

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

BRNO 2016

PAVEL ŠVEC

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie



Vliv akumulace manganu na vybrané rostliny
Disertační práce

Vedoucí práce:
doc. RNDr. Petr Hrdlička, CSc.

Vypracoval:
Ing. Pavel Švec

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Vliv akumulace manganu na vybrané rostliny** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval doc. RNDr. Petru Hrdličkovi, CSc., za pomoc při dokončení mé disertační práce. Také bych rád poděkoval prof. RNDr. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D., za cenné rady, jeho čas, který mi věnoval a možnost pracovat v jeho laboratoři. Dále bych rád poděkoval Ing. Markétě Jarošové a Jaroslavě Kroupové, že mi byly oporou v nelehkých časech a za jejich pomoc při zpracování výsledků mé práce. Nakonec bych rád vyjádřil díky i doc. RNDr. Jozefu Kováčikovi, Ph.D. Práce s ním byla k nezaplacení.

OBSAH

ÚVOD	9
1 Literární přehled	10
1.1 Kovy a jejich vliv na rostliny	10
1.1.1 Charakteristika kovů	10
1.1.2 Vliv kovů na rostlinnou produkci	12
1.1.3 Význam Mn a jeho deficit a toxicita	16
1.1.4 Interakce kovů s manganem	22
1.2 Abiotický stres v rostlinách	23
1.2.1 Oxidační stres	23
1.2.2 Oxid dusnatý	24
1.3 Obranné mechanismy rostlin	26
1.3.1 Enzymatické mechanismy	26
1.3.2 Neenzymatické mechanismy	31
2 CÍL PRÁCE	35
3 MATERIÁL A METODIKA	36
3.1 Charakteristika použitých modelových objektů	36
3.2 Popis pokusů	38
3.3 Přehled použitých metodik stanovení	40
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	45
4.1 Toxicita půdy s přirozeně vysokým obsahem manganu na vybrané plodiny .	45
4.2 Oxidační stres vyvolaný manganem a zlepšení tohoto stavu pomocí oxidu dusnatého ve dvou ontogenetických stavech heřmánku lékařského	59
4.3 Vliv aniontů, kationtů a pH na akumulaci manganu a jeho toxicitu v zelené řase <i>Scenedesmus quadricauda</i>	72
5 ZÁVĚR	85
5.1 Zhodnocení experimentu s přirozeně kontaminovanou půdou manganem	85
5.2 Zhodnocení experimentu se dvěma ontogenetickými stavy heřmánku lékařského, vystavených manganu	85
5.3 Zhodnocení experimentu se sladkovodní mikrořasou <i>Scenedesmus quadricauda</i> , která byla vystavena manganu při různém pH	86
5.4 Shrnutí	86
6 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	87

7	SEZNAM OBRÁZKŮ	99
8	SEZNAM TABULEK	100
9	SEZNAM ZKRATEK	101

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá studiem vlivu vysokých dávek manganu na kulturní plodiny (*Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*), bylinku *Matricaria chamomilla* a sladkovodní mikrořasu *Scenedesmus quadricauda*. Především byl sledován růst, aktivita vybraných antioxidačních enzymů a obsah sekundárních metabolitů. Zjistili jsme, že vysoké dávky manganu zpomalují růst, což mělo za následek snížení biomasy, které jsme pozorovali u všech testovaných rostlin s výjimkou řas. Mangan se akumuluje v kořenech a část přijatého manganu se transportuje do nadzemní části rostlin. Jedná se o rovnoměrnější rozložení tohoto kovu v rostlině v porovnání například s mědí nebo kadmíem. Zaznamenali jsme změny v obsahu alifatických organických kyselin a v množství celkových thiolů. Byla zaznamenána zvýšená aktivita některých antioxidačních enzymů v závislosti na druhu rostliny. Nadbytek manganu měl toxicitější účinky na řepku než na ontogeneticky starší heřmánek lékařský, který vykazoval vyšší toleranci vůči vysokým dávkám manganu. Také jsme zjistili, že na toxicitu manganu má pozitivní vliv oxid dusnatý, který zlepšuje stav rostlin. Toto zlepšení se projevilo snížením množství přijatého manganu, snížením tvorby ROS, snížením lipidové peroxidace a zlepšením růstových parametrů testovaných rostlin. Hodnota pH má vliv na dostupnost manganu, ale neovlivňuje příjem manganu rostlinami. Také jsme zjistili, že kompetice Mn^{2+} a Ca^{2+} probíhá nejen u vyšších rostlin, ale i u sladkovodní mikrořasy *Scenedesmus quadricauda*.

Klíčová slova

Kovy, fluorescenční mikroskopie, antioxidační enzymy, organické kyseliny, metabolity.

Abstract

In this work we investigated the effect of high doses on the agriculture important crop plants (*Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*), herb *Matricaria chamomilla* and freshwater microalgae *Scenedesmus quadricauda*. In particular, we studied the growth rate, activity of antioxidant enzymes, and the amount of some secondary metabolites. We have found that high doses of manganese negatively influenced the growth, which resulted in a reduction of biomass which we observed in all studied groups, except algae. Manganese (Mn) is accumulated in roots and part of such absorbed Mn is transported to the shoot system. In the plants, the distribution of Mn is more balanced compared to copper and cadmium. We observed changes in the content of aliphatic organic acids, and the total amount of thiols. Higher activity was determined in several antioxidant enzymes according to the kind of plant. Abundance of manganese has been considered more toxic for the *Brassica rapa* than for the ontogenetic older *Matricaria chamomilla*, where we indicated a higher tolerance to the high concentration of Mn. We also found that the nitrogen oxide showed the positive effect on the toxicity of Mn and improved the plant viability. This improvement was reflected by decrease in uptake of Mn ions, decrease of ROS production and lipid peroxidation and also better growth parameters in the tested plants. The bioavailability of the Mn was influenced by pH however the uptake of Mn was not affected. We also found out that competition between Mn^{2+} and Ca^{2+} occur in the both land plants and also freshwater microalgae *Scenedesmus quadricauda*.

Keywords

Metals, fluorescence microscopy, antioxidant enzymes, organic acids, metabolites.

ÚVOD

Mangan byl objeven v roce 1774 švédským chemikem Carl W. Scheelem a poprvé izolován Johanem G. Gahnem ve stejném roce. Je to kovový prvek z VII. skupiny přechodných prvků s atomovým číslem 25 a s relativní atomovou hmotností $54,938 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Jako čistý kov má hustotu $7,47 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ s teplotou tání $1246 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplotou varu $2061 - 2097 \text{ }^\circ\text{C}$.

Je součástí živé i neživé přírody a patří mezi mikroprvky. Je nedílnou součástí řady metabolických drah všech nám známých živých organismů. Nejznámější je jeho funkce při fotosyntéze, kde je součástí OEC (oxygen evolving complex) v Kokově cyklu ve fotosystému II. Problematický začne být, když je ho nedostatek nebo přebytek (Marschner, 1995). Do potravního řetězce se dostává z půdy jakožto přirozená součást pedosféry, z vody nebo, a to je zásadnější problém, z činnosti člověka, například z důlní či hutní činnosti nebo rychlého rozvoje zemědělství (Gangwar *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2001). Tím dochází ke kontaminaci zemědělsky využitelné půdy a vodních zdrojů nejen manganem, ale i jinými prvky, včetně těžkých kovů, což má za následek sníženou aktivitu půdních mikroorganismů, sníženou úrodnost a tím i nižší výnos úrody (McGrath *et al.*, 1995). Pro ilustraci, manganem je kontaminováno značné množství zemědělské půdy v Číně, v důsledku průmyslového a ekonomického růstu, který nebral ohledy na ekologické hrozby.

Přírodní koloběh tohoto prvku je známý. Mangan je studován z různých důvodů a v různých souvislostech. Například způsoby ochrany rostlin před vlivem nadbytku manganu (Issa *et al.*, 1995). Mechanismus jakým se mangan přijímá do rostlin, jeho pohyb a dislokace v rostlinách.

Tato práce se zabývá vlivem manganu na zemědělsky významné rostliny a sladkovodní mikrořasu. Jakým způsobem rostliny reagují na nadměrné množství manganu, jak se vyrovnávají s tím souvisejícím stresem a jak je ovlivněn jejich metabolismus, se stalo cílem mé práce.

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Kovy a jejich vliv na rostliny

1.1.1 Charakteristika kovů

Kov je definován jako prvek periodické soustavy prvků, který je elektropozitivní, má snahu předávat valenční elektrony a tvoří jednoatomové kationty. Kovy rozlišujeme na lehké a těžké. Původně byl termín „těžký kov“ používán pouze v souvislosti s kovy, které měly škodlivé účinky a měly vyšší hustotu než železo. Jednalo se o kadmium, rtuť a olovo (Duffus, 2002). V dnešní době se tento termín používá v souvislosti se všemi kovy a polokovy, které mají hustotu vyšší než $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, nebo které mají toxický účinek na živé organismy nebo jsou hrozbou pro životní prostředí. Jejich nebezpečí spočívá v jejich schopnosti vázat se na organické látky (např. bílkoviny) a jejich funkční skupiny $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$ nebo $-\text{NH}_2$ a tím změnit jejich funkci nebo tvar a tak zabránit jejich správné funkci nebo využití. Nejznámější těžké kovy jsou kromě kadmia, rtuti a olova ještě chrom, nikl, měď, kobalt a arsen (Duffus, 2002). Podle citlivosti na kvalitu a kvantitu těžkých kovů můžeme rozdělit rostliny do tří skupin (Hall, 2002):

- Citlivé (netolerantní)
- Tolerantní
- Hyperakumulátory

Citlivé rostliny se nedokáží vyrovnat ani s velmi nízkými obsahy těžkých kovů. V jejich přítomnosti dochází k retardaci růstu, inhibici tvorby biomasy a může dojít i k úhynu. Tolerantní rostliny jsou schopné růst na místech s vyšším obsahem těžkých kovů. Tyto rostliny mají mechanismy, které jim pomáhají se vyrovnat s toxickými účinky těchto kovů. Mohou omezit příjem těchto kovů kořenovým systémem pomocí exudátů, pomocí fytochelatinů nebo metalothioneinů tyto kovy chelatují a transportují do vakuol, nebo mohou tyto kovy zabudovat do buněčné stěny. Důležitou roli v toleranci na těžké kovy hraje glutathion a organické kyseliny (Hall, 2002). Hyperakumulace je velmi podstatná schopnost rostlin přijímat a uchovávat v sobě značné množství jednoho nebo více kovů, aniž by tím rostlina sama utrpěla (Baker *et al.*, 1989). Této vlastnosti některých druhů rostlin se využívá při takzvané fytoremediaci nebo také fytoextrakci. Jde o postup dekontaminace půdy od některých těžkých kovů pomocí těchto hyperakumulátorů. Například *Thlaspi caerulescens* je hyperakumulátor zinku, niklu, kadmia a je schopná přijmout i značné množství olova (Kabata-Pendias, 2011). Takové rostliny daný kov

přijmou a dále ho už neuvolňují zpět do půdy (Pollard *et al.*, 2002). Tyto rostliny mají převážně nižší biomasu, protože většinu energie spotřebují na adaptaci na vysoké koncentrace daných kovů a jejich zabudování do svých pletiv, nejčastěji v kořenech, ale i v listech, než na tvorbu biomasy. Proces fytoremediace nebo také fytoextrakce se dělí na čtyři po sobě následující části (Kabata-Pendias, 2011):

- Fytostabilizace – vázání kovů (metaloidů) v aerobním prostředí kořenové zóny.
- Fytoextrakce – zvýšení příjmu kovů. Tento proces může pokračovat několik sezón, než se dostaví potřebný efekt.
- Fytoextrakce posílená chelatací
- Fytofiltrace (nebo také rhizofiltrace) – absorpce kovů (metaloidů) v kořenovém pletivu, v důsledku chelatace a absorpčního povrchu kořenů, z půdy i podzemní vody.

Hyperakumulátory jsou druhy nebo genotypy rostlin, které jsou schopné akumulace kovů nad koncentrací dostupnou v půdě. Dalo by se říci, že se jedná o biopumpy kovů. Tento poměr (obsah kovu v rostlině / obsah kovu v půdě) se nazývá bioakumulační faktor (BAF) a slouží k porovnání různých druhů rostlin ve vztahu k akumulaci kovů (Elekes *et al.*, 2010; Kováčik, 2013). S tím souvisí i translokační faktor (TF), který nám udává, jaké množství kovu se dostalo z kořenů do listů rostliny (obsah kovu v nadzemní části / obsah kovu v kořenové části) (Kováčik, 2013).

Dosud je známo přibližně 400 druhů rostlin schopných hyperakumulace. V Tab. 1 je uveden přehled nejznámějších a potvrzených čeledí hyperakumulátorů manganu. Jedná se o čeledi, které jsou hojně rozšířené hlavně v Austrálii, Oceánii a východní Asii. Míra nebo hranice, od které můžeme považovat rostlinu za hyperakumulátor se liší podle daného kovu. Kadmium má jinou hranici než například mangan:

- Cd – $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- Co, Cu, Ni a Pb – $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- Mn a Zn – $10\,000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

Hyperakumulátory, které již splnili svůj účel, se dají dále zpracovávat na biopaliva, popřípadě jako palivo v elektrárnách na tuhá paliva. Popel z těchto elektráren je velmi bohatý na těžké kovy, které do sebe rostlina přijala, a tyto kovy mohou být recyklovány (Kabata-Pendias, 2011).

Tab. 1: Přehled nejznámějších čeledí potvrzených hyperakumulátorů manganu.

Název čeledě	Latinský název	Zdroj
Toješťovité	<i>Apocynaceae</i>	Reeves <i>et al.</i> , 2000
Jesencovité	<i>Celastraceae</i>	Reeves <i>et al.</i> , 2000
Klusiovité	<i>Clusiaceae</i>	Reeves <i>et al.</i> , 2000
Myrtovité	<i>Myrtaceae</i>	Reeves <i>et al.</i> , 2000
Proteovité	<i>Proteaceae</i>	Proctor <i>et al.</i> , 1989
Lícidlovité	<i>Phytolaccaceae</i>	Liu <i>et al.</i> , 2010
Rdesnovité	<i>Polygonaceae</i>	Liu <i>et al.</i> , 2010
Čajovníkovité	<i>Theaceae</i>	Xue <i>et al.</i> , 2010

1.1.2 Vliv kovů na rostlinnou produkci

Na růst rostlin a rostlinou produkci má vliv mnoho faktorů. Mezi tyto faktory patří kromě dostatku světla a vody i dostatek CO₂ a minerální výživa. V případě, že některý z faktorů je nedostatečný, tak jeho navýšení vede ke zvýšení růstu a výnosu plodin. V běžné zemědělské výrobě bývá zastoupení například dusíku nebo fosforu v půdě dobré, ale nedostatečné zastoupení mají mikroprvky. To bývá způsobeno například nadměrným hnojením dusíkatými hnojivy. To může mít za následek, že ačkoliv mikroprvky jsou v půdě přítomny, tak v takové formě, kterou rostlina nedokáže přijmout. Nebo může nastat opačný případ, kdy se mikroprvek začne do rostliny dostávat ve větším množství a může mít i toxické účinky, nebo může zabránit v příjmu jiným minerálními látkami a tím způsobit jejich nedostatek, což se negativně projeví na růstu a výnosu těchto plodin (Marschner, 1995).

V Tab. 2 jsou uvedeny empiricky zjištěné obsahy některých prvků, které jsou pro rostliny důležité. Tyto obsahy můžeme považovat za úzké optimální rozpětí těchto prvků pro správný růst a vývoj daných rostlin, ačkoliv mírně vyšší obsah daných prvků by neměl mít negativní účinky. Příjem prvků je také ovlivněn příjmem jednotlivých prvků. Jeden prvek ovlivňuje příjem jiných prvků. Obsah a příjem jednotlivých prvků v rostlině ovlivňuje i její růstové parametry. Má vliv na tvar, délku i průměr kořenů, hustotu kořenového valu, výšku rostliny a celkovou úrodnost a vitálnost rostliny. Tento vliv kovů na rostliny je způsoben jejich obsahem a funkcí v rostlině. Na úrovni metabo-

lismu, kovy ovlivňují například obsah proteinů, chlorofylu, rychlost fotosyntézy, obsah intercelulárního CO₂ nebo rychlost transpirace (Marschner, 1995).

Z hlediska zaměření mé práce je nutno zmínit vliv manganu na produkci rostlin. V práci Sheng *et al.* (2015) byl zkoumán vliv manganu na pšenici v hydroponické kultivaci po dobu 14 dnů. Mangan byl aplikován jako MnSO₄ v koncentraci 3 mM. Zvýšená přítomnost manganu ovlivnila příjem ostatních sledovaných prvků. Dodané množství manganu mělo za následek vzrůst jeho obsahu z 0,3 mg·g⁻¹ na 9,5 mg·g⁻¹. Tento nárůst manganu negativně ovlivnil obsah jiných prvků a chlorofylu. Obsah draslíku klesl o 20 %, vápníku o 40 %, hořčíku o 40 %, zinku o 25 % a chlorofylu o 55 %. Vlivem manganu došlo ke zpomalení růstu výšky pšenice, ale kořeny se prodloužili. Také došlo ke snížení celkové hmotnosti nadzemní části o 18 % a u kořenů byl tento pokles hmotnosti o 50 %. V práci Demirevska-Kepova *et al.* (2004) byly sledovány biochemické změny v klíčcích ječmenu při expozici mědi (1,5 – 1500 μM) a manganem (18,3 – 18300 μM) po dobu 5 dní. Přítomnost mědi způsobila pokles obsahu chlorofylu (22 %) a proteinů (18 %) při dávce 1500 μM. Mangan ovlivnil obsah chlorofylu také negativně. Došlo k jeho poklesu o 18,5 % při dávce 18300 μM. Obsah proteinů nebyl ovlivněn manganem při žádné koncentraci. V práci El-Fouly *et al.* (2001) byl zkoumán vliv železa (0 – 33,6 μg·g⁻¹), manganu (0 – 3,3 μg·g⁻¹) a zinku (0 – 0,39 μg·g⁻¹) na slunečnici po dobu 6 týdnů. Zvýšená dávka železa pozitivně ovlivnila obsah manganu v listech i v kořenech. Obsah zinku se zvýšil v listech, ale v kořenech došlo ke snížení obsahu s rostoucí dávkou přidávaného železa. Zvyšující se dávka manganu způsobila nejprve strmý nárůst obsahu železa v nadzemní části, avšak s rostoucí dávkou Mn se obsah železa postupně snižoval. V kořenech měl obsah železa podobný průběh. Nejprve strmě vzrostl a následně se s rostoucí dávkou Mn obsah Fe v kořenech snižoval. Stejný trend byl pozorován i v obsahu zinku. Zvyšující se dávka zinku pozitivně ovlivnila obsah železa v nadzemní části, kde s rostoucí dávkou Zn rostl i obsah Fe, ale negativně ovlivnila obsah železa v kořenech, kde s rostoucí dávkou Zn došlo k postupnému snížení obsahu Fe. Zvyšující se dávka Zn ovlivnila obsah manganu v nadzemní části, kde došlo nejprve k nárůstu obsahu a při koncentraci zinku 0,26 μg·g⁻¹ došlo ke strmému snížení obsahu Mn. Obsah manganu v kořenech byl pozitivně ovlivněn zvyšující se dávkou Zn. Také bylo zjištěno, že zvyšující se dávky železa podporují růst. Rostliny, které dostaly více železa, měly více listů s větší plochou a zvětšil se i objem kořenů. Vyšší dávky manganu způsobily zvětšení listové plochy, prodloužily

výšku stonku a zvětšili objem kořenů. Vyšší dávky zinku způsobili mírný nárůst počtu listů, zvětšili plochu listů, ale negativně ovlivnili objem kořenů při nejvyšší dávce ($0,39 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). V práci Kováčik *et al.* (2009) byl heřmánek lékařský vystaven působení mědi a kadmia při dvou koncentracích (60 a $120 \mu\text{M}$) po dobu 7 dnů. Tyto kovy negativně ovlivnily obsah draslíku v listové růžici. Nejvíce to bylo patrné při $120 \mu\text{M}$ mědi, kde došlo k poklesu obsahu draslíku o 42 %. V kořenech byl pozorován také negativní vliv mědi a kadmia na obsah draslíku a také byl nejvíce vidět u koncentrace $120 \mu\text{M}$ Cu. Jak měď, tak kadmium pozitivně ovlivnili obsah železa v kořenech, kde došlo k nárůstu obsahu železa. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u $120 \mu\text{M}$ Cu, kde se obsah železa zvýšil o 49 %.

Necévnaté rostliny, například vodní řasy, mají sice odlišný způsob příjmu prvků, když nemají kořeny, ale mechanismy jsou stejné jako u cévnatých rostlin, proto i u těchto jednodušších organismů zvýšený příjem jednoho prvku ovlivňuje obsah a příjem jiných prvků. V práci Issa *et al.* (1995) byla řasa *Kirchneriella lunaris* vystavena působení několika kovů (Cd, Co, Mn a Ni) o koncentraci 0,1 mM v kombinaci s a bez vápníku o koncentraci 5 mM. Bylo zjištěno, že přijmutím vápníku došlo ke snížení příjmu ostatních kovů. U kadmia o 21,5 %, u kobaltu o 42 %, u niklu o 32 % a nejvíce u manganu o 55 %. Aplikace vápníku k těmto kovům měla za následek zvýšení suché hmotnosti, což je u řas ekvivalent růstu, takzvaný nárůst biomasy. To indikuje, že zvýšení obsahu vápníku, snížilo toxicitu použitých kovů a zlepšilo podmínky pro množení řasy. Tento fakt podporuje i zvýšení obsahu proteinů u každé kombinace s vápníkem. Obsah chlorofylu a celkových pigmentů byl také vyšší u kombinací s vápníkem než u samotných kovů.

Tab. 2: Přehledová tabulka vybraných zemědělských rostlin a obsah vybraných prvků (Bergmann, 1988).

Český název	Latinský název	Ca (mg·g ⁻¹)	Mg (mg·g ⁻¹)	K (mg·g ⁻¹)	Mo (μg·g ⁻¹)	Cu (μg·g ⁻¹)	Zn (μg·g ⁻¹)
Pšenice setá	<i>Triticum aestivum</i>	4 – 10	1,5 – 3	35 – 55	0,1 – 0,3	7 – 15	25 – 70
Ječmen setý	<i>Hordeum vulgare</i>	3 – 10	1,5 – 3	35 – 50	0,1 – 0,3	6 – 12	20 – 60
Kukuřice setá	<i>Zea mays</i>	3 – 10	2,5 – 6	30 – 45	0,2 – 0,5	7 – 15	30 – 70
Brukev řepka	<i>Brassica napus</i>	7 – 20	2,5 – 6	28 – 45	0,5 – 1	6 – 12	20 – 80
Hlávkové zelí	<i>Brassica oleracea capitata</i>	15 – 20	2,5 – 5	30 – 40	0,4 – 0,7	5 – 12	20 – 60
Žito seté	<i>Secale cereale</i>	3,5 – 10	1,5 – 3	28 – 45	0,1 – 0,3	6 – 12	20 – 60
Oves setý	<i>Avena sativa</i>	5 – 10	2 – 4	45 – 58	0,2 – 0,4	6 – 12	25 – 70
Rýže setá	<i>Oryza sativa</i>	2 – 6	2 – 4	18 – 26	0,4 – 1	7 – 12	30 – 70
Červená řepa	<i>Beta vulgaris</i>	6 – 15	2,5 – 8	38 – 70	0,2 – 1	6 – 15	20 – 80
Hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	5 – 20	2,5 – 6	22 – 35	0,4 – 1	7 – 15	25 – 70
Sója luštinatá	<i>Glycine max</i>	6 – 15	3 – 7	25 – 37	0,5 – 1	10 – 20	25 – 60
Okurka setá	<i>Cucumis sativus</i>	50 – 90	5 – 10	25 – 54	0,8 – 2	7 – 15	35 – 80
Hlávkové zelí	<i>Lactuca sativa capitata</i>	12 – 21	3,5 – 6	42 – 60	0,2 – 1	7 – 15	30 – 80
Mrkev obecná	<i>Daucus carota</i>	12 – 20	4 – 8	27 – 40	0,5 – 1,5	7 – 15	30 – 80
Špenát setý	<i>Spinacia oleracea</i>	6 – 12	3,5 – 8	35 – 53	0,3 – 1	7 – 15	20 – 70
Rajče jedlé	<i>Lycopersicum esculentum</i>	30 – 40	3,5 – 8	30 – 60	0,3 – 1	6 – 12	30 – 80
Cibule kuchyňská	<i>Allium cepa</i>	6 – 15	2,5 – 5	25 – 30	0,15 – 0,3	7 – 15	20 – 70

1.1.3 Význam Mn a jeho deficit a toxicita

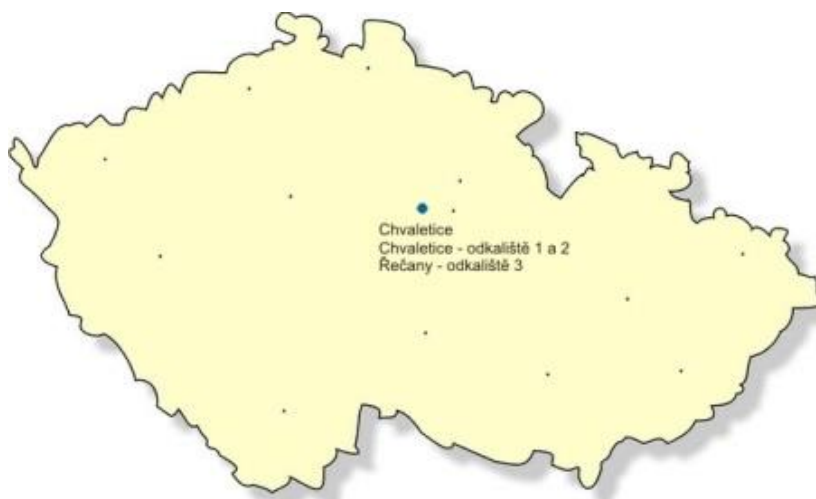
Mangan v kovové (ryzí) formě nemá širší uplatnění a je ekonomicky nerentabilní, proto se v této formě vyrábí pouze sporadicky. V této kovové formě je velmi reaktivní. Všude tam, kde je mangan potřeba, se využívají jeho sloučeniny ve formě halogenidů, oxidů, síranů, dusičnanů, uhličitanů aj. (Heslop, Jones, 1982; Greenwood *et al.*, 1993).



Zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Mangan>

Obr. 1: Mangan jako ryzí kov.

V ČR se manganové rudy nacházejí převážně v Krušných horách, ačkoliv vhodné pro těžbu jsou evidována jen 3 možná ložiska u Chvaletic s odhadovaným množstvím přibližně 138 mil. t. (Jirásek *et al.*, 2009).



Zdroj: http://geologie.vsb.cz/loziska/loziska/loziska_cr.html#MANGAN

Obr. 2: Mapa s ložisky manganu vhodnými pro těžbu.

Mangan je součástí světelné fáze fotosyntézy. Je lokalizován v chloroplastech, kde je součástí fotosystému II a podílí se na vývoji kyslíku v komplexu OEC, a ve vakuolách. Právě proto je nejvíce zastoupen v listech zelených rostlin. Velikost iontu je

podobná Ca a Mg, což může vést k substituci nebo kompetici v příjmu a funkcích. Po přijetí manganu do rostliny přes kořenový systém z vodního výluhu ve formě Mn^{2+} nebo v chelátové formě (jiné formy nejsou pro rostliny biodostupné) dochází k transportu do listů, kde je zabudován do chloroplastu. Také je aktivátorem RNA polymerasy, ačkoliv není nezbytný pro proteosyntézu, a ovlivňuje syntézu lipidů, konkrétně mastných kyselin. Také aktivuje enzymy například malát dehydrogenasu, isocitrát dehydrogenasu nebo PEP (fosfoenolpyruvát) karboxykinasu, kde u čtyřuhlíkatých (C_4) rostlin je nenahraditelný, a také aktivuje enzymy, které se podílí na syntéze látek s aromatickým jádrem například tyrosinu, ligninu, flavonoidů atd. (Marschner, 1995; Taiz *et al.*, 2010).

Nedostatek manganu

Má za následek inhibici růstu rostliny jako celku, jejích kořenů a vede až k celkovému zastavení růstu bočních kořenů. Způsobuje také chlorózu, protože rostlina nemá dostatek manganu pro tvorbu funkčního chlorofylu a tím se inhibuje i chloroplast a dochází k celkovému zpomalení fotosyntézy. Rostlina také produkuje nižší hladinu rozpustných sacharidů (Marschner, 1995; Taiz *et al.*, 2010).

Nadbytek manganu

Nadbytek manganu se projevuje nejčastěji hnědými skvrnami, deformací mladých listů, chlorózou až nekrózou listů kolem žilnatinu u cévnatých rostlin (Marschner, 1995; Taiz *et al.*, 2010). V Tab. 3 je uveden přehled některých zemědělsky významných rostlin a některých řas s empiricky zjištěným množstvím manganu pro optimální růst. V práci Saidi *et al.* (2014), kde byly klíčky slunečnice *Helianthus annuus* vystaveny působení 100 μM manganu a rostoucí koncentraci selenu (0-20 μM), bylo zjištěno, že samotný mangan způsobil inhibici růstu biomasy a prudce zvýšil akumulaci manganu jak v kořenech, tak v listech. Následná aplikace selenu zmírnila negativní účinek manganu a došlo ke zlepšení růstových parametrů. V práci Liu *et al.* (2010) došlo ke stimulaci růstu kořenů u manganového hyperakumulátoru *Polygonum perfoliatum* pouze při nižší koncentraci manganu (5 mM). Při vyšší koncentraci (10 a 15 mM) došlo k inhibici růstu kořenů. U této rostliny došlo k minimální změně v růstu ostatní biomasy a obsahu rozpustných proteinů. Naproti tomu u rostliny ze stejné čeledi *Polygonum hydropiper* došlo k signifikantnímu snížení těchto parametrů při stejném pokusu. Při podobné práci Feng *et al.* (2009) byl testován vliv křemíku (1 mM) a manganu (0,6 mM) včetně kom-

binace těchto dvou kovů na klíčení okurky. Přítomnost samotného manganu způsobila inhibici růstu biomasy jak nadzemní části, tak kořenů. Přídavek křemíku snížil negativní působení manganu, což se projevilo zvýšením růstu biomasy. Podobné výsledky měl i pokus s klíčením rýže v práci Srivastava *et al.* (2011), kde byla rýže klíčena v přítomnosti manganu o koncentraci 3 a 6 mM. Přítomnost manganu v těchto koncentracích po dobu 20 dnů vyvolal inhibici růstu kořenů a tvorby biomasy a způsobil pokles obsahu neproteinových thiolů v kořenech a snížil obsah proteinů s thio- skupinou.

Odpověď necévnatých rostlin na přítomnost kovů může být odlišná. V práci Li *et al.* (2007) byla mikrořasa *Pavlova viridis* vystavena působení kobaltu a manganu v koncentracích 0-200 μ M. Kobalt způsobil retardaci růstu biomasy a snížil obsah proteinů. Naproti tomu přítomnost manganu neovlivnila růst biomasy při žádné koncentraci. Při koncentraci 10 a 20 μ M došlo k nárůstu obsahu proteinů. V práci Ushizaka *et al.* (2011) použili chelatovaný železitý ion a mangan s koncentracemi 5 a 25 nM v kultivačním mediu pro mořskou řasu *Talassiosira weissflogii*. Výsledkem pokusu bylo, že řasy bez přítomnosti manganu téměř nerostly. Až s přídavkem manganu začali tvořit značné množství biomasy.

Tab. 3: Optimální obsah manganu ve vybraných rostlinách (Bergmann, 1988; Carcea et al., 2015; Rodrigues et al., 2015).

Český název	Latinský název	Mn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Pšenice setá	<i>Triticum aestivum</i>	30 – 100
Ječmen setý	<i>Hordeum vulgare</i>	25 – 100
Kukuřice setá	<i>Zea mays</i>	40 – 100
Brukev řepka	<i>Brassica napus</i>	30 – 150
Brukev zelná - květák	<i>Brassica oleracea botrytis</i>	30 – 100
Hlávkové zelí	<i>Brassica oleracea capitata</i>	30 – 100
Kedluben	<i>Brassica oleracea gongylodes</i>	50 – 100
Žito seté	<i>Secale cereale</i>	20 – 100
Oves setý	<i>Avena sativa</i>	20 – 100
Rýže setá	<i>Oryza sativa</i>	40 – 100
Červená řepa	<i>Beta vulgaris</i>	35 – 100
Podzemnice olejná	<i>Arachis hypogaea</i>	50 – 100
Fazol obecný	<i>Phaseolus vulgaris</i>	40 – 100
Hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	30 – 100
Sója luštinatá	<i>Glycine max</i>	30 – 100
Jetel luční	<i>Trifolium pratense</i>	35 – 100
Okurka setá	<i>Cucumis sativus</i>	60 – 120
Křen selský	<i>Amoracia rusticana</i>	60 – 120
Mrkev obecná	<i>Daucus carota</i>	50 – 120
Chřest lékařský	<i>Asparágus officinalis</i>	25 – 100
Špenát setý	<i>Spinacia oleracea</i>	40 – 100
Modro-zelená řasa	rod <i>Arthrospira</i>	20 – 110
Červená řasa	<i>Osmundea pinnatifida</i>	10 – 15
Červená řasa	<i>Grateloupia turuturu</i>	20 – 30
Červená řasa	<i>Gracilaria gracilis</i>	15 – 25
Hnědá řasa	<i>Sargassum muticum</i>	10 – 15
Hnědá řasa	<i>Saccorhiza polyschides</i>	5 – 10
Zelená řasa	<i>Codium tomentosum</i>	15 – 25
Zelená mikrořasa	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	20 – 40

Dostupnost manganu

Závisí na několika faktorech. Jeden z hlavních faktorů je pH půdního roztoku. Biodostupnost Mn je nejvyšší při pH okolo 2-3. S rostoucí hodnotou pH (od 5,5) klesá dostupnost manganu pro rostliny, až do pH 8, kde se dostupnost zase zvyšuje (Taiz *et al.*, 2010). To ovšem v praxi neplatí, protože se pro zemědělské účely pH půdy upravuje vápněním, které způsobuje, že se mangan dostává do špatně rozpustných forem a tak se jeho praktická využitelnost pro rostlinu nezvyšuje. Dále je příjem manganu ovlivněn celkovou vlhkostí prostředí, kde platí, že čím větší vlhkost půda má, tím horší je příjem manganu. Dále je příjem ovlivněn obsahem organické hmoty, která brání příjmu manganu rostlinou. Typy půd, které jsou chudé na biodostupný mangan jsou: zamokřené, rašelinné, mokřadní a humózní písčité (Marschner, 1995). Stručný přehled půdních typů, druhů vod a obsah manganu v nich je uveden v Tab. 4.

Tab. 4: Přehledová tabulka obsahu manganu v různých půdních a vodních typech (Kabata-Pendias, 2011; Pitter, 1999).

Typy půd	Obsah Mn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Zemská kůra	716 – 1400
Kyselé půdy	350 – 1200
Jílovité půdy	400 – 850
Pískovité půdy	100 – 500
Vápenaté půdy	200 – 1000
Křemičité půdy	850 – 2000
Arenozoly	7 – 2000
Podzoly	50 – 9200
Kambizoly	100 – 3900
Kalcizoly	50 – 7750
Histozoly	10 – 2200
Typy vod	Obsah Mn ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
Povrchová voda	0,01 – 1,85
Podzemní voda	0,1 – 50
Pitná voda	0,05 – 0,1
Mořská voda	0,002 – 0,004

Příjem manganu a jeho transport

Příjem manganu je podle nejnovějších výzkumů metabolicky řízen (Skinner *et al.*, 2005). Mangan se dostává z půdy do kořenů rostlin aktivním transportem ve formě kationtu Mn^{2+} stejně, jako například hořčík nebo vápník. Tento aktivní příjem zajišťuje řada transportních mechanismů, které se starají o příjem a transport látek mezi membránami (krátká vzdálenost), zajišťují radiální posun látek v kořenu (střední vzdálenost) a rozvádějí látky pomocí xylémového a floémového transportu (dlouhá vzdálenost) v organismu a fungují proti koncentračnímu gradientu. Mangan je přenášen několika druhy a typy přenašečů, například přenašeč SMF1 z rodiny NRAMP, IRT1 z rodiny ZIP, aj (Socha *et al.*, 2014).

Je také možný pasivní transport Mn^{2+} v případě, že je jeho obsah v půdním roztoku vysoký až toxický. Po jeho přijetí do rostliny je mangan rychle transportován uvnitř rostliny. Zdá se proto nepravděpodobné, že by byl mangan vázán do nerozpustných organických ligandů, protože jinak by nebylo možné, tak rychlého transportu kořenovou tkání nebo xylemovou tekutinou. Komplex interakcí mezi kořeny rostlin a mikroorganismy žijícími v půdě může snížit biodostupnost manganu (Marschner *et al.*, 2005). Deficit manganu je poměrně běžný problém při růstu rostlin na neutrální, či vápenaté půdě. V takových půdách dochází vlivem interakce kořenů rostlin s mikroorganismy k oxidaci Mn^{2+} na Mn^{3+} nebo Mn^{4+} , které jsou pro rostliny nedostupné (Kabata-Pendias, 2011).

Mangan byl nalezen ve volné Mn^{2+} formě v rostlinných kapalinách a extraktech. To nasvědčuje, že je mangan transportován pomocí organických molekul, které byli nalezeny ve floémovém exudátu. V tomto exudátu bylo naměřeno mnohem méně Mn než v listové tkáni. To vede k závěru, že mírný transport Mn floémem je možný a odpovídá nízkým koncentracím manganu v plodech a semenech. Mangan je přednostně transportován do dělicích tkání a do mladých rostoucích tkání. To potvrzuje i studie Heenana a Campbella (1980), kteří zjistili, že se mangan akumuluje v listech a jeho množství přibývá se stárnutím listu. Také zjistili, že malé množství manganu ze starých listů je schopno přemístění do nových rostoucích listů, které mají deficit manganu. To potvrzuje fakt, že má mangan nízkou mobilitu v rostlině, ale je transportu schopen, i když je značně limitován. Rozložení manganu v rostlině není rovnoměrné a je také závislé na vegetační fázi rostliny (Kabata-Pendias, 2011).

