Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Vliv výsypkových substrátů s obsahem těžkých kovů na fyziologický stav listu s důrazem na obsah fenolických látek

Monika Kovářová

Diplomová práce
Praha 2012

Školitel diplomové práce:

Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

(Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze)

Konzultant diplomové práce:

Doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

(Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze)

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. a doc. RNDr. Jany Albrechtové, Ph.D.

V Praze dne *Monika Kovářová*

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzce Lhotákové, Ph.D. za trpělivost a ochotu při vedení mé diplomové práce, za obrovskou podporu při jejím sepisování a za poskytnuté výsledky a docentce Janě Albrechtové za ochotu předat cenné rady a věcné připomínky k textu mé diplomové práce.

Velice bych chtěla poděkovat RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za pomoc a rady k plánu hrnkového pokusu a Mgr. Drahomíře Bartákové za pomoc v laboratoři.

Dále děkuji všem členům Katedry experimentální biologie rostlin za pozitivní přistup, ochotu poradit a za zpříjemnění času stráveného na katedře.

Dík patří také všem kolegům z Přírodovědecké fakulty UK (Dr. Kupkové a Dr. Potůčkové z Katedry aplikované geoinformatiky a kartografie) a České geologické služby, kteří se podíleli na odběrech vzorků, především Dr. Veronice Kopačkové, Mgr. Janu Mišurcovi a dalším a Dr. Petru Rojíkovi ze Sokolovské uhelné a.s.

Také bych chtěla poděkovat všem kolegům, přátelům a blízkým za psychickou podporu a trpělivost.

Diplomová práce byla vypracována v rámci grantového projektu GA ČR 205/09/1989: Vyhodnocení environmentálních vlivů povrchové těžby postavené na analýze dat hyperspektráního sensoru ARES, Hlavní řešitel Dr. Veronika Kopačková (Česká geologická služba), spoluřešitel doc. Jana Albrechtová (KEBR, PřF UK).

ABSTRAKT

Těžké kovy se do prostředí dostávají skrze přírodní i antropogenní procesy, hlavně těžební a průmyslovou činností. Výsypky důlních substrátů Sokolovska obsahující vysoké koncentrace těžkých kovů jsou rekultivovány výsadbami dřevin, např. borovice lesní (*Pinus sylvestris L.)*. Diplomová práce je součástí širšího projektu zaměřeného na interpretaci hyperspektrálních dat dálkového průzkumu pro monitorování stavu vegetace. Proto jsem se v diplomové práci zaměřila na nespecifické indikátory stresu těžkými kovy, které jsou detekovatelné ze spektrálních analýz listoví (fotosyntetické pigmenty a fenolické látky).

Experimentální část zahrnuje terénní výzkum na jehlicích *P. sylvestris* a modelové hrnkové pokusy s rostlinami tabáku. Terénní výzkum probíhal v r. 2009 a 2010 na jedné kontrolní a třech výsypkových lokalitách s odlišným obsahem těžkých kovů (Hg, As a Cu). V jehlicích byly spektrofotometricky zjišťovány obsahy fotosyntetických pigmentů, fenolických látek a ligninu.

Modelové hrnkové pokusy s rostlinami tabáku (*Nicotiana tabacum cv. Samsun*) zahrnovaly v r. 2011 pilotní pokus a pokusy 1 a 2 se substráty z výsypkových lokalit a v r. 2012 byly v pokusu 3 zkoumány i varianty s různou koncentrací rtuti v zálivce (10 ppm $HgCl_2$ a 15 ppm $HgCl_2$). Kromě výše uvedených biochemických parametrů byla prováděna gazometrická měření: rychlost čisté fotosyntézy, rychlost transpirace a vodivost průduchů.

Obsahy rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice byly nejméně závislé na toxicitě substrátu, obsah ligninu v jehlicích variabilitu vykazoval. Lokalita Lítov se jeví jako nejzatíženější stanoviště a fyziologický stav borovic zde byl nejhorší. Z hlediska možnosti použití obsahů sledovaných látek pro vyhodnocení fyziologického stavu borovice se jako nejvhodnější ukázaly obsahy fotosyntetických pigmentů.

Hrnkové pokusy ukázaly, že u listů tabáku nebyl nalezen významný rozdíl v obsahu rozpustných fenolických látek v závislosti na přítomnosti těžkých kovů, jako citlivé parametry se jeví opět obsah fotosyntetických pigmentů. Rostliny ošetřené $HgCl_2$ a vykazovaly trend snížené vodivosti průduchů a rychlosti transpirace.

KLÍČOVÁ SLOVA

těžké kovy, As, Hg, výsypkový substrát, fenolické látky, lignin, fotosyntetické pigmenty, transpirace, borovice lesní (*Pinus sylvestris*), tabák (*Nicotiana tabacum cv. Samsun*)

ABSTRACT

Heavy metals abundance in the environment increases via natural and anthropogenic processes, mainly mining and industrial activities. Spoil mine substrates of the Sokolovsko Region characteristic by high heavy metal contents are recultivated by tree planting, e.g. of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.*)*. The diploma thesis is a part of a larger project aimed on interpretation of hyperspectral remote sensing data for monitoring of vegetation physiological state. That is why it is focused on non-specific indicators of stress by heavy metals, which can be detected by foliage spectral analyses.

The experimental part of thesis comprises 1) field research on *P. sylvestris* needles and 2) model pot experiments on tobacco plants. Field research was accomplished in 2009 and 2010 on one control locality and three spoil mine banks localities with different heavy metal soil contents (Hg, As and Cu). Photosynthetic pigments', phenolic compounds'and lignin contents were determined spectrophotometrically.

Model pot experiments with tobacco plants (*Nicotiana tabacum cv. Samsun*) - pilot experiment and experiments 1 and 2 using the spoil mine substrates in 2011 and experiment 3 in 2012 also included treatments with different mercury concentration in irrigation (10 and 15 ppm $HgCl_2$). Gasometric measurements (net photosynthesis, transpiration rate and stomatal conductance) were conducted in addition to the analyses of the above biochemic parameteres.

Contents of phenolic compounds in pine needles were least dependent on substrate toxicity, lignin content showed variability dependent on locality. The Lítov locality was the most affected and pine physiological state was the worst there. Content of photosynthetic pigments appears to be the most suitable indicator for evaluation of physiological state of pine.

Pot experiments showed no differences in total content of soluble phenolic compounds in dependence on presence of heavy metals in substrate. Sensitive parameter appears to be photosynthetic contents. Plants treated by $HgCl_2$ exhibited trends of lowered stomatal conductance and transpiration rate.

KEY WORDS

Heavy metals, As, Hg, spoil mine substrate, phenolic compounds, lignin, photosynthetic pigments, transpiration, Scots pine (Pinus sylvestris), tobacco (Nicotiana tabacum cv. Samsun)

OBSAH:

ABSTRAKT **4**
KLÍČOVÁ SLOVA **4**
ABSTRACT **5**
KEY WORDS **5**
SEZNAM ZKRATEK **8**
1. ÚVOD **9**
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE: **12**
2. LITERÁRNÍ ÚVOD **13**
2.1. DŮLNÍ ČINNOST V OBLASTI SOKOLOVA 13
2.2. PŘÍTOMNOST TĚŽKÝCH KOVŮ VE VÝSYPKOVÝCH SUBSTRÁTECH 14
2.3. VLIV TĚŽKÝCH KOVŮ (TK) NA ROSTLINY 14
2.3.1. Mechanismy působení TK na rostliny *14*
2.3.2. Citlivost rostlin k těžkým kovům *15*
2.3.3. Arsen *16*
2.3.3.1. Toxicita sloučenin arsenu 17
2.3.3.1.1. Indukce tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) 17
2.3.3.1.2. Vliv As na fotosyntézu a transpiraci rostlin 18
2.3.3.2. Detoxifikace As rostlinou 19
2.3.4. Rtuť *19*
2.3.4.1. Toxicita Hg 20
2.3.4.1.1. Inducke tvorby ROS 20
2.3.4.1.2. Vliv Hg na fotosyntézu a transpiraci 21
2.3.4.2. Detoxifikace Hg rostlinou 21
2.3.4.3. Reaktivní formy kyslíku (ROS) 22
2.3.5. Vybrané sledované látky v jehlicích borovice: jejich fyziologická funkce a vztah k těžkým kovům *23*
2.3.5.1. Fenolické látky 23
2.3.5.2. Lignin 24
2.3.5.3. Fotosyntetické pigmenty 25
3. MATERIÁL A METODY **26**
3.1. TERÉNNÍ VÝZKUM: POPIS STANOVIŠŤ 26
3.2. MATERIÁL 30
3.2.1. Terénní výzkum *30*
3.2.2. Hrnkové pokusy *30*
3.2.2.1. Design hrnkových pokusů 31
3.2.3. Metody *34*
3.2.3.1. Stanovení obsahu těžkých kovů v půdě a jehlicích borovice 34
3.2.3.2. Biochemické stanovení fenolických látek 34
3.2.3.3. Biochemické stanovení fotosyntetických pigmentů 37
3.2.3.4. Gazometrická měření: rychlost čisté fotosyntézy, rychlost transpirace, vodivost průduchů 38
3.2.3.5. Statistické vyhodnocení 38

4. VÝSLEDKY 39

4.1. TERÉNNÍ VÝZKUM 39
4.1.1. Chemické složení výsypkových substrátů 39
4.1.1.1. Obsah As a Hg v jehlicích borovice 39
4.1.1.2. Obsah fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice 42
4.1.1.3. Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice 43
4.1.1.4. Obsah ligninu v jehlicích borovice 45
4.2. HRNKOVÉ POKUSY 46
4.2.1. Obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku 46
4.2.2. Obsah fotosyntetických pigmentů v listech tabáku 48
4.2.3. Vliv toxických substrátů na tvorbu biomasy rostlin tabáku 48
4.2.4. Vliv toxických substrátů na vybrané fyziologické parametry rostlin tabáku 53

5. DISKUZE 55

5.1. METODICKÉ PŘÍSTUPY 55
5.2. TERÉNNÍ VÝZKUM 56
5.2.1. Chemické složení výsypkových substrátů 56
5.2.2. Obsah As a Hg v jehlicích borovice 56
5.2.2.1. Dostupnost As a Hg z půdy 56
5.2.2.2. Příjem As a Hg rostlinami a transport do nadzemních částí 59
5.2.2.3. Obsah fotosyntetických pigmentů v jehlicích v závislosti na TK v substrátu 60
5.2.2.4. Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na obsahu As a Hg v substrátu 60
5.2.2.5. Obsah ligninu v jehlicích borovice v závislosti na obsahu As a Hg v substrátu 62
5.3. HRNKOVÉ POKUSY 62
5.3.1.1. Obsah rozpustných fenolických látek v rostlinách tabáku v závislosti na toxickém substrátu 63
5.3.1.2. Vliv toxických substrátů na hmotnost prýtu a kořenů rostlin tabáku 63
5.3.1.3. Vliv toxických substrátů na vybrané fyziologické parametry rostlin tabáku 64
5.3.2. Vyhodnocení vstupních hypotéz 65
5.3.2.1. Terénní výzkum 65
5.3.2.2. Hrnkové pokusy 66

6. ZÁVĚRY 67

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY 68

SEZNAM ZKRATEK

ROS – reaktivní formy kyslíku
SOD – superoxid dismutáza
POD - peroxidása
ČGS – Česká geologická služba
HGAAS – generace hydridů atomovou absorpční spektrometrií
TK – těžké kovy
SH – thiolová skupina
PAL – fenylalanin amoniak lyasa
PSI – fotosystém I
PSII – fotosystém II

1. ÚVOD

Problematika kontaminace půd po těžební činnosti je hojně studována po celém světě. Vlivem těžby se na povrch do výsypkových substrátů dostávají různé těžké kovy (As, Hg, Cu, Zn, Cd, Co, a další) ve vysokých koncentracích, které jsou obvykle pro rostliny toxické. Těžké kovy mají negativní vliv na růst a vývoj rostlin (například inhibice růstu kořene, anatomické a morfologické změny jako inhibice tvorby kořenových vlásků, tvorba apoplastických bariér blíže kořenové špičce a pod.) a na fyziologické procesy (např. inhibice fotosyntézy, snížení obsahu chlorofylu a dalších fotosyntetických pigmentů, inhibice příjmu esenciálních prvků a jejich následná deficience a další) (Patra et al., 2004; Cavusoglu et al., 2009; Wang et al., 2009; Juang et al., 2012). Z tohoto důvodu je velká pozornost věnována obnově oblastí po těžbě pomocí rekultivací. Mnoho studií se věnuje působení různých těžkých kovů na rostliny a odolnosti rostlin proti těmto toxickým účinkům, schopnosti rostlin akumulovat těžké kovy ve svých orgánech a další využitelností rostlin pro rekultivace a fytoremediace.

