

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Rostlinná buňka a těžké kovy: způsoby příjmu,
detoxifikace a vliv na buněčné struktury

Bakalářská práce

Autor: Dominika Bačíková

Studijní program: P-BSB

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Tůma CSc.

Odborný konzultant: Mgr. Martina Benáková

Hradec Králové

leden 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala za pomoc při vypracování bakalářské práce, za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Jiřímu Tůmovi CSc. a konzultantce práce Mrg. Martině Benákové.

Anotace

Bačíková D. (2016): Rostlinná buňka a těžké kovy: způsoby příjmu, detoxifikace a vliv na buněčné struktury, Hradec Králové. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Jiří Tůma: 44

Cílem bakalářské práce je zpracovat ucelený literární přehled o vlivu těžkých kovů na rostlinnou buňku, možnostmi obrany rostlinné buňky vůči jejich příjmu, mechanismy detoxifikace a tolerance. Práce je zaměřena na problematiku výskytu, příjmu a toxicity esenciálních těžkých kovů – železa, zinku, manganu, mědi, niklu, molybdenu a kobaltu, a toxických kovů – chromu, kadmia, rtuti a olova. Ionty těžkých kovů jsou zachyceny kořeny, následně do nich vstupují a jsou translokovány do nadzemních částí rostlin. Příjem iontů probíhá mobilizací kovů vázaných na půdní částice. Po příjmu těžkých kovů pomocí membránových transportérů jsou ionty vázány na chelátory a chaperony, kterými jsou organické kyseliny, aminokyseliny, peptidy – fytochelatiny a metalothioneiny a „Heat shock“ proteiny. Těžké kovy poškozují buňky navázáním se na funkčně důležité biomolekuly, které tím deaktivují. Chelátory se tomu snaží zabránit. Detoxifikační procesy zahrnují vyloučení těžkého kovu z intracelulárního prostředí nebo sekvestraci. Těžké kovy stimulují tvorbu volných radikálů a reaktivních forem kyslíku. Současně se aktivují antioxidační obranné mechanismy, jež jsou schopny bránit jejich reakci s významnými biomolekulami. Při zvýšeném množství reaktivních forem kyslíku v buňce, které antioxidační mechanismy nezvládají vychytávat, dochází k oxidačnímu stresu majícímu destruktivní účinky. Mezi ně patří změna fluidity cytoplazmatické membrány, poškození membránových proteinů a nukleových kyselin, a rozsáhlé změny v plastidech.

Klíčová slova: těžké kovy, rostlinná buňka, membránové transportéry, chelátory, mechanismy detoxifikace, volné radikály, reaktivní formy kyslíku

Annotation

Bačíková D. (2016): Plant Cell and heavy metals: uptake, detoxification and impact on cell structures, Hradec Králové. Bachelor thesis, Science Faculty, University of Hradec Králové. Supervisor of the bachelor thesis Jiří Tůma: 44

The aim of this thesis is to elaborate a comprehensive literature review about the impact of heavy metals on plant cell, the possibilities of defending plant cells from their intake, mechanisms of detoxification and tolerance. This thesis is focused on the occurrence, intake and toxicity of essential heavy metals – iron, zinc, manganese, copper, nickel, molybdenum and cobalt, and toxic metals – chromium, cadmium, mercury and lead. Ions of heavy metals are first absorbed by the roots, subsequently they enter into the roots and move to the above-ground parts of plants. The intake of ions takes place through the mobilization of metals connected to soil particles. The ions – using membrane transporters - are connected to the chelators and chaperons, which are organic acids, amino acids, peptides phytochelatins and metallothioneins, and "Heat shock" proteins. Heavy metals have damaging impact on the plant cell, as they react with functionally important biomolecules and thus causing their malfunctioning. Heavy metals stimulate the formation of free radicals and reactive oxygen forms that unspecifically reacts, usually immediately with the first organic molecule which they come into contact with. They activate the antioxidant defence mechanisms, that are able to prevent the reactions of heavy metals with important biomolecules. In case the cell contains an increased amount of reactive oxygen forms and the antioxidant mechanisms are already unable to eliminate them, the so-called oxidative stress occurs. This oxidative stress causes destructive effects resulting in a change of fluidity of cytoplasmatic membrane, it damages the membrane proteins and nucleic acids.

Keywords: heavy metals, plant cell, membrane transporters, chelators, detoxification mechanisms of detoxification, free radicals, reactive oxygen forms

Obsah

Obsah	6
Úvod	8
1. Těžké kovy, rozšíření, příjem a toxicita u rostlin	9
1.1 Měď a zinek	10
1.2 Železo	11
1.3 Mangan	12
1.4 Nikl	13
1.5 Kadmium a olovo	13
1.6 Chrom	14
1.7 Rtuť	14
1.8 Molybden	15
1.9 Kobalt	15
2. Mechanismus příjmu těžkých kovů	15
2.1 Plasmatická membrána a membránové transportéry	18
2.1.1 Rodina ZIP transportních proteinů	19
2.1.2 Cu transportéry	19
2.1.3 Rodina NRAMP transportních proteinů	19
2.1.4 ATPázy: P _{1B} ATPázy	20
2.1.5 Rodina CDF transportních proteinů	20
2.1.6 Kationt/H ⁺ antiportéry	20
2.1.7 Rodina ABC transportních proteinů	20
2.2 Chelátory a chaperony	20
3. Mechanismy detoxifikace těžkých kovů	21
3.1 Kořenové exudáty	22
3.2 Mikroorganismy	22
3.3 Mykorhiza	22
3.4 Imobilizace	23
3.5 Translokace	23

3.6 Vakuolární sekvestrace	23
3.7 Phytochelatiny	24
3.8 Metalothioneiny	25
3.9 Organické kyseliny	26
3.10 Aminokyseliny	26
3.11 Fosfátové skupiny	26
3.12 „Heat shock“ proteiny	26
4. Vliv těžkých kovů na rostlinnou buňku	27
4.1 Tvorba volných radikálů	27
4.2 Vznik reaktivních forem kyslíku	28
4.3 Fentonova reakce a Haber-Weissův cyklus	28
4.4 Antioxidanty	28
4.5 Glutathion	30
4.6 Askorbát	30
4.6.1 Askorbát-glutathionový cyklus	30
5. Vliv těžkých kovů na strukturu rostlinné buňky	31
5.1 Peroxidace lipidů	31
5.2 Inhibice fotosyntézy	32
Závěr	33
Seznam použitých zdrojů	34

Úvod

Předložená bakalářská práce je věnována problematice vlivu těžkých kovů na rostlinnou buňku formou literární rešerže. Těžké kovy se mohou významně podílet na kontaminaci zemědělských půd a kvůli své vysoké perzistenci se uchovávají v prostředí velmi dlouho. V přirozených podmínkách se nenacházejí ve velkém množství, ale v důsledku antropogenní činnosti se jejich obsah v půdě zvyšuje a to především v povrchové vrstvě humózního horizontu. Vzhledem k jejich přítomnosti v prostředí, mohou postihnout různé orgánové soustavy. Rostliny zpravidla těžké kovy přijímají kořeny z půdy a celým povrchem (zejména listy) z atmosféry. Na buněčné úrovni jsou jejich toxické účinky výsledkem vazby kovů a enzymů. Tvoří se stabilní, ale neaktivní komplex, který inhibuje životně důležité buněčné pochody.

Aby bylo možné zabránit negativním dopadům těžkých kovů na rostlinné buňky je důležitá jak jejich detekce, tak i prevence. Je potřebné porozumět chování těžkých kovů nejen v celém rostlinném organismu, ale také na buněčné úrovni.

1. Těžké kovy, rozšíření, příjem a toxicita u rostlin

Kontaminace životního prostředí těžkými kovy je vznikajícím globálním problémem, který vážně ohrožuje vegetaci, lidské zdraví a ekosystémy (Järup, 2003).

Těžkými kovy rozumíme kovy o hustotě vyšší než 5g/cm^3 . Některé z kovů jsou v menších množstvích potřebné pro rostlinnou výživu, jsou esenciální pro správný chod fotosyntézy, fixaci dusíku a další funkce. Jsou jimi železo (Fe), zinek (Zn), mangan (Mn), měď (Cu), nikl (Ni) a molybden (Mo) a kobalt (Co). Jiné jsou pro rostliny nepotřebné a již při nízkých koncentracích toxické. Jsou jimi chrom (Cr), kadmium (Cd), rtuť (Hg) či olovo (Pb) (White et al., 2012). Toxicita u některých těžkých kovů spočívá v podobnosti s esenciálními kovy, vyplývající z periodické tabulky prvků. Například kadmium je ve skupině se zinkem, arsen je ve skupině s fosforem nebo selen je ve skupině se sírou. Kvůli své podobnosti jsou tyto toxické kovy schopny nahradit esenciální prvky v proteinech, enzimech a aminokyselinách rostlin a znemožňovat jejich funkci (Hall, 2002; Clemens, 2006).

Rozsáhlé používání chemikálií v minulosti vedlo k nahromadění znečišťujících látek v našem prostředí. To vše bylo způsobeno naší lhostejností. Od počátku průmyslové revoluce se jejich koncentrace drasticky zvýšila, což představuje problém pro zdraví a životní prostředí. Četná místa jsou znečištěna směsmi organických, chemických látek a těžkých kovů (Schröder et al., 2003) Těžké kovy jsou unikátní v tom, že nejsou metabolizovány do netoxické formy. Jakmile těžké kovy kontaminují ekosystém, tak se stávají potenciální hrozbou po mnoho let. V současné době rychle se rozvíjející novou technologií pro odstranění toxických těžkých kovů se stala fytofarmacie (Jabeen et al., 2009). Jedná se o efektivní a cenově dostupné technologické řešení pro extrakci nebo odstranění neaktivních kovů a kovových znečišťujících látek z kontaminované půdy a vody. Tato technologie využívající vybraných rostlin je šetrná k životnímu prostředí (Tangahu et al., 2011). Vybrané rostliny akumulují kovy do nadzemních částí, tedy do listů a vytahují je tak z půdy. Využívání metod molekulární genetiky zlepšilo chápání mechanismů příjmu těžkých kovů a jejich tolerance v rostlinách. Začalo se využívat genového inženýrství, aby se u specifických rostlin zvýšila tolerance na těžké kovy, těmto transgenním rostlinám byly vpraveny geny z jiných, nepříbuzných organismů. Dochází tedy k modifikacím důležitých charakteristik jako absorpce, translokace a akumulace kovů. To otevírá nové možnosti fytofarmacií (Jabeen et al., 2009).