1.1.4 Interakce kovů s manganem

Mangan je znám i svými interakcemi s jinými kovy jak v biologických tak i v geochemických systémech. Z geochemických interakcí se jedná například o vysokou afinitu oxidů manganu ke kobaltu. Tato reakce byla potvrzena, když se kobalt z půdy s vysokým obsahem tohoto kovu stal pro rostliny nedostupný už při průměrném množství manganových oxidů v této půdě. Silná absorpční kapacita oxidů manganu může řídit dostupnost i jiných prvků rostlinám. Je znám antagonický vztah mezi manganem a železem u kyselých půd s vysokým obsahem dostupného manganu. Železo s manganem mají provázané metabolické funkce a pro správný a zdravý růst rostlin musí být ve správném poměru ($\text{Fe} : \text{Mn} = 1,5 - 2,5$). Pod tímto rozsahem se projevují toxické účinky manganu a deficit železa. Nad tímto rozsahem se zase projevuje toxicita železa spojená s deficitem manganu (Kabata-Pendias, 2011). Z tohoto vyplývá, že se toxicita manganu nebo železa dá snížit aplikací druhého kovu do půdy nebo, v případě vodních řas, i do vody/kultivačního média (Ushizaka *et al.*, 2011). Také bylo dokázáno, že přidavek manganu snižuje koncentraci kadmia ve všech orgánech rostliny *Phytolacca Americana* (Peng *et al.*, 2008). Z interakcí manganu s ostatními kovy je znám antagonický nebo synergický efekt v příjmu kadmia a olova (záleží na dalších podmínkách, který efekt se se projeví) a snížení příjmu manganu v přítomnosti zinku. Interakce manganu s křemíkem je také již prozkoumaná. Bylo dokázáno, že vhodná dávka křemíku napomáhá snížení toxicity manganu a jeho rovnoměrnější distribuci v rostlině. Rostliny s deficitem křemíku lépe přijímají mangan než rostliny, které mají dostatek křemíku (Feng *et al.* 2009). Další antagonistický efekt v příjmu manganu způsobuje interakce s vápníkem, hořčíkem, draslíkem, sodíkem a dusíkem. Přítomnost manganu potlačuje příjem vápníku a způsobuje jeho deficit. Ovšem za určitých podmínek vápník snižuje toxicitu manganu (Kabata-Pendias, 2011).

Také můžeme tento efekt nazvat kompeticí v aktivním příjmu prvků. V práci Issa *et al.* (1995) byla řasa *Kirchneriella lunaris* vystavena působení kadmia, kobaltu, manganu a niklu o koncentraci 100 μM a kultivační média s těmito kovy byli následně obohaceny o 5 mM vápníku. Přidání vápníku způsobilo snížení příjmu daného kovu, což bylo nejzřetelnější právě u manganu, kde se příjem snížil o téměř 55 % (Cd^{2+} o 21,6 %, Co^{2+} o 42,2 %, Ni^{2+} o 32,1 %). Byl také zaznamenán zvýšený nárůst biomasy, chlorofylu a karotenoidů u těch řas, kde byl přidán vápník.

1.2 Abiotický stres v rostlinách

1.2.1 Oxidační stres

V případě, že jsou rostliny vystaveny abiotickým stresovým podmínkám, například působením těžkých kovů, teplotními extrémy, vysokou intenzitou záření, salinitou, nedostatkem minerálních živin nebo nedostatkem vody, dochází k narušení rovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich odbouráváním. Zvýšená produkce ROS vede k oxidačnímu poškození různých buněčných struktur, včetně proteinů, DNA nebo membránových lipidů (Spsychalla *et al.*, 1990). V případě, že jsou rostliny vystaveny stresovým podmínkám, například působením těžkých kovů, teplotními extrémy, vysokou intenzitou záření, salinitou, nedostatkem minerálních živin nebo nedostatkem vody, dochází k narušení rovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich odbouráváním. Zvýšená produkce ROS vede k oxidačnímu poškození různých buněčných struktur, včetně proteinů, DNA nebo membránových lipidů (Spsychalla *et al.*, 1990).

Pojmem radikály nebo také volné radikály se rozumí všechny atomy, molekuly nebo ionty schopné nezávislé existence a musejí obsahovat alespoň jeden nespárovaný elektron. Jejich vznik probíhá přijetím nebo uvolněním jednoho volného elektronu. Také mohou vzniknout při štěpení kovalentních vazeb. Při následném kontaktu dvou volných radikálů dojde ke spojení jejich nespárovaných elektronů a vznikne kovalentní vazba (Halliwell, 2007). Kyslík se jako plyn objevil ve významném množství v zemské atmosféře před 2,2 mld. let vlivem fotosyntetické aktivity sinic. To způsobilo jeho akumulaci a tím došlo ke změně životního prostředí, ve kterém se zvýšil segregáční tlak na organismy, což vedlo k nárůstu mutací a dalšímu vývoje organismů (Halliwell, 2006). Atmosférický kyslík je v základním stavu biradikál, který obsahuje dva nespárované elektrony s paralelními spiny. V tomto neaktivovaném stavu je málo reaktivní. Pro aktivaci kyslíku je potřeba buď absorbovat dostatečné množství energie na převrácení jednoho ze spinů, nebo monovalentní redukce. V prvním případě se z tripletového stavu dostane kyslík do singletového stavu, kde má elektrony s opačnými spiny a tím se stává reaktivnější. Toto se děje převážně v chloroplastech, kde je vysoká hladina energie. V druhém případě dostáváme po postupné monovalentní redukci superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku, hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a nakonec vodu (Laloi *et al.*, 2004).

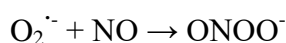
Rostlinné buňky produkují ROS kontinuálně, jako vedlejší produkt aerobního metabolismu, například neenzymatickým přenosem elektronů na molekulární kyslík při fotosyntéze v chloroplastu nebo dýchání v mitochondriích. Druhou možností je enzymatické působení, například oxidace mastných kyselin v peroxisomech. Produkce ROS v buňkách za ideálních podmínek je nízká ($240 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1} \text{O}_2^-$ a $0,5 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$). Působením stresu se produkce zvýší ($240-720 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1} \text{O}_2^-$ a $5-15 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$). Toto zvýšení tvorby ROS vlivem stresu ohrožuje buňku. Při nízkých koncentracích fungují ROS jako signální molekuly, které jsou důležité při regulaci rostlinného metabolismu a vývinu (Mittler, 2002).

Vlivem stresových podmínek dochází v mitochondriích k redukci elektronového transportu s následnou produkcí superoxidového radikálu. Ten je často výsledkem zvýšené hladiny ubisemichinonu v třetím mitochondriálním komplexu. Ubisemichinon se v přítomnosti kyslíku autooxiduje a tím se zvyšuje hladina tohoto radikálu (Raha *et al.*, 2000). Hlavním zdrojem ROS (převážně H_2O_2) v apoplastech jsou peroxidasy buněčné stěny, které se aktivují alkalickým pH, například oxalát oxidasy, které katalyzují přeměnu oxalátu na CO_2 a H_2O_2 nebo amin oxidasy, které oxidují biogenní aminy na NH_3 a H_2O_2 (Bolwell *et al.*, 1997). Hlavní metabolické procesy, které jsou odpovědné za tvorbu H_2O_2 v různých typech peroxisomů jsou fotorespirační reakce, enzymatické reakce flavinových oxidas a β -oxidace mastných kyselin (del Rio *et al.*, 1992).

1.2.2 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je bioaktivní signální molekula, které byla poprvé popsána v organismu savců, v kterém se účastní mnoha fyziologických procesů, například relaxace hladkého svalstva nebo komunikace mezi neurony. Jedny z prvních výzkumů ohledně působení NO na rostliny se zajímali o toxické účinky oxidů dusíku na fotosyntetický aparát rostlin. NO byl popsán jako signální molekula v roce 1998. Mnohé výzkumy potvrdili jeho četné úlohy v buněčných procesech, například růst a vývin (Guo *et al.*, 2005), stárnutí a také jako odpověď rostlin na biotické a abiotické stresové faktory (Asai *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015). Hlavním enzymatickým zdrojem oxidu dusnatého v rostlinách je nitrát reduktasa (NR), která je schopná syntetizovat NO z NO_2^- za přítomnosti NAD(P)H. Tato reakce je závislá na koncentraci dusitanu a dusičnanu v rostlinném pletivu. Hlavní úlohou NR není syntéza NO, ale redukce NO_3^- , proto je syntéza NO jen 1 % z celkové redukční aktivity NR (Rockel *et al.*, 2002).

NO je volný radikál (RNS – reactive nitrogen species) s relativně dlouhým časem existence (3-5 s) při srovnání s jinými ROS. Je jednou z nejmenších hydrofobních molekul s vysokou difuzí ($4,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ v H_2O). Díky těmto vlastnostem může NO lehce procházet přes lipidové membrány nebo procházet hydrofilními částmi buňky (Arasimowicz *et al.*, 2007). Oxid dusný je vysoce reaktivní molekula, která se v přítomnosti atmosférického kyslíku oxiduje na několik dalších oxidů (NO_2^\cdot , N_2O_3 , N_2O_4), které jsou schopné dále reagovat s buněčnými aminy a thioley. Také snadno reaguje se superoxidem, kdy se vytvoří peroxyinitritový iont (ONOO^-).



Tento iont způsobuje vážná poškození buněčných struktur, protože reaguje s thiolovými skupinami proteinů a polynenasycenými mastnými kyselinami (Ma *et al.*, 2013; Wendehehenne *et al.*, 2001). Za běžných podmínek, které jsou v rostlinném organismu, se může NO transformovat do jiné redoxní formy. Mohou vzniknout nitrosoniový kation (NO^+), nitroxylový anion (NO^-) a další (Arasimowicz *et al.*, 2007; Neill *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2003).

Působení stresoru v buňce vede k aktivaci specifických odpovědí. Stresový stimul je rozpoznán receptory buněčné membrány a ty začnou formovat signální molekuly, které přizpůsobí obraně odpovědi organismu. Mezi tyto molekuly patří i NO (Arasimowicz *et al.*, 2007). Zvýšený obsah oxidu dusnatého také zvyšuje biosyntézu některých hormonů jako je kyselina jasmonová nebo hypericinu. Dále také modifikuje aktivitu akonitasy, která katalyzuje izomerizaci citrátu na izocitrát. NO ovlivňuje genovou expresi a může regulovat hladinu ROS v buňkách tak, že inhibuje katalasy a peroxidasy (Arasimowicz *et al.*, 2007). Tyto modifikace enzymů, respektive proteinů, umožňují buňkám pružně reagovat na různé podněty.

Můžeme říci, že přítomnost NO pomáhá chránit buňku před oxidačním stresem. Pokud je rostlina vystavena působením kovů, tak se zvýší produkce NO molekul a tím se spustí obraná odpověď organismu. Přítomnost NO snižuje oxidační stres způsobený manganem v listech rýže, která byla vystavena působení 15 mM chloridu manganatého, po dobu 48 hod. Přítomnost samotného manganu způsobil nárůst H_2O_2 a prudce zvýšil aktivity antioxidantních enzymů GPX, CAT, SOD, GR a APX. Také došlo ke snížení obsahu GSH a AsA. Po aplikaci SNP (zdroj NO v kultivačním roztoku) došlo ke snížení produkce H_2O_2 a také se snížila aktivita všech sledovaných antioxidantních

enzymů. Obsah GSH se ještě více snížil, ale došlo k nárůstu obsahu AsA. (Srivastava *et al.*, 2012). NO má také protektivní účinky při oxidačním stresu vyvolaném kadmíem, mědí a amonnými kationty v listech rýže (Hsu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005) a snižuje toxicitu hliníku v kořenech *Cassia tora* (Wang *et al.*, 2005).

1.3 Obranné mechanismy rostlin

Každá součást buňky má celou řadu antioxidačních mechanismů podílejících se na udržování rovnováhy stavu organismu. Je to nezbytné, vzhledem k neustálé tvorbě ROS a jejich reaktivitě a vysoké toxicitě. Tyto mechanismy můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin:

- enzymatické mechanismy
- neenzymatické mechanismy

Do enzymatických patří například askorbát peroxidasa (APX), glutathion peroxidasa (GPX), superoxiddismutasa (SOD) a katalasa (CAT). Do neenzymatických patří například kyselina askorbová (AsA), redukovaný glutathion (GSH), karotenoidy a celá řada fenolových látek. Buňky se nespolehají pouze na jednu metabolickou dráhu při odbourávání ROS, ale disponují více možnostmi jak odstranit ROS (Mittler *et al.*, 2004; Taiz *et al.*, 2010; Pradedova *et al.*, 2011).

1.3.1 Enzymatické mechanismy

Peroxidasy (POX)

Peroxidasy jsou oxidoreduktasy, které katalyzují oxidaci různých skupin organických látek s využitím H_2O_2 jako koncového akceptoru elektronů. Rostlinné peroxidasy mají několik izoform, které využívají různé reduktanty a jsou umístěné v různých částech buňky, převážně v buněčné stěně a ve vakuolách (Khan *et al.*, 2006).

Askorbát peroxidasa (APX) katalyzuje odstranění H_2O_2 v askorbát-glutathionovém cyklu, kdy je využíván askorbát jako donor elektronů. APX je soubor několika izoform tohoto enzymu, které se váží na tylakoidní a mikrosomální membrány a jsou i v cytoplasmě a apoplastu (Noctor *et al.*, 1998). APX má nižší afinitu k H_2O_2 než CAT (přibližně v řádu μM), ale má důležitou funkci při regulaci tvorby ROS a také se podílí na jemné modulaci hladiny ROS, které následně plní důležitou signální funkci v rostlinném organismu (Mittler, 2002; Ahmad *et al.*, 2012).

Glutathion peroxidasa (GPX) odbourává kromě H_2O_2 i produkty peroxidace lipidů a zároveň je hlavním zdrojem ochrany proti nízkým hladinám oxidačního stresu (Ahmad *et al.*, 2008).

Superoxid dismutasa (SOD)

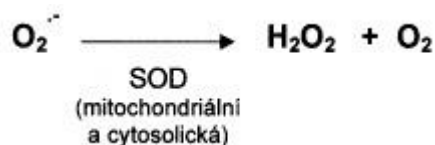
Patří do skupiny metaloenzymů a katalyzují odbourávání superoxidu na H_2O_2 . Podle kofaktoru se SOD rozdělují do tří skupin. První je Fe SOD, která se primárně nachází v chloroplastech. Druhou je Mn SOD, se vyskytuje převážně v mitochondriích a v peroxisomech. Třetí skupinou je $Cu-Zn$ SOD, která se nachází v chloroplastech, peroxisomech, cytoplazmě a v extracelulárním prostoru (Raha *et al.*, 2000; Alscher *et al.*, 2002).

SOD, které obsahují železo, jsou zřejmě nejstarší skupinou a vyskytují se jak v prokaryotických tak eukaryotických buňkách. Tento typ SOD je inaktivovaný peroxidem vodíku a je rezistentní proti inhibici kyanidem draselným. Fe SOD se může dále rozdělit na dva typy. První je složen ze dvou stejných proteinových jednotek a druhý je složen ze čtyř větších proteinových jednotek. Tento druhý typ Fe SOD se nachází ve většině vyšších rostlin (Alscher *et al.*, 2002).

Z Fe SOD se v minulosti vlivem prostředí, zvláště kyslíku, vyvinulo Mn SOD, protože se snížilo množství dostupného Fe^{2+} . Známé jsou dva typy Mn SOD. První typ je homodimerický a druhý typ je homotetramerický s jedním atomem Mn na podjednotku. Odstranění Mn z reakčního centra enzymu způsobí ztrátu katalytické aktivity a nelze ho nahradit jiným kovem (Fridovich, 1997).

U $Cu-Zn$ SOD také rozlišujeme dva typy. První se nachází v cytoplazmě a jsou homodimerické. Druhý typ se nachází v chloroplastech a v extracelulární membráně a je homotetramerický. $Cu-Zn$ SOD je zřejmě zodpovědná za katalýzu lignifikace a ochranu buňky před letálními mutacemi (Kim *et al.*, 2015).

Regulace všech forem SOD je nezávislá na stupni oxidačního stresu, ale doposud není znám mechanismus na molekulové úrovni. Nejpravděpodobnější je, že reakci spouštějí produkty peroxidace lipidů, které se difúzí dostávají až k jádru a tím spouštějí transkripci konkrétních SOD genů. Každý typ SOD odpovídá jinak na různé formy stresu (Lu *et al.*, 2015; Fridovich, 1997).



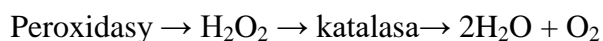
Obr. 3: Odbourání superoxidu enzymem superoxid dismutasou

Katalasa (CAT)

Katalasy mají velký podíl na antioxidační ochraně organismů. Katalyzují rozklad peroxidu vodíku, který vznikl například odbouráním superoxidu SOD, na vodu a kyslík. Katalasy se u rostlin nacházejí převážně v peroxisomech a některé izoformy i v mitochondriích. Jsou velmi citlivé na světlo, mají vysokou afinitu k H_2O_2 (v řádu mM) a jsou velmi účinné při odbourávání H_2O_2 . Jedna molekula CAT zvládne rozložit až 0,1 mil molekul H_2O_2 za sekundu (Mittler, 2002). Existují tři skupiny katalas. Jsou to:

- monofunkční katalasy
- bifunkční katalasy
- katalasy s obsahem manganu

Nejrozšířenější katalasou je monofunkční CAT s množstvím izoform. Všechny tyto izoformy jsou tetramery. Bifunkční katalasy jsou příbuzné s eukaryotickými APX a vyskytují se hlavně v cyanobakteriích a v houbách. Katalasy s manganem v reakčním centru byly objeveny v mikroorganismech (Smirnoff, 2005).



Tyto jednotlivé enzymy jsou součástí antioxidačního mechanismu ochrany rostlin a pracují jako jeden celek. Některé se navzájem doplňují, jiné zase zpracovávají produkty vytvořené předešlým enzymem. Jejich spolupráce a funkce celého mechanismu je vidět například v práci Saidi *et al.* (2014), kde byly klíčky slunečnice *Helianthus annuus* vystaveny působení 100 μM manganu a rostoucí koncentraci selenu (0-20 μM). Samotný mangan způsobil zvýšení produkce H_2O_2 , nárůst obsahu proteinových karbonylů (PCO) a zvýšení peroxidace lipidů, což se projevilo nárůstem obsahu malondialdehydu (MDA). Následná aplikace selenu zmírnila oxidační poškození, což se projevilo snížením H_2O_2 , PCO a MDA. Selen také zvýšil aktivitu katalasy (CAT), askorbát peroxidasy (APX) a glutathion peroxidasy (GPX) a zároveň snížil aktivitu superoxid dismutasy (SOD). Při podobné práci Feng *et al.* (2009) byl testován vliv křemíku (1 mM) a

manganu (0,6 mM) včetně kombinace těchto dvou kovů na klíčení okurky. Přítomnost samotného manganu způsobila prudký nárůst H_2O_2 a látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou. Také došlo k nárůstu aktivit APX, GR, GPX a SOD a snížila se aktivita CAT. Přídavek křemíku snížil negativní působení manganu, což se projevilo snížením produkce H_2O_2 a látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou. Také došlo ke změnám u antioxidantních enzymů, kde došlo ke snížení aktivity SOD a GPX a ke zvýšení aktivity APX, GR a CAT. Podobné výsledky měl i pokus s klíčením rýže v práci Srivastava *et al.* (2011), kde byla rýže klíčena v přítomnosti manganu o koncentraci 3 a 6 mM. Přítomnost manganu v těchto koncentracích po dobu 20 dnů vyvolal zvýšenou produkci superoxidu, H_2O_2 a nárůst obsahu látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou. Také došlo ke zvýšení aktivity GPX, GR a APX a ke snížení CAT aktivity, jak v kořenech, tak i v nadzemní části.

Odpověď necévnatých rostlin na přítomnost kovů může být jiná, než u cévnatých rostlin. V práci Li *et al.* (2007) byla mikrořasa *Pavlova viridis* vystavena působení kobaltu a manganu v koncentracích 0-200 μM . Kobalt při koncentracích 20 a 50 μM způsobil signifikantní nárůst obsahu MDA a způsobil zvýšení CAT a GPX aktivity, přičemž aktivita SOD zůstala nezměněna, s výjimkou koncentrací 20-100 μM . Přítomnost manganu v koncentraci 100 a 200 μM způsobila nárůst aktivity CAT a GPX. Aktivita SOD se nezměnila při žádné koncentraci podobně jako obsah MDA. V práci Ushizaka *et al.* (2011) použili chelatovaný železitý ion a mangan s koncentracemi 5 a 25 nM v kultivačním mediu pro mořskou řasu *Talassiosira weissflogii*. Výsledkem pokusu bylo, že řasy bez přítomnosti manganu měli velmi nízkou aktivitu SOD. Až s přídavkem manganu došlo k nárůstu aktivity SOD. V Tab. 5 je uvedený stručný přehled reakcí antioxidantních enzymů na přítomnost manganu u různých rostlin, s různými koncentracemi manganu a s různou délkou expozice.

Tab. 5: Přehledová tabulka účinku manganu na aktivity antioxidantních enzymů ve vybraných rostlinách

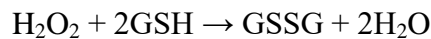
Organismus	Enzym	Konc. (mM)	Expozice (dny)	Efekt	Zdroj
Rýže	APX/ GPX/ CAT/ SOD/ GR	6	10	↑ / ↑ / ↑ / ↑ / ↑	Srivastava <i>et al.</i> , 2011
Řasa <i>Pavlova viridis</i>	GPX/ CAT/ SOD	0,2	15	↑ / ↑ / ↔	Li <i>et al.</i> , 2007
Okurka	APX/ GPX/ CAT/ SOD/ GR	0,6	16	↑ / ↑ / ↓ / ↑ / ↑	Feng <i>et al.</i> , 2009
Řepka	APX/ GPX/ CAT/ GR	5	10	↓ / ↑ / ↑ / ↑	Kováčik <i>et al.</i> , 2014
Kukuřice	APX/ GPX/ CAT/ GR	5	10	↑ / ↑ / ↑ / ↑	Kováčik <i>et al.</i> , 2014
Ječmen	APX/ GPX/ CAT/ GR	5	10	↑ / ↑ / ↑ / ↑	Kováčik <i>et al.</i> , 2014
Pšenice	APX/ GPX/ CAT/ GR	5	10	↑ / ↑ / ↑ / ↑	Kováčik <i>et al.</i> , 2014
Heřmánek – listy	APX/ GPX/ GR	1	7	↑ / ↓ / ↔	Kováčik <i>et al.</i> , 2014
Heřmánek – kořeny	APX/ GPX/ GR	1	7	↔ / ↔ / ↓	Kováčik <i>et al.</i> , 2014
Slunečnice	APX/ GPX/ CAT/ SOD	0,1	4	↓ / ↓ / ↓ / ↑	Saidi <i>et al.</i> , 2014
Mořský salát	CAT/ SOD	$1,8 \cdot 10^{-3}$	0,3	↑ / ↑	Pereira <i>et al.</i> , 2014
Fytoplankton	CAT/ SOD	0,1	90	↑ / ↑	Vega-López <i>et al.</i> , 2013
Brukev sítinovitá	APX/ GPX/ CAT/ SOD/ GR	2	7	↑ / ↑ / ↓ / ↑ / ↑	Kaur <i>et al.</i> , 2011
Grep cv. Combier	CAT/ SOD	15	105	↑ / ↔	Mou <i>et al.</i> , 2011
Řasa <i>Thalassiosira weissflogii</i>	SOD	$5 \cdot 10^{-6}$	14	↑	Ushizaka <i>et al.</i> , 2011

↑ - nárůst aktivity, ↓ - pokles aktivity, ↔ - nezměněná aktivita; APX – askorbát peroxidasa, GPX – glutathion peroxidasa, CAT – katalasa, SOD – superoxid dismutasa, GR – glutathion reduktasa

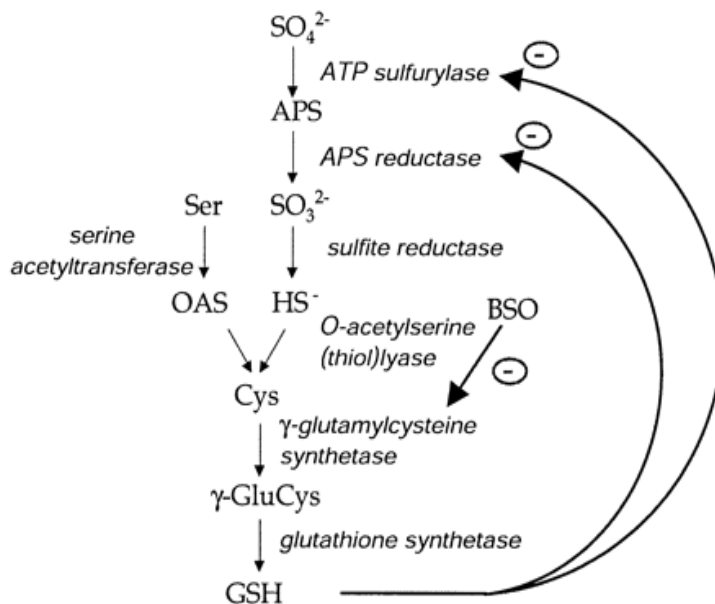
1.3.2 Neenzymatické mechanismy

Redukovaný glutathion (GSH)

Glutathion je tripeptid, který je složen z α -glutamyl-cystenyl-glycinu. Nachází se ve všech buněčných strukturách, jako jsou vakuoly, chloroplasty, mitochondrie, endoplazmatické retikulum nebo v cytoplazmě. Glutathion se v rostlině syntetizuje ve dvou krocích. V prvním kroku se vytvoří glutamylcystein z glutamátu a cysteinu. V druhém kroku se díky působení glutathion syntasy naváže glycin v přítomnosti Mg^{2+} . Glutathion v rostlině plní mnoho funkcí. Je hlavním zdrojem neproteinových thiolů v buňkách a je velmi dobrým antioxidantem. V chloroplastech ve spolupráci s askorbátem plní důležitou úlohu při odbourávání superoxidu a H_2O_2 (Ahmad *et al.*, 2012).



V buňkách převládá redukovaná forma glutathionu. Poměr mezi redukovaným a oxidovaným glutathionem (GSSG) je asi 100:1. Správný poměr GSH:GSSG zajišťuje enzym glutathion reductasa (GR). Při redukci GSSG na GSH se oxiduje NADPH (Garai-Ibabe *et al.*, 2013). GSH je produktem metabolismu síry a zároveň je i přenašečem její redukované formy.

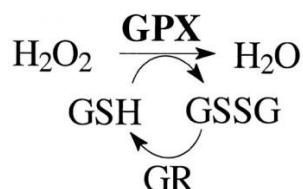


Zdroj:

<http://jxb.oxfordjournals.org/content/55/398/837/F1.expansion>

Obr. 4: Syntéza glutathionu ze síranu (Hartmann *et al.*, 2004).

Pokud je rostlina vystavena stresu, tak se aktivita GR může zvýšit, což potvrzuje antioxidační funkci glutathionu. Redukovaný glutathion se spotřebovává a zvyšuje se podíl GSSG. Aktivita GR se proto musí zvýšit, aby bylo dostatek redukovaného glutathionu.



Obr. 5: Regenerace GSH enzymem glutathion reduktasou (GR).

GSH také stabilizuje membránové struktury tím, že odstraňuje acylové zbytky, které vznikají při peroxidaci lipidů. Také je schopný reagovat s NO za vzniku S-nitroso-glutathionu (GSNO). Tato látka je považována za stabilní transportní formu pro oxid dusnatý, jako signální molekulu. Zároveň je i prekurzorem fytochelatinů a slouží i jako substrát pro glutathion-S-transferasy, které katalyzují několik konjugačních reakcí za účelem odbourání xenobiotik (Habig *et al.*, 1974; Mleiki *et al.*, 2015; Smirnov, 2005).

Kyselina askorbová (AsA)

Kyselina askorbová, známá také jako vitamín C, je důležitý antioxidant. Je rozpustná ve vodě a v rostlinných pletivech se vyskytuje ve formě askorbátu. Účastní se detoxifikace organismu vychytáváním ROS a redukuje H_2O_2 na vodu v askorbát-glutathionovém cyklu. Chrání buněčné membrány regenerací α -tokoferolu a také funguje jako kofaktor violaxantin deepoxidasy v xantofylovém cyklu, čímž se minimalizuje poškození způsobené oxidačními procesy (Smirnov, 2005). Askorbát se nachází ve všech rostlinných pletivech, ale nejvíce se vyskytuje v chloroplastech, kde se nachází 30-40 % z celkového množství askorbátu. Je syntetizován v mitochondriích a odtud se transportuje do dalších buněčných částí, pomocí difúze nebo elektrochemického gradientu. Ovlivňuje mnoho fyziologických procesů, včetně regulace růstu, diferenciaci a metabolismu rostlin (Davey *et al.*, 2000; Hong-bo *et al.*, 2008).

Fenolové látky

Tyto látky jsou důležité nejenom pro svou strukturální úlohu v rostlinách, ale i pro svou schopnost chránit rostliny proti vlivu různých abiotických i biotických stresům. Jejich syntézu ovlivňuje celá řada environmentálních faktorů, které jsou schopné způsobit

oxidační stres organismu, a to například vysoká intenzita záření, UV záření, nízké teploty, přízemní ozón (LA smog) nebo škůdci (Smirnoff, 2005). Fenolové látky jsou schopné odbourávat ROS tak, že poskytnou vodík pro rozklad peroxidu vodíku ze svých četných hydroxylových skupin (Sgherri *et al.*, 2003). Vzniklý fenolový radikál se regeneruje zpět na fenolovou látku různými způsoby, například v askorbátovém cyklu. Role fenolových látek v redoxních procesech organismů je stále předmětem intenzivního výzkumu. Například vystavení řepky, kukuřice, ječmene a pšenice působení 5 μM manganu po dobu 21 dnů mělo za následek téměř dvojnásobné zvýšení rozpustných fenolů u řepky. U ječmene nedošlo k žádné změně v obsahu rozpustných fenolů. Pšenice a kukuřice reagovali mírným zvýšením obsahu fenolů, ale toto zvýšení nebylo statisticky významné (Kováčik *et al.*, 2014).

Organické kyseliny

Organické kyseliny hrají důležitou roli v mnoha biochemických drahách. Například při respiraci a vytváření energie, biosyntéze aminokyselin, fotosyntéze, transportu kationtů a při snižování toxicity těžkých kovů (Dresler *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že obsah organických kyselin může mít úzký vztah k tolerantnosti rostlin k těžkým kovům. Organické kyseliny mohou mít také velký vliv na detoxifikaci těžkých kovů v organismu rostlin (Hall, 2002).

Hlavními organickými kyselinami, respektive jejich anionty, které se účastní procesu detoxifikace při nadbytku manganu jsou citrát, oxalát, malát a sukcinát (Gao *et al.*, 2013). Nejvyšší afinitu k Mn^{2+} ze zmíněných aniontů organických kyselin má citrát. Malát se může účastnit přenosu manganu z kořenů do listů. V práci Gao *et al.* (2013) byl obsah oxalátu v rostlině *Phytolacca americana*, ať už v nadzemní nebo kořenové části, mnohonásobně vyšší, než obsah citrátu nebo malátu. Oxalát má zřejmě nejvýznamnější roli při detoxifikaci a imobilizaci manganu. Je schopen vytvořit oxalátový krystal, ve kterém je obsažen i mangan (Dou *et al.*, 2009). Organické kyseliny se podílejí i na zmírnění oxidačního stresu vyvolaného kadmíem. Účastní se transportu kadmia do vakuol a podílejí se i na zvýšení tolerance rostliny vůči jeho působení (Sun *et al.*, 2006).

Neenzymatické mechanismy ochrany organismu před ROS, částečně doplňují a částečně suplují enzymatický mechanismus ochrany. Jakým způsobem reaguje neenzymatický systém ochrany rostlin při vystavení působení těžkých kovů, můžeme vidět

například v práci Saidi *et al.* (2014), kde byly klíčky slunečnice *Helianthus annuus* vystaveny působení 100 μM manganu a rostoucí koncentraci selenu (0-20 μM). Bylo zjištěno, že samotný mangan způsobil pokles chlorofylu a karotenoidů. Následná aplikace selenu zmírnila negativní účinek manganu a došlo k nárůstu obsahu chlorofylu a karotenoidů. V práci Liu *et al.* (2010) byl použitý hyperakumulátor manganu *Polygonum perfoliatum*, který byl vystaven působení manganu v koncentraci 10 a 15 mM. Při těchto koncentracích došlo k minimální změně obsahu chlorofylu. Naproti tomu u rostliny ze stejné čeledi *Polygonum hydropiper* došlo k signifikantnímu snížení chlorofylu při stejném pokusu. Při podobné práci Feng *et al.* (2009) byl testován vliv křemíku (1 mM) a manganu (0,6 mM) včetně kombinace těchto dvou kovů na klíčení okurky. Přítomnost samotného manganu způsobila snížení obsahu chlorofylu a karotenoidů. Přídavek křemíku snížil negativní působení manganu, což se projevilo zvýšením obsahu chlorofylu a karotenoidů. Podobné výsledky měl i pokus s klíčením rýže v práci Srivastava *et al.* (2011), kde byla rýže klíčena v přítomnosti manganu o koncentraci 3 a 6 mM. Přítomnost manganu v těchto koncentracích po dobu 20 dnů vyvolal pokles redukovaného askorbátu (AsA) a redukovaného glutathionu (GSH).

Odpověď necévnatých rostlin na přítomnost kovů může být jiná, než u cévnatých rostlin. V práci Li *et al.* (2007) byla mikrořasa *Pavlova viridis* vystavena působení kobaltu a manganu v koncentracích 0-200 μM . Kobalt při koncentracích 20 a 50 μM způsobil signifikantní nárůst obsahu chlorofylu, karotenoidů a GSH. Přítomnost manganu v koncentraci 10 a 20 μM způsobila nárůst obsahu chlorofylu a karotenoidů a při koncentraci 100 a 200 μM došlo k nárůstu obsahu GSH. V práci Ushizaka *et al.* (2011) použili chelatovaný železitý ion a mangan s koncentracemi 5 a 25 nM v kultivačním mediu pro mořskou řasu *Talassiosira weissflogii*. To mělo za následek, že řasy bez přítomnosti manganu téměř nerostly a netvořili chlorofyl, což se změnilo až s přidáním manganu, kdy došlo k nárůstu obsahu chlorofylu. Z těchto příkladů vyplývá, že neenzymatický mechanismus ochrany reaguje velmi pružně v případě, že se projeví negativní vliv působení těžkých kovů. Také je patrná odlišná odezva mezi cévnatými a necévnatými rostlinami.

2 CÍL PRÁCE

- Zpracování literární rešerše k tématu práce
- Posouzení metodiky odběru vzorků, jejich přípravy k analýze a vlastní analýza
- Statistické zpracování získaných dat
- Posouzení výsledků v souladu s odborným výstupem práce
- Studium příjmu a toxicity manganu v hydroponicky pěstovaném heřmánku v různých ontogenetických stádiích
- Studium vlivu manganu na vybrané hospodářské plodiny v půdě přirozeně kontaminované manganem z oblasti Krušných hor
- Akumulace a fyzikálně-chemické aspekty (pH, kompetice iontů) příjmu manganu v sladkovodní řase

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Charakteristika použitých modelových objektů

Brukev řepka

Brukev řepka (*Brassica napus* cv. Smaragd) je jednoletá bylina dosahující výšky 50-120 cm. Lodyha je přímá, větvená, lysá a nedřevnatíci. Dolní lodyžní listy jsou řapíkaté, střední a horní listy jsou přisedlé až objímavé. Květy vyrůstají v řídkém hroznu a jsou žluté, asi 2x delší než lístky kališní. Řepka byla vyseta v počtu 20 semen a byla pěstována v květináčích, které obsahovali 500 g zeminy. Osvětlení bylo zajištěno bílými fluorescenčními trubicemi (L36W/840, Lumilux, Osram, Germany) při osvětlení $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR na úrovni listů a se světelným režimem 12 h den/12 h noc. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí 20-25°C (Kováčik *et al.*, 2014).

Ječmen setý

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* cv. Bojos) je jednoletá nebo ozimá obilnina dorůstající výšky stébla až 100 cm. Kořen je svazčitý, listy jsou drsné a klas je přímý. Ječmen byl vyset v počtu 10 semen a byl pěstován v květináčích, které obsahovali 500 g zeminy. Osvětlení bylo zajištěno bílými fluorescenčními trubicemi (L36W/840, Lumilux, Osram, Germany) při osvětlení $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR na úrovni listů a se světelným režimem 12 h den/12 h noc. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí 20-25°C (Kováčik *et al.*, 2014).

Pšenice setá

Pšenice setá (*Triticum aestivum* cv. Tiguan) je jednoletá nebo ozimá obilnina dorůstající výšky 40-150 cm. Kořen je svazčitý, má rovné stéblo, drsné listy a čtyřhranné klasy (Zimolka, 2005). Pšenice byla vyseta v počtu 10 semen a byla pěstována v květináčích, které obsahovali 500 g zeminy. Osvětlení bylo zajištěno bílými fluorescenčními trubicemi (L36W/840, Lumilux, Osram, Germany) při osvětlení $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR na úrovni listů a se světelným režimem 12 h den/12 h noc. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí 20-25°C (Kováčik *et al.*, 2014).

Kukuřice setá

Kukuřice setá (*Zea mays* cv. Korneli) je jednoletá tráva dorůstající výšky 3 m. Kořen je svazčitý, stébla jsou vyplněna bílou dřevinou a listy jsou ploché a široké (Zimolka *et al.*, 2008). Kukuřice byla vyseta v počtu 5 semen a byla pěstována v květináčích, které obsahovali 500 g zeminy. Osvětlení bylo zajištěno bílými fluorescenčními trubicemi (L36W/840, Lumilux, Osram, Germany) při osvětlení $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR na úrovni listů a se světelným režimem 12 h den/12 h noc. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí 20-25°C (Kováčik *et al.*, 2014).

Heřmánek pravý

Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) je jednoletá aromatická bylina dosahující výšky 10-60 cm. Listy bývají dlouhé 4-7 cm a kořen je tenký a vřetenovitý. Pro potřeby pokusu byl zvolen hydroponický způsob pěstování v roztoku podle Hoaglanda, který běžně používáme na našem pracovišti (Kováčik *et al.*, 2009a,b; 2010). Rostliny se pěstovaly v 5 L nádobách. V každé nádobě bylo 25 rostlin. Osvětlení bylo zajištěno bílými fluorescenčními trubicemi (L36W/840, Lumilux, Osram, Germany) při osvětlení $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR na úrovni listů a se světelným režimem 12 h den/12 h noc. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí 20-25°C (Kováčik *et al.*, 2014). Při těchto podmínkách rostliny tvoří listové růžice.