Fyziologický stav rostlin je možné hodnotit skrze nespecifické indikátory stresu, mezi které patří například obsahy fotosyntetických pigmentů a fenolických látek. Jejich obsahy v rostlinách reagují na různé stresové podmínky prostředí. Obsah fenolických látek (hlavně ligninu) pak dále ovlivňuje koloběh živin, především uhlíku, v ekosystému skrze rychlost rozkladu rostlinného opadu a změnou dostupnosti látek pro mikroorganismy a rostliny (Ollinger et al., 2002). Obsah fenolických látek i fotosyntetických pigmentů může být ovlivněn těžkými kovy. Obsah fotosyntetických pigmentů se při stresu těžkými kovy snižuje, naopak u ligninu byl zaznamenán vyšší obsah např. při vystavení rostlin Cd (Elobeid et al. 2012) či Mn (Gao et al. 2012).

Výše zmíněné látky je možno detekovat v listoví nejen pomocí biochemických analýz, ale i pomocí dálkového průzkumu Země, který pracuje se spektrálními daty získanými na základě leteckého či satelitního snímkování vegetace. V dnešní době se takto běžně zjišťují obsahy fotosyntetických pigmentů, dusíku či celulózy v porostu. Dobře je tato metodika rozpracována na smrku ztepilém, nejvýznamnější ekonomické dřevině střední Evropy (např. Soukupova et al., 2002; Malenovský et al. 2006). V současné době jsou vytvářeny i mapy obsahu chlorofylu v porostech smrku ztepilého (např. Mišurec et al., 2012). Ostatní dřeviny jsou z tohoto hlediska prostudovány velmi málo. Nově se zkoumá možnost využití změn obsahů rozpustných fenolických látek a ligninu v listoví, které také mají vliv na změny v odrazivosti listoví především v blízké

infračervené a krátkovlnné infračervené oblasti elektromagnetického spektra. Nicméně fenolické látky jsou heterogenní skupinou a jejich detekce s použitím spektrálních dat je proto obtížná (např. Soukupová et al. 2002).

Tato diplomová práce je rozdělena na dvě části - terénní výzkum v lokalitách přímo na výsypkách na Sokolovsku a modelové hrnkové pokusy. Cílem terénního výzkumu bylo přispět k výzkumu využití změn obsahu fenolických látek a ligninu v listoví v dálkovém průzkumu Země získanými daty z biochemických analýz jehlic borovice lesní, která dosud není prostudována z hlediska optických vlastností listoví.. Pro výzkum byla zvolena 4 stanoviště na výsypkách v oblasti Sokolovské pánve se substráty různě kontaminovanými těžkými kovy a s rekultivační výsadbou borovice lesní. Stanoviště se lišila především různým obsahem těžkých kovů v substrátu. Výzkum probíhal ve dvou následných vegetačních sezónách 2009 a 2010, a bylo tak možno opakovat terénní odběry vzorků a porovnat vliv jednotlivých vegetačních sezón. Současně s analýzami, které jsou součástí této diplomové práce, probíhala další měření a analýzy v rámci mezinárodního grantového projektu řešitelského týmu projektu GAČR, který byl zaměřen na výzkum použití hyperspektrálních dat dálkového průzkumu Země pro sledování vlivu důlní činnosti na kvalitu půdy a vegetace. Projekt zahrnoval řadu specialistů z různých oborů - především geology, odborníky na dálkový průzkum, geografy a též tým fyziologů rostlin z Katedry experimentální biologie rostlin vedený doc. Albrechtovou a s účastí Dr. Lhotákové; dále Dr. Kupkové a Dr. Potůčkové z Katedry aplikované geoinformatiky a kartografie. Tento GAČR projekt byl vedený Veronikou Kopačkovou z České geologické služby (ČGS), s účastí Jana Mišurce a dalších z ČGS, s částí týmu z Czech Globe AV ČR, v.v.i. (Jan Hanuš, Zbyněk Malenovský), německých kolegů z Martin Luther University v Halle (Cornelia Glasser, Andras Jung, Christoph Salbach a další) a francouzských kolegů z French Geological Survey, (BRGM) (Stephane Chevrel, Anna Burginon a další). Terénní výzkum probíhal ve výsypkových areálech společnosti Sokolovská Uhelná a.s., s podporou Dr. Petra Rojíka.

Doprovodnou součásti diplomové práce pak byly hrnkové modelové pokusy, které byly zaměřeny na zjištění vlivu kontaminovaných substrátů s vysokým obsahem těžkých kovů na vybrané fyziologické parametry rostlin. Substráty byly přivezeny z vybraných výsypek, na kterých byl prováděn terénní výzkum. Studovanými parametry byly zvoleny rychlost čisté fotosyntézy, parametry vodního režimu, alokace biomasy do nadzemní části a kořenů a obsah fenolických látek a ligninu v listoví. Aby bylo

možno uskutečnit pokusy v rámci časového horizontu diplomové práce, byla v tomto případě jako modelová rostlina zvolena rychle rostoucí bylina – *Nicotiana tabacum*. Nebylo tedy možno použít rostliny borovice lesní, které by byly nejvhodnějším materiálem, adekvátně doplňující terénní výzkum. Hlavním kontaminantem na výsypkách na Sokolově, kde byl prováděn terénní výzkum, je rtuť. Hg je známa jako inhibitor aquaporinů, a může tedy zásadně ovlivňovat rychlost transpirace, vodivost průduchů a rychlost čisté fotosyntézy, proto byly tyto parametry zjišťovány na rostlinách tabáku.

Do pokusu byly i zahrnuty varianty zalévané roztokem $HgCl_2$, které byly zařazeny pro ověření vlivu rtuti na vodní režim rostlin. Z rozborů výsypkových substrátů odebraných v terénu však nebylo zřejmé, v jaké formě se zde rtuť vyskytovala a zda byla pro rostliny dostupná. Proto byla zvolena právě forma $HgCl_2$, o které je známo, že jej rostliny kořeny ze substrátu přijímají (Askari et al., 2007; Zhou et al., 2009).

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE:

Terénní výzkum

Cílem terénního výzkumu je na základě biochemických analýz jehlic borovice lesní bylo:

1. zjistit jaká je variabilita obsahu rozpustných fenolických látek, ligninu a fotosyntetických pigmentů v různě starých jehlicích borovice lesní rostoucí na výsypkových substrátech s různým obsahem těžkých kovů
2. provést vyhodnocení významnosti přítomnosti těžkých kovů na odběrových stanovištích na variabilitu obsahů výše zmíněných látek v jehlicích borovice lesní

Hrnkové pokusy

1. Zjistit vliv kontaminovaných výsypkových substrátů s různým obsahem těžkých kovů na vybrané fyziologické parametry rostlin (transpirace, rychlost čisté fotosyntézy, vodivost průduchů) a obsah rozpustných fenolických látek v listech rostlin tabáku
2. Zjistit vliv $HgCl_2$ na vybrané fyziologické parametry rostlin
3. Porovnat účinky kontaminovaných výsypkových substrátů s různým obsahem těžkých kovů a $HgCl_2$ na výše zmíněné fyziologické parametry

Hypotézy

Terénní výzkum

1. Výsypkové substráty s obsahem As a Hg mají vliv na fyziologický stav borovic.
2. Stáří jehlic má vliv na obsah rozpustných fenolických látek a ligninu v jehlicích borovice.
3. Těžké kovy mění obsah rozpustných fenolických látek, ligninu a fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice.

Hrnkové pokusy

1. Vybrané kontaminované substráty mají vliv na fyziologický stav rostlin tabáku.
2. Těžké kovy mění obsah rozpustných fenolických látek a fotosyntetických pigmentů v rostlinách tabáku.
3. Těžké kovy mají vliv na vodní režim a rychlost čisté fotosyntézy rostlin tabáku.

4. Rtuť ve formě $HgCl_2$ zvyšuje obsah rozpustných fenolických látek a snižuje obsah fotosyntetických pigmentů v rostlinách tabáku.
5. Rtuť ve formě $HgCl_2$ snižuje transpiraci rostlin a snižuje rychlost čisté fotosyntézy rostlin tabáku.

2. LITERÁRNÍ ÚVOD

2.1. Důlní činnost v oblasti Sokolova

Zkoumané lokality výsypek se nachází v oblasti Sokolovské pánve o rozloze cca 200 km^2 v západních Čechách. Pro tuto oblast je charakteristická dlouhodobá těžba hnědého uhlí. První zmínky o hnědém uhlí pocházejí z 16. století, a nejstarší písemné záznamy o jeho těžbě spadají do poloviny 17. století. Po Druhé světové válce se začalo upouštět od hlubinného těžení a nahradily ho efektivnější povrchové lomy. Zásoby hnědého uhlí by se měly podle odhadů těžit do roku 2036.

Důlní činnost zatěžuje okolí znečištěním, a zejména povrchové lomy přetváří ráz celé krajiny. Těžbou se na povrch dostávají toxické kovy, jako např. As a Hg, nebo se zde mohou hromadit v toxických koncentracích některé další prvky, např. Cu nebo Zn, které jsou v nízkých koncentracích pro rostliny esenciální. Odpady a emise z důlní činnosti také zapříčiňují kyselé pH vod a půd v postižených lokalitách. Při nízkých hodnotách pH dochází u některých prvků k tvorbě sloučenin, které mají negativní vliv na fyziologii rostlin. Jako příklad je možno uvést hliník, který se do půdy uvolňuje při pH 5,5, a při nižším pH tvoří toxické kationty Al^{3+} (Kinraide, 1991). Díky těmto zátěžím je Sokolovská oblast využívána v mnoha studiích, například pro výzkum fyzikálních změn půd na výsypkách (Kuraz et al., 2012), či pro výzkum rozvoje bakteriálních společenstev na sukcesních stanovištích (Urbanova et al., 2011). Vytěžené horninové masy jsou ukládány na výsypky, které mohou být umístěny vně nebo uvnitř dolů.

Vzhledem k toxicitě materiálu navezeného na výsypky je nutné podrobit tato místa rekultivaci. Rekultivace je soubor činností, které upravují krajinu po nežádoucích zásazích, jako je například těžba. Rekultivace se člení na dvě části – technickou a biologickou. Výsypky jsou v zájmové oblasti nejprve podrobeny technické úpravě terénu, která zahrnuje například úpravu sklonů terénu a odvodnění, a má za následek změny ve fyzikálních vlastnostech půdy. Následuje biologická fáze, která se řadí ve

zkoumané lokalitě k lesnickým rekultivacím. Při tomto typu rekultivace není výsypkový materiál překrýván ornou půdou. Sazenice dřevin, které jsou při výsadbě dvou až tříleté, jsou v pětiletém cyklu ošetřovány (ožínání, okopávání) a chráněny proti okusu. V jedenáctém roce dochází k prořezání porostu. Jako zástupci listnatých dřevin jsou používané například olše či duby a mezi zástupce jehličnanů se řadí např. borovice a smrky (Frouz et al. 2007).

2.2. Přítomnost těžkých kovů ve výsypkových substrátech

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1, na výsypkách se vyskytují toxická množství některých těžkých kovů. Mezi nejčastější toxické kovy vyskytující se v oblastech důlní činnosti patří As, Hg, Pb, Cd či se zde vyskytují ve vysokých koncentracích kovy pro rostliny esenciální jako Cu a Zn (Bech et al., 2012; Dong et al., 2012; Wahsha et al., 2012).

Těžké kovy jsou definovány svou hustotou vyšší než 5 g/cm^3 (Michalak, 2006). Do prostředí se dostávají antropogenní činností jako je například těžba, průmyslová činnost (Suchara et al., 2011), ochrana rostlin pesticidy a fungicidy (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002) nebo přírodními procesy jako sopečná aktivita. Mohou se vyskytovat v nejrůznějších formách a skrze akumulaci v rostlinách, kontaminaci pitné vody či z ovzduší se mohou dostávat do potravního řetězce a tím ohrožovat další organismy.

Mezi těžké kovy přítomné v Sokolovské oblasti patří Ag, Al, As, Be, Bi, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg, La, Li, Mo, Nd, Ni, Pr, Sb, Se, Sn, Sr, Th, U, V a Y (Suchara et al., 2011). Kovům, které se na výsypkách vyskytují ve vysokých koncentracích, budou věnovány samostatné kapitoly.