Tabulka 1 – **Vliv vybraných těžkých kovů na rostlinná pletiva** (Viehweger, 2004)

Prvek	Vliv na rostlinnou buňku
přebytek nebo nedostatek mědi, přebytek zinku a kadmia	Dopad na fotosyntetický aparát: chlorotické listy, změna poměru mezi chlorofylem A a B, snížení fotosyntetické činnosti
přebytek kadmia a mědi	Vliv na kořenové ultrastruktury: zkrácené kořeny, větší objem buněk v kůře, poškození rostlinné pokožky
přebytek kadmia a olova	Lipoperoxidace – poškození fosfolipidů membrán, zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál
působení kadmia a olova	Změny koncentrací stopových prvků jako je železo, vápník, mangan a zinek

1.1 Měď a zinek

Měď bývá vylučována horninami na jejich povrch. Je součástí několika minerálů, které mohou obsahovat jak jednoduché tak i složité sulfidy mědi. Tyto minerály jsou docela snadno rozpustné v procesech zvětrávání, zejména v kyselém prostředí. Měď hraje významnou roli v několika fyziologických procesech, kterými jsou fotosyntéza (viz tabulka 1), dýchání, distribuce sacharidů, redukce a fixace dusíku, metabolismus proteinů a metabolismus buněčné stěny. Dále ovlivňuje propustnost vody xylémem a tak ovládá vztah mezi vodou a prostředím rostliny a také řídí produkce deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA). V případě, že dojde k jejich nedostatku je výrazně zbrzděno rozmnožování rostlin (sníží se produkce semen a zvýší se sterilita pylu). Navzdory tomu všemu je měď považována za vysoce toxický prvek. Nejběžnějšími charakteristickými příznaky toxicity jsou chlorózy a kořenové malformace (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). V půdě se ionty mědi vyznačují omezenou pohyblivostí, zejména kvůli vazbě na půdní částice. Významnou roli v jejich biodostupnosti hraje chelatace, zejména organickými kyselinami, ale také snadná tvorba komplexů s aminokyselinami a nízkomolekulárními peptidy (Babula et al., 2010). V pletivech kořene se měď téměř výhradně vyskytuje v komplexních formách a s největší

pravděpodobností vstupuje do kořenových buněk v disociované formě (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Zinek se vyskytuje především samostatně v sulfidech (ZnS), může být též nahrazován za Mg^{2+} v křemičitanech. Koncentrace zinku v sedimentech jílu a břidlic se pohybují od 80 do 120 ppm a jeho koncentrace v pískovcích a karbonských skalách se pohybují od 10 do 30 ppm. Během procesu zvětrávání, ke kterému dochází zejména v kyselém a oxidujícím prostředí, jsou vyluhovány zinečné minerály a dochází k produkci mobilních Zn^{2+} . Zinek je také snadno absorbován minerálními a organickými složkami a proto je součástí většiny typů půd. Jeho hromadění je pozorováno v povrchových horizontech.

Rostliny jej přijímají hlavně jako Zn^{2+} , při vyšším pH pravděpodobně jako hydratovaný monovalentní kationt $ZnOH^+$ a další možnost příjmu je chelátově vázaný. Pohyblivost zinku v rostlině je střední, rychlost se pohybuje mezi K^+ a Ca^{2+} . Při jeho vyšším obsahu v živném mediu se hromadí především v pletivech kořenu (Tůma et Svojanovská, 2015).

Zinek hraje zásadní role v metabolismu rostlin, z nichž nejvýznamnější je jeho činnost jako součást enzymů – dehydrogenázy, proteinázy, peptidázy a fosfohydrázy. Důležitou úlohu hraje zinek při regulaci metabolismu nukleových kyselin. Zasahuje do metabolismu cukrů. Při nedostatku zinku se zvýší obsah redukcujících cukrů a klesá fosforylace glukózy v důsledku inhibice hexokinázy.

Mikroby jsou schopny inaktivovat zinek v půdě. Zvýšené množství zinku v půdě je způsobeno především dlouhodobým používáním zinečnatých hnojiv. Existuje několik druhů rostlin, které jsou velmi tolerantní vůči absorpci zinku z půdy nebo vůči depozicím atmosférického zinku v zamořeném prostředí. Mohou v sobě hromadit velké množství tohoto kovu bez vykazování příznaků toxicity. Symptomy toxicity zinkem jsou chlorózy, vyskytující se převážně na nových listech, a růstové deprese rostlin. Když je v rostlině přebytek kadmia, tak se zinek váže v kořenech některých plodin jako jsou sója, rajče, zelí či pšenice (Steveninck et al., 1994).

Měď a zinek jsou těžké kovy, které jsou jako katalytické a strukturální komponenty proteinů a jako kofaktory, potřebné v růstu a vývoji rostlin. Vysoké koncentrace těchto kovů narušují normální růst rostlin, buněčné proliferace a diferenciaci většiny rostlinných buněk. Je to způsobeno tím, že mnoho těžkých kovů může snadno vázat sulfátové skupiny (-C-SH nebo R-SH) (Kumar et al., 1995).

1.2 Železo

Železo je jednou z hlavních složek litosféry (přibližně 5%) a nachází se převážně v magmatických horninách. Chování železa je úzce spojeno s koloběhem kyslíku, síry a uhlíku. V půdách se železo vyskytuje hlavně ve formách oxidů či hydroxidů jako samostatné malé částice nebo jsou sloučeny s dalšími minerály. V půdních

horizontech bohatých na organické látky se železo nachází především v chelátové formě. Rostliny obecně železo pohlcují ve formě Fe^{2+} kationtů a kořeny mají tu schopnost, že dokáží přeměnit Fe^{3+} na Fe^{2+} kationty, což je pro většinu rostlin zásadním krokem pro absorpci. Dále jeho dopravu zprostředkovává převážně citrát, který se naváže na železo. Železo je pro rostliny nezbytnou složkou jejich výživy. Organické komplexy železa se účastní mechanismů přenosu elektronů při fotosyntéze. Předpokládá se, že i tvorba chlorofylu je jím ovlivněna. Je prokázáno, že rostliny s vysokým obsahem živin, zejména vápníku a oxidu křemičitého, jsou schopny tolerovat vyšší množství železa. Pokud ho mají rostliny nedostatek, tak se mohou objevit rozličné příznaky tohoto deficitu, které jsou závislé na půdě, rostlině, výživových a klimatických faktorech. Nejběžnějším počátečním příznakem nedostatku železa jsou chlorózy vyskytující se převážně na mladých listech. Zejména některé ovocné stromy, oves a rýže jsou velmi náchylné k chlorózám způsobeným nedostatkem železa. Pokud dojde k nadměrnému příjmu železa rostlinou, tak v ní vyvolá toxickou odezvu. S největší pravděpodobností k tomu dochází na silně kyselých půdách, na půdách bohatých na sírany a na zaplavených půdách. Symptomy toxicity nejsou nijak specifikovány, obvykle se liší mezi druhy rostlin a fázemi růstu (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

1.3 Mangan

Mangan je jedním z nejhojnějších stopových prvků v litosféře. Jeho nejvyšší koncentrace jsou obvykle obsaženy v mafických horninách. Z manganu se skládá řada minerálů, ve kterých se vyskytuje ve formě Mn^{2+} , Mn^{3+} či Mn^{4+} . V silikátových nerostech se ale nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu Mn^{2+} , kde je schopen nahradit dvojmocné kationty jako jsou Fe^{2+} a Mg^{2+} . Všechny sloučeniny manganu jsou velmi důležitými půdními složkami, protože jsou důležité pro výživu rostlin a řídí chování několika dalších stopových prvků. Mangan má také značný vliv na některé vlastnosti půdy a to zejména na její pH a Eh, což je redox potenciál (měřítko převahy redukce či oxidace). Sloučeniny manganu jsou také známé pro jejich schopnost rychlé oxidace či redukce a tedy oxidační podmínky může výrazně snížit dostupnost manganu a přidružených stopových prvků a zase naopak. Četné studie prokázaly, že příjem manganu rostlinou probíhá obdobě jako u jiných dvojmocných kationtů. Ovšem stejně tak může dojít k pasivní absorpci v případě, že je ho v půdě vysoké množství. Obecně je známo, že mangan je rychle rostlinou převzat a dokáže se v ní i rychle přemístit. Proto je pravděpodobné, že nebude vázán na organické ligandy v pletivech kořenu nebo v xylémové tekutině (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Na rozdíl od jiných esenciálních stopových prvků jako měď, zinek, železo či molybden, které jsou obvykle nedílnou součástí enzymů, mangan působí jako aktivátor enzymů. Ovlivňuje buněčné procesy jako je dýchání, syntéza aminokyselin, biosyntéza ligninu a hladinu hormonů v rostlinách. Projevem jeho nedostatku je zpomalení růstu, nekrotické skvrny na listech a chloróza (Burnell, 1988).

1.4 Nikl

Nikl je sedmý nejrozšířenější přechodný kov a v přírodě se vyskytuje jak ryzí tak i ve sloučeninách. Ve skalách se vyskytuje především ve sloučeninách, jako jsou sulfidy (millerit, NiS), arsenidy (nicolit, NiAs) a antimonidy (breithauptit, NiSb). Nikl je rovněž spojován s uhličitany, fosforečnany a křemičitany. Během procesu zvětrávání je snadno mobilizován a poté vysrážen s ionty železa a manganu. Ovšem na rozdíl od železa a manganu je relativně stabilní ve vodných roztocích a schopen se přesouvat na poměrně dlouhé vzdálenosti. Příjem niklu rostlinami je ovlivněn druhem dané rostliny a pedologickými faktory, z nichž nejvýznamnějším je především pH půdy (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Nikl je snadno přijímán ve formě Ni^{2+} a nepatrně v chelátové.

Je mobilní v xylému i floému proto bývá obsažen i v semenech (Tůma et al., 2010). Nikl je pro rostliny důležitým esenciálním prvkem. Je známo, že zvyšuje výnosy plodin i vzhled a kvalitu produktů. Má významný vliv pro normální růst a vývoj vyšších rostlin a má esenciální funkci při stárnutí semen a rostlin. Nikl je metabolickým kofaktorem ureázy tzn., že zřejmě působí na růst rostlin hlavně prostřednictvím močoviny, jejíž hladinu v rostlinách ovlivňuje (bobovité).

Nikl ve vyšších koncentracích může působit fyto toxicky. Z fyziologických účinků niklu na rostliny je známo, že nikl inhibuje fotosyntézu, především hlavně výměnu plynů, inhibuje fotosystém II (PS II) na oxidačním místě. Z dlouhodobých pokusů je zřejmé, že redukuje růst listů, mění strukturu chloroplastů a snižuje obsah fotosyntetických pigmentů a snižuje enzymatickou aktivitu pro CO_2 asimilaci (Dan et al., 2002).

1.5 Kadmium a olovo

Kadmium se řadí mezi jeden z nejvíce ekotoxických kovů, které vykazují nepříznivé účinky na biologickou aktivitu půdy a metabolismus rostlin. Při zvětrávání se kadmium snadno uvolňuje a přesto, že je především známo jako Cd^{2+} , tak může také tvořit několik komplexních iontů (CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^+ , CdCl_3^- , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$, a $\text{Cd}(\text{OH})_2^{2-}$) a organické cheláty. Je známo, že velký podíl kadmia bývá nahromaděno v pletivech kořene. Když se zvýší množství kadmia v růstovém médiu, koncentrace tohoto kovu v kořenech přesahuje jeho obsah v nadzemních částech asi stokrát. Kadmium v rostlinách je relativně mobilní, přestože jeho translokace prostřednictvím rostlinných pletiv může být omezena (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Příčina toxicity kadmia je spojovaná s narušením enzymatické aktivity a syntézy antokyanu. Chlorofyl se vyznačuje schopností koncentrovat kadmium, proto se doporučuje využívat ho k indikaci horní hranice citlivosti (zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/ci_zorode_prvky.htm).

Olovo se převážně nachází v magmatických horninách a jílových sedimentech. V nezměněné podobě ho lze nalézt v minerálu galenitu (PbS). Vyskytuje se především jako Pb^{2+} , ačkoliv jeho oxidační stav je +4, a v několika dalších formách, ve kterých většina jeho minerálů je zcela nerozpustná v přírodních vodách. Během zvětrávání olovnaté sulfidy pomalu oxidují a jsou schopny ve formě uhličitanů a dalších formách se začleňovat do jílovitých minerálů a organické hmoty. Obsah olova v půdách souvisí se složením podloží. Rostliny jsou schopny ho přijímat jak z půd, tak i z ovzduší a řadí se mezi nejvíce nahromaděný těžký kov v pletivech kořene. V rostlinách je olovo pevně vázáno a není pohyblivé. Malá pohyblivost olova je vysvětlována jeho ukládáním ve formě pyrofosforečnanu v buněčných stěnách.

