

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Příjem rizikových prvků rostlinami rodu *Noccaea* a
*Arabidopsis***

Diplomová práce

Autor práce: Kateřina Koubová

Vedoucí práce: prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Příjem rizikových prvků rostlinami rodu *Noccaeae* a *Arabidopsis*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 07.04.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala zejména paní Ing. Janě Najmanové, která mě vedla po celou dobu trvání modelových pokusů, dále prof. Ing. Jiřině Szákové, Csc. za odborné vedení, ostatním členům katedry za laskavou pomoc a své rodině za morální i materiální podporu.

Příjem rizikových prvků rostlinami rodu *Noccaea* a *Arabidopsis*

Souhrn

Na půdách vysoce znečištěných rizikovými prvky se vyskytuje vzácná skupina rostlin, zvaných hyperakumulátory. Tyto rostliny mají významnou schopnost adaptace, kombinující extrémně vysokou míru tolerance vůči rizikovým prvkům a jejich kumulaci v nadzemní biomase. Do této skupiny patří několik druhů z rodu *Noccaea* a *Arabidopsis*, z čeledi Brukvovitých (*Brassicaceae*). V této práci byla potvrzena hyperakumulace Cd *Noccaea caerulescens* (ekotyp Ganges a Mežica) a *Arabidopsis halleri*, u kterého byla také ověřena hyperakumulace Zn.

V případě Pb jsou dříve publikované výsledky nejednotné, pravděpodobně vzhledem k nízké biologické dostupnosti tohoto prvku v půdě. Cílem této práce bylo najít vhodné kultivační podmínky, při kterých by se projevila hyperakumulační schopnost Pb u rodu *Noccaea* a *Arabidopsis*. Jsou zde prezentovány výsledky ze 3 modelových pokusů: 1) dlouhodobého nádobového a polního pokusu 2) krátkodobého pokusu s přidavkem Pb a 3) hydroponického pokusu s různou koncentrací Pb.

Lze shrnout, že žádný z provedených modelových pokusů neprokázal v případě olova hyperakumulační schopnost testovaných druhů.

Klíčová slova: kadmium, zinek, olovo, hyperakumulátor, *Thlaspi* (*Noccaea*), *Arabidopsis*

The risk element uptake by plants of genera *Noccaea* and *Arabidopsis*

Summary

On highly risk elements polluted soils a rare group of plant species called hyperaccumulators can occur. These plants possess a significant ability to adapt, combining extremely high tolerance to hazardous elements and their accumulation in the above-ground biomass. To this class belong several species of genus *Noccaea* and *Arabidopsis* of *Brassicaceae* family. In this work was corroborated hyperaccumulation of Cd by *N. caerulescens* (ecotype Ganges and Mezica) and *A. halleri* in which hyperaccumulation of Zn was also confirmed.

In the case of Pb the previously published results are inconsistent, presumably due to low bioavailability of this element in soil. The objective of this work was to study hyperaccumulation of Pb in genus *Noccaea* and *Arabidopsis* under different conditions. The data from 3 model experiments are presented: 1) a long-term field and pot experiment 2) a short-term pot experiment with extra added Pb and 3) a hydroponic experiment with different concentrations of Pb.

It can be concluded that none of the model experiments did not corroborated a hyperaccumulation ability of Pb in the tested species.

Keywords: cadmium, zinc, lead, hyperaccumulator, *Thlaspi* (*Noccaea*), *Arabidopsis*

Seznam použitých zkratek

AF	akumulační faktor
CAX	(z angl. Cation Exchangers)
CDF	kationtové difúzní přenašeče (z angl. Cation Diffusion Facilitator)
DTPA	kyselina diethylentriamin pentaoctová
EDDHA	kyselina ethylenediamin-di(o)-hydroxyfenoctová
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FDR3	gen kódující proteiny z MATE
GSH	glutathion
HA	hyperakumulátor
HEDTA	kyselina N-hydroxyethyl-ethylenediamin trioctová
HMAAs	(z angl. Heavy Metal transporting ATPases)
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
MATE	(z angl. Multidrug And Toxin Efflux) přenašeče-proteiny
MT	methalothioneniny
MTP	(z angl. Metal Transporter Proteins)
NHA	nehyperakumulující druhy
Nramp	(z angl. the natural resistance associated macrophage proteins)
PM	plazmatická membrána
PC	fytochelatiny
RP	rizikové prvky
TF	translokační faktor
YSL	(z angl. Yellow Strip-1 Like)
ZIP	skupina přenašečů (z angl. Zinc-iron permease)

1	ÚVOD	9
1.1	Cíle práce	10
2	VYBRANÉ RIZIKOVÉ PRVKY	11
2.1	Kadmium	12
2.2	Zinek	13
2.3	Olovo	14
3	BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST RIZIKOVÝCH PRVKŮ V PŮDĚ	16
3.1	Biologická dostupnost kadmia.....	18
3.2	Biologická dostupnost zinku.....	19
3.3	Biologická dostupnost olova.....	20
4	MECHANISMY CHOVÁNÍ RP V ROSTLINÁCH	21
4.1	Příjem.....	21
4.2	Translokace	23
4.3	Detoxikace a tolerance.....	24
4.3.1	<i>Fytochelatin</i>	25
4.3.2	<i>Metalothionein</i>	26
5	METALOFYTY	27
5.1	Hyperakumulátory	28
6	FYTOREMEDIACE	29
6.1	Fytoextrakce rizikových prvků	30
6.2	Fytoremediační potenciál rostlin	31
6.3	Proč rostliny akumulují RP	32
7	ROD NOCCAEA	33
7.1	Vývoj názvosloví <i>Noccaea</i> a <i>Thlaspi</i>	33
8	ROD ARABIDOPSIS	34
9	USPOŘÁDÁNÍ A PRŮBĚH MODELOVÝCH EXPERIMENTŮ	35
9.1	Dlouhodobý nádobový a polní pokus	35
9.2	Krátkodobý nádobový pokus s přidavkem olova	37
9.3	Hydroponie	38
9.3.1	<i>Stanovení rizikových prvků</i>	39

10	VÝSLEDKY	40
10.1	Dlouhodobý nádobový a polní pokus	40
10.1.1	Dlouhodobý polní a nádobový pokus- <i>N.rotundifolia</i> , <i>N. montana</i>	44
10.2	Krátkodobý nádobový pokus s přidavkem olova	47
10.3	Hydroponie	50
11	DISKUSE	52
12	ZÁVĚR	58
13	SEZNAM LITERATURY	59
14	PŘÍLOHY	66
14.1	Vývoj názvosloví <i>Thlaspi</i> a <i>Noccaea</i>	66
14.2	Přehled studovaných druhů.....	68
14.2.1	<i>Noccaea caerulescens</i> J.&C. Presl (Penízek modravý).....	68
14.2.2	<i>Noccaea jankae hungarica</i> (Penízek slovenský maďarský).....	71
14.2.3	<i>Noccaea montana</i> (Penízek horský)	73
14.2.4	<i>Noccaea rotundifolia</i> (Penízek okrouhlostý).....	74
14.2.5	<i>Arabidopsis halleri</i> (Huseníček Hallerův).....	75

LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 ÚVOD

S příchodem průmyslové revoluce a mírou industrializace se zvyšovalo zatížení životního prostředí. Stále více rizikových prvků se dostávalo do jednotlivých ekosystémů, kde představovaly a stále představují důležité polutanty. Mnohé z nich jsou toxické již při velmi malých koncentracích (Memon et al. 2000).

Existuje několik různých zdrojů rizikových prvků, jako jsou (1) přírodní zdroje, (2) zemědělské zdroje, (3) průmyslové zdroje, (4) odpadní vody, (5) atmosférické zdroje a (6) ostatní (Nagajyoti et al. 2010). Znečištění tedy pochází jak ze zdrojů přírodních, tak z činnosti člověka. Spalováním fosilních paliv, těžbou a tavením rud, produkcí komunálního odpadu, hnojením, stříkáním pesticidy apod. jsme kontaminovali rozsáhlá území (Kabata-Pendias et Pendias, 1989).

Pokud jsou v půdě přítomny kovy jako je kadmium, zinek nebo olovo ve vysokých koncentracích, vykazují potenciální toxické účinky na celkový růst a metabolismus rostlin (Shah et Dubey 1998, Agrawal et Sharma 2006). Bioakumulace těchto rizikových prvků v rostlinách, představuje riziko pro zdraví lidí a zvířat (Wang et al., 2003). Použití biologických metod k čištění kontaminovaných míst životního prostředí zahrnuje bioremediační techniky, například fytořemediaci. Tato technologie je založena na přirozeně se vyskytujících rostlinných druzích, které mají potenciál akumulovat vysoké koncentrace rizikových prvků ve své biomase. Rychlost fytořemediace je přímo úměrná rychlosti růstu rostlin a celkovému nárůstu biomasy (Kumar et al. 1995a; Cunningham et Ow 1996; McGrath 1998). Ve většině případů právě tyto dvě kritéria činí fytořemediaci velice pomalou (Shah et. Nongkynrih, 2007). Rostliny rodu *Arabidopsis* a *Noccaea* (dříve známé jako *Thlaspi*) vykazují hyperakumulační schopnosti pro Cd a Zn, (a podle některých pramenů i Ni a Pb), ale jsou malého vzrůstu a pomalu rostoucí, což je pro fytořemediacní využití nevýhodné. Cestou by mohlo být například genové inženýrství (Martínez et al. 2006).

1.1 Cíle práce

Cílem literárního přehledu bylo shromáždit informace týkající se mechanismů příjmu rizikových prvků rostlinami rodu *Noccaea* (*Thlaspi*) a *Arabidopsis*. Mezi zkoumané prvky patří kadmium, zinek a olovo. Hyperakumulační schopnost v případě kadmia a zinku byla prokázána již v mnoha studiích, ale v případě olova jsou výzkumy sporné. Důvodem je pravděpodobně nízká biologická dostupnost tohoto prvku v půdě.

Cílem experimentální práce je:

- 1) Ověřit hyperakumulační schopnost různých druhů a fenotypů rodu *Arabidopsis* a *Noccaea* (*Thlaspi*) v různých půdních podmínkách.
- 2) Najít vhodné kultivační podmínky, při kterých by se projevila hyperakumulační schopnost těchto druhů v případě olova.

Vědecká hypotéza:

Hyperakumulační schopnosti rostlin se projevují v závislosti na konkrétních fyzikálně-chemických vlastnostech půdy a na míře mobility prvků v půdě.

2 VYBRANÉ RIZIKOVÉ PRVKY

Termín „těžké kovy“, nebo přesněji rizikové prvky (dále RP), se vztahuje ke skupině kovů a metaloidů s atomovou hustotou vyšší než 4 g.cm^{-3} (Hawkes 1997). Na spodní limit hodnoty hustoty neexistuje jednoznačný názor, pohybuje se v rozmezí od 3,5 do 7 g.cm^{-3} (Duffus 2002). Hlavní roli však hrají jejich chemické vlastnosti, nikoliv hustota (Nagajyoti et al. 2010). Toxicita RP se mění s druhem rostliny, specifickou koncentrací, chemickou formou, složením půdy nebo pH (Nagajyoti et al. 2010).

Rizikové prvky jsou klasifikovány jako prvky esenciální a neesenciální (Ali et al. 2013). Esenciálními prvky jsou takové, které živé organismy potřebují pro fyziologické a biochemické funkce (Ali et al. 2013). Prvky, které organismy nepotřebují k žádné z těchto dvou funkcí, jsou neesenciálními. Dle Clemense 2006 závisí toto rozdělení jak na jejich chemických vlastnostech, tak i na hojnosti zastoupení v zemské kůře. Například kadmium se přirozeně v zemské kůře vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích ($0,13 \text{ mg.kg}^{-1}$) a Clemens 2006 se domnívá, že možná právě proto nebyl během evoluce zapojen do důležitých metabolických procesů, oproti zinku, který je sousedícím prvkem v periodické tabulce prvků a patří mezi prvky esenciální. Ve své práci se budu zabývat esenciálním zinkem a dvěma neesenciálními prvky- kadmíem a olovem.

Jedním z důvodů, proč jsou neesenciální prvky zvláště toxické je jejich schopnost napodobovat prvky esenciální a tak se zapojit do metabolických procesů probíhající v rostlinách (Verbruggen et al. 2013). V případě rizikových prvků platí, že jsou silně jedovaté pro enzymy citlivé na kovy, což vede k inhibici růstu a smrti organismů (Nagajyoti et al. 2010). Většina rizikových prvků je bioakumulativní, hromadí se v potravním řetězci přes příjem primárními producenty a dostávají se na vyšší úroveň potravního řetězce (Nagajyoti et al. 2010). Rostliny jsou stacionární organismy, jejich kořeny jsou v primárním kontaktu s kovovými ionty. Ve vodních systémech jsou kovovým iontům vystavené rostliny celým svým povrchem. Rizikové prvky mohou být také absorbovány přes povrch listů z ovzduší (Nagajyoti et al. 2010).

2.1 Kadmium

Tento kov je chemicky příbuzný zinku, přirozeně se se zinkem a olovem vyskytuje v rudách obsahující sulfidy těchto kovů. Kadmium se vyskytuje v řadě anorganických a organických sloučenin jako dvojmocný kationt. S organickými sloučeninami tvoří komplexy (Bencko et al. 1984). Je všeobecně uznáván jako prvek, který nemá v organismech žádnou prokázanou biologickou roli. Jsou však známy případy u mořských rozsivek, kdy je Zn nahrazen při jeho nedostatku kadmiem (Lane et al. 2005).

Vzhledem k chemické podobnosti se kadmium vyskytuje v rudách a půdě společně se zinkem v poměru 1:100 až 1:1000. Při rafinaci zinku a jiných kovů je získáváno jako vedlejší produkt. Pro své vlastnosti chránit železo před korozi je používáno při výrobě plechů, zejména v automobilovém průmyslu. Je také přidáváno jako stabilizátor plastů a sulfid kademnatý je součástí barevných pigmentů přidávaných do plastů a barviv. Pro svou schopnost zlepšovat mechanochemické vlastnosti dalších kovů je přidáváno zejména do slitin na bázi mědi. Důležité je jeho využití jako součásti elektrod v alkalických akumulátorech (Bencko et al. 1984).

Kontaminace životního prostředí byla vyvolána zejména jeho rostoucím používáním v průmyslu, na čemž se podílely slévárny kovů a průmysl barviv, výroba plastů a výroba akumulátorů. Dalším důležitým zdrojem bylo a stále je spalování pohonných hmot a olejů, v zemědělství používání fosfátů přirozeného původu a pesticidů obsahující tento prvek (Bencko et al. 1984). Kadmium emitované do ovzduší se kumuluje v půdě a ve vodě a vstupuje takto do potravinových řetězců (Bencko et al. 1984).

Dle vyhlášky 13/1994 Sb. je maximální přípustný obsah Cd v lehkých půdách $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, limitní obsah kadmia na ostatních půdách je 1 mg.kg^{-1} . Rostliny pěstované v půdě s vysokým obsahem kadmia vykazují viditelné příznaky chloróz, inhibice růstu nebo hnědnutí kořenových špiček, které vedou k úhynu rostliny (Nagajyoti et al. 2010). Je známo, že kadmium může snižovat příjem, transport a využívání významných esenciálních prvků – Ca, Mg, P a K a také vody (Das et al. 1997). Hernandez et al. (1996) zjistili, že Cd snižuje absorpci dusičnanů a jejich transport z kořenů do nadzemních částí inhibicí aktivity nitrátreduktázy v nadzemní biomase. Toxicita může mít vliv na propustnost plazmatické membrány, což zapříčiňuje snížení obsahu vody. Fodor et al. 1995 ve své práci zmiňuje, že v plazmatické membráně snižuje aktivitu ATPázy u pšenice a slunečnice. Vytváří změny ve

funkčnosti membrán vyvoláním peroxidace lipidů a také poruchy v metabolismu chloroplastů inhibicí biosyntézy chloroplastu a redukcí aktivity enzymů.

Zajímavé je, že kadmium může zlepšit růst některých rostlin - některé populace *Noccaea caerulea* v regionu Ganges, Jižní Francie, jsou přizpůsobeny na kontaminované půdy, což by mohlo naznačovat možnou biologickou roli kadmia. Molekulární základ tohoto účinku zůstává stále nejasný (Roosens et al. 2003; Liu et al. 2008). Vysoká resistance *N. caerulea* byla potvrzena ve studii, kterou publikovali Nishiyama et al. (2005) a kteří při koncentraci Cd okolo 5 mg.kg⁻¹ v půdě symptomy toxicity Cd nepozorovali.

2.2 Zinek

Zinek je relativně měkký kov s oxidačním stavem +2. Snadno reaguje jak s anorganickými kyselinami, tak s organickými látkami. Nejdůležitějšími minerály obsahujícími zinek jsou sfalerit (ZnS), zinkit (ZnO), smithsonit (ZnCO₃), willemmit (ZnSiO₄) a hemimorfit [Zn₂(OH)₂SiO₃]. Při odstřelu a drcení rudy uniká zinek do životního prostředí jen velmi málo, při flotaci rozdrčené rudy může zinek kontaminovat odpadní vody. Principem hutnické výroby zinku je redukce oxidu zinečnatého v žáru uhlí při teplotách 1100-1300°C. Během tavby zinkové rudy často dochází k emisím do ovzduší, doprovázeným emisemi kadmia, olova a arzenu (Bencko et al. 1984). Nagajyoti et al. 2010 ve své práci uvádí obsahy jednotlivých rizikových prvků v odpadních vodách z různých odvětví průmyslu. Zinek byl zastoupen ve vodách z průmyslu metalurgického a galvanického, z výroby chemikálií, tiskařského průmyslu, zpracování kůží, ve vodách z výroby umělých hnojiv, z chlor-alkalické produkce či zpracování surové ropy.

Zinek patří k esenciálním prvkům, určitá nízká koncentrace tohoto prvku je nezbytná pro rostliny, zvířata i člověka. V organismech je součástí více než dvaceti metaloenzymů a dalších sto enzymů potřebuje zinek ke své funkci (Kafka et Punčochářová 2002). Slouží jako kofaktor a aktivátor enzymatických reakcí nebo je využíván pro katalytické vlastnosti. Tyto stopové kovové prvky se účastní redoxních reakcí, přenosu elektronů a strukturálních funkcí v metabolismu nukleových kyselin (Nagajyoti et al. 2010). K enzymům, které obsahují zinek, patří například karbon anhydráza, alkohol dehydrogenáza, superoxid dismutáza a RNA polymeráza. Zinek se podílí na tvorbě sacharidů a katalyzuje oxidační procesy v rostlinách. Slouží jak o kofaktor RNA polymerázy (Nagajyoti et al. 2010).

Fytotoxicita zinku je indikována poklesem růstu a vývoje u rostliny. Vysoká hladina zinku v půdě inhibuje mnoho rostlinných metabolických funkcí, které mají za následek opožděný růst nebo chlorózy u mladých listů, které se mohou při delší expozici rozšířit i do listů starších (Nagajyoti et al. 2010). Chloróza může částečně vznikat vyvolaným nedostatkem železa, jehož ion má stejný průměr jako Zn^{2+} (Marschner 1986). Nadměrné množství zinku může také zvýšit deficit manganu a mědi (Nagajyoti et al. 2010). Při hodnotě pod 10 mg.kg^{-1} Zn v sušině se objevují na rostlinách zřetelné symptomy nedostatku. Deficience se projevuje hlavně na mladých částech rostlin vytvářením růžic s úzkými a drobnými listy, které jsou bledě zelené a zkrácením internodií. U ovocných stromů se při nedostatku Zn vytváří růžice úzkých drobných listů, které jsou asymetrické a často zbarvené do modrozelená (Richter 2003). Obsahy zinku v rostlinách se pohybují od 8 do 100 mg.kg^{-1} sušiny (Misra et Mani 1991).

2.3 Olovo

Tento prvek patří k nejdéle známým a hojně využívaným těžkým kovům, v krystalické formě se jedná o modrostříbřitě bílý, měkký kov. Možné oxidační stavy jsou 0, +2, +4. Za průměrný obsah olova v půdách je považováno $5-50 \text{ mg.kg}^{-1}$ Pb a za přirozený $2-300 \text{ mg.kg}^{-1}$ Pb. Běžně se vyskytuje v rozmezí $10-20 \text{ mg.kg}^{-1}$. Vyhláška 13/1994 Sb. připouští v zemědělských půdách maximálně 100 mg.kg^{-1} Pb v lehkých půdách a 140 mg.kg^{-1} Pb v půdách ostatních. Ve většině anorganických sloučenin se olovo vyskytuje ve dvojmocné formě. Anorganické soli olova jsou většinou špatně rozpustné s výjimkou octanu, dusičnanu, chlorečnanu, a chloristanu (Bencko et al. 1984).