2.3. Vliv těžkých kovů (TK) na rostliny

2.3.1. Mechanismy působení TK na rostliny

Toxicita těchto prvků vůči rostlinám je dána jejich koncentrací a formou v jaké jsou pro rostliny dostupné. Například naměřená celková koncentrace toxického prvku v půdě nemusí znamenat nutné ohrožení rostlin, pokud se vyskytuje ve formě pro rostliny nedostupné (Chapman et al., 2012). Existuje několik mechanismů, jakými

těžké kovy působí na rostliny. Nejčastěji mezi ně patří schopnost reagovat s proteiny díky vazbám na různé funkční skupiny (SH) a tím je deaktivovat nebo způsobují tvorbu volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, které dále poškozují metabolismus rostlin (oxidace proteinů, lipidů a pod.) a buněčné struktury (membrány). Některé toxické prvky (As) jsou chemickou astrukturou podobné esenciálním prvkům (P) a mohou být rostlinami přijímány skrze transportéry pro esenciální prvky a tím způsobovat jejich deficienci (Hall, 2002; Chen et al., 2012; Thapa et al., 2012). Tato poškození mají za následek nejčastěji sníženou tvorbu biomasy (Lomonte et al., 2010), různé anatomické změny (jako například degradace palisádového parenchymu v listech, zesílení kortikální části kořene) (Maksimovic et al., 2007; Rodriguez et al., 2009; Souza et al., 2011) až smrt rostliny.

Rostliny se však dokáží těmto účinkům toxických prvků do určité míry bránit. V první řadě se snaží zabránit vniku toxických látek do organismu již na úrovni kořene. Vylučují exudáty, které na sebe toxické látky váží a tím snižují jejich dostupnost pro rostliny, velkou roli mohou hrát mykorrhizní symbionti, kteří mohou napomáhat například ukládáním toxických látek ve své buněčné stěně nebo se v kořenech tvoří apoplastické bariéry, které zvyšují selektivitu příjmu látek, jako jsou například Caspary ho proužky a další obranné mechanismy (Hall, 2002; Juang et al., 2012). V okamžiku kdy jsou kovy přijaty do buňky a dosáhnou toxických koncentrací, tak je rostlina schopná se bránit jejich účinkům navázáním kovu do sloučenin (metalothioneiny, fytochelatiny) a tím je deaktivovat. Následně jsou tyto sloučeniny ukládané do buněčné stěny, vakuoly nebo jsou vylučovány do okolního prostředí (Hall, 2002; Thapa et al., 2012).

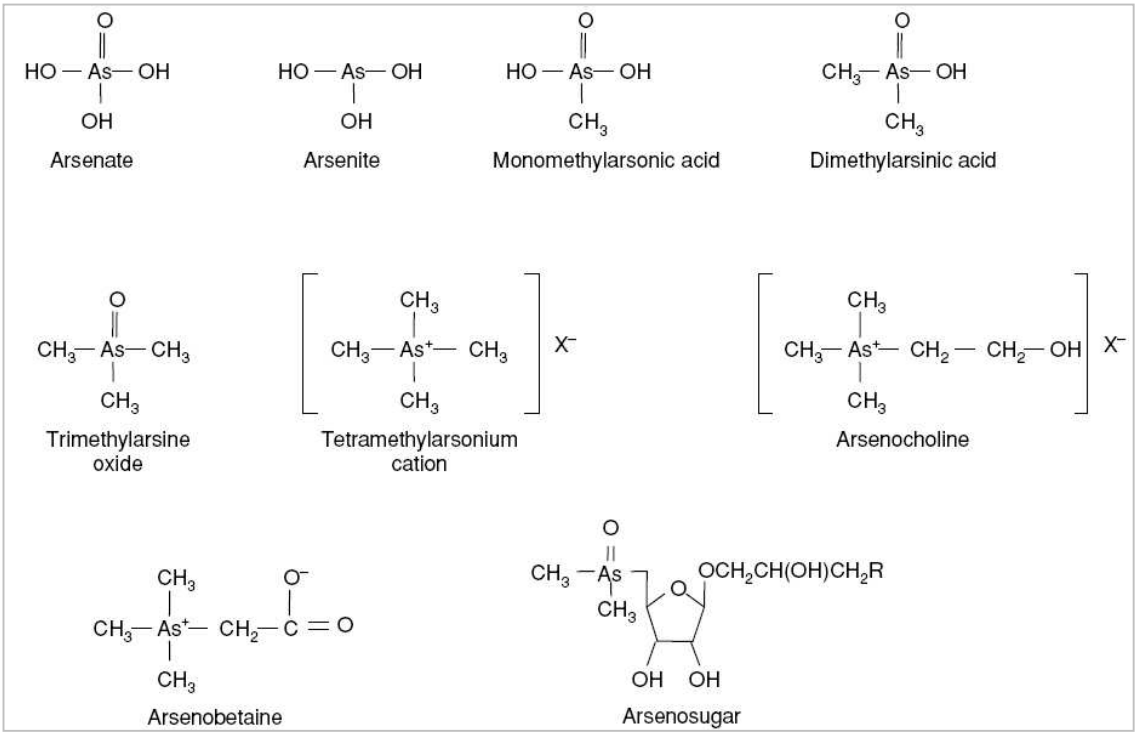
2.3.2. Citlivost rostlin k těžkým kovům

Podle schopnosti tolerovat určité koncentrace toxických kovů můžeme rostliny rozdělit na citlivé, tolerantní a na hyperakumulující. U citlivých rostlin je možné zaznamenat negativní vliv toxických kovů již při jejich nízkých koncentracích. Tyto rostliny zřejmě nejsou schopné uplatnit v dostatečné míře obranné mechanismy a dochází u nich k výraznému úbytku biomasy nebo dokonce k úhynu celé rostliny. Potvrzují to výsledky několika studií s citlivými rostlinami jako například inhibice růstu kořenů rostlin *Rumex dentatus* již při koncentraci mědi 10 μM (Huang et al., 2008) či studie na rostlinách *Brassica juncea*, které byly vystaveny toxickým koncentracím

kadmia (25 a 50 μmol/L). Tolerantní rostliny vykazovaly vyšší schopnost deaktivovat reaktivní formy kyslíku vzniklé jako reakce na Cd než citlivé rostliny (Iqbal et al., 2010). Tolerantní rostliny jsou schopné růst v oblastech s vyššími koncentracemi toxických kovů díky schopnosti uplatnit obranné mechanismy, které jsou popsané výše. Hyperakumulující rostliny jsou schopné aktivně přijímat toxické kovy a transportovat je z kořenů do nadzemních částí, kde jsou ukládány a to ve vyšších koncentracích než v půdě a až tisíckrát vyšších než jsou schopné ukládat tolerantní rostliny (Rascio and Navari-Izzo, 2011).

2.3.3. Arsen

Arsen je jeden z prvků, který se vyskytuje ve vysokých koncentracích hlavně v oblastech důlní činnosti. V půdě se vyskytuje ve dvou formách a to v podobě anorganických sloučenin, z kterých se mikrobiální činností vytvářejí sloučeniny organické (obr. 1). Organické sloučeniny jsou v půdě zastoupeny většinou v malých množstvích (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002).



Obr. 1 Chemická struktura sloučenin arsenu detekovaných v půdě a v rostlinách, převzato z (Zhao et al., 2010)

Nejvíce se v půdě vyskytují dvě anorganické formy arsenu - arsenát (As^{V}) a arsenit (As^{III}). Jejich dostupnost pro rostliny závisí na mikroorganismech žijících v půdě, na vlastnostech půdy (pH, okysličenost, hydroxy sloučeniny železa a pod.) a na vlastnostech rhizosféry rostlin, které mohou měnit vlastnosti půdy v okolí kořenové soustavy (Zhao et al., 2010). Volného arsenátu je v půdě poměrně malé množství díky jeho silným vazbám na hydroxidy železa. Předpokládá se, že je rostlinami přijímán skrze transportéry pro fosfát. Tato cesta je arsenátu umožněna díky jeho vysoké chemické podobnosti s fosfátem. Arsenit je rostlinami pravděpodobně přijímán aquaporiny a transportéry pro křemík (Zhao et al., 2009).

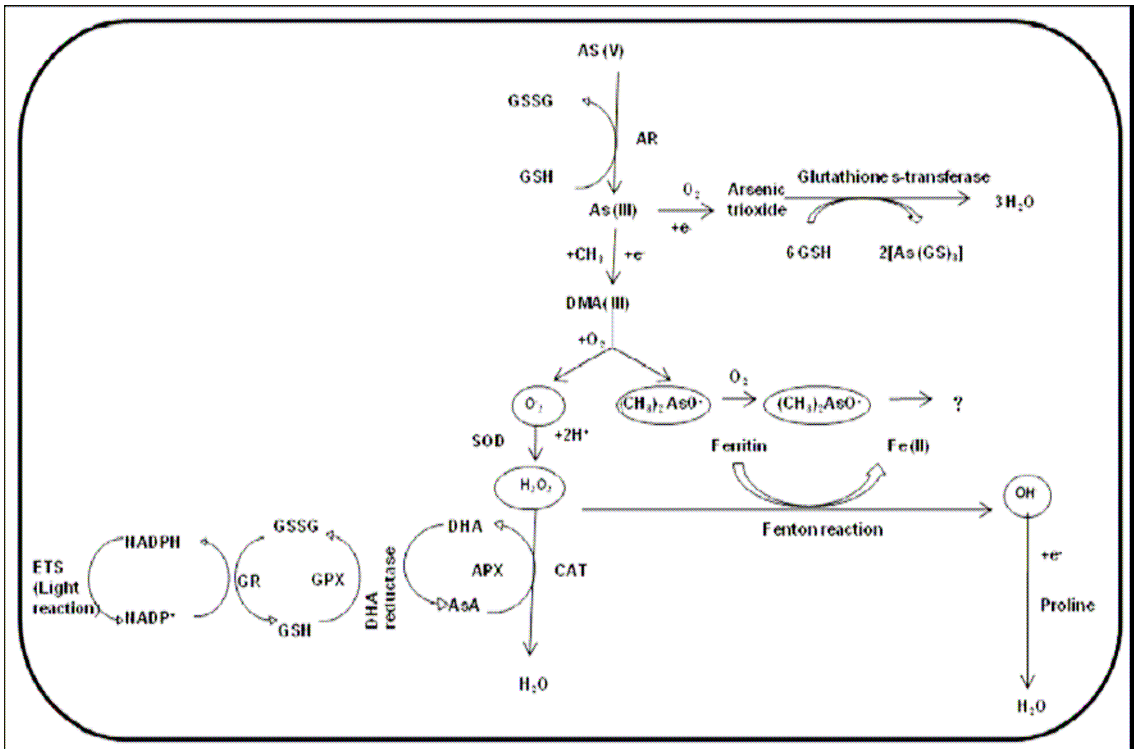
2.3.3.1. Toxicita sloučenin arsenu

Arsenát i arsenit vykazují negativní vliv na fyziologický stav rostlin. Arsenát, díky již zmíněné podobnosti s fosfátem, může negativně ovlivňovat například syntézu ATP. Arsenit je vysoce afinní k SH skupinám a může se skrze ně vázat na proteiny a tím je deaktivovat (Zhao et al., 2010). Z hlediska mé diplomové práce se dále budu zabývat indukcí tvorby reaktivních forem kyslíku, které by mohly mít vliv na zvýšení koncentrace fenolických látek v jehlicích borovice, jako reakce na přítomnost As a účinky As na fotosyntézu a transpiraci.

2.3.3.1.1. Indukce tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS)

Z několika studií vyplívá, že při vystavení rostlin toxickému arsenu se zvyšuje aktivita enzymů zapojených do obranného mechanismu proti ROS, jako jsou katalasy, superoxid dismutáza (SOD), glutathion-S-transferasa nebo se zvyšuje přítomnost neenzymatických stresových látek jako je glutathion či askorbát (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002; Requejo and Tena, 2005).

ROS zřejmě vznikají při redukci As^{V} na méně toxický As^{III} a také při metylaci As^{III} (Obr. 2) (Sharma, 2012). Zdá se, že míra metylace As^{III} v rostlinách závisí na dostatečném příjmu živin. Ze studie na rostlinách rajčat vyplývá, že u stresovaných rostlin nedostatkem fosforu a dusíku byl vznik metylovaných sloučenin arsenu vyšší než u nestresovaných rostlin (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002; Zhao et al., 2010).



Obr. 2 Předpokládaný mechanismus tvorby ROS za přítomnosti As a obrana rostlin převzato z (Sharma, 2012)

2.3.3.1.2. Vliv As na fotosyntézu a transpiraci rostlin

Mechanismy působení As na fotosyntézu nejsou v literatuře podrobně popsány, ale ze studií vyplývá, že As snižuje obsah chlorofylu v rostlinách, čímž inhibuje fotosyntézu.

Pokusy na rýži (Rahman et al., 2007) a fazolích (Stoeva et al., 2005) ukazují, že stoupající obsah arsenu a jeho sloučenin v substrátu (hydroponie či půda), snižuje obsah obou typů chlorofylu v rostlině i rychlost čisté fotosyntézy. Minimální obsah arsenu působící negativně na fazole byl 5mg.dm^{-3} As v hydroponii (Stoeva et al., 2005). U rýže byla koncentrace od 60 mg.Kg^{-1} As v půdě a výše smrtící (Rahman et al., 2007).