Pokud se v rostlinách hromadí velké množství kadmia a olova, mohou nepříznivě ovlivnit absorpci a transport esenciálních prvků. Tyto prvky narušují metabolismus rostliny a mají negativní dopad na její růst a reprodukci (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

1.6 Chrom

Chrom je velmi často součástí rud. Vyskytuje se například v chromitu ($FeO \cdot Cr_2O_3$) a krokoitu ($PbCrO_4$). Chrom vykazuje vysokou variabilitu oxidačních stavů, od +2 do +6. Přirozeně se však vyskytuje jako Cr^{3+} a Cr^{6+} . Vysoce oxidované formy jsou méně stabilní jak Cr^{3+} (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Převážně se vyskytuje však ve formě Cr^{3+} z důvodu jeho omezené rozpustnosti ve vodě a schopnosti tvořit pevné komplexy s půdními minerály. Jako Cr^{6+} vytváří chromáty, které jsou lehce mobilizovatelné a snadno mohou pronikat do buněk, kde způsobují oxidativní poškození (Greenwood et Earrnshaw, 1993). Symptomy toxicity je vadnutí a poranění kořene, chlorózy mladých listů, chlorotické skvrny na obilovinách a hnědo-červené zbarvení listů (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Nejvíce chromu se kumuluje v kořenech, méně v listech a stoncích. Nejnižší obsahy byly zjištěny v zrnu.

Chrom stimuluje vývoj rostlin a kladně působí na metabolismus cukrů.

1.7 Rtuť

Rtuť se nachází ve všech typech magmatických hornin, kde ji lze nalézt spíše v menším množství. Vyšší koncentrace rtuti se nacházejí v sedimentárních horninách, jílovitých sedimentech a konkrétně v břidlici bohaté na organické látky (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Běžně se objevuje v oxidačních stavech Hg^0 , Hg^{1+} a Hg^{2+} (Greenwood et Earrnshaw, 1993). Byly zjištěny dva způsoby, kterými se váže rtuť na rostlinnou tkáň. A to buď vazbou na ethanol nebo na kyselinu chlorovodíkovou (Beauford et al., 2006). Dostupnost rtuti v půdě pro rostliny je

však nízká (Patra et Sharma, 2000) a nejnovější poznatky naznačují, že je rtuť především vázána na buněčnou stěnu v kořenech (Beauford et al., 2006).

1.8 Molybden

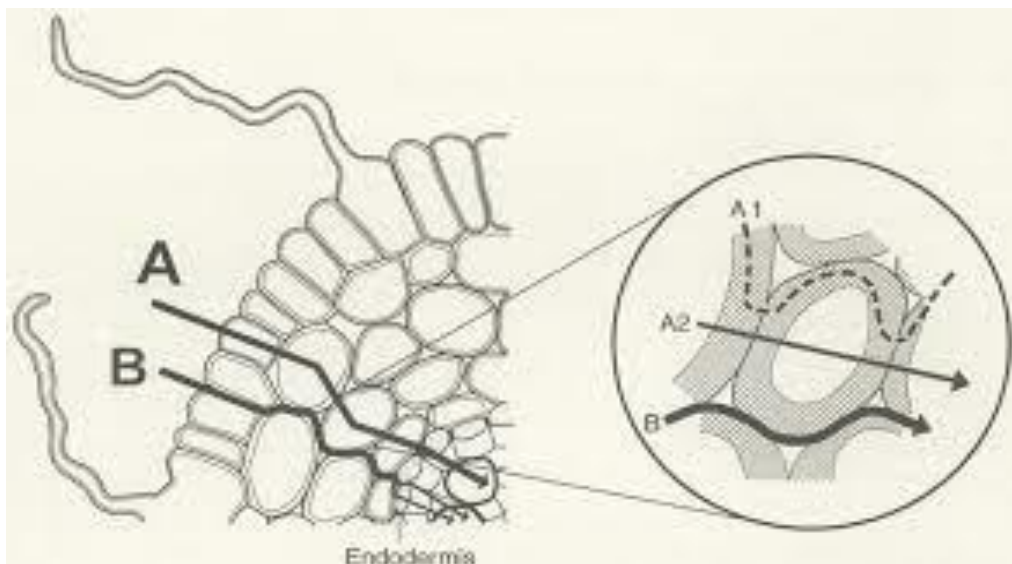
Molybden se nachází v žulových a jiných magmatických horninách. Dále ho lze nalézt v sedimentech jílu bohatých na organické látky. Převažujícím minerálem je molybdenid (MoS_2), obsahující většinu molybdenu nacházejícího se na pevnině. Během zvětrávání jsou Mo sulfidy pomalu oxidovány a jejich hlavním produktem je MoO_4^{2-} anion, který se vyskytuje v neutrálním pH, a HMoO_4^- , který se nachází při nižších hodnotách pH. Obvykle je sledována pozitivní korelace mezi příjmem molybdenu rostlinami a pH půdy (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Hraje zásadní roli jako součást enzymů, je nezbytným kofaktorem nitrátreduktázy a nitrogenázy (Mendel et al., 2002).

1.9 Kobalt

Kobalt je tvrdý, stříbrolesklý kov s feromagnetickými vlastnostmi, který se řadí mezi vzácné prvky. V přírodě se nachází ve dvou oxidačních stavech a to ve formě Co^{2+} a Co^{3+} a tvoří komplexní anion $\text{Co}(\text{OH})_3^-$. Při zvětrávacích procesech je poměrně pohyblivý. Během absorbování kobaltu rostlinami se chová stejně jako železo a mangan, váže se do komplexotvorné organické sloučeniny (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Kobalt je nezbytnou součástí několika enzymů a koenzymů. Ale jeho vysoká koncentrace v buňce brzdí syntézu RNA a dochází ke snížení množství DNA zřejmě změnou aktivity velkého počtu endo- a exonukleáz (Palit et al., 1994).

2. Mechanismus příjmu těžkých kovů

Ionty těžkých kovů jsou nejprve zachyceny kořeny, následně do nich vstupují a jsou translokovány do nadzemních částí rostlin. Příjem iontů kovů probíhá pomocí mobilizace kovů vázaných na půdní částice. Pomocí transportérů jsou kovy přeneseny přes plasmatickou membránu do buněk. Kovy vstupují do kořenů buď apoplastickou nebo symplastickou cestou (viz obrázek 1).



Obrázek 1- **Způsoby vstupu těžkých kovů do buňky** A – protoplastická cesta: A1- symplastická cesta, A2 – transcellulární cesta; B – apoplastická cesta (Steudle et Frensch, 1996).

Existují dva způsoby, probíhající současně, kterými kovy mohou do buňky vstupovat a to je již zmíněná symplastická a apoplastická cesta. Symplastická cesta ještě zahrnuje cestu protoplastickou společně s cestou transcellulární (viz obrázek 1). Apoplast představuje pasivní transportní cestu na krátké vzdálenosti a vzniká propojením buněčných stěn, mezibuněčných a volných prostorů. Protoplastická cesta reprezentuje transport procházející vnitřním prostředím buněk. Transcellulární cestou je označován tok iontů přes buněčné membrány. Symplastickou cestou je označován aktivní transport pomocí plasmodesmat, což jsou mikroskopické kanálky v buňkách. (Steudle et Frensch, 1996).

Cesta přes apoplast je poměrně neregulovaná, protože dochází pouze k difúzi bez překročení membrány. Apoplastický transport je omezen vysokou kationtovou výměnnou kapacitou buněčné stěny. Jako bariéra proti vstupu iontů kovů do xylému apoplastickou cestou slouží endodermis, nebo přesněji Caspariho proužky, které se nacházejí v buněčných stěnách endodermálních buněk. Většinou látky vstupují do kořenů přes symplast, před samotným vstupem do xylému.

Při transportu symplastem se ionty pohybují přes plasmatickou membránu, která má obvykle velký záporný potenciál. Tento membránový potenciál poskytuje silný elektrochemický gradient pro vnitřní pohyb iontů kovů. Většina iontů kovů vstoupí do kořenových buněk rostlin pomocí specifických iontových přenašečů nebo kanálů (Jabeen et al., 2009).

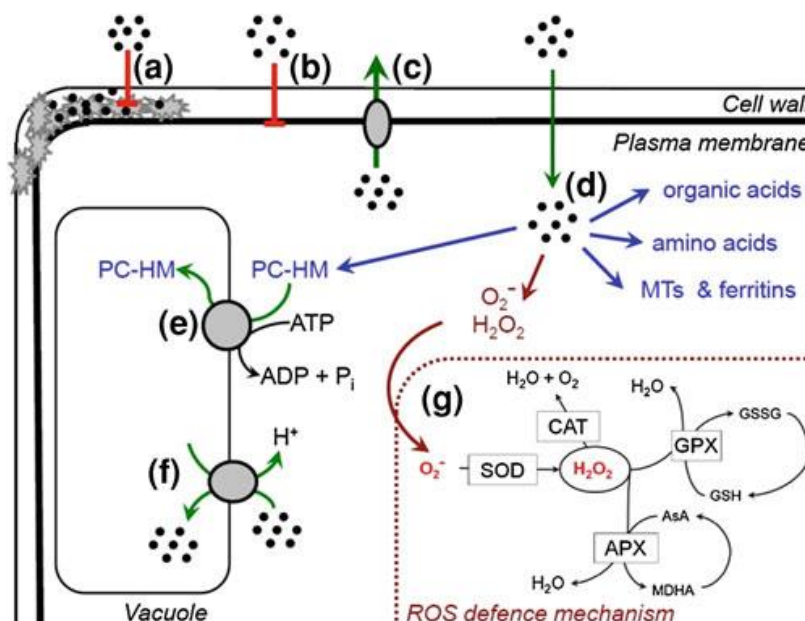
Úroveň tolerance rostlin a toxicity na buněčné úrovni je u různých druhů rostlin odlišná a také závisí na biodostupnosti těžkých kovů v suchozemských ekosystémech, která se týká jejich fyzikálně-chemického složení (Blanco et al., 2004) a vlastností dané půdy (Mortvedt, 1994). Dalším významným aspektem je

dostupnost esenciálních kovů jako je například železo, protože mechanismy, kterých rostliny využívají k příjmu těchto pro ně potřebných kovů mohou usnadnit a povolit vstup neesenciálním a eventuálně toxickým látkám (Römheld et Marschner, 1986).

V první linii obrany se mnoho rostlin vystavených toxickým koncentracím kovových iontů snaží předejít nebo snížit příjem do kořenových buněk omezením apoplastu vazbou na buněčnou stěnu nebo buněčné exsudáty nebo zamezením transportu (Manara, 2012).

Zprvu rostlina izoluje a neutralizuje kovy, které vstupují do buňky. Kovy jsou v půdě většinou navázané na půdní částice a rostlina je nejprve musí zmobilizovat (Manara, 2012) uvolňováním do půdy pomocí kořenových exsudátů, které vytvoří s ionty kovů komplexy (Römheld et Marschner, 1986). Poté se alternativně sloučeniny v buněčné stěně (hystidylové skupiny, pektiny a některé sacharidy) váží na kovové ionty a tyto ionty se nedostanou do cytosolu buněk, zůstávají uloženy v buněčné stěně. Ve chvíli, když tato preventivní obranná opatření selžou, kvůli příliš vysoké koncentraci kovů v půdě, se ionty kovů dostávají do cytosolu.

