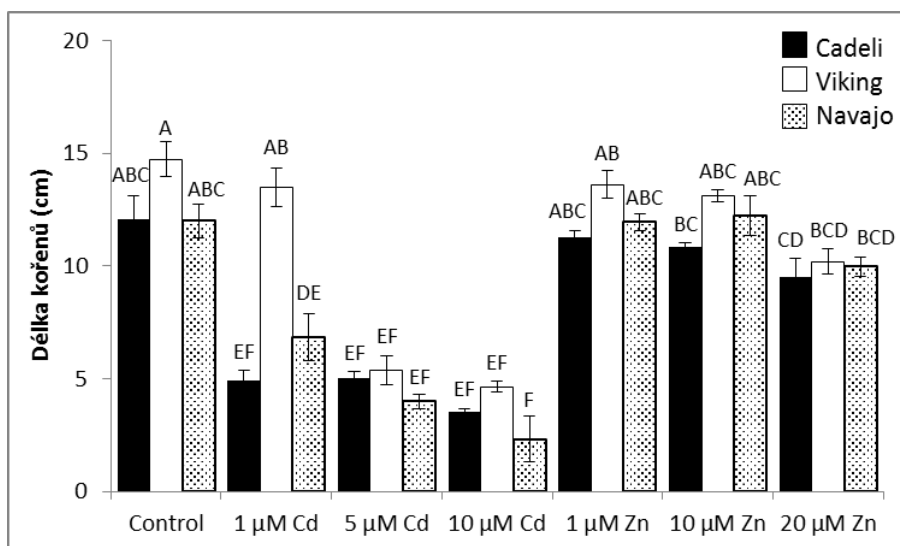
7.2 Hydroponický experiment zaměřený na spolupůsobení kadmia a zinku a na fyziologické a anatomické parametry řepky olejky (*B. napus*)

Experiment probíhal na Univerzitě Bayreuth a jeho cílem bylo zjistit, jak reaguje řepka olejka, konkrétně tři různé kultivary, na spolupůsobení dvou kovů, a to Cd a Zn. Závěrečné analýzy zahrnovaly jednak vyhodnocení obsahu kovů a mikroprvků v rostlině, dále pak také anatomické zkoumání kořenů, případné narušení jejich vnitřní stavby a detekci ligninu.

7.2.1 Testování vhodných koncentrací těžkých kovů

Před zahájením hydroponických experimentů proběhlo testování různých koncentrací těžkých kovů za účelem najít jejich vhodnou dávku (Obr. 9). V případě aplikace Cd byly zkoušeny čtyři různé koncentrace (1, 5, 10, 20 μM Cd), přičemž nejvyšší koncentrace (20 μM Cd) vedla k úmrtí testovaných rostlin. Růst kořenů u Cadeli a Navajo byl signifikantně inhibovaný již při aplikaci 1 μM Cd, zatímco u kultivaru Viking došlo pouze k částečné redukci délky kořene. Nejvhodnější dávka Cd vedoucí u všech kultivarů k 50% redukci délky kořenů byla zvolena 5 μM Cd. Hodnocen byl také vliv různých koncentrací Zn (1, 10, 20 μM Zn). Hledána byla taková dávka, která by měla pozitivní vliv, případně nepůsobila negativně na růst rostlin. Na základě výsledků pokusu byla jako nejvhodnější koncentrace zvolena 10 μM Zn (Obr. 9).

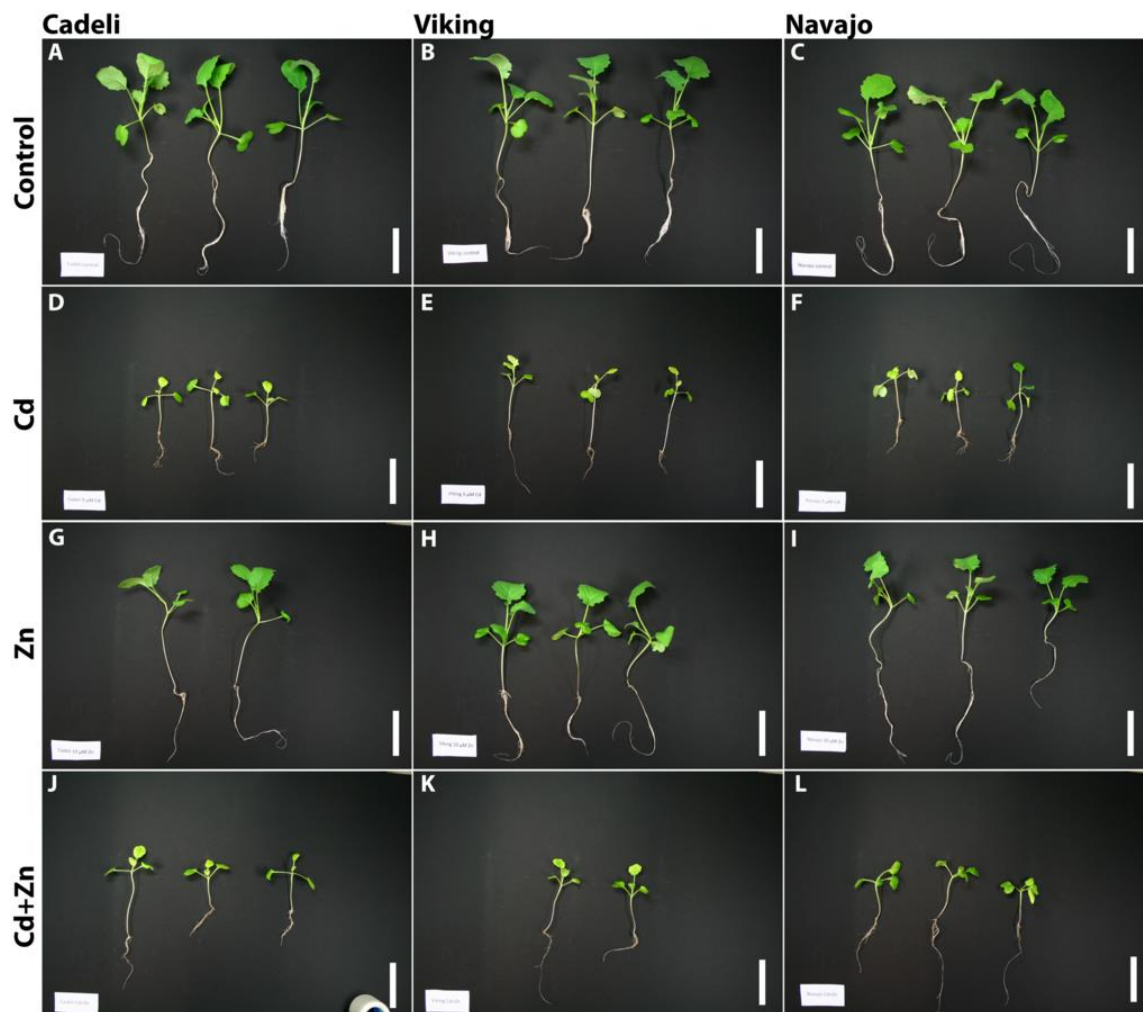
Koncentrace Cd, která byla zvolena pro následující experimenty, byla v porovnání s dávkami aplikovanými v jiných experimentech s řepkou olejkou poměrně nízká. Běžně užívané koncentrace popsané v člancích jsou často vyšší jak 20 μM (Nouairi et al. 2006; Ali et al. 2013), tato dávka však vedla v našem pokusu ke smrti rostlin. Důvodem nutnosti použít nižší koncentraci Cd může být menší obsah kompetujících iontů v Hoagland médiu, které bylo používáno pro naše experimenty.



Obr 9: Délka kořenů (cm) u tří různých kultivarů řepky olejky (Cadeli, Viking, Navajo) po 14 dnech hydroponického pěstování s přidavkem různých koncentrací Cd a Zn. Chybové úsečky představují průměry \pm SD ($n = 3$). Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 3$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

7.2.2 Vliv kadmia a zinku na růst kořenů a nadzemní části rostlin

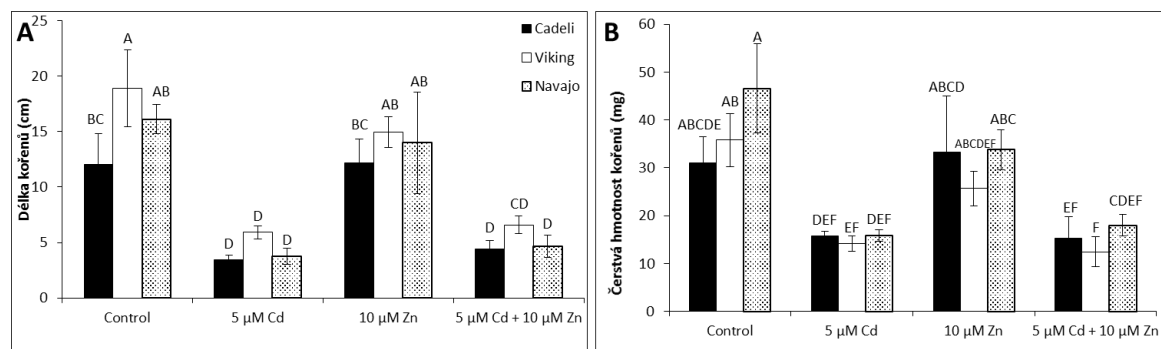
Viditelné symptomy toxicity zahrnující listové chlorózy a redukovaný růst se objevovaly u rostlin vystavených působení Cd a Cd + Zn (Obr. 10D-F a J-L). Rostliny rostoucí v kontrolním médiu a v médiu se Zn nevykazovaly žádné viditelné symptomy toxicity (Obr. 10A-C a G-I). Listové chlorózy vyvolané Cd jsou běžně pozorovatelné průvodní jevy popsané nejen u rodiny *Brassicaceae*, ale také u rostlin z jiných čeledí. Listové chlorózy jsou často spojené s inhibicí fotosyntetické aktivity v chloroplastech (Simonova et al. 2007) spolu se sníženým obsahem chlorofylu (Yan et al. 2016).



Obr. 10: Různé kultivary řepky olejky (Cadeli, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. A, B, C – kontrola; D, E, F – médium s Cd; G, H, I – médium s Zn; J, K, L – médium s Cd + Zn. Měřítko představuje 5 cm.

Rostliny rostoucí v médiu s Cd a Cd + Zn měly v porovnání s kontrolou a médiem se Zn signifikantně redukovanou délku a hmotnost kořenů (Obr 11A, B). Negativní vliv Cd na růst kořenů byl v minulosti popsán u mnoha různých rostlinných druhů (např. Lux et al. 2011a; Tran and Popova 2013) a spolu s listovými chlorózami se jedná o typický znak doprovázející toxicitu vyvolanou Cd. Kořeny kultivaru Viking a Navajo rostoucí v médiu s Cd a Cd + Zn měly prokazatelně větší průměr ve střední části, než kořeny kontrolní a kořeny v médiu se Zn (Tab. 5). U kultivaru Cadeli nebyly zaznamenány žádné signifikantní změny v tloušťce kořenů (Tab. 5). Podobné výsledky ukazující na zvětšení kořenů vlivem Cd byly popsány také u *Arabidopsis thaliana* (Suzuki 2005) a *Pisum sativum* (Rodríguez-Serrano et al. 2006). Celkový růst kořenů byl negativně ovlivněn jak u rostlin stresovaných pouze Cd, tak u rostlin v médiu s Cd + Zn. Naopak rostliny v médiu se Zn nevykazovaly inhibici růstu a jejich kořeny byly porovnatelné s kořeny kontrolními (Obr. 11A). Pro testování vlivu Zn na růst rostlin je důležité zvolit

vhodnou koncentraci, protože jak již bylo popsáno dříve, nadbytek Zn vede k toxicitě a redukcii růstu kořenů, stejně jako je tomu u Cd (Stoyanova and Doncheva 2002; Sridhar et al. 2007; Li et al. 2012b).



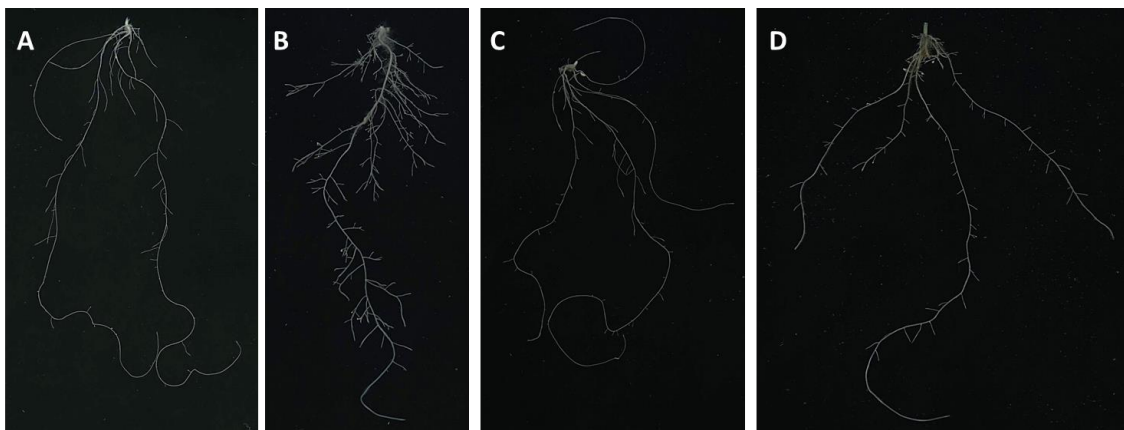
Obr. 11: Změny v délce a čerstvé hmotnosti kořenů u řepky olejky (Cadeli, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. Chybové úsečky představují průměry ± SD (n = 9). Statistika odpovídá popisu u Obr 9.

Tab 5: Průměr kořene a počet kořenových špiček u řepky olejky (Cadeli, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. Pro měření byly zvoleny části vzdálené zhruba 1 mm od kořenové špičky a části z poloviny kořene (střední část). Data představují průměry pěti hodnot (n = 5). Statistika odpovídá popisu u Obr 9.

Průměr kořene (mm) (n = 5)			
	Kořenová špička	Střední část	Počet kořenových špiček
<i>Cadeli</i>			
Kontrola	0.21 ^D	0.28 ^{BC}	17,3±3,2 ^F
5 μM Cd	0.47 ^B	0.29 ^{ABC}	123,0±15,1 ^{ABC}
10 μM Zn	0.30 ^{CD}	0.28 ^{ABC}	49,0±5,3 ^F
5 μM Cd + 10 μM Zn	0.38 ^{BC}	0.30 ^{ABC}	107,0±3,6 ^{BCD}
<i>Viking</i>			
Kontrola	0.26 ^{CD}	0.25 ^{CD}	45,3±16,7 ^{EF}
5 μM Cd	0.69 ^A	0.33 ^{AB}	169,3±18,5 ^A
10 μM Zn	0.23 ^D	0.25 ^{CD}	60,0±4,4 ^{DEF}
5 μM Cd + 10 μM Zn	0.33 ^{BCD}	0.29 ^{BC}	158,7±42,9 ^A
<i>Navajo</i>			
Kontrola	0.22 ^D	0.22 ^D	30,0±5,3 ^F
5 μM Cd	0.46 ^B	0.31 ^A	135,7±8,1 ^{AB}
10 μM Zn	0.24 ^D	0.26 ^{CD}	49,7±16,3 ^{EF}
5 μM Cd + 10 μM Zn	0.34 ^{BCD}	0.31 ^{ABC}	86,7±12,5 ^{CDE}

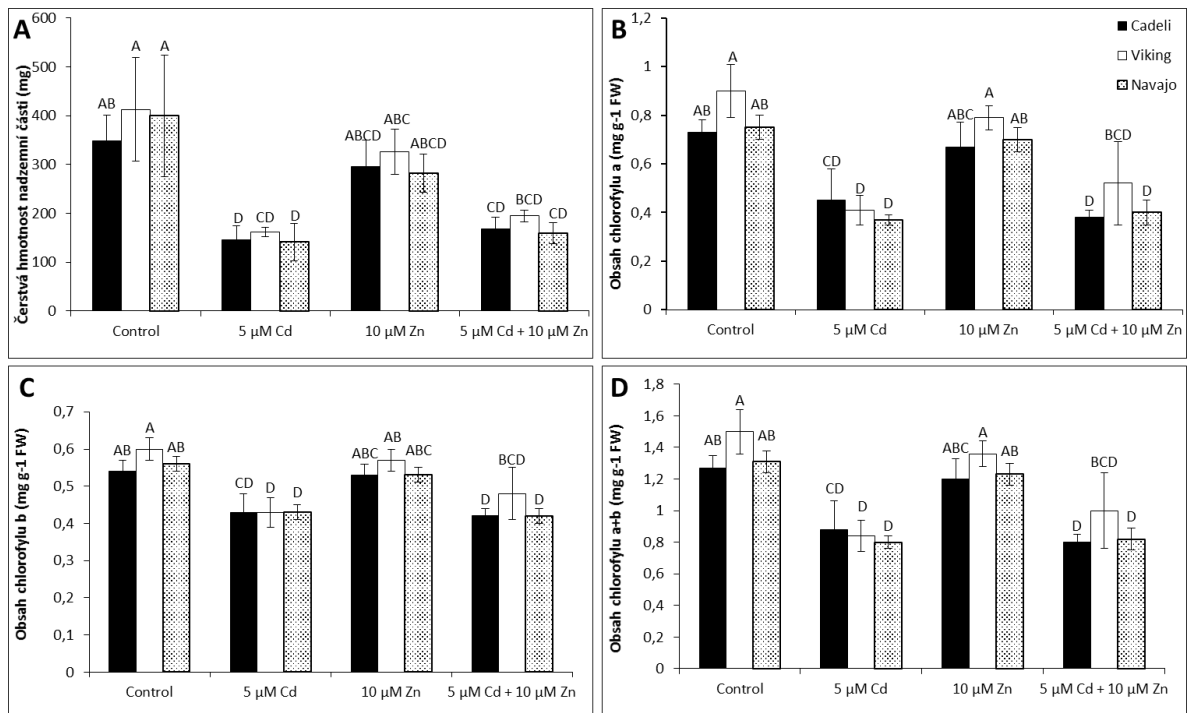
Hodnocen byl také počet kořenových špiček (Tab. 5). Z výsledků je patrné, že kořeny kontrolní varianty a kořeny rostoucí v médiu se Zn měly menší počet kořenových špiček, nežli kořeny stresované Cd a Cd + Zn. Tento jev je patrný také z Obr. 12, na kterém jsou zobrazeny scany kořenů u kultivaru Viking. Kořeny rostoucí v médiu s Cd (Obr. 12B) byly oproti kontrole

(Obr. 12A) a médiu se Zn (Obr. 12C) velmi rozvětvené, a vyskytoval se u nich vyšší počet kořenů prvního a druhého řádu. Médium s Cd + Zn vedlo také k vyššímu počtu kořenových špiček a postranních kořenů (Obr. 12D), nicméně charakter růstu nebyl oproti kontrole a médiu se Zn natolik pozměněný, jako u kořene v médiu s Cd (Obr. 12B).



Obr. 12: Kořeny a jejich charakter růstu u řepky olejky (Cadel, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. A – kontrola; B – médium s 5 µM Cd; C – médium s 10 µM Zn; D – médium s 5 µM Cd + 10 µM Zn.

Vliv Cd a Zn na nadzemní části rostlin a množství chlorofylu je zobrazen na obr. 13A-C. Redukce čerstvé nadzemní biomasy vlivem Cd se pohybovala mezi 58 – 64% a vlivem Cd + Zn mezi 51 – 60%, zatímco hmotnost nadzemní části v médiu se Zn byla redukována pouze v rozmezí od 15 – 29% (Obr. 13A). Přítomnost Cd a Cd + Zn v médiu způsobila také v porovnání s kontrolou a médiem se Zn signifikantní úbytek v množství chlorofylu (Obr. 13B – D). Stejně výsledky byly v rámci rodiny *Brassicaceae* pozorovány již dříve (Mohamed et al. 2012; Ali et al. 2013; Zong et al. 2017). Statistika vycházející z dvou faktoriální ANOVY nezaznamenala žádné signifikantní změny u testovaných kultivarů mezi délkou kořenů, hmotností kořenů, hmotností nadzemní části či množství chlorofylu a přítomností Cd, Zn či Cd + Zn v médiu.

