

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta



Katedra experimentální biologie rostlin

Bakalářská práce

Specifika minerální výživy rostlin na hadcových půdách

Specifics of plant mineral nutrition on serpentine soils

Škopová Lucie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie

3.ročník

Vedoucí práce: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultanti práce: RNDr. Filip Kolář, Ph.D.

RNDr. Veronika Lipánová, Ph.D.

Mgr. Marek Šustr

Praha, 2023

Poděkování

Poděkování patří zejména mé školitelce RNDr. Editě Tylové, Ph.D za vstřícnost, předání mnoha cenných rad a obrovskou ochotu při spolupráci během psaní této bakalářské práce. Rovněž bych ráda poděkovala i konzultantům RNDr. Filipu Kolářovi, Ph.D., RNDr. Veronice Lipánové, Ph.D a Mgr. Marku Šustrovi za jejich užitečné odborné komentáře. A v neposlední řadě přísluší velké díky mé rodině a příteli za neskutečnou podporu, kterou mi po celou dobu poskytovali.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 2.5.2023

Lucie Škopová

.....

Abstrakt

Hadec je metamorfovaná ultrabazická hornina, na které se utváří substrát se specifickými kombinacemi vlastností zodpovědných za tvorbu typických nehostinných podmínek pro život rostlin. Charakteristické chemické složení hadcových půd spočívá v nízkém poměru Ca:Mg iontů, nízkém obsahu biogenních prvků (P, K, N) a naopak ve vysoké koncentraci těžkých kovů (Co, Cr, Ni). Život tamních rostlin stěžují ale i abiotické faktory v podobě skalnatého povrchu, mělké půdní vrstvy a nedostatku vody. Cílem této bakalářské práce bylo shrnout komplex charakteristického hadcového fenoménu, který v mnoha ohledech vytváří stres pro růst rostlin. Díky zmíněné specifitě se hadce vyznačují specifickou flórou a vegetací v čele s řadou endemitů. Práce je zaměřena na specifickou minerální výživu rostlin a shrnuje poznatky o mechanismech adaptace rostlin žijících na hadcovém substrátu. Zaměřila jsem se především na problematiku typického nízkého poměru Ca:Mg iontů v hadcové půdě a popsala funkce těchto prvků v rostlinách a stresové působení nadbytku Mg. Napříč celou touto prací se zároveň zabývám doposud identifikovanými mechanismy příjmu a transportu k hadcům relevantních živin v rostlinách. V závěru se zabývám schopnostmi rostlin přežít v hadcových půdách i přes velkou koncentraci těžkých kovů, popisuji působení nadbytku těžkých kovů, mechanismy adaptace rostlin na tento významný stresový faktor hadcových půd a naznačuji případné využití hyperakumulujících rostlin.

Klíčová slova: hadcové půdy, Ca:Mg poměr, minerální výživa, vápník, hořčík, těžké kovy

Abstract

Serpentine is a metamorphosed ultramafic rock on which a substrate with specific combinations of properties responsible for creating the typical inhospitable conditions for plant life is formed. The characteristic chemical composition of serpentine soils consists of a low ratio of Ca:Mg ions, low content of biogenic elements (P, K, N) and a high concentration of heavy metals (Co, Cr, Ni). Abiotic factors such as rocky surface, shallow soil and lack of water also hinder the life of local plant. The aim of this bachelor thesis was to summarize the complex of characteristic serpentine phenomenon that in many ways create stress conditions for plants growth. Thanks to this specificity, the serpentine areas are characterised by a specific flora and vegetation with a number of endemics. This work focuses on the specific mineral nutrition of plants and summarizes the knowledge on the mechanisms of adaptation of plants growing on serpentine substrates. I focused mainly on the typical low Ca:Mg ion ratio in serpentine soil and described the functions of these elements in plants and the stress effect of excess Mg. Throughout this work, I also address the mechanisms of uptake and transport of serpentine-relevant nutrients in the plants identified so far. In conclusion, I discuss ability of plants to survive in serpentine soils despite high concentrations of heavy metals, describe the effects of excess heavy metals, mechanisms of plant adaptation to this important stress factor of serpentine soils, and suggest possible applications of hyperaccumulating plants.

Key words: serpentine soils, Ca:Mg ratio, mineral nutrition, calcium, magnesium, heavy metals

Seznam použitých zkratek

ABA – kyselina abscisová (z angl. abscisic acid)

ABC – transportní protein s ATP vazebnou doménou (z angl. ATP-binding cassette)

ACA – vápenaté pumpy P typu (z angl. autoinhibited Ca^{2+} ATPases)

ACC – kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová

AtNRX1 – gen kódující xy v *Arabidopsis thaliana* (z angl. *nucleoredoxin Arabidopsis thaliana*)

CaM – kalmodulin (z angl. calmodulin)

CAX – $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiportér (z angl. cation exchanger)

CBL – proteiny podobné calcineurinu B (z angl. calcineurin B-like proteins)

CDF – proteiny usnadňující kationtovou difúzi (z angl. cation diffusion facilitator)

CDPK – Ca^{2+} dependentní proteinkinázy (z angl. Ca-dependent protein kinase)

CIPK – proteinkinázy interagující s CBL (z angl. CBL-interacting protein kinase)

CML – proteiny podobné kalmodulinu (z angl. calmodulin-like proteins)

CNGC – kanál řízený cyklickými nukleotidy (z angl. cyclic nucleotide gated channel)

DACC – depolarizací aktivované kationtové kanály (z angl. depolarization-activated cation channels)

FPN – ferroportin

GLR – homolog glutamátového receptoru (z angl. glutamate receptor)

GSH – glutathion

HACC – hyperpolarizací aktivované kationtové kanály (z angl. hyperpolarization-activated cation channels)

HMA – ATPáza asociovaná s těžkými kovy (z angl. heavy metal ATPase)

IREG/FPN – transportéry iontů kovů (z angl. iron regulated /ferroportin transporter)

IRT – transportér Fe^{2+} (z angl. iron regulated transporter)

KUP9 – transportér K^{+} (z angl. K^{+} uptake permease 9)

MGR – Mg^{2+} transportéry (z angl. Mg^{2+} release transporters)

MGT/MRS2 – transportér Mg^{2+} (z angl. magnesium transporter/mitochondrial RNA splicing 2)

MHX – $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiportér (z angl. magnesium proton exchanger)

MPT – transportéry iontů kovů (z angl. metal tolerance proteins)

PGPR – rhizobakterie podporující růst rostlin (z angl. plant growth promoting rhizobacteria)

RCA – kořenové kationtové kanály (z angl. root cation channels)

ROS – reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)

TPC – dvoupórové kanály (z angl. two-pore channels)

ZIP – transportéry Zn^{2+} a Fe^{2+} (z angl. zinc/iron-regulated transporter-like proteins)

Obsah

1. Úvod	1
2. Hadcové půdy	2
2.1 Vlastnosti hadců	2
2.2 Hadcové lokality	3
2.3 Rostliny hadcových lokalit	4
3. Poměr vápníku a hořčíku na hadcích	5
3.1 Význam vápníku (Ca) pro rostliny	7
3.2 Význam hořčíku (Mg) pro rostliny	10
3.3 Toxicita Mg	14
4. Přítomnost těžkých kovů na hadcích	17
4.1 Nikl (Ni) - význam pro rostliny a jeho nadměrné množství v hadcových půdách	18
4.2 Kobalt (Co) - jeho nadměrné množství u hadcových rostlin	21
4.3 Obranné mechanismy proti toxicitě těžkých kovů	23
5. Závěr	27
6. Seznam použité literatury	28

1. Úvod

Půdy hadcového charakteru tvoří pozoruhodný komplex vlastností ovlivňujících život tamních rostlinných společenstev. Hadce pokrývají pouze 1 % celkového povrchu Země a nikdy netvoří rozsáhlé ucelené celky, ale spíše ostrůvkovitá mikrostanoviště (Brady et al. 2005). Hadcový substrát vyniká zejména specifickými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, které podporují vznik rostlinných endemitních druhů a utváření charakteristických ekotypů (Bratteler et al. 2006). Pro většinu rostlin je tento substrát výzvou, některé v něm nedokáží přežít, a naopak jiné druhy mají schopnost se na hadce adaptovat a prosperovat tam, kde ostatní druhy neobstojí (Fitzsimons & Miller 2010). Mezi významné hadcové stresové faktory patří například nedostatek biogenních prvků (P, K, N), vysoká koncentrace těžkých kovů (Ni, Co, Cr) a pro hadce příznačný nízký poměr Ca:Mg iontů (Brady et al. 2005). Zjevné jsou i nepříznivé fyzikální podmínky, jako je špatná půdní tepelná vodivost, nízká dostupnost vody i mělký půdní profil. Hadcové rostliny jsou však schopné se těmito podmínkám vyrovnat prostřednictvím specifických fyziologických i morfologických změn tzv. serpentinomorfóz, které zahrnují například hlubší kořenový systém, xeromorfní struktury a celkovou zakrslost. Tyto viditelné změny v morfologii rostlin jsou však mnohdy přeceňované, jelikož ne vždy musejí být u adaptované populace přítomny.

Ovšem, chemické složení hadcových půd je hlavním limitujícím faktorem pro růst rostlin. Například již zmiňovaný nízký poměr Ca:Mg iontů patří mezi hlavní aspekty, kvůli kterým je hadcová půda považována za neúrodnou. Tyto dva esenciální prvky jsou v optimálních koncentracích důležité pro správný růst a vývoj rostlin. Na hadcích však rostliny musí umět reagovat na nízkou koncentraci vápníku, a naopak na nadměrnou až toxickou koncentraci hořčíku. K pochopení celkového vlivu hadcového fenoménu působícího na rostliny bylo nutné shrnout primární účinky zásadních makroživin, těžkých kovů a jejich identifikované mechanismy příjmu i transportu po rostlinách. Zaměřila jsem se na význam příjmu Ca a Mg pro rostlinu a toxicitu Mg. Velkou pozornost jsem ve své práci rovněž věnovala působení vysoké koncentrace toxických kovů (především Ni a Co) na serpentinfoyty a shromáždila jsem doposud známé poznatky o principu adaptace na tento stresový faktor. Adaptované rostliny reagují na přítomnost vysokého obsahu těžkých kovů jejich omezeným příjmem nebo naopak tolerancí k vysoké akumulaci kovových prvků přímo v rostlinných pletivech bez příznaků toxicity. Většina hadcových rostlin je vybavena širokým spektrem adaptačních mechanismů, které jim umožňují kolonizaci hadcových lokalit. Po celkovém shrnutí všech specifických stresových aspektů hadcových půd, lze na tyto půdy nahlížet jako na optimální modely pro studie související s adaptací rostlin na různé stresové podmínky.

Cíl práce: Cílem práce je shrnout teoretické poznatky o specifitě minerální výživy na hadcových půdách se zaměřením na nízký poměr Ca:Mg a nadbytek těžkých kovů, které jsou hlavními stresovými faktory působícími na těchto lokalitách.

2. Hadcové půdy

2.1 Vlastnosti hadců

Hadec (serpentin, křemičitan železnato-hořečnatý) je přeměněná ultrabazická hornina, která vzniká procesem zvaným serpentinizace. Vysoká hydratace původní ultramafické mateřské horniny, způsobí přeměnu prvotních minerálů (např. harzburgit či dunit) na minerály serpentínové (zejména chryzolit a antigorit), které v hornině dominují (Coleman 1971, Krám et al. 2009). Hadce tvoří rozptýlené edafické ostrůvky vyskytující se po celém světě, které pokrývají cca 1 % povrchu Země (Proctor 1999) a vytváří se na nich specifická hadcová půda. Jedinečnost hadcového substrátu spočívá především v komplexu specifických chemických i fyzikálních vlastností, které jsou pro mnoho rostlin nehostinné, a proto se lokality s hadcovým podložím vyznačují neobvykle řídkou vegetací, což nabízí adaptovaným rostlinám možnost života na místech s nízkou konkurencí (Rune 1953). Zdejší vegetace se skládá především z lokálně adaptovaných populací široce rozšířených rostlin a specializovaných endemických druhů, které se dokážou adaptovat a přežít stresové podmínky hadcového substrátu.

Fyzikální překážku pro rostliny taktéž činí poměrně strmý a skalnatý serpentínový povrch s kamenitými výchozy. Hadcová hornina je tmavá špatně tepelně vodivá hornina, jejíž teplota během dne značně kolísá a na níž vznikají velmi mělké půdní vrstvy, které jsou náchylné k častým erozím a odnosu živin, v jejichž důsledku je substrát výživově chudý (Bini et al. 2017). Dalším stresorem pro rostliny způsobeným strukturou hadcové půdy je minimální schopnost retence vody, což vede v některých oblastech ke zvýšenému suchu, na které musí rostliny reagovat efektivnějším hospodařením s vodou (Proctor & Woodell 1975).

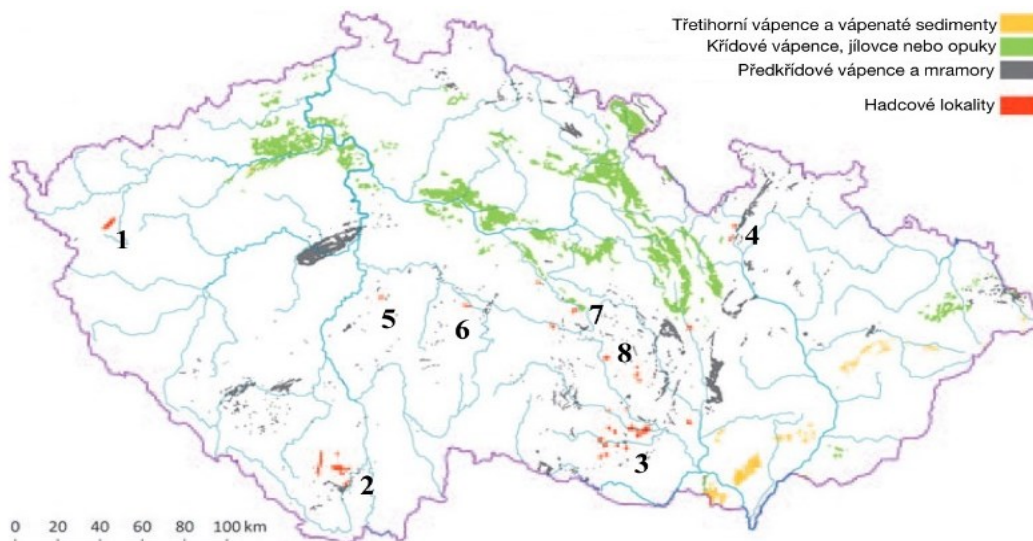
Primární chemismus hadcových stanovišť je definován nízkým obsahem vápníku a vysokým podílem hořčíku, což utváří specifický nízký poměr Ca:Mg (Main 1981). Příznačný je i nedostatek rostlinných makroprvků, jako je fosfor (P), draslík (K) a dusík (N) (Chiarucci et al. 1999, Brady et al. 2005, Drenovsky et al. 2013). Důležitým hadcovým jevem je také vysoké množství těžkých kovů, především kobaltu (Co), niklu (Ni) a chromu (Cr), které působí na většinu neadaptovaných rostlin toxicky (Kazakou et al. 2010, Vithanage et al. 2014). Výše zmíněné problematiky příznačné pro hadcové lokality budou více rozvedeny v dalších kapitolách. Podle Rajakaruna et al. (2004) můžeme nazvat kombinaci výše zmíněných nepříznivých edafických faktorů a rostlinných adaptací tzv. „hadcovým syndromem“, díky němuž se hadcové půdy řadí mezi neúrodné substráty s malou hustotou osídlení.

Charakteristická struktura hadcových oblastí se tedy vyznačuje zřetelně řidší vegetací s výraznými hranicemi s okolím (Rune 1953).

2.2 Hadcové lokality

Hadcové oblasti jsou rozšířené po celém světě i přesto, že pokrývají minimum plochy zemského povrchu (Oze et al. 2004). Právě typický výskyt hadců jako ostrovů v krajině stojí za jejich obrovskou diverzitou. Hadcová mikrostaniště můžeme nalézt po celém světě, jako například na Nové Kaledonii, v Kalifornii či na Kubě, která je významná zejména vysokým výskytem rostlin se schopností hyperakumulace kovů (nejméně 80 druhů) (Reeves et al. 1996, Harrison et al. 2006). Tyto oblasti jsou často ve středu pozornosti mnoha vědců zabývajících se výzkumem rostlinných adaptací, fyziologických procesů a slouží rovněž jako pozoruhodné modely v ekologii rostlin.

Na území České republiky se nalézá taktéž mnoho roztroušených ostrůvkovitých hadcových oblastí pokrývajících přibližně 0,1 % rozlohy naší země (Krám et al. 2009). Z nichž lze zmínit osm nejvýznamnějších lokalit: Slavkovský les, Kremežsko, Mohelno, Raškov, Mladá Vožice, Dolnokralovické hadce, Borek u Chotěboře a Staré Ransko (viz obrázek 1) (Kolář & Vít 2008). Největším a zároveň nejvýše položeným hadcovým komplexem u nás je Slavkovský les (Kolář & Petr 2008). Bohaté srážky na tomto území přispívají k okyselování půd, která je za normálních podmínek na hadcích spíše bazického charakteru. Díky této povaze lokality se zde vyskytuje především pokryv keřových vřesovišť, acidofilních borových lesů a na otevřených prostranstvích se vyvinuly travnaté plochy (Krám et al.



Geologická mapa ČR 1 : 50 000. (1) Slavkovský les, (2) Křemže, (3) Mohelno, (4) Raškov, (5) Mladá Vožice, (6) dolnokralovické hadce, (7) Borek u Chotěboře, (8) Staré Ransko

Obrázek 1: Mapa výskytu hadců. Hadcové lokality jsou červeně zvýrazněné a, čísla (1-8) na mapě značí nejvýznamnější hadcové lokality v ČR (Chytrý 2012).