Většina kovových iontů vstoupí do rostlinných buněk pomocí specifických iontových přenašečů (Manara, 2012). Membránové transportéry mohou exportovat ionty z buňky ven nebo do vakuol (viz obrázek 2) a snížit tak jejich koncentraci v cytosolu. (Hall, 2002). Všechny tyto procesy se řadí mezi symplastickou cestu, tedy proces aktivního přenosu (Jabeen et al., 2009). Konkrétní přenašeče budou rozebrány v dalších kapitolách.

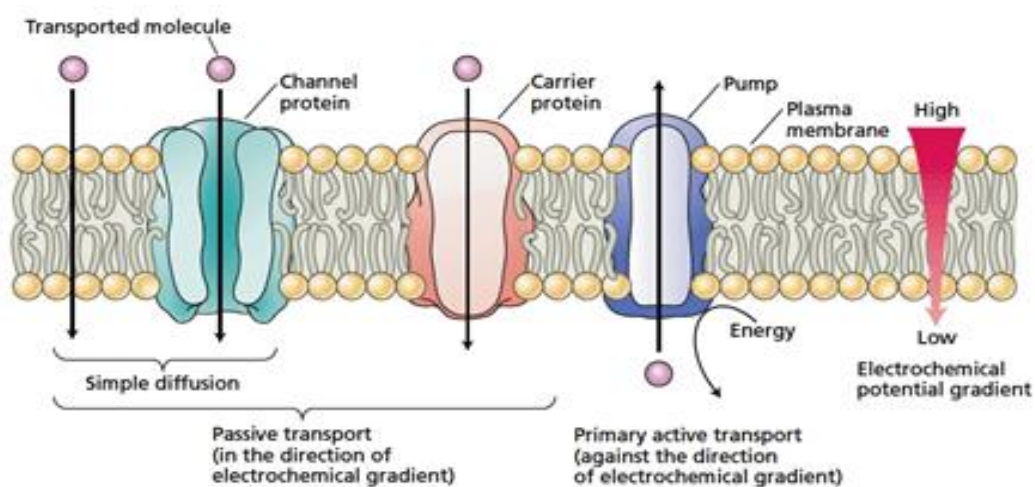


Obrázek 2 - Reakce rostlin na toxicitu těžkých kovů a) kovové ionty vytvářejí

vazbu s buněčnou stěnou a exudáty kořene b) influx c) eflux d) chelatace kovu v cytosolu – ligandy například: fytochelatin, metalothioneiny, organické kyseliny a aminokyseliny e) doprava kovů ligandovými komplexy tonoplastem a hromadění ve vakuole f) sekvestrace ve vakuole, přeprava přes tonoplast g) vznik reaktivních forem kyslíku, které navozují tzv. oxidační stres (Manara, 2012).

2.1 Plasmatická membrána a membránové transportéry

Cytoplazmatická membrána tvoří vysoce selektivní bariéru mezi vnitrobuněčným obsahem a okolním prostředím (viz obrázek 3).



Obrázek 3 – Struktura cytoplazmatické membrány

(zdroj:http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_01_novenelettan/ch02s02.html)

Cytoplazmatická membrána o tloušťce 5 nanometrů se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy molekulárních bílkovin, které mohou být jak integrální, tak periferní. Integrální proteiny jsou vláknité procházející celou dvojvrstvou a dodávají membráně pevnost. Periferní se nacházejí na povrchu lipidové dvojvrstvy a jsou kulovitěho tvaru. Mají enzymatickou aktivitu.

Ionty těžkých kovů se nemohou volně pohybovat přes membrány, což jsou lipofilní struktury, kvůli svému náboji. A proto musí být transport těchto iontů řízen membránovými proteiny s transportními funkcemi, obecně označovanými jako přenašeče nebo transportéry (Lasat, 2002). Úplnému vstupu těchto iontů do buňky nelze zcela zamezit, avšak membránové transportéry je mohou exportovat z buňky ven nebo do vakuol a tak snížit jejich koncentraci v cytosolu (Hall, 2002). Na základě dosud získaných údajů se uvádí několik proteinových transportních rodin, podílejících se na transportu kovů uvnitř rostlin. Do největších rodin patří NRAMP, ZIP, YSL proteiny, působící při vstupu kovů a P1BATPásy, CDF, CAX a ABC působící

při výstupu iontů (Verkleij et al., 2009). Podrobněji jsou konkrétním přenašečům věnovány další kapitoly.

Transportéry těžkých kovů řídí jejich translokaci po celé rostlině, udržujíc homeostázu kovů a podílejí se na absorpci a vnitřním vylučování. Tyto proteinové transportéry aktivně pumpují kovové ionty dovnitř buněk nebo do vakuol. Podle toho je můžeme rozdělit na transportéry mezi kořenem a nadzemní částí rostliny, jako například ATPázy typu P a MATE proteiny a na transportéry do vakuol, jako například CDF - kationtové difuzní přenašeče, HMA proteiny a ABC transportéry (Hall, 2003).

Transportéry těžkých kovů přes plazmatickou membránu a tonoplast zachovávají fyziologicky přijatelné koncentrace těžkých kovů, ale rovněž mohou přispět k stresové reakci vyvolané těmito kovy (Williams et al., 2000).

2.1.1 Rodina ZIP transportních proteinů

Skupina transportérů ZIP hraje důležitou roli v transportu iontů Zn^{2+} , ale také jsou schopné přenášet Cd^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} a Cu^{2+} (Pedas, 2009). Rodina ZIP transportérů byla identifikována u mnoha druhů rostlin (stejně tak jako bakterií, hub a živočichů) a má za úkol přemísťování dvojmocných kationtů přes membrány. Některé ZIP proteiny jsou uvedeny do pohybu v *A. thaliana* kořeny a výhonky v reakci na železnaté či zinečnaté zatížení a proto se tyto proteiny mohou zdát součástí stresové reakce (Guerinot, 2000). Mnoho z nich představuje nízkou iontovou selektivitu, například studie u kvasinek ukázaly, že AtIRT1 může kromě jiného přenášet i Mn^{2+} , Zn^{2+} a Cd^{2+} (Korshunova, 1999).

2.1.2 Cu transportéry

Ionty mědi se do buněčného cytosolu dostávají hlavně pomocí transportérů z proteinové rodiny COPT. Předpokládá se, že transportéry COPT1 a COPT2 jsou umístěny na povrchu buněk a regulují příjem mědi do buněk. Ostatní transportéry z této rodiny, což jsou COPT3 až COPT5 se podílejí na mobilizaci mědi z vnitrobuněčných uložišť (Burkhead et al., 2009).

2.1.3 Rodina NRAMP transportních proteinů

Bylo prokázáno, že rodina NRAMP transportních proteinů přenáší přes membrány širokou škálu kovů jako jsou Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , a Co^{2+} . Byly identifikovány v bakteriích, houbách, rostlinách a i v živočiších (Nevo et Nelson, 2006). Rodina

NRAMP proteinů v *A. thaliana* je důležitá především v přepravě železa a kadmia (Thomine et al., 2000).

2.1.4 ATPázy: P_{1B}ATPázy

ATPázy jsou nejvíce zkoumanou skupinou transportérů těžkých kovů. Mezi nimi byly nalezeny takové, které jsou přímo zodpovědné za toleranci k těžkým kovům u některých druhů tzv. transformovaných rostlin. P_{1B}ATPázy transportují jednomocné a dvoumocné ionty těžkých kovů přes membrány za spotřeby ATP. Jedna skupina má na starosti transport dvoumocných iontů kovů jako jsou zinek, olovo, kadmium a měď a druhá skupina je zapojena především v procesu vylučování zinku a kadmia z cytosolu do mezibuněčného prostoru (Catty et al., 2011; Deinlein et al., 2012).

2.1.5 Rodina CDF transportních proteinů

V rostlinných buňkách se CDF proteiny nazývají MTP (metal tolerance proteins). Tyto transportní proteiny jsou lokalizováni na plasmatické membráně a v membránách různých buněčných organel. Přepravují dvojmocné kationty zinku, kadmia, kobaltu, železa, niklu a manganu. Přenos iontů je zprostředkováván proti koncentračnímu gradientu s využitím H⁺ nebo K⁺ kationtů (Montanini et al., 2007).

2.1.6 Kationt/H⁺ antiportéry

Kationt/H⁺ antiportéry jsou protisměrné nespecifické přenašeče. Transport protonů H⁺ probíhá z vnitřního do vnějšího prostředí buňky a protisměrně dochází k transportu ostatních kationtů.

2.1.7 Rodina ABC transportních proteinů

Do rodiny ABC transportérů patří HMT1 protein, který pravděpodobně přenáší fytochelatinu do vakuoly. Příjem fytochelatinů vakuolárními váčky je nejspíš poháněn energií přímo z hydrolýzy ATP, což se u ABC typu transportérů předpokládá. HMT1 je schopný přenášet jak apo-PC tak PC-Cd komplexy (Ortiz et al., 1995).

2.2 Chelátory a chaperony

Po příjmu těžkých kovů prostřednictvím přenašečů jsou ionty vázány na chelátory a chaperony. Chelátory vyrovnávají koncentrace kovů v cytosolu, aby nepřesáhly určité nepřiměřené množství. Chaperony jsou bílkoviny, které pomáhají dalším bílkovinám se správně sbalit, nebo nalézt prostorové uspořádání odpovídající

nativní konformaci a získání energeticky nejvýhodnějšího uspořádání (Clements, 2001). Dobře známými mobilními chelátujícími látkami jsou organické kyseliny jako je například kyselina citrónová, malonová nebo maleinová (Curie et al., 2009; Rauser, 1999), aminokyseliny jako jsou cystein, histidin, methionin a další, peptidy (fytochelatin, metalothioneiny) a proteiny (metallochaperony a „Heat shock“ proteiny) (Verkleij et al., 2009).

Esenciální ionty kovů jsou doručeny kurčitým cytosolickým proteinům či organelám a poté je příjem organelami zajištěn pumpami, které jsou schopny reagovat se specifickými chaperony. Uvolněné chaperony mohou poté znova navázat na sebe další kovový iont. Detoxifikace a ukládání přebytečných iontů kovů je zajištěna vakuolou. Transportéry v tonoplastu zajišťují průchod iontů a chelátorových komplexů (Clements, 2001).

3. Mechanismy detoxifikace těžkých kovů

Při diskuzi o detoxifikaci těžkých kovů jsou důležité dva aspekty: rostlinná buňka je kompartmentována, proto hraje důležitou roli distribuce a intracelulární transport iontů kovů mezi kompartmenty (především vakuolami) a cytoplasmou (viz. tabulka 2). Navíc jsou vyšší rostliny mnohobuněčné organismy s diferencovanými orgány, mezi nimiž rovněž dochází k rozdílné distribuci kovových iontů (Šuman et Kotrba, 2010)

Tabulka 2 – **Detoxifikační mechanismy buňky v reakci na různé kovové ionty** (Hall, 2002)

Mechanismus obrany vůči kovu	Daný kov
mykorhiza	zinek, měď, kadmium
buněčná stěna, exudáty	různé, lze zahrnout i nikl
cytoplazmatická membrána, snížený příjem	arseničnany, nikl
Aktivní přenos iontů z buňky (efflux)	různé, lze zahrnout i zinek
Fytochelatin	Kadmium
Metalothioneiny	Měď
Organické kyseliny, aminokyseliny	Různé
"Heat shock" proteiny	různé, lze zahrnout i kadmium
Skladování ve vakuole	zinek, měď, kadmium

Rostliny schopné hyperakumulace těžkých kovů využívají dalších strategií detoxifikace, kterými normální rostliny nedisponují. Zvýšené akumulace kovů docílí:

- skrze nadměrné přepravovací systémy, zajišťující lepší sekvestraci
- díky expresi specifických proteinů
- díky vysoké koncentraci kovových chelátorů (Becher et al., 2004)

K čemu je to však pro tyto rostliny dobré? Jaká z toho plyne výhoda? S největší pravděpodobností tento zvláštní rys může fungovat v obraně proti patogenu nebo proti němu vyvolat útok (Freeman et al., 2006; Boyd, 2007).