Scenedesmus quadricauda

Scenedesmus quadricauda (Chlorophyceae, Chlorophyta) je běžná sladkovodní zelená řasa, která tvoří lineární kolonie skládající se typicky ze 4 buněk. Patří do skupiny řas, které se používají k toxikologickým a ekotoxikologickým výzkumům a testům. Řasy byly kultivovány v Petriho miskách na mediu „Milieu Bristol“ po dobu 4-5 týdnů po naočkování. Osvětlení bylo zajištěno bílými fluorescenčními trubicemi (L36W/840, Lumilux, Osram, Germany) při osvětlení $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR na úrovni listů a se světelným režimem 12 h den/12 h noc. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí 20-25°C (Kováčik *et al.*, 2015).

3.2 Popis pokusů

A. Experiment zaměřený na vliv půdy bohaté na mangan

Půda s vysokým obsahem manganu byla odebrána v Krušných horách (Kula *et al.*, 2012). Kontrolní půda pocházela ze západu Slovenské republiky. Do připravených květináčů byly vysazeny 4 druhy zemědělských plodin (řepka, ječmen, pšenice a kukuřice). Vždy tak, aby byl jeden květináč pouze s kontrolní půdou a jeden s půdou bohatou na mangan (Mn-půda). Takto pěstovaným rostlinám byla udržována vlhkost zeminy přibližně 60%. Rostliny byly zpracovány po 21 dnech od vysazení, protože řepka vykazovala viditelné známky retardace růstu. Celé rostliny byly zhomogenizovány v kapalném dusíku.

Tento pokus byl ještě doplněn experimentem, který se prováděl v plastových miskách s filtračním papírem položeným na skleněných kuličkách a závlahová voda byla obohacena o 5 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ při dvou různých pH (6,5 a 3,7). Tato koncentrace byla zvolena podle výsledků analýzy Mn-půdy. Při vodním výluhu se do vody uvolnila přibližně takováto koncentrace manganu. Semena rostlin byly rovnoměrně rozmístěny na filtrační papír a rostly po dobu 10 dnů. Z čerstvého materiálu byly připraveny extrakty dle potřebné analýzy (viz kapitola 3.3). Část každého homogenního vzorku byla usušena při 75°C a následně zpracována na prvkovou analýzu (viz kapitola 3.3) (Kováčik *et al.*, 2014).

B. Experiment zaměřený na vliv manganu na heřmánek při hydroponickém pěstování

Heřmánek lékařský (tetraploid) byl vyset na písek, kde byl ponechán 3 týdny. Po tuto dobu vyklíčil a mírně zesílil, aby mohl být přesazen do 4 finálních hydroponických nádob. V každé 5 L nádobě bylo umístěno 25 ks homogenních rostlinek. Hydroponické roztoky se měnily každý týden, aby nedošlo k vyčerpání mikroprvků a tím ke zkreslení výsledků pokusu. V těchto hydroponických nádobách rostly po dobu dalších 4 týdnů. Kultivace tedy celkem trvala 7 týdnů. Po těchto 7 týdnech byl k Hoaglandovu roztoku přidán mangan v koncentraci 0, 100, 500 a 1000 μM ve formě $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a heřmánky rostly další týden. Po těchto 7 dnech byly rostliny heřmánku zpracovány na následné analýzy.

Další experiment byl zaměřen na příjem a toxicitu manganu při klíčení heřmánku. 100 semen bylo rovnoměrně umístěno na filtrační papír, který ležel na skleněných kuličkách ($d=2\text{ mm}$) v Petriho misce. Pro každou koncentraci byla jedna miska, tzn. celkem 4 misky (0, 100, 500 a 1000 μM). Znovu byl použit mangan ve formě $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Byl rozpuštěn v deionizované vodě. Tento pokus trval 7 dní.

Následující experiment s klíčením byl zaměřen na případné zmírnění toxicity vyvolané 1000 μM Mn^{2+} , použitím donoru NO nitroprusidem sodným (SNP) v koncentracích 100, 500 a 1000 μM . Tento pokus byl sestaven stejným způsobem jako ten předchozí (Petriho misky, skleněné kuličky, deionizovaná voda a 100 semen heřmánku na každou misku). Pokus trval také 7 dní.

Celá listová růžice a kořenový systém u vzrostlých rostlin byly homogenizovány kapalným dusíkem. Každá část samostatně. Z čerstvého materiálu byly připraveny extrakty dle potřebné analýzy (viz kapitola 3.3). Část každého homogenního vzorku byla usušena při 75°C a následně zpracována na prvkovou analýzu (viz kapitola 3.3) (Kováčik *et al.*, 2014).

C. Experiment zaměřený na vliv aniontů, kationtů a pH na příjem manganu u zelené řasy *Scenedesmus quadricauda*

Kultivovaná řasa se z Petriho misek seškrabala, navážila a rozmíchala v 5 mM HEPES pufru (pH 6,5) tak, aby bylo 0,2 g čerstvé hmotnosti v 50 ml šroubovací zkumavce. V těchto šroubovacích zkumavkách byla řasa vystavena manganu ve formě 3 solí (MnCl_2 , MnSO_4 a $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$) a dvou koncentrací těchto solí (10 a 100 μM) po dobu 24 h. Následně byly zkumavky centrifugovány a dvakrát promyty HEPES puftrem. Výsledný řasový pelet byl zpracován dle potřeby analýzy. Z čerstvé hmoty se připravili extrakty. Část řas se usušila pro prvkovou analýzu. Při tomto pokusu se sledoval vliv koncentrace na akumulaci manganu a změny aktivit antioxidantních enzymů.

Další pokus se zabýval vlivem pH (4,5, 6,5 a 9,5) na příjem manganu a jeho vliv na obsah redukováného glutathionu (GSH) a fytochelatinu 2 (PC2). Pro každé pH byla nachystána samostatná série. Jako zdroj manganu byla použita sůl MnSO_4 v koncentraci 100 μM , protože v předchozím pokusu tato sůl vykazovala nejlepší akumulaci v řase. Po 24 h expozice byly zkumavky centrifugovány a dvakrát promyty HEPES

pufrem. Výsledný řasový pelet byl zpracován dle potřeby analýzy. Z čerstvé hmoty se připravili extrakty. Část řas se usušila pro prvkovou analýzu.

Následující pokus se zaměřil na možnou kompetici mezi Mn a Ca, popřípadě Mn a K. Jako zdroj manganu byla opět zvolena sůl MnSO_4 ve výsledné koncentraci $100 \mu\text{M}$. Zdrojem Ca^{2+} iontů a K^+ iontů byli tyto soli: CaCl_2 , CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl , K_2SO_4 a KNO_3 ve výsledné koncentraci $100 \mu\text{M}$. Byly založeny dvě série. V první sérii byly k řase aplikovány pouze vápenaté a draselné soli (každá samostatně). V druhé sérii byly k řase aplikovány opět vápenaté a draselné soli, stejně jako v první sérii, tentokrát se ke každé Ca/K soli přidal mangan. Po 24 h expozice byly zkumavky centrifugovány a dvakrát promyty HEPES pufrem. Výsledný řasový pelet byl zpracován dle potřeby analýzy. Z čerstvé hmoty se připravili extrakty. Část řas se usušila pro prvkovou analýzu.

3.3 Přehled použitých metodik stanovení

Stanovení fyziologických parametrů

Hodnoty získané z čerstvého materiálu byly vyjádřeny na jednotku suché hmoty pomocí procentuálního obsahu sušiny. Tím bylo zjištěno i množství vody obsažené v rostlinném pletivu. Byla použita rovnice $[100 - (\text{suchá hmotnost} \times 100 / \text{čerstvá hmotnost})]$. Suchá hmotnost byla získána po vysušení vzorků při 80°C do konstantní hmotnosti. Tyto suché vzorky se použily na další analýzy (viz níže). Čerstvý materiál byl zhomogenizován v kapalném dusíku a byly naváženy alikvótní navážky, které se ihned extrahovaly dle příslušné následující analýzy. Na extrakci vybraných parametrů byl použit inertní mořský písek s třecí miskou a tloučkem s 50 mM fosfátovým pufrem, aby bylo dosaženo celkového rozrušení pletiva. Spektrofotometrické stanovení byly provedeny na spektrofotometru Agilent/HP DAD UV/Vis 8453.

Celkové rozpustné fenoly

Byly stanoveny běžně používanou metodou tzv. Folin-Ciocalteu činidlem (Kováčik *et al.*, 2014). Alikvótní část suché rostlinné hmoty byla homogenizována v 80% methanolem při ředění $0,1 \text{ g s. hm./ml}$. Reakční směs obsahovala $30 \mu\text{l}$ supernatantu, $470 \mu\text{l}$ demineralizované vody, $975 \mu\text{l}$ 2% Na_2CO_3 a $25 \mu\text{l}$ Folin-Ciocalteu činidla (Sigma-Aldrich, Německo). Absorbance byla měřena při vlnové délce 750 nm po hodinové

inkubaci při 40°C. Obsah rozpustných fenolů se vypočítal z kalibrační křivky, která byla naměřena z různých koncentrací gallové kyseliny.

Obsah rozpustných proteinů

Byl stanoven standardní metodikou (Bradford, 1976). Reakční směs byla připravena smícháním 980 μl činidla s 20 μl supernatantu (v případě řasy byla směs 900 μl + 100 μl supernatantu). Po 15 min inkubace se měřila absorbance při vlnové délce 595 nm. Obsah rozpustných proteinů byl spočítán z kalibrační křivky, která byla sestrojena z komerčního albuminu hovězího séra. Výsledky byly přepočítány na jednotku suché hmotnosti.

Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

Aktivita askorbát peroxidasy (APX, EC 1.11.1.11) byla stanovena jako oxidace askorbátu (pokles absorbance) při vlnové délce 290 nm po dobu 1 min. Reakční směs byla složena z 1 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7), 0,27 ml 0,5 mM kyseliny askorbové, 0,115 ml supernatantu a 0,115 ml 250 mM peroxidu vodíku. Aktivita se určila pomocí absorbančního koeficientu $2,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boominathan *et al.*, 2002).

Aktivita guajakol peroxidasy (GPX, EC 1.11.1.7) byla stanovena jako oxidace guajakolu na tetraguajakol (nárůst absorbance) při vlnové délce 470 nm po dobu 1 min. Reakční směs byla složena z 3,1 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7), 0,3 ml 0,2 % H_2O_2 , 12 μl guajakolu a 20 μl supernatantu. Aktivita se určila pomocí absorbančního koeficientu $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Cakmak *et al.*, 1991).

Aktivita glutathion reduktasy (GR, EC 1.6.4.2) byla stanovena jako redukce GSSG (nárůst absorbance) při vlnové délce 412 nm po dobu 1 min. Reakční směs byla složena z 1 ml 1 mM DTNB (5,5“-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)), 1 ml 1 mM GSSG (oxidovaný glutathion) a 1 ml 0,1 mM NADPH. Všechny látky byly rozpuštěny ve 100 mM fosfátovém pufru. Aktivita se určila pomocí absorbančního koeficientu $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Gomes-Junior *et al.*, 2006).

Aktivita katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) byla stanovena jako redukce peroxidu vodíku na vodu (pokles absorbance) při vlnové délce 240 nm po dobu 1 min. Reakční směs byla složena z 2,95 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7), 7 μl koncentrovaného H_2O_2 (36 %)

a 40 μ l supernatantu. Aktivita se určila pomocí absorbančního koeficientu $0,039 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kováčik, Bačkor, 2007).

Aktivita superoxid dismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) byla stanovena dle návodu přibaleného v kitu (katalogové číslo 19160, Sigma-Aldrich).

Peroxidace lipidů

Byla stanovena jako množství malondialdehydu (MDA), které zreagovalo s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Alikvótní část biomasy byla zhomogenizována v 0,1% (w/v) kyselině trichloroctové (TCA). K 0,5 ml supernatantu se přidal 1,5 ml 20% TCA obsahující 0,5% (w/v) TBA a směs se zahřívala ve vodní lázni při 95°C po dobu 30 min a pak následovalo prudké ochlazení. Absorbance se měřila při vlnové délce 532 nm (korekce na zákal 600 nm). Výsledky se přepočítaly s použitím absorbančního koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Esterbauer *et al.*, 1990).

Stanovení ROS jako peroxidu vodíku a superoxidu

Obsah peroxidu vodíku byl stanoven reakcí s TiCl_4 a obsah superoxidu byl stanoven jako množství nitritu vytvořeného z hydroxylaminu. Složení reakčních směsí je podrobně popsáno v pracích Kováčik *et al.* (2007, 2009).

Stanovení oxidu dusnatého

Bylo provedeno tzv. Griessovou reakcí v homogenizátech připravených v sodno-acetátovém pufru s pH 3,6 (Tewari *et al.*, 2008).

SNP – nitroprusid sodný ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) je kyanosloučenina, která obsahuje ve své molekule NO skupinu, ze které se ve vodním prostředí uvolňuje oxid dusnatý. Jedná se o běžně používanou látku při studiu úlohy NO v metabolismu rostlin. Při porovnání možných exogenních zdrojů NO měl SNP vysokou stabilitu a konzistentní uvolňování NO (Bradley *et al.*, 2015), proto byl vybrán.

Fluorescenční mikroskopie

K fluorescenční mikroskopii byl použit fluorescenční mikroskop Axioscop 40 (Carl Zeiss, Německo).

ROS – Na vizualizaci bylo použito barvivo CellROX Deep red reagent s absorbančí 644 nm a emisí 665 nm a 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCF-DA) s absorbančí 502 nm a emisí 526 nm. Detailní postup je popsán v práci Kováčik *et al.* (2014).

RNS/NO – Na vizualizaci bylo použito barvivo 2,3-diaminonaftalen (DAN) s absorbančí 365 nm a emisí 415 nm. Detailní postup je popsán v práci Kováčik *et al.* (2014).

Peroxid vodíku – Na vizualizaci bylo použito barvivo Amplex Ultrared s absorbančí 568 nm a emisí 681 nm. Detailní postup je popsán v práci Kováčik *et al.* (2014).

Peroxidace lipidů – Na vizualizaci bylo použito barvivo BODIPY s absorbančí 581 nm a emisí 591 nm. Detailní postup je popsán v práci Kováčik *et al.* (2014).

Celkové thioły – Na vizualizaci bylo použito barvivo monochlorobiman s absorbančí 394 nm a emisí 490 nm. Detailní postup je popsán v práci Kováčik *et al.* (2014).

Kvantifikace Mn a vybraných prvků

Suché vzorky byly zváženy v teflonových celách určených k mikrovlnnému rozkladu mokrou cestou. K naváženým vzorkům byla přidána podvarově destilovaná HNO₃ v poměru 1:1 s demineralizovanou vodou (2 ml + 2 ml). Rozklad probíhal v mikrovlnném extraktoru Ethos Sel Microwave Extraction Labstation (Milestone Inc.) při teplotě 210°C po dobu 30 min a dalších 30 min byly vzorky chlazeny dle programu. Následně byly vzorky kvantitativně převedeny a doplněny na 20 ml. Kvantitativní měření bylo provedeno atomovým absorpčním spektrofotometrem (AAS) s acetylenovým hořákem Varian AA30 (Mulgrave, Australie). Mangan byl měřen při vlnové délce 279,5 nm, s limitem detekce 2 µg/l.

Stanovení organických a anorganických aniontů

Bylo provedeno iontově-výměnou chromatografií na systému DX 600, Dionex Corporation (Sun Valley, CA, USA) doplněného o elektrochemický detektor ED50 s kolonou IonPac AS 11-HC. Mobilní fází byla směs deionizované vody a 100 mM NaOH s průtokem 0,35 ml/min. Vzorky byly extrahovány deionizovanou vodou při ředění 0,1 g č. hm./ml.

Stanovení GSH a PC2

Bylo provedeno na HPLC-MS/MS Agilent 1200 s detektorem Agilent 6460 Triple quadropole s nastavením v pozitivním modu s přechodem 308/76 (GSH) a 540/76 (PC2) a na koloně Zorbax SB-C18. Mobilní fázi byla směs 0,2% kyseliny octové a methanolu v poměru 95:5 pro stanovení GSH. Pro stanovení PC2 byla zvolena metoda gradientu, kde byla složkou A 0,2% kyselina octová a složkou B byl acetonitril. Poměr těchto dvou složek se měnil takto: A:B – 0 min (95:5), 0,4 min (70:30), 1 min (50:50), 1,5-2 min (40:60), 3 min (95:5). Vzorokly byly zhomogenizovány a extrahovány s 0,1 M HCl při ředění 0,1 g č. hm./ml pro obě stanovení (Kováčik *et al.*, 2014).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato část disertační práce je přiložena ve formě publikací v odborných časopisech a je doplněna o komentář autora. U každé práce je vyznačen podíl autora na dané publikaci, se kterým souhlasili uvedení spoluautoři. Některé citace, na které je v komentáři odkazováno, jsou součástí odborného článku, a tudíž se nevyskytují v seznamu použité literatury na konci disertační práce.

4.1 Toxicita půdy s přirozeně vysokým obsahem manganu na vybrané plodiny

KOVÁČIK, J.; ŠTĚRBOVÁ, D.; BABULA, P.; ŠVEC, P.; HEDBÁVNÝ, J. Toxicity of naturally-contaminated manganese soil to selected crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, roč. 62, s. 7287–7296. ISSN 0021-8561.

Podíl autora Švec P.: 10 % textové části práce a 30 % experimentální práce

Mangan patří mezi mikroprvky v organismech, kde má nenahraditelné místo například jako součást různých enzymů. Jeho biodostupnost pro rostliny stoupá se snižujícím se pH (Marschner, 1995) prostředí a to může znamenat ohrožení pro růst některých rostlin, které se pěstují na kyselejších půdách. V porovnání s jinými těžkými kovy, je příjem manganu relativně rychlý proces, který může vést ke snížení růstu a výnosu mnoha plodin, ačkoliv existuje několik druhů obilnin, které se zdají být k vyšším obsahům manganu částečně tolerantní, jako například ječmen cv. Obzor, který byl vystaven koncentraci 18300 μM MnCl_2 po dobu 5 dnů, vykazoval nárůst suché hmoty, nezměněný obsah neproteinových thiolů a nezměněný obsah redukovaného askorbátu v porovnání s kontrolou (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004). Příjem manganu je ovlivněn mnoha faktory, například oxidačním stavem manganu nebo přítomností a dostupností jiných prvků.

V této práci jsme měli jedinečnou možnost pracovat s půdou z Krušných hor, která měla vysoký obsah manganu, který nebyl antropogenního, ale přírodního původu (Kula *et al.*, 2012). Mateřská hornina je žulovitá a má vysoký obsah organické hmoty. Ve srovnání s kontrolní půdou, která byla odebrána na západním Slovensku poblíž obce Bošany, s písčito-jílovitým charakterem (hnědozem), má téměř 10 krát vyšší obsah manganu (kontrolní půda – 675,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, manganová půda – 6494,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Obsah vodou extrahovatelného manganu byl 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v kontrolní půdě a 280,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v manganové půdě. Zaměřili jsme se proto i na obsah dalších vybraných kovů a jejich změn, včetně jejich vodou extrahovatelné frakce. Obsahy vybraných prvků byly vyšší

v kontrolní půdě s výjimkou kadmia. Podobné práce, kde byla použita půda s vysokým obsahem manganu přírodního původu, nejsou známe z literatury. Zkoumali jsme vliv manganu na růst vybraných plodin (řepka, ječmen, kukuřice a pšenice). Při srovnání obsahu prvků v řepce bylo zjištěno, že se obsah Mn zvýšil z $53,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v kontrolní půdě na $13696 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v manganové půdě. Toto množství manganu ovlivnilo obsah makroprvků i mikroprvků. Například obsah vápníku klesl z $11,7 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ v kontrolní půdě na $2,12 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ v manganové půdě. Naproti tomu, obsah niklu vzrostl o 50 %. V ječmeni byl obsah manganu z kontrolní půdy $59,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a z manganové půdy byl $5953 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. To mělo za následek snížení obsahu všech dalších sledovaných prvků s výjimkou kadmia, které vzrostlo z $55,2 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ na $84 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. V kukuřici byl zaznamenán také nárůst obsahu manganu z kontrolní půdy $62,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na $5622 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v manganové půdě. Došlo k výraznému snížení obsahu draslíku (o 64 %) a vápníku (o 61 %). Ovlivněny byly i obsahy ostatních sledovaných prvků s výjimkou hořčíku. U pšenice jsme naměřili obsah manganu $66,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ z kontrolní půdy a $2363 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ z manganové půdy. Došlo ke snížení obsahu téměř všech sledovaných prvků. Nejvíce zřetelný byl pokles vápníku (o 81 %). Nezměnil se obsah sodíku a niklu. Z těchto výsledků je jasně vidět, jak rozdílný vliv má mangan na obsah dalších kovů v různých druzích rostlin. Jediné dva prvky, a to vápník a hořčík, reagovali na nadměrné množství manganu stejně napříč rostlinami. Hořčík a vápník klesal s rostoucím množstvím manganu. Stejně výsledky byly zaznamenány i v práci Sheng *et al.* (2015), kde také došlo k poklesu obsahu vápníku o 39 % při aplikované koncentraci 3 mM manganu k pšenici. Negativní změny v obsahu prvků, jako důsledek působení vyšší koncentrace manganu, byly zaznamenány i v práci Shi *et al.* (2008), kde byly naklíčené semínka okurky vystaveny $600 \mu\text{M MnSO}_4$.

Vliv manganu na růst rostlin byl stanoven jako suchá hmota daných rostlin v porovnání se suchou hmotou rostlin pěstovaných v kontrolní půdě. Také jsme stanovili obsah rozpustných proteinů. V rámci této části experimentu jsme také vypočítali bioakumulační faktor (BAF) vybraných prvků. Obsah rozpustných proteinů, u rostlin pěstovaných na manganové půdě, se nezměnil pouze u kukuřice. U ostatních rostlin jsme zaznamenali pokles obsahu rozpustných proteinů, který byl nejvýraznější u řepky (téměř 50 %). Biomasa byla také ovlivněna. U rostlin pěstovaných na manganové půdě jsme zaznamenali výrazný pokles suché hmoty, který byl nejvíce patrný u řepky. Pokles suché hmotnosti, který byl důsledkem vystavení pšenice působení 3 mM manganu,

byl zaznamenán také v práci Sheng *et al.* (2015). BAF pro mangan se v jednotlivých rostlinách nedostal přes 1, kromě řepky, kde byla hodnota BAF pro mangan 2,11, ale u té není možné říct, že by byla manganovým hyperakumulátorem, protože její růst byl silně retardován. Nejnižší hodnotu BAF pro mangan měla pšenice (0,36).

Jedním z projevů toxicity kovů je oxidační poškození buněk. Rozsah a intenzita oxidačního poškození je ovlivněna hlavně kvalitou a kvantitou aplikovaného kovu do růstového média nebo půdy. Tento oxidační stres je kontrolován mnoha antioxidantními enzymy, které chrání rostlinu před poškozením. Aktivitu těchto enzymů jsme také stanovili na závěr experimentu. U řepky, pěstované na manganové půdě, se aktivita APX nezměnila. Nejvyšší nárůst APX aktivity byl zaznamenán u ječmene z manganové půdy. Stejná změna aktivity nastala i v rýži, která byla vystavena působení 6 mM manganu v práci Srivastava *et al.* (2011). Hodnoty GR aktivity byly zvýšené u všech rostlin. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán v ječmeni z manganové půdy. Podobně se změnila aktivita GR v rýži, která byla vystavena působení 6 mM manganu v práci Srivastava *et al.* (2011). Ječmen z této půdy měl i největší nárůst GPX aktivity. GPX aktivita byla zvýšená u všech rostlin pěstovaných na manganové půdě. Stejná změna aktivity GPX byla zaznamenána v ječmeni, který byl vystaven působení 18300 μM manganu, po dobu 5 dnů v práci Demirevska-Kepova *et al.* (2004). Aktivita CAT byla také zvýšená u rostlin z manganové půdy. Nejvyšší CAT aktivita byla zaznamenána u ječmene. Stejná změna CAT aktivity (zvýšení) nastala i v práci Demirevska-Kepova *et al.* (2004), kde byl ječmen vystaven 18300 μM MnCl_2 po dobu 5 dnů. Na vizualizaci ROS jsme použili fluorescenční mikroskopii, která je velmi citlivou metodou vizualizace ROS při použití specifických reagentů. Touto metodou jsme získali fotografie, na kterých bylo možno identifikovat místa s největším výskytem ROS. S pomocí fluorescenční mikroskopie byla také zkoumána i přítomnost RNS, míra oxidačního poškození a celkové thiolu. Na tyto stanovení byly použity specifické fluorescenční reagenty. V místech s větším poškozením lipidové membrány měnili svou barevnou odezvu z oranžové na zelenou. Toto poškození bylo zaznamenáno u všech rostlin, které byly pěstovány v manganové půdě. Zvýšení peroxidace lipidů vlivem vyššího množství Mn bylo zaznamenáno i u pšenice vystavené působení 3 mM MnSO_4 po dobu 14 dnů v práci Sheng *et al.* (2015). V případě celkových thiolů, se jejich vyšší obsah projevil intenzivnější modrou barvou. Obsah celkových thiolů byl výrazně vyšší u rostlin, které se pěstovali v manganové půdě. Podobný nárůst thiolů byl zaznamenán například v ječmeni, který byl vystaven

1500 μM mědi v práci Demirevska-Kepova *et al.* (2004). Ve stejné práci byl ječmen vystaven i 18300 μM manganu, ale obsah thiolů se nezměnil.

Také jsme stanovili obsah rozpustných fenolů a obsah organických kyselin. Obsah rozpustných fenolů se změnil pouze u řepky, kde došlo k téměř dvojnásobnému nárůstu obsahu fenolů. Obsahy organických kyselin byly stanoveny jako anionty těchto kyselin a byly téměř vždy výrazně nižší u rostlin pěstovaných v manganové půdě než u rostlin z půdy kontrolní. Výjimkou byly jen acetát a formiát u kukuřice, kde došlo k nárůstu. Z práce Dresler *et al.* (2014), kde byla kukuřice vystavena působení kadmia a mědi v koncentracích 50 a 100 μM , je vidět, že obsah organických kyselin se mění v závislosti na koncentraci použitého kovu. S rostoucí koncentrací, se téměř u všech sledovaných organických kyselin snižoval jejich obsah. V práci Gao *et al.* (2013), kde byla *Phytolacca americana*, která je hyperakumulátor manganu, vystavena působení 20 mM manganu, bylo sledováno zvýšení organických kyselin ve srovnání s kontrolou. Z toho vyplývá, že organické kyseliny reagují u každé rostliny jinak, v závislosti na míře tolerantnosti rostliny k danému kovu. Z našich výsledků vyplývá, že námi testované rostliny nejsou tolerantní k vyšším obsahům biodostupného manganu, ačkoliv ječmen tuto dávku manganu snášel nejlépe z testovaných rostlin.

Součástí tohoto experimentu s manganovou půdou bylo i otestování klíčení a růstu v různém pH (3,7 a 6,5). Toto pH jsme zvolili tak, aby korespondovalo s pH z kontrolní a manganové půdy. Zjistili jsme, že růst v kontrolním médiu (deionizovaná voda) byl nižší pouze u kukuřice při pH 3,7. V roztoku s manganem (5 mM MnCl_2) byl růst nižší u ječmene při pH 3,7. Koncentraci 5 mM Mn jsme použili, protože přibližně odpovídá koncentraci manganu z manganové půdy, která byla vodou extrahovatelná. Obě použité pH v roztoku s manganem zpomalily růst kukuřice, pšenice i řepky. Obsah manganu v nadzemní části byl vyšší pouze u řepky a kukuřice v pH 3,7 při porovnání obsahů manganu v závislosti na pH. V kořenové části byl obsah manganu vyšší u kukuřice při pH 6,5. Z výsledků vizualizace ROS vyplývá, že zvýšený obsah ROS byl důsledek přijatého manganu a nikoliv pH. Výsledky tohoto pokusu nás vedou k závěru, že příjem manganu a tvorba ROS není závislá na hodnotě pH. Vysoká citlivost řepky na mangan, kterou jsme pozorovali v manganové půdě, byla pozorována i u tohoto pokusu a nebyla závislá na hodnotě pH.

Toxicity of Naturally-Contaminated Manganese Soil to Selected Crops

Jozef Kováčik,^{*,†} Dagmar Štěrbová,[†] Petr Babula,[‡] Pavel Švec,[†] and Josef Hedbavny[†]

[†]Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

[‡]Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The impact of manganese excess using naturally contaminated soil (Mn-soil, pseudototal Mn 6494 vs 675 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in control soil) in the shoots of four crops was studied. Mn content decreased in the order *Brassica napus* > *Hordeum vulgare* > *Zea mays* > *Triticum aestivum*. Growth was strongly depressed just in *Brassica* (containing 13 696 $\mu\text{g Mn g}^{-1}$ DW). Some essential metals (Zn, Fe) increased in Mn-cultured *Brassica* and *Zea*, while macronutrients (K, Ca, Mg) decreased in almost all species. Toxic metals (Ni and Cd) were rather elevated in Mn-soil. Microscopy of ROS, NO, lipid peroxidation, and thiols revealed stimulation in all Mn-cultured crops, but changes were less visible in *Triticum*, a species with low shoot Mn (2363 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW). Antioxidative enzyme activities were typically enhanced in Mn-cultured plants. Soluble phenols increased in *Brassica* only while proteins rather decreased in response to Mn excess. Inorganic anions (chloride, sulfate, and phosphate) were less accumulated in almost all Mn-cultured crops, while the nitrate level rather increased. Organic anions (malate, citrate, oxalate, acetate, and formate) decreased or remained unaffected in response to Mn-soil culture in *Brassica*, *Hordeum*, and *Triticum* but not in *Zea*. However, the role of organic acids in Mn uptake in these species is not assumed. Because control and Mn-soil differed in pH (6.5 and 3.7), we further studied its impact on Mn uptake in solution culture (using Mn concentration ~ 5 mM deducted from water-soluble fraction of Mn-soil). Shoot Mn contents in Mn-treated plants were similar to those observed in soil culture (high in *Brassica* and low in *Triticum*) and pH had negligible impact. Fluorescence indicator of “general ROS” revealed no extensive or pH-dependent impact either in control or Mn-cultured roots. Observed toxicity of Mn excess to common crops urges for selection of cultivars with higher tolerance.

KEYWORDS: cereals, fluorescence microscopy, ion-exchange chromatography, oxidative stress, soil pollution

■ INTRODUCTION

Manganese (Mn) is an essential micronutrient for plants, being, for example, a component of various enzymes.¹ Its bioavailability increases with decreasing pH, and Mn excess could therefore represent a risk for plant growth in acidic soils^{2,3} although some reports show no impact of media pH on Mn uptake.⁴

Compared to other metals, Mn uptake is a relatively fast process that typically leads to depression of productivity in various crops,^{5,6} while some cereals seem to be partially tolerant to high Mn excess.^{7,8} Mn uptake is also affected by various factors including given species, available nutrients, or pH.^{3,4} To date, reports about the effect of Mn excess on crops using artificially contaminated soil are rare,² but changes of Mn amount in plants grown on multimetallic soils can be deducted.^{9,10}

Toxicity of metals is typically connected with oxidative damage (reactive oxygen species formation, ROS) being affected mainly by the given metal and exposure concentration.^{11,12} This oxidative stress is mainly controlled by various antioxidative enzymes to prevent damage.¹³ Despite high amounts of Mn usually accumulated in plants, ROS formation is relatively slightly enhanced if assayed by classic spectrophotometry.^{6,7} Fluorescence microscopy is a more sensitive qualitative method owing to the use of specific reagents, and it was previously reported that the impact of Mn on ROS

formation could be concentration-dependent.¹⁴ Mn toxicity may be attenuated by nitric oxide,^{14,15} but its formation in crops has not yet been studied.

Analyses of antioxidative enzyme activities even revealed no impact of Mn on the peroxidase activity in some plants,¹⁶ and in general, stimulation of enzymes is lower in high Mn treatments compared to other metals^{7,8} or even depleted if plants contain high endogenous amounts of Mn.¹⁷ This indicates species-specific responses determined by both plant species and culture conditions. To the best of our knowledge, comparison of various crops in the same work was not published but it is needed to provide background for further selection of species/cultivars tolerant to Mn excess.

Despite numerous data related to Mn uptake and toxicity in various crops, our study is the first one where naturally contaminated Mn soil was used. Fluorescence microscopy that is not frequently used in agricultural research was also carried out to detect symptoms of oxidative stress with sensitive techniques. Ion-exchange chromatography was involved in the monitoring of inorganic and mainly organic anions (aliphatic organic acids) that could participate in metal chelation. Besides,

Received: February 27, 2014

Revised: June 25, 2014

Accepted: June 25, 2014

Published: June 26, 2014

Table 1. Content of Selected Metals in Naturally-Contaminated Mn Soil (marked as Mn) and in Control Soil Measured as Pseudo-Total Content and Water-Soluble Fraction

	pseudototal content		water-soluble content	
	control	Mn	control	Mn
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	675.1 \pm 4.84	6494.3 \pm 355.0***	1.50 \pm 0.16	280.1 \pm 18.6***
K (mg g^{-1} DW)	8.79 \pm 0.32	3.04 \pm 0.16***	0.063 \pm 0.0022	0.038 \pm 0.0026***
Ca (mg g^{-1} DW)	0.52 \pm 0.014	0.058 \pm 0.0016***	0.052 \pm 0.0019	0.03 \pm 0.00092***
Mg (mg g^{-1} DW)	6.26 \pm 0.091	0.64 \pm 0.026***	0.029 \pm 0.0009	0.015 \pm 0.0014***
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	143.5 \pm 4.78	122.7 \pm 6.15*	0.53 \pm 0.046	1.36 \pm 0.038***
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	474.3 \pm 22.2	176.1 \pm 10.4***	23.0 \pm 1.59	22.2 \pm 1.89
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	29566.3 \pm 1524.4	22621.7 \pm 1134.8*	47.4 \pm 4.2	13.2 \pm 1.67***
Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	26.6 \pm 1.64	17.5 \pm 1.35**	0.23 \pm 0.02	0.24 \pm 0.012
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	42.5 \pm 1.82	32.6 \pm 2.26*	0.091 \pm 0.0072	0.049 \pm 0.0031**
Cd (ng g^{-1} DW)	344.8 \pm 10.6	514.5 \pm 17.4***	13.6 \pm 1.52	11.5 \pm 1.56
pH (water/1 M KCl)	6.51/7.08	3.74/3.92		

Data are means \pm SDs ($n = 3$). The *, **, and *** indicate significant difference at 0.05, 0.01, and 0.001 level of Student's t -test between control and Mn soil in the given fraction.

impact of pH on Mn uptake in some crops did not match with known fact that “its bioavailability increases with decreasing pH” as for example, potato contained more Mn at less acidic pH.³ Because control and Mn-soil we used differed in pH, a further solution test was done to verify its involvement in Mn uptake.

MATERIALS AND METHODS

Plant Cultured and Experimental Design. Selected crops were tested in the present study (provided by Josef Hedbavny), namely *Brassica napus* cv. Smaragd, *Hordeum vulgare* cv. Bojos, *Zea mays* cv. Korneli, *Triticum aestivum* cv. Tigan. Seeds were surface sterilized and sown directly to pots containing 500 g of control or naturally contaminated soil (5 for *Zea*, 10 for cereals and 20 seeds for *Brassica* in order to achieve approximately similar biomass/soil ratio). Control soil, collected on the field (by Jozef Kováčik, western Slovakia, village Bošany), is widely distributed in the Slovak Republic—Eutric Cambisol (with sandy loamy texture) as reported previously.¹⁸ Mn-contaminated soil was collected on the natural locality in the Krušné Hory Mountains (or Ore Mountains) as described in the previous paper.¹⁹ We note that the origin of this soil is not clear, but is probably natural because the composition of plant species around and within this locality is similar (P. Švec, personal visitation). Soil moisture was maintained at 60% of water holding capacity with distilled water to prevent the impact on minerals. Cultivation was realized under laboratory conditions with $\sim 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR at leaf level supplied by cool white fluorescent tubes L36W/840 (Lumilux, Osram), 25/20 °C day/night temperature and relative humidity of $\sim 60\%$.¹⁴ Whole shoots of plants were harvested after 21 days of cultivation because growth retardation was visible. In the subsequent experiment, crops were sown directly on filter paper placed on glass balls in plastic box and supplemented with 5 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solution (deducted from Mn content in water-soluble fraction of Mn-contaminated soil, see discussion) with pH 6.5 or 3.7 (based on pH of water extracts from control and Mn-contaminated soil, see the Results section). Plants were harvested 10 days later because *Brassica* plants showed strong retardation of growth. For fresh mass-requiring parameters, individual plants were powdered using liquid N_2 and fresh material was extracted as described below. Dry samples (dried at 75 °C to constant weight) were analyzed for mineral nutrients including Mn.

Quantification of Mn and Mineral Nutrients. Samples were prepared by mineralization of dry plant material (10–20 mg) in the mixture of concentrated HNO_3 and water (5 + 5 mL) using microwave decomposition (Ethos Sel Microwave Extraction Labstation, Milestone Inc.) at 200 °C over 1 h (complete duration of the mineralization program). The resulting clear solution was placed to glass flasks and diluted to a final volume of 20 mL. Soil samples for

total content of metals (more exactly it is pseudototal content because primary HNO_3 concentration in mineralizates is ca. 5 M and traces of metals may remained bound in silicates present in the soil) were prepared by the same way while water-soluble Mn and nutrients were extracted with deionized water as reported earlier.¹⁸ All measurements were carried out using an atomic absorption spectrometer AA30 (Varian Ltd.; Mulgrave, Australia) and the air–acetylene flame. Measurements of mineral nutrients were done as described previously and Mn was quantified at $\lambda_{\text{max}} = 279.5 \text{ nm}$, LOD of Mn was $2 \mu\text{g/L}$.¹⁴

Fluorescence Microscopy. For microscopic analyses, cross sections were taken ca. 1 cm above the stem base and were immediately stained with respective reagents. General accumulation of ROS was monitored using two widely used reagents: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, 502_{Ex}/526_{Em} nm, Life Technologies, U.S.A.) and CellROX Deep Red Reagent (644_{Ex}/665_{Em} nm, Life Technologies, U.S.A.). Staining procedure was conducted as previously reported.²⁰ Nitric oxide or reactive nitrogen species (RNS) were visualized with 2,3-diaminonaphthalene (DAN, 365_{Ex}/415_{Em} nm, Sigma-Aldrich, U.S.A.) using 250 μM DAN for 1 h at room temperature.¹⁴ Lipid peroxidation was visualized by BODIPY 581/591 C11 lipid peroxidation sensor (581_{Ex}/591_{Em} nm, Life Technologies, U.S.A.) and total thiols by monochlorobimane (394_{Ex}/490_{Em} nm) according to previous protocols.^{20,21} Staining solution was always removed by respective buffer and samples were observed using fluorescence microscope and appropriate set of filters (Axioscop 40, Zeiss, Germany).