(Rahman et al., 2007) se domnívají, že jimi pozorovaná změna tvaru chloroplastů (jevily se kruhovitější oproti chloroplastům u kontrolních rostlin) a destrukce chloroplastových membrán by mohla být další příčina snížení rychlosti fotosyntézy u rostlin rýže.

Pokusy (Paivoke, 1983) a (Merry et al., 1986) ukazují snížení obsahu dusíku v rostlinách působením arsenu. Dusík je jedna ze součástí chlorofylu a jeho úbytek v rostlině by mohl zapříčinit úbytek chlorofylu v rostlinách (Rahman et al., 2007).

Vliv arsenu na transpiraci rostlin se nezdá být hlavním směrem výzkumu jeho toxicity a v literatuře je o něm psáno velice málo.

V rámci studie vlivu As na fyziologické parametry rostlin fazolí byl hodnocen vodní potenciál, transpirace a vodivost průduchů. Inhibiční účinek As na tyto parametry byl zaznamenán již při koncentracích 2 mg/dm^3 (Stoeva et al., 2005).

Pokusy na rostlinách okurek naznačují, že by arsen mohl mít obdobné negativní účinky na transpiraci rostlin skrze interakci s aquaporiny jako rtuť (Czech et al., 2010).

2.3.3.2. Detoxifikace As rostlinou

Arsen se v rostlinném těle vyskytuje hlavně v podobě arsenitu. Arsenát je po přijetí rostlinou téměř okamžitě redukován na arsenit. Rostliny při detoxifikaci arsenu využívají jeho vysokou afinitu k SH skupinám a tvoří sloučeniny jakou jsou glutathion nebo fytochelatiny, které jsou na tyto skupiny bohaté díky vysokému zastoupení cysteinu v jejich struktuře. Tyto sloučeniny tvoří s arsenem komplexy, které jsou pravděpodobně ukládány ve vakuolách, kde jsou díky nízkému pH skladovány ve stabilních formách (Zhao et al., 2009).

2.3.4. Rtuť

Rtuť se do prostředí dostává hlavně díky přírodním procesům jako jsou sopečné výlevy, ale podstatná část emisí je tvořena lidskou činností jako je například těžba či zemědělská činnost (Patra and Sharma, 2000). V prostředí se vyskytuje jako elementární rtuť Hg^0 nebo v anorganických a organických sloučeninách. Všechny tyto sloučeniny umožňují lokální i globální cirkulaci rtuti skrze půdu, vodu i vzduch (Boening, 2000; Wang et al., 2012).

Organické formy Hg v prostředí vznikají činností bakterií. Jsou využívány jako složky fungicidů jako prostředek ochrany rostliny v zemědělství. Avšak metylovaná forma Hg je velice toxická. Z organických forem vzniká výparem elementární forma Hg, kterou jsou rostliny schopné přijímat skrze listy (Boening, 2000; Patra and Sharma, 2000).

Anorganické formy rtuti se v půdě vyskytují hlavně v netoxických sloučeninách, kde je rtuť navázaná na síru (rumělka HgS), ale v oblastech průmyslové činnosti a těžby se může vyskytovat i v toxických sloučeninách. Toxické formy se vyskytují v podobě rozpustných solí Hg^I (Hg_2Cl_2) a Hg^{II} ($HgCl_2$), které jsou pro rostliny z půdy dostupné (Boening, 2000; Patra and Sharma, 2000; Wang et al., 2012).

O mechanismu příjmu rtuti rostlinami je známo velice málo. Dostupnost rtuti z půdy je ovlivněna vlastnostmi půdy (např. redoxní potenciál, obsah uhličitanů a oxidů, pH) a stářím kontaminovaného substrátu (se zvyšujícím se stářím klesá dostupnost Hg) (Hatzinger and Alexander, 1995; Yao et al., 2011). Přeměny solí rtuti mikroorganismy na její další formy (organické sloučeniny a elementární rtuť) může také snižovat koncentraci dostupné rtuti pro rostliny v půdě. Elementární rtuť, která se vypařuje z půdy může být přijímána rostlinou skrze listy (Patra et al., 2004).

2.3.4.1. Toxicita Hg

Rtuť může narušovat metabolismus buněk několika způsoby. Podobně jako As i Hg vykazuje vysokou afinitu k SH skupinám, díky níž může poškozovat proteiny jejich srážením nebo vzájemným propojováním. Je schopná se vázat na molekuly ATP a ADP a tím je deaktivovat. Působením $HgCl_2$ se mění propustnost plasmatických membrán, což může mít za následek snížený příjem esenciálních kovů do buňky (Godbold and Huttermann, 1988; Patra and Sharma, 2000). Z hlediska mé diplomové práce se dále budu zabývat indukcí tvorby ROS způsobenou přítomností Hg, které by mohly mít vliv na zvýšení koncentrace fenolických látek v jehlicích borovice a účinky Hg na fotosyntézu a transpiraci.

2.3.4.1.1. Inducke tvorby ROS

Indukce tvorby ROS, po vystavení rostlin různým koncentracím rtuti, byla potvrzena v několika studiích skrze různé indikátory. V pokusech na klíčních rostlinách okurky (*Cucumber sativum L.*) s různými koncentracemi $HgCl_2$ byl zjištěn vyšší obsah peroxidáz u rostlin vystavených nejvyšší koncentraci rtuti (500 μM) a zvýšená oxidace proteinů při koncentracích 250 a 500 μM (Cargnelutti et al., 2006).

V pokusech na klíčních rostlinách *Jatropha curcas* pěstovaných také při různých koncentracích $HgCl_2$ používali jako indikátory oxidativního stresu zvýšenou aktivitu antioxidativních enzymů, jako je SOD a peroxidásy (POD) jejichž zvyšování aktivity korelovalo se zvyšujícím se obsahem Hg až do koncentrace 100 μM $HgCl_2$. V této studii přikládají důležitý význam korelaci zvyšujícího se obsahu $HgCl_2$ se zvyšující se aktivitou fenylalanin amoniak lyasy (PAL). PAL umožňuje tvorbu obranných látek jako jsou fenolické látky a flavonoidy a autoři se domnívají, že by mohla mít důležitou roli v antioxidativním systému studované rostliny (Gao et al., 2010).

2.3.4.1.2. Vliv Hg na fotosyntézu a transpiraci

Rtuť může negativně ovlivňovat fotosyntézu několika mechanismy v nichž velkou roli hraje již zmíněná afinita rtuti k SH skupinám.

Rtuť inhibuje fotosyntézu skrze narušování elektron transportních řetězců ve fotosystémech I i II (PSI, PSII) (Kimimura and Katoh, 1972; Ventrella et al., 2009). Podle studie vlivu $HgCl_2$ na fotofosforylaci v izolovaných chloroplastech špenátu inhibuje tato sloučenina již při malých množstvích (0,1 μmol na mg chlorofylu) necyklický transportní řetězec fotosyntézy, čímž následně dochází i k inhibici tvorby ATP (Bradeen et al., 1973). Poškození PSII v izolovaných chloroplastech špenátu potvrzují další studie (Sersen et al., 1998). Ze studie (Terashima and Ono, 2002) na *Vicia faba* a *Phaseolus vulgaris*, vyplývá, že fotosyntéza nemusí být inhibována pouze přímým působením na obsahy chlorofylu či fotosystémy, ale i jejím inhibičním působením na aquaporiny, čímž ovlivňuje transport vody a CO_2 v listech rostlin.

Rtuť v podobě $HgCl_2$ inhibuje vodní transport v celé rostlině skrze změny v permeabilitě membrány. Předpokládaným mechanismem této změny je inhibice vodních kanálu – aquaporinů (Javot and Maurel, 2002). Aquaporiny jsou membránové kanály zajišťující pasivní vodní transport skrze membránu a vyskytují se v plasmalemě a tonoplastu buněk (Kjellbom et al., 1999).

U klíčních rostlin pšenice vystavených toxickým koncentracím rtuti (0,1 – 0,5 mM $HgCl_2$) byl naměřen zvýšený vodní deficit oproti kontrole (Ge et al., 2009). V jiné studii na kořenech pšenice byl naměřen pokles hydraulické vodivosti kořene přičítaný inhibici aquaporinů přidaným $HgCl_2$ (Zhang and Tyerman, 1999).

2.3.4.2. Detoxifikace Hg rostlinou

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.3.4, rtuť je rostlinami přijímána kořeny z půdy nebo může být absorbována ze vzduchu listy. Studie ukazují, že se rtuť přijímaná z půdy akumuluje v kořenech, což naznačuje jistý obranný mechanismu proti transportu rtuti do nadzemních částí rostlin (Patra and Sharma, 2000). Avšak akumulace v kořenech či transport do nadzemních částí také závisí na druhu rostliny (Castro et al., 2009) a formě v jaké se rtuť v rostlině vyskytuje. Anorganické formy se více ukládaly v kořenech rýže a organické formy více v semenech rýže (Meng et al., 2010). Navíc u rostlin *Nicotiana miersii*, u kterých byla rtuť přijímaná listy v podobě Hg^0, nebyl prokázán transport rtuti z listů. Jako těžký kov by mohla být rtuť také detoxifikována

skrze metalothioneiny. O detoxifikačních mechanismem je v dostupné literatuře informací jen málo.

Akumulaci rtuti v kořenech potvrzuje studie na rostlinách rýže (Du et al., 2005). U rostlin *Halimione Portulacoides* byla většina rtuti v kořenech vázána v buněčných stěnách. V malém množství byla rtuť vázána na vysokohmotnostní proteiny, které autor označuje za metalothioneniny (Valega et al., 2009).

Vyšší koncentrace rtuti v cytoplasmě buněk může způsobovat oxidativní stres, jak již bylo řečeno v kapitole 2.3.4.1.1. Rostliny se proti oxidativnímu stresu brání vyšší aktivitou askorbát peroxidásy, peroxidáz nebo SOD, jak bylo zjištěno například u rostlin *Medicago sativa cv. Arag* (Sobrino-Plata et al., 2009). V této studii také byla zaznamenána inhibice aktivity glutathion reduktázy zapříčiněná zřejmě vazbou Hg na thioskupiny reduktázy, což se projevilo i na snížené syntéze glutathionu.

2.3.4.3. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS v rostlinách vznikají v malých množstvích při různých procesech, mimo jiné může být jejich tvorba indukována přítomností těžkých kovů. Další procesy, kdy vznikají ROS jsou například respirace či elektronový transport při fotosyntéze a mohou mít i důležitou funkci například při syntéze ligninu (Michalak, 2006). Mezi reaktivní formy kyslíku patří peroxid vodíku H_2O_2, hydroxylové radikály OH^-, ozon O_3, singletový kyslík - $1O_2$ a anion superoxidu - O^{2-} (Blokhina et al., 2003). Ve velkých množstvích vznikají ROS jako reakce na stres jako například při napadení patogeny nebo při vystavení toxickým koncentracím těžkých kovů.

Těžké kovy mohou indukovat tvorbu ROS různými mechanismy. Některé kovy se mohou díky své redoxní aktivitě podílet na vzniku hydroxylový radikálů skrze Fentonovu reakci či Haber Weissovu reakci obr. 3. Jiné mohou zvyšovat tvorbu ROS při fotosyntéze narušováním elektrontransportního řetězce, vyčerpáváním glutathionu, který hraje roli jak v detoxifikaci těžkých kovů, tak při detoxifikaci ROS nebo poškozováním enzymů fungujících v detoxifikačních procesech proti ROS (Michalak, 2006; Juknys et al., 2012).

Obr. 3 Tvorba reaktivních forem kyslíku, převzato z (Michalak, 2006)

Haber-Wiessova reakce

$$H_2O_2 + {}^{\cdot}O_2^- \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$$

Fentonova reakce

$$H_2O_2 + Fe^{2+}(Cu^{+}) \rightarrow Fe^{3+}(Cu^{2+}) + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

$$O_2 + Fe^{3+}(Cu^{2+}) \rightarrow Fe^{2+}(Cu^{+}) + O_2$$

ROS jsou velice reaktivní a mohou poškozovat mnoho buněčných struktur jako jsou například membrány, lipidy nebo chlorofyl a proto se rostliny snaží udržet jejich nízké koncentrace (Michalak, 2006). Na deaktivaci ROS se podílí mnoho enzymů ať už přímo detoxifikací ROS (SOD, POD a pod.) nebo na tvorbě látek, které s ROS reagují a tím je deaktivují, jako například glutathion, askorbát nebo fenolické látky, kterými se budu zabývat v kapitole 2.3.5.1 (Blokhina et al., 2003).