2009). Za druhově nejbohatší serpentínovou lokalitu u nás je však považována hadcová step u Mohelna. Tato oblast je v porovnání s ostatními hadcovými lokalitami na území ČR výrazně floristicky bohatší (objeveno 620 druhů rostlin), k čemuž přispívá fakt, že se jedná u nás o nejnižše položenou hadcovou oblast (Kolář & Petr 2008).

2.3 Rostliny hadcových lokalit

Rostliny rostoucí na hadcích (tzv. serpentinyfyty) se liší od nehadcových druhů zejména zvýšenou mírou stresové tolerance a naopak sníženou schopností konkurence. Z tohoto důvodu jim vyhovuje nehostinné izolované prostředí hadců s nízkou hustotou rostlinných populací (Kruckeberg 1951). A proto, že hadce vytvářejí extrémní půdní podmínky pro rostlinnou říši, najdeme zde rozmanitou flóru, která je na specifické podmínky hadců adaptována, včetně řady endemických druhů. Vlivem rozdílných faktorů působících na jednotlivé hadcové lokality se každá oblast liší svými nepříznivými podmínkami, které napomáhají k utváření rozmanité druhové skladby (Harrison et al. 2000).

U rostlin, které jsou vystaveny stresovým podmínkám, jako jsou ty na hadcích, dochází k řadě morfologických či biochemických adaptací, které jim umožňují přežít. Jedná se o změny morfologické stavby či mechanismy umožňující tolerovat specifické výživové podmínky hadců. Pro již zmíněné morfologické modifikace u rostlin vzniklé pod selekčním tlakem hadcových specifických nároků byl zaveden odborný termín tzv. serpentinomorfózy (Novák 1928, cit v Proctor & Woodell 1975). Tyto změny nám umožňují nejlépe rozpoznat rozdíl mezi rostlinou rostoucí na hadcovém substrátu oproti jejím nehadcovým příbuzným. Existuje mnoho srovnávacích studií, které se zaměřily právě na porovnávání morfologie hadcových rostlin s těmi nehadcovými. Příkladem je zajímavá srovnávací studie morfologické stavby listů druhu *Eurya japonica*, konkrétně jedinců rostoucích na hadcové a nehadcové lokalitě, u nichž bylo zjištěno, že u hadcové populace došlo ke zmenšení velikosti průduchů i celkové plochy listů. Tloušťka listů se naopak zvýšila, což přispělo k lepší výměně plynů a minimalizaci ztrát vody (Shiba et al. 2022). Změny v podobě menší hustoty i velikosti průduchů byly objeveny i u mnoha dalších bylinných druhů hadcových rostlin (např. *Aster hispidus* var. *leptocladus*, *Adenophora triphylla* var. *japonica*), což vede k myšlence, že tato modifikace by mohla pravděpodobně být jednou z možných adaptací těchto rostlin na hadcové oblasti (Kumekawa et al. 2013). Důležitý doklad hadcové adaptace poskytly i přesazovací pokusy, díky nimž byl prokázán lepší růst hadcových rostlin na toxických půdách na rozdíl od kontrolních nehadcových druhů (Kruckeberg 1951, Konečná et al. 2022).

Mezi projevy adaptace, kterých si na rostlině všímáme jako první, patří její celková zakrslost (nanismus) a redukce listů či jiných nadzemních orgánů (Kruckeberg 1954). Pro rostliny na chudých hadcových substrátech je výhodnější více investovat do vyvinutějšího kořenového systému, který usnadňuje příjem nedostatkové vody a živin na úkor růstu nadzemní části (Brady et al. 2005). Rostliny spíše potlačují růst postranních kořenů a preferují dlouhé kořeny rostoucí co nejvíce do hloubky, které zlepšují dostupnost vody. V reakci na nízkou hladinu živin a na nedostatek vody v půdě dochází právě u některých hadcových rostlin k redukci velikosti a k tvorbě pravděpodobně celkově užších listů (Hayakawa et al. 2012). U mnoha druhů serpentinofytů se taktéž objevuje xeromorfní stavba těla, která je charakteristickou adaptivní reakcí rostlin na teplé a suché stanoviště, jako jsou právě některé aridnější hadcové lokality (Dudic et al. 2007). Xeromorfní listy bývají pokryty výraznou vrstvou kutikuly s epikutikulárními vosky omezujícími transpiraci, mají menší hustotu hlouběji zanořených průduchů (Ohga et al. 2012) a mnohdy mají husté odění v podobě trichomů chránících abaxiální stranu listů (Rotondi et al. 2003). Tento znak však nelze považovat za typicky hadcový jev, jelikož ne všechny hadcové oblasti jsou charakterizovány intenzivním suchem. To samé platí i pro přítomnost sukulentních struktur objevujících se u některých druhů hadcových rostlin (např. sukulentní keř *Euphorbia barnardii*) (Knowles & Witkowski 2000). Tyto rostliny mají mnohdy zdužnatělá pletiva umožňující hromadění zásob vody, tělo kryto voskem snižující ztráty vody a také disponují schopností udržovat metabolické aktivity i za podmínek sucha. Právě zpomalený metabolismus umožňuje rostlinám prodloužit dobu pohlavního vývoje, což taktéž přispívá k překonání drsných podmínek hadcových stanovišť (Proctor & Woodell 1975). Výše popsané modifikace jsou způsobené především vlivem vnějšího prostředí, ale mohou být i částečně geneticky fixované (Proctor & Woodell 1975). Proto populace rostlin na hadcové půdě poskytují možnost výzkumu genetické diferenciaci mezi nimi a nehadcovými druhy nebo populacemi (Westerbergh & Saura 1992). Pro tuto bakalářskou práci jsou nicméně stěžejní výživové aspekty života rostlin na hadcích, a to především vliv nízkého poměru Ca:Mg a mechanismy tolerance.

3. Poměr vápníku a hořčíku na hadcích

Mimořádně nízký poměr Ca:Mg v hadcových půdách je pravděpodobně jednou z hlavních příčin nehostinnosti hadcových půd, jak poprvé naznačili Loew et al. (1901). Charakteristickým faktorem, který zde hraje roli, je nadměrné až toxické množství hořčíku a naopak nedostačující množství vápníku. V této souvislosti je potřeba zmínit tzv. Loewův faktor, který udává poměr Ca:Mg iontů. Za optimálních podmínek by se měl tento molární poměr v půdě pohybovat nejméně okolo čísla 1, na hadcích však tato hodnota klesá až k číslu 0,4 (Kolář & Vít 2008). Tyto podmínky vyžadují, aby rostliny kolonizující hadcové lokality byly schopny adaptace k získávání adekvátního množství

nedostatkového Ca a aby zároveň potlačily toxicitu Mg. Jednou z vlastností serpentinofytů je právě selektivní příjem, tedy schopnost získávat dostatečné množství nedostupného prvku, díky přednostní absorpci vápníku před ostatními půdními kationty, v tomto případě především před hořčíkem (Whittaker 1954). Danou vlastnost prokazuje například srovnání s nehadcovými rostlinami, které touto schopností nedisponovaly (Walker et al. 1954). Rovněž u *Alyssum bracteatum* (hyperakumulátor Ni) byla pozorována schopnost udržovat vhodný poměr Ca:Mg tím, že rostlina dokáže přijímat Ca i za podmínek jeho nedostatečného množství v půdě (Ghaderian et al. 2007). Hadcové druhy rostlin oproti jejich nehadcovým příbuzným můžou mít vyšší poměr Ca:Mg iontů v listech, a to díky selektivnímu transportu Ca nebo inhibici Mg transportu z kořenů (O'Dell et al. 2006). Obdobné hypotézy se však vyskytovaly už i v dřívějších studiích, například u některých hadcových druhů *Agrostis stolonifera* (Kruckeberg 1954, Marrs & Proctor 1976). Byly provedeny i kultivační pokusy *in vitro* s různými poměry Ca:Mg s hadcovými i nehadcovými populacemi *Arabidopsis arenosa*. Na médiu se stresovým obsahem 0,04 Ca:Mg se dal pozorovat celkově lepší růst kořenů u původem hadcových rostlin, tyto rostliny měly navíc při nízkém poměru Ca:Mg delší primární kořeny a nižší hustotu postranních kořenů oproti nehadcovým rostlinám (Konečná et al. 2022). Tyto výsledky potvrdily fakt, že hadcové druhy rostlin na rozdíl od nehadcových jsou, díky adaptačním mechanismům, schopny na hadcové půdě lépe prosperovat. Obecně lze tedy říci, že pro správný růst a vývoj rostlin na hadcích je zásadní snaha udržovat v rostlinách homeostázu Ca^{2+} a Mg^{2+} (Tang & Luan 2017).

I přestože nízký poměr Ca:Mg je pro hadce příznačný, nelze jej považovat za striktně hadcový fenomén. Příkladem jsou pobřeží slaných vod, která obsahují vysoké množství Mg stejně jako hadcový substrát. Některé rostliny s adaptací na mořské oblasti mají tudíž větší předpoklad ke kolonizaci hadcových lokalit. To dokládá růst rostliny *Silene maritima* (silenka mořská), která je adaptovaná na mořské oblasti s vysokým Mg, a tato adaptace jí zároveň umožňuje relativně srovnatelnou schopnost růstu i na hadcích (Proctor 1971). Podobně i pobřežní rostlina *Armeria maritima* (trávníčka přímořská), která roste na mořských útesech a horninách s relativně vysokým obsahem hořčíku a těžkých kovů, byla nalezena i v několika hadcových oblastech (Proctor & Woodell 1971, Woodell & Dale 1993). Přínosný je taktéž výzkum autorů Taylor & Levy (2002), ve kterém byla zkoumána preadaptace rostlin usnadňující kolonizaci nových (hadcových) stanovišť. U druhu *Phacelia dubia* byla zjištěna vyšší tolerance k nízkému poměru Ca:Mg u variety *P. dubia* var. *georgiana* (endemit žulových oblastí) v porovnání s dalšími varietami stejného druhu z jiných stanovišť (*Phacelia dubia* var. *interior*, *Phacelia dubia* var. *dubia*). Kvocient Ca:Mg v jeho lokální půdě sice nepřevyšoval ten na hadcích, ale i tak byl nejméně o dva řády nižší v porovnání s normální půdou u zmiňovaných ostatních variet téhož druhu.

V tomto případě lze tedy rozdílné složení původních substrátů brát jako stěžejní ve schopnosti následné adaptace k toleranci vyššího Mg a nižšího Ca jako je na hadcích.

Pro objasnění stresového působení nízkého poměru Ca:Mg hadcových lokalit a mechanismů tolerance rostlin k tomuto faktoru je nezbytné nejprve představit význam obou těchto rostlinných esenciálních makroprvků. Pro rostlinné makroprvky je charakteristická jejich nenahraditelnost a nepostradatelnost v minerální výživě rostlin. Zastoupení jednotlivých biogenních prvků je nezbytné pro metabolické procesy a pro celkové dokončení životního cyklu rostlin. Tyto prvky jsou rostlinou přijímány převážně z půdy ve formě iontů nebo anorganických sloučenin prostřednictvím kořenů (Marschner 2012). V prostředí, kde obsah minerálních látek v půdě a jejich příjem rostlinou dosáhne nadměrného množství, musí rostliny zareagovat příslušnými obrannými mechanismy. Způsob, jakým rostliny snižují stres z toxického prostředí může být například ukládání iontů do vakuol nebo přímo vylučování iontů z buněk (Gao et al. 2015).

3.1 Význam vápníku (Ca) pro rostliny

Vápník je pro rostlinu nepostradatelným makroprvkem s mnoha funkcemi. V biologii rostlin mu je věnována velká pozornost, a to zejména pro jeho dvě nejvýznamnější základní funkce – úloha intracelulárního druhého posla při přenosu signálů (Scrase-Field & Knight 2003, Yang & Poovaiah 2003) a stavební funkce. Rostlinami je vápník (ve formě kationtu Ca^{2+}) přijímán z půdního roztoku pasivně a pletivy kořene se pohybuje především apoplastem. Přes endodermis je transportován symplastem, do endodermálních buněk vstupuje pasivně pomocí Ca^{2+} kanálů na plazmatické membráně, poté je aktivně vyložen do apoplastu středního válce a dále rozváděn do nadzemních částí xylémovým transpiračním proudem (White 1998, White et al. 2002, Gilliam, Dayod, et al. 2011). Následná akumulace Ca^{2+} v rostlinném těle probíhá v listech a stoncích, kde je většinou lokalizován v apoplastu, a naopak v cytoplazmě je udržována velmi nízká koncentrace Ca^{2+} asi kolem $0,1 \mu\text{M}$, a to kvůli jeho roli v přenosu signálu (Piñeros & Tester 1995, Stael et al. 2012). Za regulaci nízké koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě jsou primárně zodpovědné membránové transportéry vápníku (především vápenaté pumpy – Ca^{2+} ATPázy), které zajišťují aktivní transport Ca^{2+} z cytoplazmy do apoplastu, např. do prostoru buněčné stěny nebo do vakuoly (Evans et al. 1991). Do cytoplazmy Ca^{2+} vstupuje pasivně iontovými kanály. Vápníkové kanály jsou v rostlinách lokalizovány na mnoha místech, v tonoplastu, chloroplastech, endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně, a i v jaderných membránách (Sanders et al. 2002). Zatím bylo u rostlin identifikováno několik typů kanálů pro pasivní vstup vápníku do cytoplazmy: napětově řízené kanály, kam patří depolarizací aktivované kationtové kanály DACC (depolarization-activated cation channels) a hyperpolarizací aktivované kationtové kanály HACC

(hyperpolarization-activated cation channels) (Hamilton et al. 2000, Kiegle et al. 2000), napětově nezávislé kanály řízené změnou turgoru anebo kanály řízené vazbou ligandu například inositoltrifosfátu (Davenport & Tester 2000). HACC pravděpodobně hrají roli v přísunu Ca^{2+} iontů v důsledku reakce na ABA (kyselina abscisová), a DACC přispívají k transportu Ca^{2+} v reakci na abiotické faktory např. chlad (Thion et al. 1998). Za zmínku stojí i neselektivní kationtové kanály GLR (glutamate receptor), které rovněž napomáhají rostlinám při snižování stresu z chladu nebo při vápníkové výživě (Meyerhoff et al. 2005). Do rodiny napětově řízených kationtových kanálů patří také dvoupórový kanál TPC1 (two-pore channels 1), který se podílí v buňkách listů *A. thaliana* na napětově aktivovaném přítoku Ca^{2+} (Furuichi et al. 2001). TPC1 je exprimován v celé rostlině *A. thaliana*. Mezi role tohoto vakuolárního kanálu TPC1 lze zahrnout např. regulaci klíčení semen a pohyb průduchů (Peiter et al. 2005). Na základě porovnání hadcových a nehadcových populací některých rostlin (např. u *Arabidopsis arenosa* a *Arabidopsis lyrata*) (Arnold et al. 2016) se předpokládá, že by funkce kanálů TPC1 společně s dalšími iontovým transportéry, jako je transportér KUP9 (K^+ uptake permease 9), mohla souviset s adaptací rostlin na hadcové půdy (Turner et al. 2010, Konečná et al. 2021). Transportér KUP9 má v rostlinách mnoho funkcí: zajišťuje distribuci K^+ v listech i absorpci K^+ v kořenech (Yamanashi et al. 2022) a podílí se rovněž na regulaci růstu primárních kořenů prostřednictvím homeostázy draslíku (K) především v reakci na jeho nízkou dostupnost (Zhang et al. 2020).

K otevření vápenatých kanálů a k vylití většího množství vápníku do cytoplazmy dochází v okamžiku přijetí signálu, což následně v buňkách vyvolává řadu biochemických reakcí (Hetherington & Brownlee 2004). Aktivita vápenatých kanálů je stimulována například změnou membránového potenciálu (depolarizací/hyperpolarizací) či jinými podněty (mechanické, hormonální, abiotický stres či patogeny) (McAinsh & Pittman 2009, Jammes et al. 2011). Jakožto druhý posel vápník přenáší přicházející signál a následně mění činnost cílových proteinů (Marschner 2012). Tuto funkci plní díky schopnosti měnit konformaci Ca^{2+} vazebných proteinů, jako je kalmodulin (CaM), Ca^{2+} dependentní proteinkinázy (CDPK, Ca-dependent protein kinase), proteiny podobné kalmodulinu (CML, calmodulin-like proteins) a proteiny podobné calcineurinu B (CBL, calcineurin B-like proteins) (Wang et al. 2007), na které se v cytoplazmě dokáže navázat (Cheng et al. 2002, White & Broadley 2003, Mohanta et al. 2017). Ca^{2+} se podílí na různých typech reakcí včetně reakcí na světlo, zasolení, mechanický stres a změny teploty. Jedním z konkrétních příkladů signální dráhy vápníku je jeho vliv společně s kyselinou abscisovou na zavírání průduchů při nedostatku vody v prostředí (Allen et al. 2001). Důležité je následné ukončení signální dráhy a deaktivace činnosti kanálů po předání signálu. Dochází k aktivnímu odčerpání vápníku z cytoplazmy do apoplastu, za účelem obnovení nízké cytoplazmatické koncentrace. Na čerpání vápníku z cytoplazmy do vakuoly se podílejí zejména vápenaté pumpy P typu

ACA (autoinhibited Ca^{2+} ATPases) nebo $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiportéry CAX (cation exchanger) (Cheng Ning-Hui & Hirschi 2003) lokalizované v tonoplastu (Conn & Gilliam 2010, Gilliam, Athman, et al. 2011). ACA je typ vysoko-afinitních Ca^{2+} pump, které realizují primární aktivní transport, k němuž využívají energii ve formě ATP, a jsou stimulovány kalmodulinem. Zároveň ACA mohou být lokalizované i na plazmalemě, kde zajišťují transport ven z buňky (do apoplastu buněčné stěny). CAX naopak realizují sekundární aktivní transport-antiport, k němuž využívají protonový gradient vytvořený H^{+} pumpami, a jsou aktivovány fosforylací nebo navázáním jiného interagujícího proteinu. U mutantů *cax1* je zároveň prokázána spojitost s tolerancí k vysokému množství hořčnatých iontů, ta vede k potřebě většího příjmu Mg pro správný růst a vývoj rostlin (Cheng et al. 2003, Bradshaw 2005). CAX1,3 společně s kanálem řízeným cyklickými nukleotidy CNGC2 (cyclic nucleotide gated channel) lokalizovaným na plazmatické membráně brání toxickému hromadění apoplastického a cytosolického vápníku v rostlinných buňkách (Wang et al. 2017). Role CNGC kanálů byla popsána např. v udržování homeostáze Ca^{2+} v listovém mezofylu, kde se CNGC2 podílí na transportu Ca^{2+} z apoplastu do mezofylových buněk, či na růstu pylové láčky (CNGC18) (Frietsch et al. 2007). K jejich aktivaci dochází navázáním cAMP a cGMP (cyklický adenosinmonofosfát a guanosinmonofosfát) a k inhibici dochází navázáním kalmodulinu s Ca^{2+} na CNGC v důsledku blokace vazebné domény pro cyklické nukleotidy (Hua et al. 2003).