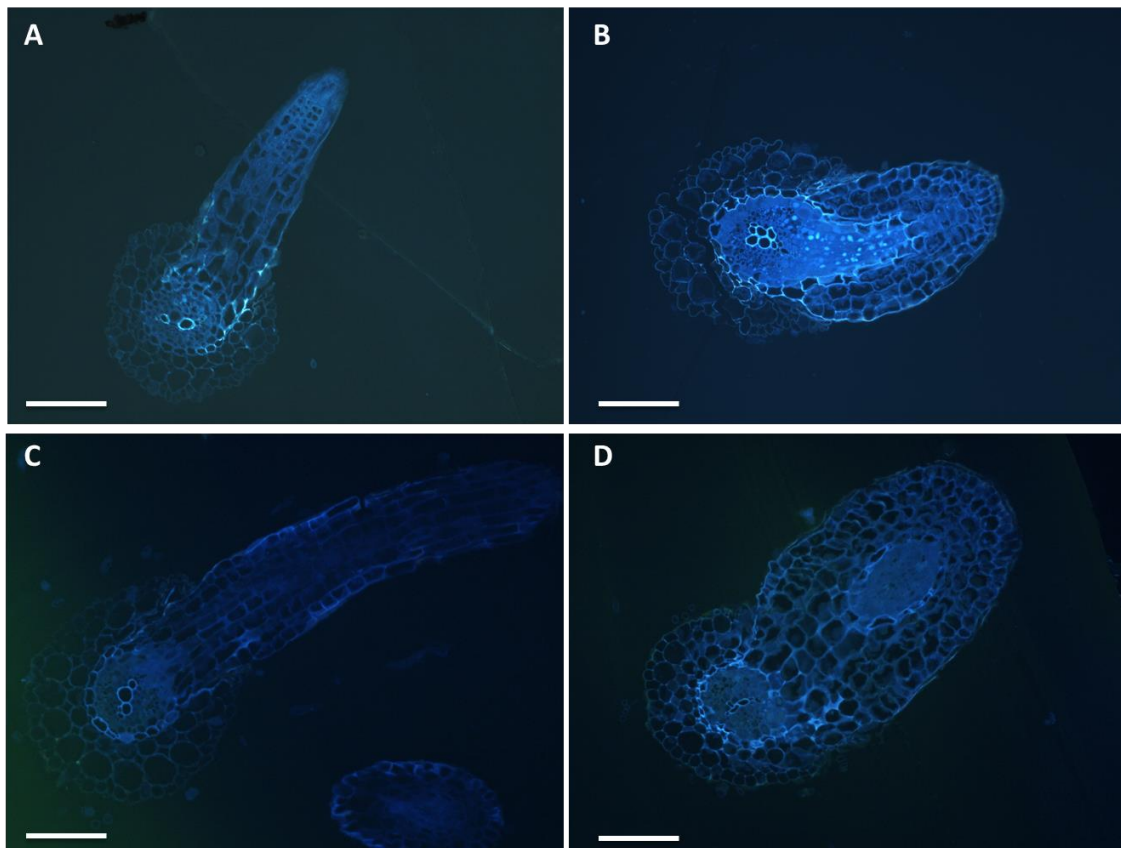


Obr. 13: Změny v čerstvé hmotnosti nadzemní části a množství chlorofylu u řepky olejky (Cadelí, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. Chybové úsečky představují průměry \pm SD (n = 3). Statistika odpovídá popisu u Obr. 9.

7.2.3 Vliv kadmia a zinku na anatomii kořene

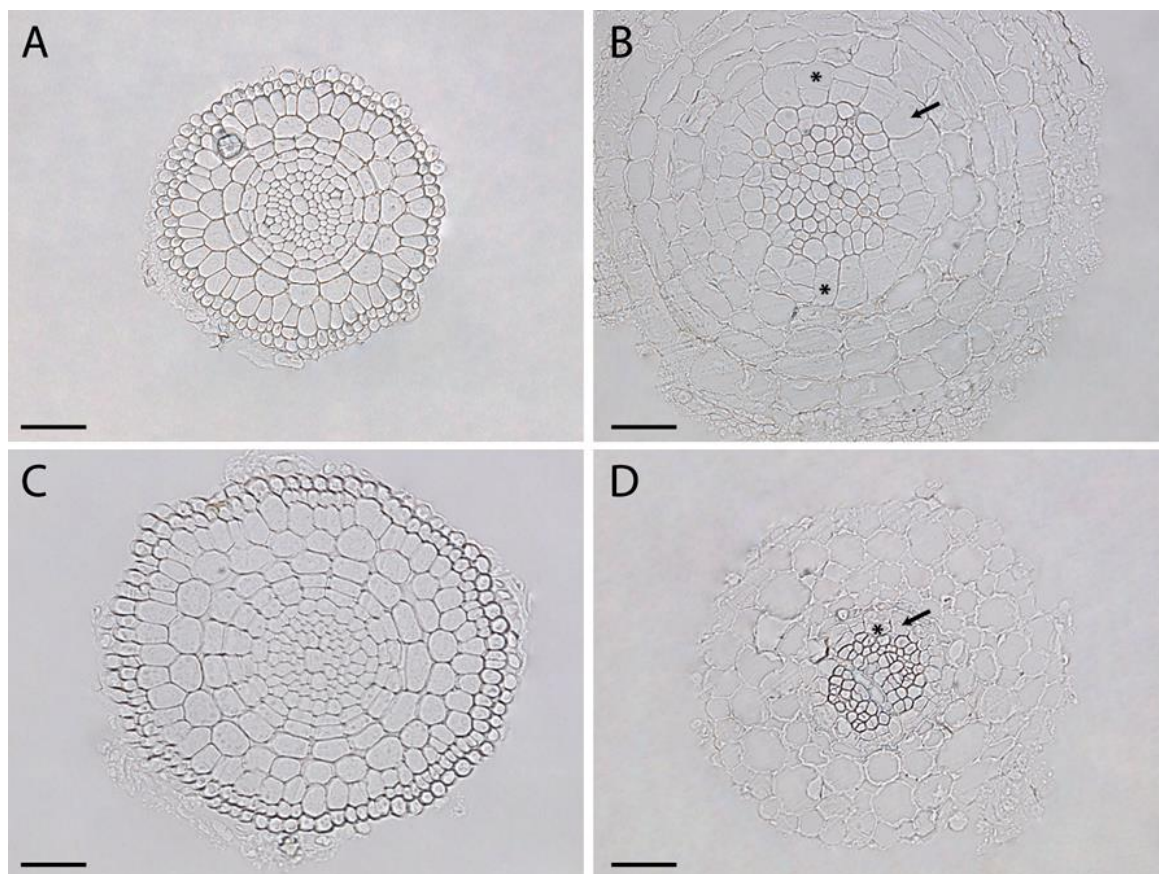
Přijem Cd kořeny je umožněn jak cestou symplastickou (intracelulární transport pomocí plasmodesmat), tak cestou apoplastickou (transport mezibuněčnými prostory či buněčnými stěnami) (Shahid et al. 2016; Song et al. 2017). Růst kořene je poté ovlivněn na mnoha nejrůznějších úrovních zahrnujících například změnu anatomie kořene (Lux et al. 2011a), biosyntézu ligninu (Yang et al. 2007), oxidační stav (Romero-Puertas et al. 2002a) či impregnaci buněčné stěny, a to především vlivem ukládání suberinu (Vatehova et al. 2012).

Přítomnost Cd a Cd + Zn v našem experimentu významně ovlivnila anatomii a morfologii kořenů. Kořenové špičky byly u všech testovaných kultivarů signifikantně tlustší než špičky kontrolní a špičky z média se Zn (Tab. 5), což je částečně vidět také na snímcích řezů (Obr. 14). Největšího průměru dosahovala kořenová špička u kultivaru Viking rostoucího v médiu s Cd. Přítomnost Zn v médiu vyvolala u kultivaru Cadelí mírně zvětšený průměr kořenové špičky oproti kontrole, nicméně tato změna nebyla statisticky signifikantní (Tab. 5).



Obr. 14: Řezy kořenovými špičkami u řepky olejky (Cadel, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. A – kontrola; B – médium s 5 μM Cd; C – médium s 10 μM Zn; D – médium s 5 μM Cd + 10 μM Zn. Řezy byly vedeny zhruba 1 mm od kořenové špičky. Měřítka představuje 100 μm .

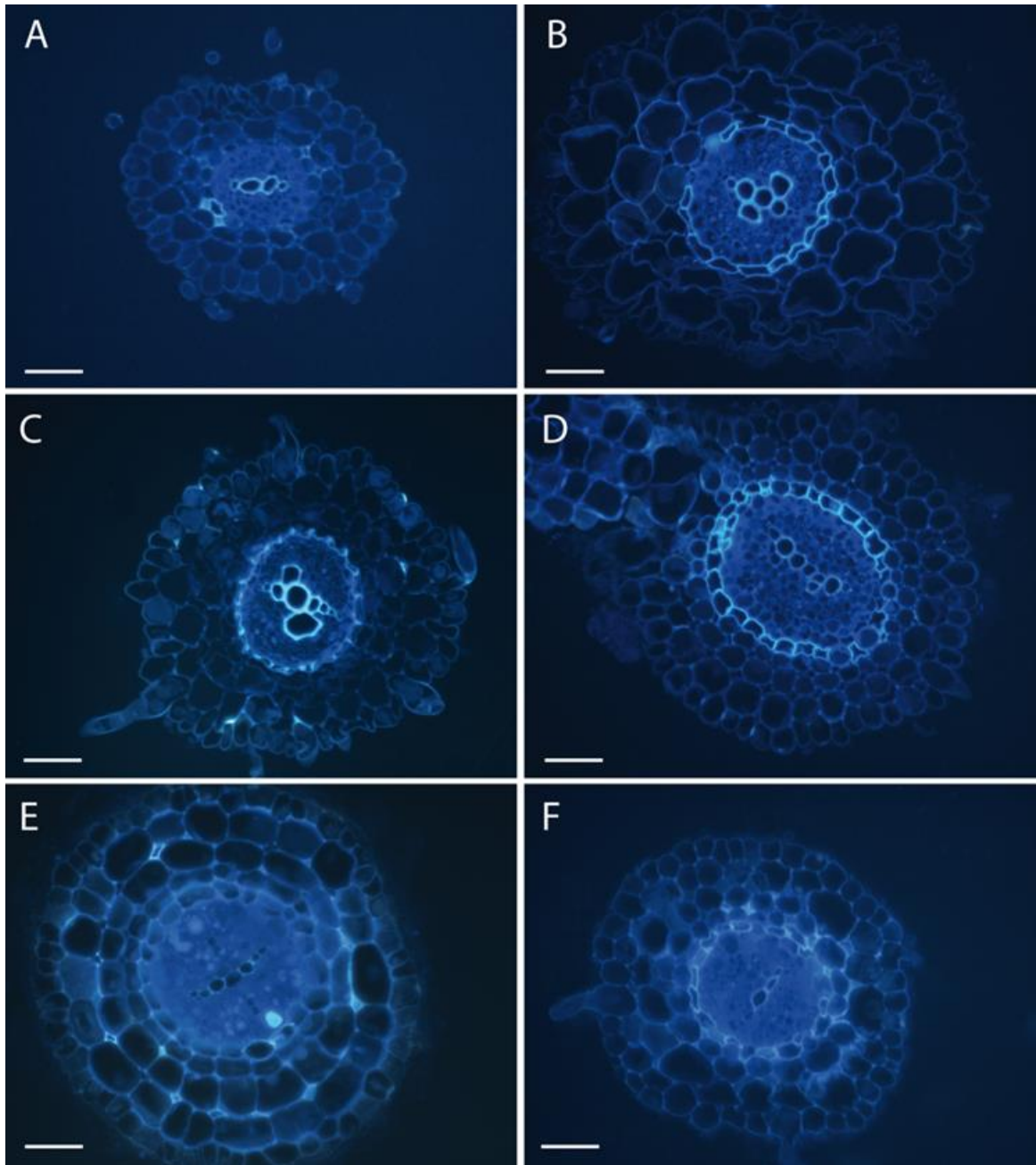
Buňky pericyklu v kořenech rostlin stresovaných Cd a Cd + Zn byly nápadně zvětšené a vykazovaly nepravidelné buněčné dělení (Obr. 15B, D) v porovnání s kontrolou a médiem se Zn (Obr. 15A, C). Pericykl je vrstva buněk, která slouží u rostlin k zakládání postranních kořenů vznikajících díky velmi rychlým návazným transverzálním a následným periklinálním buněčným dělením (Laskowski et al. 1995). V nedávné době bylo zjištěno, že Cd se nenachází pouze v jedné vrstvě kořene, ale může být lokalizováno ve střední lamelle buněčných stěn kořenového stéle (Van Belleghem et al. 2007), v endodermis a pericyklu (Yamaguchi et al. 2011), ale také například pouze uvnitř pericyklu (Wojcik and Tukiendorf 2004). Vzhledem k různorodé lokalizaci Cd v kořeni je pravděpodobné, že jeho přítomnost ve vrstvě endodermis či pericyklu specificky ovlivňuje chování těchto kořenových pletiv.



Obr. 15: Vliv Cd a Zn na anatomii kořenové špičky u řepky olejky (Cadel, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. V případě média s Cd a Cd + Zn byly pozorovány zvětšené buňky pericyklu (šipka) a nepravidelné buněčné dělení (hvězdička). A – kontrola; B – médium s 5 μM Cd; C – médium s 10 μM Zn; D – médium s 5 μM Cd + 10 μM Zn. Řezy byly vedeny zhruba 1 mm od kořenové špičky. Měřítka představuje 100 μm .

Analyzována byla také míra autofluorescence u jednotlivých variant těžkých kovů (Obr. 16). U kultivaru Navajo byla pozorována zvýšená míra autofluorescence v endodermis kořenů rostlin rostoucích v médiu s Cd, Zn a Cd + Zn v porovnání s kontrolou (Obr. 16A-D). Vyšší intenzita autofluorescence může značit častější ukládání autofluorescenčního materiálu, jako je například lignin či suberin, které je vyvoláno nadměrnou akumulací kovů. Přestože v našem experimentu působí Zn jako mikroprvek, jeho vliv na ukládání ligninu/suberinu je stejný jako v případě působení Cd či Cd + Zn (Obr. 16C). V některých případech lze pozorovat také ukládání extracelulárního materiálu uvnitř intercelulár ve vrstvě kortexu. Tyto „shluky“ autofluorescenčního materiálu souvisí s poškozením kořene vlivem interakce Cd s membránami, ale zároveň mohou sloužit také jako blokády pro vstup Cd do vnitřních vrstev kořene. V našem experimentu byl pozorován uložený autofluorescenční materiál především u kořenů rostlin stresovaných Cd a Cd + Zn (Obr. 16E, F), ale v menší míře také u kontroly (Obr.

16A). Podobné blokády byly v minulosti pozorovány například u *Oryza sativa* či *Phragmites* stresovaných sulfidy či organickými kyselinami (Armstrong and Armstrong 2001, 2005), kde vedly k inhibici příjmu vody a minerálních látek.



Obr. 16: Vliv Cd a Zn na akumulaci a ukládání autofluorescenčního materiálu (lignin/suberin) v kořenech u řepky olejky (Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn; autofluorescence pod UV světlem. A – kontrola; B, E – médium s 5 μM Cd; C – médium s 10 μM Zn; D, F – médium s 5 μM Cd + 10 μM Zn. Řezy pochází ze středních částí kořenů. Měřítka představuje 100 μm .

7.2.4 Příjem a translokace kadmia a zinku

Obsah kovů v kořenech a nadzemních částech spolu s translokačními faktory (TF) pro testované kultivary (Cadelí, Viking, Navajo) jsou uvedeny na Obr. 17. Translokační faktor je definován jako poměr obsahu kovu v nadzemní části vůči kořeni. Tato veličina udává schopnost rostliny translokovat kov ze svých kořenů do nadzemní biomasy a značí tak míru potenciální fytoextrakce dané rostliny. Je však nutné doplnit, že na procesu fytoextrakce se značnou měrou podílí také například dostupnost kovu z půdy, půdní druh, půdní pH, redoxní potenciál či mikrobiální složka (Vig et al. 2003; Alkorta et al. 2006). Přesto však lze z hodnot TF vycházejících z hydroponických experimentů získat poměrně přesnou představu o genetickém potenciálu testované rostliny k tomu tolerovat vyšší koncentrace těžkých kovů a být tak případně potenciálním hyperakumulátorem.

Z našeho předpokladu se potvrdilo, že obsah těžkých kovů v rostlinách rostoucích v médiu s přídavkem Cd či Zn byl vyšší než u kontrol. U všech genotypů bylo prokázáno, že akumulace Cd i Zn byla vyšší v kořenech než v nadzemních částech (Obr. 17A-D). Vyšší schopnost translokovat Cd do nadzemní části byla zaznamenána u Cadelí v porovnání s Vikingem, zatímco v médiu s Cd + Zn docházelo k většímu transportu Cd do nadzemní části u Cadelí v porovnání s kultivarem Navajo (Obr. 17B). U kultivaru Navajo byla také mírně redukována translokace Zn do nadzemních částí, což potvrzuje také nízká hodnota TF pro Zn, a to 0,26 (Obr. 17E).

Čeled' *Brassicaceae* je známá pro četný výskyt hyperakumulátorů kovů. Velmi nadějným kandidátem se slibnými výsledky se zdá být například *Brassica juncea* či *Noccaea caerulescens* (Qadir et al. 2004; Jacobs et al. 2017). V poslední době se však výzkum věnuje také řepce olejce (*B. napus*), která by byla díky rychlému růstu, značné biomase a vysoké toleranci vůči těžkým kovům vhodnou rostlinou pro fytoremediace (Hernández-Allica et al. 2008; Dhiman et al. 2016). Některé studie nicméně naznačují, že fytoextrakční potenciál řepky olejky je značně limitovaný (Turan and Esringu 2007; Yu et al. 2012). Stejný závěr vychází také z našeho hydroponického experimentu a hodnot TF, které se všechny pohybují pod hodnotou „1“ u všech zkoumaných kultivarů (Obr. 17E). Vzhledem k velkému množství vyšlechtěných genotypů u řepky je však pravděpodobné, že experimenty testující jiné genotypy mohou prokázat fytoextrakční potenciál, jako je tomu například v případě pokusů od Szulc et al. (2015) či Cojocarú et al. (2016).