2.3.5. Vybrané sledované látky v jehlicích borovice: jejich fyziologická funkce a vztah k těžkým kovům

2.3.5.1. Fenolické látky

Fenolické látky jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin, které vznikají z produktů primárního metabolismu. Produkty primárního metabolismu, jako jsou například aminokyseliny, nukleové kyseliny či některé sacharidy, lipidy a proteiny, jsou pro život rostlin nezbytné a jejich syntéza je ve všech rostlinách obdobná. Sekundární metabolity rostlin jsou tvořeny potřebnými (avšak ne nezbytnými) či odpadními látkami, jako jsou například fenolické látky, glykosidy nebo terpenoidy. Jejich syntéza je druhově i orgánově specifická. Oba typy metabolismu jsou spolu úzce spojeny a některé jejich produkty nelze striktně řadit pouze k jednomu typu metabolismu.

Fenolické látky jsou tvořeny aromatickým kruhem (C6) s navázanou minimálně jednou hydroxylovou skupinou. Biosyntéza probíhá nejčastěji skrze šikimátovou dráhu. Tato dráha vychází z erytrosa-4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu. Dalšími reakcemi vzniká kyselina šikimová, podle které je dráha nazvána. Následnými reakcemi vzniká fenylalanin, který představuje nejběžnější prekursor pro syntézu fenolických látek. Díky enzymu fenylalaniniamoniaklyase vzniká kyselina skořicová, ze které různými modifikacemi vznikají fenolické látky.

V rostlinách se vyskytuje několik skupin těchto látek. Jejich obsahy se liší nejen u různých druhů rostlin, ale i v rámci rostliny samotné podle struktury a věku orgánu či celé rostliny. Například u jehličnanů tvoří fenolické látky obsažené v jehlicích až 12,3% celkového obsahu uhlíku v celé rostlině (Aspinwall et al., 2011). Na základě složení uhlíkového skeletu můžeme fenolické látky rozdělit do čtyř skupin - jednoduché fenoly, fenolkarboxylové kyseliny, fenylpropanoidy a flavonoidy.

Funkce fenolických látek v rostlině jsou četné. Plní mnoho rolí jako například přenašeče elektronů, ochrana před UV zářením, ochrana proti herbivorům, signální, stavební a impregnační molekuly, lákadla opylovačů a mnoho dalších (Klepzig et al., 1995; Grace and Logan, 2000).

Díky ochranné funkci fenolický látek v rostlinách se dají tyto látky považovat za nespecifický bioindikátor stresu (Klepzig et al., 1996). Jejich zvýšený obsah v rostlinách je spojován například se znečištěným ovzduším (Pasqualini et al., 2003), s vodním stresem a zasolením (Redha et al., 2012; Sanchez-Rodriguez et al., 2012) či se stresem spojeným s vysokým obsahem těžkých kovů v půdě (Rastgoo and Alemzadeh, 2011). Z hlediska mé diplomové práce je velice důležitá jejich ochranná funkce při vysokých koncentracích těžkých kovů v půdě a při ochraně proti reaktivním formám kyslíkových radikálů, které jsou popsané v kapitole 2.3.4.3.

Mechanismus ochrany rostlin před stresem pomocí fenolických látek působí na několika úrovních. Fenolické látky (hl. taniny) jsou schopny vázat se na těžké kovy a tím je deaktivovat (Lavid et al., 2001). Díky své struktuře se váží na alkoxylové radikály vzniklé působením těžkých kovů. Tato schopnost závisí na stavbě molekuly a počtu hydroxylových skupin obranné fenolické látky. Fenoly (hl. flavonoidy) také dokáží snížit tekutost membrán a tím snížit průchod radikálů. Také jsou schopny se vázat na polární část fosfolipidů v membráně a snižovat tak možnost interakce radikálů s membránou. Flavonoidy mohou deaktivovat kyslíkové radikály poskytnutím elektronu nebo vodíkového atomu (Michalak, 2006).

2.3.5.2. Lignin

Lignin patří mezi důležité sekundární metabolity rostlin. Je to jedna z hlavních složek buněčné stěny rostlinných buněk, která zajišťuje mechanické zpevnění buněk (a následně i orgánů – jehlice, stonky) a odolnost různým vlivům stresu, jako jsou například ROS, zasolení (Neves et al., 2010), vodní deficit (Lee et al., 2007) či těžké kovy (Elobeid et al., 2012; Gao et al., 2012), díky čemuž se v různých studiích může

používat jako nespecifický indikátor stresu. Jeho přesná struktura není dosud známa, protože se zatím nepodařilo lignin izolovat v nezměněné podobě. Jeho syntéza probíhá polymerizací radikálů fenolických alkoholů (coniferyl, synapyl a p-kumaryl alkohol) v buněčné stěně. (Lewis and Yamamoto, 1990; Radotic et al., 2005).

Fenolické látky a lignin mají obecně velký vliv na koloběh živin v ekosystémech, zvláště pak koloběh dusíku a uhlíku. Rostliny a půdní mikroorganismy využívají dostupný dusík z půdy a o tento zdroj spolu mohou soupeřit. Rostliny produkují fenolické látky a lignin, které mohou inhibovat mikrobiální činnost v půdě. Tím však zmenšují dostupnost minerálního N, který je v mnoha ekosystémech limitní. Proto rostliny nemohou produkovat těchto látek taková množství, která by příliš inhibovala půdní mikroby a znamenala by nedostatek dusíku pro rostliny (Ushio et al., 2009). Obsah těchto látek v listoví zvyšuje nízké pH půdy a nedostatek živin (Smolander et., 2012).

2.3.5.3. Fotosyntetické pigmenty

Fotosyntetické pigmenty se dělí na tři základní skupiny a to chlorofyl, fykobiliny a karotenoidy. Chlorofyl je zásadní složkou světlosběrných komplexů a jeho základní struktura je tvořena porfirinem, na který je navázaná molekula hořčíku.

Karotenoidy se nacházejí v membráně thylakoidů a napomáhají při sběru světla. Jejich důležitou rolí je ochrana fotosyntetických struktur před poškozením ROS vznikajících při fotosyntetických reakcích (Sharma, 2012).

Obsah fotosyntetických pigmentů velice dobře odráží fyziologický stav rostlin díky úzkému propojení s fotosyntézou a primární produkcí rostlin (Ustin et al., 2009). a je považován za nespecifický bioindikátor stresu (Tausz et al., 1998).

Díky schopnosti odrážet zdravotní stav rostlin, je chlorofyl studován jako možný indikátor stresu ve sledování zdravotního stavu porostu pomocí dálkového průzkumu Země (Misurec et al., 2012).

3. MATERIÁL A METODY

Experimentální část mé diplomové práce se člení na terénní výzkum a hrnkové pokusy. Pro terénní výzkum byla zvolena jako experimentální rostlina borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Vzorky jehlic z terénního výzkumu pocházejí z vybraných stanovišť v oblasti Sokolovské pánve, jejichž podrobný popis následuje v kapitole 3.1.

Pro hrnkové pokusy byly použity rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum cv. Samsun*) pěstované na substrátech přivezených z níže popsaných stanovišť (kapitoly 3.1 a 3.2.2.1).

3.1. Terénní výzkum: Popis stanovišť

Vybraná stanoviště se nacházejí na několika výsypkách (obr. 4) s různými koncentracemi toxických kovů. Jako kontrolní stanoviště byla zvolena lokalita Svatava, která se nevyskytuje na výsypce a je tvořena smíšeným hospodářským lesním porostem ve věkové kategorii 21-40 let. Jako další stanoviště byly zvoleny lokality Lítov, Erika, Lomnice, a Podkrušnohorská výsypka (obr. 6, 7, 8, 9). Kromě stanoviště Erika, které se nachází u bývalého pískového lomu a původně bylo zamýšleno jako kontrolní lokalita, jsou ostatní stanoviště umístěna na výsypkách důlních substrátů. Stromy na stanovišti Lomnice jsou cca o 5 let mladší než na ostatních stanovištích a nachází se na výsypce v části, kde došlo k převrstvení výsypkového substrátu půdou určenou k biologickým rekultivacím. Na těchto stanovištích se vyskytuje ve vysokých koncentracích hlavně As, Hg a Cu jak popisuje tab. 2 pro terénní výzkum. Výsypky se také potýkají s velice nízkou hodnotou pH, která je také důsledkem těžby v této oblasti (tab. 3). V tab. 1 jsou uvedeny souřadnice stanovišť.

Tab. 1 *Souřadnice experimentálních stanovišť v Sokolovské pánvi*

Stanoviště	Severní šířka	Východní délka
Erika	50,217	12,6
Svatava	50,206	12,607
Lomnice	50,213	12,642
Lítov	50,156	12,531

V ČR zatím nejsou dané limitní obsahy toxických kovů v lesních půdách (Rotter 2011), proto tu předkládám pouze tabulku s limitními obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách tab. 4.

Tab. 2 *Průměrné koncentrace vybraných prvků na terénních stanovištích*

	Koncentrace vybraných prvků (ppm)			
Stanoviště	**Cu**	**Zn**	**As**	**Hg**
Svatava (kontrola)	26,0	39,5	32,8	13,0
Erika	24,0	19,0	71,5	16,0
Lítov	73,7	64,8	116,4	17,1
Lomnice	87,6	116,0	74,8	30,0

Tab. 3 *Průměrná koncentrace Hg a průměrná hodnota pH v KCl substrátů použitých v hrnkovém pokusu*

Varianta	Hg (ppm)	pH
Svatava (kontrola)	0,60	7,19
Erika	0,06	4,83
Lítov	0,24	3,04
Lomnice	0,48	2,78
Podkrušnohorská výsypka	0,41	3,80

Tab. 4 *Limitní obsahy rizikových prvků v půdách dle vyhlášky č. 382/2001 Sb.*

	Koncentrace rizikových prvků (mg.kg-1)			
Typ půdy	**Cu**	**Zn**	**As**	**Hg**
běžné půdy	60	120	20	0,3
lehké půdy	45	105	15	0,3

Obr. 4 *Umístění stanovišť v oblasti Sokolovské pánve*

Obr. 5 – *Povrchová těžba hnědého uhlí na Sokolovsku*

Obr. 6 *Stanoviště Lítov*

Obr. 7 *Stanoviště Erika*

Obr. 8 *Stanoviště Lomnice*

Obr. 9 *Stanoviště Podkrušnohorská výsypka*

3.2. Materiál

3.2.1. Terénní výzkum

Borovice lesní - *Pinus sylvestris*

Tato dřevina představuje zástupce jehličnatých stromů používaných v daných lokalitách pro rekultivaci krajiny. Jehlice byly nasbírány v oblasti Sokolovské pánve na výše popsaných stanovištích. Odběry byly prováděny vždy z osluněné části koruny (aby se zabránilo vzniku gradientů v obsahu chemických látek vlivem míry ozářenosti jehlic) ve dvou úrovních dále označovaných jako horní a spodní, z prvních a druhých ročníků větví aby byly postihnuty možné gradienty sledovaných parametrů v koruně stromu. Stromy jsou staré cca 20 let, na stanovišti Lomnice jsou borovice přibližně o 5 až 8 let mladší a proto zde proběhl odběr pouze horních větví. Jehlice určené pro stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů byly nastříhány na menší části a byly jim odebrány vrcholové části. Odebrané vzorky byly uskladněny v plastových mikrozkumavkách a na místě uchovávány v chladícím boxu (cca 0°C). Po převozu do laboratoře byly přesunuty do mrazničky (cca -20°C). Odběry se konaly na konci července 2009 a na konci srpna 2010.

3.2.2. Hrnkové pokusy

Tabák - *Nicotiana tabacum cv. Samsun*

Tato rostlina byla zvolena z několika důvodů. U rostlin nebylo potřeba, aby dorostly až do reprodukční fáze, což umožnilo v roce 2011 uskutečnit více pokusů za jednu vegetační sezonu. Tabák patří mezi hojně využívané modelové rostliny a jeho semena byla pro nás dobře dostupná. Vzhledem k nízkým koncentracím rtuti v dovezeném substrátu se tato rostlina zdála vhodným kandidátem pro experiment, jehož cílem bylo zhodnotit vliv rtuti na fyziologický stav rostlin. Semena *N. tabacum* byla získána z laboratoře studia regulačních faktorů morfogeneze rostlin. Semena byla vyseta na netoxický substrát a ponechána klíčit 3 – 5 týdnů. Pokusy se konaly v roce 2011 a 2012 viz tab. 5.