Jak už bylo uvedeno výše, Ca je v rostlině lokalizován primárně v apoplastu, ve vakuole, uvnitř endoplazmatického retikula, nejvíce však v prostoru buněčné stěny. Podstatná část vápníku (až 90 %) může být rovněž v rostlině uložena ve vakuolách ve specializovaných buňkách idioblastech ve formě krystalů štavelu vápenatého (Kostman et al. 2001). Tyto krystaly mají mechanickou funkci v ochraně proti herbivorům a zároveň zřejmě mohou sloužit jako interní zásobárna vápníku (Franceschi & Nakata 2005) nebo dokonce i uhlíku (Tooulakou et al. 2016) pro fotosyntézu při uzavřených průduších. Uvažuje se také o možné úloze těchto krystalů v toleranci (detoxifikaci) vůči alespoň některým kovům, které se na krystaly mohou vázat (Pongrac et al. 2018). Tento mechanismus tolerance mimo jiné spočívá v navazování kovů při tvorbě krystalů, konkrétně například v inkorporaci Al u rostliny *Corchorus olitorius* (Mazen 2004).

V souvislosti s nízkým obsahem vápníku v hadcové půdě je nutné zde také shrnout projevy deficiencie tohoto prvku u rostlin, které se s tímto faktorem na rozdíl od serpentinofytů neumí vypořádat. Deficiencie vápníku v rostlinách obecně způsobuje poruchy v růstu vegetativních vrcholů a poškozuje rostlinné meristémy. Obecně se příznaky nedostatku vápníku objevují jako první v mladších vyvíjejících se částech, a to z důvodu špatné mobilizace vápníku ze starších do mladších částí rostliny (neschopnost redistribuce vápníku floémem) (Tang & Luan 2017, Thor 2019). Viditelným

projevem u rostlin je zejména deformace rostlinného těla (kroucení listů, lámání stonků či praskání plodů), usychání špiček listů a hniloba části plodů (White & Broadley 2003). Za fenotypové deformace rostlinného těla je zodpovědná především dezintegrace buněčných stěn, která souvisí se stavební funkcí vápníku v buněčné stěně. Zde se vápník podílí na zesíťování molekul pektinů interakcí s jejich záporně nabitými karboxylovými skupinami. Vápník rovněž stabilizuje buněčné membrány interakcí s fosfolipidy a membránovými proteiny (Tuna et al. 2007, Marschner 2012). Rostlinná pletiva s oslabenými buněčnými stěnami jsou více náchylná k patogenním nákazám (Yamazaki et al. 2000) a hnilobám (Sugimoto et al. 2010). Nedostatečné množství vápníku se projevuje i v podobě chudšího kořenového systému, jelikož se snižuje tvorba a prodlužování kořenů. U hadcových rostlin, které jsou stěžejní pro tuto práci, nicméně zmíněné projevy nedostatku Ca^{2+} rostlin nenajdeme, protože jsou na nedostatek vápníku adaptovány.

3.2 Význam hořčíku (Mg) pro rostliny

Hořčík (Mg) je 8. nejrozšířenějším prvkem na Zemi a pro rostliny představuje jeden z esenciálních makroprvků nezbytný pro jejich růst a vývoj (Guo et al. 2015). V rostlinách se Mg hromadí ve vakuolách, chloroplastech, mitochondriích, ale nachází se i volně v cytosolu, kde je nejhojněji zastoupeným bivalentním kationtem (Marschner 2012). Mg je významným pro svoji schopnost tvořit různé stabilní komplexy a interagovat s nukleofilními ligandy. Komplexy utváří například s velkým procentem celkového cytosolického ATP a ADP, což je důležité pro mnoho rostlinných enzymatických reakcí (Lin & Nobel 1971, Hermans et al. 2013, Gout et al. 2014). Hořčík se kovalentně váže v zelených pletivech (15-20 % celkového Mg v buňce) v molekule chlorofylu, kde má funkci jako jeho centrální strukturní atom nezbytný pro fotosyntézu (Knoop et al. 2005, Marschner 2012). V ní hraje roli především při přenosu energie, ale slouží také jako kofaktor řady enzymů, jako je například enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza), který je klíčový pro fixaci CO_2 v Calvinově cyklu (Guo et al. 2015, Erb & Zarzycki 2018, Shao et al. 2021). Mg rovněž napomáhá stabilizaci 3D struktury ribozomů i konformaci nukleových kyselin, což je nezbytné pro aktivitu nukleáz a polymeráz (Sreedhara & Cowan 2002).

U rostlin žijících v prostředí, kde trpí nedostatečným příjmem Mg, dochází rovněž k řadě fyziologických problémů. Rostliny například začnou odbourávat chlorofyl, čímž dojde ke chloróze listů mezi žilnatinou, nekróze v podobě skvrn a k následnému předčasnému stárnutí (Guo et al. 2016). K degradaci chlorofylu patrně dochází v důsledku mnoha faktorů např. vytvářením reaktivních forem kyslíku ROS (reactive oxygen species) při nedostatku Mg, čemuž se rostliny mohou bránit zvýšenou tvorbou antioxidantních složek (Cakmak & Marschner 1992). Projevy nedostatku se na rozdíl od vápníku

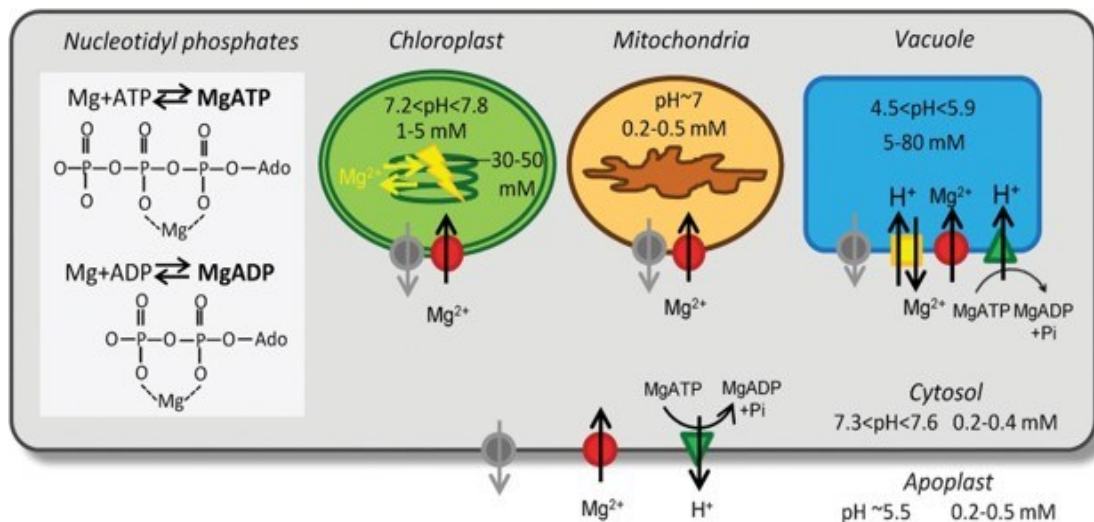
projevují zejména ve starších částech rostlin, a to díky dobré mobilitě a reutilizaci hořčíku v rostlinném těle. V důsledku deficiencie dochází k narušení transportu asimilátů do sinku, jelikož Mg^{2+} je nezbytný pro činnost ATPázy, která hraje stěžejní roli v nakládání sacharózy (Cakmak et al. 1994, Hermans et al. 2005). Důsledkem je klesající obsah škrobu v pletivech a rovněž porucha distribuce sacharidů po rostlině. Nedostatek tohoto prvku může rovněž vést k zastavení syntézy proteinů, jelikož Mg funguje při agregaci podjednotek ribozomů (Cammarano et al. 1972). K nedostatku Mg v půdě poměrně často přispívá přítomnost ostatních konkurenčních půdních iontů (K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+) a nižší pH půdy, což je typické zejména u rostlin v tropických oblastech s vysokými teplotami (Marschner 2012, Guo et al. 2015).

Na buněčné úrovni bylo doposud identifikováno několik transportérů hořčíku, u některých z nich však jejich funkce zůstává do jisté míry spekulativní (viz obrázek 2). Jedná se primárně o zástupce rodiny transportérů MGT/MRS2 (magnesium transporter/mitochondrial RNA splicing 2) (Saito et al. 2013) zahrnující doposud 10 členů, které zajišťují příjem a distribuci Mg^{2+} v rostlinách (Li et al. 2016). MGT/MRS2 geny kódující transportní proteiny hořčíku byly identifikovány například u druhu *Arabidopsis thaliana* a bylo u nich zjištěno, že se jedná o homology k bakteriálnímu kanálu CorA (pojmenovanému podle jeho odolnosti vůči Co^{2+}) propouštějícímu Mg^{2+} (i Ni^{2+} a Co^{2+}) ionty přes membránu (Moomaw & Maguire 2008, Marschner 2012). Z půdy je Mg rostlinami přijímán ve formě dvojmocného kationtu, který je dobře rozpustný ve vodě, a tudíž snadno absorbovatelný. U *A. thaliana* je do příjmu Mg^{2+} z prostředí zapojeno několik transportérů MGT/MRS2 rodiny, např. transportér MGT6/MRS2-4, MGT7/MRS2-7 nebo MGT1/MRS2-10, jehož gen je exprimován v epidermálních buňkách a v trichomech listů (Mao et al. 2014). MGT1/MRS2-10 se zároveň může podílet i na distribuci jiných dvojmocných kationtů (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}), avšak s nižší afinitou (Li et al. 2001). Za podmínek nízké koncentrace Mg^{2+} v substrátu dochází v kořenech *A. thaliana* ke zvýšení exprese MGT6/MRS2-4, čímž se zvýší efektivita příjmu, což svědčí o tom, že přítomnost transportéru MGT6/MRS2-4 je potřebná pro adaptaci rostlin na prostředí s nedostatkovým Mg (Mao et al. 2014). Role transportéru MGT7/MRS2-7 v absorpci Mg do kořenů a v regulaci buněčné homeostáze je patrná především v podmínkách nedostatku Mg, protože *mgt7/mrs2-7* mutantní rostliny vykazují vyšší citlivost k nízkému Mg např. v podobě pomalejšího růstu (Gebert et al. 2009). Význam MGT transportérů v příjmu Mg^{2+} z prostředí byl dokumentován i u dalších rostlinných druhů. Např. u rýže (*Oryza sativa*) OsMGT1 zvyšuje příjem Mg^{2+} a zároveň tím potlačuje toxicitu hliníku (Al). Mg^{2+} , který se dostává do rostliny, soupeří s Al^{3+} o vazebná místa v rostlinných buňkách, čímž reguluje toxicitu hliníku, způsobující např. inhibici růstu kořenů (Chen et al. 2012). Také ZmMGT6 u kukuřice (*Zea mays*) hraje roli v příjmu Mg^{2+} . Transgenní rostlina *A. thaliana*, která ve zvýšené míře exprimuje gen *ZmMGT6*, vykazuje delší kořenový

systém, vyšší obsah chlorofylu a v porovnání s kontrolní rostlinou roste lépe právě za podmínek nízké koncentrace Mg (Li et al. 2017). Rovněž u citronečníku *Poncirus trifoliata* dokáže transportér PtrMGT5, lokalizovaný na plazmatické membráně, zvyšovat absorpci Mg, čímž se zvyšuje vitalita rostlin kolonizujících prostředí s nízkým obsahem hořčíku (Liu et al. 2019). Kromě MGT transportérů se nicméně předpokládá také zapojení jiných transportních proteinů ve vstupu Mg^{2+} do rostliny. Těmi jsou vápníkové kationtové kanály RCA (root cation channels), které se nacházejí na plazmatické membráně kořenových buněk a propouštějí řadu dvoumocných kationtů (Piñeros & Tester 1993).

Na dlouhou vzdálenost je Mg^{2+} v rostlině transportován xylémem i floémem. Do nadzemních částí je Mg přenášen transpiračním proudem vody v xylému, který zahrnuje výdej Mg do apoplastu ve středním válci kořene. Floémem je umožněna recyklace Mg^{2+} v rostlině. U *A. thaliana* jsou do alokace Mg z kořenů do prýtu zapojeny například čtyři Mg^{2+} transportéry MGR (Mg^{2+} release transporters) (MGR4-MGR7) lokalizované na plazmatické membráně (Meng et al. 2022). U transportérů MGR4 a MGR6 byla potvrzena jejich role v nakládání Mg^{2+} do transpiračního proudu, což dokládají výsledky pokusu na mutantech *mgr4* a *mgr6*, které vykazovaly vysokou hladinu Mg^{2+} v kořenech a nízkou koncentraci v prýtu (Bakshi & Gilroy 2022). Na nakládání do xylému se zřejmě podílí i některé MGT/MRS2 transportéry, např. u *A. thaliana* se jedná o transportér MGT9/MRS2-2 (Gebert et al. 2009), a u rýže to mohou být pravděpodobně transportéry OsMGT2 s OsMGT6 (Chaudhry et al. 2021). Pro nakládání Mg do xylému i pro jeho další distribuci je důležitý vakuolární Mg^{2+}/H^+ antiportér MHX1 (magnesium proton exchanger) lokalizovaný na tonoplastu, který se zároveň podílí i na udržování homeostázy Mg v cytoplazmě, což je podstatné pro optimální růst rostlin (Shaul et al. 1999).

Podstatná je také správná distribuce Mg^{2+} mezi jednotlivé kompartmenty buňky a regulace homeostázy Mg^{2+} v cytoplazmě. Na regulaci homeostázy Mg^{2+} se v *A. thaliana* podílejí např. již zmiňované transportéry MGT6/MRS2-4 a MGT7/MRS2-7, které v případě vysokého obsahu hořčíku v rostlině přispívají k toleranci Mg^{2+} toxicitě prostřednictvím zvýšené akumulace a vakuolární sekvestrace (Yan et al. 2018). Tyto hypotézy byly podpořeny experimenty s mutantem *mgt6/mrs2-4*, které prokázaly jeho přecitlivělost na stres způsobený vysokou hladinou Mg i naopak velmi nízkou koncentrací (viz obrázek 3) (Yan et al. 2018). To tedy naznačuje, že MGT6/MRS2-4 transportér má dvě funkce v závislosti na stavu prostředí (Oda et al. 2016). Právě sekvestrace Mg^{2+} do vakuoly je pro toleranci klíčová a jsou v ní zapojeny i další MGT/MRS2 transportéry, např. MGT2/MRS2-1 a MGT3/MRS2-5, které jsou lokalizované na tonoplastu a umožňují akumulovat větší množství vakuolárního Mg (Gebert et al. 2009, Conn et al. 2011). Vysoké množství Mg^{2+} v hadcové půdě koreluje se zvýšenou expresí *MGT2/MRS2-1* a *MGT3/MRS2-5* v rostlinách, což snižuje míru toxicity Mg.

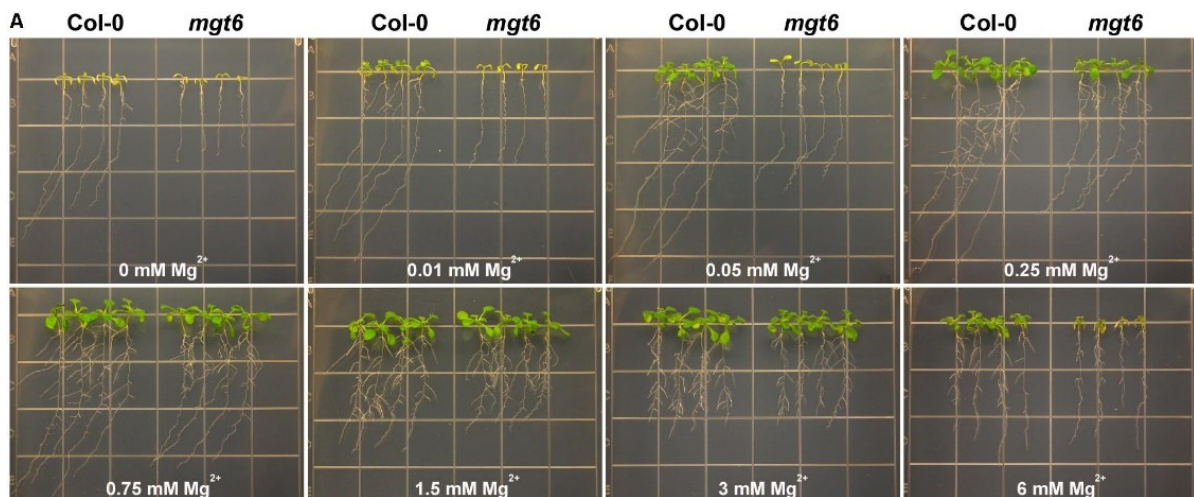


Obrázek 2: Schéma zobrazující rostlinou buňku s vyznačenými transportéry hořčíku (barevně značené – identifikované / šedě značené – spekulativní transportéry). Uvedena je velikost pH a koncentrace celkového množství Mg v chloroplastech, mitochondriích, vakuolách, cytosolu a apoplastu. Přehled mechanismů homeostáze hořčíku (Hermans et al. 2013)

U rostlin byl rovněž vyvinut signální mechanismus, který umožňuje kontrolu aktivity transportu Mg, která se zdá být úzce spojena se signalizací Ca^{2+} . Jedná se o vápníkovou signalizační dráhu CBL-CIPK (calcineurin B-like protein – CBL-interacting protein kinase), která zajišťuje spojení mezi stavem živin v prostředí a aktivitou transportérů. Ukázalo se, že CIPK kinázy jsou schopné udržovat netoxickou hladinu Mg v cytoplazmě tím, že interagují s přenašeči Mg^{2+} na tonoplastu, fosforylují je a ovlivňují tak vakuolární sekvestraci Mg^{2+} iontů (Tang & Luan 2017). Kináza CIPK23 se navíc rovněž podílí na inhibici nadměrné koncentrace kovů v cytosolu tím, že dokáže regulovat také aktivitu transportéru IRT1 (iron regulated transporter 1), který se podílí na transportu Fe i jiných těžkých kovů (Zn, Co, Cd) (Dubeaux et al. 2018). Dokonce by se dalo hovořit o této kináze jako o takovém hlavním regulátoru řady transportních procesů, jelikož se podílí i na regulaci transportérů pro K^+ , NH_4^+ a další ionty (Ródenas & Vert 2021).