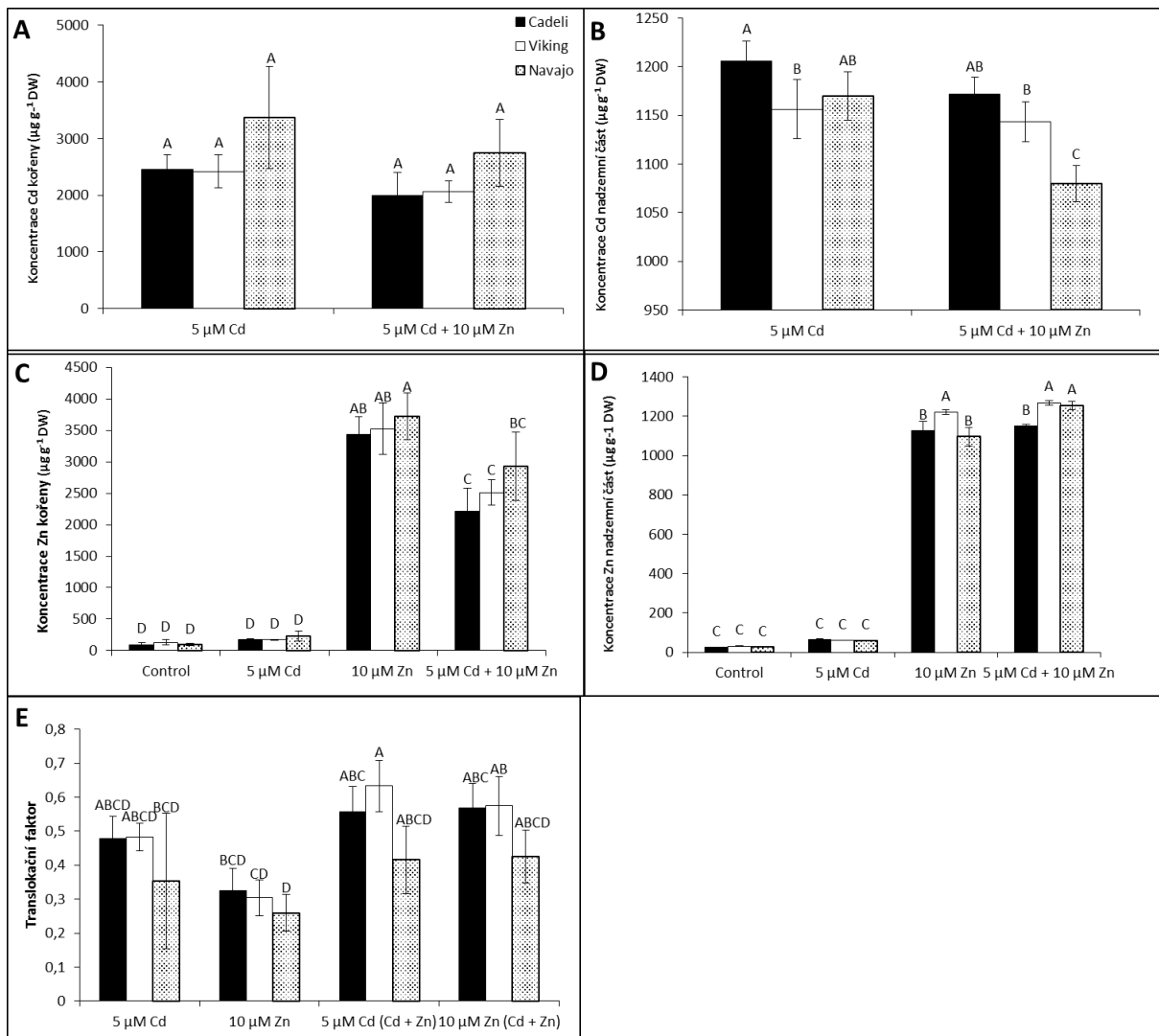
Obsah Cd v kořenech dosáhl podobných hodnot jak v médiu se samotným Cd, tak v médiu s Cd + Zn u všech testovaných kultivarů (Obr. 17A). V případě nadzemní části se obsahy Cd v obou typech médií téměř nelišily a přídavek Zn tak nehrál větší roli (Obr. 17B). Jediná větší změna byla pozorována u kultivaru Navajo, který akumuloval signifikantně méně

Cd do nadzemní části v případě růstu v médiu s Cd + Zn (Obr. 17B). Důvodem aplikace Zn do médií s Cd byla předpokládaná ochranná role tohoto prvku před toxicitou vyvolanou Cd a jeho prokázaná antioxidační schopnost (Monteiro et al. 2007; Taspinar et al. 2011). V našich experimentech se však tato vlastnost neprokázala, toxicita Cd v médiu s Cd + Zn byla porovnatelná s tou, která vznikla u rostlin stresovaných pouze Cd. Dokladem jsou také hodnoty TF u Cadeli a Vikinga, které jsou vyšší pro translokaci Cd v médiu s Cd + Zn, než v médiu se samotným Cd (Obr. 17E).

Obsah Zn v kořenech byl nižší u rostlin rostoucích v médiu s Cd + Zn, než v médiu se samotným Zn (Obr. 17C). Oproti tomu obsah Zn se v nadzemních částech nelišil v závislosti na přídatku či absenci Zn (Obr. 17D). Podobné výsledky popisuje také Tkalec et al. (2014), v jehož experimentech měl Zn pozitivní účinek na akumulaci Cd kořeny, zatímco Cd mělo antagonistický efekt na akumulaci Zn v nadzemní části a v kořenech. V našich experimentech neměl Zn negativní účinek na příjem Cd kořeny ani na jeho translokaci do nadzemní části (Obr. 17A, B). Odlišné výsledky od našeho experimentu lze najít u autorů Wu et al. (2003), kteří pozorovali, že Cd vedlo k redukci akumulace Zn nejen v kořenech, ale také v nadzemních částech, a že translokace Zn byla signifikantně inhibována přídatkem Cd.

Experimenty popisující vzájemný vztah mezi Cd a Zn nejsou jednotné ve svých výsledcích a tvrzeních, což je dané především rozdílnými koncentracemi těžkých kovů, které jsou pro účely pokusu využívány. Autoři Cherif et al. (2011) uvádí, že vyšší koncentrace Zn v kombinaci s Cd zvyšují oxidativní stres, zatímco nižší a přiměřené dávky Zn dokáží modulovat toxicitu způsobenou Cd. Stejně závěry popisují ve své práci též Sharma et al. (1999), kde měl Zn o koncentraci 25 a 50 μM antagonistický efekt na příjem Cd a naopak.

Díky vzájemné chemické podobnosti Cd a Zn může jejich vzájemná interakce v médiu vést ke kompetici v příjmu, transportu a akumulaci rostlinou (Welch and Norvell 1999). Pozorovaný pokles obsahu Zn v kořenech rostlin stresovaných Cd + Zn může být způsoben přítomností Cd, které dokáže obsadit Zn-vazebná místa důležitých enzymů či přenašečů Zn. Jedná se o běžný jev, který je pozorován v přirozeném prostředí obsahujícím kovy (Tang et al. 2014). Dále bylo prokázáno, že Cd je přijímáno, sekvestrováno a transportováno stejnými přenašeči, které se účastní příjmu a transportu Zn. Mezi takové řadíme například HMA2, 3, 4 (AtHMA2, 3, 4) či NRAMP4 (TcNRAMP4) (Eren and Argüello 2004; Courbot et al. 2007; Oomen et al. 2009; Morel et al. 2009).



Obr. 17: Obsah Cd (A, B) a Zn (C, D) v kořenech a nadzemních částech a translokační faktor (E) [$\text{TF} = \text{Cd}_{\text{nadzemní část}} / \text{Cd}_{\text{kořen}}$] u řepky olejky (Cadeli, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, Zn či Cd + Zn. Chybové úsečky představují průměry \pm SD ($n = 3$). Statistika odpovídá popisu u Obr. 9.

7.2.5 Vliv kadmia a zinku na příjem a translokaci K, Mg, Ca a Na

Tabulka 6 udává obsah vybraných minerálních prvků v kořenech a nadzemních částech rostlin v různých druzích médií. Mezi jednotlivými kultivary nebyla pozorována výraznější změna u příjmu minerálních prvků v závislosti na těžkém kovu.

Obsah K v kořenech byl nezávislý na použitém médiu a těžkém kovu. U jiných druhů rostlin však byl v minulosti pozorován negativní vliv těžkého kovu na příjem K kořeny (Abu-Muriefah 2008; Siddiqui et al. 2012). U rostlin v médiu s přídavkem Zn byl v našem experimentu zaznamenán poměrně vysoký nárůst obsahu K v nadzemních částech, tento zvýšený obsah však již neplatil v případě média s Cd + Zn. Bylo prokázáno, že přídavek K do média má pozitivní účinky na příjem Zn (Barker and Pilbeam 2015), a to samé může platit také

naopak. Vysoký obsah K a zároveň nižší obsah Ca v nadzemních částech rostlin rostoucích v médiu se Zn potvrzují také jiné další studie poukazující na antagonistickou interakci mezi K a Ca v příjmu kořeny rostlin (Fageria 2008; Barker and Pilbeam 2015).

Hořčík patří mezi významné prvky podílející se na správné funkci fotosyntézy. Je známo, že Mg může být v molekule chlorofylu nahrazen jiným těžkým kovem (Küpper et al. 1998). Obsah Mg v našem experimentu byl vyšší v nadzemních částech, než v kořenech, ve kterých se toto množství nelišilo mezi jednotlivými variantami těžkých kovů. U varianty média s Cd a Cd + Zn proběhl menší nárůst obsahu Mg v nadzemních částech rostlin v porovnání s kontrolou a médiem se Zn. Podobné výsledky popisující vyšší míru akumulace Cd ve stoncích je popsán také u *B. juncea* (Jiang et al. 2004), *Triticum aestivum* a *Zea mays* (Nikolić et al. 2014).

Obsah Ca byl v nadzemních částech značně vyšší než v kořenech, a přidání Cd do média nemělo na jeho obsah žádný vliv a hodnoty se rovnaly těm v kontrole. Signifikantní rozdíl v obsahu Ca však nastal u varianty se Zn, kde byl v nadzemních částech značně redukován. Žádná změna (Viking) či pouze malý pokles (Cadelí, Navajo) byla zaznamenána u nadzemních částí v médiu s Cd + Zn. Podobné výsledky byly popsány v práci od Davis-Carter et al. (1991), kteří objevili snížený obsah Ca v listech u *Arachis hypogea* po přidání Zn, snížená hodnota Ca však souvisela s toxicitou danou vysokým obsahem přidaného Zn v půdě (40 mg Zn kg⁻¹). Opačné výsledky jsou popsány u rostlin *Pisum sativum*, v jejichž listech došlo po přidání Zn k nárůstu obsahu Ca (Stoyanova and Doncheva 2002). Je známo, že některé Ca kanály a přenašeče jsou permeabilní pro mnoho dalších dvojmocných kationtů, jako je například Ba²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ či Zn²⁺ (White and Broadley 2003). Z tohoto důvodu se můžeme domnívat, že redukce Ca v listech rostlin rostoucích v médiu se Zn mohla být způsobena okupací Ca kanálů právě ionty Zn²⁺. V médiu s Cd + Zn nebyl tento jev pozorován, což mohlo být dáno kompeticí mezi Cd²⁺ a Zn²⁺ vedoucí k nižší afinitě iontů k Ca kanálům.

Obsah Na v kořenech byl stejný u všech použitých koncentrací těžkých kovů. V nadzemních částech vzrostl obsah Na u rostlin v médiu s Cd a v médiu se Zn, toto chování však bylo částečně závislé na kultivaru. Vyšší obsah Na v listech rostlin z média s Cd byl naměřen u Cadelí, kdežto u Vikinga narostl obsah Na v médiu se Zn. U kultivaru Navajo se obsahy Na v nadzemních částech v médiu s Cd a v médiu se Zn pohybovaly na podobných hodnotách. Sodík nepatří mezi esenciální mikroprvky, je však pro rostliny důležitý při nedostatku K, který dokáže díky své chemické podobnosti v jeho funkcích zastoupit (Maathuis 2013). V našem experimentu byl v médiu s Cd obsah K v nadzemních částech redukován, je proto možné, že vyšší obsah Na byl u těchto rostlin způsoben snahou o vyrovnání metabolismu a nahrazení K pomocí Na.

Tab. 6: Obsah K, Mg, Ca a Na ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) v kořenech a v nadzemních částech u řepky olejky (Cadelí, Viking, Navajo) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přidavku Cd, Zn či Cd + Zn. Chybové úsečky představují průměry \pm SD ($n = 3$). Statistika odpovídá popisu u Obr. 9.

	Obsah minerálních látek v kořenech ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)			
	K	Mg	Ca	Na
<i>Cadelí</i>				
Kontrola	20.97 \pm 2.70 ^A	1.51 \pm 0.51 ^A	4.56 \pm 0.61 ^A	0.95 \pm 0.25 ^A
5 μM Cd	25.72 \pm 3.92 ^A	1.82 \pm 0.26 ^A	6.94 \pm 0.78 ^A	4.03 \pm 1.67 ^A
10 μM Zn	19.52 \pm 3.96 ^A	1.65 \pm 0.24 ^A	5.78 \pm 0.96 ^A	1.37 \pm 0.69 ^A
5 μM Cd + 10 μM Zn	19.78 \pm 5.17 ^A	1.82 \pm 0.22 ^A	5.70 \pm 1.18 ^A	1.41 \pm 0.70 ^A
<i>Viking</i>				
Kontrola	20.00 \pm 3.74 ^A	1.44 \pm 0.01 ^A	4.42 \pm 0.39 ^A	1.27 \pm 0.48 ^A
5 μM Cd	24.02 \pm 4.81 ^A	1.57 \pm 0.23 ^A	5.82 \pm 0.57 ^A	3.80 \pm 3.82 ^A
10 μM Zn	21.99 \pm 6.43 ^A	1.80 \pm 0.22 ^A	5.63 \pm 0.50 ^A	3.93 \pm 4.77 ^A
5 μM Cd + 10 μM Zn	25.20 \pm 7.73 ^A	1.79 \pm 0.10 ^A	5.89 \pm 0.66 ^A	4.44 \pm 4.73 ^A
<i>Navajo</i>				
Kontrola	19.08 \pm 4.31 ^A	1.21 \pm 0.17 ^A	4.74 \pm 0.24 ^A	1.30 \pm 0.58 ^A
5 μM Cd	27.95 \pm 9.41 ^A	2.08 \pm 0.98 ^A	7.26 \pm 2.01 ^A	5.42 \pm 3.96 ^A
10 μM Zn	25.83 \pm 5.07 ^A	1.79 \pm 0.54 ^A	5.35 \pm 1.22 ^A	3.23 \pm 4.04 ^A
5 μM Cd + 10 μM Zn	24.38 \pm 5.44 ^A	1.73 \pm 0.26 ^A	6.18 \pm 1.28 ^A	4.37 \pm 5.00 ^A

	Obsah minerálních látek v nadzemní části (mg.g ⁻¹ DW)			
	K	Mg	Ca	Na
<i>Cadeli</i>				
Kontrola	59.42±1.20 ^D	6.80±0.12 ^{CD}	32.59±1.30 ^{CD}	0.31±0.02 ^D
5 μM Cd	45.03±1.64 ^F	9.10±0.08 ^A	34.30±1.32 ^{ABC}	0.94±0.07 ^B
10 μM Zn	69.56±1.94 ^B	6.43±0.07 ^D	23.74±1.38 ^{EF}	0.65±0.08 ^C
5 μM Cd + 10 μM Zn	48.07±1.72 ^{EF}	7.80±0.26 ^B	29.98±1.27 ^D	0.27±0.02 ^D
<i>Viking</i>				
Kontrola	66.76±3.29 ^{BC}	7.01±0.05 ^C	32.63±0.60 ^{CD}	0.29±0.01 ^D
5 μM Cd	48.08±3.67 ^{EF}	8.10±0.09 ^B	32.78±1.05 ^{BCD}	0.69±0.08 ^C
10 μM Zn	78.86±2.07 ^A	6.53±0.24 ^{CD}	24.81±1.51 ^E	1.55±0.08 ^A
5 μM Cd + 10 μM Zn	59.01±1.41 ^D	8.02±0.30 ^B	33.01±2.16 ^{BCD}	0.29±0.03 ^D
<i>Navajo</i>				
Kontrola	63.10±2.23 ^{CD}	6.97±0.18 ^{CD}	37.47±0.45 ^A	0.27±0.02 ^D
5 μM Cd	47.32±0.43 ^{EF}	9.32±0.27 ^A	35.24±1.07 ^{ABC}	0.69±0.05 ^C
10 μM Zn	75.93±1.22 ^A	5.80±0.37 ^E	20.49±0.53 ^F	0.68±0.01 ^C
5 μM Cd + 10 μM Zn	51.69±0.81 ^E	9.37±0.21 ^A	36.50±1.49 ^{AB}	0.22±0.03 ^D

7.2.6 Závěr

Přídavek Cd do média měl negativní vliv na růstové charakteristiky zahrnující délku a hmotnost kořenů a hmotnost nadzemní části. Ochranná role Zn před toxicitou vyvolanou Cd nebyla pozorována u žádného testovaného kultivaru řepky olejky. Mezi jednotlivými kultivary byly pozorovatelné jen menší změny v chování v reakci na těžké kovy. Ke změnám anatomie kořenů docházelo u rostlin rostoucích v médiu s Cd a částečně v médiu s Cd + Zn, kde byla zaznamenána zvýšená akumulace ligninu/suberinu a zvětšené buňky pericyklu. Translokační faktory u jednotlivých kultivarů neprokázaly fytoextrakční potenciál pro Cd ani pro Zn, výsledky hydroponického experimentu však nemají natolik vypovídající hodnotu, jako půdní či polní experimenty. Obsah těžkých kovů v kořenech byl u všech kultivarů vyšší v kořenech než v nadzemních částech. Akumulace Cd v nadzemních částech byla ovlivněna přídavkem Zn pouze u kultivaru Navajo, kde byla signifikantně snížena. Zastoupení minerálních prvků v kořenech se u většiny případů neměnilo v závislosti na kultivaru a dávkce těžkých kovů.

V nadzemních částech však bylo chování rostlin rozdílné. Obsah K byl vyšší u rostlin rostoucích v médiu se Zn, kdežto množství Mg narostlo v médiu s Cd. Signifikantně redukovaný obsah Ca byl zaznamenán u rostlin v médiu se Zn, což však neplatilo v případě spolupůsobení Cd + Zn. Obsah Na byl ovlivněn pouze v médiu se samotným Cd či Zn, kde byl oproti kontrole a médiu s Cd + Zn vyšší. Reakce na přítomnost Cd či Zn pak byla závislá na konkrétním kultivaru.

7.3 Vliv benzoátu sodného na stresovou odpověď vůči vyšším dávkám kadmia u řepky olejky (*B. napus*)

Cílem experimentu bylo popsat chování rostlin stresovaných Cd a vystavených působení BS, jakožto látky schopné vychytávat H₂O₂. Analýzy zahrnovaly například stanovení obsahu chlorofylu, fenolů, flavonoidů či obsahu ROS, a dále zastoupení těžkého kovu a dalších mikroprvků v kořenech a nadzemních částech rostlin.

7.3.1 Vliv kadmia a benzoátu sodného na růst rostlin a fotosyntetické parametry

Pro následné experimenty byl použit pouze jeden kultivar řepky olejky (*B. napus*), kultivar Ladoga, a to vzhledem k jeho charakteristice, která popisuje vysokou výnosnost tohoto kultivaru. V prvním kroku bylo kontrolováno, zda testovací koncentrace BS negativně neovlivní růst rostlin. Pro tento účel byly změřeny délky kořenů a hmotnosti nadzemních a podzemních částí rostlin kontrolních a rostlin ošetřených Cd, BS a Cd + BS (Tab. 7). Z výsledků vyplývá, že rostliny rostoucí v médiu s BS nevykazovaly žádné signifikantní redukce v růstu a fenotypově byly totožné s rostlinami kontrolními. Oproti tomu rostliny pěstované v médiu obsahujícím Cd či Cd + BS vykazovaly signifikantně redukovaný růst, který nebyl ovlivněn přidáním BS u druhé testované varianty s těžkým kovem.

Obsah chlorofylu byl srovnatelný u rostlin kontrolních a u rostlin rostoucích v médiu s přísadkou BS (Tab. 7). Značný pokles hodnot u všech tří fotosyntetických pigmentů byl zaznamenán jak ve variantě s Cd, tak Cd + BS. Tyto výsledky ukazují na to, že BS nemá žádný vliv na toxicitu vyvolanou Cd a nevyznačuje se schopností chránit molekuly chlorofylu před negativním dopadem těžkého kovu.

Tab. 7: Změny v délce kořenů (cm) a v čerstvé hmotnosti kořenů a nadzemních částí (mg), změny v obsahu chlorofylu a, b a karotenoidů (mg.g⁻¹ FW) u řepky olejky (Ladoga) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, BS či Cd + BS (n = 6). Chybové úsečky představují průměry ± SE. Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu (P < 0.05) signifikantně odlišné.

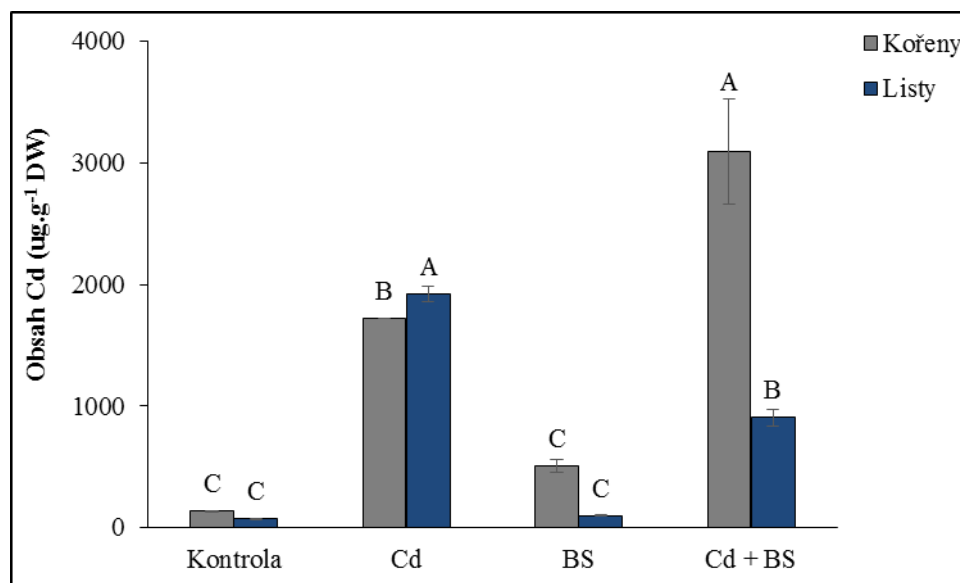
	Délka kořenů (cm)	Hmotnost kořenů (mg)	Hmotnost listů (mg)	Obsah chlorofylu a (mg.g ⁻¹ FW)	obsah chlorofylu b (mg.g ⁻¹ FW)	obsah karotenoidů (mg.g ⁻¹ FW)
Kontrola	18,12±1,87 ^A	3,38±0,82 ^A	36,10±3,37 ^A	0,92±0,21 ^A	0,38±0,09 ^A	0,15±0,02 ^A
Cd	9,05±3,56 ^B	1,86±0,57 ^B	22,38±3,71 ^B	0,19±0,06 ^B	0,07±0,03 ^B	0,05±0,01 ^B
BS	16,38±1,84 ^A	3,10±0,73 ^A	32,87±4,37 ^A	0,81±0,17 ^A	0,33±0,06 ^A	0,13±0,03 ^A
Cd + BS	9,67±1,32 ^B	1,66±0,45 ^B	18,29±2,80 ^B	0,21±0,07 ^B	0,08±0,04 ^B	0,05±0,01 ^B

7.3.2 Akumulace Cd v kořenech a v nadzemních částech a vliv benzoátu sodného

Z grafů na Obr. 18 vyplývá, že akumulace Cd je u této řepky oproti předchozím testovaným kultivarům odlišná, a to s ohledem na translokaci těžkého kovu z kořenů do nadzemní části. V nadzemní části byl nalezen srovnatelný, ba dokonce mírně vyšší obsah Cd, než v kořenech. Tento výsledek ukazuje na schopnost translokovat vyšší obsah kovů do stonku a do listů a být tak potenciálním hyperakumulátorem. Toto tvrzení platí také v případě hodnoty TF, který je u Ladogy a obsahu Cd nad limitní hranicí „1“ (Tab. 8).