3.1 Kořenové exudáty

Kořenové exudáty mohou ovlivňovat příjem prvků rostlinami změnou fyzikálního a chemického charakteru prostředí rhizosféry, zapříčiněné například změnou pH v rhizosféře, chelatací a komplexací rizikových prvků (Fišer et al., 2014).

Kovy jsou v půdě většinou navázané na půdní částice a rostlina je nejprve musí zmobilizovat (Manara, 2012). Klíčovým krokem k získání esenciálních kovů je uvolňování exsudátů s chelatačními vlastnostmi do půdy. Jde o chemické sloučeniny, které tvoří komplexy s kovovými ionty (Römheld et Marschner, 1986). Musí dojít k vytvoření chelátové vazby pomocí sekrece chelátů a H^+ a tím se vytvoří tzv. molekulární „klece“ kolem kovových iontů. V této podobě se nejsou schopné dostat do tenkých iontových kanálů v buněčné stěně. Vazba kovových iontů jako jsou měď a zinek v apoplastu také pomáhají kontrolovat obsah kovů v kořenových buňkách (Dietz, 1996). V buněčné stěně kořene jsou přítomna kationtová vazebná místa a to umožňuje výměnu kovů a ovlivňují dostupnost iontů pro příjem a difúzi apoplastem (Allan et Jarrel, 1989).

3.2 Mikroorganismy

Rhizosférní mikroorganismy mohou svou činností měnit biologickou dostupnost rizikových prvků, a to například uvolňováním chelatuujících látek, okyselováním zeminy či změnou redoxního potenciálu zeminy. Přítomností mikroorganismů v rhizosféře je stimulována akumulace některých minerálních látek, jako jsou železo či mangan, rostlinnými kořeny. Například bakterie rodu *Pseudomonas* a *Bacillus* jsou schopny usnadňovat akumulaci kadmia (Macková et Macek, 2005).

3.3 Mykorrhiza

Mykorrhizou rozumíme symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin. Rostliny s mykorrhizní symbiózou přijímají menší množství těžkých kovů. Samotný proces přijímání doposud není příliš znám. Převládá teorie o selektivním výběru prvků,

jež jsou přijaty a transportovány. V případě těžkých kovů dochází ke sníženému vychytávání a přesunu mykorrhizní houbou (Joner et al., 2000).

3.4 Imobilizace

Imobilizace je proces, kdy jsou těžké kovy navázány do buněčných stěn. K tomuto procesu dochází již v kořenech rostliny a tímto se snižuje poškození buněčných membrán (Di Toppi et Gabbrielli, 1999). Buněčná stěna má klíčovou roli v pohybu iontů těžkých kovů, kterým brání dostat se do cytosolu pomocí pektinových míst a hystidylových skupin a extracelulárních látek jako jsou kalóza a sliz, na které se těžké kovy mohou navázat (Wang et al., 1992; Manara, 2012).

3.5 Translokace

Ve chvíli, kdy těžký kov vstoupí do kořenu rostliny, může být buď uložen ve vakuolách kořenových buněk, nebo je xylémem transportován do nadzemních částí rostlin. V druhém případě dochází k transportu xylémem, retranslokaci ve floému a přenosu z xylému do floému. Transport v xylému probíhá z kořenů do nadzemních částí rostlin, zatímco transport floémem probíhá v opačném směru (Marschner, 1995).

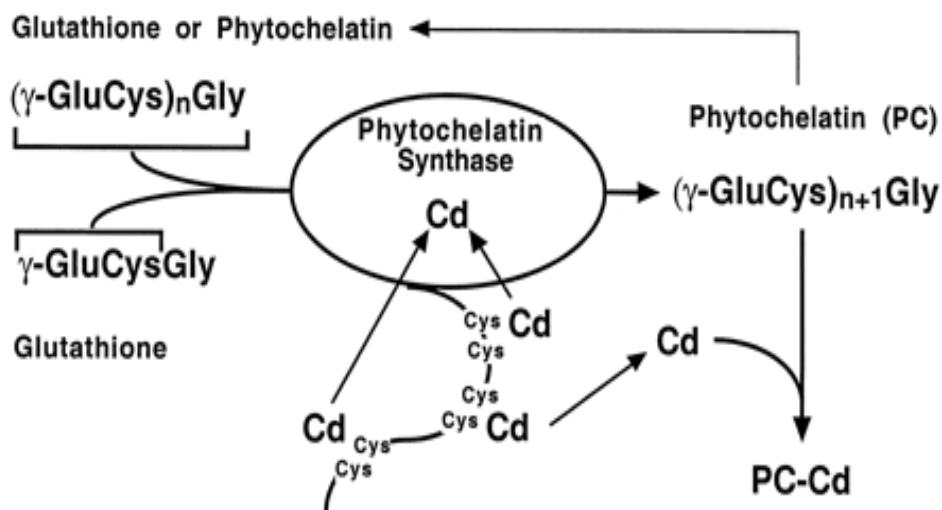
Transport iontů kovů do xylému se obvykle uskutečňuje pomocí membránových transportních proteinů, jako jsou například HMA transportéry přenášející ionty kadmia a zinku. Do přenosu může být také zapojena celá řada chelátorů (Clemens et al., 2002). Například železo a nikl jsou transportovány organickými kyselinami, převážně citrátem (Tiffin, 1970; Leea et al., 1977). Kromě toho se na translokaci niklu může podílet aminokyselina histidin (Krämer et al., 1996). Měď bývá transportována methioninovým derivátem nikotinaminem (Pich et Scholz, 1996). Následný transport iontů kovů do floému probíhá přes právě zmíněný nikotinamin (Stephan et Scholz, 1993).

3.6 Vakuolární sekvestrace

Jedná se o vyčlenění přebytku těžkých kovů do vakuoly z důvodu snížení hladiny toxických kovů v cytosolu (Hall, 2002).

Buněčné vakuoly jsou obecně místem depozice mnoha iontů těžkých kovů (Šuman et Kotrba, 2010). Jsou především hlavním místem pro shromažďování a ukládání fytochelatinů navázaných na kovové ionty tvořící spolu nízkomolekulární komplex (Yang et Chu, 2011). Přičemž tuto akumulaci zprostředkovávají ATPdependentní transportéry z rodiny ABC lokalizované v tonoplastu (Šuman et Kotrba, 2010). Ve vakuole pak nízkomolekulární komplex spolu s dalšími ionty kovů, které mohou vstoupit do vakuoly přes CAX transportéry, tvoří vysokomolekulární komplex (Yang et Chu, 2011). Tím je znemožněna opětovná refundace kovových iontů zpět do cytosolu. Fytochelatiny mohou být následovně degradovány hydrolasami nebo

kde jsou LWM shlukovány do větších celků, takzvaného vysokomolekulárního komplexu (Clemens, 2006). Výsledkem tohoto procesu je snížení volných iontů kadmia uvnitř cytosolu (Grill et al., 1985). Ionty kadmia jsou ve vakuole důsledkem kyselého pH disociovány a kadmium je zabudováno do organických kyselin jako jsou citrát, oxalát a malát (Saber et al., 1999).



Obrázek 5 – Popis fytochelatínové syntézy (Cobbett, 2000)

3.8 Metalothioneiny

Metalothioneiny jsou charakterizovány jako nízkomolekulární kódované polypeptidy, které váží kovy. Obsahují velké množství aminokyseliny cysteinu, tím pádem jsou bohaté na sulfhydrylové skupiny. Vysoký obsah této funkční skupiny umožňuje již zmíněnou vazbu ke kovům do stabilních komplexů (Kagi et al., 1974; Kojima et al., 1976). Hrají roli v detoxifikaci těžkých kovů, v ochraně proti oxidačnímu stresu a jako metalochaperony se nepochybně podílejí na homeostázi esenciálních kovů jako jsou zinek a měď (Artiushenko et al., 2014). Konkrétně přenášejí ionty Zn^{2+} a Cu^{+} k různým metaloenzymům a transkripčním faktorům (Freisinger et al., 2008). Navíc mohou buňce poskytnout ochranu proti iontům těžkých kovů, jako jsou Cd^{2+} a Hg^{2+} a reaktivním formám kyslíky (Hasler et al., 2000). Dříve se předpokládalo, že metalothioneiny jsou záležitostí živočišné říše, zatímco v rostlinách detoxifikaci iontů těžkých kovů zajišťují enzymaticky syntetizované fytochelatiny. Od té doby uplynulo více jak 30 let od objevení prvního rostlinného metalothioninu v pšeničném klíčku (Peroza et al., 2013). Do té doby než v roce 1983 byl z obilí pšenice seté (*Triticum aestivum*) izolován první malý protein bohatý na cystein, který byl označen jako metalothionein (Freisinger et al., 2008).

3.9 Organické kyseliny

Organické kyseliny a aminokyseliny na sebe mohou vázat těžké kovy a tak pomáhat s detoxifikací. Nebyla však stanovena jasná korelace mezi akumulací těžkých kovů a tvorbou těchto sloučenin. Organické kyseliny jako jsou například malát, citrát a šťavelan napomáhají toleranci vůči těžkým kovům pomocí transportu kovů xylémem a sekvestrací iontů ve vakuole, ale kromě toho mají i jiné role v buňce (Rauser, 1999). Malát je cytosolový chelátor vážící se na zinečnaté ionty (Mathys, 1977). Citrát, který je syntetizován enzymem citrátovou synthasou, má hlavní roli v chelaci Fe^{2+} iontů, ale také má silnou afinitu k Ni^{2+} a Cd^{2+} iontům (Cataldo et al., 1988).

3.10 Aminokyseliny

Nejdůležitějším aminokyselinovým ligandem je histidin, který hraje především klíčovou roli v chelaci niklu (Krämer et al., 1996), dále tvoří komplexy ještě s kadmíem a zinkem (Shah et Nongkynrih, 2007). A to díky přítomnosti karboxylové skupiny, aminoskupiny a imidazové skupiny (Callahan et al., 2006).

3.11 Fosfátové skupiny

Fytát je hlavní zásobárnou fosforu v rostlinách (Hocking et Pate, 1977). Jeho molekula se skládá ze šesti fosfátových skupin, které umožňují chelataci více kationtů, zahrnují kationty vápníku, hořčíku, draslíku, železa, zinku a manganu (Mikus et al., 1992). Všechno naznačuje, že by mělo jít o detoxifikační funkci.

3.12 „Heat shock“ proteiny

Proteiny tepelného šoku, neboli „Heat shock“ proteiny (HSP) jsou používané rostlinou k ochraně před přebytečným množstvím těžkých kovů. Tyto proteiny působí jako molekulární chaperony při syntéze bílkovin, váží se na nesbalené proteiny a chrání je či pomáhají jejich sbalení (Heckathorn et al., 2004). Bylo prokázáno, že je možné navodit toleranci k rizikovým prvkům pomocí krátkého tepelného šoku. Tento krátký tepelný stres před vystavením působení těžkých kovů snižuje poškození membrány. Krátký tepelný stres vyvolává tolerantní efekt předcházející škodám na buněčných membránách. Buňky mají klasickou ultrastukturu s jednou výjimkou a tou je to, že se vytvořily cytoplazmatické granule tepelného šoku (HSGs). Tento ochranný efekt může být zrušen cyclohexamidem, který působí jako inhibitor syntézy bílkovin. V pokusu byly stresované buněčné kultury *Lycopersicon peruvianum* CdSO_4 . Příjem kadmia ne až tak výrazně ovlivnil tepelný stres. Změny v ultrastruktuře byly nalezeny začínaje plasmalemou (buněčnou membránou) a poté v endoplasmatickém retikulu a mitochondriálních membránách. Kadmium bylo nalezeno společně se sírou ve vakuolách stresovaných buněk. Sraženiny obsahovaly přebytek síry, evidentně vzhledem k vyvolanému stresu vznikly fytochelatiny (Neumann et al., 1994). Jsou

významné právě proto, že buněčné membrány a proteiny jsou hlavními složkami poškození buněk v období, kdy rostliny prožívají stres. Dále bylo zjištěno, že těžké kovy také negativně ovlivňují fotosyntézu a právě malé HSP hrají významnou roli v ochraně funkce chloroplastů (Heckathorn et al., 2004).