T*ab. 5* *Časový rozpis hrnkových pokusů s použitými variantami*

rok	období	Pokus	Varianta
2011	únor - květen	pilotní	Kontrola, Lítov
	březen - červen	1	Kontrola, Lítov, Lomnice, Erika, PVS
	červen - srpen	2	Kontrola, Erika, PVS
2012	duben - červen	3	Kontrola, Erika, PVS, kontrola písek, písek 10 ppm $HgCl_2$, písek 15 ppm $HgCl_2$

3.2.2.1. Design hrnkových pokusů

2011 – pokus pilotní, pokus 1 a 2

Substrát

Pro hrnkové pokusy s rostlinami tabáku byl přivezen substrát z okolí stanovišť použitých v terénním výzkumu. Na daném stanovišti došlo k několika odběrům substrátu z různých míst. Vzhledem k heterogenitě substrátů z jednoho stanoviště byl substrát smíchán ze všech odběrových míst daného stanoviště. Díky toxicitě substrátu (rostliny tabáku nebyly schopny na čistém výsypkovém substrátu růst), bylo nutné substrát naředit. Po pilotních pokusech s různým ředěním substrátu s pískem byl zvolen poměr substrát:písek - 1:6.

Varianty

Původně bylo zamýšleno pěstovat rostliny na substrátech ze všech stanovišť z terénního výzkumu, ale po výsledcích z prvních pokusů byly substráty ze stanoviště Lítov a Lomnice vyřazeny. Rostliny na substrátu z těchto stanovišť začaly po čtrnácti dnech odumírat jak je vidět na obr. 10 a 11. Kontrolní stanoviště Svatava bylo nahrazeno netoxickým kontrolním substrátem.

Obr. 10 – odumírající rostliny na substrátu ze stanoviště Lítov, 2. Týden kultivace v substrátu

Obr. 11 – odumírající rostliny na substrátu ze stanoviště Lomnice

Kultivace rostlin

Rostliny byly předpěstovány ve dvou fázích. Nejprve byla semena vyseta na netoxický substrát a následně po 3 – 5 týdnech byly semenáčky přesazeny do písku. V pilotních pokusech byly rostliny předpěstovány v netoxickém substrátu. Zhruba po 6 týdnech byly přesazeny do výsypkových substrátů. Při sklizni bylo zjištěno, že kořeny rostlin neprorostly z původního kořenového balu do nového substrátu a proto byla

zařazena další fáze předpěstování v písku. Díky ní bylo možno rostliny přesadit bez zbytků původního substrátu a kořeny byly nuceny prorůst do toxického substrátu. Na každou variantu substrátu bylo použito pět rostlin, každá v samostatném květináči. Všechny varianty byly zalévány obyčejnou vodou. Rostliny byly v toxickém substrátu pěstovány 4 týdny. Po té byly z listů odebrány vzorky pro biochemické analýzy a zbylá biomasa byla sklizena.

Sklizeň

Sklizeň probíhala po tři dny. Nejprve byla odejmuta nadzemní část rostliny a zvážena a po té byly odejmuty vzorky pro biochemické analýzy, které byly zváženy a uloženy do mrazáku. Kořenový systém byl vyjmut ze substrátu tak, aby se co nejméně potrhal a byl ponořen do kádinky s vodou po dobu než byly zbylé potrhané kořeny vybrány ze substrátu. Kořeny byly promyty vodou pro odstranění zbytků substrátu, osušeny a zváženy. Nadzemní i podzemní části byly usušeny v sušárně při 80°C.

2012 – pokus 3

Pokusy v roce 2012 byly v některých ohledech obměněny na základě výsledků pokusů z roku 2011.

K variantám se substráty z terénních stanovišť byly přidány další tři varianty (tab. 5) pěstované pouze ve směsi písku a perlitu v poměru 1:1. Jedna z pískových variant byla kontrolní a další dvě varianty byly ošetřeny Hg zálivkou ve formě $HgCl_2$ (Askari et al., 2007; Zhou et al., 2009).

Všechny rostliny byly předpěstovány stejným způsobem jako v roce 2011. Po přesazení do substrátu byly všechny varianty zalévány 3x týdně živným roztokem namíchaným podle Hoaglanda (Laštůvka, Z., Minář, J. 1967), který byl použit ve čtvrtinové koncentraci. První dva týdny bylo použito 200 ml roztoku na jednu rostlinu, druhé dva týdny bylo použito 100 ml roztoku. Složení živného roztoku je popsané v tab. 6. Nové varianty pěstované v písku byly zalévané živným roztokem obohaceným o $HgCl_2$ s koncentrací 10 ppm a 15 ppm. Tyto koncentrace byly zvoleny na základě koncentrací naměřených v substrátech z terénních stanovišť.

Tab. 6 – *složení ¼ živného roztoku podle Hoaglanda (ž.r. – živný roztok)*

makroprvky	**zásobní roztok (g/l)**	**pipetování (ml / l ž.r.)**	***mikroelementy roztok I:***	**zásobní roztok (g/l)**
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	295,5	1	**H_3BO_4**	14,3
KNO_3	126,5	1	**$MnCl_2 . 4H2O$**	9,06
KH_2PO_4	34	1	**$ZnSO_4$**	1,11
$MgSO_4 . 7H_2O$	61,4	1	**$(NH_4)_2Mo_7O_{24}$**	0,38
namíchat každý zvlášť			**$CuSO_4$**	0,4
mikroprvky				
Fe citrát	5	0,5		
mikroelementy II	*	0,5		
*** příprava: 50 ml zás. roztoku I + 950ml H2O**				

3.2.3. Metody

3.2.3.1. Stanovení obsahu těžkých kovů v půdě a jehlicích borovice

Stanovení obsahů těžkých kovů v půdě a v jehlicích borovice bylo provedeno Českou geologickou službou (ČGS). Pro stanovení obsahu těžkých kovů (TK) v půdě na stanovištích byly použity spektrometrické metody.

Pro stanovení obsahu Hg v substrátu pro hrnkové pokusy byla použita metoda pyrolitického rozkladu vzorku s následným spektrálním měřením v laboratoři ČGS. Pro stanovení pH substrátu pro hrnkové pokusy byla použita metoda výluhu roztokem KCl.

Pro stanovení obsahu As v jehlicích borovice byla použita metoda generace hydridů a následná atomová absorpční spetrometrie (HGAAS). Pro stanovení obsahu Hg v jehlicích borovice byla použita metoda pyrolitického rozkladu vzorku s následným spektrálním měřením v laboratoři ČGS.

3.2.3.2. Biochemické stanovení fenolických látek

Homogenizace

Vzorky byly homogenizovány pomocí tekutého dusíku v třecích miskách (jehlice) či v plastových zkumavkách (listy).

Extrakce

Extrakce byla provedena podle (Singleton & Rossi, 1965). Pro extrakci fenolických látek byl použit 80% methanol. Homogenizované vzorky (jehlice *P. sylvestris*) s methanolem (6 ml) byly ponechány 30 minut ve vodní lázni. Poté byly odstředěny při 5 000 otáčkách a supernatant byl přepipetován do nové zkumavky. K peletu byly přidány 4 ml methanolu a postup se opakoval. Následně byly přidány 3 ml methanolu. Koncentrace fenolických látek v supernatantu byla stanovena spektrofotometricky. Pelet byl vysušen v sušárně při 80°C a následně zvážen a použit jako referenční sušina.

V případě listů *N. tabacum* byl použit stejný postup. Lišila se pouze množství použitého methanolu a to nejprve 4 ml a následně 2x 3 ml.

Spektrofotometrické stanovení

Pro stanovení absorbance vzorku byl použit spektrofotometr Unicam Helios α. Byly použity roztoky popsané v tab. 7.

Tab. 7 – *Složení roztoků pro spektrofotometrické stanovení absorbance fenolických látek*

roztok	složení
roztok A	2% (20g/l) Na_2CO_3 v 0,1M Na OH
roztok B	0,5% $CuSO_4$ x $5H_2O$ v 1% vinanu sodnodraselném
roztok C	1ml roztoku B v 50ml roztoku A (míchá se čerstvě před měřením)
roztok D	Folin-Ciocalteu reagens

Před spektrofotometrickým stanovením bylo třeba smíchat 0,5 ml vzorku s 10 ml roztoku C. Vzniklý roztok byl řádně promíchán a ponechán 10min stát. Následně byly přidány 0,2ml roztoku D. Vzniklý roztok bylo nutné opět řádně promíchat a ponechat 30min stát. Poté byla absorbance roztoku měřena na spektrofotometru při 750 nm. V případě jehlic byl roztok příliš koncentrovaný a bylo nutné jej naředit s roztokem C v poměru 1:9. Jako blank (slepý vzorek) byl použit roztok C.

Pro výpočet koncentrace fenolických látek byla použita rovnice 1 lineární regresní přímky ($y = 0{,}6093x - 0{,}0149$, $R^2 = 0{,}9647$, y – koncentrace, x - absorbance). Rovnice byla vypočtena z kalibrační křivky kyseliny gallové.

Biochemické stanovení ligninu

Při extrakci ligninu jsem vycházela z článku (Lange et al., 1995). Vysušené jehlice byly rozemlety v nožovém mlýnku IKA (A 11) a homogenizovaná sušina byla použita pro stanovení ligninu. Vstupní množství sušiny bylo 0,02 – 0,03 g, která byla předsušena při 80°C po 48 hodin.

Extrakce byla rozdělena do tří fází. Fáze I zahrnovala extrakci buněčných stěn, ve fázi II docházelo k extrakci komplexu ligninu a kyseliny thioglykolové a ve fázi III byla měřena absorbance vzorku.

Fáze I – izolace buněčných stěn

V této fázi byly použity roztoky popsané v tab. 8. Získané buněčné stěny byly vysušeny přes noc a zváženy.

Tab. 8 – *Roztoky a jejich účinky pro izolaci buněčných stěn*

roztok	působení
1M NaCl	narušení iontových vazeb
1% SDS	odstranění proteinů a látek tukové povahy
100% Methanol	izolace buněčných stěn
Chloroform:Methanol 1:1	izolace buněčných stěn

Fáze II – extrakce ligninu

Pro extrakci ligninu byly použity vysušené buněčné stěny z fáze I. Pomocí roztoku 2M HCl a kyseliny thioglykolové byl lignin vyvázán a následně rozpuštěn v 0,5M NaOH. Okyselením extraktu 36% HCl vznikla sraženina ligninu, která byla přes noc vysušena při 50°C a následně zvážena.

Fáze III – spektrofotometrické stanovení

Vysušená sraženina byla rozpuštěna v 0,5M NaOH a byla měřena absorbance při 280 nm na spektrofotometru Unicam Helios α.

Pro výpočet koncentrace ligninu byla použita rovnice 2 lineární regresní přímky ($y = 22{,}379x + 0{,}0179$, $R^2 = 0{,}9937$, y – koncentrace, x - absorbance). Rovnice byla vypočtena z kalibrační křivky ligninového standardu (hydrolyzovaný lignin, Aldrich Chemical Company, USA; [8672-93-3]).

Podrobný pracovní postup je popsán v tab. 9.

Tab. 9 – *Stanovení koncentrace ligninu (Lang et al., 1995)*

Fáze I – izolace buněčných stěn
1. K sušině přidat 1 ml 1M NaCl, protřepat na třepačce, 10 minut v sonikátoru, protřepat, 10 minut sonikátor, protřepat
2. Centrifugace – 10 000 otáček, 5 minut, odsát
3. Přidat 1ml 1% SDS, 20 minut sonikátor, centrifugovat, odsát
4. Vypláchnout 1 ml destilované vody, 7 minut sonikátor, centrifugovat, odsát a opakovat dokud vzorek pění
5. Přidat 1ml 100% methanolu, 20 minut sonikátor, centrifugovat, odsát
6. Přidat 1ml směs chloroform:methanol 1:1, 20 minut sonikátor, centrifugovat, odsát
7. Přidat 1ml 100% methanolu, 20 minut sonikátor, centrifugace, odsát
Předsušit vzorek na 40°C a cca po 2h dosušit na 80°C přes noc
Fáze II – extrakce ligninu
1. K buněčným stěnám přidat 1ml 2M HCl a 0,2 ml kyseliny thioglykolové a nechat inkubovat v inkubloku na 95°C po 4 hodiny, vyndat a nechat zchladnout na pokojovou teplotu
2. Centrifugace 10 000 otáček, 10 minut, odsát
3. Propláchnout destilovanou vodou, centrifugovat, odsát a opakovat dokud je roztok barevný (min. 3x)
4. Přidat 1ml 0,5M NaOH, třepat, 20 mint sonikovat a nechat ležet přes noc
5. Třepat, 20 minut sonikovat, centrifugovat, supernatant přepipetovat do nové zkumavky
6. Propláchnout pelet 0,5 ml 0,5M NaOH, třepat, 5 minut sonikátor, centrifugovat, přepipetovat supernatant
7. Okyselit extrakt 0,3 ml 36% HCl, nechat 4 hodiny v lednici (4°C), centrifugace při 4°C
8. Odstranit supernatant, pelet vysušit v sušárně přes noc na 50°C
Fáze III – spektrofotometrické stanovení
1. Pelet rozpustit v 1ml 0,5M NaOH
2. ředit se standardem 0,5M NaOH 1:40 a měřit na spektrofotometru při 280nm

3.2.3.3. Biochemické stanovení fotosyntetických pigmentů

Biochemické stanovení fotosyntetických pigmentů bylo provedeno doktorkou Zuzanou Lhotákovou dle stejného postupu, který byl uplatněn u hrnkových pokusů na tabáku popsaného níže.