Na grafu zobrazujícím akumulaci Cd v médiu s Cd + BS je vidět, že příjem Cd kořeny je signifikantně vyšší než v médiu se samotným Cd, a translokace do nadzemní části je naopak v porovnání s tímto médiem snížena (Obr. 18). Z tohoto výsledku můžeme odvozovat různé možnosti, proč dochází v médiu s Cd + BS k vyššímu příjmu Cd kořeny a k nižší translokaci do nadzemní části. Benzoát sodný může například vést k vyšší dostupnosti Cd pro kořeny rostlin, případně může ovlivňovat plazmatickou membránu a umožnit tak lepší průchod iontů Cd²⁺ do kořenových buněk. Tyto předpoklady však nevysvětlují nízký obsah Cd v nadzemní části. Jako

pravděpodobnější vysvětlení by se mohlo jevit takové, kdy BS působí pozitivně na aktivitu a tvorbu chelatačních látek v buňkách a vede tak k vyššímu ukládání Cd ve vakuole. Sekvestrovaný kov je tímto způsobem inaktivován, jeho koncentrace v cytosolu a symplastu je nižší a tudíž je jeho translokace do nadzemní části omezena. Podobný závěr byl popsán u řepky olejky, které byl do média s Cd přidán glutathion, látka známá mimo jiné jakožto vychytávač ROS (Noctor and Foyer 1998). Glutathion vedl u těchto rostlin k signifikantnímu snížení TF pro Cd a dokonce došlo k úbytku Cd v symplastu a omezení translokace kovu z kořenů do nadzemní části. Dále byl popsán zvýšený výdej iontů Cd^{2+} z kořenů do hydroponického média (Nakamura et al. 2013).



Obr. 18: Obsah Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$ DW) v kořenech a v nadzemních částech (listech) řepky olejky (Ladoga) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, BS či Cd + BS ($n = 3$). Chybové úsečky představují průměry \pm SE. Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

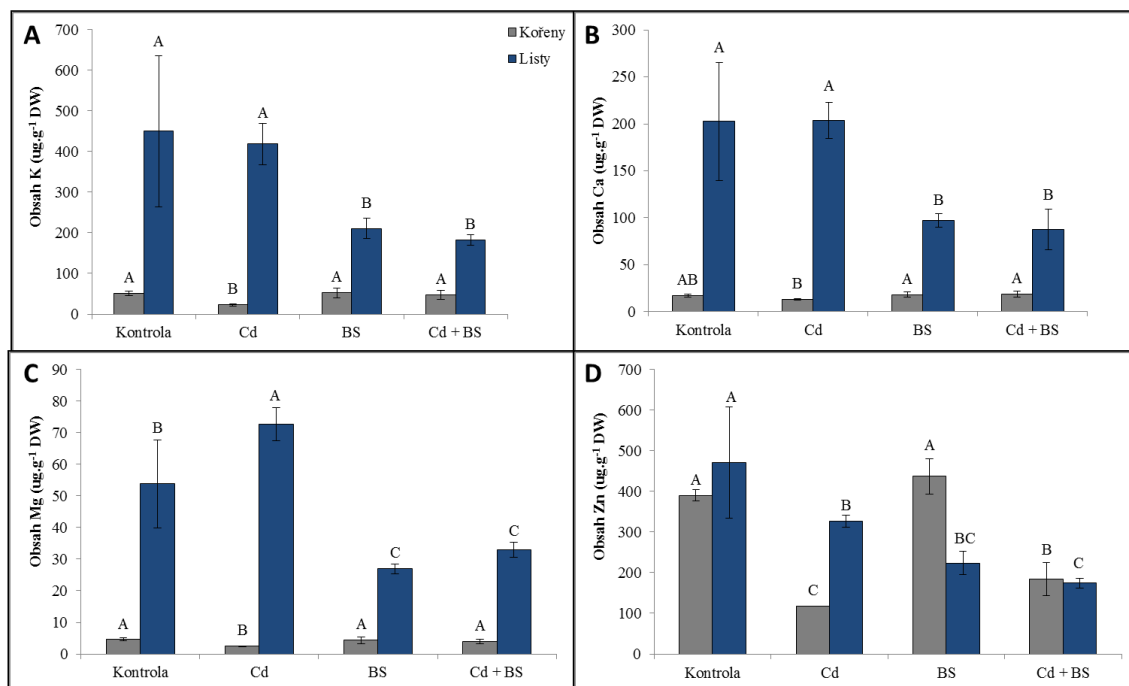
Tab. 8: Translokační faktory [$TF = \frac{Cd_{\text{nadzemní část}}}{Cd_{\text{kořen}}}$] v kořenech a v nadzemních částech řepky olejky (Ladoga) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, BS či Cd + BS ($n = 3$).

	Translokační faktor
Kontrola	0,54
Cd	1,12
BS	0,19
Cd + BS	0,16

7.3.3 Vliv kadmia a benzoátu sodného na příjem a translokaci K, Ca, Mg a Zn

Obsahy minerálních látek v kořenech a v nadzemních částech testovaných rostlin jsou uvedeny na obr. 19. Obsahy K (Obr. 19A), Ca (Obr. 19B) a Mg (Obr. 19C) byly značně vyšší v nadzemní části, než v kořenech. U všech výše zmíněných minerálních prvků došlo k redukcí v obsahu a příjmu kořeny rostoucími v médiu s Cd. Naopak u nadzemních částí obsahy K, Ca a Mg značně poklesly u rostlin rostoucích v médiu s BS a Cd + BS. Z tohoto výsledku se zdá, že BS vede k inhibici translokace minerálních prvků do nadzemní části, nikoliv však k inhibici v jejich příjmu. Benzoát sodný má tak z tohoto pohledu negativnější vliv na přenos minerálních látek, než Cd. Obsah Zn (Obr. 19D) byl u kontrolní varianty a varianty s přidaným BS stejný, případně vyšší v kořenech než v nadzemní části. Aplikace Cd do média pak vedla k redukcí jeho obsahu jak v kořenech, tak v listech. Redukce v translokaci Zn nebyla u média s BS a Cd + BS tolik výrazná, jako u K, Ca a Mg, nebyla však ani zanedbatelná. I v tomto případě tak lze tvrdit, že přídavek BS do média vedl zřejmě k ovlivnění transportu Zn do nadzemní části.

Dle studie od Mickky (2016) lze použít BS jako velmi účinný prostředek pro ošetření semen *Vicia faba* klíčících v mořské vodě, která by jinak procházela značným stresem zasolením. Rostliny se brání nadměrnému množství solí mimo jiné omezením jejich transportu do stonků a listů. Pokud má tedy BS pozitivní vliv na rostliny rostoucí v zasolené půdě, můžeme předpokládat, že jeho účinek povede také k omezení transportu ostatních minerálních solí z kořenů do nadzemních částí. Tento předpoklad potvrdily výsledky našeho experimentu, v němž byla ve všech případech pozorována redukce v translokaci minerálních prvků z kořenů do listů. Pro podporu našeho tvrzení by však byly potřeba ještě dodatečné experimenty (např. porovnání obsahu minerálů u rostlin stresovaných zasolením a těžkými kovy, analýza obsahu xylému, popis chování membránových přenašečů, či přesný popis chování BS v cytosolu kořenových buněk), které by tuto domněnku potvrdily, či vyvrátily.



Obr. 19: Obsah K, Ca, Mg a Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) v kořenech a v nadzemních částech řepky olejky (Ladoga) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd, BS či Cd + BS ($n = 3$). A – obsah K v kořenech a listech; B – obsah Ca v kořenech a listech; C – obsah Mg kořenech a listech; D – obsah Zn v kořenech a listech. Statistika odpovídá popisu u Obr. 18.

7.3.4 Vliv kadmia a benzoátu sodného na obsah proteinů, superoxidového radikálu, fenolů a flavonoidů

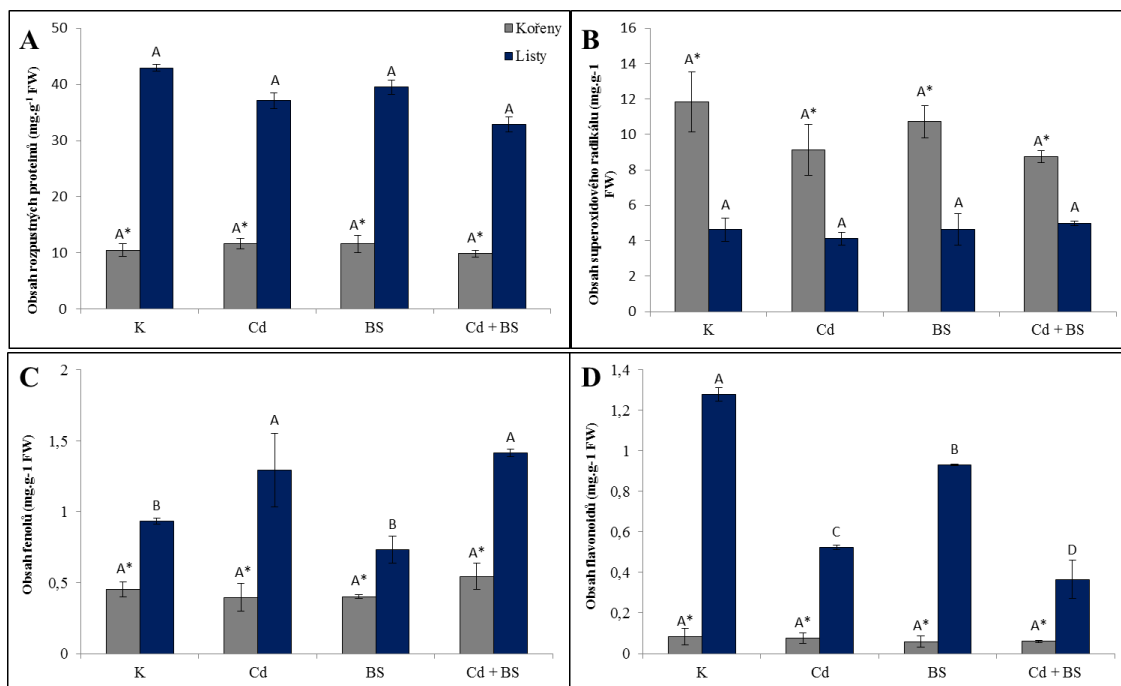
Grafy s celkovým obsahem proteinů, superoxidového radikálu, fenolů a flavonoidů v kořenech a v nadzemních částech jsou zobrazeny na Obr. 20A - D. Přítomnost Cd vede u rostlin mimojiné k velkým změnám v modifikaci proteinů. Jedná se především o nárůst oxidovaných forem, které jsou přednostními substráty pro endoproteázy, enzymy zajišťující proteolytickou degradaci (Romero-Puertas et al. 2002b). Z tohoto hlediska lze předpokládat, že toxicita Cd způsobí změny v množství proteinů a povede k jejich celkovému úbytku. Na druhou stranu však přítomnost Cd indukuje také produkci dalších proteinů, souvisejících s ochrannými funkcemi v rostlinném organismu. Jak bylo popsáno například u listů topolu rostoucího v hydroponickém médiu spolu s přídavkem Cd, došlo v těchto listech k úbytku některých proteinů souvisejících s metabolismem uhlíku či majících vliv na oxidativní stres, zatímco hladina proteinů reagujících na abiotický stres se významně zvýšila (Kieffer et al. 2008). Výsledky našich experimentů ukazují, že kořeny obsahovaly významně nižší množství proteinů, jejichž množství se v závislosti na variantě testovaného média neměnilo, v nadzemních částech

byl však zaznamenán úbytek proteinů u varianty s Cd, a u varianty s Cd + BS (Obr. 20A). Tento úbytek však nebyl statisticky signifikantní. Podobné výsledky byly popsány také u lupiny bílé (Costa and Spitz 1997), hrachu setého (Bavi and Kholdebarin 2011) či rýže seté (Hsu and Kao 2004).

Obsah superoxidového radikálu byl v našem experimentu vyšší v kořenech než v nadzemních částech, žádné signifikantní změny v jeho obsahu v závislosti na variantě testovaného média však nebyly zaznamenány (Obr. 20B). Ve většině případů se u rostlin stresovaných Cd setkáváme s nárůstem obsahu superoxidového radikálu, jakožto molekuly hromadící se během oxidativního stresu (Shah et al. 2001; Romero-Puertas et al. 2004; Srivastava et al. 2014). Důvodů pro vysvětlení našich výsledků, které neukázaly významnější změnu v obsahu radikálu, může být více. Obsah superoxidového aniontu u rostlin závisí na různých faktorech, jakými jsou například míra a délka působícího stresu, rostlinný genotyp či například stáří pokusných rostlin (Shah et al. 2001).

Obsah celkových fenolů v závislosti na variantě testovaného média je znázorněn na Obr. 20C. Vyšší množství těchto sekundárních metabolitů se vyskytovalo v nadzemních částech než v kořenech, přičemž jejich obsah se oproti kontrole signifikantně zvýšil u variant s Cd a Cd + BS. Fenoly patří mezi sekundární metabolity reagující různou měrou na biotický i abiotický stres. V přítomnosti těžkých kovů dokáží fenoly působit jako chelátory kovů, případně přímo jako vychytávače ROS (Michalak 2006). Byly popsány případy, kdy došlo k úbytku celkového obsahu fenolů u rostlin stresovaných Cd (Haribabu and Sudha 1970; Sofo et al. 2017), v literatuře však nalezneme také opačné výsledky, popisující situaci, kdy přítomnost kovů nevedla k žádné změně, anebo způsobila pouze mírný nárůst obsahu fenolů (Jiang et al. 2017).

Flavonoidy patří mezi polyfenolické látky, jedná se o sloučeniny schopné vázat volné kovy a vychytávat ROS, čímž se řadí mezi důležité rostlinné antioxidanty. V našem experimentu byl zaznamenán vyšší obsah flavonoidů v nadzemních částech než v kořenech (Obr. 20D). Ve variantách s Cd a Cd + BS došlo k významné redukci v jejich obsahu. Tento výsledek by mohl naznačovat, že u řepky olejky nepatří biosyntéza flavonoidů mezi hlavní antioxidační cestu, pomocí které by se rostliny chránili před toxicitou Cd, a tudíž využívají jiné mechanismy obrany. Podobné výsledky, tedy snížení obsahu flavonoidů po aplikaci Cd, byly zaznamenány také například u rostlin *Brassica juncea* (Kapoor et al. 2016) či *Hordeum sativum* L (Lachman et al. 2005).



Obr. 20: Obsah rozpustných proteinů (A), superoxidového radikálu (B), fenolů (C) a flavonoidů (D) v kořenech a v nadzemních částech řepky olejky (Ladoga) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přidavku Cd, BS či Cd + BS (n = 6). Chybové úsečky představují průměry ± SE (n = 6). Hodnoty ve sloupcích vypočítané zvlášť pro kořeny a pro listy, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0.05$) signifikantně odlišné.

7.3.5 Závěr

Přídavek BS do růstového média neměl negativní vliv na růst a vitalitu rostlin, oproti aplikaci Cd nezpůsobil žádné inhibice v délce kořenů, listové chlorózy, ani redukované množství nadzemní biomasy. Přítomnost Cd vedla u pokusných rostlin ke snížení obsahu chlorofylu a, b a karotenoidů. Dále měl těžký kov negativní vliv na celkové množství proteinů, superoxidového radikálu a flavonoidů. Celkový obsah rozpustných fenolů byl vlivem Cd výrazně zvýšen. Přidáním BS do média nedošlo u žádné pozorované stresové signální látky ke snížení toxického působení Cd. Oproti původnímu předpokladu tak z našich experimentů vyplývá, že BS není vhodnou látkou, která by byla schopná redukovat oxidativní stres vyvolaný přidavkem Cd.

Benzoát sodný měl významný vliv na akumulaci Cd a transport minerálních prvků. Zvolený kultivar vykazoval fytoextrakční potenciál, daný vysokou mírou translokace Cd z kořenů do stonků a TF, který dosahoval hodnoty „1,12“. Po přidání BS do média s Cd došlo k výraznému zvýšení obsahu Cd v kořenech a naopak k poklesu jeho obsahu v nadzemní části. U všech sledovaných minerálních prvků došlo v médiu s BS a Cd + BS ke snížení jejich obsahu v nadzemní části, kdežto jejich příjem kořeny nebyl oproti médiu s Cd ovlivněn.

7.4. Anatomické experimenty a imunofluorescenční značení MTs v kořenech řepky olejky (*B. napus*)

Anatomické experimenty s řepkou olejkou zahrnovaly fluorescenční barvení příčných řezů kořene a imunofluorescenční značení MTs v kořenech. Všechny anatomické metody byly aplikovány na rostliny následujících variant: kontrola, 5 μM Cd, 10 μM BS a 5 μM Cd + 10 μM BS. Kromě řepky olejky byla použita pro srovnání také jednoděložná kukuřice setá (*Zea mays*), která byla pěstována ve stejných podmínkách (složení hydroponického média, doba kultivace, světelný a teplotní režim), jako rostliny řepky olejky. Pouze koncentrace Cd a BS byly u kukuřice odlišné, hydroponické médium obsahovalo 50 μM Cd (5620 μg Cd v $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 100 μM BS (1441 μg BS).