Co se týká transportu Mg do dalších kompartmentů buňky, i do něho jsou zapojeny především transportéry z rodiny MGT/MRS2. Do chloroplastů jsou u *A. thaliana* Mg^{2+} nejspíše translokovány například pomocí vysoko afinitních transportérů MGT10/MRS2-11, MGT1/MRS2-10 nebo nízko-afinitního MGT7/MRS2-7 (Drummond et al. 2006). U transportéru MGT1/MRS2-10 byla objevena jeho úloha jednak v přísunu Mg iontů do buněk mezofylu listů a jednak v translokaci Mg^{2+} do chloroplastů. U mutantních rostlin bez funkčního transportéru MGT1/MRS2-10 docházelo k defektům fotosyntézy či snížení obsahu chlorofylu, objevovala se u nich např. žlutě zbarvená zesíťovaná žilnatina listů (Sun et al. 2017). Obdobnou funkcí disponuje pravděpodobně i kanál CNGC10, který zprostředkovává

transport Mg^{2+} i Ca^{2+} (Conn et al. 2011), a poskytuje tak fotosyntéze dostatečné množství hořčíku. Transport Mg je rovněž zajištěn i z cytosolu do mitochondrií, což umožňuje např. transportér MGT5/MRS2-6 (Li et al. 2008). MGT5/MRS2-6 transportér je lokalizován v mitochondriích a je podstatný i pro samčí fertilitu a správný vývoj pylu, právě v něm dochází k expresi *MGT5/MRS2-6* i několika dalších genů rodiny MGT/MRS2 nezbytných pro rostlinou reprodukci (Chen et al. 2009, Xu et al. 2015, Yan et al. 2018).



Obrázek 3: Experimenty s mutanty *mgt6* reagujícími na nedostatek i nadbytek Mg^{2+} . Zobrazeny jsou viditelné fenotypové projevy růstu mladých semenáčků *A. thaliana* pěstovaných na jednotlivých médiích s uvedenou koncentrací Mg^{2+} po dobu deseti dnů. *Mgt6* mutantní rostliny na médiích s nízkou hladinou hořčíku (0,01, 0,05 i 0,25 mM) vykazovaly oproti divokému typu kratší primární kořeny a celkový zakrslejší vzrůst. Relativně srovnatelný růst *mgt6* mutanta v porovnání s divokým typem nastal pouze v případech střední hladiny Mg^{2+} (0,75, 1,25 a 3 mM). Naopak na mediích s vysokým obsahem Mg^{2+} (6 mM) *mgt6* mutantní semenáčky *mgt6* rovněž vykazovaly nižší celkovou hmotnost a nízký obsah chlorofylu (Yan et al. 2018).

3.3 Toxicita Mg

Z hlediska zaměření této bakalářské práce je stěžejní problematika toxicity Mg. Hořčík je jedním z esenciálních makroprvků, avšak jeho nadbytek na rostliny působí coby další stresový faktor. V půdních roztocích se koncentrace Mg pohybuje v rozmezí mezi 0,13-8,5 mM (Guo et al. 2016) a za optimální množství Mg ve vegetativních částech rostlin je považována hodnota okolo 1,5-3,5 g/kg. Nadměrné množství hořčíku je pak specificky určeno pro každý jednotlivý rostlinný druh podle toho, při jaké hladině Mg v půdě začne rostlina měnit svůj fenotyp. V přírodě není toxicita hořčíku častá a hadcové půdy z tohoto hlediska představují zajímavou výjimku (Brady & Weil 2008).

S ohledem na nízký poměr Ca:Mg v hadcové půdě Proctor (1971) předpokládal, že toxicita hořčíku v hadcovém substrátu může být podmíněna nízkým množstvím Ca, protože po jeho přidání toxicita Mg ustupovala. Později bylo zjištěno, že vyšší koncentrace hořčíku v půdě u některých druhů rostlin je naopak nezbytná k tomu, aby rostlina mohla přijímat dostatečné množství tohoto prvku (Main 1974). Tato myšlenka byla následně podpořena i v autorově novější práci, ve které studoval druh trávy *Poa curtifolia* vyskytující se na hadcových půdách, která potřebuje k optimálnímu růstu dokonce extrémně nadměrnou koncentraci Mg (Main 1981). Tento názor byl rovněž podepřen srovnávacími experimenty u endemitních rostlinných druhů z iránské hadcové oblasti (*Alyssum murale*, *Cleome heratensis*) s nehadcovým druhem *Cleome foliolosa*. V prýtu těchto hadcových druhů byla zaznamenaná mnohem vyšší koncentrace Mg než v nehadcových druzích (Asemaneh et al. 2007).

V případě, že se rostliny s podmínkami nadměrné koncentrace hořčíku nedokážou vypořádat, dochází u nich v reakci na toxicitu Mg k mnoha různým fenotypovým projevům. U rostlin citlivých na vysoké množství Mg je především patrná inhibice růstu primárních kořenů a celkově snížená produkce biomasy (Oda et al. 2016). Projevy sníženého růstu byly popsány např. ve studii zabývající se *mgt6/mrs2-4* a *mgt7/mrs2-7* mutanty *A. thaliana*, ze které následně vyplynul fakt, že Mg^{2+} transportéry MGT6/MRS2-4 a MGT7/MRS2-7 hrají významnou roli v adaptaci rostlin na podmínky vysokého obsahu Mg. Přítomnost vysokého obsahu hořčíku v rostlině může také pravděpodobně narušit funkci ATP a některých enzymů, a to v případě, že není udržena stabilní koncentrace Mg^{2+} v cytoplasmě (Hermans et al. 2013). Uvnitř rostliny může rovněž dojít k nadměrné degradaci škrobu způsobené zaprvé zvýšenou expresí genů kódujících enzymy degradující škrob (např. α -amylázu AMY1 a β -amylázu BAM1), nebo za druhé sníženou transkripcí genů kódujících enzymy syntézy škrobu (např. glukosyltransferáza GBSS1) (Guo et al. 2015). V chloroplastech může dojít k narušení fotosyntetické aktivity a tvorbě ROS, a tudíž k degradaci některých složek chloroplastů, např. chlorofylu. To potvrdil ve své práci Rao et al. (1987), který zjistil, že fotosyntéza byla více inhibována v listech slunečnice s vyšším obsahem Mg než u listů s jeho nízkou koncentrací.

Guo et al. (2014) ve své studii zkoumal roli fytohormonů v odpovědi rostliny na toxicitu Mg. Zjistil, že kyselina abscisová (ABA) a proteiny DELLA, které jsou negativními regulátory působení giberelinů, mohou reagovat na signalizaci toxické koncentrace hořčíku v rostlinách. Výzkum u *A. thaliana* prokázal zvýšenou syntézu ABA při nadměrném obsahu hořčíku v rostlině stimulovanou proteiny DELLA, což mělo pod vlivem toxicity Mg za následek inhibici růstu rostliny. Jejich přímá funkce v Mg toxicitě není doposud zcela objasněna, ale proteiny DELLA se v souvislosti s Mg toxicitou mohou pravděpodobně podílet například i na zvýšené degradaci škrobu a rovněž negativně ovlivňují MGT5/MRS2-6 transportéry. Nicméně co se týká základních molekulárních mechanismů reakce rostlin

na toxicitu Mg, tak v porovnání s mechanismy odpovědi na nedostatek Mg o nich máme prozatím shromážděno celkově jen málo informací.

Pro rostliny kolonizující hadcové lokality je však typická jejich schopnost tolerovat nízký poměr Ca:Mg v půdě. Během kolonizace hadcových půd se proto u nich musely vyvinout mechanismy bránící projevům toxicity Mg. Jednou z možností, jak už bylo výše uvedeno, je přímá tolerance rostlin k vysokému obsahu Mg, nebo dokonce potřeba jeho vyšší koncentrace ke správné absorpci (Main 1974). Druhou variantou může být taktéž výše zmíněná selektivita příjmu iontů anebo uskladnění většího množství Mg přímo v rostlině (Kazakou et al. 2008). Jako zásobárny Mg iontů slouží především vakuoly, ve kterých rostlina uskladňuje nadměrné množství hořčíku bez účinků toxicity. Tang et al. (2015) se ve své práci zabýval funkcí signalizačních vápník vazebných proteinů (CBL) lokalizovaných na tonoplastu, které se při vysokém obsahu Mg^{2+} v rostlinných buňkách podílejí na regulaci vakuolární sekvestrace Mg^{2+} iontů. Jak už bylo výše zmíněno, v transportu hořčíku do vakuoly hrají u *A. thaliana* roli transportéry MGT2/MRS2-1 a MGT3/MRS2-5. Akumulace podstatné části přijímaného Mg probíhá ve vakuolách buněk listového mezofylu, což koreluje se zvýšenou přítomností transportérů hořčíku z rodiny MGT/MRS2 (Conn, et al. 2011, Gilliam et al. 2011). Pro transportér MGT6/MRS2-4 byla objevena jeho role v příjmu Mg^{2+} do cytosolu buněk listů, ze kterého je následně pomocí tonoplastových transportérů hořčíku sekvestrován do vakuol (Yan et al. 2018).

Zajímavostí je, že nedávná studie objevila schopnost fosfolipázy Dα1 (PLDα1) podílet se na stresové reakci na podmínky vysokého obsahu hořčíku prostřednictvím regulace homeostázy K^+ (Deepika & Singh 2022). Dokladem byly pokusy na *pldα1* mutantovi *A. thaliana*, u kterého docházelo k citlivým reakcím v podobě snížené délky primárního kořene a celkově nižší hmotnosti rostliny (Kocourková et al. 2020). Vysokou koncentrací hořčíku se zabývala i studie, z jejíž výsledků vyplývá, že gen *AtNRX1* (*nucleoredoxin Arabidopsis thaliana*) v *Arabidopsis thaliana* při vysoké koncentraci Mg^{2+} iontů negativně ovlivňuje příjem Ca. U mutantů *atnrx1-1* a *atnrx1-2* byla pozorována vyšší cytosolická koncentrace Ca^{2+} v podmínkách toxicity Mg. Funkce NRX1 proteinu ještě není zcela vyjasněn, ale bylo zjištěno, že *AtNRX1* je zároveň koexprimován s genem *MGT4/MRS2-3*, který kóduje transportér Mg^{2+} , což ukazuje na jejich vzájemnou interakci. Tato hypotéza vedla k myšlence možného šlechtění se zaměřením na tento gen s cílem vyšlechtit rostliny odolné vůči nadměrnému množství Mg odpovídající hadcům (Niu et al. 2018). Za zmínku stojí i zajímavý výzkum související s úvahami o kolonizaci Marsu, který naznačuje možnou důležitost již zmiňovaných Ca^{2+} transportérů CAX v toleranci k toxicitě hořčíku, konkrétně k síranu hořečnatému, který je značně obsažen v půdách na Marsu (Visscher et al. 2010). Právě vysoké množství dostupného hořčíku v hadcových substrátech vzbuzuje zdánlivou

podobnost s půdami s vysokým obsahem síranu hořečnatého na Marsu, jenž má v nadbytku na rostliny rovněž fyto toxické účinky.

4. Přítomnost těžkých kovů na hadcích

Těžké kovy, též nazývané „potencionální toxické prvky“ (Pourret & Hursthouse 2019), nemají přesnou definici, podle které by se daly zařadit do jedné vymezené skupiny. Jedna z mnoha definic řadí všechny prvky s hustotou vyšší než $4,5 \text{ g/cm}^3$ do skupiny těžkých kovů. Podle jiné se však za těžké kovy považují kovy o hustotě vyšší než 5 g/cm^3 (Nieboer & Richardson 1980). Jak bylo již výše zmíněno, v hadcovém substrátu se těžké kovy (zejména Ni, Co, Cr) často vyskytují v mnohem větším množství než v běžných nehadcových půdách. Avšak existují i další substráty bohaté na kovy, jako jsou například půdy vzniklé po lesních požárech s vysokým obsahem Mn, Cu, Zn (Bartkowiak & Lemanowicz 2017), či substráty vzniklé sopečnou činností bohaté na Hg, Cd, Ni a Cr (Doelsch et al. 2006).

Některé těžké kovy v rostlinách fungují jako esenciální makroprvky nezbytné pro růst a vývoj (např. Fe, Mn, Cu, Zn, Ni), musí však být zastoupeny v optimálním množství. Tyto kovy jsou rostlinou přijímány z půdy prostřednictvím specifických transportérů. Řada těžkých kovů však funkcí esenciálního prvku nedisponuje, nicméně i přes tento fakt jsou tyto kovy schopné do rostlin do jisté míry proniknout. Jejich vstup je zprostředkováván díky ne zcela selektivním transportérům jiných mikroprvků (především Fe a Zn) a taktéž díky chemické podobnosti mezi ionty. Do skupiny transportérů kovů můžeme řadit: transportéry Zn^{2+} a Fe^{2+} ZIP (zinc/iron-regulated transporter-like proteins), transportéry CDF (cation diffusion facilitator), mezi něž patří i transportéry iontů kovů MPT (metal tolerance proteins), dále ATPázy těžkých kovů HMA (heavy metal ATPase), transportní proteiny ABC (ATP-binding cassette) s ATP vazebnou doménou a některé další. Proteiny MPT (nejznámější je MPT1 účastníci se transportu Zn z cytosolu do vakuol) jsou H^+ antiportéry bivalentních kationtů, které se podílejí na řadě rostlinných fyziologických funkcích, jako je například kontrola distribuce nebo tolerance k nadbytku těžkých kovů. Obecně všechny tyto transportéry kovů zastávají v rostlinách mnoho funkcí, zprostředkovávají příjem kovů, zajišťují jejich kompartmentalizaci, či se podílejí na sekvestraci a regulaci homeostázy. Rovněž i ATPázy P typu (HMA) se účastní tolerance vůči toxicitě těžkých kovů tím, že je nakládají do xylému pro transport z kořenů do prýtu (Hussain et al. 2004, Mills et al. 2005). V nadzemní části jsou kovy následně transportovány xylémem do listů, kde se různým způsobem ukládají, což je druhově specifické. U rostlin schopných tolerovat vyšší obsah kovů v pletivech jsou tyto kovy především sekvestrovány do vakuol (Boyd et al. 2000, Hall 2002).

Typickými fyto toxickými těžkými kovy pro hadce jsou nikl, kobalt a chrom, které mají v nadbytku negativní vliv na předem neadaptované rostliny. Příznaky toxicity mohou být dvojího typu:

za první je považována chloróza způsobená indukovaným nedostatkem železa a druhým typem je přímý účinek daného kovu, jehož následkem může být například zakrnělý růst (Hunter & Vergnano 1952). Primárním efektem toxicity kovů může být také omezený příjem ostatních důležitých živin, což má dopad na buněčné děje, například na proces buněčného dělení, který může být následně i zastaven. Na první pohled nás na přítomnost těžkých kovů v těle rostliny může upozornit již zmiňovaný celkový zakrslý vzrůst a chloróza listů. Chlorózu a její příčinu způsobenou vysokým obsahem Ni a Co zkoumali například Hunter & Vergnano (1952) u rostlin ovsu. Na listech se po několika dnech po přidání nadbytku Ni i Co začala objevovat intervenční chloróza s následnou nektrózou podobnou té, kterou způsobuje nedostatek železa. Ze získaných výsledků vyvodili, že nadbytek Co a Ni má na listy ovsu téměř stejný dopad, avšak s tím rozdílem, že Ni má větší intenzitu působení než Co. Většina studií zabývajících se toxicitou těžkých kovů u hadcových druhů směřuje spíše k výzkumu enormního množství Ni a Co, které jsou, na rozdíl od taktéž nadměrně zastoupeného Cr v hadcové půdě, snadno dostupné pro rostliny. Důvodem špatné dostupnosti chromu pro rostliny je jeho chemická forma, ve které se v půdě vyskytuje, jelikož v ultramafických horninách je zastoupen především v téměř nerozpustné formě chromitu (Kazakou et al. 2008). Stejně tak i já se v této bakalářské práci dále zaměřuji primárně na podstatnější a doposud více prozkoumané těžké kovy hadcových substrátů, tedy nikl a kobalt.