Při extrakci fotosyntetických pigmentů jsem vycházela z článku (Porra et al., 1989). Na kousky nastříhané jehlice (listy) byly extrahovány v 10 ml dimethylamidu kyseliny mravenčí (DMF). Skleněné lahvičky byly uzavřené parafilmem. Extrakce probíhala 7 dní ve tmě.

Výsledný extrakt byl v případě jehlic naředěn s čistým DMF v poměru 1:4. U listů tabáku byl extrakt měřen v neředěné podobě. Následovalo měření absorbance na spektrofotometru Unicam Helios α v rozmezí vlnových délek 400 – 800 nm. Pomocí

programu Vision V3.31 byly vybrány z výsledné křivky vlnové délky 480, 647, 664 a 750 nm.

Pro výpočet koncentrace fotosyntetických pigmentů byly použity rovnice z práce (Wellburn, 1994) v tab. 10.

***Tab. 10** – Rovnice pro výpočet fotosyntetických pigmentů podle Wellburn, 1994*

$Ch_a = 11{,}65 * A_{664} - 2{,}69 * A_{647}$ (mg/ml)
$Ch_b = 20{,}81 * A_{647} - 4{,}53 * A_{664}$ (mg/ml)
$c_{(x+c)} = (1000 * A_{480} - 0{,}89\ Ch_a - 52{,}02 * Ch_b) / 245$ (mg/ml)
Ch_a (Ch_b) = chlorofyl a (b); $c_{(x+c)}$ = koncentrace karotenoidů a xantofylů

3.2.3.4. Gazometrická měření: rychlost čisté fotosyntézy, rychlost transpirace, vodivost průduchů

Pro sledování fyziologického stavu rostlin tabáku byla zvolena gazometrická metoda měření vybraných fyziologických parametrů pomocí přístroje TPS-1 - Portable Photosynthesis System. Byly měřeny tři základní parametry a to rychlost čisté fotosyntézy, rychlost transpirace a vodivost průduchů.

Měření probíhalo jednou týdně. V roce 2011 přibližně od 14 hodin do 16 hodin. V roce 2012 bylo měření rozděleno do dvou dnů, aby rostliny byly měřeny přibližně ve stejném čase a nedocházelo ke vzniku rozdílů při měření daném denní rytmicitou měřených parametrů. Měření probíhalo přibližně mezi 13. a 15. hodinou

3.2.3.5. Statistické vyhodnocení

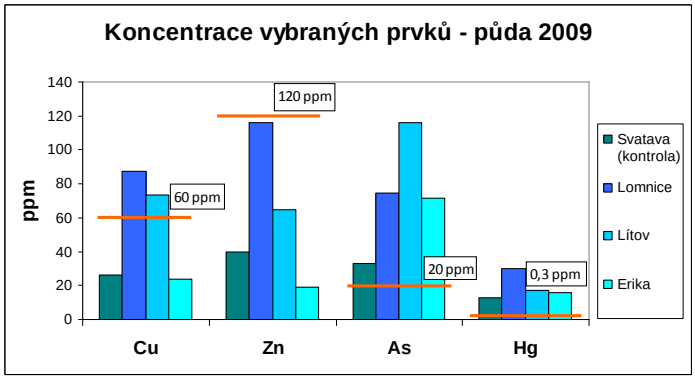
Získaná data byla vyhodnocena pomocí statistického programu NCSS 97. Pro porovnání dat byla použita jednocestná analýza rozptylu a analýza variance, t-testy. V případě normálního rozdělení dat byl jako mnohonásobný srovnávací test použit Tukey-Kramer test a v případě nenormálního rozdělení Kruskal-Wallis Z test. Hladina významnosti byla zvolena u všech testů $\alpha = 0{,}05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. Terénní výzkum

4.1.1. Chemické složení výsypkových substrátů

Z grafu 1 jasně vyplývá, že na stanovištích Lítov a Lomnice byly překročeny vyhláškou (382/2001 Sb.) dané limitní obsahy sledovaných rizikových prvků. Na stanovištích Svatava a Erika byly limity překročeny pouze v případě As a Hg. Tyto výsledky prvkové analýzy substrátů odpovídají předpokladu, že As, Hg a případně Cu jsou nejvýznamnějšími stresovými faktory na vybraných stanovištích. Avšak je třeba zdůraznit, že se jedná o celkový obsah prvků v půdě a není známa přesná forma, v jaké se dané prvky vyskytují.



Graf 1 *Koncentrace vybraných prvků v závislosti na stanovišti, oranžové úsečky – limitní obsahy prvků v běžných půdách dle vyhlášky č. 382/2001 Sb.*

4.1.1.1. Obsah As a Hg v jehlicích borovice

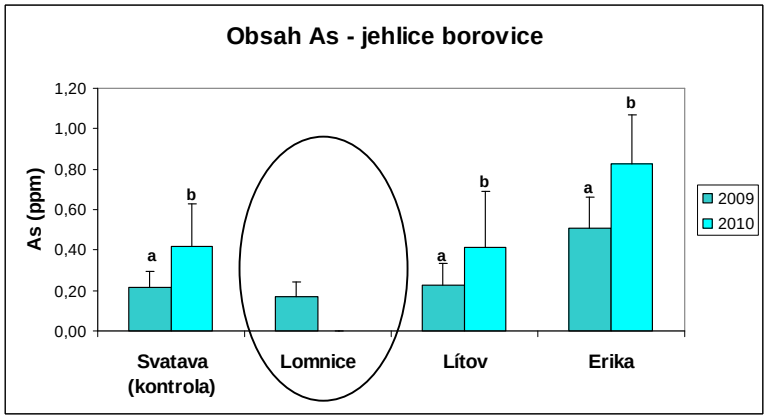
V obou letech odběru byl naměřen statisticky významně vyšší obsah arsenu v jehlicích borovice na stanovišti Erika oproti všem ostatním stanovištím. Zbylá stanoviště se mezi sebou významně nelišila (tab. 11). V roce 2010 nebylo do statistického zpracování zařazeno stanoviště Lomnice. U naprosté většiny vzorků se obsahy As v jehlicích borovice pohybovaly pod hranicí detekce. Ani v jednom případě nedosáhly hodnoty uváděné toxické koncentrace 3 – 10 $mg.kg^{-1}$ (Tlustoš et al. 2007; Alloway, 1990; Kabata-Pendias a Pendias, 2001).

Tab. 11 Porovnání rozdílů v obsahu As v jehlicích mezi stanovišti: výsledky srovnávacích testů k One-Way ANOVA

As - 2009 - Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Stanoviště	**Četnost**	**Průměr**	**Lišící se stanoviště**
Svatava (kontrola)	8	0,21625	Erika
Lomnice	5	0,172	Erika
Lítov	12	0,2275	Erika
Erika	11	0,4790909	Lomnice, Svatava (kontrola), Lítov
Alfa = 0,050, kritická hodnota = 3,8316			
As - 2010 - Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test			
Stanoviště	Svatava (kontrola)	Lítov	Erika
Svatava (kontrola)	0	0,0967	2,0402
Lítov	0,0967	0	2,7814
Erika	2,0402	2,7814	0
Regular Test: Median se průkazně liší, když je z-hodnota > 1,9600			
Bonferroni Test: Median se průkazně liší, když je z-hodnota > 2,3940			

V roce 2010 došlo k statisticky prokazatelnému zvýšení koncentrace As v jehlicích borovice na stanovištích Svatava, Lítov a Erika. Stanoviště Lomnice nebylo do statistiky zařazeno díky neměřitelným koncentracím As v jehlicích borovice, které se v roce 2010 pohybovaly pod hranicí detekce (graf 2).

Možným vysvětlením, proč mají stanoviště Svatava a Lomnice nižší obsahy As než stanoviště Erika, by mohlo být složení půdy na stanovištích. Stanoviště Svatava i Lomnice mají vyšší podíl organické vrstvy půdy než zbylá dvě stanoviště, což by mohlo snižovat dostupnost As pro rostliny a následně i obsah As v jehlicích, jak bude popsáno v diskusi.



Graf 2 *Obsah As v jehlicích borovice v závislosti na roku odběru a stanovišti, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena popisují statisticky významný rozdíl mezi roky 2009 a 2010 na hladině* $\alpha = 0,05$

T – testu, stanoviště Lomnice nebylo zařazeno do statistického zpracování z důvodu malé četnosti detekovatelných koncentrací As v roce 2010

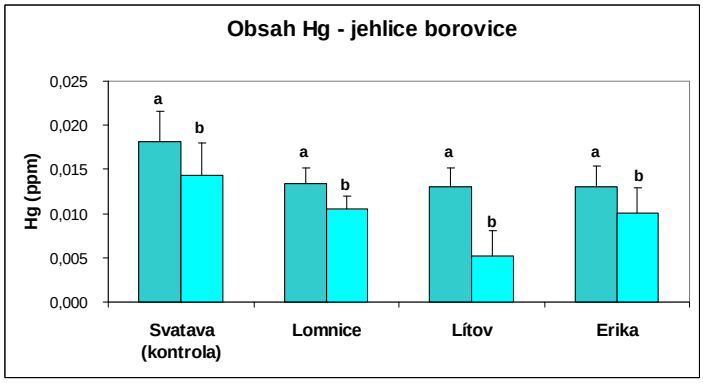
Vyšší obsah Hg v jehlicích borovice oproti všem ostatním stanovištím byl v roce 2009 statisticky prokázán u kontrolního stanoviště Svatava. Naopak statisticky prokazatelný nejnižší obsah Hg v jehlicích borovice oproti všem ostatním stanovištím byl v roce 2010 u stanoviště Lítov. Zbylá stanoviště se v obou letech mezi sebou významně nelišila (tab. 12).

V roce 2010 došlo k statisticky významnému snížení Hg v jehlicích borovice na všech stanovištích (graf 3).

Dostupnost rtuti pro rostliny je ovlivněna mnoha půdními faktory a na rozdíl od arsenu, může být rtuť přijímána z ovzduší v její elementární formě. Možné příčiny nejvyššího obsahu rtuti v jehlicích borovice na kontrolním stanovišti Svatava budou popsána v diskusi.

Tab. 12 Porovnání rozdílů v obsahu Hg v jehlicích mezi stanovišti: výsledky srovnávacích testů k One-Way ANOVA

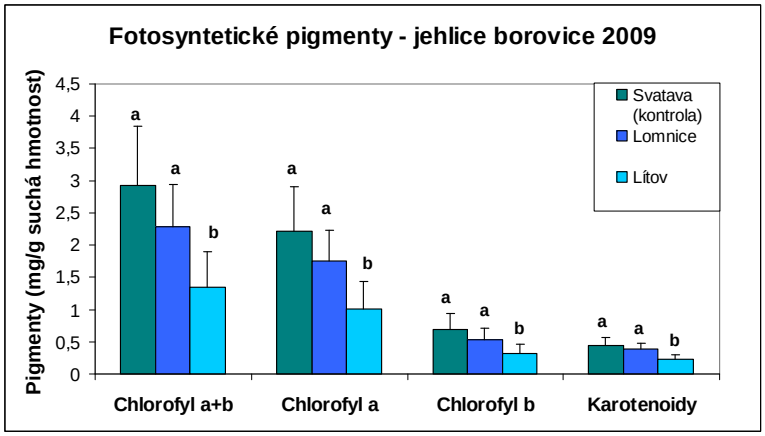
Hg - 2009 - Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test				
Stanoviště	**Četnost**	**Průměr**	**Lišící se stanoviště**	
Svatava (kontrola)	10	0,0180	Erika, Lomnice, Lítov	
Lomnice	10	0,0134	Svatava	
Lítov	12	0,0140	Svatava	
Erika	14	0,0130	Svatava	
Alfa = 0,050, kritická hodnota = 3,7830				
Hg - 2010 - Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test				
Stanoviště	Svatava (kontrola)	Lomnice	Lítov	Erika
Svatava (kontrola)	0	1,4062	4,6787	1,7808
Lomnice	1,4062	0	3,3094	0,3849
Lítov	4,6787	3,3094	0	2,9074
Erika	1,7808	0,3849	2,9074	0
Regular Test: Median se průkazně liší, když je z-hodnota > 1,9600				
Bonferroni Test: Median se průkazně liší, když je z-hodnota > 2,6383				