Assay of Antioxidative Enzymes and Metabolites. For the assay of enzymatic activities, whole shoots were homogenized with inert sand in potassium phosphate buffer containing 1% insoluble PVPP (pH 7.0). Soluble proteins were quantified according to Bradford method²² and bovine serum albumin as standard (595 nm). Ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) activities were measured as the oxidation of ascorbate and guaiacol at 290 and 470 nm, respectively.^{11,12,23} Glutathione reductase (GR) activity was assayed as the reduction of GSSG at 412 nm.¹¹ Catalase activity was measured as the reduction of H_2O_2 to water monitored at 240 nm.²³ Randomly selected supernatants were boiled and assayed in order to check that reactions were enzymatic.

Total soluble phenols were extracted with 80% methanol and quantified using the Folin–Ciocalteu method with gallic acid as standard and detection at 750 nm.²³

Quantification of organic and inorganic anions was performed by an Ion-Exchange Chromatography system (DX 600, Dionex Corporation, Sun Valley, CA, U.S.A.) equipped with ED50 Electrochemical detector and conductivity cell installed in DS3 Detection Stabilizer and Anion Self-Regenerating Suppressor–Ultra II (2 mm, ASRS-ULTRA II) operating at 100 mA in AutoSuppression Recycle Mode. Samples were prepared in deionized water (0.1 g FW/1 mL) that was found to be more suitable in comparison with acidified water (data not shown).

Separation was carried out with an IonPac AS 11–HC (2 × 250 mm) analytical column and IonPac AS 11–HC (2 × 50 mm) guard column (Dionex Corporation, Sun Valley, CA, U.S.A.). The mobile phase consisted of deionized water (A) and 100 mM NaOH in deionized water (B). A linear gradient profile of the mobile phase from 1% B (0–4 min), 1–15% B (4–12 min), 15–25% B (12–17 min), 25–45% B (17–20 min), and 45–1% B (20–21 min) was applied at a flow rate 0.35 mL/min. The column was equilibrated for 15 min under initial conditions prior to injection of the next sample. The column temperature was 30 °C and injection loop was 10 μL. The peak identity was confirmed by comparing the retention times with retention time of standards and by spiking standard solutions to the samples. Calibration curves were linear ($r^2 > 0.998$) for each compound in the concentration range 1–100 μg mL⁻¹. Limit of detection was 0.2–0.9 μg mL⁻¹. Reagents (malic acid, citric acid, ammonium acetate, and ammonium formate) were purchased from Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Germany), sodium hydroxide solution 50%, sodium phosphate and sodium sulfate were supplied by Fluka Chemie (Buchs, Switzerland) and other chemicals (sodium chloride, oxalic acid, potassium nitrate, sodium nitrite) were obtained from Penta Chrudim (Czech Republic). All chemicals used were of analytical grade. Demineralized water with a specific resistance of 18.2 MΩ cm⁻¹ (Mili-Q RG, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) was used to prepare all solutions and standards.

Statistical Analyses. Two independent repetitions of the whole experiment were performed in order to check reproducibility. At least six pots were used for each crop and soil. Data were evaluated using ANOVA followed by a Tukey's test (MINITAB Release 11, Minitab Inc.; State College, Pennsylvania) at $P < 0.05$. Additionally, Student's t -test was used to compare the difference between control and Mn-soil and biomass production. Number of replications (n) in tables/figures denotes individual soil samples or individual plants analyzed for each parameter. Only for Mn-exposed *Brassica*, several shoots were pooled to achieve enough biomass for measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

Uptake of Mn, Alterations of Mineral Nutrients, and Growth of Plants Cultured in Mn-Contaminated Soil.

Analysis of soil Mn content revealed ca. 10-times higher amount in Mn-contaminated soil than in control soil in the pseudototal fraction and much higher difference in water-soluble fraction (Table 1). Pseudototal Mn content in Mn-soil is within the range reported previously on the locality from which soil used in the present study originated.¹⁹ Further assay of selected essential and nonessential metallic nutrients showed their higher pseudototal amount in control soil (except for Cd), although it was not observed for all metals in water-soluble fraction (Table 1). The control soil we used is widely distributed in the Slovak Republic–Eutric Cambisol (with sandy loamy texture) with higher Mg content as reported previously for the same soil type from other locality.¹⁸ More acidic pH was the main difference between Mn-soil and control (Table 1) and we therefore subsequently studied the impact of pH on Mn uptake in solution culture (see last paragraph of discussion).

Uptake of Mn, such as in the case of other metals, is affected by soil conditions as well as by plant species. This variability has previously been observed in various plants collected from naturally Mn-contaminated locality.¹⁹ As expected, plants showed similar amount of Mn in control soil because it is an essential micronutrient (Table 2). However, differences of Mn content in Mn-soil were more extensive and suggest species-specific uptake. To our knowledge, this is first laboratory-controlled study using naturally Mn-contaminated soil, and we therefore found no data exactly comparable with the present study. In terms of our crops, it has been reported that shoots of

Table 2. Accumulation of Selected Metals in the Shoots of Four Crops Cultured in Naturally Mn-Contaminated Soil Over 21 Days^a

	Brassica		Hordeum		Zea		Triticum	
	control	Mn	control	Mn	control	Mn	control	Mn
Mn (μg g ⁻¹ DW)	53.9 ± 5.17d	13696 ± 1761a	59.2 ± 5.58d	5953 ± 420.1b	62.1 ± 5.73d	5622 ± 476.5b	66.4 ± 6.32d	2363 ± 386.1c
K (mg g ⁻¹ DW)	36.3 ± 2.69b	39.0 ± 1.10b	56.2 ± 3.25a	32.0 ± 3.20b	54.0 ± 5.57a	19.4 ± 1.50c	54.0 ± 3.84a	21.5 ± 1.57c
Ca (mg g ⁻¹ DW)	11.7 ± 1.82a	2.12 ± 0.16c	2.83 ± 0.25b	0.91 ± 0.06d	2.25 ± 0.11bc	0.87 ± 0.06d	2.29 ± 0.08bc	0.43 ± 0.05e
Mg (mg g ⁻¹ DW)	5.63 ± 0.31a	2.90 ± 0.15b	3.40 ± 0.28b	1.81 ± 0.20cd	1.58 ± 0.09de	1.23 ± 0.09ef	2.15 ± 0.11c	0.94 ± 0.11f
Zn (μg g ⁻¹ DW)	96.5 ± 3.69b	246.9 ± 22.4a	104.4 ± 3.28b	78.9 ± 4.71c	80.1 ± 3.15c	90.5 ± 2.87b	94.6 ± 5.94b	75.1 ± 3.81c
Na (μg g ⁻¹ DW)	784.4 ± 40.7c	1738.2 ± 102.1b	2765.4 ± 312.1a	1607.7 ± 138.0b	81.4 ± 5.20d	42.6 ± 4.03e	81.1 ± 6.70d	83.6 ± 4.20d
Fe (μg g ⁻¹ DW)	140.6 ± 13.9b	259.8 ± 26.5a	94.9 ± 8.76c	70.2 ± 5.40d	49.7 ± 3.79e	138.4 ± 11.3b	114.4 ± 10.1bc	101.3 ± 11.7c
Cu (μg g ⁻¹ DW)	7.17 ± 0.61b	6.80 ± 0.53b	7.53 ± 0.58b	7.05 ± 0.52b	7.18 ± 0.56b	4.52 ± 0.50c	8.96 ± 0.52a	7.11 ± 0.42b
Ni (μg g ⁻¹ DW)	3.83 ± 0.18bc	7.68 ± 0.37a	2.15 ± 0.18d	2.44 ± 0.30d	1.89 ± 0.32d	3.22 ± 0.30c	4.51 ± 0.38b	4.26 ± 0.51b
Cd (ng g ⁻¹ DW)	279.3 ± 22.1b	685.0 ± 38.1a	55.2 ± 5.08e	84.0 ± 11.0d	238.4 ± 27.1bc	245.4 ± 31.6b	192.4 ± 12.6c	nd

^aData are means ± SDs ($n = 3$). Species identity is the same as in Figure 1. Values within rows, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$). nd, not detected.

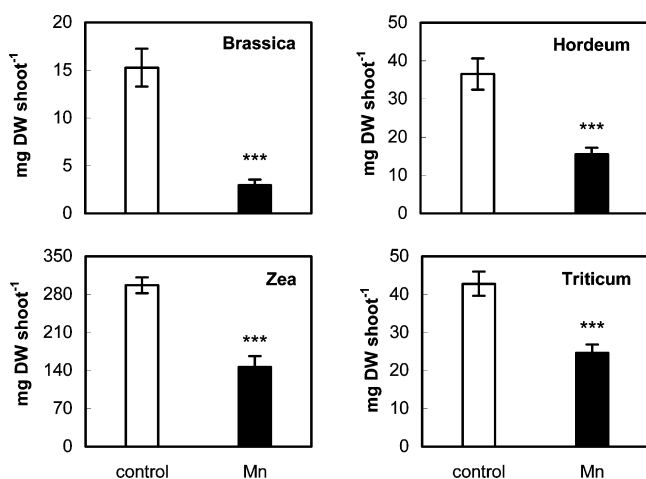


Figure 1. Dry biomass (milligrams per shoot) of four crops cultured in naturally Mn-contaminated soil (shown in Table 1) over 21 days. Data are means \pm SDs ($n = 10$). *** indicates significant difference at 0.001 level of Student's t -test. Brassica, *Brassica napus* cv. Smaragd, Hordeum, *Hordeum vulgare* cv. Bojos, Zea, *Zea mays* cv. Korneli, and Triticum, *Triticum aestivum* cv. Tiguan.

Hordeum contained up to $3500 \mu\text{g Mn g}^{-1}$ in soil with total Mn concentration $500\text{--}2500 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}^2$; both these values are lower compared to our data (Tables 1 and 2), although growth depression by ca. 50% (Figure 1) is similar to mentioned study. Another theoretical comparison is possible with barley plants cultured in hydroponics with 1.83 mM Mn^{2+} where bioaccumulation (BAF) value was ca. 6.5:⁸ considering that water-soluble Mn was $\sim 5 \text{ mM}$ in our study ($280.1 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$, Table 1), our BAF value is 21 and indicates similar extent of Mn uptake despite different culture conditions and Mn concentrations. However, BAF values for almost all species analyzed in the present study were calculated with respect to the pseudototal soil metal content, and this value is therefore lower in the case of *Hordeum* (0.92, Table 3). In this sense, only Mn-cultured *Brassica* had BAF higher than 1 but it does not confirm hyperaccumulation potential because growth was extremely suppressed (Figure 1).

Few studies also report Mn uptake in plants from natural localities and BAF can be calculated. For example, BAF in *Vaccinium myrtillus* was lower in the soil from polluted localities (3.6–14.4) in comparison with control localities (27.6–41.3).¹⁰ In a similar study, species *Plantago lanceolata* and *Cardaminopsis*

arenosa from a polluted locality (mining and metallurgic activity, where also higher soil Mn content was detected), revealed lower BAF if compared to control site (*P. lanceolata* 0.01–0.03 vs 0.09 in control; *C. arenosa* 0.02–0.1 vs 0.37 in control).⁹ Above-mentioned data confirm that various plant species in natural populations do not elevate Mn content, although soil Mn content was higher on polluted localities. On the contrary, our plants had higher BAF values in Mn-soil: there is certainly a “break” of regulatory mechanisms and thus excessive Mn uptake damaged plants visibly in the present study.

Above-mentioned uptake of Mn was therefore reflected in the changes of growth. This was mainly visible in *Brassica* plants where the highest shoot Mn amount correlates with the most depleted growth (cf. Table 2 and Figure 1). Another aspect that certainly affected growth is depletion of some essential nutrients. Mainly Mg and Ca, being quantitatively important divalent cations that could compete with Mn uptake, decreased in plants from Mn-soil (Table 2). Although BAF for these metals was elevated in Mn-soil, indicating that plants effectively cope with their depleted amounts (compared to control, Tables 1 and 3), absolute quantities are probably not high enough for optimal growth (also visible by chlorosis of the leaves that appeared after several days of cultivation). In agreement with our data, Mn excess depleted macronutrients (Ca and Mg) more than the level of micronutrients (Fe, Zn, Cu) in cucumber plants and growth was also affected.⁶ Besides, reduction of available Ca led to a dramatic increase in Mn content in *Phytolacca americana*.²⁴ However, our data also showed that the impact of Mn excess is species-specific and cannot be generalized because some metallic nutrients such as Zn or Fe even increased in Mn-cultured *Brassica* and *Zea*, but not in cereals (Table 2).

Another original aspect arising from the present study is the impact of Mn excess on the uptake of toxic metals. Amount of Cd and Ni was relatively similar in control and Mn-soil (Table 1). Accumulation of Ni was elevated in Mn-soil in *Brassica* and *Zea* plants but not in cereals. On the other hand Cd uptake strongly increased in Mn-cultured *Brassica* plants but was not detected in *Triticum* (Table 2). Owing to absence of similar literature, we are unable to compare these values deeply. Theoretical comparison is possible in relation to studies where polluted and nonpolluted localities in Poland were compared: although polluted localities contained more Mn, they also contained more Cd and therefore sharp increase in shoot Cd

Table 3. Bioaccumulation Factor Calculated as the Ratio of Individual Metals in Tissue (Table 2) to Total Soil Metal Content (Table 1)^a

	Brassica		Hordeum		Zea		Triticum	
	control	Mn	control	Mn	control	Mn	control	Mn
Mn	0.079	2.11	0.087	0.92	0.092	0.86	0.098	0.36
K	4.13	12.8	6.39	10.5	6.14	6.38	6.14	8.03
Ca	22.5	36.6	5.44	15.7	4.33	15.0	4.40	7.41
Mg	0.899	4.53	0.54	2.83	0.25	1.92	0.34	1.47
Zn	0.67	2.01	0.73	0.64	0.56	0.74	0.66	0.61
Na	1.65	9.87	5.83	9.13	0.17	0.24	0.17	0.47
Fe	0.0047	0.0115	0.0032	0.0031	0.0017	0.0061	0.0039	0.0045
Cu	0.27	0.39	0.28	0.40	0.27	0.26	0.34	0.41
Ni	0.09	0.24	0.051	0.075	0.044	0.098	0.11	0.13
Cd	0.81	1.33	0.16	0.16	0.69	0.48	0.56	nd

^aAccording to literature, BAF <1 and >1 indicate excluders and accumulators, respectively (see ref 18 for details).

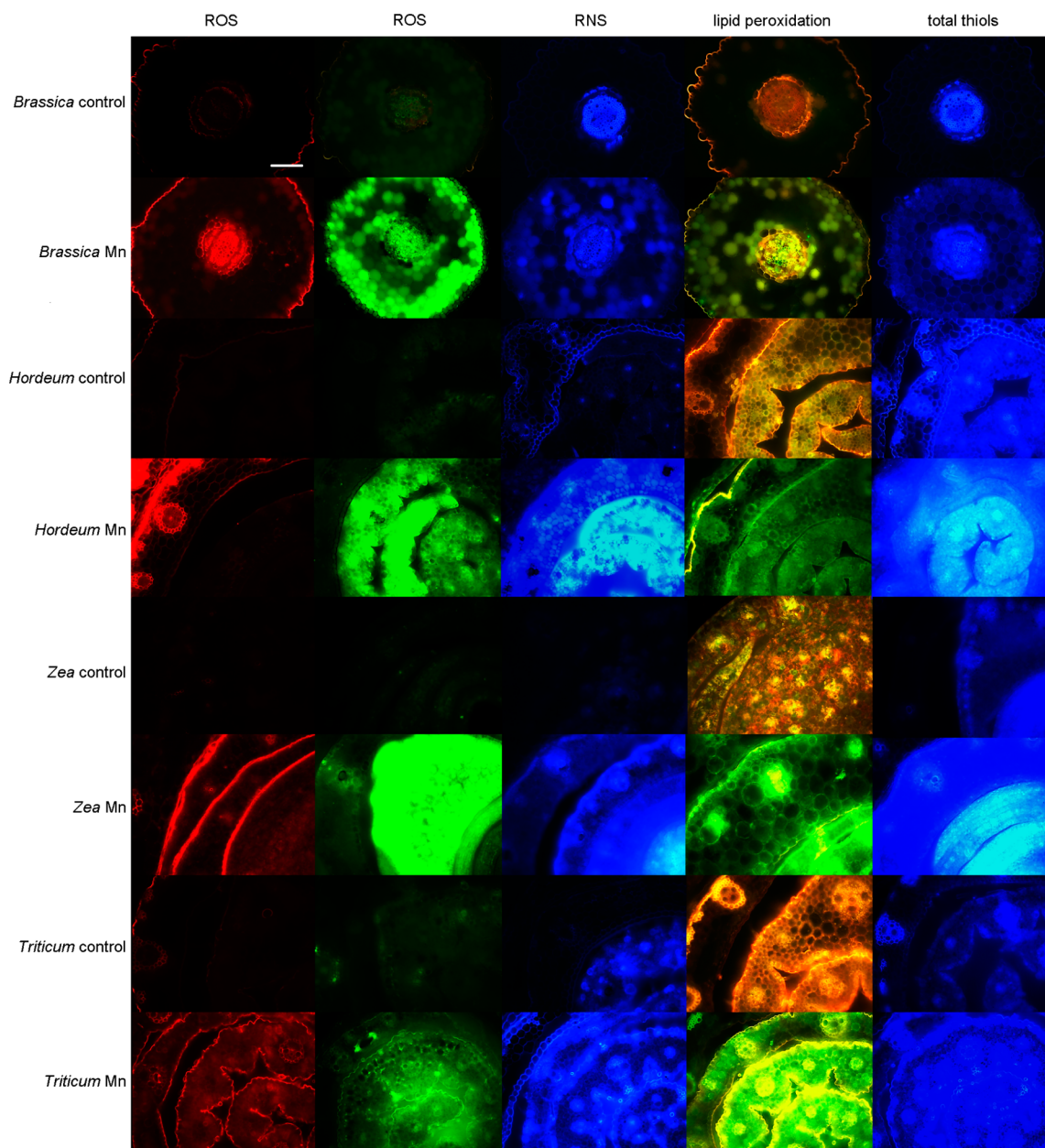


Figure 2. Fluorescence microscopy of selected oxidative stress-related parameters in the shoots of four crops cultured in naturally Mn-contaminated soil over 21 days. Species identity is the same as in Figure 1. Cross sections were taken ca. 1 cm above the stem base and were immediately stained. ROS (reactive oxygen species) were stained with CellROX Deep Red reagent (red signal) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (green signal), RNS (reactive nitrogen species) with 2,3-diaminonaphthalene, lipid peroxidation with BODIPY 581/591 C11 and total thiols with monochlorobimane. Bar indicates 200 μm .

content was found in three species.^{9,10} However, our data again confirm that the uptake of toxic metals under Mn excess is not influenced only by pH or Mn itself and cereals (*Hordeum* and *Triticum*) seem to be less effective accumulators.

Oxidative Stress, Antioxidative Enzyme Activities and Metabolites in Plants Cultured in Mn-Contaminated Soil. Appearance of oxidative stress may be detected by various qualitative and quantitative methods. Fluorescence microscopy is sensitive qualitative method owing to use of specific reagents. In fact, visualization of ROS by two staining reagents confirmed that Mn excess evoked increase in ROS in all species investigated (Figure 2). Relatively less pronounced enhancement was observed in *Triticum*, a species with the lowest Mn amount (Table 2 and Figure 2).

Changes of nitric oxide (RNS, Figure 2) were also less extensive in *Triticum*, indicating that the lower level of oxidative stress does not evoke further elevation of nitric oxide. This fits well with our recent study where concentration-dependent stimulation of ROS in response to Mn excess was observed but nitric oxide presence differed in relation to ontogenetic stage; subsequent tests confirmed that exogenous NO ameliorated the appearance of ROS.¹⁴ This is further evidence that NO plays an important role also under Mn excess, although this aspect is only poorly known.¹⁵

Higher ROS formation may also induce peroxidation of lipids. This peroxidation was confirmed by specific fluorescent reagent, shown as increase in green color within cross sections of tissue (Figure 2). This increase was detected in all species,

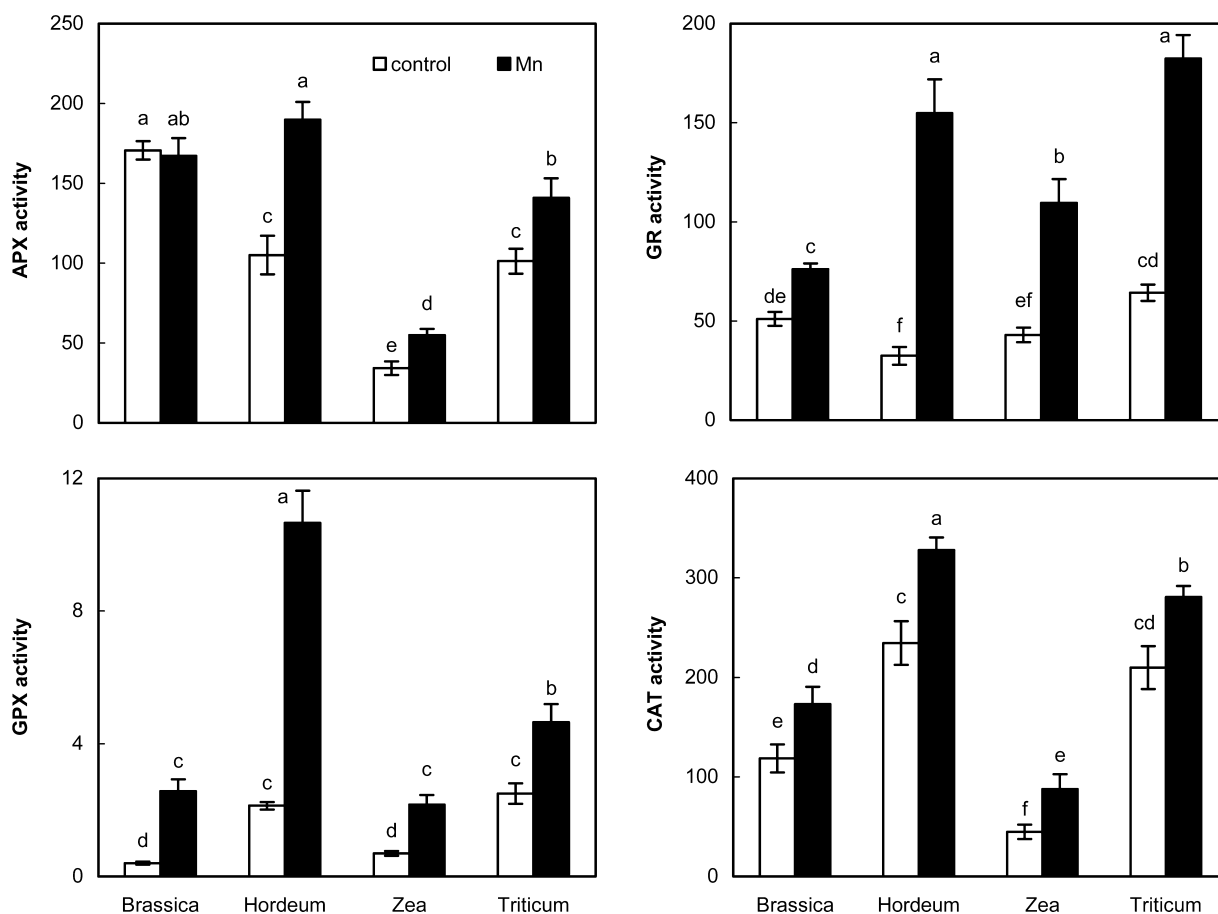


Figure 3. Activities of some antioxidative enzymes in the shoots of four crops cultured in naturally Mn-contaminated soil over 21 days. APX, ascorbate peroxidase; GPX, guaiacol peroxidase; GR, glutathione reductase; and CAT, catalase. Unit is $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein for GPX and $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein for other enzymes. Data are means \pm SDs ($n = 4$). Values within each graph followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$). Species identity is the same as in Figure 1.

indicating oxidative damage from excessive Mn uptake. This may be explained by the fact that all species contained more Mn in shoots than chamomile plants in our previous study, where also concentration-dependent elevation of lipid peroxidation signal was visible.¹⁴ Species-specific sensitivity is also known, e.g., low Mn excess had no impact on lipid peroxidation in mulberry plants,²⁵ while high Mn excess evoked only a slight elevation in rice seedlings after 20 days of cultivation.⁷

Antioxidative enzymes did not show any universal trend in relation to Mn amount in individual species (Figure 3). This was also observed in other species, e.g., in cucumber shoots⁶ and no concentration dependency was found in pea⁵ or chamomile seedlings.¹⁴ In *Hordeum*, activity of enzymes was the most elevated. Peroxidases (APX and GPX) showed significantly enhanced activities in cereals (*Hordeum* and *Triticum*) in response to Mn excess (Figure 3). In agreement with our data, barley plants cultured under Mn excess had higher CAT and GPX activity⁸ and rice seedlings showed elevation of GPX and APX activities in response to long-term presence of high Mn (3 and 6 mM)⁷ that is similar to our water-soluble Mn fraction (Table 1). However, relatively slight impact of Mn on peroxidases in *Zea* observed in the present study has also been previously reported and even 1 mM of Mn^{2+} had negligible impact on oxidative or peroxidative activities in its roots.¹⁶ Above-mentioned data confirm that antioxidative enzymes are involved in tolerance to Mn excess though responses differ in various species. Despite this increase, overall

growth depression and appearance of oxidative damage were detected in all species (Figures 1 and 2). This is in accordance with other crops, e.g., tobacco plants cultured in vitro with 2 or 5 mM Mn contained similar amounts of Mn in leaves (up to 11 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) as our plants (Table 2) but GPX and APX activities were considerably suppressed.¹⁷ Glutathione reductase (GR) showed similar basic values in controls among plants and also strong increase in all species in Mn-soil with the exception of *Brassica* that could again indicate its sensitivity. Enhanced activity of GR was also reported in various crops where other antioxidative enzymes were depleted, such as rice,⁷ cucumber,⁶ and tobacco.¹⁷ This fits well with visualization of total thiols though increase was less visible in some species (Figure 2). However, protein- and nonprotein thiols were variably affected by Mn excess in rice,⁷ providing evidence that "total thiols" staining could not always match fully with individual parameters.

Phenolic metabolites are important stress-induced compounds including excess of metals.²⁶ In the case of Mn excess, it seems that their role is less important because we found significant increase only in *Brassica* plants that could be related to strong growth inhibition (Figure 4). Further studies are needed to analyze profile of phenols in plants under Mn excess. Soluble proteins are typically depleted by excess of metals depending on the given metal and applied concentration.¹¹ Mn excess in the present study evoked depletion in three species, but not in *Zea* (Figure 4). We assume this is related to high

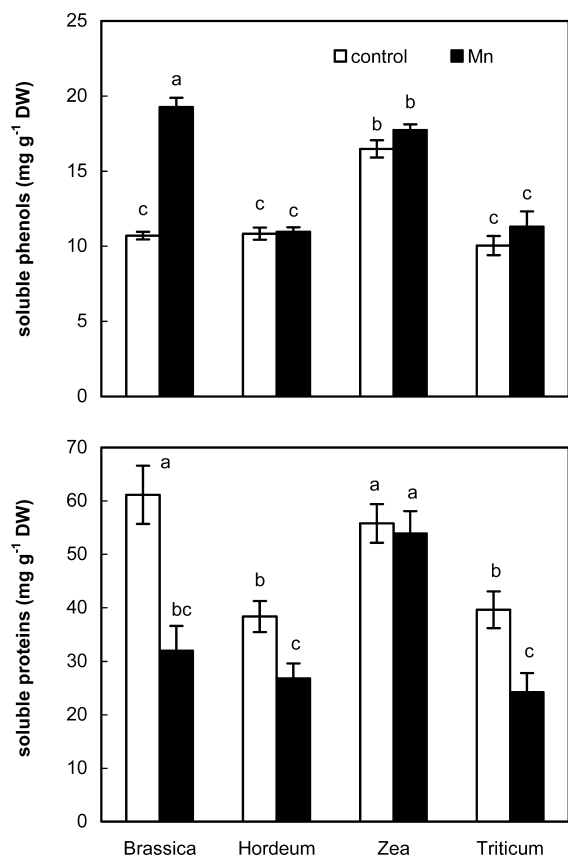


Figure 4. Quantitative changes of total soluble phenols and soluble proteins in the shoots of four crops cultured in naturally Mn-contaminated soil over 21 days. Data are means \pm SDs ($n = 4$). Other details are the same as in Figure 3.

biomass production of *Zea* compared to other species and thus tissue-dilution impact on Mn translocation. Proteomic analyses will be carried out to study detailed changes at proteome level.

Quantitative Changes of Organic and Inorganic Anions in Plants Cultured in Mn-Contaminated Soil.

Amount of malate was the highest among organic anions in control shoots of all plants (Table 4). This is in accordance with earlier report e.g. in *Zea*²⁷ while *Triticum turgidum* contained more oxalic and less malic acid²⁸ than our species (Table 4). Generally, organic acids such as oxalate, citrate and malate play an important role in the detoxification of various metals through chelation^{27,28} or by modulation of rhizosphere pH.²⁹ In the case of Mn excess, oxalic acid is potentially involved in Mn detoxification in *Phytolacca americana*³⁰ and citrate enhanced Mn uptake in *Juncus effusus*.³¹ Our present data showed decrease or unchanged contents of three above-mentioned acids and their role in the Mn uptake in any species is not expected. This could be related, the most probably, to observed growth depletion (and appearance of oxidative stress) leading to attenuated metabolism including Krebs cycle owing to high Mn excess in Mn-soil we used.

Increase in the nitrate amount in the majority of Mn-cultured species is in accordance with the depleted amount of proteins and indicates suppressed nitrate reduction and incorporation into the organic form. This was not observed in *Zea*, which probably has a higher potential to cope with Mn excess (Figure 4 and Table 4). The lower amount of sulfate in the majority of Mn-cultured crops may be related to elevated signal of thiols (Table 4 and Figure 2), suggesting its conversion into the

Table 4. Accumulation of Selected Organic and Inorganic Anions in the Shoots of Four Crops Cultured in Naturally Mn-Contaminated Soil Over 21 Days

	Brassica		Hordeum		Zea		Triticum	
	control	Mn	control	Mn	control	Mn	control	Mn
malate (mg g ⁻¹ DW)	29.3 \pm 2.83b	4.73 \pm 0.38d	40.1 \pm 5.71a	7.44 \pm 0.87c	7.02 \pm 0.59c	2.58 \pm 0.24e	8.07 \pm 0.45c	0.69 \pm 0.05f
citrate (mg g ⁻¹ DW)	16.5 \pm 1.22a	4.59 \pm 0.28c	9.53 \pm 0.69b	3.35 \pm 0.28cd	1.54 \pm 0.26ef	0.96 \pm 0.06f	2.32 \pm 0.20de	0.37 \pm 0.04g
oxalate (mg g ⁻¹ DW)	9.20 \pm 0.79a	3.63 \pm 0.45b	3.07 \pm 0.30b	2.75 \pm 0.25bc	3.65 \pm 0.43b	2.74 \pm 0.22bc	2.36 \pm 0.15c	1.12 \pm 0.09d
acetate (mg g ⁻¹ DW)	6.34 \pm 0.43a	3.37 \pm 0.22b	2.88 \pm 0.20bc	1.19 \pm 0.24e	0.96 \pm 0.13e	2.65 \pm 0.11c	1.86 \pm 0.11d	1.75 \pm 0.09d
formate (μ g g ⁻¹ DW)	205.7 \pm 17.4b	118.8 \pm 14.2c	44.5 \pm 2.92d	5.52 \pm 0.54e	112.0 \pm 18.3c	562.9 \pm 38.6a	239.4 \pm 32.1b	181.5 \pm 13.8b
nitrate (mg g ⁻¹ DW)	12.1 \pm 1.63c	28.3 \pm 3.43a	0.53 \pm 0.04g	7.65 \pm 0.63d	20.9 \pm 2.65b	5.06 \pm 0.37e	0.47 \pm 0.05g	2.88 \pm 0.22f
nitrite (μ g g ⁻¹ DW)	91.4 \pm 4.58b	70.9 \pm 3.24c	nd	nd	158.6 \pm 19.6a	112.3 \pm 17.8ab	37.7 \pm 4.74d	18.8 \pm 1.75e
chloride (mg g ⁻¹ DW)	5.53 \pm 0.19d	2.71 \pm 0.26f	14.3 \pm 1.45b	2.97 \pm 0.32ef	21.6 \pm 1.34a	4.23 \pm 0.41de	10.3 \pm 0.74c	1.64 \pm 0.25g
sulfate (mg g ⁻¹ DW)	11.5 \pm 0.84b	8.45 \pm 0.49c	15.0 \pm 1.10a	8.45 \pm 0.64c	3.56 \pm 0.40d	3.91 \pm 0.26d	8.25 \pm 0.22c	2.34 \pm 0.21e
phosphate (mg g ⁻¹ DW)	20.7 \pm 1.95a	14.1 \pm 1.04b	14.5 \pm 2.00b	5.47 \pm 0.29d	12.2 \pm 1.72b	8.08 \pm 0.56c	11.7 \pm 1.02b	7.75 \pm 0.24c

Data are means \pm SDs ($n = 3$). Species identity is the same as in Figure 1. Values within rows, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$). nd, not detected.

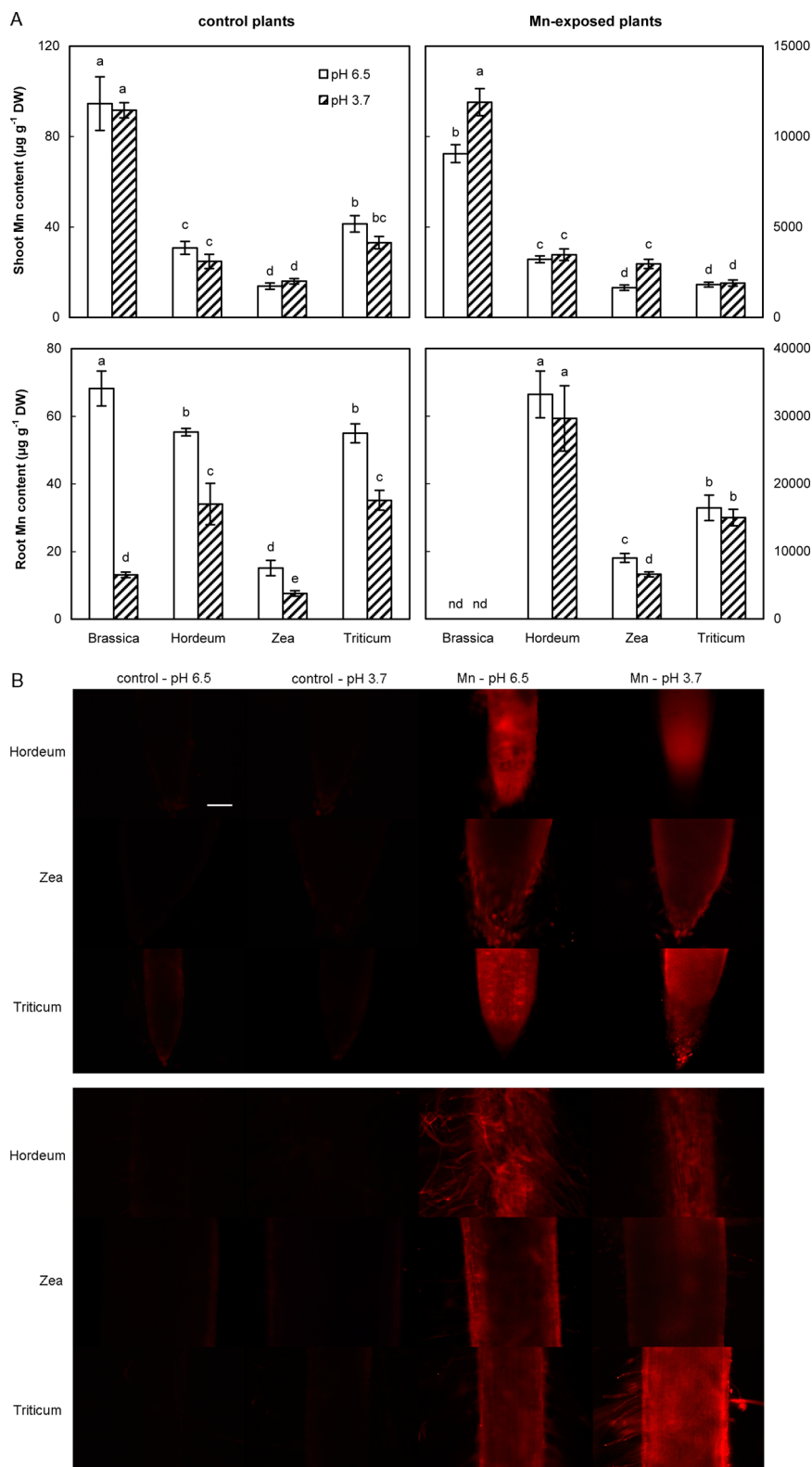


Figure 5. (A) Amount of Mn in the shoots and roots of four crops sown on filter paper and supplemented with deionized water (control plants) or with 5 mM Mn^{2+} solution (Mn-exposed plants) in relation to pH (values were selected based on pH of water extracts of control and Mn-contaminated soil shown in Table 1 and Mn^{2+} concentration based on water-soluble content in Mn-contaminated soil in the same Table). Plants were cultured over 10 days. Data are means \pm SDs ($n = 3$). Other details are the same as in Figure 3. (B) Fluorescence visualization of ROS with CellROX Deep Red reagent in the root tip (above) and upper part of roots (bottom) in relation to pH and Mn absence/presence in the culture solution as mentioned in part A. Bar indicates 100 μm . Note that the root Mn content (nd in graph) and microscopy was not done in Mn-exposed *Brassica* because the roots were strongly rudimentary in the presence of Mn after given exposure time.

organic form under Mn excess. The phosphate quantity was lower in all Mn-exposed species, and its role in Mn uptake is not apparent, although Mn-containing crystals in some species may be formed with phosphate.²⁴

Responses of Crops to Mn-Enriched Solution and Various pH. Because control and Mn-contaminated soil differed in pH (Table 1), we further investigated impact of pH on Mn toxicity in solution culture and crops were sown directly on filter paper with treatment solutions. Values of pH were selected based on water extracts (6.5 and 3.7 in control and Mn-soil) and Mn²⁺ concentration was based on water-soluble content in Mn-contaminated soil (Table 1; 280.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW = ~ 5 mM). Growth (both shoot and root biomass) in control treatments (deionized water only) was reduced only at pH 3.7 in *Zea* (data not shown). In Mn-enriched solutions, growth of *Hordeum* was reduced only by pH 3.7; both pH 3.7 and 6.5 reduced growth of *Zea*, *Triticum*, and *Brassica* (data not shown). Generally, impact of Mn excess on biomass was more negative at lower pH and in the case of *Brassica* it was pH-independent (only rudimentary roots ca. 1 mm long were developed). These are only slight differences in comparison with shoot biomass of plants cultured in Mn-contaminated soil where, e.g., *Triticum* was slightly more tolerant than *Hordeum* (Figure 1). This could be evoked by different exposure conditions and time (10 days in solutions vs 21 days in soil) and it may logically be expected that longer cultivation could lead to restoration of growth after adaptation to Mn excess. However, high sensitivity of *Brassica* to Mn excess (found in soil culture) was confirmed in solution culture and this sensitivity is not therefore pH-dependent but Mn-evoked. In agreement with our observations, growth of potato plants was more negatively affected by lower pH under Mn excess.³

Higher toxicity of Mn at lower pH could also be related to its higher solubility, as it is known that various metals are more readily absorbed at more acidic pH. Subsequent analyses of Mn content were therefore carried out to identify if Mn toxicity is related to its uptake in relation to pH. In control plants, decrease of pH depleted Mn content preferentially in the roots while such observation in Mn-exposed plants was only exceptional (Figure 5A). It has been reported that increasing pH increased Mn accumulation in the roots of barley³² and Mn uptake by potato was also higher at pH 5.8 than at pH 4.0 depending on applied Mn dose.³ This is partially in contradiction to our data because the Mn content in Mn-exposed plants was slightly higher or unaffected by lower pH in shoots (Figure 5A) but may be explained by concentration dependency of this process because potato treated with 5 mM (approximate concentration of water-soluble Mn in our Mn-soil as mentioned above) showed lower difference between various pH. However, impact of pH on Mn uptake was negligible in our Mn-exposed plants while more pronounced differences in control plants are rather evoked by translocation from seed during growth. This is in accordance with data from *Spiraea* plants where media pH did not affect foliar Mn.⁴ It is also visible that shoot Mn content in Mn-treated plants was very similar to that observed in soil culture (cf. Figure 5 and Table 2) with *Brassica* and *Triticum* containing the highest and the lowest value, respectively.