Olovo je nejrozšířenější z těžkých kovů. Mezi nejdůležitější minerály obsahující olovo patří galenit (PbS), cerusit ($PbCO_3$) a anglesit ($PbSO_4$), který vzniká jako sekundární produkt oxidace galenitu. Protože má podobný iontový poloměr jako křemík a draslík, nachází se také v krystalových mřížkách různých draselných nerostů, jako jsou živce a slídy (Cibulka 1991). V rudách obsahujících sulfid olovnatý se často vyskytuje i zinek. Výroba olova z rudy obsahující sulfid olovnatý (obsah olova 3-8%) zahrnuje koncentrování (koncentrát obsahuje 55-70 % Pb), slinování, při kterém je olovo oxidováno, dále redukci oxidu olovnatého a přečišťování k odstranění nečistot. Největší spotřeba činí na výrobu baterií, při výrobě kabelů, barviv, slitin, skla, broků a podobně. Důležité jsou organické sloučeniny olova, především tetraethylolovo, které se po mnoho desetiletí přidávalo do benzínu jako antidetonační přísada (Barek et al. 1998). Zavedením bezolovnatých paliv se však v dopravě jeho spotřeba

významně snížila. Emise olova v roce 1995 činily 195 tun, v roce 2003 to byly jen 5,5 tuny (Havel et Gažáková 2010).

Do trofických řetězců se olovo dostává především z půdy absorpcí autotrofními organismy (obtížněji než kadmium). Autotrofy jsou následně konzumovány heterotrofními organismy a rezistentní ionty olova jimi přecházejí do dalších článků potravních cest (Kafka et Punčochářová 2002). Toxicita olova souvisí s jeho interferencí s různými enzymovými systémy, které mohou být deaktivovány buď vazbou olova na skupiny –SH jejich proteinů nebo vytěsňováním esenciálních kovových iontů olovem (Bark et al. 1994). Právě interferenci olova s důležitými enzymy uvádí Nagajyoti (2010) jako možný důvod v inhibici klíčení u zimolezu prorůstavého (*Spartina alterniflora*). Špatný růst mladých rostlin v důsledku expozice olovu byla pozorována u soji (*Glycine max*) (Huang et al. 1974), rýže (*Oryza sativa*) (Mukherji et Maitra 1976), kukuřice (*Zea mays*) (Miller et al. 1975), nebo u rajčat (*Solanum lycopersicum*) a lilku (*Solanum melongena*) (Khan et Khan 1983). V přírodě existují některé typy rostlin, které jsou přístupné příjmu značně vysokých koncentrací olova, aniž by byl poškozen jejich vývoj a růst (Kafka et Punčochářová 2002). Walker et Bernal 2003 potvrzují vysokou toleranci populace *N. caerulea* vůči vysokým koncentracím olova v půdě extrahovatelným roztokem kyseliny diethylen triamin pentaoctové (DTPA) a CaCl_2 . Tyto extrakční činidla se používají jako ukazatele vyluhovatelných rozpuštěných rizikových prvků v půdním roztoku (Ebbs et Kochian 1997, McLaughlin et Henderson 1999, Schat et al., 2000). Při koncentraci $\text{Pb } 5 \text{ mg.l}^{-1}$ v půdním roztoku byla pozorována slabá chloróza listů v mezižilním prostoru, Walker et Bernal (2003) se domnívají, že byla způsobena nedostatkem železa.

3 BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST RIZIKOVÝCH PRVKŮ V PŮDĚ

Biologickou dostupností se v ekotoxikologii rozumí ta část látek v životním prostředí, která je dostupná pro biologickou aktivitu, jako je například příjem organismy (Brandl 2005). Rizikové prvky zasahují do fyziologických procesů - plyné výměny, fixace CO₂, dýchání a vstřebávání živin (Nagajyoti et al. 2010). Nagajyoti et al. 2010 uvádějí, že příjem rizikových prvků rostlinami není lineárně závislý na jejich celkových koncentracích v půdě.

Mobilitu a biologickou dostupnost kovů ovlivňuje mnoho faktorů: chemické složení a sorpční vlastnosti půdy (Kłos et al. 2012), pH, redox potenciál, kationtová výměnná kapacita, organická hmota a s tím související mikrobiální aktivita (Pentrangeli et al. 2001), množství jílových minerálů (Alloway 1990, Wenzel et al. 1999), provzdušnění půdy, hnojení, dostupnost prvků v půdě a vlhkost půdy (Yamamoto et Kozlowski 1987).

Díky silné vazbě na půdní částice je pouze zlomek z celkového množství rizikových prvků v půdě rostlinám přístupný (Lasat 2000), vysrážením prvků jsou nerozpustné a tedy nepřístupné rostlinám z půdního roztoku (Sheoran et al. 2011). Z hlediska biologické dostupnosti můžeme rizikové prvky rozdělit do tří kategorií: (1) snadno přístupné prvky (Cd, Ni, Zn, As, Se, Cu), (2) středně přístupné (Co, Mn, Fe) a (3) minimálně přístupné (Pb, Cr, U) (Prasad 2003). Některé rostliny mají vyvinuté mechanismy pro zvýšení rozpustnosti rizikových prvků v půdě (Ali et al. 2013).

Významnou roli v míře biologické dostupnosti rizikových prvků hraje rhizosféra. Kořeny rostlin vylučují látky napomáhající k mobilizaci kovů v rhizosféře. Kořenová sekrece H⁺ iontů zvyšuje aciditu rhizosféry a zvyšuje rozpustnost kovů (Ali et al. 2013). H⁺ ionty mohou vytěsnit kationty rizikových prvků adsorbované na půdní částice (Alford et al. 2010). Podle práce, kterou publikovali Thangavel et Subbhuraam (2004) mohou kořenové výměšky snížit pH v rhizosféře až o dvě jednotky. Ke značnému zvýšení dostupnosti rizikových prvků přispívají i mikroorganismy rhizosféry, především bakterie a mykorhizní houby (Vamerali et al. 2010; Sheoran et al. 2011).

Ke zvýšení biologické dostupnosti se používají různá chelatační činidla, jako například EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), HEDTA (kyselina N-hydroxyethyl-ethylenediamin trioctová, EDDHA (kyselina ethylenediamin-di(o)-hydroxyfenyloctová), kyselina citrónová, elementární síra či síran amonný (Elkhatib et al., 2001; Lai and Chen, 2004; Sun et al., 2011b), které se mohou přidávat do půdy. Ve vodě cheláty tvoří s těžkými

kovy rozpustné komplexy a pomáhají jejich desorpci z půdních částic (Ali et al. 2013). Nicméně jejich používání může způsobit sekundární znečištění. Například EDTA není snadno biologicky odbouratelná a po přidání do kontaminované půdy se může vyluhovat do podzemní vody a způsobit nebezpečí pro životní prostředí (Ali et al. 2013). Toto riziko se může eliminovat používáním chelátů přírodního původu, jako je například zmiňovaná kyselina citronová, lehce rozložitelných v životním prostředí a netoxických pro rostliny (Ali et al. 2013).

3.1 Biologická dostupnost kadmia

Při zvětrávání hornin, kde obsah kadmia nepřesahuje $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$, tento prvek snadno přechází do roztoku a vyskytuje se jako kationt Cd^{2+} . Může tvořit také komplexní ionty CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^+ , CdCl^- , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ aj. a organické cheláty. V silně oxidačních podmínkách je kadmium schopno tvořit stálé minerály (CdO , CdCO_3) a hromadit se ve fosfátech a biogenních usazeninách (Beneš, 1994). Některé studie naznačují, že Cd je jeden z nejdostupnějších RP v půdě (Lee et al. 1998) a to díky snadnému příjmu Zn^{2+} a Fe^{2+} přenašeči (Astolfi et al. 2011). S klesající hodnotou pH rozpustnost kadmia silně stoupá a s tím i jeho pohyblivost. Nejpohyblivější je při pH 4,5-5,5. Při pH > 7,5 přestává být rozpustné, a proto o jeho přijatelnosti rozhoduje rozpustnost CdCO_3 a pravděpodobně také $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$. Za přítomnosti síranů dochází k vysrážení Cd, a tím opět ke snížení jeho rozpustnosti. Chloridové ionty pohyblivost Cd v půdě zvyšují. Kadmium se v půdě kumuluje nejvíce ve vrstvě 0-5cm, s přibývajícím hloubkou jeho koncentrace klesá. S humínovými kyselinami vytváří komplexy, které jsou méně stabilní než komplexy humínových kyselin s olovem.

Astolfi et al. (2011) pozorovali, že Cd působí na asimilační proces Fe s častým následkem nedostatku Fe v rostlině i přes jeho dostatečné množství v půdě. Na druhé straně bylo u ječmene setého (*Hordeum vulgare*) prokázáno, že nedostatek Fe zvyšuje příjem a akumulaci Cd (Siedlecka et Krupa 1999). V pokusu, který provedli Keller et Hammer (2004), byly sledovány účinky přidávání Fe ve vztahu k příjmu Cd a Zn *N. caerulea* ve vápenité půdě. Účinnost fytoextrakce byla vyšší u *N. caerulea*, které rostly v půdě s přídavkem Fe, protože se zvýšila produkce biomasy a eliminovaly se symptomy chlorózy. Přídavek Fe měl pravděpodobně dva efekty. Snížil se nedostatek přístupného Fe, který je na vápnatých půdách běžný. Železo patří do katalytické skupiny pro mnoho redoxních enzymů a je nezbytné pro syntézu chlorofylu (Marschner 1995). Druhým pozitivním dopadem bylo snížení toxicity Cu, na kterou je *N. caerulea* citlivá. Vyšší koncentrace mědi ovlivňuje fotosyntézu *N. caerulea* a snižuje jeho růst (Lombi et al. 2001). Nižší tvorbu biomasy zaznamenali v důsledku Cu toxicity i Ebbs et al. (1997). Přídavek Fe byl tedy pozitivní a příjem Cd a Zn zvýšil, nicméně se neprokázal jako účinný přídavek pro jednoznačně vyšší příjem RP (Keller et Hammer, 2004).

3.2 Biologická dostupnost zinku

Zinek je v půdě obsažen v různých formách. Jeho celkový obsah je značně rozdílný a závisí zejména na obsahu zinku v mateční hornině a charakteru půdotvorného procesu. Například půdy s vysokým obsahem jílu nebo organickými látkami mají vyšší adsorpční kapacitu pro zinek než písčité půdy s malým množstvím organických látek. V jílovité půdě bývá obsaženo až 95 mg.kg^{-1} Zn, zatímco v písčité půdě okolo $10 - 30 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Zinek je rostlinami přijímán převážně jako kationt Zn^{2+} a v hydratovaných formách. Může být přijat také ve vhodné chelátové vazbě nebo jako Zn(OH)^+ . Není známa forma, ve které je zinek translokován z kořenů do nadzemních částí rostliny. Hladina zinku v rostlinách se běžně pohybuje do 100 mg.kg^{-1} v sušině. Příjem zinku inhibuje přítomnost některých kovů. Kompetitivní vliv na příjem má Fe a Mn. Depresivně na příjem působí Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} . Hromadí se v kořenech zejména při vysokých hladinách v půdě.

Pohyb zinku v rostlině je velmi malý, ve starých listech je prakticky imobilní. Imobilita je vysvětlována jeho reakcí s fosforem za vzniku $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Na pohyblivost zinku v rostlině nejsou jednotné názory.

V rostlinném organismu plní zinek významné funkce. Při nedostatku Zn bylo zjištěno poškození funkce chloroplastů a snížení intenzity fotosyntézy. Účast Zn v pochodech fotosyntézy spočívá pravděpodobně v tom, že zinek je nezbytnou složkou karboanhydrázy, alkoholdehydrogenázy, glutamátdehydrogenázy, laktádehydrogenázy a alkalické fosfatázy. Důležitou úlohu hraje také při regulaci metabolismu nukleových kyselin. Zn inhibuje aktivitu ribonukleázy v rostliných pletivech. Při nedostatku Zn stoupá aktivita ribonukleázy. Zinek je napojen na metabolismus aminokyselin a bílkovin. Je nezbytný jako aktivátor při tvorbě tryptofanu, čímž nepřímo ovlivňuje i tvorbu indolových auxinů (Richter 2003). Zasahuje do metabolismu cukrů.

3.3 Biologická dostupnost olova

V půdách je olovo velmi málo pohyblivé. To je dáno tím, že se dobře váže na jílové minerály, oxidy manganu, hydroxid Fe, Al a organickou hmotu. Olovo se hromadí převážně v humusovém horizontu, jeho sorpce na humusové látky je pevnější než na jílové minerály. Imobilitu olova však nelze přeceňovat, protože za přítomnosti chelátů jako transportních systémů, může jeho pohyblivost narůstat. Například fulvokyseliny mohou olovo chelatizovat a zvyšovat jeho pohyblivost a přijatelnost rostlinami. Olovo je rozpustné v kyselém prostředí, při zvyšování pH se jeho rozpustnost snižuje, protože se sráží ve formě hydroxidu, fosforečnanu nebo uhličitanu (Richter 2003). V běžných kultivačních podmínkách roztoků různých pokusů s pH 6,0-7,0 a koncentrací P mezi 0,1-2,0 mmol.l⁻¹ se většina přidaného olova vysráží buď jako hydroxid olovnatý nebo fosforečnan olovnatý (Huang et Cunningham 1996). Při rozmezí pH 4,5-5,0 a koncentraci P menší než 10 μM, byla už většina přidaného olova v rozpustné formě. Účinnost příjmu Pb se však výrazně lišila mezi druhy a jejich kultivary a byla prokázána vyšší účinnost u rostlin dvouděložných než jednoděložných (Huang et Cunningham 1996). Toto tvrzení je mezi vědci obecně přijímáno a je založeno na odběrech vzorků ze silně kontaminovaných míst v terénu a zjištění, že mezi hyperakumulátory rizikových prvků patří téměř výhradně dvouděložné rostliny (Huang and Cunningham 1996). Při studiu dostupnosti a transportu olova je problém v množství různých reakcí s ostatními prvky v půdním roztoku.

Výsledky experimentu, který provedli Huang et Cunningham 1996, potvrdily vyšší koncentraci Pb v nadzemní biomase po přidání chelátu HEDTA do kontaminované půdy. Po přidání HEDTA se koncentrace olova v půdním roztoku zvýšila 1000x (oproti kontrole) a koncentrace Pb v kukuřici (*Zea mays*) a hrachu (*Pisum sativum*) z 500 mg.kg⁻¹ na více než 10000 mg.kg⁻¹.

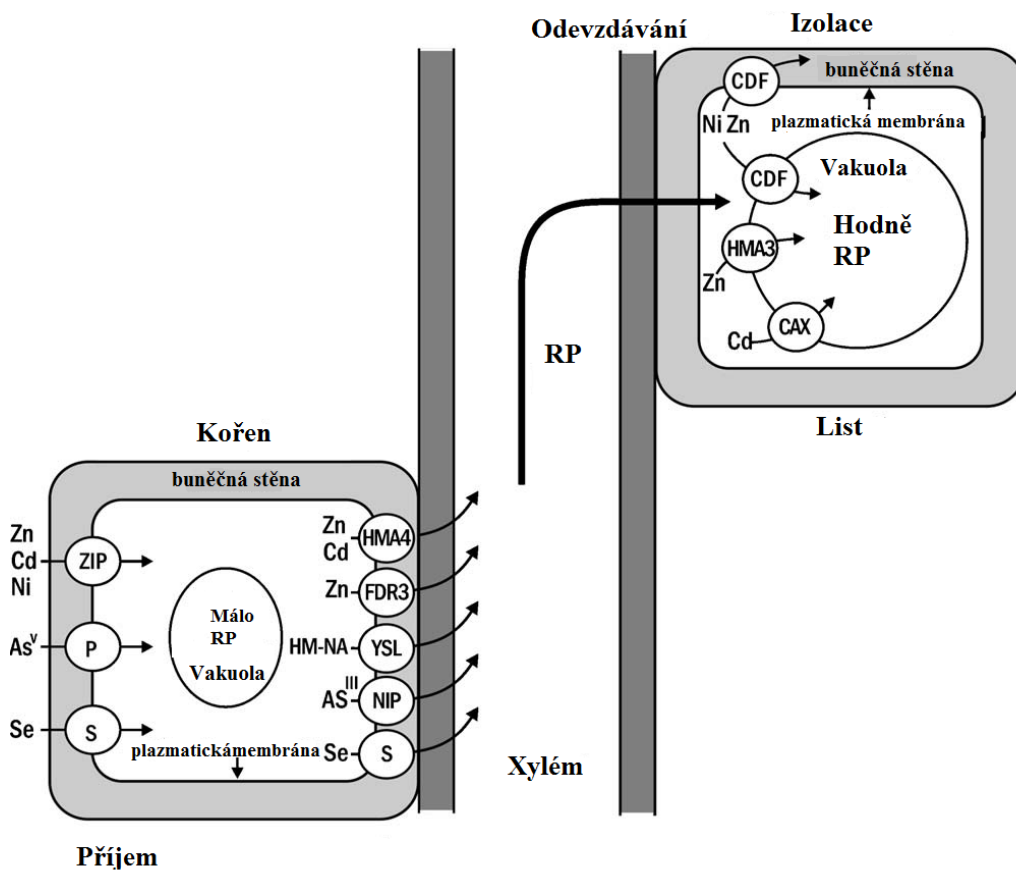
4 MECHANISMY CHOVÁNÍ RP V ROSTLINÁCH

4.1 Příjem

Rostliny přijímají rizikové prvky z půdního roztoku do svých kořenů. Přímo vystavena působení RP v roztoku půdy je buněčná stěna kořene, interakce mezi nimi byly popsány v několika člancích shromážděných Ernstem et al. 1992. Buněčná membrána hraje klíčovou roli v udržování homeostáze RP na přibližně stejné hodnotě, je zodpovědná za prevenci nebo redukci vstupu RP do buňky (Astolfi et al. 2011). Apoplast kořenového epidermu je dobře prostupný pro rozpuštěné látky. Buněčná stěna endodermální vrstvy působí jako bariéra proti difúzi RP do cévního systému rostlin (Astolfi et al. 2011). Před tím, než rozpuštěné látky vstoupí do xylému, se dostanou do vnitřní strany plazmatické membrány (Astolfi et al. 2011). Po vstupu do kořenů, mohou být ionty buď uloženy uvnitř kořenových buněk, nebo přemístěny xylémem do nadzemní biomasy (Prasad 2004). Membránový potenciál, jenž je na vnitřní straně buněčné membrány negativní, v kořenových epidermálních buňkách může překročit až -200 mV, což poskytuje velkou hnací sílu pro příjem kationtů prostřednictvím sekundárních transportérů (Hirsch et al. 1998).

Příjem iontů z půdního roztoku je zprostředkováno specializovanými transportéry, proteinovým kanálem nebo H^+ proteinovými párovými nosiči, které jsou přítomné v plazmatické membráně kořene (Obr.1) (Greipsson 2011). S použitím molekulárních technik bylo v posledních letech popsáno několik přenašečů kationtů mikroživin. Většina z nich patří do ZIP skupiny (z anglického Zinc–Iron Permease), které přispívají k příjmu Zn^{2+} a Fe^{2+} iontů (Clemens 2001). Další skupinou jsou tzv. Nramp (the Natural Resistance Associated Macrophage Proteins) proteiny, které hrají důležitou roli v transportu dvojmocných kovových iontů (Seth 2012). Neesenciální prvky mohou účinně konkurovat esenciálním prvkům využíváním stejných přenašečů přes membránu na základě podobnosti mezi sebou-mají stejný oxidační stav a poloměr iontů (Thangavel et Subbhuraam 2004; Alford et al. 2010). Tento nedostatek selektivity a široká substrátová specifikace přenašečů (Clemens 2000) může částečně zdůvodnit vstup nepotřebných rizikových prvků do rostlinných buněk, a to i proti koncentračnímu gradientu (Seth 2012). Například v kvasinkách bylo zdokumentováno, že Fe-přenašeč IRT1, patřící do skupiny ZIP, transportuje také Zn a možná i Cd (Clemens 2000). U několika přenašečů byla identifikována afinita jak pro příjem Cd, tak Zn. Komplementací kvasinkového Zn-přenašeče přenesli Lasat et al. (2000) do mutantní rostliny *N. caerulea*

gen ZNT1 cDNA, který kóduje vysoce afinitní Zn-přenašeč. Na základě studia dvou ekotypů *N. caerulescens* bylo zjištěno, že v málo Cd akumulujícím ekotypu může být Cd přenášeno pomocí ZNT1, a naopak, ve vysoce akumulujícím Cd ekotypu přes vysoce afinitní Cd přenašeč. Dalším zkoumaným Fe-přenašečem byl AtNramp3 u rodu *Arabidopsis*, u kterého byl pozorován transport Cd^{2+} (Thomine et al. 2000). U Cd a Zn bylo zjištěno, že se společně akumulují v nadzemních částech *Arabidopsis halleri* (Bert et al. 2003), což ukazuje, že jejich příjem je geneticky korelován, tudíž jsou přijímány buď stejným přenašečem, nebo je jejich příjem kontrolován stejnými regulátory (Astolfi et al. 2011).