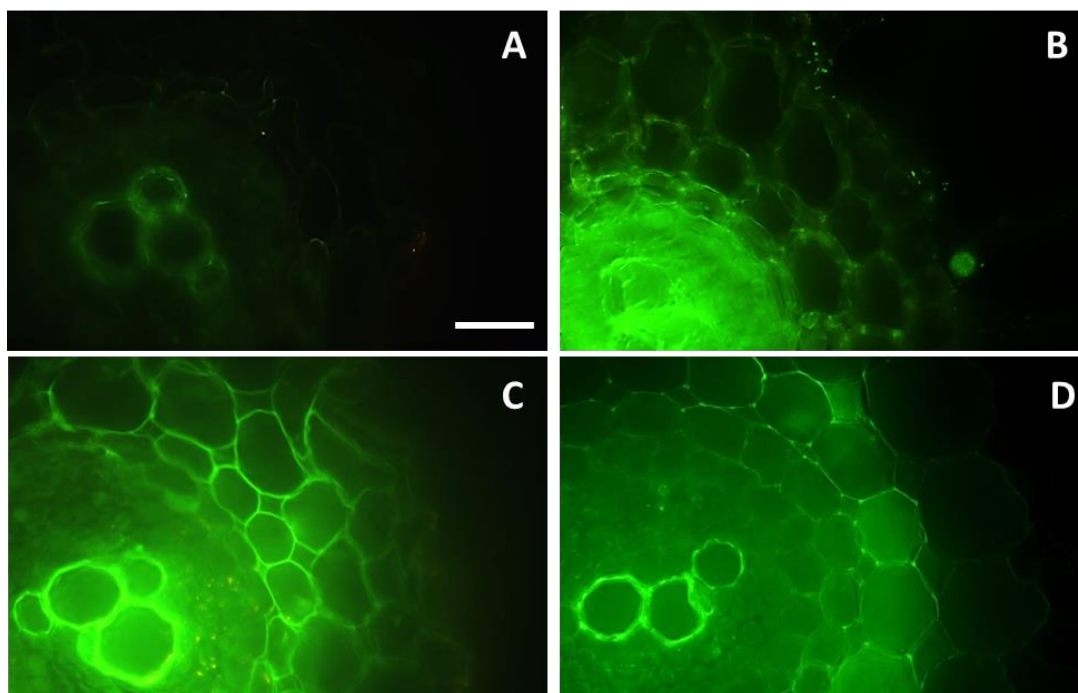
7.4.1 Fluorescenční barvení kořenů řepky olejky

Malé fluorescenční molekuly, vážící se specificky na ionty kovů, umožňují zobrazit míru interakce těchto kovů s buněčnými strukturami, místo akumulace v buňkách či orgánech/pletivech a v neposlední řadě dávají informaci o transportu, funkci a toxicitě daného kovu pro sledovaný pokusný organismus. V současné době existuje velké množství komerčně dostupných fluoroforů specificky se vážících na ionty různých kovů, jakými jsou například Zn^{2+} (Goldsmith and Lippard 2006), Cu^{2+} (Miller et al. 2006), Fe^{2+} , Fe^{3+} (Crichton et al. 2002) či Hg^{2+} (Nolan et al. 2006). Vzhledem k podobnosti iontů Cd^{2+} a Zn^{2+} je komplikované vytvořit fluorofor specifický pouze pro Cd a zároveň minimalizovat vazbu tohoto fluorescenčního barviva na fyziologicky přirozeně se vyskytující ionty Zn^{2+} .

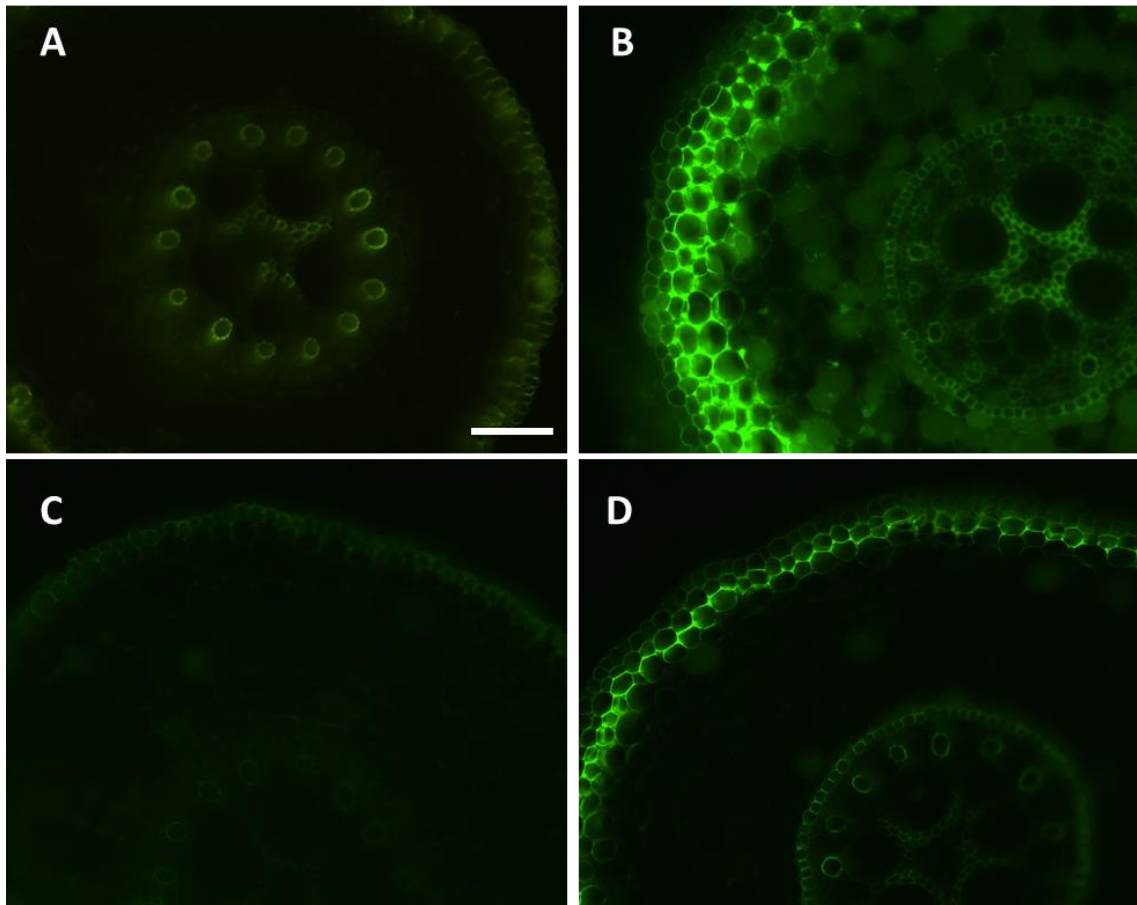
Fluorescenční barva LeadiumTM green je popsána jako specifická barva značící Cd^{2+} a Pb^{2+} v rostlinách (Zhang et al. 2012; Zhao et al. 2013), o vazbě tohoto fluoroforu k iontům Zn^{2+} se výrobci nezmiňují. Z tohoto důvodu jsme barvu použili pro vizualizaci lokalizace Cd v rostlinných kořenových buňkách. Po aplikaci Leadmia k příčným kořenovým řezům pocházejícím ze středních částí kořenů je patrná zelená fluorescence, která značí vazbu Leadmia k iontům kovu, a která se vyskytuje nejen u variant s přidaným Cd (Obr. 21B, D), ale v menší míře také u kontroly a u varianty s BS (Obr. 21A, C). Experiment byl opakován čtyřikrát, vždy se stejným, pozitivním signálem v kontrole. Může se jednat o nespecifickou vazbu na jiný iont, například na výše zmíněný Zn^{2+} . Výsledky použití Leadmia, jakožto fluoroforu značícího Cd, se v literatuře liší. Například autoři Li et al (2012a) či Lu et al. (2008) dokumentují přítomnost navázaného fluoroforu pouze v přítomnosti Cd, naopak z výsledků od autorů Zhao et al. (2013)

je vidět, že zelený signál se vyskytuje v menší míře i u kontroly, což však autoři nijak nekomentují. Hu et al. (2012) pro změnu kontrolní variantu vůbec neukazuje. Podle nejnovější studie, která se snažila spektrofluorometricky určit selektivitu Leadmia pro různé ionty kovů vyplývá, že Leadmium green se v *in vitro* podmínkách váže k iontům Zn^{2+} s vyšší afinitou, než k iontům Cd^{2+} , nicméně maximální fluorescence je v případě Cd téměř dvakrát vyšší, než v případě vazby k Zn. Autoři dále uvádějí, že Leadmium green můžeme považovat za fyziologických podmínek v živých buňkách za specifický fluorofor pro detekci iontů Cd^{2+} , a že jeho vazba k Zn^{2+} je minimální (Malaiyandi et al. 2016).

Pokud bychom chtěli stanovit, které buněčné struktury obsahují ionty Cd^{2+} , bylo by to v případě řepky obtížné vzhledem k pozitivnímu signálu u kontrolní varianty (Obr. 21A) a u varianty s BS (Obr. 21C). Stejná série experimentů však byla nezávisle prováděna také u kukuřice seté (*Zea mays*). Zde je vidět, že ačkoliv se zelený signál opět vyskytuje u kontroly (Obr. 22A) a varianty s BS (Obr. 22C), varianta s přidaným Cd (Obr. 22B) a Cd + BS (Obr. 22D) svítí výrazně intenzivněji. Signál se vyskytuje především v rhizodermálních buňkách, a oproti rostlinám rostoucím v médiu s Cd + BS je u varianty s Cd fluorescence silnější a zasahuje více vrstev buněk (Obr. 22B). Zaznamenat lze dále slabší zelené odezvy ve vrstvě kortexu a také v endodermis.



Obr. 21: Detekce Cd ve středních částech kořenů řepky olejky (*Ladoga*) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd a BS. A – kontrola; B – médium s Cd; C – médium s BS; D – médium s Cd + BS. Měřítka představuje 100 μ m.



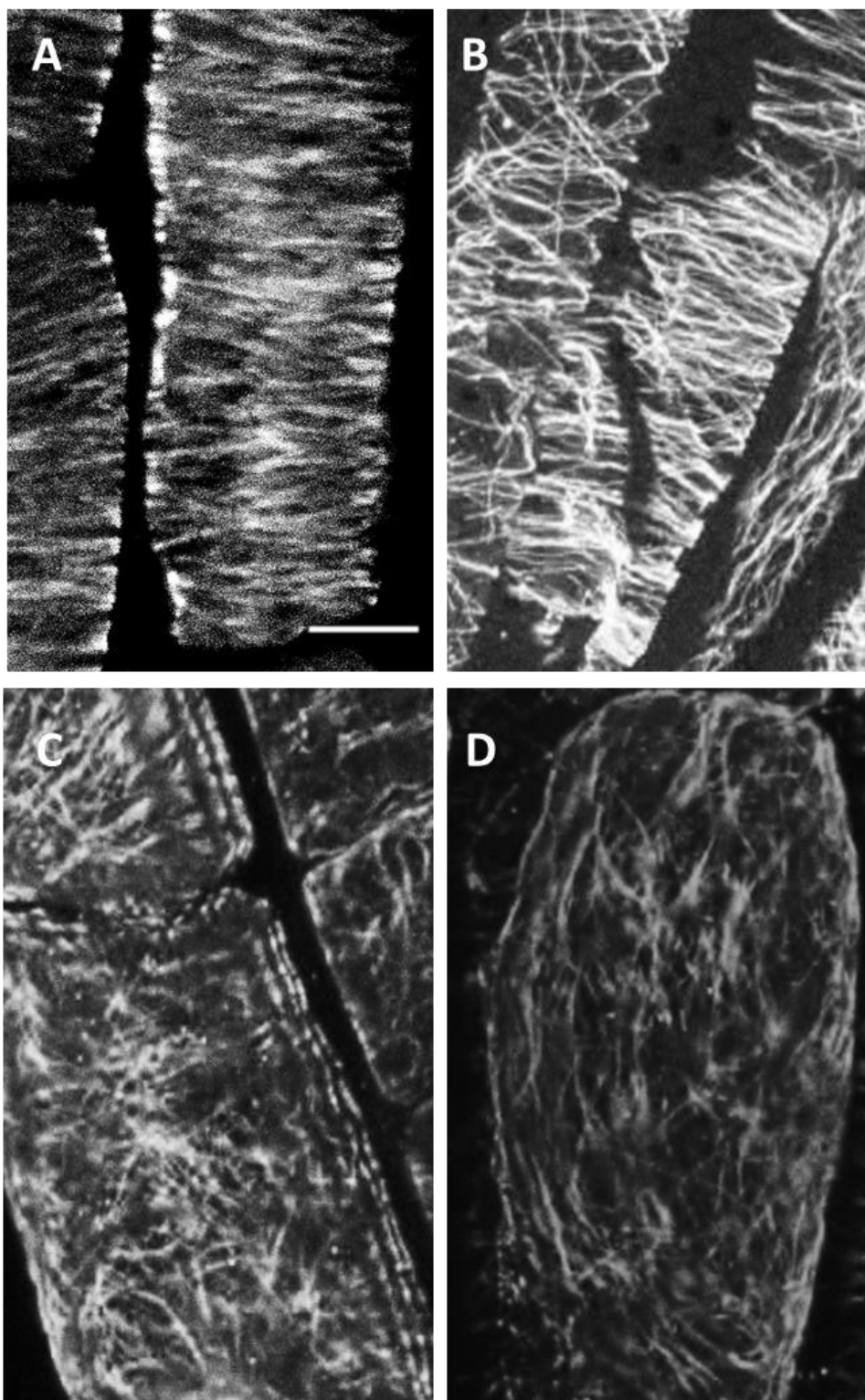
Obr. 22: Detekce Cd ve středních částech kořenů kukuřice seté (*Zea mays*) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd a BS. A – kontrola; B – médium s Cd; C – médium s BS; D – médium s Cd + BS. Měřítko představuje 100 μm .

7.4.2 Imunofluorescenční detekce MTs v kořenech řepky olejky

Mikrotubulární cytoskelet je velmi dynamická struktura, která se podílí například na správném buněčném dělení a růstu, zajišťuje pohyb organel, kompartmentalizaci a intracelulární transport (Ehrhardt and Shaw 2006). Mikrotubuly reagují jako jedna z prvních buněčných komponent na vnější stres. Účinek Cd na MTs struktury je značný, vede například k narušení mitózy spolu se vznikem dezorganizovaného mitotického vřeténka (Siddiqui et al. 2009), způsobuje depolymeraci kortikálních MTs a narušuje jejich orientaci (Horiunova et al. 2016).

V rámci našich experimentů jsme nejprve testovali efekt krátkodobých dávek Cd na rozložení MTs v kortikální vrstvě kořenových buněk. Buňky kontrolní varianty měly správné transverzální uspořádání MTs, nebyla patrná žádná depolymerující vlákna (Obr. 23A). Narušení MTs se však objevilo již při nejnižší dávce Cd (50 μM , obr. B), kdy došlo k narušení

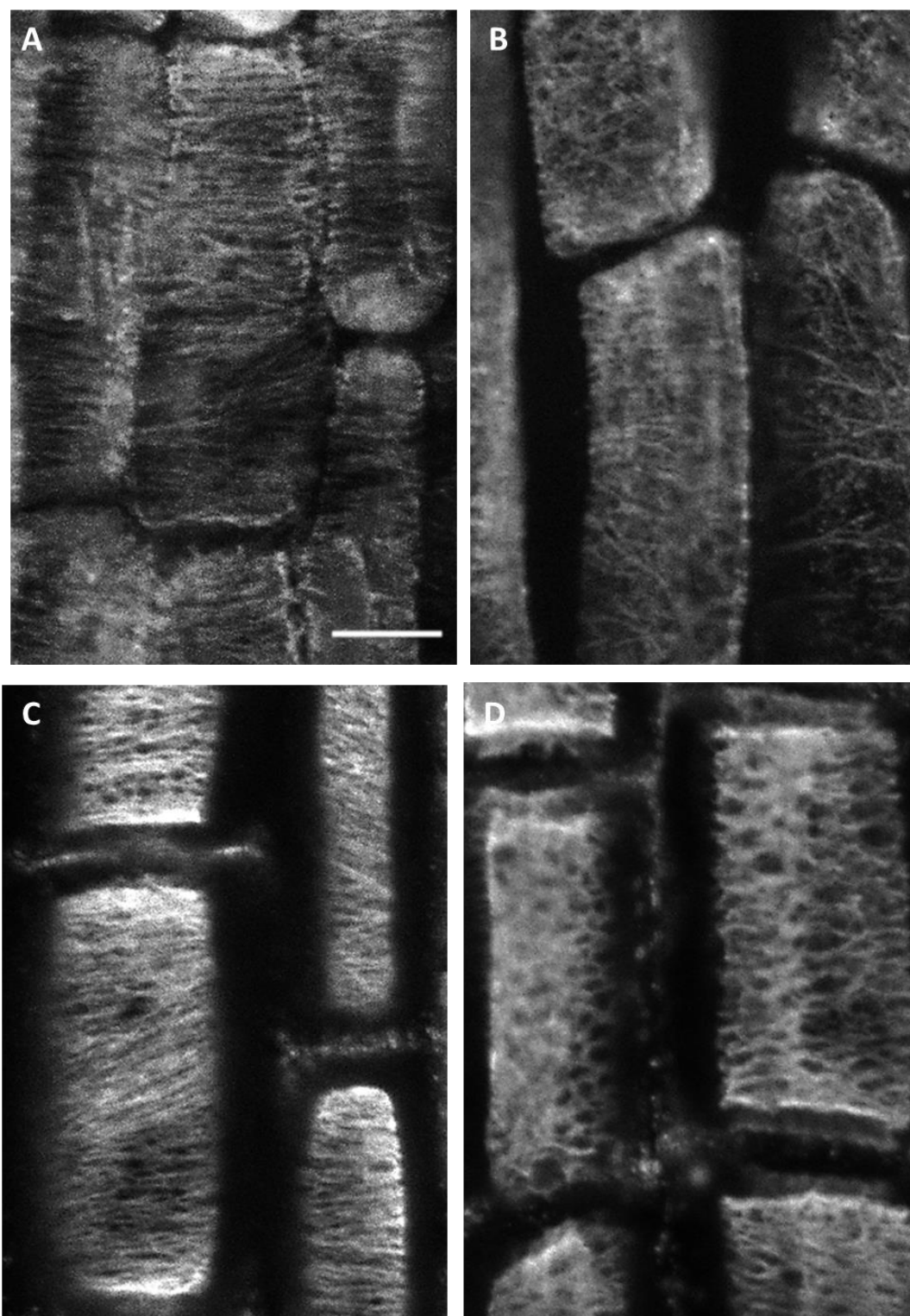
transverzální orientace, které se vyskytovalo i u ostatních dávek těžkého kovu. U dvou nejvyšších koncentrací Cd (100, 150 μM) je patrná nejen změna orientace MTs, ale také značná depolymerace vláken (Obr. 23C, D). Reaktivní formy kyslíku, které vznikají v nadměrném množství po aplikaci Cd, vedou k narušení redoxního stavu v buňkách. Tato nerovnováha má dopad na celý MTs systém, vyznačující se právě depolymerací MTs a narušením orientace vláken (Livanos et al. 2014), jak tomu bylo také v našem experimentu. Z literatury je známo, že MTs cytoskelet je velmi citlivý již na malé koncentrace Cd, jak bylo popsáno například u kořenů hrachu. K narušení vláken zde došlo již po aplikaci Cd v koncentraci 0,25 μM CdCl₂ (Fusconi et al. 2007), což dělá z MTs cytoskeletu potenciálně citlivý marker pro detekci těžkých kovů v prostředí. Autoři také sledovali vlastní životaschopnost buněk a zjistili, že ačkoliv vede přídavek Cd k narušení cytoskeletu u všech testovaných dávek těžkého kovu, viabilita buněk klesala až při nejvyšších dávkách Cd (25, 250 μM Cd). Tento výsledek může naznačovat, že změna orientace MTs vláken není pro buňky tolik fatální, jako jejich následná depolymerace, která nastává v pozdějších fázích stresu.



Obr. 23: Vliv Cd na uspořádání MTs v kořenech řepky olejky (Ladoga) rostoucí 48 hodin hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd. A – kontrola; B – médium s 50 μM Cd; C – médium se 100 μM Cd; D – médium se 150 μM Cd. Měřítka představuje 10 μm .

Druhá sada testování zahrnovala kořeny ošetřené stejným způsobem, jako v experimentu s BS (kapitola 7.3), jednalo se tedy o varianty kontrolní, variantu s Cd, BS a Cd + BS. Přestože předešlé pokusy neprokázaly pozitivní vliv BS na vznik antioxidantů a redukci toxicity Cd, rozhodli jsme se testovat jeho případný vliv na buněčné úrovni a sledovat chování MTs aparátu. Jak je vidět na Obr. 24A, kontrolní varianta obsahovala kořenové kortikální buňky s transversálně uspořádanými MTs. Shodné výsledky jsou patrné také u varianty s BS (Obr. 24C), kde se zdá, že svazky jsou vůči kontrole sice tenčí, ale ve větším a hustším počtu svazků. Toto pozorování opět dokládá, že aplikace samotného BS neměla negativní vliv na rostlinný růst. V případě působení Cd jsou pozorovatelné depolymerované MTs vlákna spolu s jejich narušenou orientací (Obr. 24B). Vliv BS na MTs stresované Cd je zobrazený na Obr. 24D. Vidíme zde částečně depolymerované MTs, jejichž orientace však není narušena tolik, jako u varianty se samotným Cd. Z těchto výsledků se můžeme domnívat, že BS má potenciálně pozitivní vliv na MTs procházející stresem vyvolaným Cd, a narušení vláken je díky němu menší.

U obou sad testovaných rostlin byly pozorovány klasické symptomy toxicity způsobené vyšší dávkou Cd, jako jsou listové chlorózy, redukovaná nadzemní biomasa a délka kořenů. Na prodloužení a růstu kořenů se velkou měrou podílí právě MTs cytoskelet. Redukce délky kořenů u rostlin stresovaných Cd je tak způsobena především depolymerací MTs vláken a tvorbou chromosomálních aberací, které vedou k omezení mitotické aktivity meristematických buněk kořene (Seth et al. 2008).