The relatively negligible impact of pH in terms of Mn uptake was further verified at the level of oxidative stress induction. Fluorescence indicator of "general ROS" revealed no extensive or pH-dependent impact either in control or Mn-cultured roots (Figure 5B). It is clear that the appearance of oxidative damage

is related to Mn presence, and the same was observed in shoot samples mentioned above (Figure 2).

CONCLUSIONS

Naturally contaminated manganese soil used in the present study had a clearly negative impact on the growth of four crops after prolonged cultivation. High shoot Mn accumulation and the overall trend of its uptake were similar in soil and solution culture, in which *Brassica* and *Triticum* contained the highest and the lowest amounts, respectively. Solution culture also confirmed that the low pH of Mn soil (3.7) is not the main factor affecting Mn uptake or ROS formation. The elevated fluorescent signal of nitric oxide and thiols together with typically enhanced activities of antioxidative enzymes could contribute to protection against Mn excess in soil culture, while the involvement of phenolic metabolites and aliphatic organic acids in this process was not observed. However, the sensitivity of the investigated plants to soil contamination by Mn urges for further selection of a cultivar tolerant to Mn excess, owing to its presence in acidic soils.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +420 545 133281; fax: +420 545 212044; e-mail: jozkovicak@yahoo.com.

Funding

The sponsor had no involvement in the present study.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by OP Education for Competitiveness (European Social Fund and the state budget of the Czech Republic) CZ.1.07/2.3.00/30.0017 Postdocs in Biological Sciences at MENDELU.

REFERENCES

- (1) Millaleo, R.; Reyes-Díaz, M.; Ivanov, A. G.; Mora, M. L.; Alberdi, M. Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2010**, *10*, 476–494.
- (2) Hernandez-Soriano, M. C.; Degryse, F.; Lombi, E.; Smolders, E. Manganese toxicity in barley is controlled by solution manganese and soil manganese speciation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2012**, *76*, 399–407.
- (3) Sarkar, D.; Pandey, S. K.; Sud, K. C.; Chanemougasoundharam, A. In vitro characterization of manganese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci.* **2004**, *167*, 977–986.
- (4) Stanton, K. M.; Mickelbart, M. V. Growth and foliar nutrition of *Spiraea alba* Du Roi and *Spiraea tomentosa* L. in response to root zone pH. *Sci. Hortic.* **2014**, *165*, 23–26.
- (5) Gangwar, S.; Singh, V. P.; Prasad, S. M.; Maurya, J. N. Modulation of manganese toxicity in *Pisum sativum* L. seedlings by kinetin. *Sci. Hortic.* **2010**, *126*, 467–474.
- (6) Shi, Q.; Zhu, Z. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ. Exp. Bot.* **2008**, *63*, 317–326.
- (7) Srivastava, S.; Dubey, R. S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regul.* **2011**, *64*, 1–16.
- (8) Demirevska-Kepova, K.; Simova-Stoilova, L.; Stoyanova, Z.; Hölzer, R.; Feller, U. Biochemical changes in barley plants after

excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot.* **2004**, *52*, 253–266.

(9) Nadgórska-Socha, A.; Ptasinski, B.; Kita, A. Heavy metal bioaccumulation and antioxidative responses in *Cardaminopsis arenosa* and *Plantago lanceolata* leaves from metalliferous and non-metalliferous sites: a field study. *Ecotoxicology* **2013**, *22*, 1422–1434.

(10) Kandziora-Ciupa, M.; Ciepal, R.; Nadgórska-Socha, A.; Barczyk, G. A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Vaccinium myrtillus* L. leaves in polluted and non-polluted areas. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 4920–4932.

(11) Kováčik, J.; Bačkor, M. Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 471–479.

(12) Kováčik, J.; Klejdus, B.; Hedbavny, J.; Štork, F.; Bačkor, M. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Soil* **2009**, *320*, 231–242.

(13) Gajewska, E.; Skłodowska, M. Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotox. Environ. Safety* **2010**, *73*, 996–1003.

(14) Kováčik, J.; Babula, P.; Hedbavny, J.; Švec, P. Manganese-induced oxidative stress in two ontogenetic stages of chamomile and amelioration by nitric oxide. *Plant Sci.* **2014**, *215–216*, 1–10.

(15) Srivastava, S.; Dubey, R. S. Nitric oxide alleviates manganese toxicity by preventing oxidative stress in excised rice leaves. *Acta Physiol. Plant.* **2012**, *34*, 819–825.

(16) Hadži-Tašković Šukalović, V.; Vuletić, M.; Veljović-Jovanović, S.; Vučinić, Z. The effects of manganese and copper in vitro and in vivo on peroxidase catalytic cycles. *J. Plant Physiol.* **2010**, *167*, 1550–1557.

(17) Santandrea, G.; Pandolfini, T.; Bennici, A. A physiological characterization of Mn-tolerant tobacco plants selected by in vitro culture. *Plant Sci.* **2000**, *150*, 163–170.

(18) Kováčik, J.; Grúz, J.; Klejdus, B.; Štork, F.; Hedbavny, J. Accumulation of metals and selected nutritional parameters in the field-grown chamomile anthodia. *Food Chem.* **2012**, *131*, 55–62.

(19) Kula, E.; Hrdlička, P.; Hedbavny, J.; Švec, P. Various content of manganese in selected forest tree species and plants in the undergrowth. *Beskydy* **2012**, *5*, 19–26.

(20) Kováčik, J.; Klejdus, B.; Babula, P. Oxidative stress, uptake and bioconversion of 5-fluorouracil in algae. *Chemosphere* **2014**, *100*, 116–123.

(21) Muller, M.; deKok, L. J.; Weidner, W.; Tausz, M. Differential effects of H₂S on cytoplasmic and nuclear thiol concentrations in different tissues of *Brassica* roots. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 585–589.

(22) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

(23) Kováčik, J.; Bačkor, M. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Soil* **2007**, *297*, 255–265.

(24) Dou, C.; Fu, X.; Chen, X.; Shi, J.; Chen, Y. Accumulation and interaction of calcium and manganese in *Phytolacca americana*. *Plant Sci.* **2009**, *177*, 601–606.

(25) Tewari, R. K.; Kumar, P.; Sharma, P. N. Oxidative stress and antioxidant responses of mulberry (*Morus alba*) plants subjected to deficiency and excess of manganese. *Acta Physiol. Plant.* **2013**, *35*, 3345–3356.

(26) Kováčik, J.; Klejdus, B.; Štork, F.; Hedbavny, J. Nitrate deficiency reduces cadmium and nickel accumulation in chamomile plants. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5139–5149.

(27) Dresler, S.; Hanaka, A.; Bednarek, W.; Maksymiec, W. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiol. Plant.* **2014**, *36*, 1565–1575.

(28) Adeniji, B. A.; Budimir-Hussey, M. T.; Macfie, S. M. Production of organic acids and adsorption of Cd on roots of durum wheat

(*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Acta Physiol. Plant.* **2010**, *32*, 1063–1072.

(29) Javed, M. T.; Stoltz, E.; Lindberg, S.; Greger, M. Changes in pH and organic acids in mucilage of *Eriophorum angustifolium* roots after exposure to elevated concentrations of toxic elements. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 1876–1880.

(30) Gao, L.; Peng, K.; Xia, Y.; Wang, G.; Niu, L.; Lian, C.; Shen, Z. Cadmium and manganese accumulation in *Phytolacca americana* L. and the roles of non-protein thiols and organic acids. *Int. J. Phytorem.* **2013**, *15*, 307–319.

(31) Najeeb, U.; Xu, L.; Ali, S.; Jilani, G.; Gong, H. J.; Shen, W. Q.; Zhou, W. J. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *170*, 1156–1163.

(32) Huang, C.; Webb, M. J.; Graham, R. D. Effect of pH on Mn absorption by barley genotypes in a chelate-buffered nutrient solution. *Plant Soil* **1993**, *155–156*, 437–440.

4.2 Oxidační stres vyvolaný manganem a zlepšení tohoto stavu pomocí oxidu dusnatého ve dvou ontogenetických stavech heřmánku lékařského

KOVÁČIK, J.; BABULA, P.; HEDBÁVNÝ, J.; ŠVEC, P. Manganese-induced oxidative stress in two ontogenetic stages of chamomile and amelioration by nitric oxide. *Plant Science*, 2014, roč. 215-216, s. 1–10. ISSN 0168-9452.

Podíl autora Švec P.: 15 % textové části práce a 30 % experimentální práce

Ontogeneze se zabývá původem a vývojem jedince a je součástí evoluční biologie. Rostliny mohou reagovat na stejný podnět jinak v závislosti na ontogenetickém stádiu. Například klíčence ječmenu reagovali na přítomnost Zn, Cd a Cu odlišně, než rostliny, které byly dva týdny staré (Schiller *et al.*, 2014) nebo rostliny Kajanu indického (*Cajanus cajan*), které byly vystaveny zinku ve třech různých ontogenetických stavech a měli také různé odpovědi (Khudsar *et al.*, 2008). Proto jsme se v této práci rozhodli sledovat vliv manganu v několika koncentracích (100, 500 a 1000 μM) na heřmánek lékařský ve dvou různých ontogenetických stádiích (7 týdnů staré rostliny, které byly pěstované hydroponicky a 7 dnů staré klíčence) po dobu 7 dnů.

Zvyšující se dávka manganu neměla vliv na klíčení semen, ale nadbytek manganu způsobil zpomalení růstu klíčenců. Délka kořenů se snížila o téměř 45 % už při koncentraci 100 μM Mn. Nejvíce byl růst zpomalen u koncentrace 1000 μM Mn, kde došlo ke zpomalení růstu o 73,8 %. Růst nadzemní části byl snížen až u koncentrace 1000 μM Mn, kde byla nadzemní část nižší o 29,6 %. Toto snížení délky mělo vliv i na suchou hmotnost klíčenců. Ta korelovala se zpomalením růstu. U kořenové části byla hmotnost nižší o 26,8 % už při koncentraci 100 μM Mn a nejnižší hmotnost byla při koncentraci 1000 μM Mn, kde byla nižší o 73,2 % při srovnání s kontrolou. Snížení hmotnosti nadzemní části odpovídalo zpomalení růstu. Snížení hmotnosti bylo zaznamenáno u nadzemní části při koncentraci 1000 μM Mn o 21 %, při porovnání s kontrolou. Zpomalení růstu a snížení biomasy bylo zaznamenáno i při aplikaci 50-250 μM Mn hrachu v práci Gangwar *et al.* (2010).

Zpomalení růstu mohlo být vyvoláno vyšším příjmem manganu v klíčencích i v rostlinách. Příjem manganu je relativně rychlý proces a dle výsledků je koncentračně závislý. Obsah manganu v nadzemní části sedmítýdenních rostlin byl nejvyšší při aplikované dávce 1000 μM , kde dosahoval množství 1750 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmotnosti. V kořenové části byl stanoven celkový obsah manganu a obsah manganu po oplachu.

Tyto obsahy byli nejvyšší také v aplikované dávce 1000 μM manganu. Celkový obsah byl přibližně 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a obsah po oplachu byl 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Tyto hodnoty jsou nižší při srovnání s aplikovanou dávkou 600 μM Mn okurce v práci Shi *et al.* (2008). Akumulace manganu v nadzemní části byla vyšší a v kořenech nižší než při aplikaci Cd nebo Cu heřmánku (Kováčik *et al.*, 2009). Translokační faktor u sedmi týdenních rostlin se zvýšil mezi aplikovanými koncentracemi 100 a 500 μM manganu z 0,31 na 0,35. V koncentraci 1000 μM byl jen nepatrně nižší a to 0,34. Tyto hodnoty jsou nižší, než byly hodnoty v okurce (přibližně 0,73; Shi *et al.*, 2008), kde byl sledován i vyšší příjem manganu do nadzemní části okurky. Domníváme se, že nižší hodnoty translokačního faktoru jsou způsobeny vyšší tolerantností heřmánku k manganu. V sedmi-týdenních rostlinách byla zaznamenána i změna v obsahu minerálních látek. Tato změna byla v heřmánku pozorována i při aplikaci mědi a kadmia v práci Kováčik *et al.* (2009). Při koncentraci 100 μM Mn se v nadzemní části snížil obsah hořčíku i železa. V koncentracích 500 μM a 1000 μM Mn došlo ke snížení obsahu vápníku a obsah hořčíku i železa zůstal nižší. V kořenech se snižoval obsah vápníku s rostoucí koncentrací manganu od 500 μM . Také došlo ke snížení obsahu mědi všude, kde byl přidán mangan. Fakt, že nedošlo ke změně obsahu draslíku tak, jako v případě aplikace mědi nebo kadmia (Kováčik *et al.*, 2009), naznačuje nízkou toxicitu manganu. Obsah manganu v nadzemní i kořenové části klíčenců heřmánku se zvyšoval s rostoucí aplikovanou dávkou.

Mangan také ovlivnil míru oxidativního stresu (ROS a lipidovou peroxidaci) sedmi týdenních rostlin. V sedmi týdenních rostlinách mírně vzrostla aktivita APX v nadzemní části heřmánku při koncentracích 500 a 1000 μM . Aktivita APX v kořenové části zůstala bez změn. Nízká stimulace APX byla také pozorována u rýže vystavené vysoké dávce manganu (mM) v práci Srivastava *et al.* (2011) a také u klíčenců hrachu vystavené nižší dávce manganu (μM) v práci Gangwar *et al.* (2010). Aktivita GPX vzrostla jak v kořenech, tak v nadzemní části při koncentraci 100 μM Mn. Se zvyšující se dávkou Mn se aktivita GPX snižovala jak v nadzemní části, tak v kořenové části. Aktivita GR se v nadzemní části heřmánku neměnila, ale v kořenové části byla zvýšena u aplikované dávky 100 a 500 μM Mn a při koncentraci 1000 μM Mn došlo k poklesu aktivity při srovnání s kontrolou. Obsah peroxidu vodíku se v kořenové části neměnil. Jeho obsah se zvýšil jen v nadzemní části u koncentrací 500 a 1000 μM Mn. Obsah superoxidu se zvyšoval v nadzemní části s rostoucí koncentrací manganu. V kořenové části se zvyšoval obsah superoxidu až od 500 μM Mn. Obsah superoxidu

byl jednoznačně vyšší v kořenové části. Toto rozložení (rostoucí obsah H_2O_2 v nadzemní části a zvyšující se obsah superoxidu v kořenové části) bylo pozorováno i v klíčencích rýže vystavené 6 mM $MnCl_2$ v práci Srivastava *et al.* (2011). Superoxid, spíše než peroxid vodíku, přispěl k vizualizaci ROS. Vizualizace ROS odpovídá výsledkům stanovení obsahu superoxidu a peroxidu vodíku. Vizualizace lipidové peroxidace souhlasí s rostoucím obsahem látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou a se zvyšujícím se obsahem ROS, podobně, jako při aplikaci 600 μM Mn okurce v práci Shi *et al.* (2008). Obsah těchto látek se zvyšoval s rostoucí koncentrací manganu, jak v nadzemní části, tak v části kořenové. Vizualizace ROS v klíčencích ukázala stejný trend jako ve vzrostlých rostlinách. Stejný trend, jako u sedmi týdenních rostlin, byl zaznamenán i u vizualizace lipidové peroxidace v klíčencích heřmánku. Vizualizace RNS/NO v klíčencích ukázala, že se obsah oxidu dusnatého zvýšil při koncentraci 100 μM Mn, ale při koncentraci 500 a 1000 μM Mn došlo k razantnímu úbytku NO v kořenech klíčenců, při srovnání s kořeny u sedmitýdenních rostlin, u kterých obsah NO stoupal s rostoucí dávkou manganu. Jakým způsobem se podílí NO na toxicitě manganu, není přesně známo.

Proto jsme otestovali vliv exogenního oxidu dusnatého na klíčencích heřmánku, který byl aplikován jako SNP v různých koncentracích (100, 500 a 1000 μM). Výsledky ukázali, že došlo ke snížení oxidativního stresu na klíčence, které byly vystaveny 1000 μM koncentraci manganu. Při aplikované dávce 1000 μM Mn byla aktivita CAT nejvyšší. S rostoucí dávkou SNP se aktivita CAT postupně snižovala. Aktivita APX se zvýšila až při dávce 500 μM SNP a při dávce 1000 μM SNP se již nezměnila. GPX aktivita se zvýšila při samostatně aplikovaném Mn. Při porovnání s kontrolou byla aktivita GPX mírně vyšší při koncentracích SNP 500 a 1000 μM . GR aktivita se neměnila s aplikovanou dávkou SNP. Současně s tímto zmírněním Mn-indukovaného oxidativního stresu klíčenců, došlo ke snížení příjmu manganu v závislosti na aplikované dávce SNP a také ke zlepšení růstu kořenů a nadzemní části klíčenců. Zlepšení růstu bylo sledováno i při aplikaci 10 μM SNP *Lupinus luteus*, která byla vystavena působení olova a kadmia v práci Kopyra *et al.* (2003). Dospěli jsme k závěru, že NO se podílí na tolerantnosti klíčenců heřmánku k vyšším dávkám manganu.



Manganese-induced oxidative stress in two ontogenetic stages of chamomile and amelioration by nitric oxide



Jozef Kováčik^{a,*}, Petr Babula^b, Josef Hedbavny^a, Pavel Švec^a

^a Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

^b Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2013

Received in revised form 21 October 2013

Accepted 26 October 2013

Available online 2 November 2013

Keywords:

Fluorescence microscopy

Heavy metals

Mineral nutrients

Ontogenesis

Reactive oxygen species

ABSTRACT

Impact of manganese (Mn^{2+}) excess (100, 500 and 1000 μM over 7 days) on two ontogenetic stages (7-week-old plants and 7-day-old seedlings) of *Matricaria chamomilla* was compared. Mn excess depressed growth of seedlings (but not germination) and stimulated oxidative stress (ROS and lipid peroxidation) in both plants and seedlings. Growth inhibition could be evoked by higher Mn uptake and higher translocation factor in seedlings than in plants. Total thiols staining revealed elevation in almost all treatments. In 7-week-old plants, activity of peroxidases increased slightly and rather decreased under high Mn doses. Superoxide rather than hydrogen peroxide contributed to visualized ROS presence. Fluorescence of nitric oxide (NO) showed stimulation in plants but decrease in seedlings. Impact of exogenous nitric oxide donor (sodium nitroprusside/SNP) was therefore tested and results showed amelioration of 1000 μM Mn-induced oxidative stress in seedlings (decrease in H_2O_2 and increase in NO content while antioxidative enzyme activities were variably affected) concomitantly with depleted Mn accumulation. It is concluded that NO participates in tolerance to Mn excess but negative effects of the highest SNP dose were also observed. Extensive fluorescence microscopy is also explanatively discussed.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Increasing industrial production leads to elevated release of undesirable heavy metals into the environment and represents increasing risk for human health if accumulated in crop plants. On the hand, numerous metals are essential for plant growth and productivity but may be phytotoxic at higher concentrations. Among them, manganese (Mn) is important micronutrient being e.g. component of plant photosystem II [1,2]. Its toxicity is favored in acidic soils where amount of Mn^{2+} increases and it can be easily absorbed and translocated within plant leading often to growth inhibition [3,4].

Heavy metals stimulate increase in ROS (reactive oxygen species) formation, being affected especially by the given metal and exposure concentration [5]. This phenomenon was also observed in terms of Mn excess though with substantially lower intensity considering applied Mn concentrations [6]. This oxidative stress may be controlled by various antioxidative enzymes [7,8]. Their activity in Mn-exposed plants is usually affected only slightly e.g. at the level of peroxidases [9]. Though harmful if present in excess, ROS may also modulate plant growth [10]. On the contrary to ROS, nitric oxide (NO) typically exhibits protective effect in plants

through changes in relation to ROS [11]. Its involvement in Mn toxicity has only rarely been studied [12]. Surprisingly, changes to NO content under Mn excess have not yet been observed/visualized and eventual toxicity of widely used NO donor (sodium nitroprusside, SNP) is only partially known [13]. Typically, SNP ameliorates metal-induced depression of growth and toxicity in various plants [14–17].

Mn uptake was studied in numerous species and it is well known that it accumulates considerably in plant biomass [6,18]. Chamomile (*Matricaria chamomilla*) is a widely used medicinal plant cultured throughout the world. It accumulates considerable amount of some metals such as Cd and Ni in the shoot [19]. Other metals, such as Al, are only slightly accumulated [20]. It was therefore the aim of the present study to verify Mn uptake and subsequent alteration of oxidative stress-related parameters in chamomile treated by three Mn doses. Owing to various cultivation and species analyzed, comparison of Mn uptake is often complicated. We therefore cultured older plants in hydroponics and compared responses with seedlings germinated directly in solutions with identical Mn concentrations.

Fluorescence microscopy is modern technique used in physiology [21,22]. It allows visualization of target compounds using (usually) specific probes. Such visual data are suitable to see localization of target compound(s) within tissue or organs. Here we provide extensive fluorescence microscopy of selected oxidative stress-related parameters in Mn-exposed plants for the first time.

* Corresponding author. Tel.: +420 545 133281; fax: +420 545 212044.

E-mail address: jozkovacic@yahoo.com (J. Kováčik).

For complexity, we also compare these responses in two ontogenetic stages of chamomile mentioned above. Eventual involvement of NO in Mn-induced toxicity was also studied in chamomile seedlings.

2. Materials and methods

2.1. Plant culture, experiments design and statistics

Twenty-one days old seedlings of *M. chamomilla* L. (tetraploid 'Lutea', Asteraceae) germinated in sand were placed to Hoagland solution [11,19,20]. Uniform plants were cultivated in dark plastic boxes with 5 L of continually-aerated solutions (25 plants per box). The experiment was performed in a growth chamber under controlled conditions: 12-h day (6.00 am–6.00 pm), the photon flux density was $\sim 270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR at leaf level supplied by cool white fluorescent tubes L36W/840 (Lumilux, Osram, Germany) with a 25/20 °C day/night temperature and relative humidity of $\sim 60\%$. In these conditions, plants form basal leaf rosettes only (=shoots). Solutions were renewed weekly to prevent nutrient depletion. Plants, that had been cultivated hydroponically during 4 weeks (=total age 7 weeks), were used in the experiment and further cultured for 7 days in mentioned Hoagland solution enriched with Mn^{2+} concentrations 100, 500 and 1000 μM (added in the form of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Including control, all variants contained 2.03 μM Mn^{2+} as micronutrient and pH was checked to be 6.0. One box containing 25 plants was used for each treatment, thus the whole experiment included 4 boxes.

Subsequent experiment was focused on Mn^{2+} uptake and toxicity in chamomile seedlings. Seeds (100) were sown directly on filter paper placed on glass balls (2 mm in diameter) within Petri dishes containing identical Mn^{2+} concentrations of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ as mentioned above (but prepared using deionised water only). Solutions were applied below the surface of filter paper and were not applied directly on filter paper to ensure that Mn^{2+} can freely diffuse through filter paper toward seedlings. Seeds germinated within 48 h and they were harvested 5 days later, thus the whole exposure time was 7 days. Final Mn concentration of solutions was measured to verify that Mn was available through filter paper and selected parameters were monitored. Fluorescence microscopy was also done as mentioned below. Another experiment with seedlings was focused on eventual amelioration of toxicity induced by 1000 μM Mn^{2+} using exogenous nitric oxide supplied as sodium nitroprusside (SNP) in the final concentrations of 100, 500 and 1000 μM . Exposure was realized using mentioned Petri dishes and seeds were again sown on filter paper and experimental solutions were prepared using deionised water only. At least three dishes were used for each treatment.

For fresh mass-requiring parameters, individual plants were powdered using liquid N_2 and fresh material was extracted as described below. Dry samples (dried at 75 °C to constant weight) were analyzed for mineral nutrients and/or Mn amount.

Two independent repetitions of the whole experiment were performed in order to check reproducibility. Data were evaluated using ANOVA followed by a Tukey's test (MINITAB Release 11, Minitab Inc.; State College, Pennsylvania) at $P < 0.05$. Number of replications (n) in tables/figures denotes individual plants measured for each parameter among 7-week-old plants while seedlings within one Petri dish were pooled prior to determination of biomass production, Mn content and enzymatic assays as mentioned in respective tables (then $n = 3$ means three individual dishes).

2.2. Quantification of manganese and mineral nutrients

Samples were prepared by mineralization of dry material in the mixture of concentrated HNO_3 and water (5+5 ml) using

microwave decomposition (Ethos Sel Microwave Extraction Labstation, Milestone Inc.) at 200 °C over 1 h. Resulting clear solution was quantitatively placed to glass flasks and diluted to a final volume of 20 ml. Chamomile seedlings (owing to very low biomass) were mineralized in lower amount of solution and diluted to a final volume of 3 ml. All measurements were carried out using an atomic absorption spectrometer AA30 (Varian Ltd.; Mulgrave, Australia) and the air-acetylene flame. Samples for quantification of "intra-root" Mn were washed with 5 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ before drying. Measurements of mineral nutrients were done as described previously [23] and Mn was quantified at $\lambda_{\text{max}} = 279.5 \text{ nm}$. LOD of Mn was 2 $\mu\text{g/l}$.

2.3. Fluorescence microscopy

In 7-week-old plants, freshly prepared hand-made cross sections were stained. Primary roots were excised ca. 5 cm from the leaf rosettes' base (ca. 3 cm below the surface of cultivation solutions) in the zone of lateral roots formation. In the shoots, adult leaf's petioles of similar age from 3 individual plants were stained. Among seedlings, whole fresh roots or cotyledons were stained. We observed root apex and root in the zone of differentiation, where root hairs appear. ROS and RNS/NO were stained using CellROX® Deep Red Reagent (644_{ex}/665_{em}, Life Technologies Corporation) and 2,3-diaminonaphthalene (Sigma-Aldrich) forming highly fluorescent 1H-naphthotriazole product (365_{ex}/415_{em}) in accordance with manufacturer's instructions. Stock solution of CellROX® Deep Red Reagent in DMSO was diluted by PBS buffer (0.05 M, pH 6.8) to final concentration of 5 μM and samples were stained for 60 min at 37 °C. Stock solution of 2,3-diaminonaphthalene in 0.62 M HCl was used diluted by PBS buffer (0.05 M, pH 6.8) to the final concentration of 250 μM . After incubation, samples were washed three times by PBS buffer and observed. Amplex® Ultra-Red (568_{ex}/681_{em} nm, Life Technologies Corporation) was used to visualize hydrogen peroxide in accordance with manufacturer's instructions. Briefly, plant tissues were incubated in a working solution that consisted of 50 μl of 10 mM Amplex® UltraRed stock solution in DMSO, 100 μl of horseradish peroxidase (10 U/ml in 0.05 M PBS buffer, pH 6.0, Sigma-Aldrich, USA) and 4.85 ml of reaction buffer (0.05 M PBS, pH 6.0). Plant tissues were incubated for 30 min at room temperature and dark to avoid accelerated oxidation. After incubation, plant tissues were carefully washed three times with PBS buffer (0.05 M, pH 6.0) and observed. Lipid peroxidation was visualized by BODIPY® 581/591 C11 lipid peroxidation sensor (581_{ex}/591_{em} nm, Life Technologies, USA) where oxidation of the polyunsaturated butadienyl portion of the dye results in a shift of the fluorescence emission peak from 590 to 510 nm according to manufacturer's instructions. Stock solution in ethanol was diluted by PBS buffer (0.1 M, pH 7.4) to a final concentration of 4 μM . Samples were stained for 30 min at RT and darkness to avoid accelerated oxidation. Thereafter, they were washed three times and observed. The fluorescence of BODIPY® 581/591 C11 was acquired simultaneously using dual excitation (485 and 581 nm) and detection (510 and 591 nm). Final images represent merges of 510 and 591 nm emissions. All staining were carried out in the dark to avoid possible light-accelerated oxidation. Total thiols were stained with monochlorobimane (Sigma-Aldrich, USA). Stock solution of monochlorobimane (394_{ex}/490_{em}) in methanol (11 mM) was used to prepare working solution. Working solution was prepared immediately prior to use by diluting stock solution with PBS (0.05 M, pH 7.2) to a final concentration of 50 μM . Samples were stained for 20 min in the dark at room temperature, washed three times to remove excess of staining solution and observed [21]. Fluorescence microscopy was done with Axioscop 40 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with appropriate set of excitation/emission filters.

2.4. Assay of antioxidative enzymes and stress parameters

Fresh tissue was homogenized with small amount of inert sand using cold mortar and pestle in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0, 1 g FW/5 ml). After centrifugation, supernatants were used to measure enzyme activities and stress parameters. Ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) activities were measured as the oxidation of ascorbate and guaiacol at 290 and 470 nm, respectively [23,24]. Glutathione reductase (GR) activity was assayed as the reduction of GSSG at 412 nm [7]. Catalase activity was measured as the reduction of H₂O₂ to water monitored at 240 nm [24]. Proteins were quantified according to Bradford method with BSA as standard at 595 nm [25]. Owing to extremely low biomass of seedlings (see tables), whole seedlings (not separated to shoot and root) were extracted for the assay of antioxidative enzymes in selected treatments. One sample included 200–400 seedlings. ROS (hydrogen peroxide and superoxide radical content) were measured using TiCl₄ and hydroxylamine method, respectively [23,24]. TBARS were quantified in homogenates prepared with 0.1% trichloroacetic acid with TBA method monitored at 532 and 600 nm [26]. Spectrophotometry was carried out with Agilent/HP DAD UV/Vis 8453 spectrophotometer.

3. Results and discussion

3.1. Mn uptake by plants and impact on mineral nutrients

In 7-week-old chamomile, Mn excess affected neither shoot nor root biomass after 7 days of exposure probably owing to higher biomass of these plants at the beginning of exposure to Mn (ca. 210 mg DW per average shoot and 60 mg DW per average root). Plants also showed no necrosis or chlorosis and roots were without symptoms of increased lignification (free of brown color). In accordance, 5-day-old barley plants exposed to 183–18,300 μM of Mn revealed no alteration of shoot dry weight [27]. On the contrary, 22-day-old cucumber exposed to 600 μM Mn over 11 days showed depleted shoot and root dry biomass [28]. These data indicate variable sensitivity of plants to Mn excess, depending probably more on the given species than on applied Mn concentration. It also seems that chamomile is Mn-tolerant species and we therefore tested responses of seedlings to Mn excess (see below).

Mn uptake by plants is relatively fast process and Mn is quickly accumulated in shoots [1]. This was also visible in chamomile plants and Mn amount increased concentration-dependently (Fig. 1). We also observed that considerable part of root Mn was surface-bound, especially at high exogenous Mn doses (difference between total and intra-root Mn content, Fig. 1). Shoot and root Mn accumulation in chamomile was lower compared to similar (600 μM) application of Mn to cucumber [28]. Generally, shoot Mn uptake was higher but root Mn accumulation was lower at 100 μM Mn compared to previously tested metals using similar concentrations (120 μM Cd or Cu, [23]). Owing to various culture conditions and ontogenetic stages, direct comparison of metal content with literature is often problematic. For this reason, translocation factor (TF) has been introduced, expressing metal shoot/root ratio ([29] and the references therein). Based on the data in Fig. 1, TF is 0.31, 0.35 and 0.34 in 100, 500, and 1000 μM Mn treatment, respectively, while lower TF values for Cd were previously observed (ca. 0.1 [29]). Our TF values for Mn are lower than those found in cucumber plants [28] where higher amount of Mn in shoots was observed. We assume that lower TF may contribute to higher chamomile tolerance to Mn excess in comparison with other species.

Excess of metals usually affects accumulation of essential mineral nutrients. This fact has also been observed under Cu and Cd excess in chamomile [23]. Mn excess revealed more negative

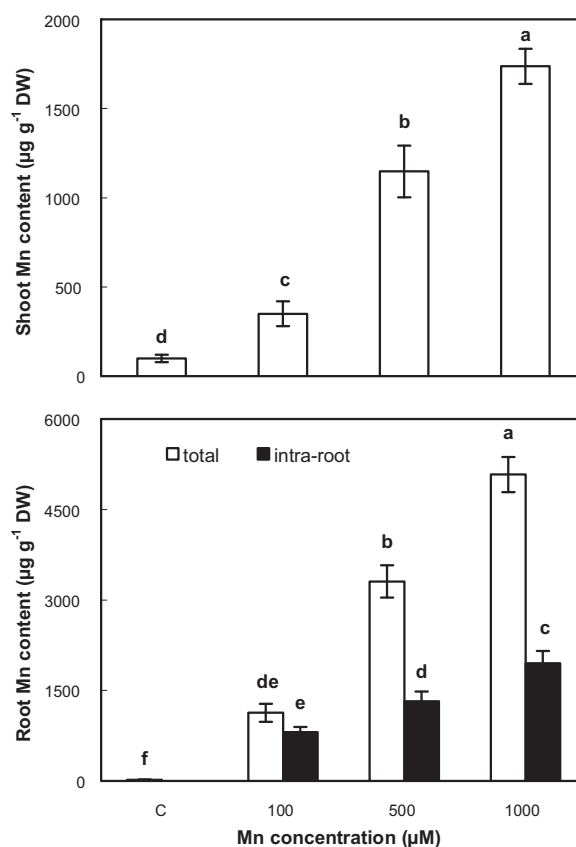


Fig. 1. Uptake of manganese by 7-week-old *Matricaria chamomilla* plants after 7 days of exposure to Mn²⁺ applied through hydroponics. Data are means ± SDs (*n* = 4). Values within each graph followed by the same letter did not differ significantly according to Tukey's test (*P* < 0.05). Control and all treatments contained 2.03 μM Mn²⁺ as micronutrient in basic Hoagland solution. "intra-root" Mn was quantified after washing with Na₂-EDTA (see Section 2).

impact in shoots and depletion of Ca, Mg and Fe was observed (Table 1). In the roots, only Ca and less-pronouncedly Cu amounts were depressed. This overall depression is in contradiction to impact of Cu and Cd that stimulated Fe uptake [23]. On the other hand no effect of Mn on K⁺ accumulation (Table 1) in comparison with previously tested metals indicates low toxicity. Our data fit well with those observed in cucumber plants exposed to 600 μM Mn, where no impact on K⁺ but depletion of Ca, Mg, Fe and Cu was reported [28].

3.2. Impact of Mn on oxidative stress and antioxidative enzymes in plants

Content of H₂O₂ was preferentially elevated in shoots while superoxide in roots of Mn-exposed plants (Fig. 3). This may partially explain why ROS formation was visibly enhanced in all three Mn doses in roots but not in shoots (Fig. 2). Superoxide also increased preferentially in roots while H₂O₂ in shoots of Mn-exposed rice seedlings [6]. Higher ROS formation could induce peroxidation of lipids. This was observed in Mn-exposed chamomile (TBARS content or more specifically mainly malondialdehyde gives signal in this assay, Fig. 3) but with substantially lower intensity compared to previously tested metals [7,11]. This Mn-evoked peroxidation of lipids was also visualized using specific fluorescent reagent, shown as increase in green color within cross sections of tissue (Fig. 2A and B). In agreement, increase in ROS production was followed by accumulation of TBARS in 600 μM Mn-exposed cucumber leaves [28].