Obrázek 1: Schéma transportu RP hyperakumulujícími rostlinami. Příjem kořeny, navázání na jednotlivé přenašeče, translokace xylémem a izolace RP v buněčné stěně nebo ve vakuolách. (Převzato a upraveno dle Rascia et Navara-Izzo 2010).

4.2 Translokace

Cesta rizikových prvků z půdního roztoku až do vakuol je kontrolována a regulována různými molekulami. Některé molekuly jsou zapojeny do transportu skrze membránu, ostatní zaručují tvorbu komplexů a izolaci z metabolicky aktivních částí rostlin (Ali et al. 2013). Na rozdíl od ne-hyperakumulujících (NHA) druhů rostlin, které většinu RP ukládají v kořenech, hyperakumulující (HA) druhy RP rychle a efektivně přemisťují xylémem do nadzemní biomasy (Obr.1) (Benavides et al. 2005). Množství Zn ve vakuolách kořenových buněk u *N. caerulescens* je 2-3x nižší a odběr Zn z vakuol téměř 2x efektivnější než u jeho nehyperakumulujícího příbuzného druhu (Benavides et al. 2005). V případě kadmia, které lehce proniká skrz kortikální vrstvu kořene, je jeho translokace do nadzemní biomasy uskutečněna apoplastickou nebo symplastickou dráhou v komplexu s několika možnými ligandy (např. organické kyseliny, fytochelatiny) (Salt et al. 1995a). Malé organické molekuly, především malát a citrát, přítomné v kořenech HA druhů, mohou fungovat jako ligandy, avšak některé práce naznačují, že vzhledem k jejich nízké asociační konstantě ke kovům, kterou vykazují v návaznosti na celkem vysoké pH cytosolu (kolem 7,4), je tvorba komplexů zanedbatelná (Benavides et al. 2005; Haydon et al. 2007). Jejich funkce může být relevantní spíše v kyselém prostředí vakuol (Haydon et al. 2007). Klíčovou roli hrají aminové kyseliny- histidin a nikotinamin, které s bivalentními kationty tvoří stabilní komplexy. Volný histidin (His) je považován za nejdůležitější ligand u Ni-hyperakumulátorů (Callahan et al. 2006). Geny kódující enzymy biosyntézy nikotinaminu jsou ve vysokých koncentracích přítomné u Cd/Zn hyperakumulátoru *N. caerulescens* a *A. halleri*, obsahující 3x vyšší množství nikotinaminu než ostatní nehyperakumulující druhy (Mari et al. 2006).

Dalším důležitým předpokladem, je zvýšená exprese genů kódující transportní systém, z důvodu jeho zvýšeného zatížení. Nedílnou součástí je třída proteinů P_{1B} ATPázy, nebo-li HMAs (z angl. Heavy Metal transporting ATPases), zodpovědná za udržování homeostáze RP a tolerance (Rascio et Navari-Izzo 2011). U *N. caerulescens* a *A. halleri* bylo zdokumentováno nadměrné množství genů HMAs, HMA4 podporuje úlohu HMA4 proteinu (patřící k Zn/Co/Cd/Pb HMA podtřídě, umístěné v plazmatické membráně xylému) v přesunu Cd a Zn z kořenového symplastu do xylému a následně do nadzemní biomasy. U *A. halleri* byla potvrzena tolerance Cd a Zn s genem HMA4 – aktivita tohoto genu pozitivně ovlivňuje další geny pro HA (Rascio et Navari-Izzo 2011). Tyto geny zvyšují expresi genů patřících do ZIP skupiny.

Další skupina transportních proteinů RP je MATE (z angl. Multidrug And Toxin Efflux), gen FDR3, kódující proteiny z této skupiny, přítomen v kořenech *A. halleri* operuje s Fe, ale jeho nadměrná přítomnost nasvědčuje roli v transportu i jiných kovů, zejména Zn (Krämer et al. 2007). Skupina YSL (z angl. Yellow Strip-1 Like) zprostředkovává přechod chelátů kovů s nikotianinem do xylému a následné odevzdání do listů. Tři geny (TcYSL3, TcYSL5, ZSL7) jsou nadměrně přítomné v kořenech a výhoncích *N. caerulescens*, kde participují na translokaci z kořene do nadzemní biomasy (Obr.1) (Krämer et al. 2007).

4.3 Detoxikace a tolerance

Detoxikace a izolace RP je klíčovou schopností rostlin, jak akumulovat vysoké koncentrace RP v nadzemních orgánech, aniž by jevíly známky fytotoxického efektu (Rascio et Navari-Izzo 2007). Akumulace RP se soustřeďuje především v listech, kde je jejich hlavním cílem fotosyntetický aparát, nezbytný pro přežití rostlin (Rascio et Navari-Izzo 2007). Strategie rostlin jsou různorodé. Schopnost přežít v kontaminovaném prostředí zahrnuje spuštění řady biochemických procesů, od selektivního příjmu anorganických látek až po intracelulární mechanismy obrany.

První bariéra vůči stresu toxicity RP, působící především na kořenové úrovni, je fixace RP buněčnou stěnou nebo extracelulárními karbohydráty (různé slizy), které rostliny mohou vylučovat (Astolfi et al. 2011).

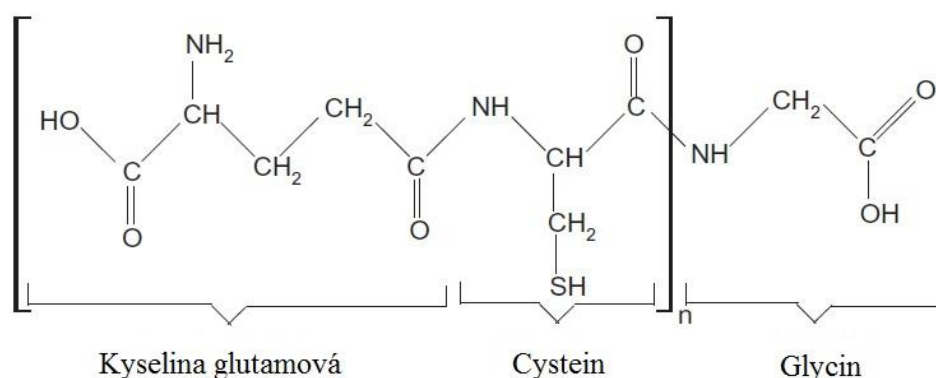
V nadzemní biomase jsou RP většinou uloženy ve vakuolách. Vakuoly jsou buněčné organely s nízkou metabolickou aktivitou (Denton 2007). Izolace rizikových prvků ve vakuolách je jednou z možností, jak zamezit vstupu kovových iontů do cytosolu a snížit jejich interakce s metabolickými procesy buněk (Assunção et al., 2003; Sheoran et al., 2011). Tento proces je u hyperakumulátorů součástí mechanismu tolerance (Ali et al. 2013). Vakuolární izolaci Zn v listech hyperakumulátoru *N. caerulescens* potvrdil Vázquez et al. (1994). Srovnávací analýzy mezi HA a NHA druhy ukázaly, že odpovědnost za přenos RP skrze tonoplast nebo PM z cytoplasmy mají geny skupiny CDF (z angl. Cation Diffusion Facilitator), zvané též MTPs (z angl. Metal Transporter Proteins). Gen MTP1 kódující protein lokalizovaný na tonoplastu je vysoce exprimován v listech Zn/Ni HA (Hammond et al. 2006). Na izolaci Zn se podílí vakuolární P_{1B} ATP, kterou kóduje gen HMA3, geny skupiny CAX (z angl. Cation Exchangers) zprostředkovávají Cd izolaci, obě dvě skupiny byly pozorovány u *N. caerulescens* a *A. halleri* (Rascio et Navari-Izzo 2007).

V detoxifikačním mechanismu jsou dále důležité organické kyseliny, na které se RP za vzniku ligandu naváží, Salt et al. (1999) ve své studii potvrzují, že většina přítomného Cd a Zn byla u *A. halleri* a *N. caerulescens* navázaná na malát (aniont kyseliny jablečné).

K obranným mechanismům patří i syntéza na cystein bohatých rostlinných peptidů zvaných fytochelatiny (Memon et al 2000).

4.3.1 Fytochelatiny

Fytochelatiny (PCs) jsou post-translačně syntetizované polythioly, hrající důležitou roli v detoxikaci těžkých kovů. Poprvé byly popsány v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* a dále pak v rostlinách a řasách. Celá rodina fytochelatinů se skládá z dipeptidické repetice γ -Glu-Cys, která se může opakovat 2–11 \times (nejčastěji ale 2–5 \times) a je zakončena aminokyselinou Gly. Chemická struktura je znázorněna na obrázku č. 2.



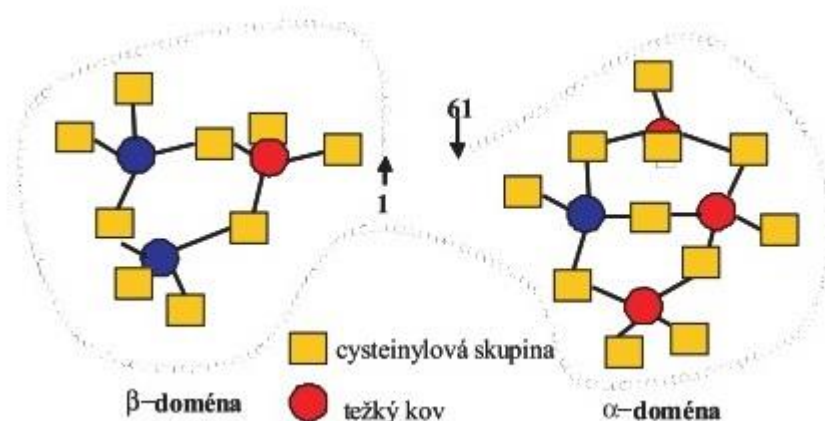
Obrázek 2: Chemická struktura fytochelatinů. (Převzato a upraveno dle Seth 2012).

Různé variety *A. thaliana*, které obsahují malé množství PC-syntetázy (enzym, který zodpovídá za syntézu fytochelatinů) jsou neschopny syntetizovat chelatiny a byla u nich pozorována hypersensitivita na Cd a Hg (Memon et al. 2001).

Zhao et al. (2002) se domnívají, že HA nespolehají na vysokohmotností ligandy PCs z důvodu nadměrného množství síry a metabolické nákladnosti syntézy tohoto typu chelátorů. Exprese antioxidantních genů a syntéza GSH (glutathion) jako stěžejní antioxidantní molekula chrání rostliny rodu *Noccaea* před oxidačním stresem (Rascio et Navari-Izzo 2007).

4.3.2 Metalothioneiny

Metalothioneiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností, vyskytující se v rámci celé živočišné říše. Obsahují vysoký podíl cysteinu, zatímco aromatické kyseliny zcela chybí (Memon et al. 2000). Právě tento podíl cysteinu způsobuje vysokou afinitu ke kovům, zejména ke kadmiu, zinku, olovu, rtuti a mědi (Prusa et al. 2004). MT jsou rozděleny dle své primární struktury a dle organismu, ze kterého pocházejí do dvou tříd MT-I a MT-II. Většinou obsahují 60-68 aminokyselinových zbytků v centrální části s dvaceti cysteiny a celkovou vazbou sedmi jednomocných nebo dvoumocných iontů kovů. Ačkoliv aminokyselinové sekvence u různých druhů mohou být rozdílné, jejich prostorové uspořádání je podobné. Všechny MT mají krátký lineární úsek, na který jsou vázány dvě separátní proteinové domény. Tyto domény obsahují klustery s vysokou afinitou ke kovům. Kovy jsou vázány do společných tetrahedrálních Me (II)- Cys jednotek. Do této vazby jsou zapojeny všechny cysteiny přítomné v doménách, jak je vidět na obrázku č. 3.



Obrázek 3: Struktura metalothioneinů, které dokáží vázat ionty rizikových prvků do velmi stabilních komplexů (Převzato z Kizek 2001).

Cobbett et Goldsbrough (2002) pozorovali u rodu *Arabidopsis* MT proteiny, které posléze přenesli do kmene kvasinek a jednobuněčných sinic *Synechococcus*, ve kterých MT proteiny nebyly přítomné. Kvasinky i sinice se po mutaci staly Cu a Zn rezistentní. Tato studie poskytuje důležitý důkaz, že rostlinné MTs jsou schopny poskytnout toleranci ke kovům

v jiných než rostlinných systémech. U *A. thaliana* byl nalezen MT, který je kódován pomocí 7 genů (Cobbett et Goldsbrough 2002).

5 METALOFYTY

Metalofyty jsou rostliny speciálně přizpůsobené půdám s vysokou koncentrací RP (Sheoran et al. 2011). Primárním místem výskytu těchto rezistentních rostlin jsou půdy bohaté na rudy těchto prvků. Dle Alforda et al.(2010) jsou metalofyty botanickými kuriozitami. Mezi těmito rostlinami nacházíme vysoké zastoupení čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Dělíme je do tří kategorií: exkludory, indikátory a akumulátory (Ali et al. 2013). Lambinon et Auquier (1963) rozdělili metalofyty na dvě skupiny: (1) obligátní metalofyty, které rostou pouze na kontaminovaných nebo půdách přirozeně bohatých na kovy a (2) fakultativní metalofyty, které se vyskytují jak na půdách kontaminovaných, tak na nekontaminovaných.

Exkludory akumulují těžké kovy ze substrátu do svých kořenů, ale omezily jejich transport do nadzemních částí (Sheoran et al. 2010). Takovéto rostliny mají nízký potenciál pro extrakci kovů, ale mohou být využity pro fytostabilizační účely (Lasat 2002).

Indikátory těžké kovy kumulují v nadzemních částech a odrážejí míru koncentrace v podloží (Sheoran 2010).

5.1 Hyperakumulátory

Termín poprvé použil ve své studii Jaffre et al. (1976), který objevil akumulaci schopnost niklu u druhu *Sebertia accuminata*. Teprve pozdější práce Brookse et al. (1977) uvádí koncentraci niklu odpovídající hyperakumulačním limitům pro rody *Homalium* a *Hybanthus* a to více než 1000 mg.kg⁻¹ v suché hmotě (0,1%).

Nejnižší limity pro hyperakumulaci jsou 100 mg.kg⁻¹ Cd, As (0,01% sušiny), 1000 mg.kg⁻¹ (0,1% sušiny) Pb, Co, Cu, Cr a Ni a 10000 mg.kg⁻¹ (1% sušiny) pro Zn a Mn (Reeves et Baker 2000). Van der Ent et al. (2012) pak považují za hyperakumulační limit u Zn hodnotu 3000 mg.kg⁻¹.

Hyperakumulující rostliny jsou rozšířeny napříč rostlinnou říší. Je známo přibližně 400 druhů ze 45 čeledí. Z čeledí dominují hvězdnicovité (*Asteraceae*), brukvovité (*Brassicaceae*), hvozdíkovité (*Caryophyllaceae*), šáchorovité (*Cyperaceae*), růžotvaré (*Cunoniaceae*), bobovité (*Fabaceae*), pryšcovité (*Flacourtiaceae*), lipnicovité (*Poaceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*), violkovité (*Violaceae*) a pryšcovité (*Eupobiaceae*) (Prasad 2003). Čeleď brukvovitých je nejpočetnějším taxonem, který čítá 11 rodů a 87 druhů.

Přírodní hyperakumulátory rostou pomalu a jsou malého vzrůstu a většinou jsou selektivní pro jednotlivé kovy (Shah et al. 2007). Mezi první známé hyperakumulátory patří skupina *Noccaea* spp. Tento rod je znám pro svoji akumulaci kovů a také pro svoji schopnost akumulovat více kovů najednou. Již dříve bylo popsáno, že *N. caerulescens* kumuluje Cd, Ni, Zn a Pb, *N. goesingense* Zn a Ni, *N. ochroleuca* Zn a Ni a *N. rotundifolia* Ni, Pb a Zn. U třech rodů a celkem 20 druhů rodu *Noccaea* je známá akumulace Zn (Prasad 2003). Baumann (1885) jako první zdokumentoval koncentraci Zn v listech *T. calaminare* okolo 1%. Tato skupina rostlin vykazuje veliké mezidruhové i vnitrodruhové rozdíly, a proto je předmětem intenzivního výzkumu (Shah et al. 2007). *N. caerulescens* a *A. halleri* se staly populárními modely ve výzkumu hyperakumulace (Zemanová et al. 2013). Rozdíl v příjmu Zn, Ni a Cd mezi populacemi je zdokumentován v několika studiích (Pollard et Baker, 1996; Escarré et al., 2000; Pollard et al., 2002; Assunção et al. 2003a, Taylor et Macnair, 2005). *N. caerulescens* má pozoruhodnou schopnost akumulovat extrémně vysoké hladiny Zn (39,6 g.kg⁻¹ sušiny) a Cd (10 g.kg⁻¹ sušiny). Díky svým vlastnostem byl použit jako zdroj genů pro jiné rostlinné druhy lépe se hodící pro fytoremediaci (Shah et al. 2007).

Nejdéle známým předpokládaným hyperakumulátorem Pb je *N. rotundifolia*, který dle Reevese et Brookse (1983) naakumuloval až 8200 mg.kg⁻¹ Pb, ale autoři neuvedli žádné

informace o koncentraci Pb v půdě. Kromě Pb byl tento druh shledán i jako hyperakumulátor Zn, s koncentrací v biomase až do 17300 mg.kg⁻¹ (1,73 %).

Huang et al. (1996) hyperakumulační schopnost Pb *N. caerulescens* nepotvrdili, při celkové koncentraci Pb v půdě 2500 mg.kg⁻¹ v jeho biomase pouze 79 mg.kg⁻¹. Byla u něj však shledána nejvyšší koncentrace tohoto prvku v kořenech a to jak u pěstování hydroponicky, tak v půdě.

6 FYTOREMEDIACE

Fytoremediace je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů z životního prostředí (Cunningham 1996). Původ slova fytoremediace pochází z řeckého „phyto“ – rostlina a z latinského „remedium“ – čistit, odstranit.

Fytoremediační technologie využívá všech biologických, chemických a fyzikálních procesů, které mají souvislost s růstem a výživou vyšších rostlin. Největší uplatnění má na místech s povrchovým znečištěním a je velmi účinná pro hydrofobní polutanty, jako například aromatické uhlovodíky, chlorovaná rozpouštědla nebo nitrosloučeniny (Smrček 2003). Účinná je rovněž pro ionty kovů a radionuklidů. Jedná se o relativně mladou technologii, studovanou v posledních dvou desetiletích, zhruba od roku 1987. Fytoremediace představuje dostupné řešení, šetrné k životnímu prostředí, použitelné *in situ* a cenově dostupné. Bylo vypočteno, že náklady na remediaci za pomocí rostlin lze snížit až na 1,35 Kč/m³ (Cunningham 1996).

Fytoremediace se skládá ze 4 technologií, z nichž každá má jiný mechanismus sanace znečištěné složky. Patří mezi ně: (1) rhizofitrace, používaná pro znečištění vod, (2) fytostabilizace, která zabraňuje vodní a větrné erozi a tím šíření rizikových prvků, (3) fytovolatilizaci, při které dochází k absorpci RP a jejich přeměně na těkavé formy a uvolnění do atmosféry a (4) fytoextrakci, při které rostliny absorbují polutanty z půdy a přemístí je do sklíditelných nadzemních částí (Prasad 2003).