4.1 Nikl (Ni) - význam pro rostliny a jeho nadměrné množství v hadcových půdách

Nikl je na základě jeho velmi snadné rozpustnosti v půdě jedním z nejrozšířenějších, a tudíž nejdostupnějších těžkých kovů obsažených v rostlinách, přesto nebylo doposud potvrzeno zapojení specifických transportérů v jeho příjmu do rostliny. Ni zajišťuje v rostlinách v nízkém množství některé fyziologické funkce, ale jeho potenciál souvisí zejména se schopností fytoasimilace spojené s konkrétním rostlinným druhem (Brankovic et al. 2017). Je řazen mezi esenciální mikroprvky, ale jediná esenciální úloha Ni v rostlinách, která byla prozatím identifikována, je funkce kofaktoru v enzymu ureáze, který je v přírodě zapojen do koloběhu uhlíku a dusíku (Freyermuth et al. 2000). Ureáza je enzym, který štěpí močovinu na hydrogenuhličitan a amoniak. Jedná se o doposud jediný objasněný protein obsahující Ni u rostlin. Účastní se například katabolismu proteinů, štěpí močovinu vznikající např. rozkladem argininu. Hojně se vyskytuje např. v semenech některých rostlin čeledi Fabaceae a Pinaceae (Polacco et al. 2013). Může se zřejmě také podílet na zpracování močoviny přijaté z vnějšího prostředí. Metabolický proces močoviny však není nezbytným pro růst rostlin, pokud mají k dispozici i jiné zdroje dusíku. To bylo například potvrzeno v pokusech na mutantních sójových semenech bez aktivity ureázy, které i tak dokončily svůj životní cyklus (Polacco et al. 1982). O úloze ureázy v rostlinách se poprvé ve své práci zmínil Dixon et al. (1975), který zkoumal roli Ni ve fazolích. Při dostatečném množství Ni v rostlinách se aktivita ureáz zvyšuje, což vede k sníženému vzniku nektróz

a k nižší akumulaci močoviny (Eskew et al. 1984, Marschner 2012). Existuje pravděpodobně ještě další enzym (nikl-dependentní hydrogenáza) obsahující Ni, jehož funkce zlepšující fixaci dusíku v rostlinných symbiontech nepřímo pozitivně ovlivňuje růst rostlin. Diskuse se vedly i ohledně úlohy niklu v odolnosti některých rostlin vůči chorobám, to by mohl umožnit vliv Ni na některé antipatogenní látky (fenolické látky nebo terpeny) (Wood & Reilly 2007).

Co se týká příjmu a transportu Ni, předpokládá se, že jsou do něho zapojeny některé neselektivními transportéry jiných kovů, například transportéry Zn^{2+} a Fe^{2+} z rodiny ZIP konkrétně např. IRT1 (iron-regulated transporter) u *A. thaliana*, které jsou ovšem primárními přenašeči Fe^{2+} (Nishida et al. 2011). Jak bude i níže zmíněno, neselektivní transportér IRT1 zlepšuje absorpci i dalších kovů, jako je Ni či Co, za podmínek deficiencie Fe. Translokace Ni z kořenů do prýtu probíhá xylémem, ovšem není objasněn fakt, zda je Ni nakládán v podobě volných iontů, nebo společně s ligandem. Spekulovalo se např. o funkci histidinu v nakládání Ni do xylému, tato funkce však nebyla potvrzena u neakumulujících rostlin, a tudíž by u hyperakumulujících druhů musel být vyvinut speciální transportér, který by u jiných druhů naopak chyběl (Kerkeb & Krämer 2003). Známa je role histidinu při potlačení sekvestrace Ni ve vakuolách buněk kořenů, díky čemuž se zlepší mobilita Ni. Ni je nakládán do xylému a transportován do prýtu, kde se sekvestruje zejména v listech (Deng et al. 2018). A co se týče následného vykládání Ni z xylému, opět neznáme konkrétní transportér, který by byl za to zodpovědný, možné je však zapojení transportérů z rodiny ZIP (Van der Pas & Ingle 2019). Existují důkazy i o transportu Ni do mladších listů prostřednictvím floému, to dokládá přítomnost většího množství Ni ve floémové šťávě u některých hadcových dřevin (např. *Phyllanthus balgooyi*) (van der Ent & Mulligan 2015).

Za podmínek vysoké hladiny Ni, jako je například ta v hadcovém substrátu, se stává nikl toxickým (Homer et al. 1991). Ve standardních půdách se koncentrace Ni uvádí v rozmezí 5,5-38,6 ppm, avšak v hadcových půdách je tato hladina až 100krát vyšší. Je známo, že koncentrace niklu v rostlinách takřka koresponduje s obsahem kobaltu a chromu, který patří taktéž k typickým hadcovým kovům (Baker & Brooks 1989). Studie hadcových druhů rostlin identifikovaly zhruba u 360 druhů vyšší koncentraci Ni než 1 g/kg a valná většina z nich (až 90 %) byla určena za hadcové endemity (Kazakou et al. 2008). U těchto druhů rostlin (např. *Alyssum bracteatum*) muselo dojít k určité adaptaci umožňující rezistenci vůči zmíněnému stresu z vysokého množství Ni (Ghaderian et al. 2007). Princip, jakým se rostliny mohou zbavovat nadbytku Ni, může spočívat v jeho přímém vyloučení, to rostlinám umožňuje opad listů. Pokud je Ni v rostlině ve velké koncentraci, naváže se na vazebná místa v buněčné stěně listů, nebo se dokonce může akumulovat v trichomech – například u hadcového endemita *Alyssum inflatum* – a při opadu listů pak Ni odchází z těla rostlin (Ernst 1972, Ghasemi et al. 2009). Dalším ze způsobů, jakým rostliny reagují na vysoký obsah Ni, je jeho hyperakumulace společně

s organickými látkami, jako jsou například kyselina citrónová a jablečná, které společně vytvářejí stabilnější organo-kovový komplex, čímž usnadňují transport kationtů do vakuol (Lee et al. 1978, Altinözlü et al. 2012). Rovněž chelatace s těmito ligandy zjevně podporuje snížení toxicity, právě jejich schopnost chelatace v cytosolu umožňuje potlačení aktivity volných iontů (Bhatia et al. 2005). Hyperakumulátoři niklu mají oproti běžným rostlinám často celkově vyšší požadavky na množství niklu. Například hadcové druhy *Alyssum murale* a *Alyssum bracteatum* prokazovaly zlepšenou schopnost růstu při zvýšené hladině (0,01 mM) Ni v půdním roztoku (Asemaneh et al. 2006).

U většiny druhů probíhá akumulace Ni zejména v pokožce prýtu, kde je hlavním místem sekvestrace vakuola. U *Arabidopsis thaliana* může být sekvestrace Ni do vakuol zprostředkována transportéry iontů kovů IREG/FPN (iron regulated /ferroportin transporter), které jsou využívány primárně pro transport jiných kovů. Například *IREG2* je exprimován pouze v kořenech při nedostatku železa, což dokládá snížená tolerance Ni u mutanta *ireg2* při nízké dostupnosti Fe (Schaaf et al. 2006) a zároveň vyřazení tohoto transportéru vedlo ke zvýšené citlivosti k nadbytku Ni (Merlot et al. 2014). *IREG2* je lokalizovaný na tonoplastu a podílí se na vakuolární sekvestraci Ni v kořenech, čímž omezuje translokaci Ni z kořenů do prýtu. U rostliny *Psychotria gabriellae* se uplatňuje při akumulaci Ni ve vakuole transportér *PgIREG1* pocházející ze stejné rodiny. *PgIREG1* je u *P. gabriellae* exprimován především v prýtu. Hladina exprese je navíc výrazně vyšší než u příbuzného druhu *P. semperflorens*, který schopnost hyperakumulace Ni nemá (Merlot et al. 2014). Vnesení genu *PgIREG1* do *A. thaliana* navíc vede k výraznému zvýšení tolerance k nadbytku Ni v mediu (viz obrázek 4). Ve spojitosti s tím můžeme



Obrázek 4: Kultivace rostlin *A. thaliana* divokého typu (Col), *ireg2* mutantních rostlin (*ireg2-1*) a *ireg2* mutantních rostlin exprimujících gen *PgIREG2* z *Psychotria gabriellae* (*PgIREG1-GFP*) na mediu obsahujícím 30 μM NiCl_2 po dobu 12 dní. Výsledky měření akumulace Ni v kořenech prokázaly fakt, že mutace *ireg2-1* vedla ke snížení akumulace niklu v kořenech, ale při expresi *PgIREG1-GFP* došlo naopak ke zvýšení koncentrace niklu v kořenech a prýtech (Merlot et al. 2014).

zmínit i homologní gen *NcIREG2*, který u rostliny *Noccaea caerulescens* přispívá k akumulaci Ni tím, že zlepšuje jeho sekvestraci do vakuol v kořenech, ale neomezuje tím translokaci Ni do listů (García de la

Torre et al. 2021). To stejné se ale nedá říci o hadcovém druhu *Noccaea japonica*, u kterého zvýšená exprese *IREG2* potlačuje translokaci Ni z kořenů do prýtu. Oba tyto druhy se vyznačují zvýšenou tolerancí k Ni, avšak u druhu *N. caerulescen* v porovnání s *N. japonica* byla viditelná chloróza listů, způsobená právě účinnější translokací Ni z kořenů do nadzemních částí (Nishida et al. 2020).

Nikl se obecně koncentruje nejvíce v listech, kde u nehadcových populací ve větším množství způsobuje rozptýlenou chlorózu a nekrózu listů (Vergnano & Hunter 1953). To platí zejména pro nehadcové druhy rostlin, které neumí zareagovat na podmínky vyšší koncentrace kovů, a tudíž se u nich objevují i další příznačné defekty například v podobě zhoršeného růstu, inhibice buněčného dělení a také dochází k poruchám expanze buněk v dělivém pletivu kořenů (Robertson & Meakin 1980).

Některé hypotézy vedou k závěru, že vnitřní obsah Ca a Mg u hadcových rostlin může přispívat k toleranci Ni, avšak fyziologické mechanismy této hypotézy nejsou zcela prozkoumány (Gabbrielli & Pandolfini 1984). Stejně tak i v pozdějších studiích byl navržen možný vztah mezi akumulací iontů Ni, Mg a Ca v rostlinách. Například u rostlin z Maroka byla nalezena pozitivní korelace mezi obsahy Ni a Mg v rostlině. Korelační koeficient mezi nimi v nadzemních částech rostlin byl roven 0,65, čímž vědci naznačili fakt, že rostliny z ultramafických půd se s vysokým obsahem Mg a Ni vyrovnávají shodnými mechanismy (Ater et al. 2000, Pędziwiatr et al. 2018). Naopak v jiných studiích zkoumajících hadcové rostliny, např. v Zimbabwe, nebyly nalezeny souvislosti mezi akumulací Ni a příjmem jiných esenciálních prvků (Brooks & Yang 1984).

Zajímavostí je, že byl v rhizosféře některých Ni hyperakumulátorů (*Alyssum serpyllifolium* poddruh *lusitanicum*) objeven zvýšený výskyt Ni rezistentních bakterií, které by pravděpodobně mohly přispívat například k solubilizaci minerálů, lepšímu vývoji kořenových vlásků, efektivnějšímu příjmu stopových prvků nebo ke zlepšené rozpustnosti Ni, což způsobuje jeho vyšší akumulaci např. u Ni hyperakumulátora *A. murale* (Abou-Shanab et al. 2006, Mengoni et al. 2010). Tyto půdní mikroorganismy jsou zároveň zapojeny i do tolerance rostlin vůči těžkým kovům prostřednictvím jimi produkované deaminázy kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové (ACC), regulující hladinu ethylenu v rostlinách (Becerra-Castro et al. 2009). Existence rhizobakterií podporujících růst rostlin PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) byla zdokumentována i u *Raphanus sativus* (ředkev setá), kde například bakteriální kmen CIK-516 zvyšoval délku kořenů i obsah chlorofylu a zmírňoval dopad nadměrného množství Ni na rostliny (Akhtar et al. 2018).

4.2 Kobalt (Co) - jeho nadměrné množství u hadcových rostlin

Kobalt (Co) je důležitým přechodným prvkem, esenciálním pro většinu organismů včetně člověka (tvoří např. součást vitamínu B12). U rostlin nebyla esenciální role kobaltu prokázána, přesto

patří mezi prvky prospěšné (benefiční). Mezi pozitivní účinky kobaltu zejména u bobovitých rostlin patří zvýšená stimulace aktivity hlízkových symbiontů, která zlepšuje fixaci dusíku a přísun N pro rostlinu (Pilon-Smits et al. 2009). Při nedostatku Co dochází u symbiotických bakterií k poklesu syntézy methioninu a bílkovin, což v konečném důsledku vede i k menší velikosti hlíz rostliny (Marschner 2012). Při ideálním stopovém množství kobalt oddaluje senescenci listů, která souvisí s inhibicí působení fytohormonu ethylenu (Pilon-Smits et al. 2009), a stimuluje aktivaci antioxidantních enzymů zapojených v inhibici ROS vznikajících při abiotickém stresu (Lwalaba et al. 2020).

Specifika příjmu a mechanismu transportu kobaltu v rostlinách nejsou doposud zcela přesně známa. Dosavadní experimenty naznačují, že příjem kobaltu závisí stejně jako příjem niklu na přítomnosti transportérů z rodiny ZIP (především transportéru IRT1), ale i na přítomnosti ferroportinů (tj. FPN1, FPN2). Transportéry ZIP rodiny primárně transportují Fe^{2+} a Zn^{2+} , ale nejsou zcela specifické a umožňují vstup Co do buněk rhizodermis. Již dříve byl transportér IRT1 identifikován jako transportér širšího spektra iontů kovů, který zřejmě může být různě selektivní i v závislosti na podmínkách prostředí, protože při expresi *IRT1* v kvasinkách byl pozorován příjem Zn pouze při nízkém pH, jak uvádí ve své práci Korshunova et al. (1999). V případě nedostatku železa v rostlinách dochází k větší expresi *IRT1*, což následně zvýší i akumulaci dalších kovů (Mn, Co a Zn), například v kořenech *A. thaliana* (Morrissey et al. 2009). Obdobné výsledky byly získány i u hrachu, u kterého opět nízká hladina Fe^{2+} indukovala expresi *IRT1* a usnadnila transport většího spektra bivalentních kationtů kovů (Zn^{2+} , Cd^{2+}) (Cohen et al. 1998).

Vzestupně se poté Co pohybuje v rostlinách pomocí transpiračního toku v xylému a distribuce kobaltu po rostlinném těle je zřejmě druhově specifická (Palit et al. 1994, Banerjee & Bhattacharya 2021). Doposud nebyly popsány specifické přenašeče pro transport kobaltu z kořenů do prýtu, tudíž se předpokládá, že pro jeho pohyb rostlinou na dlouhou vzdálenost jsou využívány opět transportní systémy jiných prvků (např. Zn). Nejvíce se kobalt akumuluje v orgánech v tomto pořadí: stonek, semena, listy a kořeny. Železem regulované ferroportiny se společně s ATPázami transportujícími těžké kovy (HMA3 a HMA5) podílejí na sekvestraci Co^{2+} iontů do vakuol rhizodermis kořene, což přispívá k toleranci zvýšené hladiny kovů (Lange et al. 2016, Lwalaba et al. 2020). Přesné mechanismy akumulace Co však nebyly zcela upřesněny, ale předpokládá se, že některé z těchto mechanismů může kobalt sdílet s mědí (Cu). Co se týče samotné interakce mezi ionty Cu a Co, platí, že jejich vztah v rostlině je zřejmě díky jejich společným mechanismům příjmu antagonistický. Pokud tedy rostlina přijímá kombinovaně oba tyto prvky, antagonistickým působením dochází ke snížení příjmu i transportu Co z kořenů do nadzemní části, což opět napomáhá k toleranci toxicity. Díky tomu pak dochází ke zmírnění toxických projevů způsobených oběma kovy, rostliny následně mohou vykazovat

zlepšenou fotosyntézu, správný růst a nižší míru oxidativního stresu (Lwalaba et al. 2019). Ve studii zaměřené na kombinovanou toleranci těchto prvků u ječmene byla nastíněna skutečnost, že akumulace Co byla inhibována přítomností Cu, a překvapivě naopak akumulace Cu byla podněcována přítomností Co (Lwalaba et al. 2020).

V hadcovém substrátu se kobalt stejně jako nikl vyskytuje v toxickém množství, čímž působí jako negativní faktor ovlivňující život rostlin. Hadcové rostliny však na tyto podmínky dokázaly zareagovat prostřednictvím adaptačních mechanismů, díky nimž mohou na hadcích prosperovat bez příznaků, které nadbytek kobaltu způsobuje u nehadcových druhů. Toxicita kobaltu je spojena s vyvoláváním oxidativního stresu a s inhibicí fotosyntézy (Morrissey et al. 2009). V rostlinách ovlivněných nadbytečným množstvím kobaltu dochází také ke zvýšené sekvestraci železa, syntéze feritinu a k nadměrné tvorbě ROS, která vede k narušení metabolických procesů (Kumar Tewari et al. 2002, Karuppanapandian & Kim 2013). Mezi příznaky, které rostlina vykazuje při nadměrné absorpci Co, patří například snížený celkový vzrůst, předčasný opad listů, chloróza způsobená vytěšňováním železa interakcí s kobaltem a inhibice růstu kořenů. V souvislosti s kořeny zmíním experiment (Yamaguchi et al. 2015), ve kterém byla zkoumána na rostlině *Clethra barbinervis* akumulace Ni a zároveň Co a jejich působení na kořenový systém. Výsledek naznačil, že tato rostlina má specifitější transportéry pro kobalt než pro nikl, jejich akumulace v kořenech byla téměř rovnocenná, v listech však byl více zastoupen Co. Autoři také došli k závěru, že u hyperakumulátora *C. barbinervis* došlo ke zlepšenému růstu kořenového systému v případě smíšeného účinku obou kovů.