Obr. 24: Vliv Cd a BS na uspořádání MTs v kořenech řepky olejky (Ladoga) rostoucí 14 dní hydroponicky v médiu spolu či bez přídavku Cd a BS. A – kontrola; B – médium s Cd; C – médium s BS; D – médium s Cd + BS. Měřítko představuje 10 μm .

7.4.3 Závěr

Detekce Cd v kořenech pokusných rostlin byla prováděna pomocí fluorescenčního barviva Leadmium™ green. V případě barvení kořenů řepky olejky nepřineslo dané barvivo předpokládaný výsledek, pozitivní signál byl zachycen jak u kontrolních variant, tak u varianty s přidaným BS. U kukuřice byl slabý signál taktéž zaznamenán u kontroly a varianty s BS, rozdíl intenzity barviva u variant s Cd a Cd + BS je však znát více. Fluorescenční signál se vyskytoval především v rhizodermis, endodermis a částečně v kortexu.

Výsledky imunofluorescenčního značení MT v kořenech řepky olejky potvrdily předpoklad, že krátkodobá přítomnost Cd vede k okamžité depolarizaci, narušení orientace a rozpadu MTs, a to již při nejnižší testované dávce těžkého kovu. Stejný efekt byl pozorován také po týdenní kultivaci. Spolu s kontrolní variantou a variantou s Cd byl vizualizován MTs cytoskelet také u kořenů rostoucích v médiu s BS a v médiu s Cd + BS. Aplikace samotného BS neměla negativní vliv na stavbu MTs, vlákna byla transversálně orientovaná, spojená do hustých svazků. Pozitivní vliv BS na stavbu MTs byl pozorován u varianty Cd + BS, kde sice docházelo k depolymeracím vláken, vlastní orientace však nebyla narušena tolik, jako v případě působení samotného Cd. Oproti výsledkům získaným během měření stresových faktorů se tak zdá, že BS by mohl účinně sloužit k ochraně MTs před toxicitou vyvolanou Cd a před oxidativním stresem, který má negativní dopad na stavbu a orientaci vláken.

8. Závěry

Kadmium vedlo ve všech případech k redukci růstu pokusných rostlin, sníženo bylo jak množství celkové biomasy, tak délka kořenů. Na listech se objevovaly různě rozsáhlé listové chlorózy, které souvisely se signifikantním úbytkem obsahu chlorofylu a karotenoidů. Efektivita primárních fotochemických reakcí a výtěžek fotochemické reakce Fv/m však nebyla oproti výše zmíněným parametrům vlivem Cd nijak ovlivněna.

Kyselina salicylová byla u všech testovaných kultivarů ve větší míře zastoupena v kořenech, v porovnání s nadzemními částmi rostlin, a její obsah se významně nelišil u jednotlivých variant s různými koncentracemi Cd v substrátu.

Žádné signifikantně významné změny nebyly potvrzeny ani v obsahu aminokyselin a reakci na různé dávky těžkého kovu. Pouze u prolinu byla zaznamenána vyšší závislost mezi koncentrací Cd a obsahem prolinu u testovaných rostlin, a to především v nadzemních částech.

Mezi další biochemické stresové markery ukazující na toxicitu Cd patřily hodnoty obsahu celkových rozpustných proteinů, superoxidového radikálu, fenolů a flavonoidů. V reakci na přídavek Cd však došlo k redukci vlatního obsahu pouze u flavonoidů, ostatní testované sloučeniny nevykazovaly žádné signifikantní změny.

Při hodnocení morfologie a anatomie kořenů rostoucích v médiu s přídavkem Cd bylo zaznamenáno signifikantně vyšší množství kořenových špiček, které byly rovněž oproti kontrolním kořenům v průměru silnější. Kořeny stresované Cd byly více rozvětvené a vyskytovaly se u nich ve větší míře kořeny prvního a druhého řádu. Na příčných řezech kořenových špiček rostoucích v médiu s Cd byly patrné zvětšené buňky pericyklu s nepravidelným buněčným dělením. Ve středních částech kořenů vedlo Cd k vyššímu ukládání ligninu/suberinu, představované silnějším autofluorescenčním signálem, a také k ukládání autofluorescenčního materiálu uvnitř intercelulár ve vrstvě kortexu.

Snaha o vizualizaci lokalizace Cd v kořenech probíhala pomocí fluorescenčního barviva LeadiumTM green. Tento fluorofor se však ukázal jako nevhodný pro použití u kořenů řepky olejky, poměrně silný fluorescenční signál se totiž objevoval rovněž u kontrolní varianty. V případě barvení kořenů u kukuřice seté byl získán lepší obrazový materiál, fluorescenční signál se nicméně také objevoval v menší míře u kontrolní varianty.

Vyhodnocení fytoextrakčního potenciálu u různých kultivarů řepky olejky naznačuje, že jediným kultivarem, u něhož byl zaznamenán vyšší TF, byl kultivar Ladoga. Ostatní testované kultivary přijímaly a uchovávaly vyšší množství Cd převážně ve svých kořenech.

Přítomnost Cd v substrátu či růstovém médiu úzce souvisela s příjmem minerálních prvků. Rozdíl v obsahu K a Ca byl patrný především u kultivaru Ladoga, a to v kořenech rostoucích v médiu s Cd, kde došlo k redukci obsahu těchto minerálních prvků. Další redukce K a Ca byla pozorována v listech rostlin rostoucích v médiu obsahujícím BS a Cd + BS. U

stejného kultivaru došlo po aplikaci Cd ke snížení obsahu Mg v kořenech a ke snížení obsahu Zn v kořenech i v nadzemních částech. U ostatních kultivarů pěstovaných v hydroponickém médiu (Cadel, Viking, Navajo) s vyšším obsahem Zn byl pozorován zvýšený obsah K a naopak snížený obsah Ca v nadzemních částech testovaných rostlin. U dalších testovaných kultivarů rostoucích v substrátu nebyly pozorovány kromě mírného snížení obsahu Ca v nadzemních částech u kultivaru CZL a ZhongZhuang9 významnější změny v příjmu minerálních prvků.

Testován byl také vliv Zn a BS na chování rostlin vystavených zvýšeným dávkám Cd. Jak Zn, tak BS, měl sloužit jako ochrana před zmíněným stresem. V případě Zn se však tato role nepotvrdila. Benzoát sodný vedl ke značné redukci translokace Cd do nadzemní části a také k omezení v transportu většiny minerálních prvků, nikoliv však v jejich příjmu kořeny. Pozitivní vliv byl u BS zaznamenán pouze v případě vizualizace změn v MTs cytoskeletu, kde se zdá, že depolymerace a orientace tubulinových vláken není tak výrazně ovlivněna jako u buněk kořenů rostoucích v médiu s Cd.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abu-Muriefah SS (2008) Growth parameters and elemental status of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings in response to cadmium accumulation. *Int J Agric Biol* 10:261–266
- Ali B, Qian P, Jin R, et al (2014) Physiological and ultra-structural changes in *Brassica napus* seedlings induced by cadmium stress. *Biol Plant* 58:131–138. doi: 10.1007/s10535-013-0358-5
- Ali B, Wang B, Ali S, et al (2013) 5-Aminolevulinic acid ameliorates the growth, photosynthetic gas exchange capacity, and ultrastructural changes under cadmium stress in *Brassica napus* L. *J Plant Growth Regul* 32:604–614. doi: 10.1007/s00344-013-9328-6
- Ali E, Maodzeka A, Hussain N, et al (2015) The alleviation of cadmium toxicity in oilseed rape (*Brassica napus*) by the application of salicylic acid. *Plant Growth Regul* 75:641–655. doi: 10.1007/s10725-014-9966-0
- Alkorta I, Epelde L, Mijangos I, et al (2006) Bioluminescent bacterial biosensors for the assessment of metal toxicity and bioavailability in soils. *Rev Environ Health* 21:139–152. doi: 10.1515/REVEH.2006.21.2.139
- Antosiewicz DM, Hennig J (2004) Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 129:237–245. doi: 10.1016/j.envpol.2003.10.025
- 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
- Aravind P, Prasad MNV, Malec P, et al (2009) Zinc protects *Ceratophyllum demersum* L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen species induced by cadmium. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS* 23:50–60. doi: 10.1016/j.jtemb.2008.10.002
- Armstrong J, Armstrong W (2001) Rice and Phragmites: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *Am J Bot* 88:1359–1370. doi: www.jstor.org/stable/3558443
- Armstrong J, Armstrong W (2005) Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence. *Ann Bot* 96:625–638. doi: 10.1093/aob/mci215
- Asgher M, Khan MIR, Anjum NA, Khan NA (2015) Minimising toxicity of cadmium in plants: role of plant growth regulators. *Protoplasma* 252:399–413. doi: 10.1007/s00709-014-0710-4
- Avelar Ferreira PA, Lopes G, Bomfeti CA, et al (2013) Leguminous plants nodulated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate. *World J Microbiol Biotechnol* 29:2055–2066. doi: 10.1007/s11274-013-1369-2
- 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
- Balen B, Tkalec M, Sikić S, et al (2011) Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology* 20:815–826. doi: 10.1007/s10646-011-0633-1
- Barker AV, Pilbeam DJ (2015) *Handbook of Plant Nutrition*, Second Edition. CRC Press
- 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
- Baumann HA, Morrison L, Stengel DB (2009) Metal accumulation and toxicity measured by PAM-chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1063–1075. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.10.010
- Bavi K, Kholdebarin B (2011) Effect of cadmium on growth, protein content and peroxidase activity in pea plants. *Pak J Bot* 43:1467–1470
- Ben Ghnaya A, Charles G, Hourmant A, et al (2009) Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *C R Biol* 332:363–370. doi: 10.1016/j.crvi.2008.12.001
- Benyas E, Nassab ADM, Oustan S, others (2013) Effects of cadmium on some morphological and physiological traits of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Int J Biosci IJB* 3:17–26
- Bhaduri AM, Fulekar MH (2012) Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Rev Environ Sci Biotechnol* 11:55–69. doi: 10.1007/s11157-011-9251-x
- Bhuiyan MSU, Min SR, Jeong WJ, et al (2011) Overexpression of a yeast cadmium factor 1 (YCF1) enhances heavy metal tolerance and accumulation in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC* 105:85–91. doi: 10.1007/s11240-010-9845-y
- Bianucci E, Sobrino-Plata J, Carpena-Ruiz RO, et al (2012) Contribution of phytochelatin to cadmium tolerance in peanut plants. *Metallomics* 4:1119–1124. doi: 10.1039/C2MT20146A
- Boyd RS, Jaffré T (2009) Elemental concentrations of eleven new caledonian plant species from serpentine soils: Elemental correlations and leaf-age effects. *Northeast Nat* 16:93–110
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Broadhurst CL, Chaney RL (2016) Growth and metal accumulation of an *Alyssum murale* nickel hyperaccumulator ecotype co-cropped with *Alyssum montanum* and perennial ryegrass in serpentine soil. *Front Plant Sci* 7:. doi: 10.3389/fpls.2016.00451
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 168:521–530. doi: 10.1002/jpln.200420485
- 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

- Canakci S, Dursun B (2013) Amelioration of Cd toxicity by pretreatment of salicylic acid in *Cicer arietinum* L. seedlings. *J Environ Biol* 34:1089–1094
- Carrier P, Baryla A, Havaux M (2003) Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta* 216:939–950. doi: 10.1007/s00425-002-0947-6
- Carroll MJ, Slaughter LH, Krouse JM (1994) Turgor potential and osmotic constituents of kentucky bluegrass leaves supplied with four levels of potassium. *Agron J* 86:1079–1083. doi: 10.2134/agronj1994.00021962008600060028x
- Cerná M, Speváčková V, Benes B, et al (2001) Reference values for lead and cadmium in blood of Czech population. *Int J Occup Med Environ Health* 14:189–192
- Chaney R (1983) Plant uptake of inorganic waste constituents. In: *Land treatment of Hazardous Wastes*. Noyes Data Corporation, Park Ridge, pp 50–76
- Cherif J, Mediouni C, Ben Ammar W, Jemal F (2011) Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J Environ Sci China* 23:837–844
- Chibuike GU, Obiora SC (2014) Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Appl Environ Soil Sci* 2014:e752708. doi: 10.1155/2014/752708
- Chien H-F, Wang J-W, Lin CC, Kao CH (2001) Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* 33:205–213. doi: 10.1023/A:1017539616793
- Choppala G, Saifullah, Bolan N, et al (2014) Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. *Crit Rev Plant Sci* 33:374–391. doi: 10.1080/07352689.2014.903747
- Clemens S (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 163:319–332. doi: 10.1016/j.jplph.2005.11.010
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159–182. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
- Cojocaru P, Gusiatin ZM, Cretescu I (2016) Phytoextraction of Cd and Zn as single or mixed pollutants from soil by rape (*Brassica napus*). *Environ Sci Pollut Res* 23:10693–10701. doi: 10.1007/s11356-016-6176-5
- Collings DA (2008) Crossed-Wires: Interactions and cross-talk between the microtubule and microfilament networks in plants. In: Nick P (ed) *Plant microtubules*. Springer Berlin Heidelberg, pp 47–79
- Costa G, Spitz E (1997) Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci* 128:131–140. doi: 10.1016/S0168-9452(97)00148-9
- Courbot M, Willems G, Motte P, et al (2007) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol* 144:1052–1065. doi: 10.1104/pp.106.095133

- Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ (2002) Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 91:9–18
- Davis-Carter JG, Parker MB, Gaines TP (1991) Interaction of soil zinc, calcium, and pH with zinc toxicity in peanuts. In: Wright RJ, Baligar VC, Murrmann RP (eds) *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Springer Netherlands, pp 339–347
- Dezhban A, Shirvany A, Attarod P, et al (2015) Cadmium and lead effects on chlorophyll fluorescence, chlorophyll pigments and proline of *Robinia pseudoacacia*. *J For Res* 26:323–329. doi: 10.1007/s11676-015-0045-9
- Dhiman SS, Selvaraj C, Li J, et al (2016) Phytoremediation of metal-contaminated soils by the hyperaccumulator canola (*Brassica napus* L.) and the use of its biomass for ethanol production. *Fuel* 183:107–114. doi: 10.1016/j.fuel.2016.06.025
- Di Toppi LS, Gabbriellini R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41:105–130
- Đurčeková K, Huttová J, Mistrík I, et al (2007) Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. *Plant Soil* 290:61–68. doi: 10.1007/s11104-006-9111-6
- Ehrhardt DW, Shaw SL (2006) Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annu Rev Plant Biol* 57:859–875. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105329
- Ehsan S, Ali S, Noureen S, et al (2014) Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 106:164–172. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.007
- Elstner EF, Heupel A (1976) Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem* 70:616–620
- Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdorran F, Xie Y (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci World J* 2015:e756120. doi: 10.1155/2015/756120
- Ent A van der, Baker AJM, Reeves RD, et al (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362:319–334. doi: 10.1007/s11104-012-1287-3
- Eren E, Argüello JM (2004) Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(1B)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol* 136:3712–3723. doi: 10.1104/pp.104.046292
- Escarré J, Lefèbvre C, Gruber W, et al (2000) Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytol* 145:429–437. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00599.x
- Eticha D, Stass A, Horst WJ (2005) Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant Cell Environ* 28:1410–1420. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01375.x
- Fageria NK (2008) *The Use of Nutrients in Crop Plants*. CRC Press

- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, et al (2011) A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* 476:472–475. doi: 10.1038/nature10250
- 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
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* 121:151–159. doi: 10.1016/S0168-9452(96)04528-1
- Garbisu C, Hernández-Allica J, Barrutia O, et al (2002) Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. *Rev Environ Health* 17:173–188
- Goldsmith CR, Lippard SJ (2006) 6-Methylpyridyl for pyridyl substitution tunes the properties of fluorescent zinc sensors of the zinpyr family. *Inorg Chem* 45:555–561. doi: 10.1021/ic051113s
- Gomes MP, Marques TCLL de S e M, Nogueira M de OG, et al (2011) Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Sci Agric* 68:566–573. doi: 10.1590/S0103-90162011000500009
- Gonçalves JF de C, Junior S, Dos UM, Silva EA da (2008) Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll concentrations in leaves of tropical wood species from Amazonian forest. *Hoehnea* 35:185–188. doi: 10.1590/S2236-89062008000200002
- Grispen VMJ, Nelissen HJM, Verkleij JAC (2006) Phytoextraction with *Brassica napus* L.: A tool for sustainable management of heavy metal contaminated soils. *Environ Pollut* 144:77–83. doi: 10.1016/j.envpol.2006.01.007
- Guan C, Ji J, Jia C, et al (2015) A GSHS-like gene from *Lycium chinense* maybe regulated by cadmium-induced endogenous salicylic acid and overexpression of this gene enhances tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 34:871–884. doi: 10.1007/s00299-015-1750-8
- Guo Q, Meng L, Mao P-C, et al (2013) Role of exogenous salicylic acid in alleviating cadmium-induced toxicity in Kentucky bluegrass. *Biochem Syst Ecol* 50:269–276. doi: 10.1016/j.bse.2013.05.002
- Gzyl J, Chmielowska-Bąk J, Przymusiński R, Gwóźdź EA (2015) Cadmium affects microtubule organization and post-translational modifications of tubulin in seedlings of soybean (*Glycine max* L.). *Front Plant Sci* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00937
- 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
- Haribabu TEHA, Sudha PN (1970) Effect of heavy metals copper and cadmium exposure on the antioxidant properties of the plant *Cleome gynandra*. *Int J Plant Anim Environ Sci* 2011:
- He S, He Z, Yang X, et al (2015) Chapter four - Soil biogeochemistry, plant physiology, and phytoremediation of cadmium-contaminated soils. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 135–225

- He J, Ma C, Ma Y, et al (2013) Cadmium tolerance in six poplar species. *Environ Sci Pollut Res Int* 20:163–174. doi: 10.1007/s11356-012-1008-8
- Hermans DC, Chen DJ, Verbruggen DN (2013) Magnesium in plants. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (eds) *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer New York, pp 1269–1276
- Hernández-Allica J, Becerril JM, Garbisu C (2008) Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environ Pollut* 152:32–40. doi: 10.1016/j.envpol.2007.06.002
- Horiunova II, Krasylenko YA, Yemets AI, Blume YB (2016) Involvement of plant cytoskeleton in cellular mechanisms of metal toxicity. *Cytol Genet* 50:47–59. doi: 10.3103/S0095452716010060
- Hsu YT, Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul* 42:227–238. doi: 10.1023/B:GROW.0000026514.98385.5c
- Hu P-J, Gan Y-Y, Tang Y-T, et al (2012) Cellular tolerance, accumulation and distribution of cadmium in leaves of hyperaccumulator *Picris divaricata*. *Pedosphere* 22:497–507. doi: 10.1016/S1002-0160(12)60034-4
- Huang Y, Miyauchi K, Inoue C, Endo G (2016) Development of suitable hydroponics system for phytoremediation of arsenic-contaminated water using an arsenic hyperaccumulator plant *Pteris vittata*. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:614–618. doi: 10.1080/09168451.2015.1107461
- Jacobs A, Drouet T, Sterckeman T, Noret N (2017) Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using *Noccaea caerulea*: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous “Ganges” in field trials. *Environ Sci Pollut Res* 24:8176–8188. doi: 10.1007/s11356-017-8504-9
- Jhanji S, Setia RC, Kaur N, et al (2012) Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of *Brassica napus* L. *J Environ Biol* 33:1027–1032
- Jiang S, Weng B, Liu T, et al (2017) Response of phenolic metabolism to cadmium and phenanthrene and its influence on pollutant translocations in the mangrove plant *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco (Ac). *Ecotoxicol Environ Saf* 141:290–297. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.041
- Jiang XJ, Luo YM, Liu Q, et al (2004) Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. *Environ Geochem Health* 26:319–324. doi: 10.1023/B:EGAH.0000039596.15586.b3
- Jones RJ, Kildea T, Hoegh-guldberg O (1999) PAM chlorophyll fluorometry: a new *in situ* technique for stress assessment in scleractinian corals, used to examine the effects of cyanide from cyanide fishing. *Mar Pollut Bull* 38:864–874. doi: 10.1016/S0025-326X(98)90160-6
- Kabata-Pendias A (2000) *Trace elements in soils and plants*, Third Edition. CRC Press
- Kapoor D, Kaur S, Bhardwaj R (2014) Physiological and biochemical changes in *Brassica juncea* plants under Cd-induced stress. *Biomed Res Int* 726070. doi: 10.1155/2014/726070