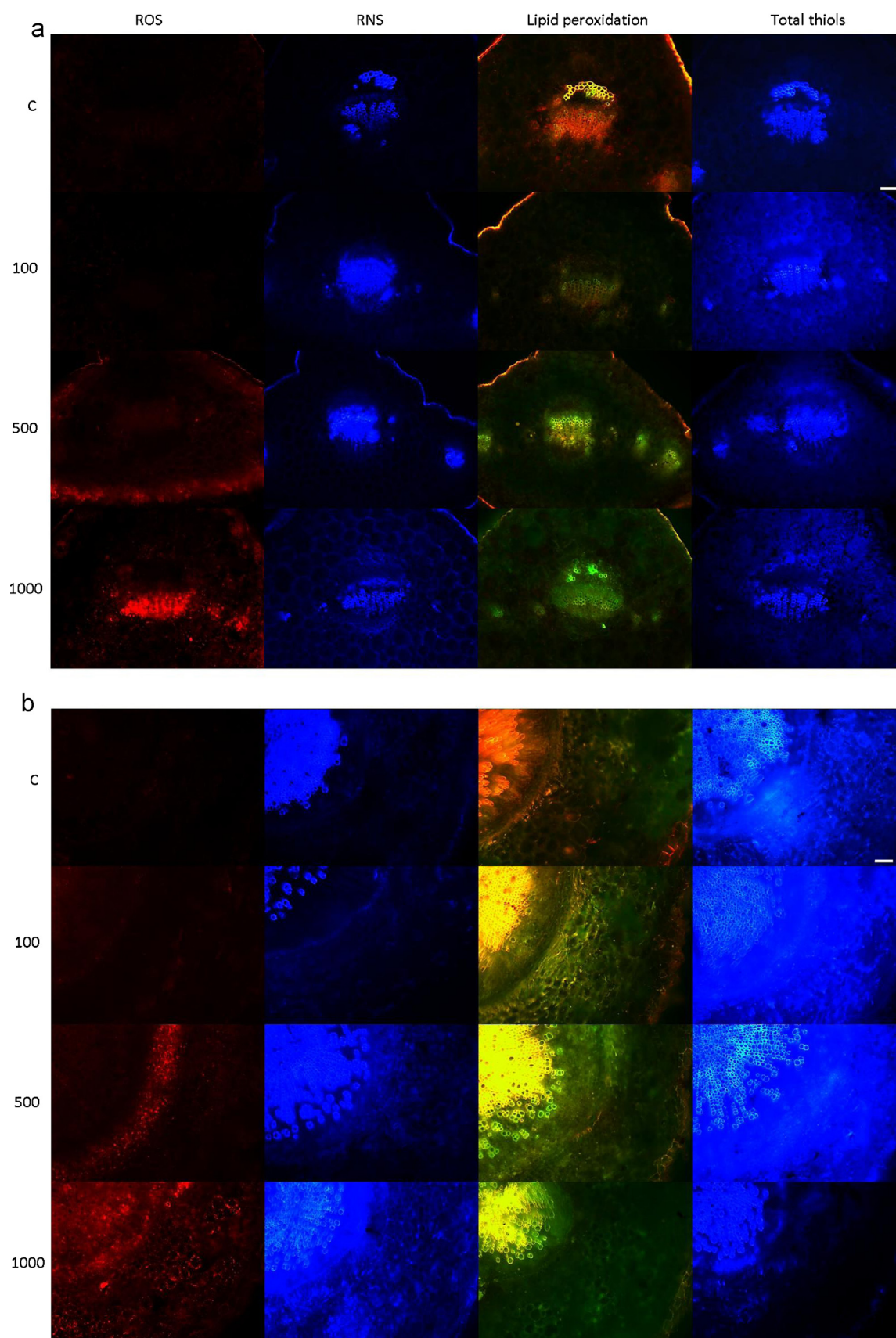


Fig. 2. Fluorescence microscopy of ROS (using CellROX), RNS/NO (using 2,3-diaminonaphthalene), lipid peroxidation (using BODIPY 581/591 C11) and total thiols (using monochlorobimane) in 7-week-old *Matricaria chamomilla* shoots (petioles, 2A) and roots (2B) after 7 days of exposure to Mn²⁺ applied through hydroponics (C – control, 100, 500 and 1000 – μM of applied Mn). Three individual cross sections were stained and representative photos are shown. Bar indicates 100 μm. (For interpretation of the references to colour in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Quantitative changes of selected mineral nutrients in 7-week-old *Matricaria chamomilla* plants after 7 days of exposure to Mn²⁺ applied through hydroponics. Data are means ± SDs (n = 4).

	Control	100 μM	500 μM	1000 μM
<i>Shoots</i>				
K (mg g ⁻¹ DW)	89.4 ± 3.70a	90.7 ± 2.69a	86.8 ± 3.04a	84.2 ± 2.81a
Na (mg g ⁻¹ DW)	4.35 ± 0.18a	3.99 ± 0.33a	3.96 ± 0.11a	4.11 ± 0.23a
Ca (mg g ⁻¹ DW)	5.58 ± 0.33a	5.68 ± 0.21a	4.55 ± 0.25b	4.48 ± 0.29b
Mg (mg g ⁻¹ DW)	3.86 ± 0.25a	3.16 ± 0.22b	3.02 ± 0.15b	2.75 ± 0.16b
Fe (μg g ⁻¹ DW)	134.5 ± 7.43a	101.4 ± 6.64b	92.4 ± 5.60b	91.9 ± 2.63b
Zn (μg g ⁻¹ DW)	48.2 ± 0.79a	48.2 ± 1.97a	46.7 ± 3.54a	51.9 ± 2.45a
Cu (μg g ⁻¹ DW)	9.51 ± 0.34a	9.08 ± 0.52a	9.36 ± 0.32a	8.87 ± 0.61a
<i>Roots</i>				
K (mg g ⁻¹ DW)	91.5 ± 5.43a	94.7 ± 4.63a	87.5 ± 3.84a	87.3 ± 4.83a
Na (mg g ⁻¹ DW)	4.96 ± 0.28a	4.74 ± 0.51a	5.08 ± 0.13a	5.52 ± 0.41a
Ca (mg g ⁻¹ DW)	3.27 ± 0.17a	3.19 ± 0.26a	2.79 ± 0.11ab	2.31 ± 0.27b
Mg (mg g ⁻¹ DW)	1.12 ± 0.13a	1.45 ± 0.20a	1.28 ± 0.17a	1.35 ± 0.30a
Fe (mg g ⁻¹ DW)	2.53 ± 0.41a	2.45 ± 0.45a	2.57 ± 0.26a	2.86 ± 0.24a
Zn (μg g ⁻¹ DW)	100.8 ± 4.42a	107.3 ± 5.13a	97.1 ± 3.94a	103.7 ± 5.27a
Cu (μg g ⁻¹ DW)	44.1 ± 3.63a	41.1 ± 2.37ab	35.1 ± 1.68b	33.3 ± 3.86b

Values within rows followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$).

Assay of ROS-related parameters after 7 days (and subsequent various time dynamics) could be a reason for low APX activity we observed (Fig. 3). Low stimulation of APX activity was also found after prolonged exposure to high Mn doses (mM) in rice [6] and lower Mn doses (μM) in pea seedlings [3]. In contrast, GPX activity was depleted at high Mn concentrations though typically not lower than control value was found (Fig. 3). This could be a reason for observed increase in ROS formation (Fig. 2). Leaves of cucumber treated with 600 μM Mn also showed slight increase in GPX activity [28]. Assay of class III peroxidase activity in maize revealed no impact on specific oxidative/peroxidative activity in roots treated with 1 mM Mn [9]. On the other hand, metals such as Cd and Cu markedly stimulated oxidative stress [7]. Relatively low enhancement of oxidative stress observed under high Mn doses (Figs. 2 and 3) indicates low toxicity of this metal though symptoms are well visible after staining with fluorescent reagents (Fig. 2).

Involvement of nitric oxide in Mn toxicity is poorly known [12]. Visualization of NO/RNS in chamomile showed unequivocally increase upon exposure to Mn in both shoot and root tissue (Fig. 2). In agreement, NO donor (SNP) ameliorated Mn-induced increase in H₂O₂ and TBARS in rice [12]. In terms of histology, it was found that phloem is involved in distal signaling via production and transport of NO under stress conditions and that Ca is involved in this process [22]. We observed intensive NO signal in vascular tissue and an increase in 100 and 500 μM Mn but also decrease in the highest Mn treatment concomitantly with Ca depletion preferentially in shoots (Fig. 2 and Table 1). On the other hand, changes in horizontal distribution of NO signal revealed increasing trend mainly in the roots.

Staining of total thiols revealed slight increase in shoots (Fig. 2A) while the highest Mn concentration caused visible reduction in roots (Fig. 2B). In accordance, decrease in glutathione content was observed in rice [6] and pea [3] seedlings. Because this method does not discriminate between low molecular thiols and peptides containing -SH group, it gives mainly information about sum of thiols. However, these qualitative data are in agreement with depleted GR activity in chamomile roots (Fig. 3), indicating shift in glutathione reduction. This observation, together with depleted GPX activity, could contribute to the highest ROS formation and lipid peroxidation in 1000 μM Mn treatment (Fig. 2).

3.3. Responses of seedlings to Mn excess

In contrast to 7-week-old plants mentioned above, seedlings germinated directly on filter paper with Mn showed reduced root

length and root dry weight (Table 2) and brown color was visible on the roots cultured with 1000 μM Mn. This brown color indicates, the most probably, elevated lignification and this is typical response of roots to elevated metal concentration [30] as well as the main reason for reduced growth [31,32]. Quantification of Mn in residual solution confirmed that Mn was sufficiently available to seedlings through filter paper (Table 2). Germination was not affected and shoot length or dry weight was affected only by 1000 μM Mn. Surprisingly, studies using seeds sown directly to treatment solution are rare in terms of Mn effect. One such study that used a pea has shown decrease in shoot and root FW/DW after exposure to 50–250 μM Mn [3]. This indicates higher tolerance of chamomile seedlings to Mn excess. Mentioned restriction of growth may sufficiently be explained by substantially higher Mn accumulation in seedlings than in plants: it was several times higher in both shoot and root tissue (Fig. 1 and Table 2). Accordingly, TF was also higher than that observed in 7-week-old plants (0.57, 0.56 and 0.47 in 100, 500 and 1000 μM treatment, respectively). We note that similar previous comparison of chamomile older plants and seedlings did not reveal such high difference in shoot Cr content [33], indicating specificity of Mn uptake. Mn (and Fe) content detected in control seedlings (Tables 2 and 3, no exogenously added Mn) clearly arises from seeds during germination.

Root tips and upper part of primary roots were stained owing to direct contact with Mn solutions. Mn-enhanced ROS formation and lipid peroxidation was observed (Fig. 4A and B) while NO presence, in contrast to 7-week-old plants, strongly decreased at high (500 and 1000 μM) but increased at 100 μM Mn treatment. However, NO fluorescence decreased less-pronouncedly in upper parts than in root tips. Similar observation was recorded in Cu-exposed *Arabidopsis* roots where 5 μM Cu evoked higher fluorescence than 25 and 50 μM Cu with sharper decrease of signal in the elongation zone [5]. This is another indication that Mn-induced oxidative stress relies on different mechanism(s) compared to other metals. Fluorescence of total thiols was visibly elevated in whole roots, reinforcing their significance in seedlings' tolerance to Mn excess (Fig. 4). Overall, root responses of seedlings to increasing exogenous Mn concentrations in terms of oxidative stress were similar to 7-week-old plants while changes of NO presence were contradictory.

3.4. Impact of exogenous nitric oxide on Mn toxicity in seedlings

Owing to above-mentioned decrease of NO in seedlings, the highest Mn dose (1000 μM) was investigated after addition of NO

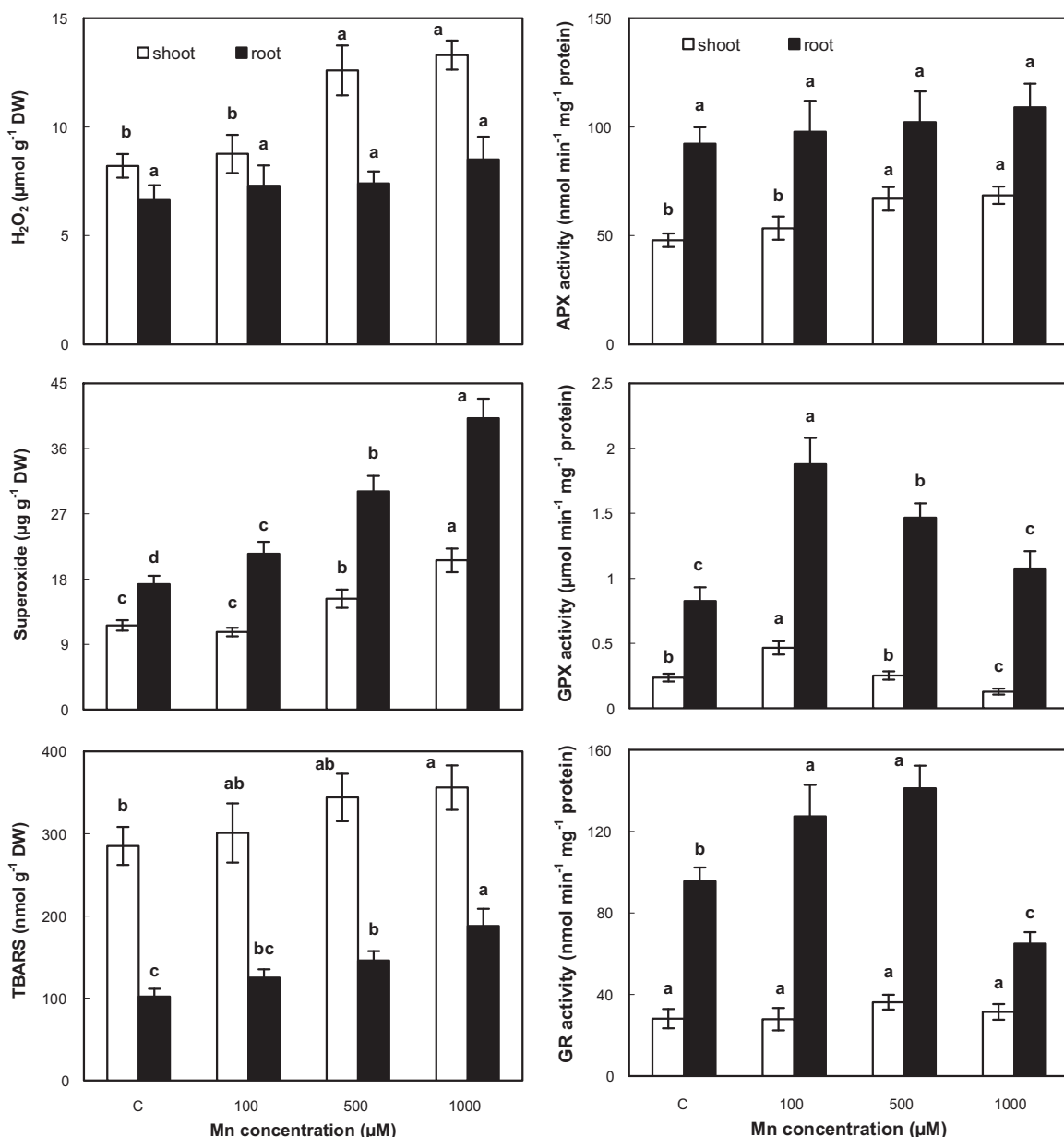


Fig. 3. Quantitative changes of hydrogen peroxide, superoxide, TBARS (MDA) and antioxidative enzymes (ascorbate peroxidase – APX, guaiacol peroxidase – GPX, glutathione reductase – GR) in 7-week-old *Matricaria chamomilla* plants after 7 days of exposure to Mn²⁺ applied through hydroponics. Data are means ± SDs ($n=3$). Other details are as in Fig. 1.

Table 2
Effect of three manganese (Mn²⁺) concentrations on germination and selected characteristics in *Matricaria chamomilla* seedlings cultured on Petri dishes over 7 days (see Section 2 for details). Data are means ± SDs ($n=20$ for shoot and root length, and $n=3$ for other parameters).

Applied Mn concentrations (µM)	Control	100	500	1000
Final Mn concentration (µM)*	nd	8.55 ± 0.83c	136.2 ± 14.7b	405.7 ± 13.8a
Germination rate (%)**	89.6 ± 1.52a	90.7 ± 3.21a	92.0 ± 4.35a	92.3 ± 4.04a
Shoot dry weight***	6.37 ± 0.41a	6.06 ± 0.15a	6.12 ± 0.43a	5.03 ± 0.25b
Root dry weight***	3.13 ± 0.34a	2.29 ± 0.26b	1.86 ± 0.17b	0.84 ± 0.11c
Shoot length (mm per shoot)	8.11 ± 0.43a	8.29 ± 0.50a	8.07 ± 0.48a	5.71 ± 0.45b
Root length (mm per root)	26.6 ± 1.27a	14.5 ± 1.26b	12.4 ± 0.73b	6.96 ± 0.40c
Shoot Mn content (µg g ⁻¹ DW)	77.8 ± 5.98d	2092.6 ± 162.0c	8515.3 ± 278.8b	9603.1 ± 176.0a
Root Mn content (µg g ⁻¹ DW)	34.1 ± 4.26d	3640.2 ± 95.3c	15,169 ± 1586b	20,277 ± 1169a

Values within rows followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's test ($P<0.05$). nd – not detected. Control – no added Mn.

* Residual Mn concentration of applied solutions.

** One dish contained 100 seeds.

*** mg per 100 seedlings.

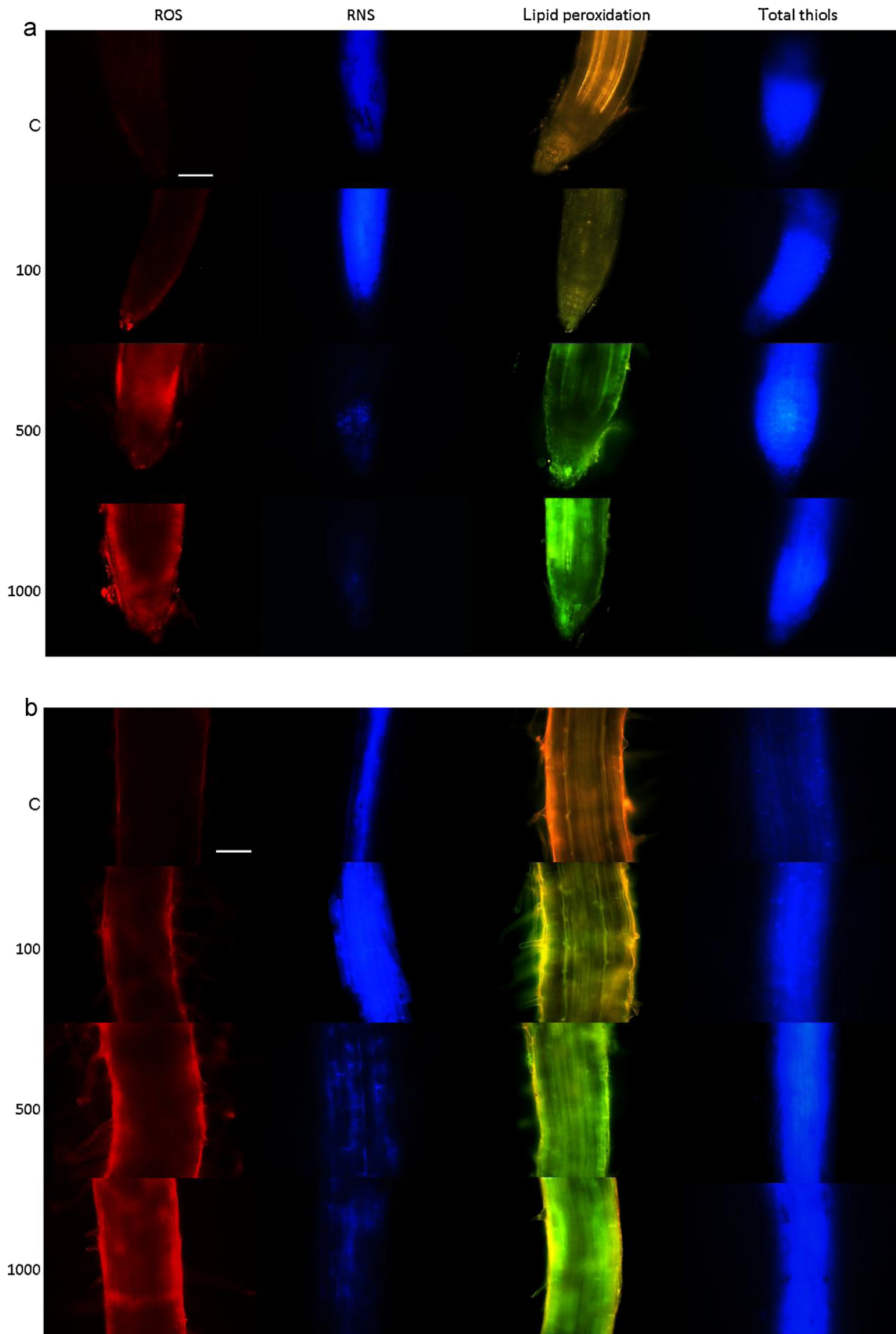


Fig. 4. Fluorescence microscopy of ROS, RNS/NO, lipid peroxidation and total thiols presence in the roots of *Matricaria chamomilla* seedlings after 7 days of exposure to Mn²⁺ applied through filter paper on Petri dishes (4A – root tip, 4B – upper part/differentiation of root hairs, C – control; 100, 500 and 1000 – μM of applied Mn). Three individual roots were stained and representative photos are shown. Bar indicates 100 μm. Staining reagents are the same as in Fig. 2.

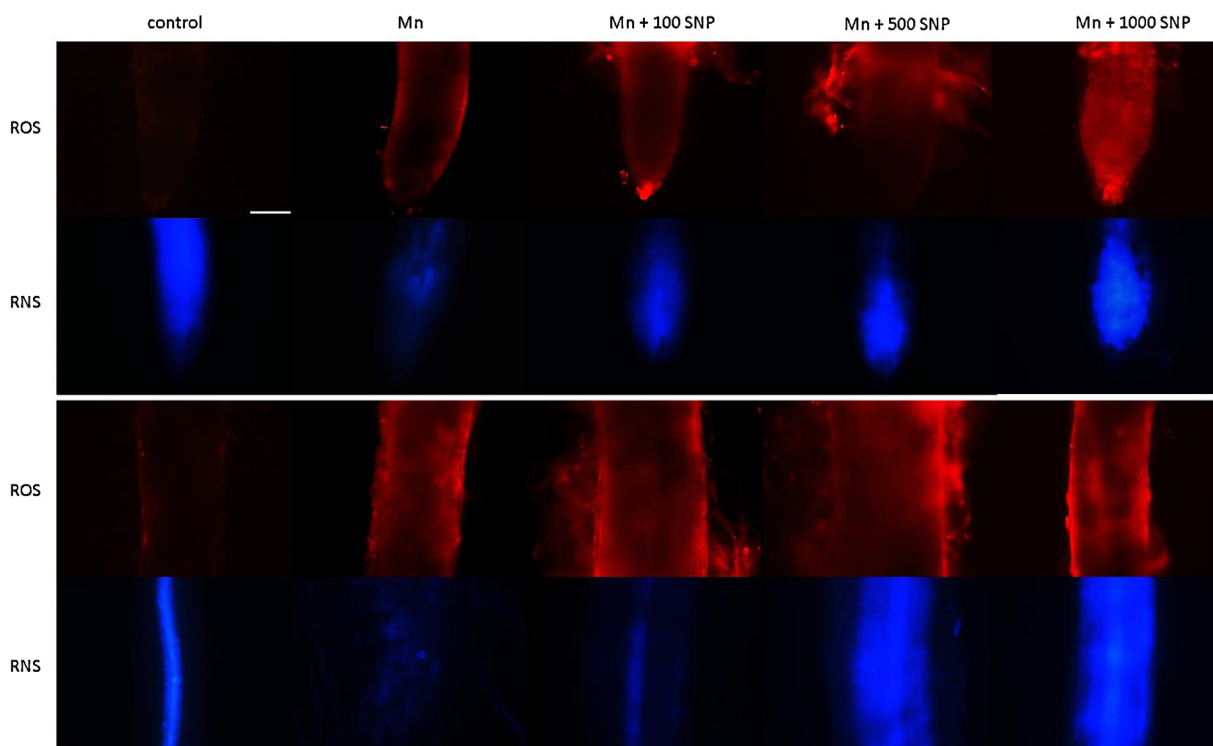


Fig. 5. Fluorescence microscopy of ROS and RNS/NO presence (using CellROX and 2,3-diaminonaphthalene, respectively) in the root tips and upper part of roots in *Matricaria chamomilla* seedlings after 7 days of exposure to 1000 μM Mn²⁺ alone or with the addition of NO donor (sodium nitroprusside/SNP, concentrations 100, 500 and 1000 μM). Three individual roots were stained and representative photos are shown. Bar indicates 100 μm.

donor, sodium nitroprusside (SNP). 1000 μM SNP reversed negative impact of Mn to control value at the level of shoot biomass and shoot length while 500 and 1000 μM SNP improved root biomass and root length to value higher than in Mn alone (Table 3). These observations are rather related to lower Mn uptake (Table 3) than to enhancement of antioxidative enzymes: only APX activity increased in high SNP treatments while catalase activity was lower in Mn + SNP in comparison with Mn alone (Table 3). In agreement, SNP (10 μM) improved growth of *Lupinus luteus* under Pb and Cd excess but antioxidative enzymes revealed discontinuous changes in relation to increasing metal concentrations [14]. Our data show that under Mn excess, SNP may react with this metal to prevent it from reaching the plant organs. On the other hand, SNP also reduced

Ni accumulation and improved growth in *Brassica napus* plants [15]. For complexity, SNP showed both positive and negative impact on Cd and Cu uptake in our recent study [13].

It has been reported that SNP reduces symptoms of oxidative stress [14–17]. This ability is concentration-dependent and toxicity of high SNP doses is also known [13]. It is therefore not surprising that lower SNP doses depleted ROS accumulation more efficiently (Figs. 5 and 6). We note that CellROX[®] Deep Red Reagent (Fig. 5) is not specific to particular ROS and should provide information about ‘generalized oxidative stress’ according to manufacturer. On the other hand, Amplex UltraRed should indicate H₂O₂: all SNP doses depleted H₂O₂ fluorescence after Amplex UltraRed staining (Fig. 6) including shoots (cotyledons, Fig. 6A) but CellROX

Table 3
Impact of exogenous nitric oxide (supplied as sodium nitroprusside, SNP in μM) on 1000 μM Mn²⁺-induced toxicity (Mn) in *Matricaria chamomilla* seedlings cultured on Petri dishes over 7 days (see Section 2 for details). Data are means ± SDs (n = 20 for shoot and root length, and n = 3 for other parameters).

Treatment	Control	Mn	Mn + 100 SNP	Mn + 500 SNP	Mn + 1000 SNP
Germination rate (%) [*]	90.3 ± 1.66a	91.0 ± 2.37a	92.3 ± 3.57a	91.6 ± 3.29a	88.7 ± 2.45a
Shoot dry weight [*]	6.85 ± 0.59a	5.26 ± 0.32b	5.08 ± 0.44b	5.31 ± 0.28b	7.19 ± 0.64a
Root dry weight [*]	3.59 ± 0.21a	0.78 ± 0.09c	0.86 ± 0.12c	2.46 ± 0.13b	2.74 ± 0.26b
Shoot length (mm per shoot)	8.74 ± 0.52a	6.15 ± 0.67b	6.32 ± 0.45b	6.54 ± 0.57b	8.55 ± 0.49a
Root length (mm per root)	28.1 ± 2.34a	7.42 ± 0.56c	7.86 ± 0.63c	17.6 ± 1.82b	15.3 ± 1.22b
Shoot Mn content (μg g ⁻¹ DW)	81.4 ± 5.28e	9865.7 ± 303.4a	7898.3 ± 231.6b	5236.6 ± 319.2c	2923.1 ± 177.5d
Root Mn content (μg g ⁻¹ DW)	48.1 ± 5.63e	20,794 ± 1803a	13,308 ± 584.5b	9536.4 ± 502.1c	4805.7 ± 339.6d
Total catalase activity ^{**}	1.36 ± 0.19c	3.43 ± 0.36a	2.41 ± 0.30b	2.29 ± 0.32b	0.98 ± 0.13c
Total ascorbate peroxidase activity ^{***}	85.9 ± 7.57b	72.7 ± 5.81b	77.3 ± 6.09b	123.6 ± 11.0a	129.8 ± 17.2a
Total guaiacol peroxidase activity ^{**}	0.17 ± 0.013b	0.26 ± 0.027a	0.19 ± 0.031b	0.21 ± 0.028ab	0.20 ± 0.022ab
Total glutathione reductase activity ^{***}	22.3 ± 2.29a	23.6 ± 2.87a	21.7 ± 2.64a	22.5 ± 2.54a	24.0 ± 3.42a
Shoot Fe content (μg g ⁻¹ DW)	80.2 ± 5.82d	75.1 ± 3.69d	166.7 ± 8.62c	469.0 ± 17.3a	386.4 ± 15.5b
Root Fe content (μg g ⁻¹ DW)	97.1 ± 9.04c	103.7 ± 7.32c	451.0 ± 27.8b	2025.9 ± 196.7a	2101.1 ± 143.4a

Values within rows followed by the same letter are not significantly different according to Tukey’s test (P < 0.05). Control – no added Mn. Total activity means that whole seedlings (shoots + roots) were extracted.

^{*} Explanations are the same as in Table 2.

^{**} μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein.

^{***} nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein.

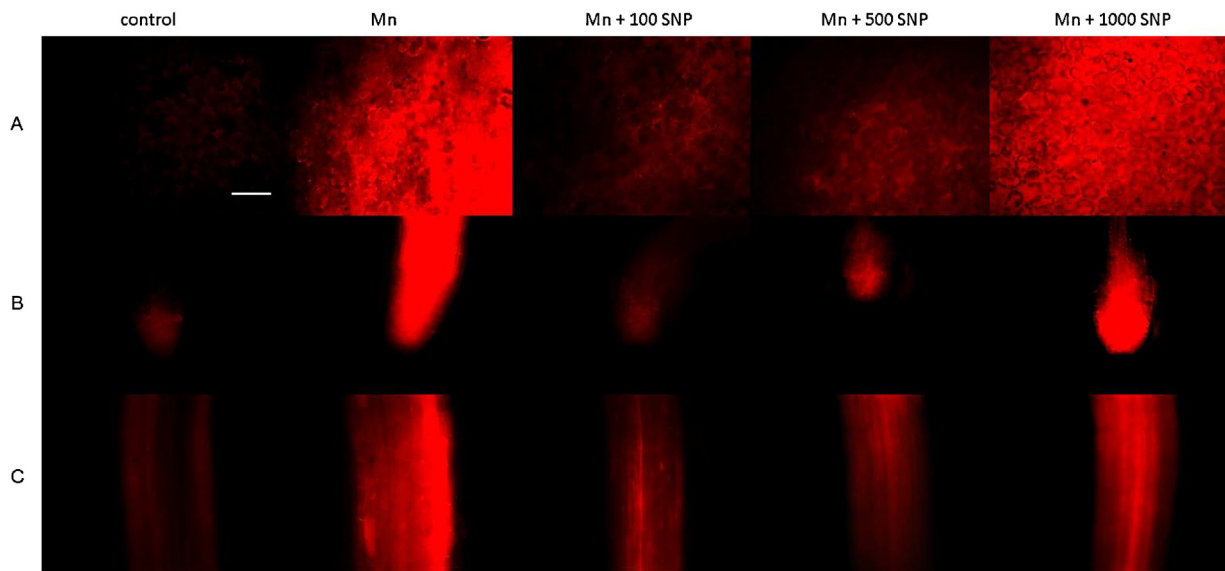


Fig. 6. Fluorescence visualization of hydrogen peroxide (using reagent Amplex UltraRed) in *Matricaria chamomilla* seedlings after 7 days of exposure to 1000 μM Mn^{2+} alone or with the addition of NO donor (sodium nitroprusside/SNP, concentrations 100, 500 and 1000 μM). A – surface of cotyledons, B – root tip, C – upper part/differentiation of root hairs. Three individual seedlings were stained and representative photos are shown. Bar indicates 100 μm .

staining did not revealed similar response (Fig. 5). Depleted H_2O_2 level after SNP addition could be a reason for lower catalase activity (Table 3). It also seems that 'CellROX[®] Deep Red Reagent' is not an indicator of 'generalized oxidative stress' because of mentioned discrepancies in relation to H_2O_2 signal. However, 'restoration' of oxidative stress under 1000 μM SNP in comparison with 100 and 500 μM (Figs. 5 and 6) despite the lowest Mn content in this treatment confirms that higher SNP doses could provoke damage though growth was improved (but further time dynamics could be negative). In accordance, time-dependent responses to SNP application under Mn excess were observed [12]. Owing to presence of Fe in SNP molecule and Fe potential to stimulate ROS generation through Fenton–Haber–Weiss reaction, we quantified Fe amount in chamomile seedlings (Table 3) to verify involvement in ROS 'restoration' (Fig. 6). Fe content was higher in Mn + 100 or Mn + 500 μM SNP than in Mn alone but neither CellROX nor Amplex UltraRed staining showed elevated ROS (Table 3 and Figs. 5 and 6). No clear relation between Fe content and ROS generation was also found at 1000 μM SNP. This confirms that Fe uptake had no direct impact on ROS formation under high SNP doses and that NO is involved in SNP-induced amelioration under Mn excess.

Above-mentioned brown color of 1000 μM Mn-treated roots was reversed in all three SNP doses (less visibly in 100 μM SNP, photo not shown). This is in agreement with quantitative changes of Mn content (decrease of Mn with increasing SNP dose, Table 3) because it was observed that lignification (visible by brown color) is time- and concentration-dependent [30]. Reduced H_2O_2 amount in all SNP treatments (in comparison with Mn alone, Fig. 6) is another indication of depleted lignification because just H_2O_2 is essential component of complete lignification process [11]. Overall, NO donor SNP showed positive impact on Mn toxicity but eventual negative impacts of high doses on oxidative stress and metal content/uptake must be considered when judging significance in such studies.

4. Conclusions

Two ontogenetic stages of chamomile revealed various growth responses to Mn excess, being negative in seedlings. Parameters of oxidative stress were elevated in both stages, indicating

ontogenetic-independent impact of Mn. Total thiols showed almost identical responses in plants and seedlings and participation in amelioration of Mn-induced toxicity is expected. Quantification of Mn accumulation revealed higher uptake and translocation factor's values in seedlings. On the other hand, NO visualization revealed increase in plants but decrease in seedlings, suggesting regulatory role in Mn toxicity. Application of NO donor (SNP) to Mn-treated seedlings partially improved growth, ameliorated oxidative damage and reduced Mn uptake, but negative impact of high SNP dose was also observed. Field studies are needed to verify chamomile tolerance and its medicinal value under Mn excess.

Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Role of the funding source

Sponsors had no involvement in the present study.

Acknowledgement

The work was supported by OP Education for Competitiveness (European Social Fund and the state budget of the Czech Republic) CZ.1.07/2.3.00/30.0017 Postdocs in Biological Sciences at MENDELU.

References

- [1] R. Millaleo, M. Reyes-Díaz, A.G. Ivanov, M.L. Mora, M. Alberdi, Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (2010) 476–494.
- [2] M.A. Gururani, C.P. Upadhyaya, R.J. Strasser, J.W. Yu, S.W. Park, Evaluation of abiotic stress tolerance in transgenic potato plants with reduced expression of PSII manganese stabilizing protein, *Plant Sci.* 198 (2013) 7–16.
- [3] S. Gangwar, V.P. Singh, S.M. Prasad, J.N. Maurya, Modulation of manganese toxicity in *Pisum sativum* L. seedlings by kinetin, *Sci. Hortic.* 126 (2010) 467–474.
- [4] D. Sarkar, S.K. Pandey, K.C. Sud, A. Chanemougasoundharam, In vitro characterization of manganese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Plant Sci.* 167 (2004) 977–986.
- [5] A. Petó, N. Lehotai, J. Lozano-Juste, J. León, I. Tari, L. Erdei, Z. Kolbert, Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings, *Ann. Bot.* 108 (2011) 449–457.

- [6] S. Srivastava, R.S. Dubey, Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings, *Plant Growth Regul.* 64 (2011) 1–16.
- [7] J. Kováčik, M. Bačkor, Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake, *Ecotoxicology* 17 (2008) 471–479.
- [8] E. Gajewska, M. Skłodowska, Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 996–1003.
- [9] V. Hadži-Tašković Šukalović, M. Vuletić, S. Veljović-Jovanović, Z. Vučinić, The effects of manganese and copper in vitro and in vivo on peroxidase catalytic cycles, *J. Plant Physiol.* 167 (2010) 1550–1557.
- [10] H. Tsukagoshi, Defective root growth triggered by oxidative stress is controlled through the expression of cell cycle-related genes, *Plant Sci.* 197 (2012) 30–39.
- [11] J. Kováčik, J. Grúz, B. Klejdus, F. Štork, R. Marchiosi, O. Ferrarese-Filho, Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H₂O₂ and NO in this process, *Plant Sci.* 179 (2010) 383–389.
- [12] S. Srivastava, R.S. Dubey, Nitric oxide alleviates manganese toxicity by preventing oxidative stress in excised rice leaves, *Acta Physiol. Plant.* 34 (2012) 819–825.
- [13] F. Štork, M. Bačkor, B. Klejdus, J. Hedbavny, J. Kováčik, Changes of metal-induced toxicity by H₂O₂/NO modulators in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 5502–5511.
- [14] M. Kopyra, E.A. Gwóźdź, Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*, *Plant Physiol. Biochem.* 41 (2003) 1011–1017.
- [15] N. Kazemi, R.A. Khavari-Nejad, H. Fahimi, S. Saadatmand, T. Nejad-Sattari, Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress, *Sci. Hortic.* 126 (2010) 402–407.
- [16] L. Wang, L. Yang, F. Yang, X. Li, Y. Song, X. Wang, X. Hu, Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity, *J. Plant Physiol.* 167 (2010) 1298–1306.
- [17] G.S.M. Ismail, Protective role of nitric oxide against arsenic-induced damages in germinating mung bean seeds, *Acta Physiol. Plant.* 34 (2012) 1303–1311.
- [18] C. Dou, X. Fu, X. Chen, J. Shi, Y. Chen, Accumulation and interaction of calcium and manganese in *Phytolacca americana*, *Plant Sci.* 177 (2009) 601–606.
- [19] J. Kováčik, B. Klejdus, J. Hedbavny, J. Zoň, Significance of phenols in cadmium and nickel uptake, *J. Plant Physiol.* 168 (2011) 576–584.
- [20] J. Kováčik, F. Štork, B. Klejdus, J. Grúz, J. Hedbavny, Effect of metabolic regulators on aluminium uptake and toxicity in *Matricaria chamomilla* plants, *Plant Physiol. Biochem.* 54 (2012) 140–148.
- [21] M. Muller, L.J. deKok, W. Weidner, M. Tausz, Differential effects of H₂S on cytoplasmic and nuclear thiol concentrations in different tissues of *Brassica* roots, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 585–589.
- [22] F. Gaupels, A.C.U. Furch, T. Will, L.A.J. Mur, K.-H. Kogel, A.J.E. van Bel, Nitric oxide generation in *Vicia faba* phloem cells reveals them to be sensitive detectors as well as possible systemic transducers of stress signals, *New Phytol.* 178 (2008) 634–646.
- [23] J. Kováčik, B. Klejdus, J. Hedbavny, F. Štork, M. Bačkor, Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants, *Plant Soil* 320 (2009) 231–242.
- [24] J. Kováčik, M. Bačkor, Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants, *Plant Soil* 297 (2007) 255–265.
- [25] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [26] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [27] K. Demirevska-Kepova, L. Simova-Stoilova, Z. Stoyanova, R. Hölzer, U. Feller, Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese, *Environ. Exp. Bot.* 52 (2004) 253–266.
- [28] Q. Shi, Z. Zhu, Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber, *Environ. Exp. Bot.* 63 (2008) 317–326.
- [29] J. Kováčik, Hyperaccumulation of cadmium in *Matricaria chamomilla*: a never-ending story? *Acta Physiol. Plant.* 35 (2013) 1721–1725.
- [30] J. Kováčik, B. Klejdus, Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots, *Plant Cell Rep.* 27 (2008) 605–615.
- [31] A. Finger-Teixeira, M.L.L. Ferrarese, A.R. Soares, D. da Silva, O. Ferrarese-Filho, Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 1959–1964.
- [32] L.M. Cervilla, M.A. Rosales, M.M. Rubio-Wilhelmi, E. Sánchez-Rodríguez, B. Blasco, J.J. Ríos, L. Romero, J.M. Ruiz, Involvement of lignification and membrane permeability in the tomato root response to boron toxicity, *Plant Sci.* 176 (2009) 545–552.
- [33] J. Kováčik, P. Babula, B. Klejdus, J. Hedbavny, Chromium uptake and consequences for metabolism and oxidative stress in chamomile plants, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 7864–7873.