Celý proces fytoextrakce má pět základních částí: (1) mobilizace rizikových prvků v půdě, (2) příjem rizikových prvků kořeny, (3) translokace naakumulovaných rizikových prvků v kořenech do nadzemní části rostliny, (4) izolace rizikových prvků v rostlinných tkáních a (5) tolerance vůči nim (Ali et al. 2013).

6.1 Fytoextrakce rizikových prvků

Fytoextrakce je neslibnější technologie pro komerční účely (Sun et al. 2011a), je ale aplikovatelná pouze na místa s nízkou až střední mírou kontaminace, neboť v silně kontaminovaných půdách nejsou schopny rostliny růst (Kumar et al. 1995a). Účinnost závisí na mnoha faktorech shrnutých v kapitole „biologická dostupnost rizikových prvků“ a vlastnostech konkrétních rostlin. Rostliny vhodné pro fytoextrakci by měly mít ideálně tyto vlastnosti (Vangronsveld et al. 2009, Ali et al. 2003):

- Rychlý růst.
- Vysoká produkce biomasy.
- Široce rozšířený a rozvětvený kořenový systém.
- Vysoká míra akumulace cílových rizikových prvků z půdy.
- Translokace RP z kořenů do nadzemní biomasy.
- Dobré adaptace na životní prostředí a klimatické podmínky.
- Odolnost vůči patogenům a škůdcům.
- Snadné pěstování a sklizeň.

Potenciál fytoextrakce je určen dvěma klíčovými faktory: (1) koncentrace RP v nadzemní biomase a (2) množství nadzemní biomasy (Li et al. 2010). Od počátku se diskutuje otázka, jestli je lepší využívat hyperakumulující druhy s nízkým výnosem biomasy nebo používat druhy se zvýšenou kumulací RP, ale větším výnosem biomasy (Vangronsveld et al. 2009). Podle Robinsona et al. (1998) a Tlustoše et al. (2006) je výsledné množství vytěženého kovu srovnatelné. Chaney et al. (1997) se naopak domnívají, že z ekonomického hlediska je lepší používat hyperakumulátory, protože pak je třeba likvidovat menší množství kontaminované biomasy. Na podporu tohoto tvrzení hypoteticky počítali odstranění Zn hyperakumulátorem a rostlinami s vysokou produkcí biomasy a došli k závěru, že při použití hyperakumulátoru se dosáhne vyššího odstranění kontaminantu. Kayser et al. (2000) naopak uvádí, že výtěžnost RP *N. caerulescens* nebyla příliš odlišná od výtěžnosti užitkových plodin, z důvodu malého vzrůstu, kdy celková výtěžnost suché hmoty činila max. 1 t.ha⁻¹. Ke stejnému závěru došel i Ebbs et al. (1997) po pozorování 10x vyšší koncentrace Cd v *N. caerulescens*, ale i 10x menší produkce biomasy ve srovnání s ostatními plodinami. V případě zinku Ebbs et al. (1997) uvádí, že i přestože brukev sítinovitá (*Brassica juncea*) do

svých tkání přijme třetinovou koncentraci Zn, je více efektivní než známý hyperakumulátor Zn *N.caerulescens*.

Zatím nebyla objevena žádná rostlina, která by splňovala všechny výše uvedené požadavky (Prasad 2003). Volba druhu, který je nejvhodnější pro remediaci konkrétního místa závisí na podmínkách a míře kontaminace. Pokud by ale měly plodiny s vyšší produkcí biomasy trpět toxicitou, použití hyperakumulátorů s vyšší tolerancí k RP, se jeví jako vhodnější řešení (Vangronsveld et al. 2009). Ve snaze najít ideální rostlinu k fytoextrakci se výzkum soustředí na šlechtění a genetické inženýrství rostlin (Prasad 2003).

6.2 Fytoremediační potenciál rostlin

O potenciálu využití rostlin na poli fytoextrakce nám může napovědět akumulční a translokační faktor. Akumulční faktor (AF) je dán podílem koncentrace RP ve sklizené biomase ku koncentraci RP v půdě. Translokační faktor (TF) indikuje efektivitu rostliny přemísťovat RP z kořenů do nadzemní biomasy. Je dán podílem koncentrace RP v biomase ku koncentraci RP v kořeni. Hodnota AF a TF by měla být větší než 1 (Fellet et al. 2012). Zatímco u exkludorů jsou hodnoty $AF < 1$, u hyperakumulátorů jsou často > 1 (Zhao et al. 2003).

Přírozeně se vyskytující hyperakumulující druhy, rostoucí na půdách bohatých RP, přijímají 100-1000x vyšší koncentrace RP než ostatní rostliny, což je činí slibnými pro fytoremediaci. Nicméně za poslední dvě dekády studia těchto druhů se ukázalo, že jejich potenciál pro fytoremediaci je omezený. Většina z nich jsou druhy selektivními a HA druhy nebyly nalezeny pro všechny potřebné RP. Efektivně používány mohou být pouze ve svém přirozeném prostředí, mají malou produkci biomasy (v případě *N. caerulescens* max 2t.ha⁻¹), mělký kořenový systém a pomalý růst, který rychlost fyoremediace limituje (Cunningham et al. 1995; Ebbst et al. 1997). Navíc chybí znalosti ohledně agronomických technik, v některých případech ohledně genetiky, onemocněních apod.

Jako slibný biotechnologický přístup zvýšení účinnosti fytoremediace se jeví přenos genů zodpovědných za HA vlastnosti do rychle rostoucích druhů s vysokým výnosem biomasy či šlechtění již známých HA druhů. Například zkřížením *N. caerulescens* a *Brassica napus* se podařilo vytvořit hybrid s vysokou tolerancí a schopností hyperakumulovat Zn a zároveň s velkou produkcí biomasy (Brewer et al. 1999). Hybridy *N. caerulescens* a *B. juncea* jsou pak schopny odstranit výrazné množství Pb (Glebea et al. 1999).

Rascio et Navara-Izzo (2007) připomínají, že ač se transgenní rostliny ukazují jako slibné, je tato část výzkumu teprve na začátku. Většina studií byla provedena v laboratorních podmínkách, nikoliv v přirozeném prostředí. Kromě toho, do HA schopností je zapojena celá řada genů, jejichž role musí být nejprve plně pochopena.

6.3 Proč rostliny akumulují RP

Hypotéz, proč vlastně rostliny RP akumulují, existuje hned několik, ve většině případů však nejsou dostatečně experimentálně podloženy (Rascio et Navari-Izzo 2007). Jednou z nich je rezistence vůči suchu, kterou RP můžou svojí přítomností zvyšovat zadržováním vody v buněčné stěně nebo působením jako osmolyty uvnitř buňky (Rascio et Navari-Izzo 2007).

Alelopatie, neboli negativní ovlivnění jiného organismu vyloučením chemických látek do prostředí, je další hypotézou. Rostliny mohou buď kořenovými exudáty snižovat pH prostředí a zvýšit biologickou dostupnost RP pro ostatní rostliny, nebo opadem svých nadzemních částí bohatých na RP zvýšit jejich koncentraci ve svém okolí na povrchu půdy a bránit tak méně tolerantním druhům v růstu (Rascio et Navari-Izzo 2007).

Největší pozornost je věnována teorii funkce vlastní obrany proti přirozeným nepřítelům, jimiž mohou být býložravci nebo patogeny. Tuto teorii potvrzuje například studie Pollarda at Bakera (1997), ve které se potvrdilo, že herbivoři dávají přednost druhům (*N. caerulea*, *Senecio coronatus*) s nízkými obsahy Zn a Ni než před druhy s obsahy vysokými.

7 ROD NOCCAEA

Penízek (*Noccaea*) je rod s více jak 50 druhy rostlin z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), z kmene *Coluteocarpeae*, které se vyskytují v Eurasii, Africe, Severní a Jižní Americe. U nás se vyskytuje 5 druhů. Rostou nejčastěji na slunných, vysýchavých a na živiny bohatých půdách. Rostliny rodu penízek mohou být jednoleté, dvouleté i vytrvalé s lodyhami jednoduchými nebo větvenými. Listy vyrůstají v přízemních růžicích. U tohoto rodu byly provedeny velké taxonomické změny, mnoho druhů z tohoto rodu byly dříve známé jako *Thlaspi spp.* V případě druhů rozšířených v ČR se tyto změny dotýkají vědeckých jmen těchto druhů: *Thlaspi montanum* na *Noccaea montana*, *Thlaspi kovatsii* na *Noccaea kovatsii*, *Thlaspi caerulescens* na *Noccaea caerulescens*, *Thlaspi perfoliatum* na *Microthlaspi perfoliatum*. Fotografie zkoumaných druhů jsou v přílohách (Obrázek č. 6-14).

7.1 Vývoj názvosloví *Noccaea* a *Thlaspi*

Tento rod byl původně popsán K. Linném v roce 1753. Různé druhy patřící do rodu *Noccaea* byly tradičně zařazovány do rodu *Thlaspi*, v průběhu let se objevovaly nové informace a taxonomie se vyvíjela (Koch et German 2013).

První kdo po K. Linném přeorganizoval tento rod, byl v roce 1802 Moench, který v té době například známý druh *Iberis rotundifolium* nebo *Lepidium rotundifolium* (později široce známý jako *Thlaspi rotundifolium*) zařadil jako jediný druh do rodu *Noccaea* a pojmenoval ho tedy *Noccaea rotundifolia*. Mnoho druhů, které byly později přiřazeny do rodu *Noccaea* ignoroval. Zavedl dalších 11 rodů, které nově kombinují jednotlivé druhy *Thlaspi species* (např. Rod *Microthlaspi*, *Raparia*, a další.)

V letech 1973-1979 uspořádal Meyer nový koncept taxonomie, založený převážně na anatomii osemení. Mnoho druhů z rodu *Thlaspi* přesunul do *Noccaea*. Toto taxonomické uspořádání řadilo většinu hyperaukumulujících druhů do jedné monofyletické skupiny (Koch et German 2013). Meyer stále předpokládal úzké vztahy mezi různými bývalými "Thlaspi" rody, což se později, na základě systematického molekulárního výzkumu Mummenhoffa et Kocha (1994), ukázalo jako nesprávné. Například druh *T. arvense* není vůbec příbuzný s rodem *Noccaea*. Nicméně částečně byl Meyerův koncept potvrzen. Nová taxonomie byla však opomíjena, Meyer v 70. letech publikoval několik monografií

zaměřených na rod *Noccaea*, v roce 2006 vydal komplexní svazek. Nicméně většina vědeckých článků týkajících se tohoto rodu změny nereflektuje, obrat nastal v posledních několika letech. Jedním z důvodů je fakt, že většina jeho prací byla publikována v němčině a v čistě taxonomických časopisech. Grafické znázornění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými rody je v příloze.

8 ROD ARABIDOPSIS

Rod *Huseníček* (*Arabidopsis*), pochází z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), z kmene *Camelineae*. Obsahuje asi 10, vesměs plevelných druhů rostlin vyskytujících se téměř v celém mírném pásu severní polokoule, dále v Jižní Americe, Jižní Africe, Austrálii a na Novém Zélandu. Devět druhů je domácích v Evropě, jeden je endemický v Severní Americe. Tento rod je tvořen rostlinami jednoletými, dvouletými i trvalými. Jednotlivé druhy se vyznačují nízkým vzrůstem, listy vyrůstající v listové růžice, rozmnožují se semeny.

Díky jeho rychlému životnímu cyklu, malé velikosti, dostupnost v mnoha mutacích a jednoduchému genomu nabízí mnoho výhod pro genetické a molekulární analýzy.

V nedávné době byly v rámci tohoto rodu provedeny rozsáhlé taxonomické změny, dle O'Kane et al. 2003 jde o rod polyfyletický, velký počet druhů byl přerazen do jiných rodů a naopak do tohoto rodu byly včleněny druhy z rodu řeřišničík (*Cardaminopsis*). Fotografie tohoto druhu jsou v příloze (Obrázek č. 15 a 16).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

9 USPOŘÁDÁNÍ A PRŮBĚH MODELOVÝCH EXPERIMENTŮ

9.1 Dlouhodobý nádobový a polní pokus

Noccaea caerulescens a *Arabidopsis halleri* byly kultivovány v 7 po sobě jdoucích vegetačních období (rok 2007-2013) v nádobovém a polním pokusu v půdě extrémně kontaminované kadmíem, zinkem a olovem. Výsledky z prvních sezón byly již zpracovány dříve (Břendová 2011), ale tato práce prezentuje komplexní hodnocení se zahrnutím všech dosavadních sezón. Polní pokus probíhá na levém břehu řeky Litavky na Příbramsku. Hutnická oblast Příbrami patří k nejvíce kontaminovaným na území České republiky. Je známá jako naleziště Ag-Pb-Zn rud, které tu byly zhruba od přelomu 12. a 13. století do konce 70. let 20. století těženy. Vysoké obsahy rizikových prvků v půdě jsou jak geogenního, tak antropogenního charakteru. Geogenní kontaminace je důsledkem zvětrávání mateční horniny. Antropogenní kontaminace byla způsobena převážně atmosférickým spadem z kovohutě. Na některých místech dosahuje kontaminace enormních koncentrací- u Pb se jedná až o 4500 mg.kg⁻¹, u Zn až 8700 mg.kg⁻¹ a u Cd až 68 mg/kg⁻¹.

Na místě polního pokusu byly stanoveny pseudototální obsahy prvků (tj. extrahovatelné lučavkou královskou: 27,0±0,1 mg.kg⁻¹ Cd, 2667±282 mg.kg⁻¹ Pb a 2697±60 mg.kg⁻¹ Zn. Hodnota pH byla 5,8±0,2. Byly použity dva fenotypy *N. caerulescens*: první z oblasti Ganges, Jižní Francie (NCG) a druhý z oblasti Mežica, Slovensko (NCM) a *A. halleri*, který se v této oblasti vyskytuje přirozeně.

V nádobovém pokusu byly rostliny pěstovány v 6 l plastových nádobách (5 rostlin na 1 nádobu) v 5 kg zeminy odebrané z lokality polního pokusu (Obr.č.4). Každý rok na začátku vegetační sezóny, byla do každé nádoby přidána jedna dávka hnojiva NPK (0,5g N; 0,16g P; 0,4g K).

Stejně rostliny jako v nádobovém pokusu byly použity i pro polní pokus (políčka cca 2 m²). Na každém políčku se nacházelo 100 rostlin ve 13 řádcích, rostoucích přirozeně bez speciální péče, občasně byly odstraňovány plevelné rostliny. V šesté sezóně došlo vlivem škůdců k úhynu rostlin. Po celou dobu trvání pokusu nebyla aplikována hnojiva ani pesticidy. Nadzemní biomasa byla vždy sklizena ke konci vegetační sezóny.

V průběhu polního i nádobového pokusu byly zkoušeny i jiné druhy, zaměřené na příjem olova- *N. rotundifolia* a *N. montana* (Graf č.2-9).



Obrázek 4: Schéma dlouhodobého nádobového pokusu.

9.2 Krátkodobý nádobový pokus s přidavkem olova

Jak již bylo uvedeno v teoretické části, rostliny rodu *Noccaea* se vyznačují dobrou schopností hyperakumulace Cd a Zn. U některých druhů se ale uvádí, že jsou schopny akumulovat olovo. Jak vyplývá z výsledků uvedených níže, na půdě z lokality Litavka se tato schopnost nepotvrdila ani v polním ani v nádobovém pokusu. Byl proveden jednorázový nádobový pokus, kdy byly vybrané druhy tohoto rodu pěstované v písčité půdě s nízkou sorpční schopností, do které bylo navíc přidáno olovo. Pokus se zaměřoval na 3 druhy: *Noccaea rotundifolia* z rakouských Alp, *Noccaea montana* z Bílé stráně u Litoměřic a *Noccaea jankae hungarica* z okolí maďarského Egeru. Semena rostlin byla vyseta do rašelinového substrátu na jaře roku 2014 a následně přesazena do nádob. U posledních dvou variant (10 a 11) byly rostliny předpěstovány přímo v pokusné zemině, aby se zabránilo přítomnosti organické hmoty v kořenové oblasti. Rostliny byly pěstovány na písčité fluvizemi z lokality Choťánky u Poděbrad.

Nádobový pokus byl založen na jaře roku 2014 v prostorách pokusné haly FAPPZ ČZU, nádoby byly umístěny v zastřešeném, bočně otevřeném prostoru. Do nádob bylo vsypáno 5 kg písčité půdy z Choťánek. V tabulce č. 1 je přehled rizikových prvků v půdě. Do každé nádoby bylo přidáno 18,31g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, což odpovídá výsledné koncentraci 2000 mg Pb na 1 kg půdy. Rostliny byly pěstovány ve třech opakováních, v případě *N.jankae hungarica* byly první tři varianty pěstovány stejným způsobem, u posledních dvou variant se semínka předpěstovávala přímo v zemině. V průběhu pokusu byly rostliny zalévány demineralizovanou vodou. Sklizeň nadzemní biomasy proběhla v říjnu 2014, tak, aby rostliny byly schopny regenerovat a dále vegetovat. Sklizená nadzemní biomasa byla usušena, zhomogenizována a analyzována na obsah Cd, Pb a Zn.

9.3 Hydroponie

Hydroponický pokus byl založen v květnu roku 2014 v experimentálním skleníku FAPPZ ČZU. V pokusu byly použity 4 plastové nádoby (č.1, č.2, č.3, č.4) (originálně potravinové kontejnery) o objemu cca 1,3-1,4 l (Obr.č.4). Do každého plastového víka bylo provrtáno 5 děr o průměru cca 5mm (4 v rohu a jedna u kraje mezi dvěma rohy). Do každého rohu se umístila jedna rostlina, 5. díra sloužila k přívodu vzduchu. Celkem bylo pěstováno 16 rostlin.

Na pěstování byl použit tzv. Hoaglandův živný roztok, který je v literatuře nejvíce doporučován, protože byl vyvinut speciálně pro hydroponické pěstování suchozemských rostlin. Pro náš pokus jsme složení tohoto roztoku mírně upravili. Na dva litry demineralizované vody se přidávalo: 2 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4,6 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,0 ml KH_2PO_4 ; 5 ml KNO_3 ; 20 ml Fe-EDTA a 0,5 ml mikroživin, které obsahovaly: H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Hodnota pH roztoku se upravovala na hodnotu 6,6 pomocí 6 mol.l^{-1} NaOH a 6 mol.l^{-1} HCl.

Pro tento pokus byly použity rostliny druhu *Noccaea jankae hungarica*, který vykazoval nejlepší růst a jeho schopnost kumulace Pb se nelišila od *N. rotundifolia*. Tento druh pochází z okolí maďarského Egeru, kde byla odebrána semena. Další populace tohoto druhu se nachází již jen okrajově v NP Agtellek a v Buda hegyi. Rostliny byly nejprve předpěstovány ze semínek v rašelinovém substrátu. Zhruba po 4 týdnech, když byly rostlinky dostatečné velké, byly přesunuty do plastových nádob se živným roztokem. Nechaly se ještě zhruba 6 týdnů růst bez přídavku olova. Po uplynutí této doby bylo do nádoby č. 1 přidáno $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Pb, do nádoby č. 2 $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Pb, nádoba č. 3 sloužila jako kontrola. Po přidání olova trval pokus dalších 5 týdnů- každých 10 dnů byl vyměňován živný roztok s příslušnými koncentracemi olova. Jednotlivé nádoby byly obaleny alobalem, aby se zabránilo vstupu světla a růstu zelených řas. Nádoby byly provzdušňovány každý druhý den. Ve skleníku byla udržována teplota 26-27°C. Po dokončení pokusu byly rostliny opláchnuty demineralizovanou vodou, rozděleny na kořeny a nadzemní část a zvážena jejich čerstvá hmota. Rostliny byly ponechány k usušení ve skleníku na aluminiových miskách a po doschnutí se zjišťovala hmotnost suché hmoty. Takto připravený materiál se namlel laboratorním mlýnkem (VEGA WARING) na jemný prášek.



Obrázek 5: Schéma hydroponického pokusu.