4. Vliv těžkých kovů na rostlinnou buňku

Těžké kovy poškozují rostlinné buňky, tím že se mohou vázat na funkčně důležité biomolekuly a tím je deaktivovat. Výsledkem je například inhibice enzymatické reakce a poruchy metabolismu (Van Assche et Clijsters, 1986). Bylo prokázáno, že těžké kovy stimulují tvorbu volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, buď přenosem elektronů zahrnujícím kovové kationty nebo jako důsledek kovem zprostředkované inhibice metabolických reakcí (Halliwell et Gutteridge, 1984; Dietz et al., 1999).

4.1 Tvorba volných radikálů

Volným radikálem se označuje jakýkoliv atom, molekula nebo jejich fragment s jedním nebo více nepárovými elektrony ve valenční sféře se schopností samostatné existence. Tyto částice jsou tedy vysoce reaktivní a jsou schopné iniciovat různé reakce probíhající řetězovým mechanismem ve snaze doplnit si nebo odevzdat nepárový elektron (Štípek, 2000). Jsou schopné poškodit důležité části buněk, jako je DNA nebo buněčné membrány, z čehož vyplývá jejich nebezpečnost. Volné radikály a jejich reaktivní metabolity, kterými jsou reaktivní formy kyslíku útočí na různé buněčné složky, čímž mohou způsobit jejich oxidační poškození. Reakcí s nenasycenými mastnými kyselinami dochází k peroxidaci esenciálních membránových lipidů v cytoplazmatické membráně nebo v intracelulárních organelách (Gobel et al., 2003). Poškození peroxidací cytoplazmatické membrány vede k úniku buněčného obsahu a postupně až k buněčné smrti. Poškození vnitrobuněčné membrány ovlivňuje respirační aktivitu mitochondrie a také způsobuje to, že chloroplast ztrácí schopnost fixovat CO₂ (Scandalios, 1990). Reakcemi s DNA dochází k nebezpečným mutacím. Následkem reakcí s proteiny, enzymy mění svou aktivitu a pumpy nejsou schopny udržet iontovou homeostázu buňky, tím pádem se v cytosolu hromadí vápenaté ionty, což vede k autoimunitním reakcím.

4.2 Vznik reaktivních forem kyslíku

Jedná se o jeden z hlavních důsledků akumulace těžkých kovů v rostlinných buňkách. Reaktivní formy kyslíku navozují takzvaný oxidativní stres a způsobují tedy rozsáhlé škody v buňce. Reagují nespecificky, obvykle hned s první organickou molekulou, se kterou přijdou do styku. Tato jejich reaktivita vede k poškození buněčných struktur. V případě, že antioxidantní systém správně funguje, je hladina reaktivních forem kyslíku v buňkách nízká. Stav nazývaný oxidativní stres nastává, když dojde ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku. Tehdy dochází k poškození membrán a narušení reakčních cyklů v buňce. Buňka se může přizpůsobit například zvýšenou syntézou antioxidantů, nebo může dojít až k buněčné smrti (Bartosz, 1997). Důležitou roli zde hrají i signální molekuly. Těžké kovy jako kadmium mohou produkovat reaktivní formy kyslíku přímo přes Fentonovu a Haber-Weissovu reakci a nepřímo inhibicí antioxidantních enzymů (Romero-Puertas et al., 2007). Především peroxid vodíku slouží jako signální molekula v reakci na těžké kovy (Dat et al., 2000). Zvýšená akumulace peroxidu vodíku změní redoxní stav buňky a indukuje produkci antioxidantů a dochází k aktivaci antioxidantních mechanismů.

Mezi reaktivní formy kyslíku patří singletový kyslík, peroxid vodíku, superoxidový anion-radikál, hydroxylový radikál, hydroxylový iont a perhydroxylový radikál (Piterková et al., 2005).

4.3 Fentonova reakce a Haber-Weissův cyklus

Cestou Haber-Weissovy a Fentonovy reakce se tvoří peroxid vodíku a hydroxylový radikál jako reaktivní formy kyslíku v reakci na volné radikály (Piterková et al., 2005).

Haber-Weissova reakce: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \cdot \rightarrow \text{OH} \cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$

Fentonova reakce: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \cdot + \text{OH}^-$

Haber-Weissovy reakce se účastní superoxidový aniont radikál ($\text{O}_2 \cdot$) reagující s peroxidem vodíku (H_2O_2) za vzniku toxického hydroxylového radikálu.

Fentonovy reakce se účastní peroxid vodíku reagující s atomem železa rovněž za vzniku hydroxylového radikálu. Kromě železa, se reakce může účastnit i jiný redoxně aktivní kov, jako měď, chróm či kobalt (Wojtazsek, 1997).

4.4 Antioxidanty

Z chemického hlediska můžeme za antioxidant považovat každou látku, která zabrání reakci reaktivního metabolitu s jinou látkou. Rostliny si vyvinuly tyto účinné obranné mechanismy, které chrání buňku před oxidačním poškozením.

Zahrnují enzymové a neenzymové antioxidanty, které fungují jako kompetitivní substráty pro reaktivní formy kyslíku a tím jsou schopny bránit jejich reakci s významnými biomolekulami (Dat et al., 2000). Příklady antioxidantů a antioxidačních enzymů a jejich lokalizace v buňce jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 3: **Subcelulární lokalizace antioxidantů** (Piterková et al., 2005)

Antioxidant	Subcelulární lokalizace
Askorbát (vitamin C)	apoplast, cytosol, plastid, mitochondrie, peroxisom
β-Karoten	Plastid
Redukovaný glutathion	cytosol, apoplast, mitochondrie, plastid, peroxisom
Polyaminy (putrescin)	cytosol, mitochondrie, jádro, plastid
α-Tokoferol (vitamin E)	buněčné membrány
Zeaxanthin	Chloroplast

Tabulka 4: **Subcelulární a orgánová lokalizace antioxidačních enzymů** (Piterková et al., 2005)

Antioxidační enzym	Subcelulární a orgánové lokalizace
Askorbátperoxidasa	cytosol, stroma plastidů, membrána plastidů, mitochondrie, peroxisomy, apoplast, kořenové hlízky
Katalasa	Peroxisomy
Dehydroaskorbátreduktasa	cytosol, stroma plastidů, kořenové hlízky
Glutathionreduktasa	cytosol, mitochondrie, stroma plastidů, kořenové hlízky
Monodehydroaskorbátreduktasa	stroma plastidů, kořenové hlízky
Superoxiddismutasa	cytosol, peroxisomy, plastidy, kořenové hlízky, mitochondrie, plastidy

4.5 Glutathion

Na ochraně proti reaktivním formám kyslíku se podílí také glutathion, ten se v rostlinných organismech vyskytuje ve dvou formách a to jako redukovaný (GSH) a oxidovaný glutathion (GSSG) (Pophaly et al., 2012; Paradiso et al., 2008). Poměr obou forem je považován za indikátor působení oxidačního stresu (Anderson et al., 1998; Ogawa, 2005). Ve fyziologických podmínkách bývá tento poměr konstantní, nezávisle na celkové koncentraci glutathionu v rostlinné buňce. Působením stresových faktorů, v našem případě těžkých kovů, dochází k oxidaci GSH na GSSG. Po ukončení stresového faktoru se GSSG opět redukuje na GSH (Valko et al., 2007). Po dobu působení stresu na rostlinu je buňka schopna po určitou dobu regenerovat glutathion z jeho oxidované formy na redukovanou pomocí NADPH a enzymu glutathionreduktasa. Pokud je však stres příliš silný nebo působí-li dlouhou dobu, dochází obvykle ke smrti buňky, případně poté celé rostliny.

Glutathion je syntetizován z jeho základních aminokyselin a to z cysteinu a kyseliny glutamové dvoustupňovou cestou podobné té v jiných organismech jak jsou rostliny. První krok je katalyzován γ -glutamylcysteine synthasou a tvoří se γ -glutamylcystein. A druhý krok je katalyzován glutathionovou synthetasou a produktem je glutathion prostřednictvím přidání glycinového zbytku. Oba dva enzymy vyžadují pro svou činnost ATP (May et Leaver, 1994; Rawlins et al., 1995; Ullman et al., 1996).

Glutathion je díky svým vlastnostem tak specifickou sloučeninou, že nemůže být v rostlině funkčně nahrazen žádnou jinou sloučeninou s výjimkou svých homologů. Tyto homology mají obecný vzorec γ -glutamyl-cystein-X, kde X může být glycin, β -alanin, serin nebo glutamát podle druhu rostliny, ve které se nachází (Droux, 2004).

4.6 Askorbát

Askorbát je významným reduktantem mnoha volných radikálů, čímž minimalizuje poškození způsobené oxidativním stresem (Piterková et al., 2005). Je schopen se přímo zbavovat superoxidu, hydroxylových radikálů, singletového kyslíku a redukovat peroxid vodíku na vodu cestou askorbát-peroxidásové reakce (Blokhina et al., 2003).

4.6.1 Askorbát-glutathionový cyklus

Askorbát-glutathionový cyklus je komplexní proces, při kterém se peroxid vodíku rozkládá na vodu, spotřebovává se redukovaný askorbát a při jeho regeneraci pak dochází k oxidaci glutathionu. Celý proces je závislý na přítomnosti NADPH, který je využíván jako reduktant. Tento proces hraje důležitou roli při ochraně

chloroplastů i jiných buněčných součástí před oxidativním poškozením (Foyer et al., 1994).

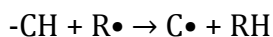
5. Vliv těžkých kovů na strukturu rostlinné buňky

Vlivem těžkých kovů dochází k rozsáhlým ultrastrukturálním změnám buňky. Vysoké koncentrace těžkých kovů způsobují změnu fluidity cytoplazmatické membrány, čímž se zvyšuje její propustnost a dochází ke zvýšenému úniku některých látek, jako jsou draselné kationty z cytoplazmy do apoplastu (Tarhanen et al., 1999). Mění v ní celkový obsah lipidů, jejich složení i stupeň nasycení (Tlustoš et al., 2006). Dále tento proces vede k poškození membránových proteinů, inaktivují se receptory, enzymy a iontové kanály (Tarhanen et al., 1999). Dochází i k rozsáhlým změnám v plastidech, především ke změnám tvaru a dezintegraci vnitřního membránového prostoru (Barceló et al., 1988).

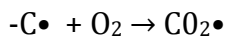
5.1 Peroxidace lipidů

Reaktivní formy kyslíku, jako například singletový kyslík, hydroxylové radikály a protonované formy superoxidového aniontu napadají lipidy. Zejména polynenasycené mastné kyseliny postranního řetězce membránových lipidů, jež obsahují dvojně vazby, jsou obzvláště citlivé na peroxidaci. Přítomnost dvojných vazeb oslabuje $-CH_2-$ vazby na atomu uhlíku sousedícím s dvojnou vazbou. Tyto methylenové skupiny nacházející se mezi dvojnými vazbami je možné lehce odstranit, jelikož jejichž vodíky jsou obzvláště reaktivní.