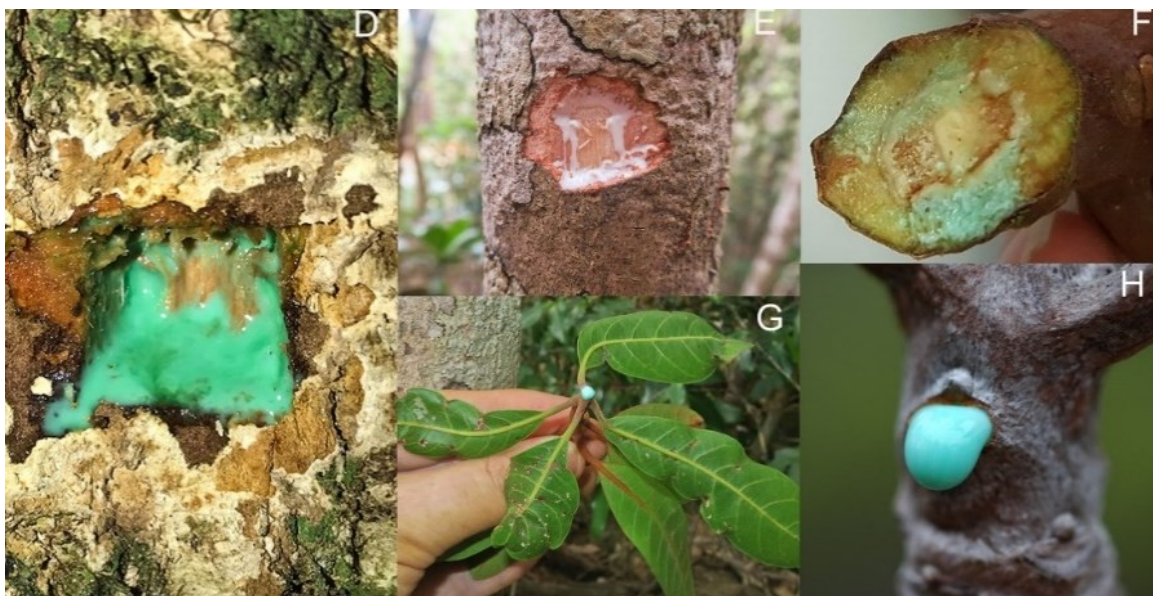
4.3 Obranné mechanismy proti toxicitě těžkých kovů

Na zvýšený výskyt těžkých kovů v hadcové půdě musí rostliny reagovat příslušnými obrannými mechanismy, které jim umožní prosperovat i v takovém prostředí. Záleží na konkrétním druhu rostliny i na konkrétním těžkém kovu, jaký způsob vyrovnávání se s fytotoxickým množstvím těžkým kovů bude upřednostněn. Jelikož se těžké kovy dostávají do rostliny primárně kořeny, některé rostlinné druhy začínají s obranou již v rhizosféře. Základem pro ně je, aby se kovy nedostaly do nadzemních částí, kde je jejich přítomnost nežádoucí. Toho docílí nepřítomností mechanismů pro příjem kovů či vyloučením látek, na které se těžké kovy v půdě navážou, čímž se zamezí jejich příjem (Tilstone & Macnair 1997). Některé druhy rostlin dokážou potlačit příjem těžkých kovů příjmem protěžovanějších prvků (Ca a Mg), v rostlinách jsou pak častěji obsazována dostupná vazebná místa preferovanějšími prvky (Pędzwiatr et al. 2018). U jiných druhů rostlin těžké kovy pronikají do kořenů, kde následně rostlina spouští detoxifikační procesy, za které jsou zodpovědné především chelatační látky (Raskin et al. 1997). Ty zajistí, že kov, který pronikne do cytosolu nebude reagovat s proteiny a membránami buněk tím, že jej

chelatají a inaktivují. Mezi chelatační látky, na které se váže většina iontů kovů, patří zejména GSH (glutathion), histidin a organické kyseliny, především citrát a malát (Verkleij et al. 2009).

Všechny rostliny mají do jisté míry schopnost akumulace kovů, která je podstatná pro správný rostlinný vývoj, protože umožňuje předcházet toxicitě. Schopnost akumulace těžkých kovů se pohybuje v normálním prostředí u rostlin v rozmezí 0,1-100 mg/kg sušiny, avšak při vyšší koncentraci se i esenciální kovy (např. Fe, Zn, Cu a další) mohou stát pro organismus toxickými (Anthonovics et al. 1971). Zajímavým či dokonce hlavním způsobem, jak se hadcové rostliny vypořádávají s toxicitou kovů, je jejich vysoká akumulace v nadzemních částech bez příznaků toxicity, což souvisí s již zmíněnou zvýšenou schopností sekvestrace těchto iontů (Tilstone & Macnair 1997). Některé rostliny, tzv. hyperakumulátoři, mají schopnost hromadit velké množství těžkých kovů bez nežádoucího dopadu na jejich prosperitu. Hyperakumulující rostlina transportuje vysoké množství těžkých kovů z půdy do kořenů a často i dále do nadzemních částí. Definice hyperakumulátorů je určena obsahem těžkých kovů v pletivech rostliny – koncentrace daných prvků musí být větší než za normálních podmínek. U niklu, mědi, kobaltu a olova se jedná o víc než 1000 µg/g hmotnosti biomasy, pro mangan je to 10 000 µg/g a u zinku se tato hodnota pohybuje okolo 10 000 µg/g sušiny (Baker & Brooks 1989). Dříve se uvádělo, že se počet rostlin schopných hyperakumulace různých kovů pohybuje okolo 450 druhů (Maestri et al. 2010), ale v současnosti je podle Reeve et al. (2018) identifikováno více 700 hyperakumulujících druhů rostlin. Pro rostliny na hadcích je především stěžejní hyperakumulace niklu a kobaltu, které se v místních půdách v okolí rostlin vyskytují ve velkých koncentracích. Hyperakumulace přináší rostlině kromě tolerance vůči toxicitě daného kovu zřejmě i další výhody. Příkladem předností hyperakumulace Ni je schopnost alelopatie (= jeden organismus negativně ovlivňuje svého konkurenta pomocí vypouštění chemických toxických látek do okolí) a taktéž nahromaděné množství sekvestrovaných iontů kovů zvyšuje odolnost vůči patogenům (Baker & Brooks 1989). Alelopatie byla objevena například u stromu druhu *Pycnandra acuminata* (*Sebertia acuminata*), pod kterým byla nalezena vrstva opadu bohatá právě na Ni (Boyd & Jaffré 2001, Paul et al. 2021). Naopak Zhang et al. (2007) předpokládá, že pro většinu hyperakumulátorů Ni na hadcových půdách není alelopatie zcela zásadní, jelikož nahromaděný Ni v opadaných listech nezpůsobí na povrchu substrátu až tak velký účinek. Akumulací těžkých kovů se rostlina rovněž může bránit napadení herbivory, kteří se mohou látkami přímo otrávit, anebo se zpomalí jejich larvální vývoj (Davis et al. 2001). Záleží však na potravním vzorci, například hmyz sající floémovou šťávu (např. mšice, molice) nemusí být, na rozdíl od herbivorního hmyzu konzumujícího celé části listů, ovlivněn toxicitou Ni tak výrazně (Jhee et al. 2005). Zajímavým efektem jsou i víceúrovňové vztahy, kdy se herbivorní hmyz (např. *Melanotrichus boydi*) dokáže specializovat na Ni hyperakumulující rostliny. Tento hmyz

poté ve svém těle dokáže rovněž akumulovat zvýšenou hladinu Ni, což mu přináší výhodu při obraně proti jeho predátorům (Boyd et al. 2001).



Obrázek 5: Ni hyperakumulující rostlinné druhy rodu *Pycnandra* (Sapotaceae) z Nové Kaledonie vylučující modrozelený latex bohatý na Ni. (D) *Pycnandra acuminata*, (E-G) *Pycnandra caeruleilates* vylučující bílý latex chudý na Ni a modrý latex bohatý na Ni., (F-H) *Pycnandra kouakouensis* (Isnard et al. 2020).

Pozoruhodným jevem, který nastává u některých druhů Ni akumulujících rostlin v reakci na půdy s nadměrným obsahem Ni, je tvorba neobvykle modrozeleného latexu (viz obrázek 5), jehož zbarvení vzniká díky vysoké hladině Ni (hodnoty kolem 66 000 $\mu\text{g/g}$). Jedním z těchto zajímavých hyperakumulátorů Ni je již výše zmíněný druh stromu z Nové Kaledonie *Pycnandra acuminata*, který ve svém těle dokáže akumulovat doposud největší zaznamenané množství Ni (257 000 $\mu\text{g/g}$ Ni) (Jaffré et al. 2018). Tento viditelný důkaz hyperakumulace byl objeven i u dalších druhů rostlin, například u *Pycnandra caeruleilates* a *Sebertia acuminata* (Isnard et al. 2020). Jasně tmavě zelené zbarvení může mít díky vysoké koncentraci Ni i floémová šťáva, což bylo popsáno u Ni hyperakumulující dřeviny *Phyllanthus balgooyi* (van der Ent & Mulligan 2015).

V souvislosti s hyperakumulujícími rostlinami se vedou diskuse o potencionálním využití při fytoremediaci. Fytoremediace je pojem zahrnující metody, které využívají hyperakumulující rostliny k odstranění škodlivých látek z prostředí znečištěného těžkými kovy (Küpper et al. 2001, Reeves 2003). Například technika fytoextrakce využívá schopnosti rostlin akumulovat kovy ve svém těle, tyto rostliny jsou následně sklizeny, čímž dochází k odstranění toxických látek z prostředí (Reeves 2003, Chaney & McIntosh 2005, Cabello-Conejo et al. 2014). Ve stádiu experimentů je také možnost, že nám mohou

hyperakumulátoři kovů posloužit k těžbě kovů, tzv. agrotěžba využívá těchto rostlin k zachytávání kovů ve sklizené rostlinné biomase, ze které je následným zpracováním získáván produkt „biorudy“. Fytotěžba může být prováděna za účelem získání některých těžkých kovů (např. Ni, Zn, As a další), pro které známe mechanismy hyperakumulace. Ovšem, aby tato metoda mohla být reálně aplikována, je zapotřebí nejprve získat důkazy o její výnosnosti (van Der Ent et al. 2015). Dokonce byl nalezen důkaz o přítomnosti Au v listech u některých rostlin (např. *Eukalyptus*), což by mohlo napomoci k hledání skrytých nových ložisek tohoto kovu (Lintern et al. 2013). Pro některé kovy (např. Co, Cu, Pb) nicméně v současnosti agrotěžba není možná, jelikož nejsou k dispozici vhodné hyperakumulátorové rostliny. Co se týče fytotěžby Ni, ta je slibná především díky vysoké ceně niklu. V souvislosti s hadcí se předpokládá, že by agrotěžba mohla v budoucnu dokonce snížit obsah Ni v půdě, což by mohlo teoreticky vést ke zvýšení úrodnosti ultramafických půd. Nicméně i přes zjevný potenciál komerčního využití této technologie, je trendu fytotěžby v praxi věnována prozatím jen zanedbatelná pozornost. Hyperakumulující rostliny také umožňují indikaci prostředí zamořeného těžkými kovy, právě jejich schopnost osidlovat tyto kontaminované půdy nám ilustruje rozsah místního znečištění (Baker & Brooks 1989).

5. Závěr

V této bakalářské práci byly shrnuty obecné teoretické poznatky hadcového fenoménu, které jsou z hlediska náročnosti hadcových stanovišť pro rostliny velmi zajímavé. Rostliny na hadcových lokalitách se musely přizpůsobit jejich specifickým podmínkám a působení mnoha stresových faktorů. Tyto lokality jsou považované za málo úrodné a nejsou vhodné pro život řady rostlinných druhů, díky adaptačním mechanismům však mohou hadce představovat životní prostor pro mnohé lokálně vzácné i endemité rostlinné druhy (Batianoff et al. 1990).

Rostliny kolonizující hadce vykazují fyziologické a morfologické změny, které jsou projevem reakce rostlin na chemické či abiotické stresové faktory, mezi které patří například nízká dostupnost vody či mělká a skalnatá půdní vrstva. Za zásadní limitující hadcový faktor se považuje abnormálně nízký poměr Ca:Mg iontů, nicméně i pro tuto komplikaci mohou mít rostliny východisko například v podobě selektivity příjmu Ca a Mg, ukládání iontů přímo v rostlinném těle, nebo dokonce potřeby nadměrného množství Mg v půdě pro schopnost jeho optimální absorpce. Velmi významným aspektem je rovněž schopnost hadcových druhů rostlin přežít v prostředí s toxickým množstvím těžkých kovů, ve kterém nehadcové druhy nejsou schopny prosperovat. K pochopení celkového působení hadcového fenoménu na rostliny bylo nutné sumarizovat základní funkce některých makroprvků i vybraných těžkých kovů. Shrnuty byly možné mechanismy reakce rostlin na půdy s nadměrným množstvím těžkých kovů, mezi které patří například hyperakumulace. Ta spočívá ve schopnosti rostlin ukládat vysoké množství kovů ve svých pletivech bez projevů stresu, přičemž klíčová je především sekvestrace do vakuoly (Conn et al. 2011). Ohledně hyperakumulačních vlastností rostlin se v současnosti vedou i diskuse v souvislosti s komerčním využitím, například při fytotěžbě nebo v indikaci znečištěného prostředí.

Jelikož mě téma rostlin adaptovaných na specifickou nehostinnost hadcového substrátu zaujalo a také je v souvislosti s ním stále dost možností výzkumu, ráda bych své navazující studium namířila tímto směrem.

6. Seznam použité literatury

- Abou-Shanab R. A. I., Angle J. S., & Chaney R. L. (2006): Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 2882–2889.
- Akhtar M. J., Ullah S., Ahmad I., Rauf A., Nadeem S. M., Khan M. Y., Hussain S., & Bulgariu L. (2018): Nickel phytoextraction through bacterial inoculation in *Raphanus sativus*. *Chemosphere*. 190: 234–242.
- Allen G. J., Chu S. P., Harrington C. L., Schumacher K., Hoffmann T., Tang Y. Y., Grill E., & Schroeder J. I. (2001): A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*. 411: 1053–1057.
- Altinözlü H., Karagöz A., Polat T., & Ünver I. (2012): Nickel hyperaccumulation by natural plants in Turkish serpentine soils. *Turkish Journal of Botany*. 36: 269–280.
- Arnold B. J., Lahner B., DaCosta J. M., Weisman C. M., Hollister J. D., Salt D. E., Bomblies K., & Yant L. (2016): Borrowed alleles and convergence in serpentine adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113: 8320–8325.
- Asemaneh T., Ghaderian S. M., & Baker A. J. M. (2007): Responses to Mg/Ca balance in an Iranian serpentine endemic plant, *Cleome heratensis* (Capparaceae) and a related non-serpentine species, *C. foliolosa*. *Plant and Soil*. 293: 49–59.
- Asemaneh T., Ghaderian S. M., Crawford S. A., Marshall A. T., & Baker A. J. M. (2006): Cellular and subcellular compartmentation of Ni in the Eurasian serpentine plants *Alyssum bracteatum*, *Alyssum murale* (Brassicaceae) and *Cleome heratensis* (Capparaceae). *Planta*. 225: 193–202.
- Ater M., Lefèbvre C., Gruber W., & Meerts P. (2000): A phytogeochemical survey of the flora of ultramafic and adjacent normal soils in North Morocco. *Plant and Soil*. 218: 127–135.
- Baker A. M. & Brooks R. R. (1989): Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1: 81–126.
- Bakshi A. & Gilroy S. (2022): Moving magnesium. *Molecular Plant*. 15: 796–798.
- Banerjee P. & Bhattacharya P. (2021): Investigating cobalt in soil-plant-animal-human system: dynamics, impact and management. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 21: 2339–2354.
- Bartkowiak A. & Lemanowicz J. (2017): Effect of forest fire on changes in the content of total and available forms of selected heavy metals and catalase activity in soil. *Soil Science Annual*. 68: 140–148.
- Batianoff G. N., Reeves R. D., & Specht R. L. (1990): *Stackhousia tryonii* Bailey: a nickel-accumulating serpentine-endemic species of central Queensland. *Australian Journal of Botany*. 38: 121–130.
- Becerra-Castro C., Monterroso C., García-Lestón M., Prieto-Fernández A., Acea M. J., & Kidd P. S. (2009): Rhizosphere microbial densities and trace metal tolerance of the nickel hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*. *International journal of phytoremediation*. 11: 525–541.
- Bhatia N. P., Walsh K. B., & Baker A. J. M. (2005): Detection and quantification of ligands involved in nickel detoxification in a herbaceous Ni hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1343–1349.
- Bini C., Maleci L., & Wahsha M. (2017): Potentially toxic elements in serpentine soils and plants from Tuscany (Central Italy). A proxy for soil remediation. *Catena*. 148: 60–66.

- Boyd R. S. & Jaffré T. (2001): Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebertia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science*. 97: 535–538.
- Boyd, Wall R. S., & Michael A. (2001): Responses of generalist predators fed high-Ni *Melanotrichus boydi* (Heteroptera: Miridae): elemental defense against the third trophic level. *The American Midland Naturalist*. 146: 186–198.
- Boyd R. S., Wall M. A., & Watkins J. E. (2000): Correspondence between Ni tolerance and hyperaccumulation in *Streptanthus* (Brassicaceae). *Madroño*. 47: 97–105.
- Bradshaw H. D. (2005): Mutations in CAX1 produce phenotypes characteristic of plants tolerant to serpentine soils. *New Phytologist*. 167: 81–88.
- Brady K. U., Kruckeberg A. R., & Bradshaw H. D. (2005): Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36: 243–266.
- Brady N. C. & Weil R. R. (2008): The nature and properties of soils. *Prentice Hall*. 13: 662–710.
- Brankovic S., Cupara S., Glisic R., Djelic G., Grbovic F., Kojicic K., & Milovanovic O. (2017): Phytoaccumulation in plants of mountain GOC in Serbia. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad. Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*. 27: 196–201.
- Bratteler M., Baltisberger M., & Widmer A. (2006): QTL analysis of intraspecific differences between two *Silene vulgaris* ecotypes. *Annals of Botany*. 98: 411–419.
- Brooks R. R. & Yang X. (1984): Elemental levels and relationships in the endemic serpentine flora of the Great Dyke, Zimbabwe and their significance as controlling factors for the flora. *Taxon*. 33: 392–399.
- Cabello-Conejo M. I., Becerra-Castro C., Prieto-Fernández A., Monterroso C., Saavedra-Ferro A., Mench M., & Kidd P. S. (2014): Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alysum pintodasilvae*. *Plant and soil*. 379: 35–50.
- Cakmak I., Hengeler C., & Marschner H. (1994): Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany*. 45: 1251–1257.
- Cakmak I. & Marschner H. (1992): Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiology*. 98: 1222–1227.
- Cammarano P., Felsani A., Gentile M., Gualerzi C., Romeo A., & Wolf G. (1972): Formation of active hybrid 80-S particles from subunits of pea seedlings and mammalian liver ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 281: 625–642.
- Chaney R. L. & McIntosh M. (2005): Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Z Naturforsch C*. 60: 190–198.
- Chaudhry A. H., Nayab S., Hussain S. B., Ali M., & Pan Z. (2021): Current understandings on magnesium deficiency and future outlooks for sustainable agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 1–18.
- Chen J., Li L. G., Liu Z. H., Yuan Y. J., Guo L. L., Mao D. D., Tian L. F., Chen L. B., Luan S., & Li D. P. (2009): Magnesium transporter AtMGT9 is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Cell Research*. 19: 887–898.