9.3.1 Stanovení rizikových prvků

Celkový obsah prvků v rostlinné biomase byl stanoven v mineralizátech po rozkladu na suché cestě následovně: 1 g vzorku se naváží do 50 ml kádinky z křemenného skla a mineralizuje se na horké desce a následně v muflové peci při postupném zvyšování teploty až na 500°C. Při této teplotě se vzorky mineralizují přes noc. Druhý den se rozklad dokončí přidáním 1 ml koncentrované HNO_3 jako pomocného oxidovadla, které se odpaří při teplotě 120°C. Nakonec je popel rozpuštěn ve 20 ml 1,5 % roztoku HNO_3 a uchován při laboratorní teplotě až do doby měření (Mader et al., 1998). V případě vzorků z krátkodobého pokusu s přidavkem olova a hydroponického pokusu byl použit rozklad na mokré cestě s mikrovlnným ohřevem. Ze zhomogenizovaného vzorku bylo naváženo 0,5 g vzorku. Navážka byla zalita 8 ml 65 % kyselinou dusičnou a 2 ml 30 % peroxidu vodíku. Takto připravený vzorek byl v teflonových reakčních nádobách extrahován v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem v zařízení Ethos 1 (MLS GmbH, Německo) po dobu 30 minut a teplotě 220 °C. Po částečném ochlazení prošel vzorek procesem odkuřování kyselin. Po

ochlazení byl mineralizát kvantitativně převeden do 20 ml zkumavky a doplněn demineralizovanou vodou, poté uchován při laboratorní teplotě až do doby měření. Pro prvkovou analýzu byla použita technika optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) s axiálním uspořádáním plazmatu (Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA).

10 VÝSLEDKY

10.1 Dlouhodobý nádobový a polní pokus

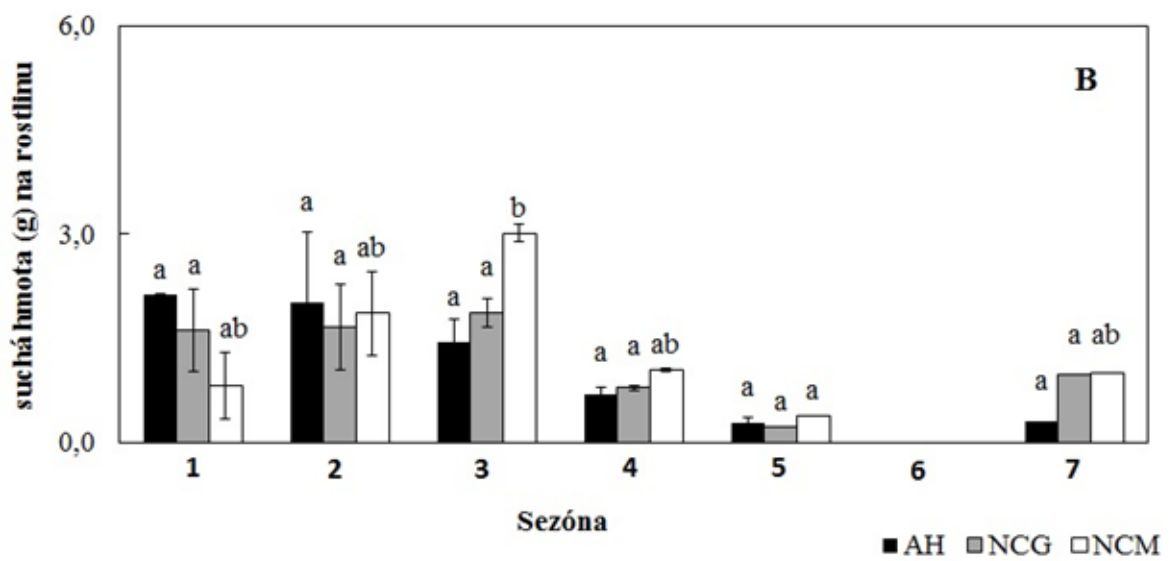
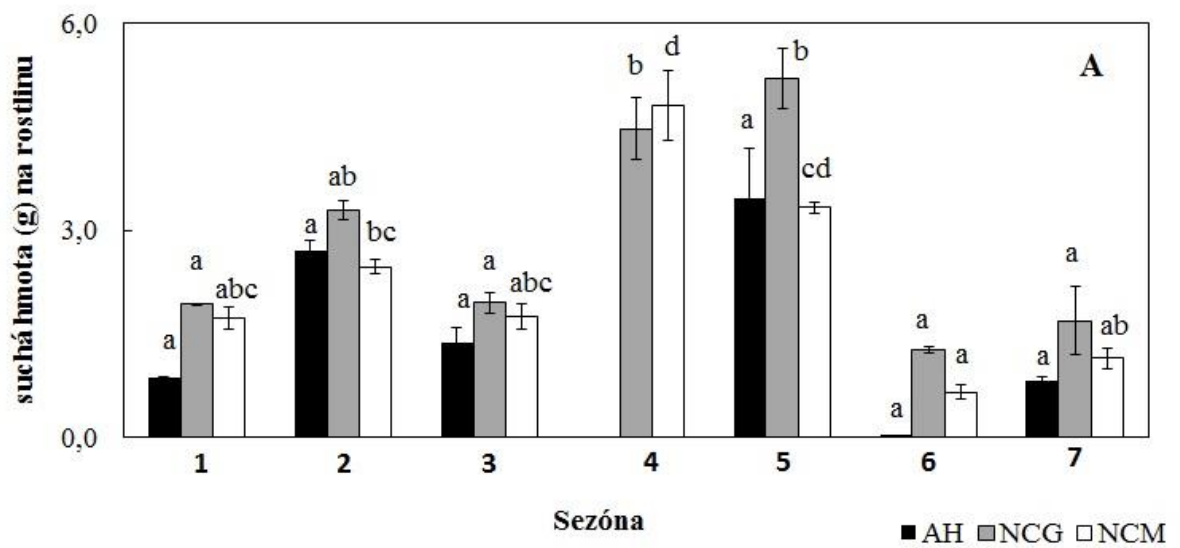
Graf č. 1 shrnuje roční výnosy sušiny v přepočtu na jednu rostlinu. Z grafu je patrné, že rostliny vykazují vysokou variabilitu výnosu. Především v nádobovém pokusu (Graf A) je variabilita vysoká, i přesto, že byly rostliny pěstovány v relativně kontrolovaných a stejných podmínkách v průběhu všech 7 sezón. U polního pokusu byla variabilita ovlivněna zejména přírodními podmínkami jednotlivých sezón, než rostlinnými druhy.

V nádobovém pokusu vykazoval dlouhodobě *A. halleri* nejnižší výnos, oproti polnímu pokusu, kde se tento druh vyskytuje přirozeně a převyšuje v několika sezónách výnos NCG, který naopak v nádobovém pokusu vykazoval celkově výnos nejvyšší. Výnosy NCG a NCM byly vyšší v nádobovém pokusu než v polním.

Obsahy Cd, Pb a Zn v nadzemní biomase rostlin jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. Výsledky potvrzují hyperakumulující schopnost Cd u NCG a NCM v nádobovém (Tabulka 1) i polním pokusu (Tabulka 2). V polním pokusu dosahovaly rostliny vyššího příjmu Cd, hlavně u NCG. V případě AH byly dosaženy hyperakumulační limity pouze ve dvou sezónách (1 a 2) nádobového pokusu. V polním pokusu byl tento limit dosažen ve všech sezónách (kromě 6., kde došlo k úhynu rostlin).

Hyperakumulační schopnost Zn byla potvrzena v první sezóně nádobového pokusu u AH. V polním pokusu bylo dosaženo lepších výsledků- hyperakumulující schopnost byla potvrzena ve třech sezónách. V jednom roce byla u polního pokusu potvrzena HA schopnost i u NCG a NCM.

V případě olova se hyperakumulační schopnost neprokázala ani u jednoho druhu jak v nádobovém, tak v polním pokusu.



Graf 1: Průměrný výnos sušiny hyperakumulujících rostlin v přepočtu na sušinu jedné rostliny v nádobách (A) a na poli (B).

Tabulka 1: Obsahy prvků v nadzemní biomase hyperakumulujících rostlin v modelovém nádobovém pokusu v jednotlivých sezónách. Průměry označené stejným písmenem se významně nelišily na hladině významnosti $P < 0,05$ v jednotlivých sloupcích, $n=6$, data jsou uvedena jako průměry \pm směrodatná odchylka.

Rostlina	Sezóna	Cd mg.kg ⁻¹	Pb mg.kg ⁻¹	Zn mg.kg ⁻¹
AH	1	149 \pm 2b	127.4 \pm 4.0c	17281 \pm 821c
	2	104 \pm 2ab	76.7 \pm 6.7b	4417 \pm 144ab
	3	53.4 \pm 3.1a	22.0 \pm 2.1a	2781 \pm 35ab
	4	x	x	x
	5	37.2 \pm 0.6a	0.9 \pm 0.1a	1569 \pm 71a
	6	23.6 \pm 1 a	2.2 \pm 0.5a	5370 \pm 165ab
	7	51.1 \pm 22.4a	13.5 \pm 11.1a	6144 \pm 1643b
Rostlina	Sezóna	Cd mg.kg ⁻¹	Pb mg.kg ⁻¹	Zn mg.kg ⁻¹
NCG	1	542 \pm 15ab	4.1 \pm 0.2ab	6109 \pm 115cd
	2	155 \pm 3a	93.6 \pm 4.6c	2007 \pm 93ab
	3	274 \pm 12a	56.8 \pm 3.8bc	2284 \pm 32b
	4	1935 \pm 64c	9.7 \pm 0.5ab	6834 \pm 175d
	5	181 \pm 3a	0.53 \pm 0.04a	1070 \pm 19a
	6	642 \pm 70ab	2.05 \pm 0.35ab	5376 \pm 396c
	7	905 \pm 84b	1.06 \pm 0.11ab	4942 \pm 290c
Rostlina	Sezóna	Cd mg.kg ⁻¹	Pb mg.kg ⁻¹	Zn mg.kg ⁻¹
NCM	1	742 \pm 29b	44.8 \pm 5.0c	7602 \pm 282d
	2	164 \pm 3a	58.7 \pm 1.6c	2579 \pm 165ab
	3	170 \pm 3a	27.7 \pm 1.5b	2308 \pm 8a
	4	742 \pm 16b	13.1 \pm 0.4ab	5060 \pm 68c
	5	264 \pm 38ab	0.37 \pm 0.09a	1414 \pm 75a
	6	854 \pm 251b	5.67 \pm 3.09a	4995 \pm 789c
	7	610 \pm 227ab	0.73 \pm 0.25a	4359 \pm 771bc

x....neanalyzováno

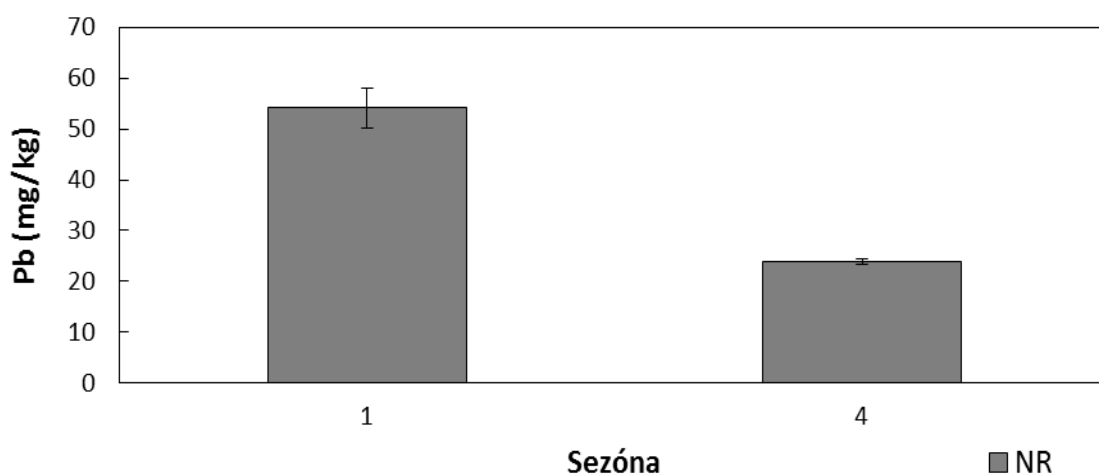
Tabulka 2: Obsahy prvků v nadzemní biomase hyperakumulujících rostlin v modelovém polním pokusu v jednotlivých sezónách. Průměry označené stejným písmenem se významně nelišily na hladině významnosti $P < 0,05$ v jednotlivých sloupcích, $n=6$, data jsou uvedena jako průměry \pm směrodatná odchylka.

Rostlina	Sezóna	Cd mg.kg ⁻¹	Pb mg.kg ⁻¹	Zn mg.kg ⁻¹
AH	1	115±6a	49.7±4.7b	12973±1026b
	2	112±8a	42.5±5.1ab	3442±185a
	3	203±31b	26.9±19.0ab	3597±216a
	4	241±23b	108.5±14.3c	13183±530b
	5	106±14a	31.7±2.7ab	2275±182a
	6	x	x	x
	7	281±31a	90.4±8.5b	26543±259b
Rostlina	Sezóna	Cd mg.kg ⁻¹	Pb mg.kg ⁻¹	Zn mg.kg ⁻¹
NCG	1	1042±100a	37.9±2.7ab	6639±259b
	2	1663±596a	48.3±7.1ab	2676±395a
	3	3093±565a	27.4±5.5ab	1794±263a
	4	4380±699b	72.5±9.9b	10711±517c
	5	1647±134a	25.8±7.0ab	2139±142a
	6	x	x	x
	7	2380±2a	35.9±1.8ab	12587±284c
Rostlina	Sezóna	Cd mg.kg ⁻¹	Pb mg.kg ⁻¹	Zn mg.kg ⁻¹
NCM	1	438±19a	29.3±3.1a	7280±350bc
	2	459±59a	52.5±7.0a	2640±190ab
	3	774±12a	49.9±12.1a	774±82ab
	4	1722±583b	187±42.8b	10247±1096cd
	5	914±28ab	38.8±2.4a	2056±128a
	6	x	x	x
	7	2102±205b	34.0±1.9a	12733±227d

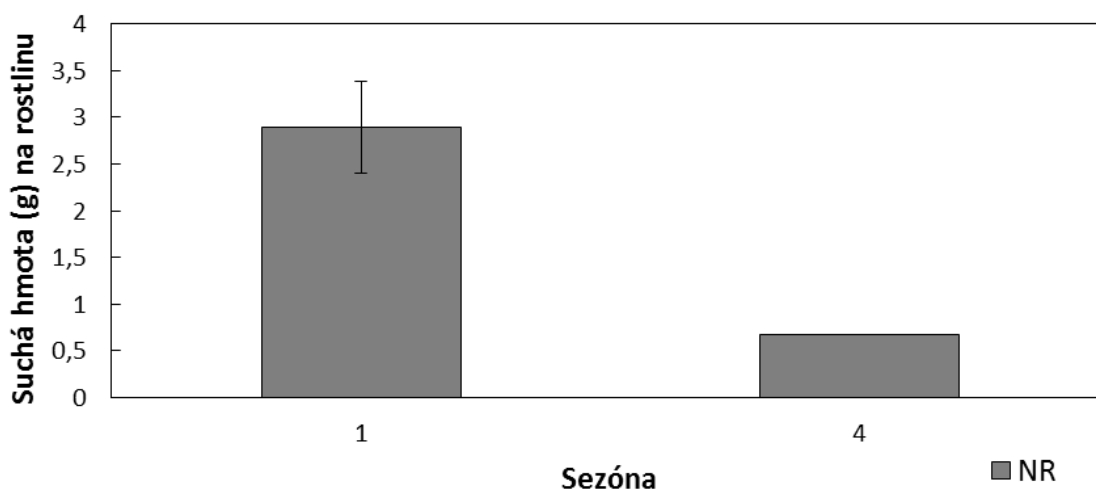
x...neanalyzováno

10.1.1 Dlouhodobý polní a nádobový pokus- *N.rotundifolia*, *N. montana*

V roce 2007 a 2010 byly v rámci polního pokusu (Litavka) zkoušeny i jiné druhy na příjem olova. Graf č. 2 shrnuje průměrné obsahy Pb v nadzemní biomase *N. rotundifolia*. V roce 2007 je průměrná hodnota přijatého Pb 54,2 mg.kg⁻¹, v roce 2010 je příjem výrazně nižší - 23,8 mg/kg⁻¹. Rostliny vykazovaly vyšší výnos v roce 2007, průměrná hodnota výnosu suché biomasy na 1 rostlinu dosahoval 2,89 g, v roce 2010 to bylo pouhých 0,68 g (Graf č.3).

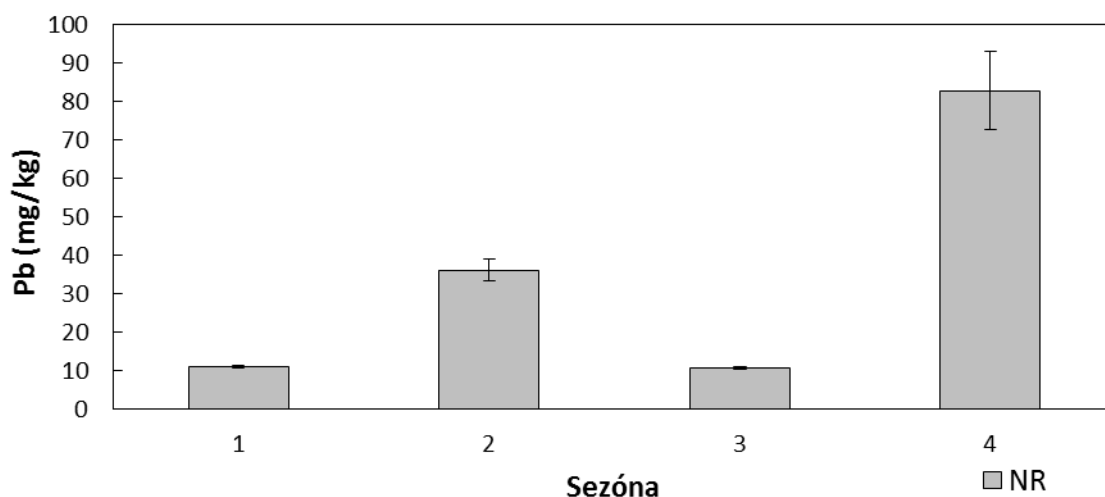


Graf 2: Průměrný obsah Pb v *N. rotundifolia* v roce 2007 a 2010, polní pokus (Litavka).

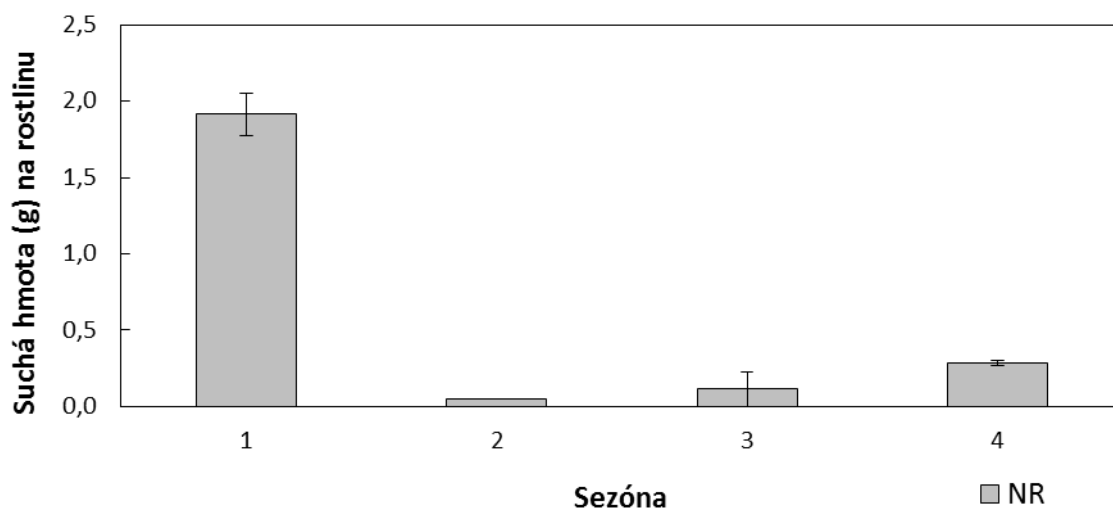


Graf 3: Průměrný výnos sušiny *N. rotundifolia* v přepočtu na sušinu jedné rostliny, rok 2007 a 2010, polní pokus (Litavka).