- Kapoor D, Rattan A, Bhardwaj R, Kaur S (2016) Photosynthetic efficiency, ion analysis and carbohydrate metabolism in *Brassica juncea* Plants under cadmium stress. *J Pharmacogn Phytochem* 5:279–286
- Kawano T, Bouteau F (2013) Crosstalk between intracellular and extracellular salicylic acid signaling events leading to long-distance spread of signals. *Plant Cell Rep* 32:1125–1138. doi: 10.1007/s00299-013-1451-0
- Khan MN, Siddiqui MH, Mohammad F, et al (2010) Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. *Acta Physiol Plant* 32:121. doi: 10.1007/s11738-009-0387-z
- Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, et al (2008) Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 8:2514–2530. doi: 10.1002/pmic.200701110
- Kleckerova A, Sobrova P, Krystofova O, et al (2011) Cadmium(ii) and zinc(ii) ions effects on maize plants revealed by spectroscopy and electrochemistry. *Int J Electrochem Sci* 2011:6011–6031. doi: <http://electrochemsci.org/papers/vol6/6126011.pdf>
- Korenkov V, King B, Hirschi K, Wagner GJ (2009) Root-selective expression of AtCAX4 and AtCAX2 results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol J* 7:219–226. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00390.x
- Krämer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:517–534. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112156
- 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
- Krtková J, Benáková M, Schwarzerová K (2016) Multifunctional microtubule-associated proteins in plants. *Front Plant Sci* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00474
- Krupa Z, Oquist G, Huner N (1992) The influence of cadmium on primary photosystem II photochemistry in bean as revealed by chlorophyll a fluorescence—a preliminary study. *Acta Physiol Plant* 2. doi: <http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/11738>
- Krzyszowska M (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant* 33:35–51. doi: 10.1007/s11738-010-0581-z
- Küpper H, Küpper F, Spiller M (1998) *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynth Res* 58:123–133. doi: 10.1023/A:1006132608181
- Kushwaha A, Rani R, Kumar S, Gautam A (2015) Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: Implications for phytoremediation. *Environ Rev* 24:39–51. doi: 10.1139/er-2015-0010
- Lachman J, Dudjak J, Miholova D, et al (2005) Effect of cadmium on flavonoid content in young barley (*Hordeum sativum* L.) plants. *Plant Soil Environ* 51:513–516. doi: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2006000172>

- Lang M, Hao M, Fan Q, et al (2011) Functional characterization of BjCET3 and BjCET4, two new cation-efflux transporters from *Brassica juncea* L. J Exp Bot 62:4467–4480. doi: 10.1093/jxb/err137
- Lasat MM, Pence NS, Garvin DF, et al (2000) Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. J Exp Bot 51:71–79
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. Development 121:3303–3310. doi: <http://dev.biologists.org/content/121/10/3303.long>
- Leitenmaier B, Küpper H (2013) Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. Front Plant Sci 4:374. doi: 10.3389/fpls.2013.00374
- Li L, Liu X, Peijnenburg WJGM, et al (2012a) Pathways of cadmium fluxes in the root of the halophyte *Suaeda salsa*. Ecotoxicol Environ Saf 75:1–7. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.09.007
- 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 X, Yang Y, Zhang J, et al (2012b) Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum aestivum* L. Ecotoxicol Environ Saf 86:198–203. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.021
- Li X, Zhang X, Li B, et al (2017) Cadmium phytoremediation potential of turnip compared with three common high Cd-accumulating plants. Environ Sci Pollut Res 24:21660–21670. doi: 10.1007/s11356-017-9781-z
- Liao M, Xie X (2004) Cadmium release in contaminated soils due to organic acids. Pedosphere 14:223–228. doi: http://pedosphere.issas.ac.cn/trqcn/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20040212&flag=1
- Liu Z, Ding Y, Wang F, et al (2016) Role of salicylic acid in resistance to cadmium stress in plants. Plant Cell Rep 35:719–731. doi: 10.1007/s00299-015-1925-3
- Livanos P, Galatis B, Apostolakis P (2014) The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. Plant Signal Behav 9:e28069
- Lu L, Tian S, Yang X, et al (2008) Enhanced root-to-shoot translocation of cadmium in the hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii*. J Exp Bot 59:3203–3213. doi: 10.1093/jxb/ern174
- Lunáčková L, Šottníková A, Masarovičová E, et al (2003) Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. Biol Plant 47:403–411. doi: 10.1023/B:BIOP.0000023884.54709.09
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. J Exp Bot 62:21–37. doi: 10.1093/jxb/erq281
- Lux A, Vaculík M, Martinka M, et al (2011b) Cadmium induces hypodermal periderm formation in the roots of the monocotyledonous medicinal plant *Merwillia plumbea*. Ann Bot 107:285–292. doi: 10.1093/aob/mcq240

- Lux A, Sottníková A, Opatrná J, Greger M (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiol Plant* 120:537–545. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0275.x
- Ma F, Peterson CA (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Can J Bot* 81:405–421. doi: 10.1139/b03-042
- Maathuis FJM (2013) Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *J Exp Bot* ert326. doi: 10.1093/jxb/ert326
- Malaiyandi LM, Sharthiya H, Dineley KE (2016) Characterization of Leadmium green for fluorescence detection of intracellular cadmium. *FASEB J* 30:824.2-824.2
- Marchiol L, Assolari S, Sacco P, Zerbi G (2004) Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environ Pollut* 132:21–27. doi: 10.1016/j.envpol.2004.04.001
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Gulf Professional Publishing
- Mengel K (2006) Potassium. In: Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, pp 91–120
- 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
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud* 15:523–530. doi: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-5400c91f-4922-4c6a-82fd-9edef2628165>
- Micky B (2016) Could Sodium benzoate enhance broad bean salinity tolerance? Seedling vigor, membrane features, antioxidant enzymes and osmolytes. *J Chem Biol Phys Sci* 6:313–328
- Miller EW, Zeng L, Domaille DW, Chang CJ (2006) Preparation and use of Coppensor-1, a synthetic fluorophore for live-cell copper imaging. *Nat Protoc* 1:824–827. doi: 10.1038/nprot.2006.140
- M-Kalantari K, Oloumi H (2005) Study the effects of CdCl₂ on lipid peroxidation and antioxidant compounds content in *Brassica napus*. *Iran J Sci Technol Sci* 29:201–208
- Mohamed AA, Castagna A, Ranieri A, Sanità di Toppi L (2012) Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale* 57:15–22. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.05.002
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:459–481. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
- Monteiro M, Santos C, Mann RM, et al (2007) Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. *Environ Exp Bot* 60:421–427. doi: 10.1016/j.envexpbot.2006.12.018
- Morel M, Crouzet J, Gravot A, et al (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiol* 149:894–904. doi: 10.1104/pp.108.130294

- Muradoglu F, Gundogdu M, Ercisli S, et al (2015) Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biol Res* 48. doi: 10.1186/s40659-015-0001-3
- Mwamba TM, Ali S, Ali B, et al (2016) Interactive effects of cadmium and copper on metal accumulation, oxidative stress, and mineral composition in *Brassica napus*. *Int J Environ Sci Technol* 13:2163–2174. doi: 10.1007/s13762-016-1040-1
- Nada E, Ferjani BA, Ali R, et al (2007) Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiol Plant* 29:57–62. doi: 10.1007/s11738-006-0009-y
- Nakamura S, Akiyama C, Sasaki T, et al (2008) Effect of cadmium on the chemical composition of xylem exudate from oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *Soil Sci Plant Nutr* 54:118–127. doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00214.x
- Nakamura S, Suzui N, Nagasaka T, et al (2013) Application of glutathione to roots selectively inhibits cadmium transport from roots to shoots in oilseed rape. *J Exp Bot* 64:1073–1081. doi: 10.1093/jxb/ers388
- Nikolić N, Pajević S, Župunski M, et al (2014) Responses of wheat (*Triticum Aestivum* L.) and maize (*Zea Mays* L.) plants to cadmium toxicity in relation to magnesium nutrition. *Acta Bot Croat* 73:359–373. doi: 10.2478/botcro-2014-0014
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Nogawa K, Sakurai M, Ishizaki M, et al (2017) Threshold limit values of the cadmium concentration in rice in the development of itai-itai disease using benchmark dose analysis. *J Appl Toxicol* 37:962–966. doi: 10.1002/jat.3444
- Nolan EM, Racine ME, Lippard SJ (2006) Selective Hg(II) detection in aqueous solution with thiol derivatized fluoresceins. *Inorg Chem* 45:2742–2749. doi: 10.1021/ic052083w
- Nouairi I, Ammar WB, Youssef NB, et al (2006) Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Sci* 170:511–519. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.10.003
- Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E (2003) Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot* 54:291–301. doi: 10.1093/jxb/erg028
- Oomen RJJ, Wu J, Lelièvre F, et al (2009) Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 181:637–650. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02694.x
- Palizban A, Badii A, Asghari G, Mardani-Nafchi H (2015) Lead and cadmium contamination in seeds and oils of *Brassica napus* L and *Carthamus tinctorius* grown in Isfahan province/Iran. *Iran J Toxicol* 8:1196–1202
- Pandey N, Pathak GC, Sharma CP (2006) Zinc is critically required for pollen function and fertilisation in lentil. *J Trace Elem Med Biol* 20:89–96. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.09.006

- Papoyan A, Kochian LV (2004) Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiol* 136:3814–3823. doi: 10.1104/pp.104.044503
- Park J, Kim J-Y, Kim K-W (2012) Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals using *Brassica napus*. *Geosystem Eng* 15:10–18. doi: 10.1080/12269328.2012.674428
- Parmar P, Kumari N, Sharma V (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot Stud* 54:45. doi: 10.1186/1999-3110-54-45
- Parrotta L, Guerriero G, Sergeant K, et al (2015) Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Front Plant Sci* 6:. doi: 10.3389/fpls.2015.00133
- Parween T, Jan S, Mahmooduzzafar, et al (2011) Genotoxic impact of cadmium on root meristem of *Vicia faba* L. *Russ Agric Sci* 37:115–119. doi: 10.3103/S1068367411020248
- 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
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14:290–295. doi: 10.1016/j.pbi.2011.02.001
- Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massacci A (2003) Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol* 133:829–837. doi: 10.1104/pp.103.026518
- Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (2007) The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface, Second Edition. CRC Press
- Polakova S, Kubík L, Němec P (2014) Registr kontaminovaných ploch (1998-2013) (ÚKZÚZ)
- Pollard AJ, Stewart HL, Roberson CB (2009) Manganese hyperaccumulation in *Phytolacca americana* L. from the Southeastern United States. *Northeast Nat* 16:155–162. doi: 10.1656/045.016.0513
- Prasad MNV (2008) Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health. John Wiley & Sons
- Příbyl P, Cepák V, Zachleder V (2005) Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium. *Protoplasma* 226:231–240. doi: 10.1007/s00709-005-0123-5
- Qadir S, Qureshi MI, Javed S, Abdin MZ (2004) Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress. *Plant Sci* 167:1171–1181. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.06.018
- Qiu Z, Wang L, Zhou Q (2013) Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere* 90:1274–1280. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.085

- 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
- Raskin I, Ensley BD (2000) Phytoremediation of toxic metals. *Phytoremediation Toxic Met*
- Raskin I, Kumar PN, Dushenkov S, Salt DE (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr Opin Biotechnol* 5:285–290
- Rauser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31:19–48. doi: 10.1007/BF02738153
- Reeves RD, Ent A van der, Baker AJM (2018) Global distribution and ecology of hyperaccumulator plants. In: *Agromining: farming for metals*. Springer, Cham, pp 75–92
- Robinson BH, Brooks RR, Hedley MJ (1999) Cobalt and nickel accumulation in *Nyssa* (tupelo) species and its significance for New Zealand agriculture. *N Z J Agric Res* 42:235–240. doi: 10.1080/00288233.1999.9513374
- 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
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, et al (2002a) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25:677–686. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00850.x
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, et al (2002b) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25:677–686. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00850.x
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, et al (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂^{·-} and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27:1122–1134. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x
- Roschztardt H, Conéjéro G, Curie C, Mari S (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol* 151:1329–1338. doi: 10.1104/pp.109.144444
- Rossi G, Figliolia A, Socciarelli S, Pennelli B (2002) Capability of *Brassica napus* to accumulate cadmium, zinc and copper from Soil. *Acta Biotechnol* 22:133–140. doi: 10.1002/1521-3846(200205)22:1/23.0.CO;2-3
- Sappin-Didier V, Vansuyts G, Mench M, Briat J-F (2005) Cadmium availability at different soil pH to transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant Soil* 270:189–197. doi: 10.1007/s11104-004-1494-7
- 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
- Sasadhar J, Choudhuri MA (1982) Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. *Aquat Bot* 12:345–354

- Schurmann P, Jacquot J-P (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:371–400. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.371
- 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
- Schwab AP, He Y, Banks MK (2005) The influence of organic ligands on the retention of lead in soil. *Chemosphere* 61:856–866. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.098
- 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
- Seregin IV, Kozhevnikova AD (2008) Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russ J Plant Physiol* 55:1–22. doi: 10.1134/S1021443708010019
- 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
- Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 161:1135–1144. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00517-9
- Shahid M, Dumat C, Khalid S, et al (2016) Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. In: Voogt P de (ed) *Reviews of environmental contamination and toxicology Volume 241*. Springer International Publishing, pp 73–137
- Sharma SS, Dietz K-J, Mimura T (2016) Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell Environ* 39:1112–1126. doi: 10.1111/pce.12706
- Sharma SS, Schat H, Vooijs R, Van Heerwaarden LM (1999) Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: Concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environ Toxicol Chem* 18:348–355. doi: 10.1002/etc.5620180235
- Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P (2016) Factors affecting phytoextraction: a review. *Pedosphere* 26:148–166. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60032-7
- Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Sakran AM, et al (2012) Effect of calcium and potassium on antioxidant system of *Vicia faba* L. under cadmium stress. *Int J Mol Sci* 13:6604–6619. doi: 10.3390/ijms13066604
- Siddiqui S, Meghvansi MK, Wani MC, Jabee F (2009) Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Phys Plant*, 31(3):531. doi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-008-0262-3>
- Simonova E, Henselova M, Masarovicova E, Kohanova J (2007) Comparison of tolerance of *Brassica juncea* and *Vigna radiata* to cadmium. *Biol Plant* 51:488–492. doi: 10.1007/s10535-007-0103-z

- Sofa A, Bochicchio R, Amato M, et al (2017) Plant architecture, auxin homeostasis and phenol content in *Arabidopsis thaliana* grown in cadmium- and zinc-enriched media. *J Plant Physiol* 216:174–180. doi: 10.1016/j.jplph.2017.06.008
- Song Y, Jin L, Wang X (2017) Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *Int J Phytoremediation* 19:133–141. doi: 10.1080/15226514.2016.1207598
- Sridhar BBM, Han FX, Diehl SV, et al (2007) Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. *Braz J Plant Physiol* 19:15–22. doi: 10.1590/S1677-04202007000100002
- Srivastava RK, Pandey P, Rajpoot R, et al (2014) Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma* 251:1047–1065. doi: 10.1007/s00709-014-0614-3
- Stoyanova Z, Doncheva S (2002) The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Braz J Plant Physiol* 14:111–116. doi: 10.1590/S1677-04202002000200005
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynth Mech Regul Adapt* 445–483
- Suchara I, Sucharova J, Hola M, et al (2011) The performance of moss, grass, and 1- and 2-year old spruce needles as bioindicators of contamination: a comparative study at the scale of the Czech Republic. *Sci Total Environ* 409:2281–2297. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.02.003
- Sugimoto K, Williamson RE, Wasteneys GO (2000) New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124:1493–1506
- Sun XM, Lu B, Huang SQ, et al (2007) Coordinated expression of sulfate transporters and its relation with sulfur metabolites in *Brassica napus* exposed to cadmium. *Bot Stud* 48:43–54. doi: <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2007/1/Bot481-05.pdf>
- Sun J, Wang R, Liu Z, et al (2013) Non-invasive microelectrode cadmium flux measurements reveal the spatial characteristics and real-time kinetics of cadmium transport in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii*. *J Plant Physiol* 170:355–359. doi: 10.1016/j.jplph.2012.10.014
- Suzuki N (2005) Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnol* 22:19–25. doi: 10.5511/plantbiotechnology.22.19
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ (2009) K⁺ transport in plants: physiology and molecular biology. *J Plant Physiol* 166:447–466. doi: 10.1016/j.jplph.2008.12.009
- Szulc PM, Kobierski M, Majtkowski W (2015) Evaluation of the use of spring rapeseed in phytoremediation of soils contaminated with trace elements and their effect on yield parameters. *Plant Breed Seed Sci* 69:81–95. doi: 10.1515/plass-2015-0008
- Tammam AA, Hatata MM, Sadek OA (2016) Effect of Cd and Zn interaction on reactive oxygen species and antioxidant machinery of broad bean plants (*Vicia faba* L). *Egypt J Exp Biol Bot* 12:193–209. doi: 10.5455/egyjebb.20160819020621

- Tang L, Qiu R, Tang Y, Wang S (2014) Cadmium-zinc exchange and their binary relationship in the structure of Zn-related proteins: a mini review. *Met Integr Biometal Sci* 6:1313–1323. doi: 10.1039/c4mt00080c
- Tao Q, Jupa R, Luo J, et al (2017) The apoplasmic pathway via the root apex and lateral roots contributes to Cd hyperaccumulation in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J Exp Bot* 68:739–751. doi: 10.1093/jxb/erw453
- Taspinar MS, Agar G, Alpsoy L, et al (2011) The protective role of zinc and calcium in *Vicia faba* seedlings subjected to cadmium stress. *Toxicol Ind Health* 27:73–80. doi: 10.1177/0748233710381888
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012) Heavy metal toxicity and the environment. In: Luch A (ed) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Springer Basel, pp 133–164
- Tkalec M, Štefanić PP, Cvjetko P, et al (2014) The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLOS ONE* 9:e87582. doi: 10.1371/journal.pone.0087582
- Tlustoš P, Břendová K, Száková J, et al (2016) The long-term variation of Cd and Zn hyperaccumulation by *Noccaea* spp and *Arabidopsis halleri* plants in both pot and field conditions. *Int J Phytoremediation* 18:110–115 . doi: 10.1080/15226514.2014.981243
- Touiserkani T, Haddad R (2012) Cadmium-induced stress and antioxidative responses in different *Brassica napus* cultivars. *J Agric Sci Technol* 14:929–937
- Tran TA, Popova LP (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk J Bot* 37:1–13. doi: 10.3906/bot-1112-16
- 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.
- Tuma J, Svojanovska, H. (2015) *Avena sativa* cadmium content, distribution and toxicity in dependence on concentration of zinc and nickel in nutrient medium. *Fres Env Bull*, 24(5A): 1798-1803. doi: <http://www.prt-parlar.de/>
- Tung J, Goodwin PH, Hsiang T (2013) Chlorophyll fluorescence for quantification of fungal foliar infection and assessment of the effectiveness of an induced systemic resistance activator. *Eur J Plant Pathol* 136:301–315. doi: 10.1007/s10658-012-0164-5
- Turan M, Esringu A (2007) Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. *Plant Soil Environ* 53:7
- Ueno D, Iwashita T, Zhao F-J, Ma JF (2008) Characterization of Cd translocation and identification of the Cd form in xylem sap of the Cd-hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Physiol* 49:540–548. doi: 10.1093/pcp/pcn026
- Uraguchi S, Fujiwara T (2013) Rice breaks ground for cadmium-free cereals. *Curr Opin Plant Biol* 16:328–334. doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.012
- Van Belleghem F, Cuypers A, Semane B, et al (2007) Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 173:495–508. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01940.x