4.3 Vliv aniontů, kationtů a pH na akumulaci manganu a jeho toxicitu v zelené řase *Scenedesmus quadricauda*

ŠVEC, P.; KOVÁČIK, J.; HEDBÁVNÝ, J.; BABULA, P.; ROTKOVÁ, G.; KLEJDUS, B. Impact of anions, cations and pH on manganese accumulation and toxicity in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, roč. 227, článek č. 161. ISSN 0049-6979.

Podíl autora Švec P.: 65 % textové části práce a 50 % experimentální práce

V naší práci jsme studovali vliv koncentrace tří různých manganových solí a vliv pH prostředí na modelový organismus, zelenou mikrořasu *Scenedesmus quadricauda*, která je součástí vodního ekosystému a má některé vlastnosti, které jsou výhodou pro tuto práci. Rychle tvoří biomasu a její kultivace není složitá. Při zkoumání vlivu koncentrace Mn na jeho příjem jsme zjistili, že účinnost příjmu byla lepší u koncentrace 10 μM Mn (28,3-37,4 %) oproti 100 μM (9,4-11,2 %). Při srovnání s prací Fargašové (1999), kde zelená řasa *S. quadricauda* byla vystavena působení 100 μM Mn, byl příjem Mn u koncentrace 100 μM podobný jako v našem případě (15,2 %). Bylo zjištěno, že u koncentrace 10 μM Mn se lépe přijal mangan ze síranové soli: při porovnání s chloridovou solí byl rozdíl v příjmu Mn signifikantně významný, přičemž při srovnání s dusičnanovou solí nebyl rozdíl v příjmu manganu již tak patrný. To bude zřejmě zapříčiněno vlivem dusičnanového aniontu, podobně jako u práce Gopalapillai *et al.* (2013), kde byla zkoumána akumulace a toxicita Ni na *Lemna minor* a bylo zjištěno, že vliv Ca^{2+} iontů na zmírnění inhibice růstu kořenů závisí na aniontové části vápenaté soli. Chlorid měl pozitivní účinek, síran mírně negativní a dusičnan vápenatý nereagoval. Tento jev může být způsoben interakcemi nebo afinitou kationtů k danému aniontu (Gopalapillai *et al.* 2013). Zvyšující se koncentrace Mn neovlivnila obsah železa, podobně jako expozice *S. quadricauda* kadmium, respektive mědi (Kováčik *et al.* 2011; Štork *et al.* 2013). Obsah vápníku se mírně změnil v případě 10 μM Mn a výrazně se změnil u 100 μM .

Aplikováním Mn došlo ke změnám v enzymových aktivitách APX, GR, CAT a SOD. 10 μM Mn koncentrace u chloridové a dusičnanové soli nezpůsobila žádnou změnu v aktivitě SOD při srovnání s kontrolou s výjimkou 10 μM MnSO_4 . Vzájemným porovnáním chloridové a dusičnanové soli zjistíme, že aktivita SOD byla signifikantně vyšší u chloridové soli. V případě použité 10 μM síranové soli došlo k výraznému nárůstu aktivity SOD, což je stejný efekt, jako u expozice *Phaeodactylum tricoratum*

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ po dobu 24hod. (Morelli *et al.*, 2004), nebo u expozice *Chlamydomonas vulgaris* zinkem (Yang *et al.*, 2014). S rostoucí koncentrací Mn došlo k významnému poklesu aktivity SOD u všech použitých solí. Nejvíce patrné to bylo u síranové soli, kde byl pokles nejzřetelnější. S aplikovanou a zvyšující se dávkou Mn se aktivita APX snižovala, kde k největšímu poklesu došlo u 100 μM MnCl_2 a $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$. U MnSO_4 byl pokles aktivity APX stejný v obou koncentracích Mn. Nejnižší pokles aktivity APX byl u 10 μM MnCl_2 . Stejný efekt měl i 10 μM MnCl_2 na 5 dní starý naklíčený ječmen, který byl vystaven manganu po dobu 5 dnů, kde také došlo ke snížení aktivity APX se zvyšující se dávkou Mn (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004), na rozdíl od *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays* a *Triticum aestivum*, kde došlo ke zvýšení aktivity APX, při vystavení vlivu manganu po dobu 21 dnů (Kováčik *et al.*, 2014). K významnému nárůstu aktivity CAT došlo u 10 μM MnCl_2 . Při koncentraci 100 μM MnCl_2 byla aktivita CAT nejnižší, což ukazuje na velkou citlivost CAT na chloridové anionty. U $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ došlo k významnému poklesu aktivity CAT s rostoucí koncentrací Mn. U MnSO_4 došlo k opačnému efektu, než u předchozích dvou solí. S rostoucí koncentrací Mn se významně zvýšila aktivita CAT. Tento efekt byl pozorován i u expozice *Phaeodactylum tricornutum* mědí, kde po 24 h došlo k významnému nárůstu aktivity CAT (Morelli *et al.*, 2004). Při srovnání s kontrolou došlo k významnému nárůstu aktivity GR u všech použitých manganových solí a koncentrací s výjimkou 100 μM chloridu. Při stejných koncentracích Mn^{2+} rostla aktivita GR takto: $\text{Cl}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{NO}_3^-$. Nejvyšší aktivity byly zaznamenány při koncentraci 10 μM MnSO_4 a $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$. Zvýšení aktivity GR bylo zaznamenáno i při expozici *P. tricornutum* Cu^{2+} (Morelli *et al.*, 2004), a při expozici *S. quadricauda* Cr^{3+} (Kováčik *et al.*, 2015). Tento vzrůstající trend GR aktivity byl také zaznamenán u *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays* a *Triticum aestivum*, které byli pěstované na manganové půdě, kde došlo také ke zvýšení aktivity GR (Kováčik *et al.*, 2014). Při srovnání výsledků APX a GR vyplývá, že největší oxidativní stres způsobila dusičnanová sůl při obou koncentracích. Z toho lze usoudit, že řasa *S. quadricauda* je citlivá na $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$. Z přiložených fotografií z fluorescenčního mikroskopu je patrné, že zvýšená koncentrace MnCl_2 nezpůsobila tak významný nárůst ROS, jako síranová nebo dusičnanová sůl. Jak z fotografií, tak z enzymových aktivit je vidět, že největší zvýšení ROS v řase způsobil 100 μM dusičnan manganatý, čemuž odpovídá i významný pokles aktivity SOD, CAT a APX v porovnání s kontrolou.

Při zkoumání vlivu pH na příjem Mn jsme zjistili, že nejlépe se Mn přijímal ze síranové soli při všech pH s výjimkou pH 4,5, kde nebyl signifikantní rozdíl mezi testovanými solemi. Nejvyšší příjem Mn byl u síranové soli při pH 9,5, což odpovídá dobré biodostupnosti Mn při vyšším pH > 9,0 (Marschner, 1995). Biodostupnost manganu má dvě maxima. Jak již bylo zmíněno, první maximum je v kyselé oblasti. Druhé maximum je od pH 8,5 a výše. Zde se mangan nachází převážně ve formě $Mn(OH)_x$. Tyto výsledky jsou podobné jako při pokusu s *C. reinhardtii*, kde byl zaznamenán nejvyšší příjem Mn při pH 8,0 (Francois *et al.*, 2007) a při expozici *C. variabilis* manganu při pH 5,0 a 7,0, kde byl lepší příjem zaznamenán u pH 7,0 (Schenck *et al.*, 1988). Nejhůře byl přijímán Mn z dusičnanové soli při pH 6,5 a 9,5 při srovnání s ostatními solemi v příslušném pH. Při kontrolním pokusu bez přítomnosti řasy a při pH 9,5 jsme dokázali, že při tomto pH a vodním prostředí dochází k tvorbě nanočástic manganu, které jsou stabilní (zeta potenciál od -30 do -35 mV). Zjistili jsme, že tvorba nanočástic je koncentracně závislá. Při koncentraci 10 μM byla velikost vytvořených částic 30 – 60 nm, a při koncentraci 100 μM byla velikost částic 65 – 150 nm. Povrch těchto částic byl saturován volnými -OH skupinami. To nás vedlo k závěru, že Mn mohl být přijímán i přes aniontové porty podobně, jako v práci Campbell *et al.* 2002, kde autoři dokázali, že Ag^+ byl přijat ve formě $AgS_2O_3^-$ přes aniontový port řasou *C. reinhardtii*.

Při pH 6,5 se mírně zvýšil obsah glutathionu (GSH) u $MnSO_4$. V tomto pH se GSH u chloridové a dusičnanové soli mírně snížilo v porovnání s kontrolou. U pH 9,5 došlo k výraznému poklesu obsahu GSH s aplikovanou chloridovou solí. $MnSO_4$ a $Mn(NO_3)_2$ nezpůsobili žádné změny v obsahu GSH při pH 9,5. Při porovnání vlivu pH na obsah GSH jsme zjistili, že pH má vliv na celkový obsah GSH. Obsah PC2 nebyl ovlivněn jednotlivými aplikovanými solemi při těchto pH, s výjimkou pH 9,5. Zde došlo k signifikantnímu snížení obsahu PC2 u použité chloridové soli, kde byl obsah PC2 přibližně 7x nižší než u kontroly a síranové soli, kde byl obsah PC2 přibližně 3x nižší než u kontroly. Tento pokles PC2 byl zřejmě důsledek poklesu GSH. Mezi jednotlivými pH nebyla zaznamenána změna obsahu PC2, která mohla být způsobena vlivem pH. Jak ukazuje práce Pawlik-Skowronské, kde *Stigeoclonium tenue* byla vystavena působení Zn a Pb z důlní vody při různém pH, byl obsah PC2 signifikantně vyšší u pH blízko neutrálnímu než při zásaditém pH (Pawlik-Skowronska 2001). Tato změna obsahu PC2 byla zapříčiněna biodostupností testovaných kovů v daném pH. V případě manga-

nu, který má dvě maxima biodostupnosti (kyselé a zásadité prostředí) se tento vliv nepotvrdil.

Pro expozici řasy manganu jsme použili 100 μM MnSO_4 , protože vykazoval nejvyšší příjem. Při aplikaci CaCl_2 a CaSO_4 došlo ke snížení obsahu Mn. Menší pokles, i když stále signifikantně významný, jsme zaznamenali i při použití $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. To poukazuje na možnou soutěž mezi Ca^{2+} a Mn^{2+} při akumulaci (Issa *et al.*, 1995). Při použití draselných solí byl vidět mírný nárůst obsahu Mn u síranové soli a větší nárůst obsahu Mn u použité dusičnanové soli. To nasvědčuje tomu, že K^+ ionty podporují akumulaci Mn v řase nebo alespoň nesoutěží s Mn^{2+} v akumulaci (Gadd *et al.*, 1996). Přítomnost Mn negativně ovlivnil obsah Ca^{2+} . Ke snížení obsahu Ca^{2+} došlo ve všech případech včetně Mn kontroly. Nejvýraznější snížení bylo u CaCl_2 (Issa *et al.*, 1995). Pokles Ca^{2+} v kontrole o přibližně 30 % naznačuje aktivní výměnu Ca^{2+} za Mn^{2+} v řase. Stejný závěr, o výměně Ca^{2+} za Mn^{2+} a naopak, byl zjištěn i u lišejníků *L. pulmonaria*, *N. helveticum* a *L. saturninum*, kde při aplikaci CaCl_2 k MnCl_2 došlo ke snížení obsahu Mn (Hauck *et al.*, 2006). Obsah draslíku byl vyšší při aplikaci chloridu a síranu draselného v přítomnosti Mn, ale i bez přítomnosti Mn, zatím co dusičnan draselný neměl signifikantní vliv na obsah draslíku. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že draslík opravdu podporuje příjem manganu a nesoutěží s ním v příjmu na rozdíl od vápníku. Výsledky z fluorescenčního mikroskopu naznačují, že poškození plazmatické membrány je zapříčiněno přítomností manganu. Se zvyšující se koncentrací manganu se zvyšoval obsah ROS, které v nadměrném množství způsobí poškození plasmatické membrány. Nejvíce poškozenou plazmatickou membránu má řasa právě v kombinaci KNO_3 a MnSO_4 . Právě v této kombinaci, jsme zaznamenali i zvýšení obsahu Mn. Z toho můžeme usoudit, že dusičnan může ovlivnit akumulaci manganu stejně, jako je to známé z jiných případů různých rostlin vystavených působení nadbytku kovů (Kováčik *et al.*, 2011).

Impact of Anions, Cations, and pH on Manganese Accumulation and Toxicity in the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*

Pavel Švec · Jozef Kováčik · Josef Hedbavný · Petr Babula · Gabriela Rotková · Bořivoj Klejdus

Received: 20 July 2015 / Accepted: 15 April 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract Accumulation of divalent manganese (Mn) and its toxicity in the green alga *Scenedesmus quadricauda* was studied at circumneutral pH (6.5). A comparison of two applied concentrations (10 or 100 μM) of MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ indicated that mainly sulfate evoked higher Mn accumulation. On the other hand, nitrate rather depleted antioxidative enzyme activities (APX, CAT, SOD), leading to an increase in ROS formation as proven by fluorescence microscopy. Subsequent experiments revealed that increase in pH (from 4.5 to 9.5) increased also Mn content but typically depleted amounts of reduced glutathione and phytochelatin 2. We also measured the size of particles formed from the manganese salts at pH 9.5. Competitive experiment between Ca/K salts (CaCl_2 , CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl, K_2SO_4 , KNO_3) and Mn (as Mn sulfate) showed a negative relation between Ca and Mn amount but KNO_3 stimulated Mn accumulation. Microscopy revealed that mainly K salts elevated plasma membrane

damage (Acridine orange staining). Data indicate that not only pH but also accompanying anion affects Mn accumulation and that Ca salts may affect Mn toxicity.

Keywords Algae · Antioxidants · Bioaccumulation · Metals · Oxidative stress

1 Introduction

Manganese (Mn) is a microelement, which is necessary for a proper function of many organisms. This metal can be a part of some enzymes and for some of them acts also as a cofactor (Marschner 1995; Dučić and Polle 2005).

Data related to the impact of Mn on algae are only scarce. For example, it was found that exposure to manganese (up to 200 μM) negatively influenced the content of proteins, carotenoids, chlorophyll *a*, and reduced glutathione (GSH) and affected activity of CAT and GPX in microalga *Pavlova viridis* (Li et al. 2007). On the other hand, the positive effect of low manganese concentrations (0–25 nM) was observed in marine alga *Talassiosira* (Ushizaka et al. 2011).

The aim of this study was to determine the effect of three Mn salts used in different concentrations and the influence of pH on a model organism *Scenedesmus quadricauda*. For our experiment, the alga was exposed to two different concentrations (10 and 100 μM) of MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$. We measured the bioaccumulation of Mn, changes in mineral nutrients (Ca, K, Fe, and Zn), and activities of antioxidant enzymes

P. Švec · J. Kováčik (✉) · J. Hedbavný · B. Klejdus
Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
Czech Republic
e-mail: jozkovacik@yahoo.com

P. Babula
Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk
University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

G. Rotková
Department of Experimental Biology, Faculty of Science,
Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno,
Czech Republic

(APX, GR, CAT, and SOD). The impact of different pHs (4.5, 6.5, and 9.5) on the changes in Mn bioaccumulation, contents of GSH, and phytochelatin 2 (PC2) was also examined. The aim of subsequent experiments was to study how manganese competes with Ca and K in our model organism.

2 Materials and Methods

2.1 Algal Culture, Experimental Design, Equipment, and Statistics

S. quadricauda (Turp.) Bréb. (Chlorophyta, Chlorophyceae), strain UTEX 76 (originated from The University of Texas, Austin), was cultured under sterile conditions on Petri dishes in a cultivation room (25/20 °C day/night) at PAR $\sim 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12/12 h day/night) in “Milieu Bristol” medium (Kováčik et al. 2015a,b). Algae were collected from the surface of cultivation medium 4–5 weeks after inoculation, weighed, and resuspended in 5 mM HEPES buffer (pH 6.5) in order to achieve 0.2 g fresh weight algal biomass/50 ml of buffer. Exposure was realized using 50 ml volume of experimental solutions in screw-cap tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Mn was added in the form of MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ in the final concentrations of 10 or 100 μM . Subsequent experiments studied (1) the impact of pH (4.5, 6.5, and 9.5) on the accumulation of Mn and on the contents of GSH and PC2 and (2) the competition between Ca/K salts (CaCl_2 , CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl, K_2SO_4 , KNO_3 ; 100 μM) and Mn (applied as MnSO_4 , 100 μM). In all experiments, the incubation time was 24 h, and thereafter, the algae were centrifuged (5 min, 2000 rpm), washed twice with HEPES buffer, and the algal pellet was extracted with respective solvents mentioned below. Processing of samples for the estimation of enzymes and metabolites involved cold mortar and pestle with the addition of inert sand (to achieve complete cell disruption).

Spectrophotometry was carried out by an Agilent/HP DAD UV/Vis 8453 fluorescence microscope with Axioscop 40 (Zeiss, Germany) and for the quantification of metabolites with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS; Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system coupled on-line to Agilent 6460 Triple quadrupole detector with Agilent Jet Stream Technologies).

ANOVA followed by Tukey’s test (MINITAB Release 11; Minitab Inc., State College, PA, USA) was used to evaluate the significance of differences ($P < 0.05$) between treatments with three 50-ml tubes for each ($n = 3$). Two independent repetitions of the whole experiment were performed in order to check reproducibility.

2.2 Quantification of Manganese and Mineral Nutrients

Samples for determination of total Mn and minerals were prepared by mineralization of dry material in a mixture of concentrated ultra-pure HNO_3 and water using microwave decomposition (Ethos Sel Microwave Extraction Labstation; Milestone Inc.) at 200 °C for 1 h. The resulting clear solution was quantitatively transferred to glass flasks and diluted to a final volume of 20 ml. Measurements were carried out using an atomic absorption spectrometer AA30 (Varian Ltd., Mulgrave, Australia) and the air-acetylene flame (Kováčik et al. 2014b).

2.3 Assay of Enzymatic Activities and Thiols

To detect the enzymatic activity, fresh material was homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). Ascorbate peroxidase (APX) activity was measured as the oxidation of ascorbic acid (290 nm), glutathione reductase (GR) as the reduction of the oxidized glutathione (GSSG) (412 nm), superoxide dismutase (SOD) using kit (catalogue number 19160, Sigma-Aldrich) according to manufacturer’s instructions, and catalase as decomposition of H_2O_2 at 240 nm (Kováčik et al. 2015a,b,c). Proteins were quantified according to the Bradford method (1976) with BSA as standard. GSH and PC2 were extracted by 0.1 M HCl and quantified using LC-MS/MS as reported earlier (Kováčik et al. 2014a).

2.4 Fluorescence Microscopy

Acridine orange (Sigma Aldrich, USA) was used to monitor the extent of plasma membrane damage of algal cells. The algal cells were stained by 0.02 % solution (w/v) of Acridine orange (AO, 502_{Ex}/526, 650_{Em} nm) dissolved in PBS for 10 min at RT. After incubation, the cells were washed three times with PBS to remove excess staining solution: orange-red color indicates chlorophyll autofluorescence and green color indicates

membrane damage evoked by Acridine orange uptake (Kováčik et al. 2014a). The 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Life Technologies, USA) was used to visualize the general pattern of ROS formation (Kováčik et al. 2015a,b).

2.5 Determination of Particle Size and Zeta Potential

The average particle hydrodynamic parameters and diameter distribution were determined by a quasielastic laser light scattering with a Malvern Zetasizer (NANO-ZS; Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Solutions were placed into a polystyrene latex cell and measured at a detector angle of 173°, a wavelength of 633 nm, a refractive index of 0.30, a real refractive index of 1.59, and a temperature of 25 °C (Krizkova et al. 2015).

3 Results and Discussion

3.1 Effect of Mn Dose on Its Accumulation, Mineral Nutrients, and Antioxidative Enzymes

The experiment with Mn concentrations revealed that algae exposed to 10 µM Mn had better efficiency

(quantity received/quantity available \times 100 (%)) of Mn accumulation (28.3–37.4 %) compared to 100 µM (9.4–11.2 %; Fig. 1). The treatment with higher Mn concentration showed results similar to those observed by Fargašová et al. (1999) under comparable conditions (15.2 %). It was found that Mn was the most readily accumulated from sulfate salt at both concentrations. The anion portion of the salt affects the effect of the cation. This fact was proven by Gopalapillai et al. (2013) who used three Ca salts to ameliorate the toxic effects at *Lemna minor* exposed to Ni: each of these three Ca salts had different effects. The same conclusion was reached by Ohtani et al. (2001) when *Brassica rapa* L. was exposed to Cd: uptake of Cd was dependent on the interaction between the anionic part of the precipitant and chemical form of Cd in soil. Increasing concentrations of Mn did not affect the content of Fe, K, and Zn (Table 1). A similar impact was observed in *S. quadricauda* exposed to Cd, Cu, and Zn (Kováčik et al. 2010, 2011; Štork et al. 2013). The content of calcium has been slightly changed under 10 µM Mn and significantly changed at 100 µM Mn.

Exposure to Mn induced changes in the enzymatic activity of APX, GR, CAT, and SOD. Furthermore, 10 µM Mn concentration of chloride and nitrate salts did not cause any changes in SOD activity, compared to

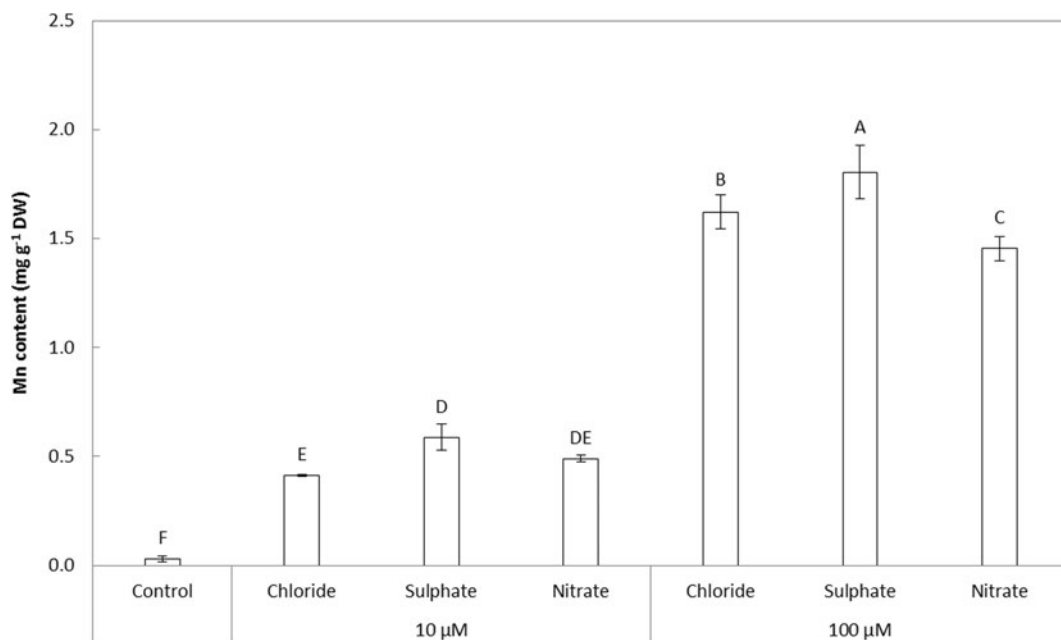


Fig. 1 Content of manganese (mg g^{-1} DW) in *Scenedesmus quadricauda* exposed to MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ applied in two different concentrations (10 and 100 µM) at pH 6.5 over

24 h. Data are means \pm SD ($n=3$). Values followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P<0.05$)

Table 1 Content of selected mineral nutrients in alga *Scenedesmus quadricauda* exposed to MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ applied in two different concentrations (10 and 100 μM) at pH 6.5 over 24 h

		Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	Fe (mg g^{-1} DW)	K (mg g^{-1} DW)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
10 μM	Control	84.04 \pm 7.98 A	0.181 \pm 0.006 A	3.500 \pm 0.006 A	75.32 \pm 7.66 A
	Chloride	76.52 \pm 10.62 AB	0.176 \pm 0.013 A	3.339 \pm 0.232 A	69.88 \pm 11.45 A
	Sulfate	93.20 \pm 13.53 A	0.186 \pm 0.006 A	3.556 \pm 0.256 A	61.96 \pm 4.67 A
	Nitrate	75.38 \pm 11.75 AB	0.180 \pm 0.024 A	3.790 \pm 0.470 A	71.03 \pm 11.64 A
100 μM	Chloride	50.05 \pm 8.83 B	0.183 \pm 0.012 A	2.579 \pm 0.529 A	69.52 \pm 5.68 A
	Sulfate	51.44 \pm 6.95 B	0.180 \pm 0.010 A	2.997 \pm 0.403 A	79.26 \pm 5.41 A
	Nitrate	68.00 \pm 11.67 AB	0.178 \pm 0.006 A	2.584 \pm 0.309 A	77.91 \pm 5.40 A

Data are means \pm SD ($n=3$). Values followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P<0.05$)

control (Fig. 2d). The activity of SOD was significantly higher in chloride salts in comparison with nitrate salts (for 10 μM). If the 10 μM sulfate salt was applied, the activity of SOD increased significantly. This fact corresponds to results of Mn content, where the amount of Mn was higher in case of MnSO_4 . Similar effects were observed in *Phaeodactylum tricornerutum* exposed to $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ over 24 h (Morelli and Scarano 2004). A significant decrease in SOD activity with increasing

concentration of Mn has been determined, in particular when the sulfate salt was applied. This suggests that the antioxidant capacity was altered.

APX activity decreased with the increasing dose of Mn salt (Fig. 2a), where the most significant decrease was noticed in 100 μM MnCl_2 and 100 μM $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, compared to control. Both applied concentrations of MnSO_4 (10 and 100 μM , respectively) induced similar decline of APX activity, in comparison to control. The

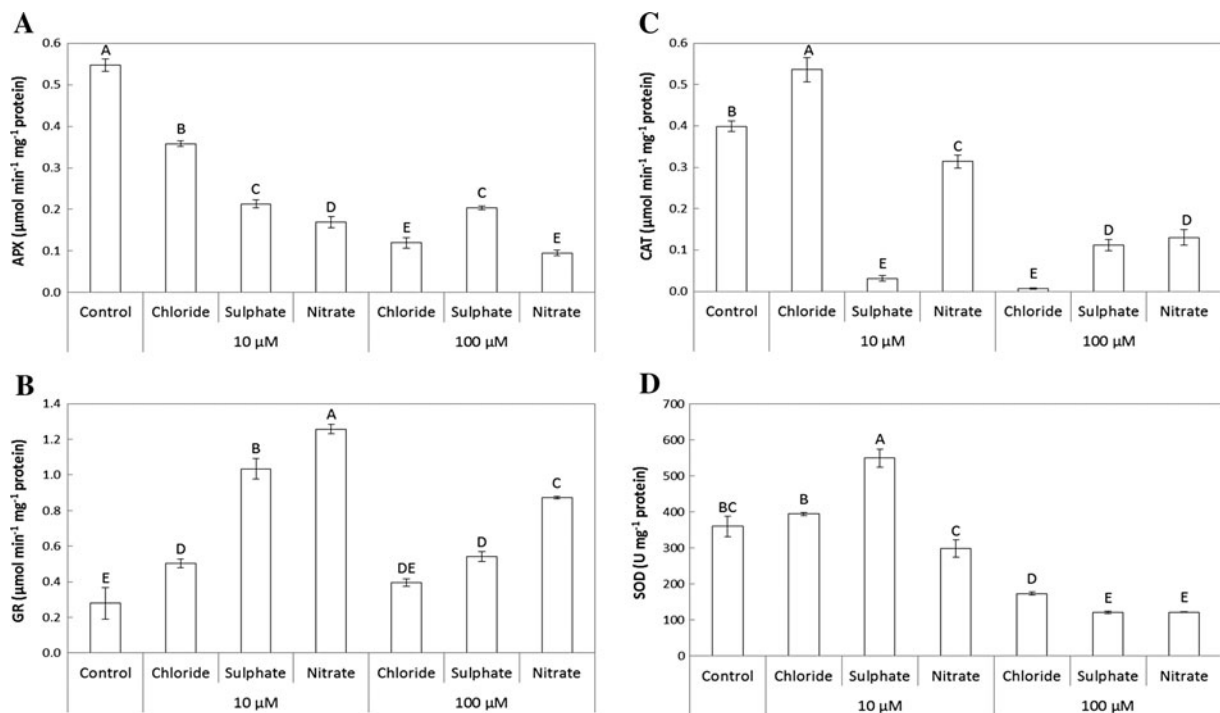


Fig. 2 Changes in antioxidative enzyme activities (APX ascorbate peroxidase (a), GR glutathione reductase (b), CAT catalase (c), SOD superoxide dismutase (d)) in *Scenedesmus quadricauda* exposed to MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ applied in two

different concentrations (10 and 100 μM) at pH 6.5 over 24 h. Data are means \pm SD ($n=3$). Values followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P<0.05$)

decline of APX activity was the lowest at 10 μM MnCl_2 . Similar results were observed in 5-day-old seedlings of barley exposed to MnCl_2 over 5 days, where the activity of APX was decreased with exposure to the increasing concentrations of Mn (Demirevska-Kepova et al. 2004). However, also the increase in APX activity was recorded in soil experiments with higher plants such as *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, and *Triticum aestivum* exposed to Mn for 21 days (Kováčik et al. 2014b).

A significant increase in CAT activity was observed after treatment with 10 μM MnCl_2 (Fig. 2c). On the other hand, CAT activity was mostly reduced after exposure to 100 μM MnCl_2 , indicating a high sensitivity of CAT to chloride anion. The increasing concentration of $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ resulted in a significant decrease of the CAT activity. The opposite effect was achieved in the case of MnSO_4 . Similarly, an enhancement of CAT activity was found in *P. tricornutum* after 2 days of exposure to 10 μM CuSO_4 (Morelli and Scarano 2004).

Compared to the control sample, a significant increase of GR activity was observed in all the treatments, except for 100 μM chloride (Fig. 2b). At the same concentration of Mn^{2+} in different solutions, GR activity increased from Cl^- to NO_3^- . The highest values of activity were observed in concentrations of 10 μM MnSO_4 and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$. A similar increase of GR activity was found in *S. quadricauda* after 24-h exposure to 1 μM Cr^{3+} (Kováčik et al. 2015a) and in *P. tricornutum* after 2 days of exposure to 10 μM CuSO_4 (Morelli and Scarano 2004).

Results mentioned above imply that the most striking formation of ROS is evoked by the nitrate salt at both concentrations (if compared to salts of the same concentration). It can be concluded that the alga *S. quadricauda* is sensitive to nitrate salts. Fluorescence microscopy (Fig. 3) showed that the increasing concentration of MnCl_2 did not increase the content of ROS, when compared to the sulfate and nitrate salts. This corresponds with the content of Mn during the 10- μM treatments (it is lower than from sulfate and nitrate salts).

3.2 Effect of pH on Mn Accumulation and Content of Thiols

We found that Mn was the most readily accumulated from sulfate salt at all pHs: only at pH 4.5, no significant difference was obtained (Fig. 4). The highest accumulation of Mn in algae exposed to sulfate salt at pH 9.5

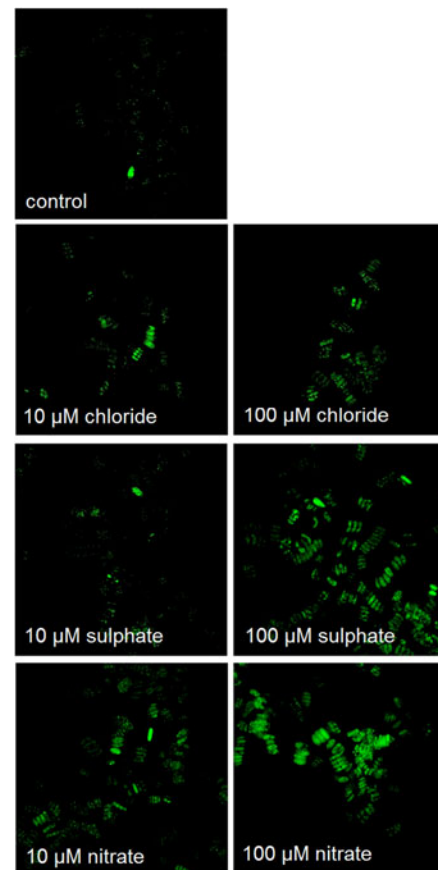
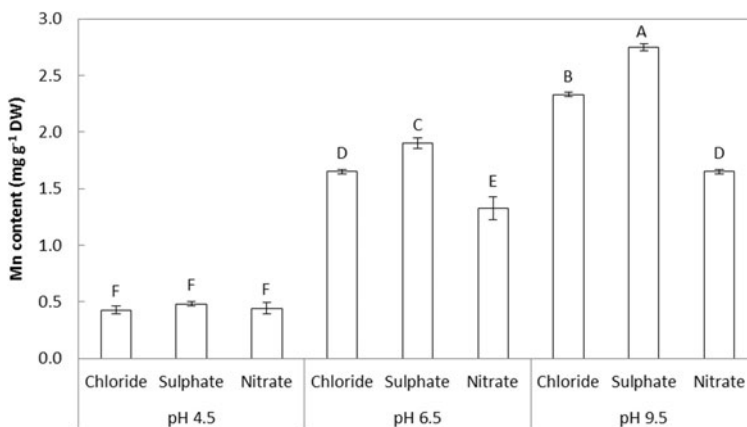


Fig. 3 Visualization of reactive oxygen species using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in *Scenedesmus quadricauda* exposed to MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ applied in two different concentrations (10 and 100 μM) at pH 6.5 over 24 h

corresponds to good bioavailability of Mn at pH >9.0 (Marschner 1995; Adamczyk-Szabela et al. 2015). Similar results were found in *C. reinhardtii* exposed to Mn, the most noticeable at pH 8.0 (Francois et al. 2007), and in *C. variabilis* exposed to Mn at pH 5.0 and 7.0, the most visible at pH 7.0 (Schenck et al. 1988).

A control experiment (without the presence of alga) demonstrated that in solutions of all Mn salts (MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$) adjusted to pH 9.5, a formation of MnO_2 nanoparticles occurred. This is due to the oxidation of Mn^{2+} to Mn^{4+} occurring at pH 9.5. We found that properties of nanoparticles depend on the salt concentration: 10 μM led to formation of particles in the range 30–60 nm while 100 μM evoked formation of particles with the size of 65–150 nm. Nanoparticles were stable with the zeta potential -30 to -35 mV. The surface of these nanoparticles was saturated with

Fig. 4 Content of manganese (mg g^{-1} DW) in *Scenedesmus quadricauda* exposed to 100 μM MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ at three different pHs (4.5, 6.5, and 9.5) over 24 h. Data are means \pm SD ($n=3$). Values followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P<0.05$)

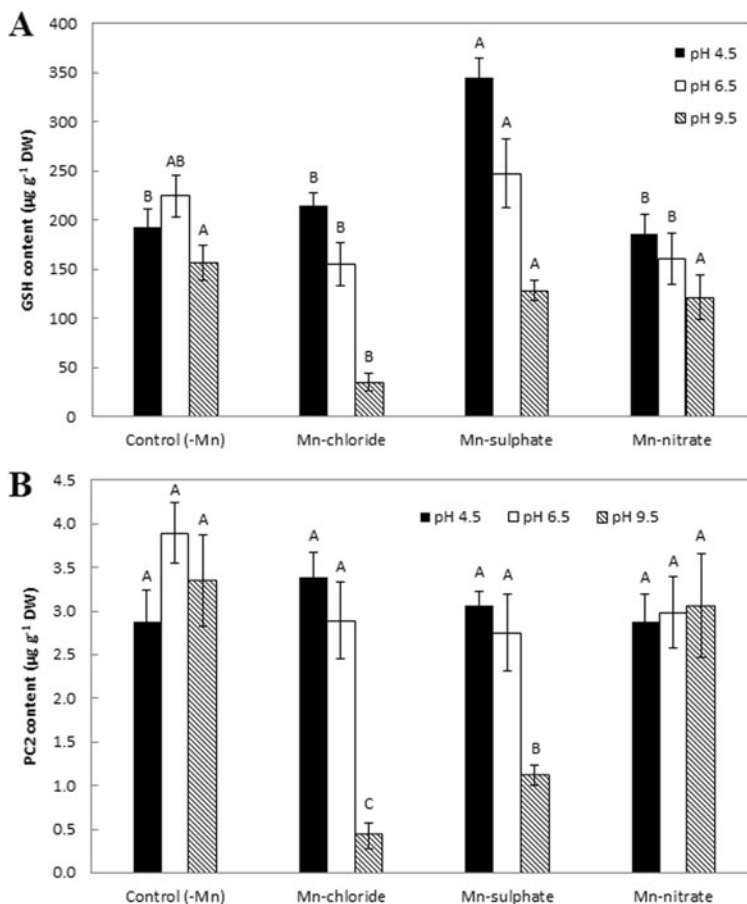


superfluous $-\text{OH}$ groups. This fact suggests that Mn might be taken up by cells via some anion transporter, because the total charge is negative, similar to the Ag^+ ions in the presence of thiosulfate by algae *C. reinhardtii*, where total charge was also negative— AgS_2O_3^- (Campbell et al. 2002). The concentration of

1000 μM caused a precipitation of MnO_2 in the form of macroscopic particles and was excluded from further experiments.