- Chen Z. C., Yamaji N., Motoyama R., Nagamura Y., & Ma J. F. (2012): Up-regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiology*. 159: 1624–1633.
- Cheng Ning-Hui & Hirschi K. D. (2003): Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing Arabidopsis protein that associates with CAX1. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 6503–6509.
- Cheng N. H., Pittman J. K., Barkla B. J., Shigaki T., & Hirschi K. D. (2003): The Arabidopsis *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell*. 15: 347–364.
- Cheng S. H., Willmann M. R., Chen H. C., & Sheen J. (2002): Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiology*. 129: 469–485.
- Chiarucci A., Maccherini S., Bonini I., & Dominicis V. de. (1999): Effects of nutrient addition on community productivity and structure of serpentine vegetation. *Plant Biology*. 1: 121–126.
- Choi Y. E., Harada E., Wada M., Tsuboi H., Morita Y., Kusano T., & Sano H. (2001): Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta*. 213: 45–50.
- Chytrý M. (2012): Vegetation of the Czech Republic: diversity, ecology, history and dynamics. *Preslia*. 84: 427–504.
- Cohen C. K., Fox T. C., Garvin D. F., & Kochian L. V. (1998): The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant physiology*. 116: 1063–1072.
- Coleman R. G. (1971): Petrologic and geophysical nature of serpentinites. *Geological Society of America Bulletin*. 82: 897–918.
- Conn S. & Gilliham M. (2010): Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany*. 105: 1081–1102.
- Conn S. J., Tyerman S. D., Conn V., Kaiser B. N., Leigh R. A., & Gilliham M. (2011): Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within Arabidopsis thaliana mesophyll vacuoles. *New Phytologist*. 190: 583–594.
- Davenport R. J. & Tester M. (2000): A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant physiology*. 122: 823–834.
- Davis M. A., Boyd R. S., & Cane J. H. (2001): Host-switching does not circumvent the Ni-based defence of the Ni hyperaccumulator *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae). *South African journal of science*. 97: 554–557.
- Deepika D. & Singh A. (2022): Plant phospholipase D: novel structure, regulatory mechanism, and multifaceted functions with biotechnological application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 42: 106–124.
- Deng T. H. B., Ent A. van der, Tang Y. T., Sterckeman T., Echevarria G., Morel J. L., & Qiu R. L. (2018): Nickel hyperaccumulation mechanisms: a review on the current state of knowledge. *Plant and Soil*. 423: 1–11.
- Dixon N. E., Gazzola C., Blakeley R. L., & Zerner B. (1975): Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*. 97: 4131–4133.
- Doelsch E., Macary H. Saint, & Kerchove V. Van de. (2006): Sources of very high heavy metal content in soils of volcanic island (La Réunion). *Journal of Geochemical Exploration*. 88: 194–197.

- Drenovsky R. E., Koehler C. E., Skelly K., & Richards J. H. (2013): Potential and realized nutrient resorption in serpentine and non-serpentine chaparral shrubs and trees. *Oecologia*. 171: 39–50.
- Drummond R. S. M., Tutone A., Li Y. C., & Gardner R. C. (2006): A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. *Plant Science*. 170: 78–89.
- Dubeaux G., Neveu J., Zelazny E., & Vert G. (2018): Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. *Molecular Cell*. 69: 953–964.
- Dudic B., Rakic T., Sinzar-Sekulic J., Atanackovic V., & Stevanovic B. (2007): Differences of metal concentrations and morpho-anatomical adaptations between obligate and facultative serpentinophytes from Western Serbia. *Archives of Biological Sciences*. 59: 341–349.
- Ent A. van Der, Baker A. J. M., Reeves R. D., Chaney R. L., Anderson C. W. N., Meech J. A., Erskine P. D., Simonnot M. O., Vaughan J., Morel J. L., Echevarria G., Fogliani B., Rongliang Q., & Mulligan D. R. (2015): Agromining: farming for metals in the future? *Environmental Science and Technology*. 49: 4773–4780.
- Ent A. van der & Mulligan D. (2015): Multi-element concentrations in plant parts and fluids of Malaysian nickel hyperaccumulator plants and some economic and ecological considerations. *Journal of Chemical Ecology*. 41: 396–408.
- Erb T. J. & Zarzycki J. (2018): A short history of RubisCO: the rise and fall (?) of Nature's predominant CO₂ fixing enzyme. *Current Opinion in Biotechnology*. 49: 100–107.
- Ernst W. (1972): Ecophysiological studies on heavy metal plants in South Central Africa. *Kirkia*. 8: 125–145.
- Eskew D. L., Welch R. M., & Norvell W. A. (1984): Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. *Plant Physiology*. 76: 691–693.
- Evans D. E., Briars S.-A., & Williams L. E. (1991): Active calcium transport by plant cell membranes. *Journal of Experimental Botany*. 42: 285–303.
- Fitzsimons M. S. & Miller R. M. (2010): Serpentine soil has little influence on the root-associated microbial community composition of the serpentine tolerant grass species *Avenula sulcata*. *Plant and Soil*. 330: 393–405.
- Franceschi V. R. & Nakata P. A. (2005): Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 41–71.
- Freyermuth S. K., Bacanamwo M., & Polacco J. C. (2000): The soybean *Eu3* gene encodes an Ni-binding protein necessary for urease activity. *The Plant Journal*. 21: 53–60.
- Frietsch S., Wang Y.-F., Sladek C., Poulsen L. R., Romanowsky S. M., Schroeder J. I., & Harper J. F. (2007): A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 14531–14536.
- Furuichi T., Cunningham K. W., & Muto S. (2001): A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca²⁺ flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiology*. 42: 900–905.
- Gabbriellini R. & Pandolfini T. (1984): Effect of Mg²⁺ and Ca²⁺ on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species. *Physiologia Plantarum*. 62: 540–544.
- Gao C., Zhao Q., & Jiang L. (2015): Vacuoles protect plants from high magnesium stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112: 2931–2932.
- García de la Torre V. S., Majorel-Loulergue C., Rigail G. J., Alfonso-González D., Soubigou-Taconnat L., Pillon Y., Barreau L., Thomine S., Fogliani B., Burtet-Sarramegna V., & Merlot S. (2021): Wide

- cross-species RNA-Seq comparison reveals convergent molecular mechanisms involved in nickel hyperaccumulation across dicotyledons. *New Phytologist*. 229: 994–1006.
- Gebert M., Meschenmoser K., Svidová S., Weghuber J., Schweyen R., Eifler K., Lenz H., Weyand K., & Knoop V. (2009): A root-expressed magnesium transporter of the MRS2/MGT gene family in *Arabidopsis thaliana* allows for growth in Low-Mg²⁺ environments. *The Plant Cell*. 21: 4018–4030.
- Ghaderian S. M., Mohtadi A., Rahiminejad M. R., & Baker A. J. M. (2007): Nickel and other metal uptake and accumulation by species of *Alyssum* (Brassicaceae) from the ultramafics of Iran. *Environmental Pollution*. 145: 293–298.
- Ghasemi R., Ghaderian S. M., & Křmer U. (2009): Accumulation of nickel in trichomes of a nickel hyperaccumulator plant, *Alyssum inflatum*. *Northeastern Naturalist*. 16: 81–92.
- Gilliham M., Athman A., Tyerman S. D., & Conn S. J. (2011): Cell-specific compartmentation of mineral nutrients is an essential mechanism for optimal plant productivity-another role for TPC1? *Plant Signaling and Behavior*. 6: 1656–1661.
- Gilliham M., Dayod M., Hocking B. J., Xu B., Conn S. J., Kaiser B. N., Leigh R. A., & Tyerman S. D. (2011): Calcium delivery and storage in plant leaves: Exploring the link with water flow. *Journal of Experimental Botany*. 62: 2233–2250.
- Gout E., Rébeillé F., Douce R., & Bligny R. (2014): Interplay of Mg²⁺, ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: unravelling the role of Mg²⁺ in cell respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 4560–4567.
- Guo W., Chen S., Hussain N., Cong Y., Liang Z., & Chen K. (2015): Magnesium stress signaling in plant: just a beginning. *Plant Signaling and Behavior*. 10: 1–6.
- Guo W., Cong Y., Hussain N., Wang Y., Liu Z., Jiang L., Liang Z., & Chen K. (2014): The remodeling of seedling development in response to long-term magnesium toxicity and regulation by ABA-DELLA signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 55: 1713–1726.
- Guo W., Nazim H., Liang Z., & Yang D. (2016): Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. *The Crop Journal*. 4: 83–91.
- Hall J. L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*. 53: 1–11.
- Hamilton D. W. A., Hills A., Kö B., & Blatt M. R. (2000): Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 4967–4972.
- Harrison S., Safford H. D., Grace J. B., Viers J. H., & Davies K. F. (2006): Regional and local species richness in an insular environment: Serpentine plants in California. *Ecological Monographs*. 76: 41–56.
- Harrison S., Viers J. H., & Quinn J. F. (2000): Climatic and spatial patterns of diversity in the serpentine plants of California. *Diversity and Distributions*. 6: 153–162.
- Hayakawa H., Tunala, Minamiya Y., Ito K., Gale S., Yokoyama J., Arakawa R., & Fukuda T. (2012): Comparative study of leaf morphology in *Aster hispidus* Thunb. var. *leptocladus* (Makino) Okuyama (Asteraceae). *American Journal of Plant Sciences*. 3: 110–113.
- Hermans C., Bourgis F., Faucher M., Strasser R. J., Delrot S., & Verbruggen N. (2005): Magnesium deficiency in sugar beets alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves. *Planta*. 220: 541–549.

- Hermans C., Conn S. J., Chen J., Xiao Q., & Verbruggen N. (2013): An update on magnesium homeostasis mechanisms in plants. *Metallomics*. 5: 1170–1183.
- Hetherington A. M. & Brownlee C. (2004): The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 401–427.
- Homer F. A., Reeves R. D., Brooks R. R., & Baker A. J. M. (1991): Characterization of the nickel-rich extract from the nickel hyperaccumulator *Dichapetalum gelonioides*. *Phytochemistry*. 30: 2141–2145.
- Hua B.-G., Mercier R. W., Zielinski R. E., & Berkowitz G. A. (2003): Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 945–954.
- Hunter J. G. & Vergnano O. (1952): Nickel toxicity in plants. *Annals of Botany*. 39: 279–284.
- Hussain D., Haydon M. J., Wang Y., Wong E., Sherson S. M., Young J., Camakaris J., Harper J. F., & Cobbett C. S. (2004): P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in arabidopsis. *The Plant Cell*. 16: 1327–1339.
- Isnard S., L’Huillier L., Paul A. L. D., Munzinger J., Fogliani B., Echevarria G., Erskine P. D., Gei V., Jaffré T., & Ent A. van der. (2020): Novel insights into the hyperaccumulation syndrome in *Pycnandra* (Sapotaceae). *Frontiers in Plant Science*. 11: 1–14.
- Jaffré T., Reeves R. D., Baker A. J. M., Schat H., & Ent A. Van Der. (2018): The discovery of nickel hyperaccumulation in the New Caledonian tree *Pycnandra acuminata* 40 years on. *The New Phytologist*. 218: 397–400.
- Jammes F., Hu H. C., Villiers F., Bouten R., & Kwak J. M. (2011): Calcium-permeable channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 278: 4262–4276.
- Jhee E. M., Boyd R. S., & Eubanks M. D. (2005): Nickel hyperaccumulation as an elemental defense of *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae): Influence of herbivore feeding mode. *New Phytologist*. 168: 331–344.
- Karuppanapandian T. & Kim W. (2013): Cobalt-induced oxidative stress causes growth inhibition associated with enhanced lipid peroxidation and activates antioxidant responses in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35: 2429–2443.
- Kazakou E., Adamidis G. C., Baker A. J. M., Reeves R. D., Godino M., & Dimitrakopoulos P. G. (2010): Species adaptation in serpentine soils in Lesbos Island (Greece): metal hyperaccumulation and tolerance. *Plant and Soil*. 332: 369–385.
- Kazakou E., Dimitrakopoulos P. G., Baker A. J. M., Reeves R. D., & Troumbis A. Y. (2008): Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews*. 83: 495–508.
- Kerkeb L. & Krämer U. (2003): The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*. 131: 716–724.
- Kiegle E., Gilliam M., Haseloff J., & Tester M. (2000): Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Journal*. 21: 225–229.
- Knoop V., Groth-Malonek M., Gebert Michael, Eifler Karolin, & Weyand Katrin. (2005): Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. *Molecular Genetics and Genomics*. 274: 205–216.

- Knowles L. & Witkowski E. T. F. (2000): Conservation biology of the succulent shrub, *Euphorbia barnardii*, a serpentine endemic of the Northern Province, South Africa. *Austral Ecology*. 25: 241–252.
- Kocourková D., Krčková Z., Pejchar P., Kroumanová K., Podmanická T., Daněk M., & Martinec J. (2020): Phospholipase Dα1 mediates the high-Mg²⁺ stress response partially through regulation of K⁺ homeostasis. *Plant Cell and Environment*. 43: 2460–2475.
- Kolář F. & Vít P. (2008): Endemické rostliny českých hadců 1. Zvláštnosti hadcových ostrovů. *Živa*. 1: 14–17.
- Konečná V., Bray S., Vlček J., Bohutínská M., Požárová D., Choudhury R. R., Bollmann-Giolai A., Flis P., Salt D. E., Parisod C., Yant L., & Kolář F. (2021): Parallel adaptation in autopolyploid *Arabidopsis arenosa* is dominated by repeated recruitment of shared alleles. *Nature Communications*. 12: 1–13.
- Konečná V., Šustr M., Požárová D., Čertner M., Krejčová A., Tylová E., & Kolář F. (2022): Genomic basis and phenotypic manifestation of (non-)parallel serpentine adaptation in *Arabidopsis arenosa*. *Evolution*. 76: 2315–2331.
- Korshunova Y. O., Eide D., Clark W. G., Guerinot M. Lou, & Pakrasi H. B. (1999): The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*. 40: 37–44.
- Kostman T. A., Tarlyn N. M., Loewus F. A., & Franceschi V. R. (2001): Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts 1. *Plant Physiology*. 125: 634–640.
- Krám P., Oulehle F., Štědrá V., Hruška J., Shanley J. B., Minocha R., & Traister E. (2009): Geoecology of a forest watershed underlain by serpentine in central Europe. *Northeastern Naturalist*. 16: 309–328.
- Kruckeberg A. R. (1951): Intraspecific variability in the response of certain native plant species to serpentine soil. *American Journal of Botany*. 38: 408–419.
- Kruckeberg A. R. (1954): The ecology of serpentine soils III. Plant species in relation to serpentine soils. *Ecology*. 35: 267–274.
- Kumar Tewari R., Kumar P., Sharma N., & Singh Bisht S. (2002): Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science*. 162: 381–388.
- Kumekawa Y., Miyata H., Ohga K., Hayakawa H., Yokoyama J., Ito K., Tebayashi S., Arakawa R., & Fukuda T. (2013): Comparative analyses of stomatal size and density among ecotypes of *Aster hispidus* (Asteraceae). *American Journal of Plant Sciences*. 4: 524–527.
- Küpper H., Lombi E., Zhao F.-J., Wieshammer G., & Mcgrath S. P. (2001): Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany*. 52: 2291–2300.
- Lange B., Pourret O., Meerts P., Jitaru P., Cancès B., Grison C., & Faucon M. P. (2016): Copper and cobalt mobility in soil and accumulation in a metallophyte as influenced by experimental manipulation of soil chemical factors. *Chemosphere*. 146: 75–84.
- Lee J., Reeves R. D., Brooks R. R., & Jaffrft T. (1978): The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*. 17: 1033–1035.
- Li H., Du H., Huang K., Chen X., Liu T., Gao S., Liu H., Tang Q., Rong T., & Zhang S. (2016): Identification, and functional and expression analyses of the CorA/MRS2/MGT-type magnesium transporter family in maize. *Plant and Cell Physiology*. 57: 1153–1168.