V nádobovém pokusu byl *N. rotundifolia* pěstován v letech 2007-2010, průměrné obsahy Pb dosahovaly těchto hodnot: 11,0; 36,1; 10,6; 82,9 mg.kg⁻¹ (Graf č. 4). Průměrné výnosy sušiny na jednu rostlinu byly: 1,92; 0,05; 0,12; 0,29 g (Graf č. 5). Příjem olova vykazuje velikou variabilitu, nejvíce bylo Pb přijato v roce 2010 (82,9 mg.kg⁻¹). V 1. sezóně byl zaznamenán nejvyšší výnos biomasy (1,92 g).

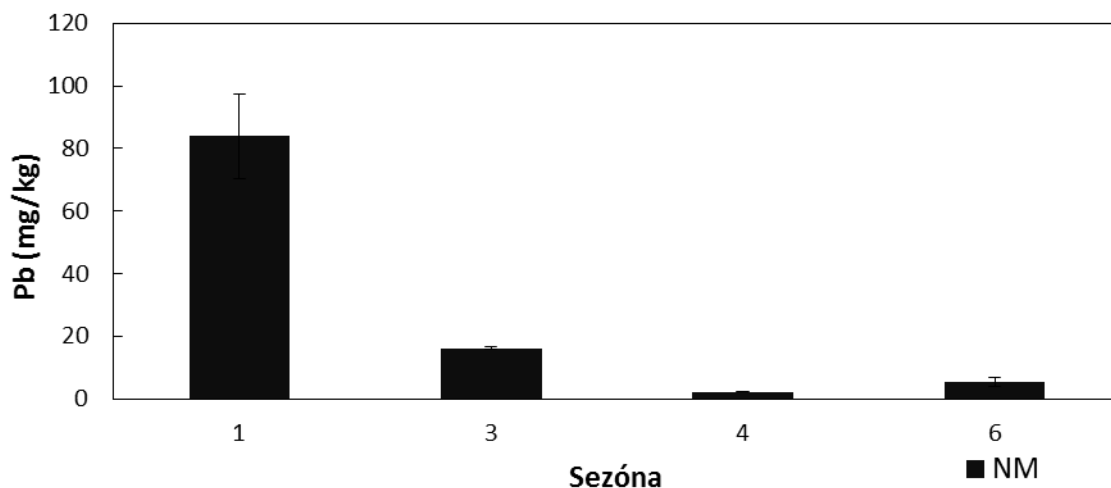


Graf 4: Průměrný obsah Pb v *N. rotundifolia* v letech 2007-2010, nádobový pokus, půda Litavka.

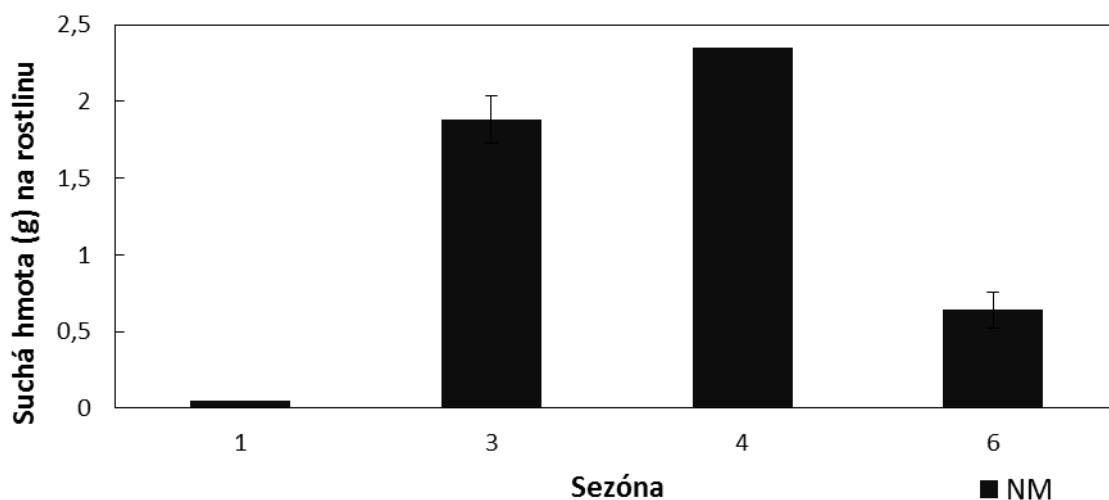


Graf 5: Průměrný výnos sušiny *N. rotundifolia* v přepočtu na sušinu jedné rostliny v letech 2007-2010, nádobový pokus, půda Litavka.

Rostliny *N. montana* byly v nádobovém pokusu pěstovány v letech 2008, 2010, 2011 a 2013. Nejvyššího obsahu Pb bylo v rostlinách v roce 2010- 83,9 mg.kg⁻¹. V dalších letech hodnoty byly: 16,29; 2,35; 5,56 mg.kg⁻¹ (Graf č. 6). Příjmy Pb *N. montana* byly téměř totožné s příjmy *N. rotundifolia*. Tento druh však vykazoval větší výnos suché biomasy na rostlinu. V jednotlivých letech dosahovaly těchto hodnot: 0,05; 1,88; 2,65; 0,64 g (Graf č. 7).



Graf 6: Průměrný obsah Pb v nadzemní biomase *N. montana* v letech 2008, 2010, 2011 a 2013, nádobový pokus, půda Litavka.



Graf 7: Průměrný výnos sušiny *N. montana* v přepočtu na sušinu jedné rostliny v letech 2008, 2010, 2011 a 2013, nádobový pokus, půda Litavka.

10.2 Krátkodobý nádobový pokus s přidavkem olova

V tomto nádobovém pokusu byla použita půda z Choťánek, která je písčité a chudá na organické látky. Byly odebrány dva nezávislé vzorky a stanoveny pseudocelkové obsahy prvků ve výluhu lučavskou královskou (Tab.č.3). V případě olova bylo do půdy přidáno 2000 mg.kg⁻¹ Pb ve formě octanu olovnatého, který je přístupný pro rostliny. Po skončení pokusu byl stanoven mobilní podíl olova ve výluhu 0.11 mol.l⁻¹ kyselinou octovou a bylo prokázáno, že 60% z celkového množství Pb je mobilní. U ostatních prvků nebyla překročena limitní hranice normy dle vyhlášky č. 13/1994 Sb.

Prvky (mg/kg)	Cd	Pb	Zn	As	Cu	Fe	Mn	Se
půda Choťánky	0,07	2010,94	18,95	4,71	2,11	2696,5	97	0,5

Tabulka 3: Pseudocelkové obsahy prvků v půdě stanoveny ve výluhu lučavkou královskou.

Kadmium bylo v půdě přítomno ve velmi malém množství (Tab.č.4). Nejvyšší příjem vykazoval druh *N. rotundifolia*, u kterého byl průměrný nárůst v nadzemní biomase 31 násobek oproti obsahu v půdě. Translokační faktor, který kvantifikuje příjem prvků z půdy, byl u kadmia a tohoto druhu velice vysoký - 31. Nejnižší obsahy Cd vykazoval druh *N. montana* ve všech třech opakováních. V případě *N. jankae hungarica* byl zaznamenán obsah kadmia nepatrně vyšší než u *N. montana*, hodnota TF se pohybovala okolo 9,56. U varianty č. 10 a 11, kde byly rostliny předpěstovány přímo v půdě, aby se zabránilo přítomnosti organické hmoty u kořenů, se oproti variantám č. 8, 9 a 10 zvedlo minimálně.

Kadmium

	Druh	Cd (mg/kg)	průměr (mg/kg)	s	TF
1	<i>N. rotundifolia</i>	1,54			
2	<i>N. rotundifolia</i>	1,54	2,17	1,09	31,00
3	<i>N. rotundifolia</i>	3,43			
4	<i>N. montana</i>	0,276			
5	<i>N. montana</i>	0,518	0,396	0,12	5,66
6	<i>N. montana</i>	0,394			
7	<i>N. jankae hungarica</i>	0,484			
8	<i>N. jankae hungarica</i>	0,965	0,669	0,23	9,56
9	<i>N. jankae hungarica</i>	0,557			
10	<i>N. jankae hungarica</i>	0,744	0,711	0,05	10,16
11	<i>N. jankae hungarica</i>	0,677			

Tabulka 4: Obsah kadmia v nadzemní biomase jednotlivých druhů.

V příjmu olova nevykazoval ani jeden druh hyperakumulující schopnost (Tab.č.5), koncentrace v nadzemní biomase se pohybovaly v rozmezí 9,7-76,1 mg.kg⁻¹, což odpovídá vyššímu příjmu olova. Dle analýzy byl nejvyšší příjem Pb zaznamenán ve variantě č. 3 u *N. rotundifolia*. Průměrné koncentrace v nadzemní biomase byly nejvyšší u rostlin *N. jankae hungarica* u variant 10 a 11 (předpěstovaných přímo v nádobách). Třetí průměrný nejvyšší obsah dosahoval u *N. jankae hungarica* (předpěstovaných v rašelinovém substrátu). Nejnižší průměrný příjem dosahovaly rostliny *N. montana*. Ve všech případech byl však TF velmi nízký, pohyboval se v rozpětí 0,01-0,02.

Olovo

	Druh	Pb (mg/kg)	průměr (mg/kg)	s	TF
1	<i>N. rotundifolia</i>	35,3			
2	<i>N. rotundifolia</i>	20,0	43,77	28,99	0,02
3	<i>N. rotundifolia</i>	76,1			
4	<i>N. montana</i>	26,8			
5	<i>N. montana</i>	9,7	23,47	12,44	0,01
6	<i>N. montana</i>	33,9			
7	<i>N. jankae hungarica</i>	21,6			
8	<i>N. jankae hungarica</i>	40,2	31,30	9,31	0,02
9	<i>N. jankae hungarica</i>	31,5			
10	<i>N. jankae hungarica</i>	38,4			
11	<i>N. jankae hungarica</i>	51,2	44,80	9,05	0,02

Tabulka 5: Obsah olova v nadzemní biomase jednotlivých druhů.

Zinek

	Druh	Zn (mg/kg)	průměr (mg/kg)	s	TF
1	<i>N. rotundifolia</i>	88,3			
2	<i>N. rotundifolia</i>	103	123	47,5	6,49
3	<i>N. rotundifolia</i>	177			
4	<i>N. montana</i>	95,6			
5	<i>N. montana</i>	144	147	52,8	7,76
6	<i>N. montana</i>	201			
7	<i>N. jankae hungarica</i>	278			
8	<i>N. jankae hungarica</i>	366	334	48,7	17,63
9	<i>N. jankae hungarica</i>	358			
10	<i>N. jankae hungarica</i>	351			
11	<i>N. jankae hungarica</i>	308	329,5	30,4	17,39

Tabulka 6: Obsah zinku v nadzemní biomase jednotlivých druhů. s...směrodatná odchylka, TF...translokační faktor

Koncentrace zinku v půdě byla velice nízká-18,95 mg.kg⁻¹, takže ani rostliny v sobě nenaakumulovaly příliš vysoké koncentrace. Nejvyšší příjem zinku vykazovaly rostliny *N. jankae hungarica*, v rozmezí od 278-366 mg.kg⁻¹ (Tab.č.6), dle TF (17) můžeme usuzovat na vysokou míru schopnosti absorbování prvků z půdy. U druhu *N. rotundifolia* a *N. montana* byla schopnost absorbování o něco menší, průměrné TF byly 6,49 a 7,76. Příjem zinku byl nejmenší u *N. rotundifolia*.

Z výsledků je zřejmé, že přes nízký obsah Cd a Zn v půdě měly rostliny tendenci tyto prvky akumulovat. V případě Pb i přes vysoký mobilní podíl tohoto prvku v půdě žádný ze sledovaných druhů neprokázal akumulaci schopnost.

10.3 Hydroponie

Rostliny *N. hungarica* byly pěstovány ve třech variantách. Varianta 1 (Tab.č.7) obsahovala 1 μM Pb, varianta 2 5 μM Pb a varianta 3 sloužila jako kontrola. Jak můžeme vidět v tabulce 1, analýza kořenů ukazuje nárůst koncentrace Pb v kořenech v závislosti na vyšší koncentraci rozpuštěného Pb v roztoku. Průměrná koncentrace Pb na rostlinu ve variantě 3 (kontrola) byla 7,4 mg.kg^{-1} suché hmoty. U varianty 1 se příjem kořeny zvýšil na průměrných 190 mg.kg^{-1} , což představuje nárůst o 26 %. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 122-226 mg.kg^{-1} . Kořeny rostlin z varianty 2 dosahovaly nejvyšší koncentrace 2095 mg.kg^{-1} , což oproti kontrole představuje nárůst o 283%. V průměru se jedná o 210 % nárůstu koncentrace Pb v kořenech u varianty 2.

Celkové obsahy olova v nadzemní biomase *N. hungaricum* nepotvrdily hyperakumulační schopnost tohoto druhu (Tab.č.8). V nadzemní biomase se ukázal podobný trend jako v případě kořenů-čím vyšší koncentrace v roztoku a v kořenech, tím vyšší v listech. Nárůst oproti kontrole u varianty 1 činil v průměru 10%, u varianty 2 došlo k nárůstu o 89%. Nejvyšší dosažená koncentrace byla 119 mg.kg^{-1} , což odpovídá vysokému příjmu olova. Stále je to ale zhruba 10x méně, než je hranice hyperakumulace (1000 mg.kg^{-1}). V ostatních případech koncentrace odpovídaly vyššímu příjmu olova.

V průběhu pokusu uhynula jedna rostlina u varianty 1 i 2. Ostatní projevovaly známky zpomaleného růstu i občasných chloróz. Vitalita rostlin se s vyšší koncentrací Pb v roztoku nezhoršovala, téměř během celého pokusu bylo nejvíce zdravých rostlin ve variantě 2 i v porovnání s variantou kontrolní.

Kořeny

Varianta	Pb (roztok) (μM)	Rostlina	Pb (mg/kg)	průměr (mg/kg)	s (mg/kg)
1	1	2/2 2/3 2/4	122 223 226	190	59
2	5	3/1 3/2 3/4	1085 1477 2095	1552	509
3 (kontrola)	0	4/1 4/2 4/3 4/4	9,55 8,97 5,14 5,87	7,4	2,2

Tabulka 7: Koncentrace Pb v kořenech *N. hungarica*.

Nadzemní biomasa

Varianta	Pb (roztok) (μM)	Rostlina	Pb (mg/kg)	průměr (mg/kg)	s (mg/kg)
1	1	2/2 2/3 2/4	6,85 10,19 6,86	7,97	1,93
2	5	3/1 3/2 3/4	59,56 35,39 119,01	71,32	43,01
3 (kontrola)	0	4/1 4/2 4/3 4/4	<0,80 <0,80 <0,80 <0,80	<0,80	-

Tabulka 8: Koncentrace Pb v nadzemní biomase *N. hungarica*.

11 DISKUSE

Cílem této práce bylo ověřit hyperakumulační schopnost různých druhů a ekotypů rodu *Noccaea* a *Arabidopsis* v odlišných půdních a kultivačních podmínkách. V experimentální části se práce zabývala druhy: *Arabidopsis halleri*, *Noccaea caerulescens* ekotyp Ganges, *Noccaea caerulescens* ekotyp Mežica, *Noccaea jankae hungarica*, *Noccaea montana* a *Noccaea rotundifolia*.

Dlouhodobý nádobový a polní pokus se po dobu sedmi let zaměřuje na příjem Cd, Pb a Zn u výše zmíněných druhů. Celkové obsahy Cd, Pb a Zn jsou shrnuty v tabulce 1 a 2.

Příjem Cd a Zn u *N. caerulescens* je předmětem intenzivního studia. Hyperakumulační schopnost byla prokázána několika autory. Brown et al. 1994 zaznamenali koncentraci Cd v *N.caerulescens* okolo 1800 mg.kg⁻¹ suché hmoty, při 5 týdenním růstu v kontaminované půdě (1020 mg.kg⁻¹ Cd). Průměrná koncentrace prezentovaná Bakerem et al. 1994 v populaci *N. caerulescens*, přirozeně se vyskytující na kontaminované půdě, je 164 mg.kg⁻¹. Wenzel et al. 1999 ve své práci prokázali jako hyperakumulátor Cd *N. rotundifolia* s nejvyšším příjmem 108 mg.kg⁻¹. *N.caerulescens* je ve vztahu k fytoremediaci Cd-kontaminovaných půd zkoumán v různých aspektech, například v rozdílu schopnosti akumulovat Cd mezi jednotlivými populacemi a uvnitř nich (Escarré et al. 2000), v hodnocení potenciálu k fytoremediaci (Lombi et al. 2001a), v mechanismu příjmu Cd (Lombi et al. 2001b, Zhao et al. 2001, Yanai et al. 2003), nebo v rozdílech půdních charakteristik (Yanai et al. 2005).

V nádobovém pokusu byla hyperakumulační schopnost prokázána u obou ekotypů *N.caerulescens* (ekotyp Ganges i Mežica) ve všech sezónách pěstování. Nejvyššího příjmu bylo dosaženo ve 4. sezóně: 1935 mg.kg⁻¹ Cd u ekotypu Ganges, translokační koeficient se pohyboval od 7 do 72. Lombi et al. 2002 porovnával ekotyp *N. caerulescens* Ganges s ekotypem Prayon. Ekotyp Ganges se projevil jako lepší hyperakumulátor Cd, ve své biomase měl 4,4-7,2 vyšší koncentraci Cd. I přes nižší výnos biomasy je celkový příjem Cd 2,2-3,7x vyšší než u ekotypu Prayon (Lombi et al. 2002). Dále byl v této studii zkoumán vliv přídavku Fe- u ekotypu Prayon neměl přídavek Fe do půdy prokazatelný účinek v příjmu Cd, oproti ekotypu Ganges, kdy při snížení z 60 μM Fe na 5 μM byl příjem Cd téměř 2x vyšší.

Zajímavé je porovnání výsledků nádobového pokusu s pokusem polním. Obsah Cd u NCG vykazuje ve většině sezón veliký nárůst, koncentrace se pohybují mezi 1042-4380 mg.kg⁻¹, translokační koeficient 3,8-162. Vysoký příjem Cd *N. caerulescens* může být důsledkem, jak naznačuje Nishiyama et al. 2005, že tento druh je schopný rozpouštět nepřístupné Cd v půdě (neextrahovatelné 1M NH₄NO₃) a přijmout 2,9- 3,7x více Cd. Vyšší

příjem Cd v polním pokusu může být způsoben například lepším prokořeněním rostlin než v nádobách. Naopak těmto výsledkům neodpovídá výnos sušiny, který byl větší v nádobovém pokusu- ten mohl být způsoben lepšími podmínkami pěstování, zejména pravidelným zaléváním v letním období, nepřítomností predátorů a vyšší teplotou. Rozdílné výsledky prezentuje studie Hammer and Keller (2003), kde se vyšší schopnost příjmu Zn a Cd u *N. caerulescens* ukázala v nádobovém pokusu. V polním pokusu u NCG bylo dosaženo i vyšších koncentrací Zn, ve dvou sezónách byla potvrzena hyperakumulační schopnost (4. sezóna 10711 mg.kg⁻¹ a 7. 12587 mg.kg⁻¹). Jako hyperakumulátor Zn ekotyp Ganges prokázali Lombi et al. 2002.

U ekotypu Mežica nebyl rozdíl v příjmu Cd v polním pokusu tak výrazný, hyperakumulační schopnost u Zn byla dosažena v 7. sezóně s 12733 mg.kg⁻¹. V nádobovém pokusu nebyla hyperakumulační schopnost Zn prokázána ani u jednoho ekotypu *N. caerulescens* a příjem byl u obou ekotypů srovnatelný. K rozdílným výsledkům došel například Hernández-Alicca et al. 2006 nebo Epelde et al. 2010, který *N. caerulescens* prokázali jako hyperakumulátor Zn, ovšem u ekotypu Lanesota. V práci Epelde et al. 2012 se však u *N. caerulescens* Lanesota hyperakumulace Zn neprokázala (průměrný příjem se pohyboval okolo 469 mg.kg⁻¹ suché hmoty). Dle výše zmíněných studií je u ekotypů *N. caerulescens* vysoká variabilita (Escarré et al. 2000), která může být způsobena tím, kde se populace nachází (kontaminovaná x nekontaminovaná půda) a následným vývojem adaptačních mechanismů (Verbruggen et al. 2013). Transportní systém *N. caerulescens* je schopný kooperovat s více RP najednou. Předpokládá se, že Cd a Zn jsou přijímány transportéry pro esenciální prvky s nízkou specifikací (Lombi et al. 2002). Basic et al. 2005 naznačuje, že vysoký příjem Cd souvisí i s vyšším příjmem Zn, Fe nebo Cu. Rozdíly v příjmu Cd mezi populacemi naznačuje vysokou afinitu transportéru pro Cd pro jednotlivé populace (Lombi et al. 2002).