- Vatehova Z, Kollarova K, Zelko I, et al (2012) Interaction of silicon and cadmium in *Brassica juncea* and *Brassica napus*. *Biologia (Bratisl)* 67:498–504. doi: 10.2478/s11756-012-0034-9
- 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
- Versieren L, Evers S, AbdElgawad H, et al (2017) Mixture toxicity of copper, cadmium, and zinc to barley seedlings is not explained by antioxidant and oxidative stress biomarkers. *Environ Toxicol Chem* 36:220–230. doi: 10.1002/etc.3529
- Vig K, Megharaj M, Sethunathan N, Naidu R (2003) Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv Environ Res* 8:121–135. doi: 10.1016/S1093-0191(02)00135-1
- Vitória AP, Rodriguez APM, Cunha M, et al (2003) Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. *Biol Plant* 47:561–568. doi: 10.1023/B:BIOP.0000041062.00539.7a
- Vollenweider P, Cosio C, Günthardt-Goerg MS, Keller C (2006) Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environ Exp Bot* 58:25–40
- Vurro E, Ruotolo R, Ottonello S, et al (2011) Phytochelatins govern zinc/copper homeostasis and cadmium detoxification in *Cuscuta campestris* parasitizing *Daucus carota*. *Environ Exp Bot* 72:26–33. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.04.017
- Wang Q, Liang X, Dong Y, et al (2013) Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on physiological characteristics of perennial ryegrass under cadmium stress. *J Plant Growth Regul* 32:721–731. doi: 10.1007/s00344-013-9339-3
- Wang SL, Liao WB, Yu FQ, et al (2009) Hyperaccumulation of lead, zinc, and cadmium in plants growing on a lead/zinc outcrop in Yunnan Province, China. *Environ Geol* 58:471. doi: 10.1007/s00254-008-1519-2
- Welch RM, Norvell WA (1999) Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. In: McLaughlin MJ, Singh BR (eds) *Cadmium in Soils and Plants*. Springer Netherlands, pp 125–150
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307–313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- Wenzel WW, Bunkowski M, Puschenreiter M, Horak O (2003) Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ Pollut* 123:131–138. doi: 10.1016/S0269-7491(02)00341-X
- White PJ, Broadley MR (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* 92:487–511. doi: 10.1093/aob/mcg164
- White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann Bot* 105:1073–1080. doi: 10.1093/aob/mcq085
- Wojcik M, Tukiendorf A (2004) Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 44:71–80. doi: 10.1007/s10725-004-1592-9

- Wu F, Zhang G, Yu J (2003) Interaction of cadmium and four microelements for uptake and translocation in different barley genotypes. *Commun Soil Sci Plant Anal* 34:2003–2020. doi: 10.1081/CSS-120023233
- Xie Y, Hu L, Du Z, et al (2014) Effects of cadmium exposure on growth and metabolic profile of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. *PLOS ONE* 9:e115279. doi: 10.1371/journal.pone.0115279
- Xu J, Sun J, Du L, Liu X (2012) Comparative transcriptome analysis of cadmium responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum*. *New Phytol* 196:110–124. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04235.x
- Xu J, Yin H, Li X (2009a) 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
- Xu P, Liu D, Jiang W (2009b) Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. *Biol Plant* 53:387–390. doi: 10.1007/s10535-009-0073-4
- Yamaguchi N, Mori S, Baba K, et al (2011) Cadmium distribution in the root tissues of solanaceous plants with contrasting root-to-shoot Cd translocation efficiencies. *Environ Exp Bot* 71:198–206. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.12.002
- Yan H, Filardo F, Hu X, et al (2016) Cadmium stress alters the redox reaction and hormone balance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. *Environ Sci Pollut Res* 23:3758–3769. doi: 10.1007/s11356-015-5640-y
- Yang D, Guo Z, Green ID, Xie D (2016) Effect of cadmium accumulation on mineral nutrient levels in vegetable crops: potential implications for human health. *Environ Sci Pollut Res* 23:19744–19753. doi: 10.1007/s11356-016-7186-z
- 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
- Yeh C-M, Chien P-S, Huang H-J (2007) Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J Exp Bot* 58:659–671. doi: 10.1093/jxb/erl240
- Yu R, Ji J, Yuan X, et al (2012) Accumulation and translocation of heavy metals in the canola (*Brassica napus* L.)—soil system in Yangtze River Delta, China. *Plant Soil* 353:33–45
- Zawoznik MS, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2007) Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 173:190–197. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.05.004
- Zhang L, Chen Z, Zhu C (2012) Endogenous nitric oxide mediates alleviation of cadmium toxicity induced by calcium in rice seedlings. *J Environ Sci China* 24:940–948
- Zhang W, Chen W (2011) Role of salicylic acid in alleviating photochemical damage and autophagic cell death induction of cadmium stress in *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 10:947–955. doi: 10.1039/c0pp00305k

- Zhang Z-C, Chen B-X, Qiu B-S (2010) Phytochelatin synthesis plays a similar role in shoots of the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* as in non-resistant plants. *Plant Cell Environ* 33:1248–1255. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02144.x
- Zhao FY, Hu F, Zhang SY, et al (2013) MAPKs regulate root growth by influencing auxin signaling and cell cycle-related gene expression in cadmium-stressed rice. *Environ Sci Pollut Res Int* 20:5449–5460. doi: 10.1007/s11356-013-1559-3
- Zimeri AM, Dhankher OP, McCaig B, Meagher RB (2005) The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol* 58:839–855. doi: 10.1007/s11103-005-8268-3
- Zipser C, Komarneni S, Baker DE (1988) Specific cadmium sorption in relation to the crystal chemistry of clay minerals. *Soil Sci Soc Am J* 52:49–53. doi: 10.2136/sssaj1988.03615995005200010009x
- Zong H, Liu S, Xing R, et al (2017) Protective effect of chitosan on photosynthesis and antioxidative defense system in edible rape (*Brassica rapa* L.) in the presence of cadmium. *Ecotoxicol Environ Saf* 138:271–278 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.009
- Zornoza P, Vázquez S, Esteban E, et al (2002) Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol Biochem* 40:1003–1009. doi: 10.1016/S0981-9428(02)01464-X
- Zákon č. 153/2016 Sb., o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. In: *Sbírka zákonů*. 01.06.2016.

10. Přílohy

Příloha 1: Obsah jednotlivých aminokyselin v kořenech a v nadzemních částech u řepky olejky (CZL, Benefit, Iwas, ZhongZhuang9). Rostliny (n = 3) rostly 30 dní na půdách s různými koncentracemi přidaného Cd (0-Kontrola, 50, 100, 150 mg Cd.kg⁻¹).

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	HIS	GLY	THR	ARG	ALA	TYR	CYS	VAL	MET	TRP	PHE	ILE	LEU	LYS	PRO
CZL kořeny																				
Ko nt	0,85± 0,10	0,81± 0,19	1,53± 0,48	1,12± 0,23	0,19± 0,07	1,61± 0,51	0,88± 0,24	0,31± 0,07	4,67± 0,98	4,18± 0,96	0,52± 0,11	1,60± 0,54	0,80± 0,04	1,04± 0,28	0,41± 0,09	0,45± 0,11	1,26± 0,42	1,38± 0,42	0,25± 0,04	5,40± 1,79
50 Cd	0,83± 0,15	0,98± 0,23	1,65± 0,29	1,35± 0,04	0,23± 0,03	1,60± 0,22	0,93± 0,06	0,32± 0,03	5,37± 0,20	4,81± 0,29	0,56± 0,04	1,74± 0,18	0,74± 0,04	1,25± 0,11	0,29± 0,13	0,51± 0,04	1,35± 0,12	1,53± 0,15	0,30± 0,06	5,61± 0,44
100 Cd	0,61± 0,37	0,54± 0,10	1,31± 0,63	0,86± 0,35	0,18± 0,09	1,28± 0,51	0,74± 0,39	0,24± 0,12	4,15± 2,15	3,46± 2,63	0,42± 0,23	1,36± 0,11	0,73± 0,06	0,79± 0,37	0,26± 0,03	0,35± 0,15	1,04± 0,42	1,18± 0,40	0,20± 0,11	9,72± 2,91
150 Cd	1,07± 0,28	0,92± 0,10	2,32± 0,49	2,24± 0,47	0,27± 0,05	1,94± 0,47	1,40± 0,55	0,43± 0,10	8,12± 2,76	6,77± 3,15	0,79± 0,27	2,54± 0,72	NA	1,67± 0,64	0,33± 0,06	0,68± 0,08	2,03± 0,69	2,27± 0,78	0,38± 0,14	7,80± 1,20
CZL nadzemní část																				
Ko nt	0,50± 0,25	1,39± 0,46	1,33± 0,68	0,52± 0,23	0,51± 0,07	0,59± 0,52	0,91± 0,27	0,36± 0,22	7,19± 3,73	1,41± 0,58	1,10± 0,28	1,45± 0,78	0,78± 0,04	0,53± 0,16	NA	1,39± 0,53	1,05± 0,48	2,02± 0,49	0,39± 0,27	5,36± 0,47
50 Cd	0,68± 0,13	1,90± 0,98	2,14± 1,22	0,82± 0,33	0,42± 0,04	0,86± 0,23	1,06± 0,28	0,55± 0,18	10,08± ±1,91	2,21± 1,10	1,50± 0,40	1,88± 0,49	0,75± 0,00	0,68± 0,21	NA	1,93± 0,50	1,57± 0,40	2,34± 0,40	0,69± 0,25	6,43± 1,18
100 Cd	0,71± 0,51	0,98± 0,48	2,76± 2,20	0,79± 0,47	0,41± 0,27	1,00± 0,60	1,12± 0,56	0,37± 0,21	8,66± 3,51	2,38± 1,79	0,91± 0,38	2,00± 0,85	0,73± 0,03	0,79± 0,38	NA	1,52± 0,67	1,78± 0,76	2,60± 0,90	0,71± 0,27	6,21± 1,51
150 Cd	0,68± 0,21	1,89± 1,14	3,59± 1,99	1,24± 0,66	0,49± 0,24	1,12± 0,49	1,60± 0,79	0,49± 0,25	14,37± ±2,76	4,58± 1,93	1,63± 0,53	2,29± 0,96	0,73± 0,04	1,20± 0,32	NA	2,04± 0,76	1,98± 0,83	3,16± 0,94	1,05± 0,47	7,24± 1,14
Benefit kořeny																				
Ko nt	0,61± 0,16	0,69± 0,07	1,11± 0,52	0,92± 0,28	0,13± 0,02	0,99± 0,26	0,70± 0,18	0,21± 0,04	4,05± 1,17	3,69± 1,42	0,44± 0,11	1,06± 0,19	0,73± 0,05	1,05± 0,37	0,33± 0,02	0,37± 0,10	0,84± 0,17	0,86± 0,27	0,22± 0,06	8,13± 1,82
50 Cd	0,48± 0,05	0,90± 0,11	0,71± 0,24	0,73± 0,06	0,06± 0,01	0,70± 0,10	0,50± 0,03	0,14± 0,01	2,46± 0,14	2,28± 0,25	0,27± 0,04	0,61± 0,03	0,71± 0,02	0,63± 0,07	0,24± 0,08	0,22± 0,01	0,46± 0,03	0,48± 0,06	0,13± 0,01	3,51± 1,11

100 Cd	0,53± 0,12	0,59± 0,14	1,51± 0,39	1,06± 0,32	0,09± 0,01	0,80± 0,10	0,68± 0,14	0,18± 0,03	5,16± 1,60	3,14± 0,81	0,42± 0,06	1,08± 0,25	0,74± 0,01	0,94± 0,20	0,25± 0,01	0,32± 0,03	0,84± 0,19	0,82± 0,18	0,15± 0,03	10,95 ±2,36
150 Cd	0,51± 0,20	0,60± 0,24	1,44± 0,74	0,93± 0,32	0,11± 0,04	0,92± 0,38	0,69± 0,31	0,17± 0,03	3,79± 1,35	3,02± 1,30	0,35± 0,10	0,85± 0,29	0,80± 0,03	0,87± 0,31	0,34± 0,11	0,31± 0,10	0,66± 0,23	0,66± 0,20	0,20± 0,06	10,48 ±1,61
Benefit nadzemní část																				
Ko nt	0,95± 0,08	3,20± 1,41	3,55± 0,58	1,04± 0,28	0,35± 0,08	1,37± 0,27	1,36± 0,24	0,51± 0,116	11,63 ±2,65	3,29± 1,00	1,36± 0,46	1,93± 0,33	0,76± 0,04	0,92± 0,22	NA	1,72± 0,53	1,59± 0,34	2,30± 0,77	0,76± 0,34	4,38± 1,91
50 Cd	0,96± 0,26	5,00± 1,50	2,88± 0,76	1,18± 0,39	0,72± 0,26	1,78± 0,40	1,30± 0,27	1,07± 0,19	10,07 ±1,42	3,34± 0,81	2,33± 0,89	2,14± 0,62	NA	0,78± 0,08	NA	2,62± 0,90	1,82± 0,63	3,41± 1,09	1,79± 0,77	3,92± 1,70
100 Cd	0,81± 0,25	2,79± 1,53	4,04± 0,62	1,25± 0,18	0,38± 0,08	1,30± 0,32	1,73± 0,64	0,53± 0,22	11,97 ±2,30	3,61± 0,78	1,38± 0,44	2,03± 0,54	0,76± 0,01	1,05± 0,09	NA	1,80± 0,72	1,70± 0,50	2,55± 0,78	0,79± 0,21	10,43 ±0,61
150 Cd	0,91± 0,16	4,70± 1,71	3,94± 1,72	1,45± 0,46	0,72± 0,22	1,76± 0,45	1,45± 0,47	0,66± 0,07	12,40 ±4,46	3,55± 1,65	1,57± 0,54	2,18± 0,79	0,50± 0,44	0,94± 0,41	NA	1,90± 0,70	1,79± 0,65	2,92± 0,82	1,13± 0,19	10,01 ±2,41
Iwas kořeny																				
Ko nt	0,82± 0,36	0,79± 0,36	1,16± 0,41	0,85± 0,26	0,10± 0,02	1,05± 0,24	0,82± 0,26	0,22± 0,07	5,08± 0,93	3,21± 1,64	0,42± 0,08	1,21± 0,34	0,85± 0,02	1,09± 0,47	0,48± 0,26	0,42± 0,11	0,95± 0,26	1,03± 0,31	0,21± 0,10	3,77± 1,49
50 Cd	0,55± 0,10	0,59± 0,02	1,39± 0,22	0,82± 0,30	0,11± 0,02	1,13± 0,35	0,85± 0,15	0,21± 0,00	4,81± 1,56	2,85± 0,74	0,44± 0,06	1,17± 0,21	NA	0,82± 0,05	0,41± 0,01	0,42± 0,03	0,930 ,16	0,97± 0,15	0,19± 0,04	3,90± 1,41
100 Cd	0,85± 0,45	1,18± 0,37	1,87± 0,82	1,57± 0,61	0,18± 0,06	1,76± 0,49	1,43± 0,49	0,32± 0,15	6,99± 2,79	5,85± 2,51	0,55± 0,24	1,41± 0,78	0,87± 0,02	1,09± 0,46	0,68± 0,14	0,60± 0,26	1,16± 0,69	1,67± 0,49	0,45± 0,17	1,06± 0,16
150 Cd	0,76± 0,21	0,93± 0,04	1,44± 0,32	1,14± 0,05	0,13± 0,02	1,55± 0,05	1,12± 0,11	0,24± 0,07	6,87± 1,87	3,83± 0,39	0,50± 0,18	1,32± 0,52	0,84± 0,02	0,84± 0,15	0,62± 0,09	0,48± 0,13	1,02± 0,45	1,11± 0,39	0,25± 0,02	1,37± 0,33
Iwas nadzemní část																				
Ko nt	0,51± 0,14	1,75± 1,01	2,56± 0,71	0,75± 0,19	0,24± 0,05	0,30± 0,11	0,79± 0,21	0,22± 0,07	6,75± 1,42	2,60± 0,91	0,66± 0,12	1,26± 0,21	NA	0,61± 0,24	NA	0,76± 0,19	0,99± 0,20	1,17± 0,26	0,38± 0,13	5,50± 3,07
50 Cd	1,05± 0,34	5,89± 1,34	5,17± 0,64	1,98± 0,45	0,51± 0,16	2,83± 0,60	2,29± 0,43	1,03± 0,10	15,02 ±2,59	4,91± 0,57	2,17± 0,67	2,73± 0,32	NA	1,09± 0,39	NA	2,52± 0,83	2,25± 0,40	3,34± 0,93	2,42± 0,85	4,98± 2,27
100 Cd	1,03± 0,42	3,65± 1,89	4,86± 2,28	1,66± 0,76	0,40± 0,10	1,50± 0,70	2,06± 0,54	0,47± 0,16	14,23 ±3,60	4,72± 1,52	1,44± 0,46	2,55± 0,56	NA	1,10± 0,11	NA	1,68± 0,55	2,04± 0,42	2,83± 0,85	1,11± 0,39	12,99 ±4,02
150 Cd	0,67±	2,23±	2,64±	0,88±	0,32±	0,70±	1,06±	0,29±	9,64±	2,45±	0,97±	1,79±	NA	0,77±	NA	1,25±	1,47±	1,92±	0,45±	13,88

Cd	0,18	0,81	1,04	0,26	0,06	0,45	0,49	0,07	2,26	1,17	0,16	0,49		0,30		0,32	0,43	0,48	0,21	±1,15
ZhongZhuang9 kořeny																				
Ko nt	0,72± 0,45	0,91± 0,31	1,80± 0,97	1,07± 0,52	0,11± 0,02	0,99± 0,29	0,79± 0,26	0,22± 0,08	3,99± 1,72	4,54± 1,73	0,41± 0,16	1,26± 0,58	0,79± 0,04	1,27± 0,47	NA	0,34± 0,09	1,03± 0,50	1,05± 0,43	0,29± 0,09	8,37± 2,27
50 Cd	0,70± 0,30	1,29± 0,29	1,79± 0,93	1,07± 0,35	0,10± 0,03	0,94± 0,21	0,81± 0,15	0,22± 0,07	4,33± 1,10	4,45± 1,49	0,42± 0,12	1,23± 0,52	0,75± 0,05	1,27± 0,44	NA	0,35± 0,11	0,97± 0,43	1,05± 0,36	0,24± 0,05	9,97± 6,30
100 Cd	0,76± 0,18	0,70± 0,16	2,09± 0,74	1,21± 0,31	0,10± 0,03	0,90± 0,19	0,85± 0,18	0,26± 0,06	4,77± 1,32	4,16± 1,89	0,50± 0,14	1,52± 0,45	0,79± 0,02	1,32± 0,30	NA	0,44± 0,11	1,26± 0,44	1,24± 0,38	0,22± 0,02	11,04 ±3,97
150 Cd	0,69± 0,08	1,14± 0,24	1,52± 0,55	1,00± 0,36	0,11± 0,01	0,84± 0,27	0,74± 0,22	0,23± 0,03	4,04± 1,60	3,87± 1,81	0,47± 0,08	1,37± 0,23	0,82± 0,11	1,18± 0,41	NA	0,41± 0,04	1,13± 0,22	1,08± 0,22	0,20± 0,07	9,29± 3,97
ZhongZhuang9 nadzemní část																				
Ko nt	1,30± 0,21	3,53± 0,33	3,43± 0,81	1,15± 0,17	0,35± 0,06	1,44± 0,35	1,28± 0,15	0,66± 0,22	11,30 ±1,68	3,78± 0,38	1,72± 0,37	2,37± 0,45	NA	1,03± 0,09	NA	2,07± 0,54	1,96± 0,39	2,95± 0,68	0,92± 0,19	5,78± 0,53
50 Cd	1,14± 0,30	2,74± 0,98	3,85± 1,66	1,35± 0,46	0,42± 0,03	1,72± 0,60	1,80± 0,88	1,33± 0,48	12,28 ±4,90	4,00± 1,25	2,42± 1,03	2,91± 0,87	NA	1,22± 0,48	NA	2,67± 0,97	2,59± 0,81	4,41± 1,25	1,74± 0,88	7,74± 2,61
100 Cd	1,37± 0,20	3,23± 1,13	4,66± 0,24	1,57± 0,22	0,74± 0,28	2,17± 0,70	1,770 ,38	1,02± 0,50	16,18 ±2,98	5,57± 1,23	2,38± 0,88	3,14± 0,78	NA	1,38± 0,18	NA	2,44± 0,98	2,70± 0,67	3,98± 0,97	1,52± 0,69	8,48± 1,88
150 Cd	1,37± 0,13	3,31± 1,13	4,38± 0,90	1,37± 0,11	0,58± 0,14	1,89± 0,07	1,40± 0,04	0,76± 0,14	14,34 ±1,19	4,34± 0,42	2,00± 0,45	2,78± 0,25	NA	1,15± 0,04	NA	2,53± 0,55	2,37± 0,11	3,60± 0,43	1,37± 0,41	10,49 ±3,90

Příloha 2: Publikace vydané časopisy s impakt faktorem

1. Krtková, J., Benáková, M., & Schwarzerová, K. (2016). Multifunctional microtubule-associated proteins in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 474.
2. Benáková, M., Ahmadi, H., Dučaiiová, Z., Tylová, E., Clemens, S., & Tůma, J. (2017). Effects of Cd and Zn on physiological and anatomical properties of hydroponically grown *Brassica napus* plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(25), 20705-20716.