- Li L.-G., Sokolov L. N., Yang Y. H., Li D. P., Ting J., Pandey G. K., & Luan S. (2008): A mitochondrial magnesium transporter functions in Arabidopsis pollen development. *Molecular Plant*. 1: 675–685.
- Li L., Tutone A. F., Drummond R. S. M., Gardner R. C., & Luan S. (2001): A novel family of magnesium transport genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 13: 2761–2775.
- Li H., Wang N., Ding J., Liu C., Du H., Huang K., Cao M., Lu Y., Gao S., & Zhang S. (2017): The maize CorA/MRS2/MGT-type Mg transporter, ZmMGT10, responses to magnesium deficiency and confers low magnesium tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 95: 269–278.
- Lin D. C. & Nobel P. S. (1971): Control of photosynthesis by Mg²⁺. *Archives of biochemistry and biophysics*. 145: 22–32.
- Lintern M., Anand R., Ryan C., & Paterson D. (2013): Natural gold particles in Eucalyptus leaves and their relevance to exploration for buried gold deposits. *Nature Communications*. 4: 1–9.
- Liu X., Guo L. X., Luo L. J., Liu Y. Z., & Peng S. A. (2019): Identification of the magnesium transport (MGT) family in Poncirus trifoliata and functional characterization of PtrMGT5 in magnesium deficiency stress. *Plant Molecular Biology*. 101: 551–560.
- Loew O. & May D. W. (1901): The relation of lime and magnesia to plant growth. *US Government Printing Office*. 1: 1–53.
- Lwalaba J. L. W., Louis L. T., Zvobgo G., Fu L., Mwamba T. M., Mukobo Mundende R. P., & Zhang G. (2019): Copper alleviates cobalt toxicity in barley by antagonistic interaction of the two metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 180: 234–241.
- Lwalaba J. L. W., Louis L. T., Zvobgo G., Richmond M. E. A., Fu L., Naz S., Mwamba M., Mundende R. P. M., & Zhang G. (2020): Physiological and molecular mechanisms of cobalt and copper interaction in causing phyto-toxicity to two barley genotypes differing in Co tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 187: 1–10.
- Maestri E., Marmioli M., Visioli G., & Marmioli N. (2010): Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*. 68: 1–13.
- Main J. L. (1974): Differential responses to magnesium and calcium by vative populations of *Agropyron spicatum*. *American Journal of Botany*. 61: 931–937.
- Main J. L. (1981): Magnesium and calcium nutrition of a serpentine endemic grass. *The American Midland Naturalist*. 105: 196–199.
- Mao D., Chen J., Tian L., Liu Z., Yang L., Tang R., Li J., Lu C., Yang Y., Shi J., Chen L., Li D., & Luan S. (2014): Arabidopsis transporter MGT6 mediates magnesium uptake and is required for growth under magnesium limitation. *The Plant Cell*. 26: 2234–2248.
- Marrs R. H. & Proctor J. (1976): The response of serpentine and non-serpentine *Agrostis Stolonifera* to magnesium and calcium. *Journal of Ecology*. 64: 953–964.
- Marschner P. (2012): Marschner's mineral nutrition of higher plants. *Academic Press/Elsevier*. 3: 1–649.
- Mazen A. M. A. (2004): Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related to accumulation of toxic metals. *Russian Journal of Plant Physiology*. 51: 281–285.
- McAinsh M. R. & Pittman J. K. (2009): Shaping the calcium signature. *New Phytologist*. 181: 275–294.

- Meng S. F., Zhang B., Tang R. J., Zheng X. J., Chen R., Liu C. G., Jing Y. P., Ge H. M., Zhang C., Chu Y. L., Fu A. G., Zhao F. G., Luan S., & Lan W. Z. (2022): Four plasma membrane-localized MGR transporters mediate xylem Mg²⁺ loading for root-to-shoot Mg²⁺ translocation in Arabidopsis. *Molecular Plant*. 15: 805–819.
- Mengoni A., Schat H., & Vangronsveld J. (2010): Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant and Soil*. 331: 5–16.
- Merlot S., Hannibal L., Martins S., Martinelli L., Amir H., Lebrun M., & Thomine S. (2014): The metal transporter PglREG1 from the hyperaccumulator *Psychotria gabriellae* is a candidate gene for nickel tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 65: 1551–1564.
- Meyerhoff O., Müller K., Roelfsema M. R. G., Latz A., Lacombe B., Hedrich R., Dietrich P., & Becker D. (2005): AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*. 222: 418–427.
- Mills R. F., Francini A., Ferreira Da Rocha P. S. C., Baccarini P. J., Aylett M., Krijger G. C., & Williams L. E. (2005): The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters*. 579: 783–791.
- Mohanta T. K., Kumar P., & Bae H. (2017): Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. *BMC Plant Biology*. 17: 1–19.
- Moomaw A. S. & Maguire M. E. (2008): The unique nature of Mg²⁺ channels. *Physiology*. 23: 275–285.
- Morrissey J., Baxter I. R., Lee J., Li L., Lahner B., Grotz N., Kaplan J., Salt D. E., & Guerinot M. Lou. (2009): The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 21: 3326–3338.
- Nieboer E. & Richardson D. H. S. (1980): The replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*. 1: 3–26.
- Nishida S., Tanikawa R., Ishida S., Yoshida J., Mizuno T., Nakanishi H., & Furuta N. (2020): Elevated expression of vacuolar nickel transporter gene IREG2 is associated with reduced root-to-shoot nickel translocation in *Noccaea japonica*. *Frontiers in Plant Science*. 11: 1–11.
- Nishida S., Tsuzuki C., Kato A., Aisu A., Yoshida J., & Mizuno T. (2011): AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*. 52: 1433–1442.
- Niu Y., Chen P., Zhang Y., Wang Z., Hu S., Jin G., Tang C., & Guo L. (2018): Natural variation among Arabidopsis thaliana accessions in tolerance to high magnesium supply. *Scientific Reports*. 8: 1–15.
- Novák F. (1928): Quelques remarques relatives au probleme de la vegetation serpentiniques. *Preslia*. 42–71.
- Oda K., Kamiya T., Shikanai Y., Shigenobu S., Yamaguchi K., & Fujiwara T. (2016): The arabidopsis Mg transporter, MRS2-4, is essential for Mg homeostasis under both low and high Mg conditions. *Plant and Cell Physiology*. 57: 754–763.
- O’Dell R. E., James J. J., & Richards J. H. (2006): Congeneric serpentine and nonserpentine shrubs differ more in leaf Ca:Mg than in tolerance of low N, low P, or heavy metals. *Plant and Soil*. 280: 49–64.
- Ohga K., Muroi M., Hayakawa H., Yokoyama J., Ito K., Tebayashi S., Arakawa R., & Fukuda T. (2012): Morphological and anatomical analyses of the serpentine ecotype of *Adenophora triphylla* var. *japonica* (Campanulaceae). *Journal of Plant Studies*. 1: 180–187.

- Oze C., Fendorf S., Bird D. K., & Coleman R. G. (2004): Chromium geochemistry of serpentine soils. *International Geology Review*. 46: 97–126.
- Palit S., Sharma A., & Talukder G. (1994): Effects of cobalt on plants. *Botanical Review*. 60: 149–181.
- Pas L. Van der & Ingle R. A. (2019): Towards an understanding of the molecular basis of nickel hyperaccumulation in plants. *Plants*. 8: 1–12.
- Paul A. L. D., Isnard S., Wawryk C. M., Erskine P. D., Echevarria G., Baker A. J. M., Kirby J. K., & Ent A. van der. (2021): Intensive cycling of nickel in a New Caledonian forest dominated by hyperaccumulator trees. *The Plant Journal*. 107: 1040–1055.
- Pędziwiatr A., Kierczak J., Waroszewski J., Ratié G., Quantin C., & Ponzevera E. (2018): Rock-type control of Ni, Cr, and Co phytoavailability in ultramafic soils. *Plant and Soil*. 423: 339–362.
- Peiter E., Maathuis F. J., Mills L. N., Knight H., Pelloux J., Hetherington A. M., & Hetherington A. M. (2005): The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*. 434: 404–408.
- Pilon-Smits E. A., Quinn C. F., Tapken W., Malagoli M., & Schiavon M. (2009): Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 267–274.
- Piñeros M. & Tester M. (1993): Plasma membrane Ca²⁺ channels in roots of higher plants and their role in aluminium toxicity. *Plant and Soil*. 195: 478–488.
- Piñeros M. & Tester M. (1995): Characterization of a voltage-dependent Ca²⁺-selective channel from wheat roots. *Planta*. 195: 478–488.
- Polacco J. C., Mazzafera P., & Tezotto T. (2013): Opinion - nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science*. 199: 79–90.
- Polacco J. C., Thomas A. L., & Bledsoe P. J. (1982): A soybean seed urease-null produces urease in cell culture¹. *Plant Physiology*. 69: 1233–1240.
- Pongrac P., Serra T. S., Castillo-Michel H., Vogel-Mikuš K., Arčon I., Kelemen M., Jenčič B., Kavčič A., Villafort Carvalho M. T., & Aarts M. G. M. (2018): Cadmium associates with oxalate in calcium oxalate crystals and competes with calcium for translocation to stems in the cadmium bioindicator *Gomphrena claussenii*. *Metallomics*. 10: 1576–1584.
- Pourret O. & Hursthouse A. (2019): It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16: 1–6.
- Proctor J. (1971): The plant ecology of serpentine: III. The influence of a high magnesium/calcium ratio and high nickel and chromium levels in some british and swedish serpentine soils. *Journal of Ecology*. 59: 827–842.
- Proctor J. (1999): Toxins, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends in Ecology and Evolution*. 14: 334–335.
- Proctor J. & Woodell S. R. J. (1971): The plant ecology of serpentine: I. serpentine vegetation of England and Scotland. *Journal of Ecology*. 59: 375–395.
- Proctor J. & Woodell S. R. J. (1975): The ecology of serpentine soils. *Advances Ecological Research*. 9: 255–366.
- Rajakaruna N. & Baker A. J. M. (2004): Serpentine: a model habitat for botanical research in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*. 32: 1–19.

- Rao I. M., Sharp R. E., & Boyer J. S. (1987): Leaf magnesium alters photosynthetic response to low water potentials in sunflower. *Plant Physiology*. 84: 1214–1219.
- Raskin I., Smith R. D., & Salt D. E. (1997): Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 221–226.
- Reeves R. D. (2003): Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*. 249: 57–65.
- Reeves R. D., Baker A. J. M., Borhidi A., & Berazaín R. (1996): Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytologist*. 133: 217–224.
- Reeves R. D., Baker A. J. M., Jaffré T., Erskine P. D., Echevarria G., & Ent A. Van Der. (2018): A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *The New Phytologist*. 218: 407–411.
- Robertson A. I. & Meakin M. E. R. (1980): The effect of nickel on cell division and growth of *Brachystegia Spiciformis* seedlings. *Source: Kirkia*. 12: 115–125.
- Ródenas R. & Vert G. (2021): Regulation of root nutrient transporters by CIPK23: “one kinase to rule them all.” *Plant and Cell Physiology*. 62: 553–563.
- Rotondi A., Rossi F., Asunis C., & Cesaraccio C. (2003): Leaf xeromorphic adaptations of some plants of a coastal Mediterranean macchia ecosystem. *Journal of Mediterranean Ecology*. 4: 25–35.
- Rune O. (1953): Plant life on serpentines and related rocks in the north of Sweden. *Sv. växtgeografiska sällskapet*. 31: 1–152.
- Saito T., Kobayashi N. I., Tanoi K., Iwata N., Suzuki H., Iwata R., & Nakanishi T. M. (2013): Expression and functional analysis of the CorA-MRS2-ALR-type magnesium transporter family in rice. *Plant and Cell Physiology*. 54: 1673–1683.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., & Harper J. F. (2002): Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*. 14: 401–417.
- Schaaf G., Honsbein A., Meda A. R., Kirchner S., Wipf D., & Wirén N. Von. (2006): AtIREG2 encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 25532–25540.
- Scrase-Field S. A. M. G. & Knight M. R. (2003): Calcium: Just a chemical switch? *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 500–506.
- Shao Y., Li S., Gao L., Sun C., Hu J., Ullah A., Gao J., Li X., Liu S., Jiang D., Cao W., Tian Z., & Dai T. (2021): Magnesium application promotes Rubisco activation and contributes to high-temperature stress alleviation in wheat during the grain filling. *Frontiers in Plant Science*. 12: 1–14.
- Shaul O., Hilgemann D. W., De-Almeida-Engler J., Montagu M. Van, Inzé D., & Galili G. (1999): Cloning and characterization of a novel Mg²⁺/H⁺ exchanger. *The EMBO Journal*. 18: 3973–3980.
- Shiba M., Tate T., & Fukuda T. (2022): Adaptive leaf morphology of *Eurya japonica* Thunb. (Ternstroemiaceae) in serpentine areas. *Journal of Plant Studies*. 11: 1–9.
- Sreedhara A. & Cowan J. A. (2002): Structural and catalytic roles for divalent magnesium in nucleic acid biochemistry. *BioMetals*. 15: 211–223.
- Stael S., Wurzinger B., Mair A., Mehler N., Vothknecht U. C., & Teige M. (2012): Plant organellar calcium signalling: An emerging field. *Journal of Experimental Botany*. 63: 1525–1542.

- Sugimoto T., Watanabe K., Yoshida S., Aino M., Furiki M., Shiono M., Matoh T., & Biggs A. R. (2010): Field application of calcium to reduce phytophthora stem rot of soybean, and calcium distribution in plants. *Plant Disease*. 94: 812–819.
- Sun Y., Yang R., Li L., & Huang J. (2017): The magnesium transporter MGT10 is essential for chloroplast development and photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. 10: 1584–1587.
- Tang R. J. & Luan S. (2017): Regulation of calcium and magnesium homeostasis in plants: from transporters to signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*. 39: 97–105.
- Tang R. J., Zhao F. G., Garcia V. J., Kleist T. J., Yang L., Zhang H. X., & Luan S. (2015): Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112: 3134–3139.
- Taylor S. I. & Levy F. (2002): Responses to soils and a test for preadaptation to serpentine in *Phacelia dubia* (Hydrophyllaceae). *New Phytologist*. 155: 437–447.
- Thion L., Mazars C., Nacry P., Bouchez D., Moreau M., Ranjeva R., & Thuleau P. (1998): Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *The Plant Journal*. 13: 603–610.
- Thor K. (2019): Calcium—nutrient and messenger. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1–7.
- Tilstone G. H. & Macnair M. R. (1997): Nickel tolerance and copper-nickel co-tolerance in *Mimulus guttatus* from copper mine and serpentine habitats. *Plant and Soil*. 191: 173–180.
- Tooulakou G., Giannopoulos A., Nikolopoulos D., Bresta P., Dotsika E., Orkoulas M. G., Kontoyannis C. G., Fasseas C., Liakopoulos G., Klapa M. I., & Karabourniotis G. (2016): Alarm photosynthesis: Calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in plants. *Plant Physiology*. 171: 2577–2585.
- Tuna A. L., Kaya C., Ashraf M., Altunlu H., Yokas I., & Yagmur B. (2007): The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 173–178.
- Turner T. L., Bourne E. C., Wettberg E. J. Von, Hu T. T., & Nuzhdin S. V. (2010): Population resequencing reveals local adaptation of *Arabidopsis lyrata* to serpentine soils. *Nature Genetics*. 42: 260–263.
- Vergnano O. & Hunter J. G. (1953): Nickel and cobalt toxicities in oat plants. *Annals of Botany*. 17: 317–328.
- Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D. M., Schwitzguébel J. P., & Schröder P. (2009): Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 10–22.
- Visscher A. M., Paul A. L., Kirst M., Guy C. L., Schuerger A. C., & Ferl R. J. (2010): Growth performance and root transcriptome remodeling of *Arabidopsis* in response to Mars-like levels of magnesium sulfate. *PLoS one*. 5: 1–16.
- Vithanage M., Rajapaksha A. U., Oze C., Rajakaruna N., & Dissanayake C. B. (2014): Metal release from serpentine soils in Sri Lanka. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186: 3415–3429.
- Walker R., Walker H., & Ashworth P. (1954): Calcium-magnesium nutrition with special reference to serpentine soils. *Plant physiology*. 30: 214–221.
- Wang M., Gu D., Liu T., Wang Z., Guo X., Hou W., Bai Y., Chen X., & Wang G. (2007): Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant Molecular Biology*. 65: 733–746.

- Wang Y., Kang Y., Ma C., Miao R., Wu C., Long Y., Ge T., Wu Z., Hou X., Zhang J., & Qi Z. (2017): CNGC2 is a Ca²⁺ influx channel that prevents accumulation of apoplastic Ca²⁺ in the leaf. *Plant Physiology*. 173: 1342–1354.
- Westerbergh A. & Saura A. (1992): The effect of serpentine on the population structure of *Silene dioica* (Caryophyllaceae). *Evolution*. 46: 1537–1548.
- White P. J. (1998): Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Annals of Botany*. 81: 173–183.
- White P. J., Bowen H. C., Demidchik V., Nichols C., & Davies J. M. (2002): Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1564: 299–309.
- White P. J. & Broadley M. R. (2003): Calcium in plants. *Annals of Botany*. 92: 487–511.
- Whittaker R. H. (1954): The ecology of serpentine soils. *Wiley on behalf of the Ecological Society of America*. 35: 258–288.
- Wood B. W. & Reilly C. C. (2007): Nickel and plant disease. *Mineral nutrition and plant disease. The American Phytopathological Society*. 1–27.
- Woodell S. R. J. & Dale A. (1993): *Armeria Maritima* (Mill.) Willd. (*Statice Armeria* L.; *S. Maritima* Mill.). *Journal of Ecology*. 81: 573–588.
- Xu X. F., Wang B., Lou Y., Han W. J., Lu J. Y., Li D. D., Li L. G., Zhu J., & Yang Z. N. (2015): Magnesium Transporter 5 plays an important role in Mg transport for male gametophyte development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 84: 925–936.
- Yamaguchi T., Tomioka R., & Takenaka C. (2015): Can *Clethra barbinervis* distinguish nickel and cobalt in uptake and translocation? *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 21378–21391.
- Yamanashi T., Uchiyama T., Saito S., Higashi T., Ikeda H., Kikunaga H., Yamagami M., Ishimaru Y., & Uozumi N. (2022): Potassium transporter KUP9 participates in K⁺ distribution in roots and leaves under low K⁺ stress. *Stress Biology*. 2: 1–11.
- Yamazaki H., Kikuchi S., Hoshina T., & Kimura T. (2000): Effect of calcium concentration in nutrient solution on development of bacterial wilt and population of its pathogen *Ralstonia solanacearum* in grafted tomato seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition*. 46: 535–539.
- Yan Y. W., Mao D. D., Yang L., Qi J. L., Zhang X. X., Tang Q. L., Li Y. P., Tang R. J., & Luan S. (2018): Magnesium transporter MGT6 plays an essential role in maintaining magnesium homeostasis and regulating high magnesium tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 9: 1–13.
- Yang T. & Poovaiah B. W. (2003): Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*. 8: 505–512.
- Zhang L., Angle J. S., & Chaney R. L. (2007): Do high-nickel leaves shed by the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* inhibit seed germination of competing plants? *New Phytologist*. 173: 509–516.
- Zhang M., Huang P., Ji Y., Wang S., Wang S., Li Z., Guo Y., Ding Z., Wu W., & Wang Y. (2020): KUP 9 maintains root meristem activity by regulating K⁺ and auxin homeostasis in response to low K⁺. *EMBO reports*. 21: 1–20.