The minimum GSH content was recorded in algae exposed to Mn chloride at pH 9.5 (Fig. 5a). Similar changes in content of GSH in the presence of chloride

Fig. 5 Content of reduced GSH glutathione (a) and PC2 phytochelatin 2 (b) ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in *Scenedesmus quadricauda* exposed to 100 μM MnCl_2 , MnSO_4 , and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ and three different pHs (4.5, 6.5, and 9.5) over 24 h. Control ($-\text{Mn}$) means control without Mn salt. Data are means \pm SD ($n=3$). Values followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P<0.05$). Data were evaluated separately for each pH



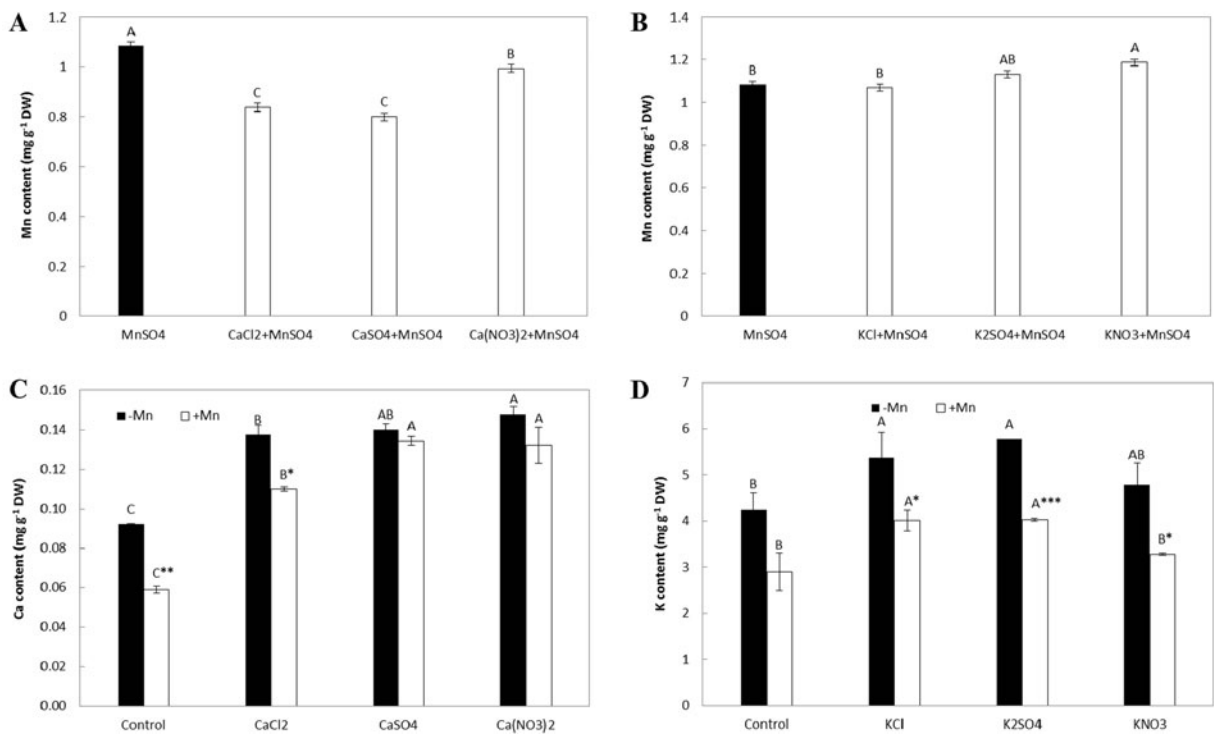


Fig. 6 Content of selected nutrients ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) in *Scenedesmus quadricauda* exposed to combined treatments ($100 \mu\text{M}$ for each salt). **a** Mn content in combination MnSO_4 with added Ca salts. **b** Mn content in combination MnSO_4 with added K salts. **c** Ca content with (+Mn) and without (-Mn) added MnSO_4 . Asterisk means compare content of Ca between (-Mn) and (+Mn) for every salt separately. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. **d** K content with (+Mn) and without (-Mn) added MnSO_4 . Control

means algae with and without MnSO_4 (for **c** and **d**). Data are means \pm SD ($n = 3$). Values followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$). Data were evaluated separately for -Mn (without manganese salt) and +Mn (with manganese salt). Asterisk means compare content of K between (-Mn) and (+Mn) for every salt separately. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$

salt (100 mM) were observed in *Stichococcus bacillaris* exposed to Pb^{2+} for 24 h (Pawlik-Skowronska 2002). MnSO_4 and $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ did not induce changes in the GSH content at this pH (9.5). The content of GSH increased after application of MnSO_4 at pH 4.5. This could be caused by the presence of sulfate moieties of

utilized Mn salt. The PC2 content was not affected by exposure to the different salts and pH, except for pH 9.5. In this case, the content of PC2 was significantly impacted by the treatment with chloride salt (approximately sevenfold lower) compared to the control sample. In the case of sulfate, the content was approximately

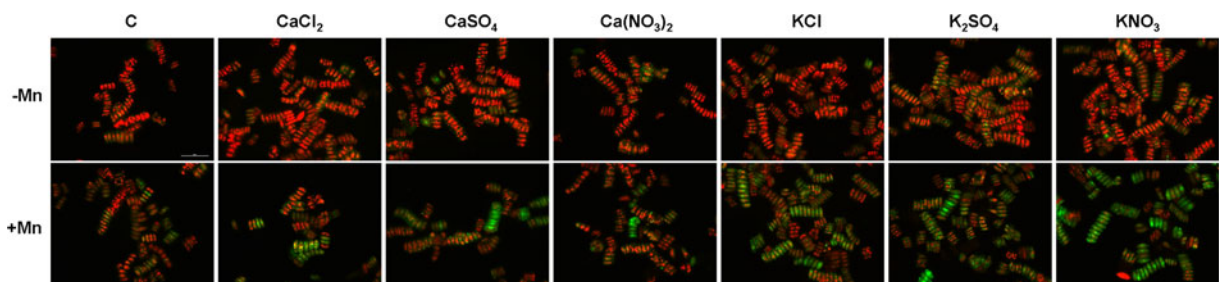


Fig. 7 Qualitative visualization of cellular damage by fluorescence microscopy using Acridine orange staining (red color indicates chlorophyll autofluorescence and green color indicates membrane damage evoked by Acridine orange uptake) in

Scenedesmus quadricauda exposed to Ca or K salts with or without Mn added as MnSO_4 ($100 \mu\text{M}$ for each salt). Bar indicates $50 \mu\text{m}$

threefold lower than in the control sample. The decrease in PC2 content after treatment with Cl salt at pH 9.5 can be explained by low content of GSH utilized as a pool for PC2 synthesis. Similar results have been observed in *Stigeoclonium tenue* exposed to Zn and Pb from mine water at different pHs, where the content of PC2 decreased with increasing basicity of the environment (Pawlik-Skowronska 2001).

3.3 Impact of Exogenous Ca and K on the Mn Amount

The highest accumulation of Mn was determined as a result of treatment with 100 μM MnSO_4 , and we therefore used MnSO_4 in the subsequent experiment. After application of CaCl_2 , CaSO_4 , and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Mn content decreased (Fig. 6a). It is referring to a possible competition between Ca^{2+} and Mn^{2+} during accumulation (Issa et al. 1995). We did not notice any changes in Mn content after application of potassium salts, except for KNO_3 . After application of KNO_3 , the content of Mn increased (Fig. 6b). It suggests that K^+ ions support the accumulation in algae or at least it does not compete with Mn^{2+} (Gadd and Laurence 1996).

The presence of MnSO_4 has a negative impact on accumulation of Ca^{2+} —the content of Ca^{2+} decreased (Fig. 6c). Reduction of the Ca^{2+} accumulation has occurred in all cases, including Mn control samples. This phenomenon was the most obvious in algae exposed to CaCl_2 (Issa et al. 1995). The amount of Ca^{2+} in the control sample decreased for about 30 % (when comparing the control samples without added Mn salt (–Mn) and with added Mn salt (+Mn)) and it is indicating an exchange of Ca^{2+} for Mn^{2+} in the alga. The same conclusion was drawn in some lichens, where the application of CaCl_2 together with MnCl_2 caused the reduction of the Mn content (Hauck et al. 2006). Volland et al. (2014) made a similar conclusion when studying the effect of Ca on Pb toxicity to algae *Micrasterias*. Application of potassium salts induced the significant increase of K^+ accumulation, except KNO_3 (Fig. 6d). The addition of MnSO_4 negatively influenced accumulation of potassium in all treatments in comparison between –Mn (without Mn) and +Mn (added Mn). The reduction of potassium content was comparable with the content of potassium in the control sample without the addition of MnSO_4 .

Acridine orange (AO) staining showed no extensive impact in treatments without Mn and only weak signal in Mn alone (Fig. 7, green emission indicates AO bound

to cellular structures). The highest green emission was visible in KNO_3 co-applied with Mn, where the most damaged plasma membrane is expected. Accordingly, Mn content increased just in this treatment (Fig. 6b). We conclude that nitrate affects Mn accumulation and this phenomenon is known in various plants exposed to metal excess.

4 Conclusions

We found that the negative effect of Mn on *S. quadricauda* depends not only on the concentration of Mn ions but also on the anionic part of the salt and on the pH. Higher pH of the solution led to higher accumulation of Mn. The highest ROS production and consequent damage of the plasma membrane was observed after co-treatment using the combination of KNO_3 and Mn. Amounts of GSH and PC2 were significantly affected by alkaline pH mainly (depletion). Our data suggest that the competition between Mn^{2+} and Ca^{2+} takes place not only in higher plants but also in green microalga *S. quadricauda*. We confirmed the oxidation of Mn^{2+} to Mn^{4+} at pH 9.5.

Acknowledgments The work was supported by OP Education for Competitiveness (European Social Fund and the state budget of the Czech Republic) CZ.1.07/2.3.00/30.0017 Postdocs in Biological Sciences at MENDELU. The authors would like to express special thanks to Pavel Kopel, Zuzana Koudelkova, and Vedran Milosavljevic for the particle size determination.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Role of the Funding Source The sponsor had no involvement in the present study.

References

- Adamczyk-Szabela, D., Markiewicz, J., & Wolf, W. M. (2015). Heavy metal uptake by herbs. IV. Influence of soil pH on the content of heavy metals in *Valeriana officinalis* L. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226, 106.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

- Campbell, P. G. C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V. P., & Vigneault, B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, *133*, 189–206.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., & Feller, U. (2004). Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, *52*, 253–266.
- Dučić, T., & Polle, A. (2005). Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*, 103–112.
- Fargašová, A., Bumbálová, A., & Havránek, E. (1999). Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*, *38*, 1165–1173.
- Francois, L., Fortin, C., & Campbell, P. G. C. (2007). pH modulates transport rates of manganese and cadmium in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: implication for an algal BLM. *Aquatic Toxicology*, *84*, 123–132.
- Gadd, G. M., & Laurence, O. S. (1996). Demonstration of high-affinity Mn^{2+} uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: specificity and kinetics. *Microbiology*, *142*, 1159–1167.
- Gopalapillai, Y., Hale, B., & Vigneault, B. (2013). Effect of major cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) and anions (SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^-) on Ni accumulation and toxicity in aquatic plant (*Lemna minor* L.): implications for Ni risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*, 810–821.
- Hauck, M., Paul, A., & Spribille, T. (2006). Uptake and toxicity of manganese in epiphytic cyanolichens. *Environmental and Experimental Botany*, *56*, 216–224.
- Issa, A. A., Abdel-Basset, R., & Adam, M. S. (1995). Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (Chlorophyta) by calcium. *Annals of Botany*, *75*, 189–192.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbávný, J., & Bačkor, M. (2010). Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Plant Science*, *178*, 307–311.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Štork, F., Hedbávný, J., & Bačkor, M. (2011). Comparison of methyl jasmonate and cadmium effect on selected physiological parameters in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, *47*, 1044–1049.
- Kováčik, J., Klejdus, B., & Babula, P. (2014a). Oxidative stress, uptake and bioconversion of 5-fluorouracil in algae. *Chemosphere*, *100*, 116–123.
- Kováčik, J., Štěrbová, D., Babula, P., Švec, P., & Hedbávný, J. (2014b). Toxicity of naturally-contaminated manganese soil to selected crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 7287–7296.
- Kováčik, J., Babula, P., Hedbávný, J., Kryštofová, O., & Provazník, I. (2015a). Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere*, *120*, 23–30.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Babula, P., & Hedbávný, J. (2015b). Nitric oxide donor modulates cadmium-induced physiological and metabolic changes in green alga *Coccomyxa subellipsoidea*. *Algal Research*, *8*, 45–52.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Babula, P., Soares, M. E., Hedbávný, J., & Bastos, M. L. (2015c). Chromium speciation and biochemical changes vary in relation to plant ploidy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *145*, 70–78.
- Krizkova, S., Dostalova, S., Michalek, P., Nejd, L., Kominkova, M., Milosavljevic, V., Moullick, A., Vaculovicova, M., Kopel, P., Adam, V., & Kizek, R. (2015). SDS-PAGE as a tool for hydrodynamic diameter-dependent separation of quantum dots. *Chromatographia*, *78*, 785–793.
- Li, M., Zhu, Q., Hu, C., Chen, L., Liu, Z., & Kong, Z. (2007). Cobalt and manganese stress in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *Journal of Environmental Sciences*, *19*, 1330–1335.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. San Diego: Academic Press. 889.
- Morelli, E., & Scarano, G. (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science*, *167*, 289–296.
- Ohtani, T., Uematsu, N., Yashima, S., & Fukami, M. (2001). Effect of anions in simulated precipitation on the uptake of heavy metals and aluminum by *Brassica rapa* L. grown in heavy metal contaminated sandy soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, *130*, 751–756.
- Pawlik-Skowronska, B. (2001). Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water, effect of some environmental factors. *Aquatic Toxicology*, *52*, 241–249.
- Pawlik-Skowronska, B. (2002). Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris*. *Environmental Pollution*, *119*, 119–127.
- Schenck, R. C., Tessier, A., & Campbell, P. G. C. (1988). The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnology and Oceanography*, *33*, 538–550.
- Štork, F., Bačkor, M., Klejdus, B., Hedbávný, J., & Kováčik, J. (2013). Changes of metal-induced toxicity by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}$ modulators in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Environmental Science and Pollution Research*, *20*, 5502–5511.
- Ushizaka, S., Kuma, K., & Suzuki, K. (2011). Effect of Mn and Fe on growth of a coastal marine diatom *Talassiosira weissflogii* in the presence of precipitated Fe(III) hydroxide and EDTA-Fe(III) complex. *Fish Science*, *77*, 411–424.
- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lutz, C., Sima, E., & Lutz-Meindl, U. (2014). Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. *Journal of Plant Physiology*, *171*, 154–163.

5 ZÁVĚR

5.1 Závěr k experimentu s přirozeně kontaminovanou půdou manganem

- Přirozeně kontaminovaná půda manganem, použitá v tomto experimentu, měla čistě negativní vliv na růst a vývoj všech čtyř pěstovaných a testovaných druhů rostlin.
- Vysoký obsah manganu v nadzemních částech rostlin a celkový trend příjmu manganu byl podobný jak v půdě, tak v použitých roztocích.
- Největší obsah manganu byl stanoven v řepce a nejméně manganu bylo v pšenici.
- Nižší pH (3,7) nemělo hlavní podíl na akumulaci manganu rostlinami a tvorbě ROS.
- Zvýšený fluorescenční signál oxidu dusnatého a celkových thiolů, spolu se zvýšenými aktivitami antioxidačních enzymů, mohlo přispět k ochraně proti nadbytku manganu v rostlinách pěstovaných v půdě.
- Zapojení fenolických látek a alifatických organických kyselin do ochrany proti nadbytku manganu jsme nezjistili.

5.2 Závěr k experimentu se dvěma ontogenetickými stavy heřmánku lékařského, vystavených manganu

- Sledovali jsme různé růstové odpovědi (délku kořenů, výšku nadzemní části a suchou hmotu) ve dvou ontogenetických stádiích heřmánku lékařského, vystaveného nadbytku manganu. Kvantifikace množství akumulovaného manganu odhalila vyšší obsah a vyšší hodnoty translokačního faktoru v klíčencích v porovnání se sedmítýdenními rostlinami a to mělo za následek negativní odpovědi klíčenců.
- Parametry oxidativního stresu, jako aktivity antioxidačních enzymů, se zvyšovaly v obou ontogenetických stádiích, což nenaznačuje ontogeneticky závislý účinek manganu.
- Celkové thioly ukázali téměř stejné odpovědi jak v rostlinách, tak v klíčencích a podílejí se na zlepšení stavu rostlin při Mn-indukované toxicitě.
- Vizualizace oxidu dusnatého ukázala zvyšující se obsah v rostlinách a snižující se obsah v klíčencích heřmánku. Toto zjištění naznačuje, že se NO podílí na snížení toxicity manganu. Aplikováním SNP (donor NO) do kultivačního rozto-

ku ke klíčencům pěstovaným v nadbytku manganu, došlo k částečnému zlepšení růstu, snížilo se oxidační poškození a snížil se příjem manganu. Také bylo zjištěno, že vyšší dávky SNP, měly negativní vliv na klíčence.

5.3 Závěr k experimentu se sladkovodní mikrořasou *Scenedesmus quadricauda*, která byla vystavena manganu při různém pH

- V této práci jsme zjistili, že negativní efekt Mn na *Scenedesmus quadricauda* záleží nejen na koncentraci Mn iontů, ale i na aniontové části použité soli a na pH prostředí. Čím vyšší je pH vodního prostředí, tím lépe se Mn akumuluje.
- Nejvyšší produkce ROS při vizualizaci a z toho vyplývající poškození plazmatické membrány, bylo zjištěno u přidaného KNO₃ k MnSO₄ v kultivačním roztoku.
- Obsah GSH a PC2 nebyl výrazně ovlivněn přítomností Mn, ale spíše hodnotou pH.
- Výsledky potvrdili, že kompetice při akumulaci mezi Mn²⁺ a Ca²⁺ probíhá nejen u vyšších rostlin, ale i u zelené mikrořasy *Scenedesmus quadricauda*. V případě K⁺ iontů, se tato hypotéza nepotvrdila.
- Při pH 9,5 došlo ke tvorbě nanočástic Mn. Velikost těchto částic je koncentračně závislá. Čím vyšší koncentrace, tím větší částice.

5.4 Shrnutí

Závěrem můžeme říci, že nadbytek manganu je pro pěstování rostlin nepříznivý. Výjimku tvoří pouze rostliny, které jsou k vyšším dávkám manganu tolerantní. Hodnota pH má vliv na dostupnost manganu pro rostliny, ale neznamena to, že toto dostupné množství musí rostlina přijmout. Jiné to je u vodních řas, na které má vliv i samotné pH. Při porovnání obsahu manganu v heřmánku a v řase, při aplikované koncentraci 100 μM, jsme zjistili, že v sedmitýdenním heřmánku bylo v nadzemní části 350 μg·g⁻¹, v kořenech 1150 μg·g⁻¹ a v řase 1750 μg·g⁻¹ Mn. Také jsme zjistili, že exogenně přídávaný oxid dusnatý působí pozitivně při nadbytku manganu a pomáhá rostlinám se snížením oxidačního stresu, který je vyvolán nadbytkem manganu, ale aplikovaná dávka nesmí být příliš velká, jinak působí negativně samo SNP.

6 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

AHMAD P., PRASAD M.N.V., 2012. *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate changes*. 1st ed. Springer, NY, USA, 515 s. ISBN: 978-1-4614-0814-7.

AHMAD P., SARWAT M., SHARMA S., 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51: 167–173.

ALSCHER R.G., ERTURK N., HEATH L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331–1341.

ARASIMOWICZ M., FLORYSZAK-WIECZOREK J., 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172: 876–887.

ASAI S., OHTA K., YOSHIOKA H., 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 20: 1390–1406.

BAKER A.J.M., BROOKS R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81–126.

Bergmann, W. 1988: *Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. (Entstehung, visuelle und analytische Diagnose)*. Second ed., Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 762 S. ISBN: 3-334-00248-9.

BOLWELL G.P., WOJTASZEK P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 347–366.

BOOMINATHAN R., DORAN P.M., 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist*, 156: 205–215.

BRADFORD M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.

- BRADLEY S.A., STEINERT J.R., 2015. Characterization and comparison of temporal release profiles of nitric oxide generating donors. *Journal of Neuroscience Methods*, 245: 116–124.
- CAKMAK I., HORST W.J., 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463–468.
- CAMPBELL P. G. C., ERRÉCALDE O., FORTIN C., HIRIART-BAER V. P., VIGNEAULT B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133: 189–206.
- CARCEA M., SORTO M., BATTELO C., NARDUCCI V., AGUZZI A., AZZINI E., FANTAUZZI P., FINOTTI E., GABRIELLI P., GALLI V., GAMBELLI L., MAINTHA K.M., NAMBA F., RUGGERI S., TURFANI V., 2015. Nutritional characterization of traditional and improved dihé, alimentary blue-green algae from the lake Chad region in Africa. *LWT – Food Science and Technology*, 62: 753–763.
- DAVEY M.W., VAN MONTAGU M., INZÉ D., SANMARTIN M., KANELLIS A., SMIRNOFF N., BENZIE I.J.J., STRAIN J.J., FAVELL D., FLETCHER J., 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825–860.
- DELRÍO L.A., SANDALIO L.M., PALMA J.M., BUENO P., CORPAS F.J., 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implication. *Free Radical Biology and Medicine*, 13: 557–580.
- DEMIREVSKA-KEPOVA K., SIMOVA-STOILOVA L., STOYANOVA Z., HOLZER R., FELLER U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 253–266.
- DOU C.M., FU X.P., CHEN X.C., SHI J.Y., 2009. Accumulation and detoxification of manganese in hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Plant Biology*, 11: 664–670.
- DRESLER S., HANAKA A., BEDNAREK W., MAKSYMIEC W., 2014. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 1565–1575.

- DUFFUS J.H., 2002. "Heavy metals" – a meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 74: 793–807.
- ELEKES C.C., DUMITRIU I., BUSUIOC G., ILIESCU N.S., 2010. The appreciation of mineral element accumulation level in some herbaceous plants species by ICP–AES method. *Environmental Science and Pollution Research*, 17:1230–1236.
- EL-FOULY M.M., NOFAL O.A., MOBARAK Z.M., 2001. Effect of soil treatment with iron, manganese and zinc on growth and micronutrient uptake of sunflower plant grown in high-pH soil. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186: 245–251.
- ESTERBAUER H., CHEESEMAN K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186: 407–421.
- FENG J., SHI Q., WANG X., 2009. Effects of exogenous silicon on photosynthetic capacity and antioxidant enzyme activities in chloroplast of cucumber seedlings under excess manganese. *Agricultural Science in China*, 8: 40–50.
- FRIDOVICH L., 1997. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutase, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 18515–18517.
- GANGWAR S., SINGH V.P., PRASAD S. M., MAURYA J. N., 2010. Modulation of manganese toxicity in *Pisum sativum* L. seedlings by kinetin. *Scientia Horticulturae*, 126: 467–474.
- GAO L., PENG K., XIA Y., WANG G., NIU L., LIAN CH., SHEN Z., 2013. Cadmium and manganese accumulation in *Phytolacca Americana* L. and the role of non-protein thiols and organic acids. *International Journal of Phytoremediation*, 15: 307–319.
- GARAI-IBABE G., SAA L., PAVLOV V., 2013. Enzymatic Product-Mediated Stabilization of CdS Quantum Dots Produced In Situ: Application for Detection of Reduced Glutathione, NADPH, and Glutathione Reductase Activity. *Analytical chemistry*, 85: 5542–5546.

- GOMES-JUNIOR R.A., MOLDES C.A., DELITE F.S., GRATAO P.L., MAZZAFERA P., LEA P.J., AZEVEDO R.A., 2006. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 420–429.
- GREENWOOD N.N., EARNSHAW A., 1993. *Chemie prvků* 1. díl. 1st ed. Informativum, Praha, 793 s. ISBN: 80-85427-38-9.
- GUO F.Q., CRAWFORD N.M., 2005. Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, 17: 3436–3450.
- GUO F.Q., OKAMOTO M., CRAWFORD N.M., 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302: 100–103.
- HABIG W.H., PABST M.J., JAKOBY W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130–7139.
- HALL J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1–11.
- HALLIWELL B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141: 312–322.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford University, 851 s. ISBN: 978-0-19-856868-1.
- HARTMANN T., HONICKE P., WIRTZ M., HELL R., RENNENBERG H., KOPRIVA S., 2004. Regulation of sulphate assimilation by glutathione in poplars (*Populus tremula*×*P. alba*) of wild type and overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase in the cytosol. *Journal of Experimental Botany*, 55: 837–845.
- HEENAN D.P., CAMPBELL L.C., 1980. Transport and distribution of manganese in two cultivars of soybean. *Australian Journal of Agricultural Research*, 31: 943.
- HESLOP R.B., JONES K., 1982. *Anorganická chemie – Průvodce pro pokročilé studium*. SNTL – Nakladatelství technické literatury, 836 s.

- HONG-BO S., LI-YE CH., MING-AN S., JALEEL CH.A., HONG-MEI M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 433–441.
- HSU Y.T., KAO C.H., 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42: 227–238.
- ISSA A.A., ABDEL-BASSET R., ADAM M.S., 1995. Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (Chlorophyta) by calcium. *Annals of Botany*, 75: 189–192.
- JIRÁSEK J., SIVEK M., LÁZNIČKA P., 2010. *Ložiska nerostů*. Ostrava, Anagram. ISBN: 978-80-7342-206-6.
http://geologie.vsb.cz/loziska/loziska/loziska_cr.html#MANGAN 4.8.2015.
- KABATA-PENDIAS A., 2011. *Trace elements in soils and plants*. 4th ed. CRC Press, Taylor and Francis group, USA, 520 s. ISBN: 978-1-4200-9368-1.
- KAUR R., BHARDWAJ R., THUKRAL A.K., NARANG U., 2011. Interactive effects of binary combinations of manganese with other heavy metals on metal uptake and antioxidative enzymes in *Brassica juncea* L. seedlings. *Journal of Plant Interactions*, 6: 25–34.
- KHAN A.S., CHAUDHRY N.Y., 2006. Peroxidase activity (POX) in some cucurbits under the stress of mercury and lead. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 4: 274–276.
- KHUDSAR T., ARSHI A., SIDDIQI T.O., MAHMOODUZZAFAR, IQBAL M., 2008. Zinc-induced changes in growth characters, foliar properties, and Zn-accumulation capacity of pigeon pea at different stages of plant growth. *Journal of Plant Nutrition*, 31: 281–306.
- KIM B.-M., LEE J.W., SEO J.S., SHIN K.-H., RHEE J.-S., LEE J.-S., 2015. Modulated expression and enzymatic activity of the monogonont rotifer *Brachionus koreanus* Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) in response to environmental biocides. *Chemosphere*, 120: 470–478.

- KOPYRA M., GWÓZDŹ E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 1011–1017.
- KOVÁČIK J., 2013. Hyperaccumulation of cadmium in *Matricaria chamomilla*: a never-ending story? *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 1721–1725.
- KOVÁČIK J., BABULA P., HEDBÁVNÝ J., KRYŠTOFOVÁ O., PROVAZNÍK I., 2015. Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere*, 120: 23–30.
- KOVÁČIK J., BABULA P., HEDBÁVNÝ J., ŠVEC P., 2014. Manganese-induced oxidative stress in two ontogenetic stages of chamomile and amelioration by nitric oxide. *Plant Science*, 215-216: 1–10.
- KOVÁČIK J., BABULA P., KLEJDUS B., HEDBÁVNÝ J., JAROŠOVÁ M., 2014. Unexpected behavior of some nitric oxide modulators under cadmium excess in plant tissue. *Plos One*, 9: e91685.
- KOVÁČIK J., BAČKOR M., 2007. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 297: 255–265.
- KOVÁČIK J., KLEJDUS B., BABULA P., 2014. Oxidative stress, uptake and bioconversion of 5-fluorouracil in algae. *Chemosphere*, 100: 116–123.
- KOVÁČIK J., KLEJDUS B., BAČKOR M., 2009a. Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* roots: side effects of scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*, 46: 1686–1693.
- KOVÁČIK J., KLEJDUS B., HEDBÁVNÝ J., 2010. Effect of aluminium uptake on physiology, phenols and amino acids in *Matricaria chamomilla* plants. *Journal of Hazardous Materials*, 178: 949–955.
- KOVÁČIK J., KLEJDUS B., HEDBÁVNÝ J., ŠTORK F., BAČKOR M., 2009b. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients

and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 320: 231–242.

KOVÁČIK J., KLEJDUS B., ŠTORK F., HEDBÁVNÝ J., 2011. Nitrate deficiency reduces cadmium and nickel accumulation in chamomile plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5139–5149.

KOVÁČIK J., ŠTĚRBOVA D., BABULA P., ŠVEC P., HEDBÁVNÝ J., 2014. Toxicity of naturally-contaminated manganese soil to selected crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 7287–7296.

KULA E., HRDLIČKA P., HEDBÁVNÝ J., ŠVEC P., 2012. Various content of manganese in selected forest tree species and plants in the undergrowth. *Beskydy*, 5: 19–26.

LALOI CH., APEL K., DANON A., 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 323–328.

LI M., ZHU Q., HU CH., CHEN L., LIU Z., KONG Z., 2007. Cobalt and manganese stress in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): Effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 1330–1335.

LIU P., TANG X., GONG CH., XU G., 2010. Manganese tolerance and accumulation in six Mn hyperaccumulators or accumulators. *Plant and Soil*, 335: 385–395.

LU X., WANG CH., LIU B., 2015. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish & Shellfish Immunology*, 42: 58–65.

MA S., ZHANG Z., YI F., WANG Y., ZHANG X., LI X., YUAN Y., CAO F., 2013. Protective effects of low-frequency magnetic fields on cardiomyocytes from ischemia reperfusion injury via ROS and NO/ONOO⁻. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 529173.

MARSCHNER H., 1995: *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Academic press, London, UK, 889 s. ISBN-13:978-0-12-473543-9.

MARSCHNER P., RENGEL Z., 2005. Interactions between rhizosphere microorganisms and higher plants for iron and manganese – an overview. *ICOBTE - 8th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, 488–489.

- MCGRATH S.P., CHAUDRI A.M., GILLER K.E., 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 14: 94–104.
- MITTLER R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405–410.
- MITTLER R., VANDERAUWERA S., GOLLERY M., VAN BREUSEGEM F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 1360–1385.
- MLEIKI A., MARIGÓMEZ I., EL MENIF N.T., 2015. Effects of Dietary Pb and Cd and Their Combination on Glutathion-S-Transferase and Catalase Enzyme Activities in Digestive Gland and Foot of the Green Garden Snail, *Cantareus apertus* (Born, 1778). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94: 738–743.
- MOU D., YAO Y., YANG Y., ZHANG Y., TIAN CG., ACHAL V., 2011. Plant high tolerance to excess manganese related with root growth, manganese distribution and antioxidative enzyme activity in three grape cultivars. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 776–786.
- NEILL S.J., DESIKAN R., HANCOCK J.T., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159: 11–35.
- NOCTOR G., FOYER CH., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249–279.
- PENG K., LUO CH., YOU W., LIAN CH., LI X., SHEN Z., 2008. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator - *Phytolacca americana* L. *Journal of Hazardous Material*, 154: 674–681.
- PEREIRA P., DE PABLO H., GUILHERME S., CARVALHO S., SANTOS M.A., VALE C., PACHECO M., 2014. Metal accumulation and oxidative stress responses in *Ulva* spp. in the presence of nocturnal pulses of metals from sediment: A field transplantation experiment under eutrophic conditions. *Marine Environmental Research*, 94: 56–64.

- PITTER P., 1999. *Hydrochemie*. 3rd ed. VŠCHT, Praha, ČR, 568 s. ISBN: 80-7080-340-1.
- POLLARD A.J., POWELL K.D., HARPER F.A., SMITH J.A.C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 539–566.
- PRADEDOVA E.V., ISHEEVA O.D., SALYAEV R.K., 2011. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58: 177–185.
- PROCTOR J., PHILLIPPS C., DUFF G.K., HEANEY A., ROBERTSON F.M., 1989. Ecological studies on Gunung silam, a small ultrabasic mountain in Sabah, Malaysia. II. Some forest processes. *Journal of Ecology*, 77: 317–331.
- RAHA S., ROBINSON B.H., 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Science*, 25: 502–508.
- REEVES R., BAKER A., 2000. *Metal-accumulating plants*. John Wiley and sons, Inc., 304 s. ISBN: 978-0-471-19254-1.
- ROCKEL P., STRUBE F., ROCKEL A., WILDT J., KAISER W.M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 53: 103–110.
- RODRIGUES D., FREITAS A.C., PEREIRA L., ROCHA-SANTOS T.A.P., VASCONCELOS M.W., ROZIS M., RODRÍGUES-ALCALÁ L.M., GOMES A.M.P., DUARTE A.C., 2015. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry*, 183: 197–207.
- SAIDI I., NAWEL N., DJEBALI W., 2014. Role of selenium in preventing manganese toxicity in sunflower (*Helianthus annuus*) seedling. *South African Journal of Botany*, 94: 88–94.
- SGHERRI C., COSI E., NAVAZI-IZZO F., 2003. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum*, 118: 21–28.

- SHENG H., ZENG J., YAN F., WANG X., WANG Y., KANG H., FAN X., SHA L., ZHANG H., ZHOU Y., 2015. Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, mineral nutrients translocation and antioxidative system in polish wheat (*Triticum polonicum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 32
- SHI Q., ZHU Z., 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 317–326.
- SCHILLER M., HEGELUND J.N., PEDAS P., KICHEY T., LAURSEN K.H., HUSTED S., SCHJOERRING J.K., 2014. Barley metallothioneins differ in ontogenetic pattern and response to metals. *Plant, Cell and Environment*, 37: 353–367.
- SKINNER W.M. *et al.*, 2005. Multi-technique studies of the distribution of metals between the soil, rhizosphere and roots of *Populus tremuloides* growing in forest soil. ICOBTE - 8th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, 488–489.
- SMIRNOFF N., 2005. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. 1st ed. Oxford, Blackwell, 302 s. ISBN: 978-1-4051-2529-1.
- SOCHA A.L., GUERINOT M.L., 2014. Mn-euvering manganese: the role of transporter gene family members in manganese uptake and mobilization in plants. *Frontiers in Plant Science* 5: 106.
- SPYCHALLA J.P., DESBOROUGH S.L., 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology*, 94: 1214–1218.
- SRIVASTAVA S., DUBEY R.S., 2011. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 64: 1–16.
- SRIVASTAVA S., DUBEY R.S., 2012. Nitric oxide alleviates manganese toxicity by preventing oxidative stress in excised rice leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 819–825.

- SUN R.L., ZHOU Q.X., JIN C.X., 2006. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant and Soil*, 285: 125–134.
- TAIZ L., ZEIGER E., 2010. *Plant physiology*. 5th ed. Sinauer associates, Sunderland, MA, USA, 782 s. ISBN: 978-0-87893-866-7.
- TANG C., DIATLOFF E., RENGEL Z., MCGANN B., 2001. Growth response to sub-surface soil activity of wheat genotypes differing in aluminium tolerance. *Plant and Soil*, 236: 1–10.
- TEWARI R.K., KIM S., HAHN E.-J., PAEK K.-Y., 2008. Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng*. *Plant Biotechnology Report*, 2: 113–122.
- USHIZAKA S., KUMA K., SUZUKI K., 2011. Effects of Mn and Fe on growth of a coastal marine diatom *Talassiosira weissflogii* in the presence of precipitated Fe(III) hydroxide and EDTA-Fe(III) complex. *Fisheries Science*, 77: 411–424.
- VEGA-LÓPEZ A., AYALA-LÓPEZ G., POSADAS-ESPADAS B.P., OLIVARES-RUBIO H.F., DZUL-CAAMAL R., 2013. Relations of oxidative stress in freshwater phytoplankton with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A, 165: 498–507.
- WANG H., XIAO W., NIU Y., CHAI R., JIN CH., ZHANG Y., 2015. Elevated Carbon Dioxide Induces Stomatal Closure of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Through an Increased Production of Nitric Oxide. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34: 372–380.
- WANG Y.S., YANG Z.M., 2005. Nitric oxide reduced aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology*, 46: 1915–1923.
- WENDEHENNE D., PUGIN A., KLESSIG D.F., DURNER J., 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*, 6: 177–183.

XUE S., WANG J., ZHOU X., LIU H., CHEN Y., 2010. A critical reappraisal of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae) – A manganese-hyperaccumulating plant. *Acta Ecologica Sinica*, 30: 335–338.

YU C.C., HUNG K.T., KAO C.H., 2005. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1319–1330.

ZIMOLKA J. *et al.*, 2005. *Pšenice – pěstování, hodnocení a užití zrna*. 1st ed. Profi press, s.r.o., Praha, 180 s. ISBN: 80-86726-09-6.

ZIMOLKA J. *et al.*, 2008. *Kukuřice – hlavní a alternativní směry*. 1st ed. Profi press, s.r.o., Praha, 200 s. ISBN: 978-80-86726-31-1.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Mangan jako ryzí kov.

Obr. 2: Mapa s ložisky manganu vhodnými pro těžbu.

Obr. 3: Odbourávání superoxidu enzymem superoxid dismutasou.

Obr. 4: Syntéza glutathionu ze síranu.

Obr. 5: Regenerace glutathionu enzymem glutathion reduktasou.

8 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled nejznámějších čeledí potvrzených hyperakumulátorů manganu.

Tab. 2: Přehledová tabulka vybraných zemědělských rostlin a obsah vybraných prvků.

Tab. 3: Optimální obsah manganu ve vybraných rostlinách.

Tab. 4: Přehledová tabulka obsahu manganu v různých půdních a vodních typech.

Tab. 5: Přehledová tabulka účinků manganu na aktivity antioxidantních enzymů ve vybraných rostlinách.

9 SEZNAM ZKRATEK

ROS	- reaktivní formy kyslíku
RNS	- reaktivní formy dusíku
OEC	- centrum vyvíjející kyslík
BAF	- bioakumulační faktor
TF	- translokační faktor
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
RNA	- ribonukleová kyselina
PEP	- fosfoenolpyruvát
NR	- nitrát reduktasa
GR	- glutathion reduktasa
APX	- askorbát peroxidasa
GPX	- guajakol peroxidasa
CAT	- katalasa
SOD	- superoxid dismutasa
GSH	- redukovaný glutathion
GSSG	- oxidovaný glutathion
GSNO	- S-nitrosoglutathion
AsA	- kyselina askorbová
PCO	- proteinový karbonyl
MDA	- malondialdehyd
SNP	- nitroprusid sodný
TBA	- thiobarbiturová kyselina