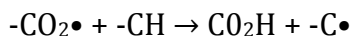
Reaktivní formy kyslíku zaútočí na atom vodíku z methylenové skupiny a vezme mu elektron a dochází k zahájení radikálové řetězové reakce.



Lipidový radikál je nestabilní, takže ihned reaguje s kyslíkem.



Mastné kyseliny postranního řetězce reagují s radikálem za vzniku lipidového peroxidu a dalšího radikálu, jež může dále napadat další mastné kyseliny postranního řetězce a šířit peroxidaci lipidů.



Řetězová peroxidace lipidů pokračuje do doby, než dojde k sloučení dvou radikálů nebo radikálu a antioxidantu a k vytvoření opět neradikálové sloučeniny (Devi et Prasad, 1999). Vzniklé lipidové peroxidy jsou nestabilní molekuly, a v následujících reakcích dochází k jejich rozkladu např. na malondialdehyd (Dietz et al., 1999).

Malondialdehyd je vysoce reaktivní tříuhlíkatý ketoaldehyd, který se může vázat aminovou nebo thiolovou skupinou na proteiny a nukleové kyseliny a tím je poškozovat (Grotto et al., 2009).

5.2 Inhibice fotosyntézy

Důsledkem akumulace iontů těžkých kovů je poškození a úbytek fotosyntetických pigmentů chlorofylů a karotenoidů, které vedou ke snížení rychlosti fotosyntézy. A právě snížení rychlosti fotosyntézy je pokládáno za jedno z nejčastějších poškození způsobených těžkými kovy.

Řada těžkých kovů ovlivňuje fotosyntézu. Ionty Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} a Hg^{2+} přímo ovlivňují fotosyntetický elektronový transportní řetězec a potlačují fixaci oxidu uhličitého. To je zapříčiněno třemi hlavními procesy a to:

1. oxidační štěpení chlorofylů a karotenoidů
2. oxidační poškození proteinů a membránových struktur
3. nahrazení kovovými kofaktory (Dietz et al., 1999)

Těžké kovy jsou schopné ovlivnit syntézu chlorofylů, poškozují enzymy potřebné pro biosyntézu chlorofylů, a jejich integritu (Bačkor et Fahselt, 2008). Prokázalo se, že zvýšený obsah kovů vede ke snížení obsahu chlorofylu *a* a ke zvýšení obsahu chlorofylu *b*. Z čehož vyplývá, že nedochází k výrazné změně obsahu chlorofylů v buňce, ale dochází především ke změně poměru chlorofylů *a* a *b* (Sheoran et al., 1990).

Důsledkem ztráty lipidů z membrán tylakoidů dochází ke snížení počtu gran a zvýšení počtu plastoglobulů v chloroplastech (Vassilev et al., 2004).

Závěr

Rostliny, ač jsou přisedlé organismy, se dokáží bránit vůči stresu vyvolanému těžkými kovy. Některé z kovů jsou v menších množstvích potřebné pro rostlinnou výživu, jsou důležité pro správný chod fotosyntézy, fixaci dusíku a další funkce. Jiné jsou pro rostliny nepotřebné a již při nízkých koncentracích toxické. Toxicita u některých těžkých kovů spočívá v podobnosti s esenciálními kovy, vyplývající z periodické tabulky prvků. Díky své podobnosti jsou tyto toxické kovy schopny nahradit esenciální prvky v proteinech, enzimech a aminokyselinách rostlin a znemožňovat jejich funkci. Mohou narušit rostlinnou homeostázu a vyvolat tak různé toxické příznaky. Například poruchy syntézy chlorofylu mající za následek chlorotické listy, poruchy fotosyntetických aktivit, malý vzrůst rostlin nebo účinky na kořenové ultrastruktury. Rostliny se snaží udržet si fyziologické koncentrace esenciálních kovových iontů a minimalizovat působení toxických kovů. Některé mechanismy se vyskytují u všech druhů, čímž způsobují toleranci na stresování těžkými kovy a jiné jsou cíleně určené pro konkrétní ionty těžkých kovů. Rostlinná buňka si vyvinula řadu mechanismů detoxifikace těžkých kovů. Patří tam například tvorba kořenových exudátů, vyvázání těžkých kovů v buněčné stěně a zamezení vstupu do buňky, jejich chelatace v cytosolu uskutečněná pomocí fytochelatinů, metalothioninů, organických kyselin či aminokyselin. Cílem je izolovat toxické ionty od citlivých buněčných složek. Tyto procesy mohou zahrnovat vyloučení určitého kovu z intracelulárního prostředí nebo sekvestraci, což je odloučení a následné uvolnění odumřelé části od živé. Při vlivu různých stresových faktorů na rostlinnou buňku, včetně působení těžkých kovů, vznikají reaktivní formy kyslíku. Současně se aktivují antioxidační obranné mechanismy. Pokud tyto mechanismy již nezvládají vychytávání reaktivních forem kyslíku, dochází ke vzniku tzv. oxidačního stresu, majícího destruktivní účinky na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny.

Seznam použitých zdrojů

Použitá literatura:

- [1] Allan D.L., Jarrell W.M. (1989): Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. *Plant Physiology* 89(3): 823–832
- [2] Anderson M.E. (1998): Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 1-14. ISSN: 00092797
- [3] Bačkor M., Fahselt D. (2008): Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis* 46 (1): 1–10. ISSN: 0334-5114
- [4] Artiushenko T., Syshchykov D., Gryshko V., Čiamporová M., Fiala R., Repka V., Martinka M., Pavlovkin J. (2014): Metal uptake, antioxidant status and membrane potential in maize roots exposed to cadmium and nickel, *Biologia* 69(9): 1142-1147 ISSN: 1336-9563
- [5] Barceló J., Vazquez M.D., Poschenrieder Ch. (1988): Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris L.*). *The New Phytologist* 108(1): 37-49
- [6] Bartosz, G. (1997): Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19(1): 47-64 ISSN: 0137-5881
- [7] Babula P., Opatřilová R., Kryštofová O., Zehnálek J., Adam V., Havel L., Kizek R. (2010): Význam a vliv mědi na rostliny. *Listy cukrovarské a řepařské* 126: 11
- [8] Beauford W., Barber J., Barringer A. R. (2006): Uptake and distribution of mercury within higher plants. *Physiologia Plantarum* 39(4): 261–265 ISSN: 0031-9317
- [9] Becher M., Talke I.N., Krall L., Krämer U. (2004): Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal* 37(2): 251-268 ISSN: 09607412
- [10] Blanco P., Tomé F.V., Lozano J.C. (2004): Sequential extraction for radionuclide fraction in soil samples: a company study. *Applied Radiation and Isotopes* 61(2-3): 345-350 ISSN: 09698043
- [11] Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003): Antioxidants, antioxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91(2): 179-194 ISSN: 03057364

- [12] Boyd R.S. (2007): The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil* 293(1-2): 153-176 ISSN: 0032-079x
- [13] Burkhead J.L., Reynolds K., Reynolds G., Abdel-Ghany S.E., Cochu C.M., Pilon M. (2009): Copper homeostasis, *New phytologist* 182(4): 799-816 ISSN: 0028646x
- [14] Burnell J.N. (1988): The biochemistry of manganese in plants. *Manganese in Soils and Plants* 33: 125-137 ISBN: 978-94-010-7768-2
- [15] Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G. (2006): Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11(1): 2-12 ISSN: 0949-8257
- [16] Cataldo D.A., McFadden K.M., Garland T.R., Wildung R.E. (1988): Organic constituents and complexation of nickel(II), iron(III), cadmium(II), and plutonium(IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology* 86(3): 734-739
- [17] Catty, P., Boutigny, S., Miras, R., Joyard, J., Rolland, N., Seigneurin-Berny, D. (2011): Biochemical characterization of AtHMA6/PAA1, a chloroplast envelope Cu(I)ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 286(42): 36188-36197 ISSN: 0021-9258
- [18] Clemens S. (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212(4):475-486 ISSN: 0032-0935
- [19] Clemens S., Palmgren M. G., Krämer U. (2002): A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7(7): 309-315 ISSN: 13601385
- [20] Clemens S. (2006): Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88(11): 1707-1719 ISSN: 03009084
- [21] Clemens S. (2006): Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* 163(3): 319-332 ISSN:01761617
- Cobbett C.S., Goldsbrough P. (2002): Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53(1): 159-182 ISSN: 1543-5008
- [22] Cobbett C.S., May M.J., Howden R., Rolls B. (1998): The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *The Plant Journal* 16(1): 73-78 ISSN: 0960-7412
- [23] Cobbett C.S. (2000): Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123(3): 825-832

- [24] Curie C., Cassin G., Couch D., Divol F., Higuchi K., Jean M., Misson J., Schikora A., Czernic P., Mari S. (2009): Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* 103(1): 1–11 ISSN: 0305-7364
- [25] Dan T.V., Krishnaraj S., Saxena P.K. (2002): Cadmium and nickel uptake and accumulation in scented geranium (*Pelargonium sp.* 'Fensham'). *Water, air, and soil pollution* 137(1/4): 355-364 ISSN: 00496979
- [26] Dat J.F., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57(5): 779–795 ISSN: 1420-682x
- [27] Deinlein U., Weber M., Schmidt H., Rensch S., Tramczynska A., Hansen T.H., Husted S., Schjoerring J.K., Talke I.N., Krämer U., Clemens S. (2012): Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation. *Plant Cell* 24(2): 708–723 ISSN: 1040-4651
- [28] Di Toppi L.S., Gabbrielli R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41(2): 105-130 ISSN: 00988472
- [29] Dietz K.J., Baier M., Kramer U. (1999): Free Radicals and Reactive Oxygen Species as Mediators of Heavy Metal Toxicity in Plants. *Heavy metal stress in plants* 43: 73 ISBN: 978-3-662-07747-4
- [30] Dietz K.J. (1996): Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany* 58: 221–254 ISBN: 978-3-642-64415-3
- [31] Droux M. (2004): Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* 79(3): 331-348 ISSN: 0166-8595
- [32] Fišer J., Nováková M., Macek T. (2014): Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. *Chemické listy* 108: 566-571
- [33] Foyer C. H., Descourvières P., Kunert K. J. (1994): Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17(5): 507-523 ISSN: 0140-7791
- [34] Freman J.L., Quinn C.F., Marcus M.A., Fakra S., Pilon-Smiths E.A.H. (2006): Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Current Biology* 16(22): 2181-2192 ISSN: 09609822

- [35] Freisinger E. (2008): Plant MTs-long neglected members of metallothionein superfamily. *Dalton Transactions* (47): 6663-6675 ISSN: 1477-9226
- [36] Gobel C., Feussner I., Rosahl S. (2003): Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *Journal of Biology Chemistry* 278(52): 52834-52840 ISSN: 0021-9258
- [37] Greenwood N.N., Earnshaw A. (1993): *Chemie prvků 2. díl, 1.vydání* Praha: Informatorium: 793 ISBN: 80-85427-38-9
- [38] Grill E. Winnacker E.L., Zenk M.H. (1985): Phytochelatins – the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230(4726): 674-676 ISSN: 00368075
- [39] Grotto D., Santa Maria L., Valentini J., Pamiz C., Schmitt G., Garcia S.C., Pomblum V.J., Batista J., Rochta T., Farina M. (2009): Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova* 32(1): 169-174 ISSN: 1678-7064
- [40] Guerinot M.L. (2000): The ZIP family of metal transporters. *Biochimica Biophysica Acta* 1465(1-2): 190–198 ISSN: 00052736
- [41] Halliwell B., Gutteridge M.C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem Journal* 219(1): 1–14
- [42] Hall J.L. (2002): Cellular mechanisms of heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53(366): 1–11
- [43] Hall J.L., Williams L.E. (2003): Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54(393): 2601 – 2613
- [44] Hasler D.W., Jensen L.T., Zebre O., Winge D.R., Vašák M. (2000): Effect of the two conserved prolines of human growth inhibitory factor (metallothionein-3) on its biological activity and structure fluctuation: comparison with a mutant protein. *Biochemistry* 39(47): 14567-14575 ISSN: 0006-2960
- [45] Heckathorn S.A., Mueller J.K., LaGuidice S., Zhu B., Barrett T., Blair B., Dong Y. (2004): Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91(9): 1312-1318
- [46] Heiss S., Wachter A., Bogs J., Cobbett Ch., Rausch T., (2003): Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany* 54(389): 1833-1839