V krátkodobém pokusu s přidavkem olova byly zkoumány druhy *N. montana*, *N. rotundifolia* a *N. jankae hungarica*. I přesto, že celkový obsah Cd a Zn v použité půdě byl velice nízký (Cd 0,07 mg.kg⁻¹; Zn 18,95 mg.kg⁻¹) dle průměrných TK se dá usuzovat na vysokou schopnost příjmu Cd a Zn těchto druhů. Pro kadmium jsou hodnoty TK u druhů v rozmezí 6,49-17,63. Pro Zn činí hodnoty TK od 5,66-31, podrobnější informace viz tabulka č. 4 a 6.

Předmětem intenzivního studia v hyperakumulaci Cd-Zn je také *Arabidopsis halleri*, který se objevuje ve více jak 80 studiích (Pollard et al. 2013). V našem nádobovém pokusu se projevil jako hyperakumulátor Cd pouze v 1. a 2. sezóně pěstování, oproti tomu v polním

pokusu, kde se vyskytuje přirozeně, koncentrace Cd splňovaly hyperakumulační limity ve všech sezónách v rozmezích od 106-281 mg.kg⁻¹. V případě Zn byl AH v nádobovém pokusu úspěšný pouze v 1. sezóně - 17281 mg.kg⁻¹. Dle Kashema et al. (2010) roste koncentrace Zn v AH lineárně s koncentrací Zn v půdě, je tedy možné, že v polním pokusu měl AH více přístupného Cd než v nádobách a proto byly v polním pokusu obsahy vyšší: v 1. sezóně 12973 mg.kg⁻¹, v 2. 13183 mg.kg⁻¹ a 3. sezóně 26543 mg.kg⁻¹, která představuje vyšší příjem, než bylo maximum prezentované Kashemem et al. 2010, kde AH ekotyp gemmifera dosáhl maximálního příjmu 26 400 mg.kg⁻¹ Zn s obsahem 1000 μM Zn v hydroponickém roztoku. Při dalším zvyšování koncentrace Zn v roztoku se zvyšoval příjem kořeny, nikoliv však v nadzemní biomase, lineární stoupání se tedy zvyšovalo od 0,2 μM do 1000 μM Zn, v této koncentraci dosáhlo svého maxima. Translokační koeficient byl nejvyšší při 100 μM Zn v roztoku (90). Kubota and Takenaka (2003) naměřili 20000 mg.kg⁻¹ Zn v listech *A. halleri* ekotyp gemmifera rostoucí na Cd-Zn kontaminované půdě v Japonsku. Fytoextrakční kapacita u AH v našem pokusu byla vyšší než u NCG a NCM. Rostliny AH s vysokými koncentracemi Zn v nadzemní biomase neprojevovaly známky fyto toxicity. Výsledky našich pokusů a v minulosti prezentovaná data podporují *A. halleri* jako použitelnou rostlinu pro fytoextrakci.

Příjem olova rostlinami z půdy je komplikovaný, vzhledem k jeho malé dostupnosti rostlinám (Walker et al. 2003). V literatuře se však objevuje, že například *N. rotundifolia* je Pb hyperakumulátor. Domnívám se, že ve většině studiích, se citují stále stejné výsledky publikované Reevesem a Brooksem (1983) s příjmem Pb 8200 mg.kg⁻¹. Ve své práci jsem se snažila shromáždit data o příjmu olova rodem *Noccaea* (Tabulka 9), kde jsou výsledky konkrétních experimentů. Tabulka dokládá rozporuplnost dosavadních výsledků.

V dlouhodobém nádobovém pokusu se příjem pohyboval u všech druhů od 0,37-127,4 mg.kg⁻¹ Pb v nadzemní biomase. Vyšších hodnot nebylo docíleno ani v polním pokusu (25,8-127,4 mg.kg⁻¹ Pb), při celkové koncentraci v půdě 2667 mg.kg⁻¹. V rámci dlouhodobého nádobového a polního pokusu byly zkoušeny i druhy *N. montana* a *N. rotundifolia*, který je často zmiňován jako hyperakumulátor Pb (Tabulka 9). Wenzel et Jockwe (1998) uvádějí příjem *N. rotundifolia* až 1934 mg.kg⁻¹ v nadzemní biomase. Fellet et al. (2012) publikoval výsledky u stejného druhu mezi 29,2-2817 mg.kg⁻¹ Pb. O rok později uvádí příjem u *N. rotundifolia* několikrát vyšší- až 5872 mg.kg⁻¹ v nadzemní biomase.

V polním pokusu v 1. a 4. sezóně byl průměrný příjem Pb 54,2 a 23,8 mg.kg⁻¹. V nádobovém pokusu byly v sezónách 1, 2, 3 a 4 příjmy vyšší, ale nepřekročily hranici 100 mg.kg⁻¹ Pb. Výnosy biomasy nejsou přímo úměrné příjmu Pb.

N. montana, který byl pěstován v sezónách 1, 3, 4 a 6 v nádobovém pokusu vykazoval přibližně stejný příjem Pb jako *N. rotundifolia*, s maximem 83,9 mg.kg⁻¹. Tento druh nebyl předmětem studia v minulých letech, v našich pokusech jsme potvrdily stejný příjem jako *N. rotundifolia*, ale vyšší výnos biomasy.

V krátkodobém nádobovém pokusu s přidavkem olova (celková koncentrace Pb v půdě 2011 mg.kg⁻¹) byla použita písčité půda, aby se zabránilo navázání Pb na organickou hmotu. Dle rozboru půdy 60% z celkového množství Pb bylo mobilní. Ani za těchto podmínek nebyla hyperakumulační schopnost žádného ze zkoumaných druhů prokázána. Průměrné hodnoty byly velice nízké: *N. rotundifolia* 43,77 mg.kg⁻¹, *N. montana* 23,47 mg.kg⁻¹, *N. jankae hungarica* 31,30 mg.kg⁻¹ a *N. jankae hungarica* (varianta 10 a 11) pěstované přímo v písčité půdě vykazují pouze nepatrný nárůst na 44,80 mg.kg⁻¹ Pb. Translokační koeficienty se pohybovaly v rozmezí 0,01- 0,02.

V hydroponickém pokusu byly použity rostliny *N. hungarica*, které vykazují nejvyšší výnos biomasy. Pěstovány byly ve 3 variantách 1) 1μM Pb, 2) 5 μM Pb a 3) kontrola. Analýza rizikových prvků byla provedena pro kořeny a nadzemní biomasu zvlášť. Dle výsledků (Tabulka č. 7) je zřejmé, že koncentrace v kořenech se zvyšuje s koncentrací v roztoku. U varianty 1 se hodnoty pohybovaly od 122-226 mg.kg⁻¹ Pb, ve variantě 2 od 1085-2095 mg.kg⁻¹ Pb. V nadzemní biomase koncentrace Pb dosahuje velice nízkých hodnot (Tabulka č. 8): varianta 1) 6,9-10,2 mg.kg⁻¹, varianta 2) 35,4-119 mg.kg⁻¹ Pb. Translokace z kořenové části do nadzemní biomasy není účinná, v obou variantách je translokační koeficient 0,04.

Vysoký příjem kořeny byl zaznamenán v hydroponickém pěstování *N. rotundifolia* 28 700 mg.kg⁻¹ Pb (Huang et Cunningham 1996), u *N. caerulescens* 26 200 mg.kg⁻¹ Pb. Při pěstování v půdě byly ve stejné studii zaznamenány obsahy nižší: *N. rotundifolia* 6350 mg.kg⁻¹ a *N. caerulescens* 5010 mg.kg⁻¹, způsobeno nejspíše navázáním Pb na organickou hmotu. Vysoké příjmy kořeny zaznamenali také Walker et Bernal (2002) u *N. caerulescens* v hydroponickém pěstování (12 013-65 631 mg.kg⁻¹ Pb) ale opět se ukázalo, že rostlina netransportovala Pb do nadzemní biomasy (3,5-112 mg.kg⁻¹ Pb).

U žádného druhu ani u jednoho způsobu pěstování nebyla prokázána hyperakumulační schopnost u rodu *Noccaea* a *Arabidopsis* v případě olova. Prokázalo se, že příjem Pb roste v závislosti na koncentraci Pb v půdě nebo v roztoku, přičemž v hydroponickém pěstování bylo dosaženo v našich, i dřívěji publikovaných pracích, lepších výsledků, z důvodu snížení navázání Pb na organickou hmotu. Nemůžeme tedy druh *N. rotundifolia*, *N. montana*, *N. jankae hungarica* doporučit jako druhy vhodné pro fytoextrakci Pb i v kontextu s tím, že

jejich hlavní nevýhodou je malý výnos biomasy. Jejich použití by však mohlo vést k částečné stabilizaci Pb v půdě.

Fytoremediace zmiňovaných rizikových prvků může být úspěšná pouze v půdách málo a středně kontaminovaných. Většina druhů v extrémně kontaminovaných půdách nepřežije. Extrémně kontaminované půdy jsou v pokusech používány k demonstraci maximálních limitů hyperakumulace u zkoumaných druhů. Intenzivní příjem rizikových prvků rodem *Noccaea* a *Arabidopsis* snižují jejich zastoupení v půdě. U kadmia a zinku byla prokázána vysoká schopnost translokace RP z kořenů do nadzemní biomasy, tudíž se dá uplatnit efektivní fytoextrakce. V případě olova se prokázalo, že příjem Pb roste v závislosti na koncentraci Pb v půdě nebo v roztoku, přičemž v hydroponickém pěstování bylo dosaženo v našich, i v dříve publikovaných pracích, lepších výsledků, z důvodu snížení vázání Pb na organickou hmotu. V hydroponickém pokusu byl prokázán vysoký příjem kořeny u *N. hungarica* což by případně mohlo vést k částečné stabilizaci Pb v půdě. Jelikož se ale neprokázal efektivní přesun tohoto prvku do nadzemních částí rostlin, fytoextrakce nelze efektivně uplatnit. Nemůžeme tedy druh *N. caerulea* Ganges, *N. caerulea* Mežica, *N. jankae hungarica*, *N. rotundifolia* a *N. montana* doporučit jako druhy vhodné pro fytoextrakci Pb, jejich další nevýhodou je také malý výnos biomasy.

Tabulka 9: Přehled článků zabývajících se příjmem Pb.

článek	druh	koncentrace Pb (mg/kg)	část rostliny	poznámka
1 Ernst, 1982	<i>N. caeruleus</i>	8,21 mmol/kg	nadzemní biomasa	
2 Reeves et Brooks, 1983	<i>Thlaspi alpestre</i> <i>N. rotundifolia</i>	2740 8200	nadzemní biomasa	neuvádí koncentraci Pb v půdě
3 Huang et Cunningham, 1996	<i>N. rotundifolia</i> <i>N. caeruleus</i> <i>N. rotundifolia</i> <i>N. caeruleus</i>	28700 26200 6350 5010	kořeny kořeny kořeny kořeny	hydroponie hydroponie půda půda
4 Wenzel et Jockwer, 1998	<i>N. rotundifolia</i> <i>N. rotundifolia</i> (ssp. <i>cepaefolium</i>)	1934 do 1934	kořeny nadzemní biomasa	půda, celková koncentrace 4000 mg/kg Pb
5 Walker et Bernal, 2003	<i>N. caeruleus</i> <i>N. caeruleus</i> <i>N. caeruleus</i> <i>N. caeruleus</i> <i>N. caeruleus</i>	12 013 65631 111-142 1.12 3.5	kořeny kořeny kořeny nadzemní biomasa nadzemní biomasa	hydroponie, v roztoku 0,52 mg/l Pb hydroponie, v roztoku 2,1 mg/l Pb koncentrace Pb v půdě vyluhovatelíné vodou byla 0,99 mg/l hydroponie, v roztoku 2,1 mg/l Pb hydroponie, v roztoku 0,52 mg/l Pb
6 Assunção, 2003	<i>N. caeruleus</i>	686 52-1890	nadzemní biomasa koncentrace v půdě byla 10610-28390 mg/kg	koncentrace Pb v půdě byla 8998 mg/kg
7 Martínez et al. 2005	<i>N. caeruleus</i> (ekotyp Ganges)	< 5 < 20	celá rostlina celá rostlina	koncentrace v půdě 1578 mg/kg
8 Epeide et al. 2008	<i>N. caeruleus</i>	76,6 479	nadzemní biomasa kořeny	celková koncentrace v půdě 591 mg/kg Pb, přístupné 47,1 mg/kg Pb
9 Likar et al. 2009	<i>N. praecox</i>	> 4000 < 2000	nadzemní biomasa nadzemní biomasa	Lokalita Žerjav (Slovensko), koncentrace v půdě 9078 mg/kg, TF=1,9, AF=0,51 lokalita Mežica (Slovensko), koncentrace v půdě 888 mg/kg
10 Fuksová et al. 2010	<i>N. caeruleus</i> <i>N. caeruleus</i>	57,6 18,3	nadzemní biomasa nadzemní biomasa	středně kontaminovaná půda (kambizol), celková koncentrace 956 mg.kg Pb silně kontaminovaná (fluvizol), celk. konc. 4626 mg.kg Pb
11 Břendová, 2011	<i>N. rotundifolium</i>	82,27	nadzemní biomasa	nádobový pokus, obsah Pb v půdě 2667 mg/kg, AF=0,03
12 Fellet et al. 2012	<i>N. rotundifolia</i> (ssp. <i>cepaefolium</i>)	282-14435 29,2-2817	kořeny nadzemní biomasa	koncentrace v půdě 2255-59950 mg/kg TF i AF<1
13 Fellet et al. 2013	<i>N. rotundifolia</i> <i>subs. cepaefolium</i>	5872 8977	nadzemní biomasa kořeny	celková koncentrace v půdě 9682 mg/kg, extrahovatelné Pb DTPA 62,5 mg/kg
14 Martínez-Alcalá et al. 2013	<i>N. caeruleus</i>	12 12	nadzemní biomasa kořeny	kyselá půda, v neutrální je koncentrace nižší kyselá půda, v neutrální je koncentrace nižší

koncentrace (mg/kg)	hladiny RP
≥1000	hyperakumulativní
100	vysoký
5	normální
0,01-0,1	nizký
	kořeny

12 ZÁVĚR

Hyperakumulační schopnost rostlin rizikových prvků (Cd, Pb a Zn) je významnou schopností rostlin, kterých bylo doposavad nalezeno zhruba 400 druhů. Tato schopnost se zkoumá v kontextu s případnou možností fytoextrakce, fytoimediační technologie, která je založená na příjmu rizikových prvků rostlinami a přesunutím do jejich nadzemní biomasy. Na konci vegetačního období se biomasa sklídí a spolu s ní odstraní rizikové prvky. Významnou skupinu hyperakumulátorů tvoří rod *Noccaea* a *Arabidopsis*.

Byly provedeny tři modelové experimenty. První dlouhodobý nádobový a polní experiment s druhy *N. caerulescens* (ekotyp ganges a Mežica) a *A. halleri*. Tento pokus je unikátní délkou trvání, jsou zde prezentovány výsledky ze všech 7 sezón. Druhý pokus je krátkodobého charakteru a zaměřuje se na příjem Pb druhy *N. jankae hungarica*, *N. montana* a *N. rotundifolia* v odlišných půdních podmínkách. Třetí hydroponický pokus se zaměřuje na ověření hyperakumulační schopnosti Pb rodu *Noccaea* druhem *N. hungarica* v živném roztoku s koncentrací Pb 1 μM a 5 μM .

V polním a nádobovém pokusu byl *N. caerulescens* prokázán jako hyperakumulátor Cd. Vyšších příjmů Cd dosahoval ekotyp Ganges. U obou ekotypů byla v polním pokusu ve dvou sezónách potvrzena i hyperakumulace Zn. *A. halleri* vykazuje hyperakumulační schopnosti v případě Zn, v polním pokusu i Cd.

V krátkodobém pokusu s přídatkem Pb nebyla vzhledem k nízkým koncentracím Cd a Zn v půdě potvrzena hyperakumulace těchto prvků u *N. jankae hungarica*, *N. montana* a *N. rotundifolia*, nicméně translokační koeficienty dosahují vysokých hodnot, což může naznačovat případnou hyperakumulaci.

U žádného ze zkoumaného druhu nebyla ani v jednom provedeném pokusu prokázána hyperakumulační schopnost Pb.

13 SEZNAM LITERATURY

- Adriano, D. C. (2001). Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. Second edition, Springer-Verlag, New York, 867.
- Abouadar, W., Schwartz, Ch., Morel, J. L., Boularbah, A. J. (2013). Effect of nickel-resistant rhizosphere bacteria on the uptake of nickel by the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* under controlled conditions. *J Soils Sediments* 13, 501-507.
- Alanne, A. L., Peräniemi, S., Turhanen, P., Tuomainen, M., Vepsäläinen, J., Tervahauta, A. (2014). A bisphosphonate increasing the shoot biomass of the metal hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Chemosphere* 95, 566–571.
- Alford, É. R., Pilon-Smith, E. A. H., Paschke M. V. (2010). Metallophytes- a view from the rhizosphere. *Plant Soil* 337, 35-50.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881.
- Assunção, A G. L., Schat, H., Aarts, M. G. M. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 159, 351–360.
- Assunção, A. G. L., Bookum, W. M., Nelissen, H. J. M., Vooijs, R., Schat, H., Ernst, W. H. O. (2003). Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytol* 159, 411-419.
- Alloway, B. J. (1990). Heavy Metals in Soils. Blackie and Son Ltd., Glasgow and London, 339.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Sidoli, C. M. D., Reeves, R. D. (1994). The possibility of in situ heavy metal decontamination of soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour Conserv Recyc* 11, 41–49.
- 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.
- Basic, N., Kelle C., Fontanillas, P., Vittoz, P., Besnard, G., Galland, N. (2005). Cadmium hyperaccumulation and reproductive traits in natural *Thlaspi caerulescens* populations. *Plant Biology* 8, 64-72.
- Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J. (1984). Toxické kovy v pracovním a životním prostředí. Avicenum, Praha.
- Brown, S. L., Chaney, R. L., Angle, J. S., Baker, A. J. M. (1994). Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 23, 1151±1157.

- Břendová, K. (2011). Využití rostlin s vysokou akumulací schopností k čištění kontaminovaných půd. Praha. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- Callahan, D. L., Baker, A. J. M., Kolev, S. D., Weed, A. K. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 2-12.
- Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D., Schroeder, J. I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthetases from plants and yeast. *Embo J.* 18, 3325-3333.
- Cobbet, C. S. (2000). Phytochelatase biosynthesis and function in heavy metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* 3, 211-216.
- Cosio, C., DeSantis L., Frey B., Diallo S., Keller C. (2004). Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *J. Exper. Bot.* 56, 412, 765-775
- Cosio, C. (2004). Phytoextraction of heavy metal by hyperaccumulating and non hyperaccumulating plants: comparison of cadmium uptake and storage mechanisms in the plants. PhD thesis, ENAC, EPFL, Switzerland, No. 2937.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review, *Environ pollut* 98, 29-36.
- Denton, B. (2007). Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *Basic Biotechnol.* 3, 1-5.
- Ebbs, S. D., Lau, I., Ahner, B. A., Kochian, L. V. (2002). Phytochelatase synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 214, 635-640.
- Ernst, W. H. O., Verkleji, J. A. C., Schat, H. (1992). Metal tolerance in plants. *Acta Bot Neerl* 41, 229-248.
- Epelde, L., Becerril, J. M., Blanco, F., Kowalchuk, G. A., Garbisu, C. (2012). Links between pseudometallophytes and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Pedobiol* 55 219-225.
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Frérot, H., Mahieu, S., Noret, N. (2013). Metal concentration and metal mass of metallicolous, non metallicolous and serpentine *Noccaea caerulescens* populations, cultivated in different growth media. *Plant Soil* 370, 197-221.
- Fellet, G., Pošćić, F., Casolo, V., Marchiol, L. (2012). Metallophytes and thallium hyperaccumulation at the former Raibl lead/zinc mining site (Julian Alps, Italy). *Plant Biosystems* 146, 1023-1036.
- Fuksová, Z., Száková, J., Tlustoš, P. (2009). Effects of co-cropping on bioaccumulation of trace elements in *Thlaspi caerulescens* and *Salix dasyclados*. *Plant, Soil Environ.* 55, 461 - 467.