- [47] Hocking P.J., Pate J.S. (1977) Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Annals of Botany* 41(6): 1259–1278
- [48] Jabeen R., Ahmad A., Iqbal M. (2009): Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanism. *The Botanical Review* 75(4): 339–364 ISSN: 0006-8101
- [49] Järup, L. (2003): Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68(1): 167–182 ISSN: 1471-8391
- [50] Joner E. J. (2000): Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil, Review* 226(2): 227-234 ISSN: 0032079x
- [51] Kabata-Pendias A., Pendias H. (2001): Trace elements in soils and plants, 3.vydání Florida: Boca Raton: 413 ISBN: 0849315751
- [52] Kagi J.H.R., Himmelhoch S.R., Whanger P.D., Bethune J.L., Vallee B.L. (1974): Equine hepatic and renal metallothioneins: purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. *Journal of Biological Chemistry* 249(10): 3537-3542
- [53] Kizek R., Vacek J., Adam V., Vojtěšek B., (2004) *Klinický biochemický metabolismus* 12: 72
- [54] Kojima Y., Berger C., Vallee B.L., Kagi J.H.R. (1976): Amino acid sequence of equine renal metallothionein 1B. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 73(10): 3413-3417
- [55] Korshunova Y.O. (1999): The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* 40(1): 37-44 ISSN: 01674412
- [56] Kotrba P., Najmanova J., Macek T., Ruml T., Mackova M. (2009): Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution, *Biotechnology Advances* 27(6): 799-810
- [57] Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. (1996): Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635–638
- [58] Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. (1995): Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29(5): 1232–1238 ISSN: 0013-936x
- [59] Lasat M.M. (2002): Phytoextraction of toxic metals. *Journal of Environmental Quality* 31(1): 109-120

- [60] Leea J., Reevesa R.D., Brooks R.R., Jaffr b T. (1977): Isolation and identification of a citratocomplex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 16(10): 1503–1505 ISSN: 00319422
- [61] Mackov M., Macek T. (2005): Využit rostlin k eliminaci xenobiotik z životnho prostředí. VŠCHT, OCHB
- [62] Mannara A. (2012): Plant responses to heavy metal toxicity. *Plants and Heavy Metals*: 27-53, ISBN: 978-94-007-4441-7 ISSN: 2191-5407
- [63] Marschner H. (1995): Mineral nutrition of higher plants. *Plant, cell and enviromental* 11(2): 147-148 ISSN: 0140-7791
- [64] Mathys W. (1977): The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zincrestance in herbage plants. *Physiologia Plantarum* 40(2):130–136 ISSN: 0031-9317
- [65] May M.J., Leaver C.J. (1994): *Arabidopsis thaliana*-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast and *Escherichia coli* homologs. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 10059–10063
- [66] Mendel R. R., Hansch R. (2002): Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Journal of experimental botany* 53(375): 1689-1698
- [67] Mikus M., Bobak M., Lux A. (1992): Structure of protein bodies and elemental composition of phytin from dry germ of maize (*Zea mays L.*). *Botanica Acta* 105(1): 26-33 ISSN: 09328629
- [68] Montanini B., Blaudez D., Jeandroz S., Sanders D., Chalot M. (2007): Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8(1):107 ISSN: 14712164
- [69] Mortvedt J.J. (1994): Plant and soil relationships of uranium and thorium decay series radionuclides – a review. *J Environ Qual* 23(4): 643–650 ISSN: 0047-2425
- [70] Neumann D., Lichtenberger O., Günther D., Tschiersch K., Novel L (1994): *Planta* 194(3): 360 ISSN: 0032-0935
- [71] Nevo Y., Nelson N. (2006): The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 1763(7): 609-620 ISSN: 01674889
- [72] Ogawa K. (2005): Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidants & Redox Signaling* 7(7-8): 973-981 ISSN: 1523-0864

- [73] Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. (1995): Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* 270(9): 4721–4728 ISSN: 0021-9258
- [74] Palit S., Sharma A., Talukder G. (1994): Effects of cobalt on plants. *The Botanical Review* 60(2): 149-181 ISSN: 0006-8101
- [75] Paradiso A., Berardino R., de Pinto M.C., di Toppi L.S.; Storelli M.M., Tommasi F., De Gara L. (2008): Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and Cell Physiology* 49(3): 362-374 ISSN: 0032-0781
- [76] Patra M., Sharma A. (2000): Mercury toxicity in plants. *The botanical review* 66(3): 379-422 ISSN: 0006-8101
- [77] Pedas P., Schjoerring J., Husted S. (2009): Identification and characterization of zinc-starvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(5): 377-383 ISSN: 09819428
- [78] Peroza E.A., Cabral A.S., Wanz X., Freisinger E. (2013): Metal ion release from metallothioneins: proteolysis as an alternative to oxidation. *Metallomics* 5(9): 1204
- [79] Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005) Oxidační stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu, *Chemické Listy* 99: 455 – 466
- [80] Pich A., Scholz G. (1996): Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* 47(1):41–47 ISSN: 0022-0957
- [81] Pophaly S.D., Singh R., Kaushik J.K., Tomar S.K. (2012): Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 11:114
- [82] Devi S. R., Prasad M.N.V. (1999): Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. *Heavy metal stress in plants: 99* ISBN: 978-3-662-07747-4
- [83] Rauser W.E. (1995): Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* 109(4): 1141–1149
- [84] Rauser W.E. (1999): Structure and function of metal chelators produced by plants - the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31(1): 19–48 ISSN: 1085-9195

- [85] Rawlins M., Leaver C.J., May M.J. (1995) Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding glutathione synthetase. FEBS Letters 376(1-2): 81-86 ISSN: 00145793
- [86] Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Rodriguez-Serrano M., Gomez M., del Río L.A., Sandalio L.M. (2007): Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. Journal of Plant Physiology 164(10): 1346-1357 ISSN: 01761617
- [87] Römheld V., Marschner H. (1986): Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiology 80(1): 175-180
- [88] Saber N.E., Abdel Moneim A.M., Barakat S.Y. (1999): Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. Biologia Plantarum 42(1): 65-73 ISSN: 00063134
- [89] Scandalios J.G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Advances in Genetic 28 (1): 2-35 ISBN: 012017628-9
- [90] Schröder P., Fischer C., Debus R., Wenzel A. (2003): Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (*Picea abies* L. Karst.) to heavy metals in pure mixture and in soil eluates. Environmental Science and Pollution Research 10(4): 225-234 ISSN: 0944-1344
- [91] Shah K., Nongkynrih J.M. (2007): Metal hyperaccumulation and bioremediation. Biologia Plantarum 51: 618-634
- [92] Sheoran I.S., Singal H.R., Singh R. (1990): Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan*) Photosynth Res 23: 345-351
- [93] Stephan U.W., Scholz G. (1993): Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? Physiologia Plantarum 88(3): 522-529 ISSN: 0031-9317
- [94] Steudle E., Frensch J. (1996): Water transport in plants: role of the apoplast. Plant and Soil 187(1): 67-79 ISSN: 0032-079x
- [95] Steveninck R.F.M, Barbare A., Fernando D.R., Steveninck M.E. (1994): The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. Plant and Soil 167(1): 157-164 ISSN: 0032-079x
- [96] Štípek S. (2000): Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, 1. vydání Praha: Grada: 314 ISBN: 80-7169-704-4
- [97] Šuman J., Kotrba P. (2010): Obecné aspekty detoxikace iontů těžkých kovů v rostlinách. Listy cukrovarské a řepařské 126: 407-408

- [98] Šupálková V., Petřek J., Havel L., Křížková S., Petrlová J., Adam V., Potěšil D., Babula P., Beklová M., Horna A., Kizek R. (2006): Electrochemical sensors for detection of acetylsalicylic acid. *Sensors* 6(11): 1483- 1497
- [99] Tarhanen S., Metsarinne S., Holopainen T., Oksanen J. (1999): Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environmental pollution* 104(1): 121-129 ISSN: 02697491
- [100] Tangahu B.V., Abdullah S.R.S., Basri H., Idris M., Anuar N., Mukhlisin M. (2011): A Review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 2011: 1-31 ISSN: 1687-806x
- [102] Tiffin L.O. (1970): Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudate of soybean. *Plant Physiology* 45(3): 280-283
- [102] Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I. (2000): Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporters family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 97(9): 4991–4996
- [103] Tlustoš P., Pavlíková D., Balík J. (2006) Mechanismus příjmu rizikových prvků a jejich hromadění v biomase. *Výzkumný ústav rostlinné výroby* 3(4)
- [104] Tůma J., Skalický M., Tůmová L., Šafránková M. (2010): Translocation of nickel in *Avena sativa*: The effect of accompanying mobile anions. *Fresenius Environmental Bulletin* 19(12): 2974-2980
- [105] Tůma J., Svojanovská H. (2015): *Avena sativa* cadmium content, distribution and toxicity in dependence on concentration of zinc and nickel in nutrient medium. *Fresenius Environmental Bulletin* 24(5): 1798-1803
- [106] Ullmann P., Gondet L., Bach T.J. (1996) Cloning of the *Arabidopsis thaliana* glutathione synthetase (GSH2) by functional complementation of a yeast *gsh2* mutant. *European Journal of Biochemistry* 236(2): 662–669 ISSN: 0014-2956
- [107] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): 44-84 ISSN: 13572725
- [108] Van Assche F., Clijsters H. (1986): Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Plant Physiology* 125(3-4): 355–360 ISSN: 01761617

- [109] Vassilev A., Lidon F., Scotti P., Da Graca M., Yordanov I. (2004): Cadmium-induced changes in chloroplast lipids nad photosystem activities in barley plants. *Biologia Plantarum* 48(1): 153-156 ISSN: 0006-3134
- [110] Viehweger K. (2004): How plants cope with heavy metals. *Botanical studies* 2014 55(1):35 ISSN: 1999-3110
- [111] Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D. M. (2009): Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1): 10–22 ISSN: 00988472
- [112] Wang J., Evangelou B.P., Nielsen M.T. (1992): Surface chemical properties of purified root cell walls from two tobacco genotypes exhibiting different tolerance to manganese toxicity. *Plant Physiology* 100(1): 496–501
- [113] Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. (2000): Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1465(1-2): 104-126 ISSN: 00052736
- [114] White P.J. (2012): Heavy metal toxicity in plants. *Plant stress physiology* 77:210-237 ISBN: 978-90-481-9369-1
- [115] Wojtaszek P. (1997): Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence response. *Acta Physiologiae Plantarum* 19(4): 581-589 ISSN: 0137-5881
- [116] Yang Z., Chu C. (2011): Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations* ISBN: 978-953-307-394-1

Internetové zdroje:

- Cizorodé prvky (2004): Ústav agrochemie a výživy rostlin, Brno. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/cizorode_prvky.htm
- Nutrient supply of plant (2011): Digitális Tankönyvtár. Dostupné z: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_01_no_venyelettan/ch02s02.html