- Fodor, A., Szabo-Nagy, A., Erdei, L. (1995). The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J Plant Physiol* 14, 787-792.
- Fuksová, Z., Száková J., Balík J., Tlustoš P. (2010). Growth and metal uptake in mono- and dual culture in metal-contaminated soils. *Soil Sedim. Contam.* 19, 188-203.
- Havel, M., Gažáková, L. (2010). Olovo. Dostupné z www.arnika.org.
- Hernandez, L. E., Carpena-Ruiz, R., Garate, A. (1996). Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr* 19, 1581-1598.
- Huang, J. W., Cunningham, S. D. (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytot.* 134, 75-84.
- Jaffre, T., Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D. (1976). *Sebertia acuminata*: a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Sci* 193, 579-580.
- Kashem, M. A., Singh, B. R., Kubota, H., Sugawara, R., Kitajima, N., Kondo, T., Kawai, S. (2010). Zinc tolerance and uptake by *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* grown in nutrient solution. *Environ Sci Pollut Res* 17, 1174–1176.
- Keller C., Hammer D. (2004) Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils. *Environ. Pollut.* 131, 243-254.
- Kizek, R., Trnková, L., Paleček, E. (2001). Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Analyt Chem* 73, 4801-4807.
- Kłos, A., Czora, M. M., Rajfur, M., Waclawek, M. (2012). Mechanisms for translocation of heavy metals from soil to epigeal mosses. *Water Air Soil Pollut. Res.* 17, 288-296.
- Kubota, H., Takenaka, C. (2003). *Arabidopsis gemmifera* is a hyperaccumulator of Cd and Zn. *Int J Phytoremediat* 5, 197-201.
- Lasat, M. M., Pence, N. S., Garvin, D. F., Ebbs, S. D., Kochian, L. V. (2000). Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Expt Botany* 51, 71-79.
- Lee, J., bae, H., Jeong, J., Lee, J., Yang, Y., Hwang, I., Martionia, E., Lee, Y. (1998). Functional expression of bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. *Plant Physiol* 133, 589-596.
- Li, J. T., liao, B., Lan, C. Y., Ye, Z. H., Baker, A. J. M., Shu, W. S. (2010). Cadmium tolerance and accumulation in cultivars of a high.biomass tropical tree (*Averrhoa carambola*) and its potential for phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 39, 1262-1268.
- Liu, Y. G., Ye, F., Zeng, G. M., Fan, T., Meng, L., Yuan, H. S. (2008). Effects of added Cd on Cd uptake by oilseed rape and pai-tsai co-cropping. *Transact. Nonferr. Met. Soc. China* 17, 846-852.

- Lombi, E., Zhao, F. J., Dunham, S. J., McGrath, S. P. (2000). Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol.* 145, 11-20.
- Lombi, E., Zhao, F. J., Dunham, S. J., McGrath, S. P. (2001a). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural Hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.*, 30, 1919-1926.
- Lombi, E., Zhao, F. J., McGrath, S. P., Young, S. D., Sacchi, G. A. (2001b). Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.*, 149, 53-60.
- Lombi, E., Zhao, F. J., McGrath, S. P., Young, S. D., and Sacchi, G. A. (2011). Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.* 149, 53–60.
- Lovy, L., Latt, D., Sterckeman, T. (2013). Cadmium uptake and partitioning in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* exposed to constant Cd concentrations throughout complete growth cycles. *Plant Soil* 362, 345–354.
- Mader, P., Szakova, J., Miholova, D. (1998). Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analisis*, 26 (3), 121-129.
- Marschner, H. (1986). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, p 674
- Martínez, M., Bernal, P., Almela, C., Valez, D., Garcia-Augustin, P., Navarro-avino, J. (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere* 64, 478-485.
- McGrath, S. P., Lombi, E., Gray C. W., Caille N., Dunham S. J., Zhao F. J. (2006). Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ. Pollut.* 141, 115-125.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8, 199-216.
- Nishiyama Y., Yanai J., Kosaki T. (2005). Potential of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoremediation: comparison of two representative soil types in Japan under different planting frequencies. *Soil Sci. Plant Nutr*, 51, 827 -834.
- Papoyan, A., Kochian, L. V. (2004). Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiology*, Vol. 136, 3814-3823.
- Pollard, A. J., Reeves R. D., Baker A. J. M. (2013). Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* 217– 218, 8– 17.

- Pongrac, P., Zhao F. J., Razinge, J., Zrimec, A., Regvar, M. (2009). Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environ. Exper. Bot.* 66, 479-486.
- Prasad, M. N. V. and Freitas H. M. O. (2003). Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Journal of Biotechnology*, Vol. 6 No. 3, 282-321.
- Prasad, M. N. V. (2003). Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. *Russ. J. Plant Physiol.* 50, 686-700.
- Reeves, R. D., Brooks, R. R. (1983). European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *Journal of Geochemici Exploration* 18, 275-283.
- Reeves, R. D., Brooks, R. (1983). Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from a mining area in Central Europe. *Environ. Pollut.* 31, 277-287.
- Richter, R. (2004). Těžké kovy v půdě. Dostupné z www.web2.mendelu.cz
- Robinson, B. H., Leblanc, M., Petit, D., Brooks, R. R., Kirkman, J. H., Gregg, P. E. H. (2003). Metal ions in biological systems. *Plant Soil* 249, 27
- Roosens, N., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximénez-Embun, P., Smith, J. A. C. (2003). Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant, Cell Environ.* 26, 1657-1672.
- Schat, H., Ilugany, M., Voojjs, R., Harley-Whitaker, J., Bleeker, P. M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* 53, 2381-2392.
- Seth, C. S. (2012). A review on mechanisms of plant tolerance and role of transgenic plants in environmental clean-up. *Bot. Rev.* 78, 32-62.
- Shah, K., Nongkynrih, J. M. (2007). Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51, 618-634.
- Shaw, B. P., Sahu, S. K., Mishra, R. K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In *Heavy Metal Stress in Plants* (Prasad, M. N. V., ed.), Berlin, Heidelberg: Springer, 84-126.
- Sheoran, V., Sheoran, A., Poonia, P. (2011). Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 168-214.
- Siedlecka, A., Krupa, Z. (1999). Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 34, 833-841.

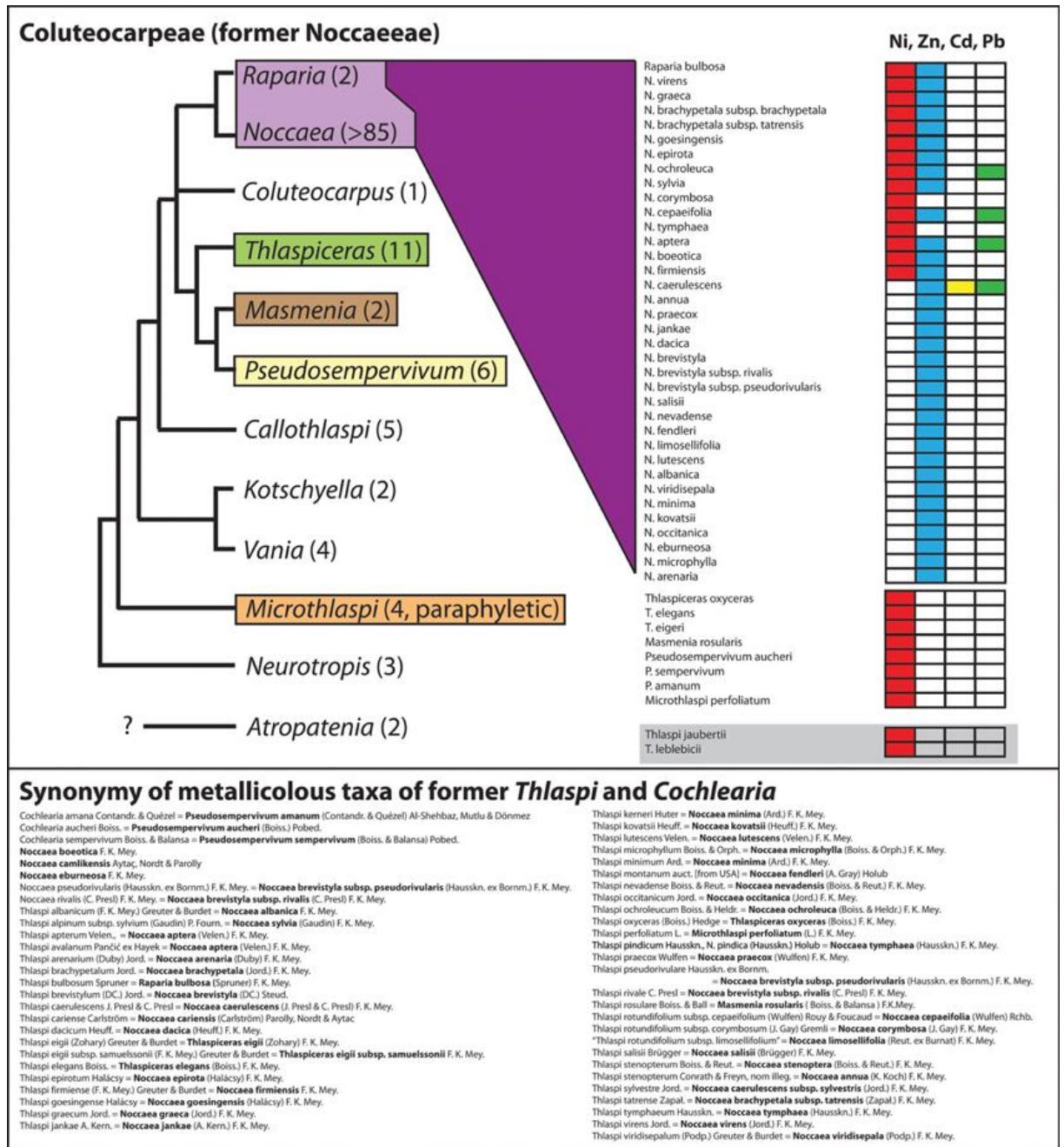
- Taylor S. I., Macnair M. R. (2005). Within and between population variation for zinc and nickel accumulation in two species of *Thlaspi* (Brassicaceae). *New Phytologist* 169, 505-514.
- Thangavel, K., Subbhurmaan T. (2004). Plant response to abiotic stresses. *J Exp. Bot.* 53, 1351-1365.
- Tlustoš, P., Száková, J., Hrubý, J., Hartman, I., Najmanová, J., Nedělník, J., Pavlíková, D., Batata, M. (2006). Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant Soil Environ.* 52, 413-123.
- Valterová, B., Száková, J., Koplík, R., havlík, J., Tlustoš, P., Mestek, O. F. (2012). Frakcionace a speciace As, Cd a Zn v nadzemní biomase penízku modravého (*Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl). *Chem. Listy* 106, 392-397
- Verbruggen, N., Juraniec, M., Baliardini, C., Meyer, C. L. (2013). Tolerance to cadmium in plants: the special case of hyperaccumulators. *Biometals* 26. 633-638.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Lelie, D., Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (7), 765-794.
- Wang, A. S., Angle, J. S., Chaney, R. L., Delorme, T. A., Reeves, R. D. (2006). Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 281, 325-337.
- Walker, D. J., Bernal, M. P. (2004). The effects of copper and lead on growth and zinc accumulation of *Thlaspi caerulescens* J. and C. Presl: implications for phytoremediation of contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 151, 136-372.
- Wenzel, W. W., Jockwer, F. (1999). Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environ. Pollut.* 104, 145-155.
- Xie, H. L., Jiang, R. F., Zhang, F. S., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2009). Effect of nitrogen form on the rhizosphere dynamics and uptake of cadmium and zinc by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 318, 205-215.
- Yanai, J., Zhao, F. J., McGrath, S. P., Kosaki, T. (2003). Effects of spatial heterogeneity of soil Cd on the growth, root distribution and Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. In abstract of 7th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Volume 2, Upsala, Sweden, 154-155.
- Yanai, J., Zhao, F. J., McGrath, S. P., Kosaki, T. (2005). Effects of soil characteristic on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Pollution* (in press).
- Zemanová, V., Pavlík M., Pavlíková D., Tlustoš P. (2013). The changes of contents of selected free amino acids associated with cadmium stress in *Noccaea caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil Environ.* 59, 417-422.

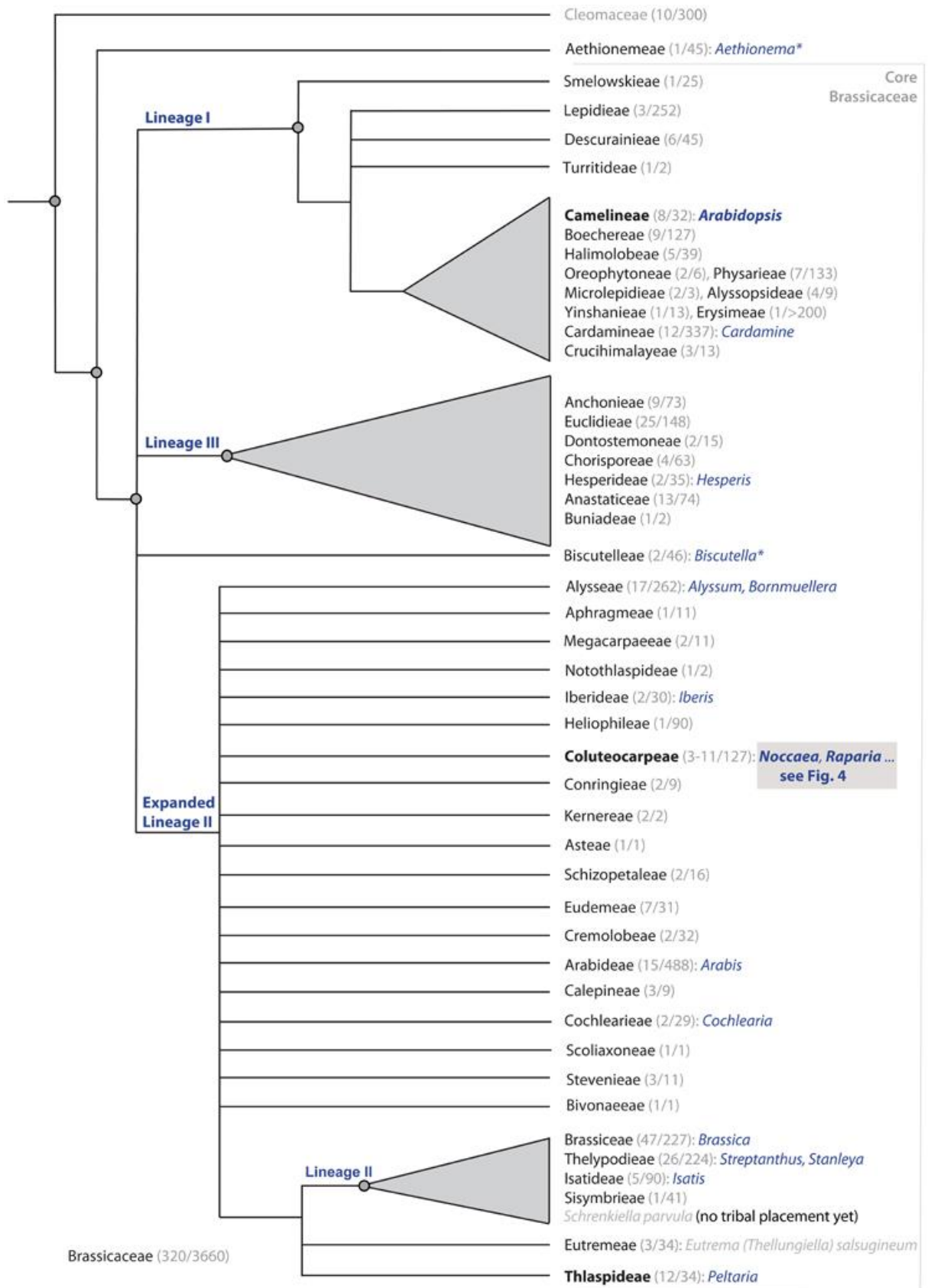
Zhang, H., Davison W., Knight B., McGrath S. (1998). In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT. *Environ. Sci. Technol.* 32, 704-710.

Zhao, F. J., Lombi, E., McGrath S. P. (2003). Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249, 37–43.

14 PŘÍLOHY

14.1 Vývoj názvosloví *Thlaspi* a *Noccaea*





14.2 Přehled studovaných druhů

14.2.1 *Noccaea caerulescens* J.&C. Presl (Penízek modravý)

Noccaea caerulescens je jednoletá až dvouletá bylina s modravě zelenou lodyhou, vyrůstající z přízemní růžice listů. Lodyha dorůstá výšky až 30 cm. Zaujímá areál západní a střední Evropy. U nás se objevuje především v horských oblastech a říčních údolích. Často se vyskytuje na místech s vysokým obsahem zinku v půdě (Valterová et al. 2011). Je považován za hyperakumulátor Cd, Ni a Zn (Robinson et al. 1998).

Ekotyp Ganges tvoří populace pocházející z Jižní Francie, z blízkosti oblasti Ganges. Tento ekotyp má nadměrnou hyperakumulační schopnost Cd.

Ekotyp Mežica pochází ze Slovenska.



Obrázek 6: *N. caerulescens* ekotyp Ganges.



Obrázek 7: *N. caerulescens* ekotyp Ganges, květ.



Obrázek 8: *N. caerulescens* ekotyp Ganges, tobolek.



Obrázek 9: *N. caerulescens* ekotyp Mežica.



Obrázek 10: *N. caerulescens* ekotyp Mežica, květ.

14.2.2 *Noccaea jankae hungarica* (Penízek slovenský maďarský)

Zkoumaný druh uvedený pod jménem *Noccaea jankae hungarica* pochází z Maďarska, u nás je tento druh známý jako *N. hungarica* (Penízek maďarský), v Maďarsku používají *N. jankae* (u nás Penízek slovenský), proto pro tuto práci bylo zvoleno toto pojmenování. *N. jankae* je diploidní ($2n=14$), zatímco *N. hungarica* je tetraploid ($2n=28$).

Na Slovensku se *N. jankae* vyskytuje na dvou lokalitách- Zoborské vrchy a Slovenský Kras. Roste na xenotermních stráních, v pahorkatinách, doubravách a křovinách. Jedná se o jednoletou až dvouletou bylinu.



Obrázek 11: *N. jankae* (převzato z www.nahuby.sk).



Obrázek 12: *N. hungarica*.

14.2.3 *Noccaea montana* (Penízek horský)

Jednoletá bylina výšky do 10 cm (s květem do 20 cm). Roste na skalnatých stráních. Obvykle se objevuje v nezapojených porostech na mělkých sklaních půdách na bazických horninách (vápence, hadce, opuka apod.) V České republice se vyskytuje vzácně, protože naši územím probíhá severovýchodní hranice rozšíření druhu. Penízek horský je zařazen mezi ohrožené druhy naší květeny.



Obrázek 13: *N. montana*.

14.2.4 *Noccaea rotundifolia* (Penízek okrouhloolistý)

Tento druh je endemit Alp. Vyskytuje se zde v několika oddělených poddruzích. Roste na skalnatých svazích a především na kamenitých sutích, na vápenci, v pásmu od subalpínského do alpínského stupně (až do 3000 m n. m.). Je to tzv. „sněhový běžec“ - v zimním období jej žene vítr po povrchu sněhové pokrývky a tak roznáší jeho semena. *N. rotundifolia* je vytrvalá trsnatá bylina s dlouhými, v suti propletenými kořenujícími výběžky. Listy jsou okrouhlé, celokrajné, uspořádané v přízemní růžici.



Obrázek 14: *N. rotundifolia*.

14.2.5 *Arabidopsis halleri* (Huseníček Hallerův)

Jednoletá bylina s nafialovělou lodyhou s listy v přízemní růžici. Nachází se většinou na lehkých až písčitéch půdách. Jedná se o plevelnou rostlinu, kterou lze najít podél cest a u tratí. Vyskytuje se na půdách bohatých na zinek (Zhao et al. 2000).



Obrázek 15: *A. halleri*.



Obrázek 16: *A. halleri*, květ.