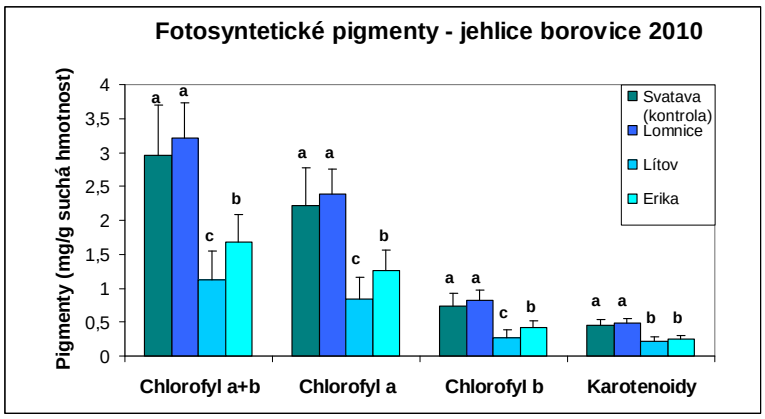
Graf 3 *Obsah Hg v jehlicích borovice v závislosti na roku odběru a stanovišti, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena popisují statisticky významný rozdíl mezi roky 2009 a 2010 na hladině α = 0,05 T – testu*

4.1.1.2. Obsah fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice

V letech 2009 i 2010 byl statisticky prokázán nižší obsah fotosyntetických pigmentů (FP) na stanovišti Lítov. V roce 2010 byl statisticky prokázán nižší obsah FP i na stanovišti Erika a nejnižší obsah FP na stanovišti Lítov (graf 4, 5). Obsahy FP na stanovišti Lomnice se v obou letech výrazně neliší od kontrolního stanoviště Svatava. Může to být dáno stářím stromů, podobným substrátem jako na stanovišti Svatava a odběrem pouze horních částí koruny z důvodů popsaných v kapitole 3.1 a 3.2.1. Mladší stromy by mohli být vitálnější a projevy stresu se nemusí plně projevovat (Ustin et al., 2009; Schlerf et al., 2010). Data byla zpracována a poskytnuta doktorkou Zuzanou Lhotákovou.



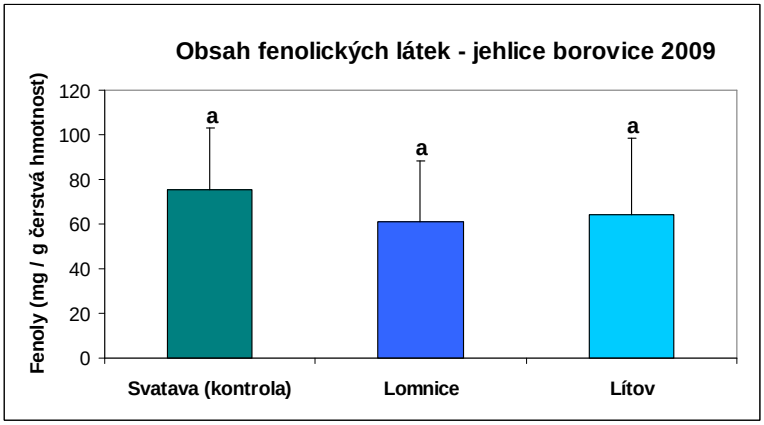
Graf 4 *Obsah fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice v roce 2009 v závislosti na stanovišti, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena popisují statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05 One way ANOVA*



Graf 5 *Obsah fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice v roce 2010 v závislosti na stanovišti, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena popisují statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05 rozdíl na hladině α = 0,05 One way ANOVA*

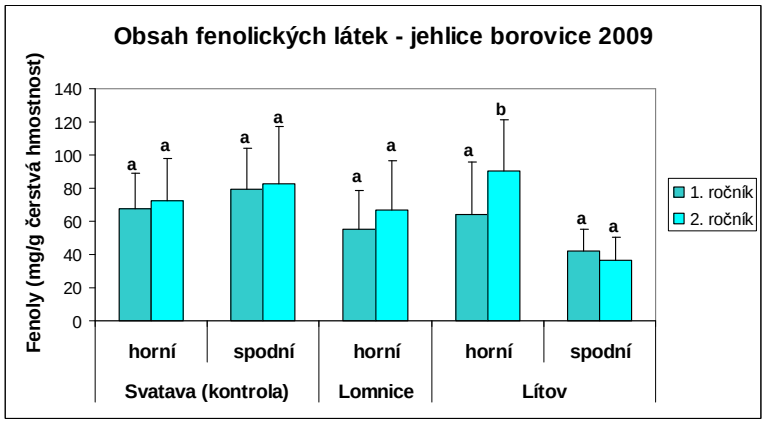
4.1.1.3. Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice

Celkové obsahy rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice odebraných v roce 2009 se výrazně nelišily. Avšak jak je z grafu 6 patrné, kontaminovaná stanoviště vykazují mírný úbytek obsahu fenolických látek v jehlicích.



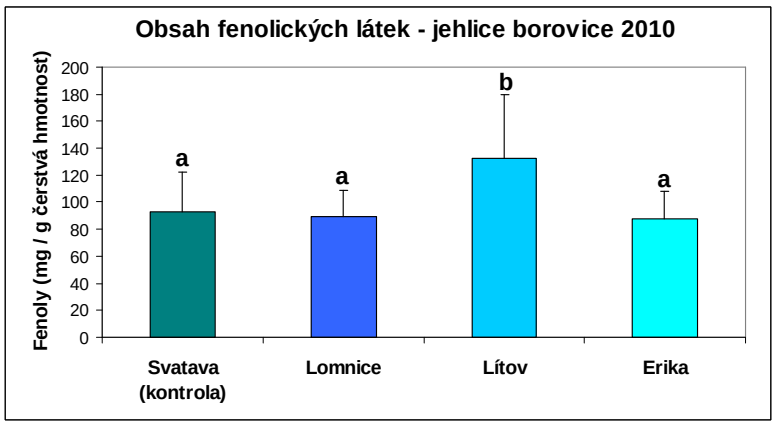
Graf 6 *Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na stanovišti v roce 2009, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena popisují statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, One way ANOVA*

Při hodnocení gradientu obsahu rozpustných fenolických látek v rámci koruny stromu nebyly nalezeny v roce 2009 téměř žádné statisticky významné rozdíly. Ale z grafu 7 je znatelný trend vyššího obsahu fenolických látek v druhých ročnících jehlic, který je na stanovišti Lítov statisticky potvrzen. Celkový obsah rozpustných fenolických látek ve spodních částech koruny se statisticky lišil mezi stanovišti Lítov a Svatava.



Graf 7 *Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na pozici v koruně a stáří jehlic v roce 2009, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, T -test*

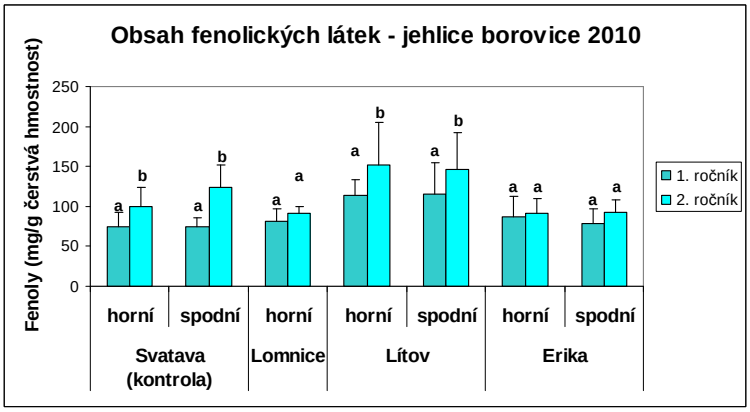
V roce 2010 byl statisticky prokázán vyšší obsah rozpustných fenolických látek na kontaminovaném stanovišti Lítov. Zbylá stanoviště se od sebe průkazně nelišila, jak ukazuje graf 8.



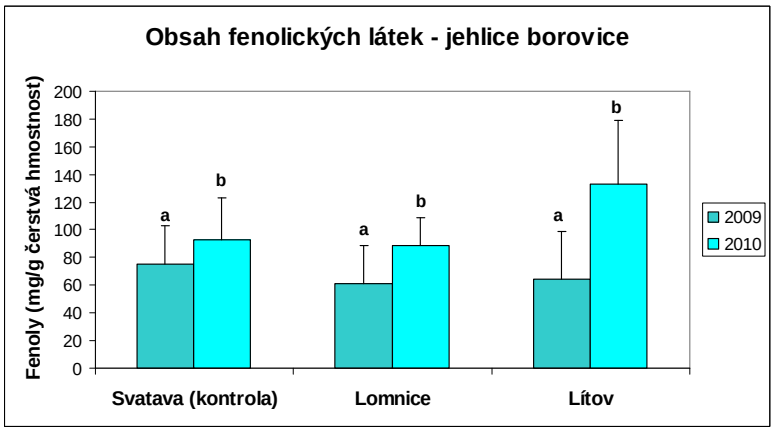
Graf 8 *Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na stanovišti v roce 2010, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one way ANOVA*

V roce 2010 stejně jako v roce 2009 nebyly statisticky potvrzeny rozdíly mezi obsahy rozpustných fenolických látek jehlice borovice odebraných z horní a spodní části koruny. Vyšší obsah fenolických látek v jehlicích borovice byl statisticky potvrzen u druhých ročníků jehlic na stanovištích Svatava a Lítov (graf 9).

V roce 2010 došlo k statisticky průkaznému zvýšení obsahu fenolických látek v jehlicích borovice na všech stanovištích (graf 10).



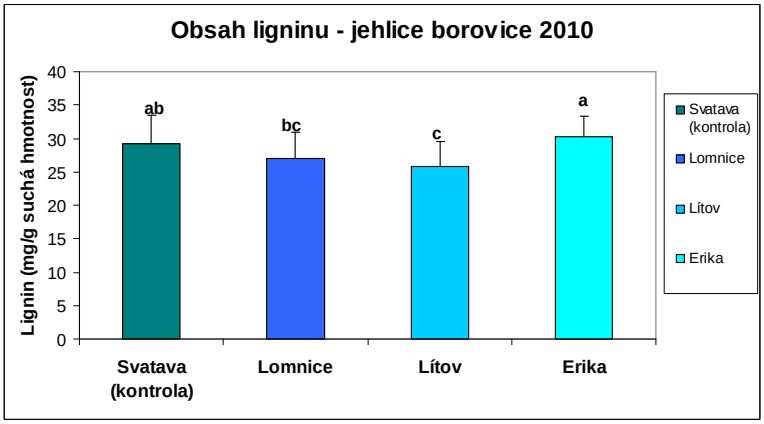
Graf 9 *Obsah fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na pozici v koruně stromu, stáří jehlic a stanovišti v roce 2010, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině* $\alpha = 0,05$*, T test*



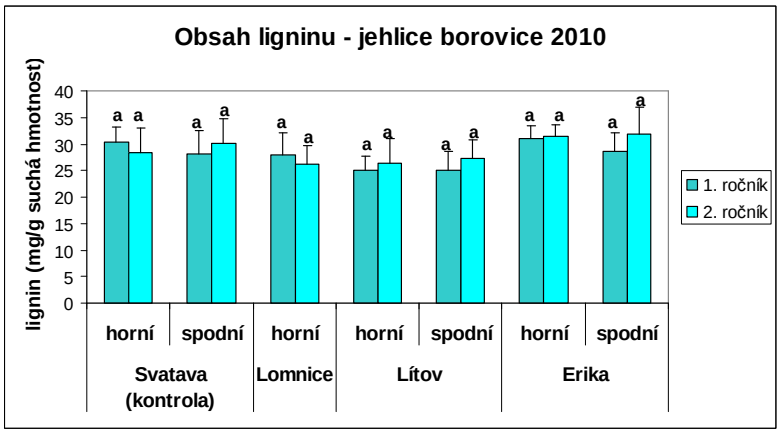
Graf 10 *Obsah fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na roku odběru a stanovišti, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině* $\alpha = 0,05$*, T test*

4.1.1.4. Obsah ligninu v jehlicích borovice

Obsah ligninu v jehlicích borovice v roce 2010 byl statisticky průkazně vyšší na stanovišti Erika a nižší na stanovišti lítov (graf 11). V roce 2010 se statisticky nepotvrdil gradient obsahu ligninu v jehlicích borovice v rámci koruny stromu (graf 12).



Graf 11 *Obsah ligninu v jehlicích borovice v závislosti na stanovišti v roce 2010, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině* $\alpha = 0,05$*, jednosměrná ANOVA*



Graf 12 *Obsah ligninu v jehlicích borovice v závislosti na pozici v koruně, stáří a stanovišti v roce 2010, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, T test*

4.2. Hrnkové pokusy

V této části bude pro přehlednost a lepší porovnatelnost rozdělen pokus 3 z roku 2012 na dvě části a to na 3a a 3b.

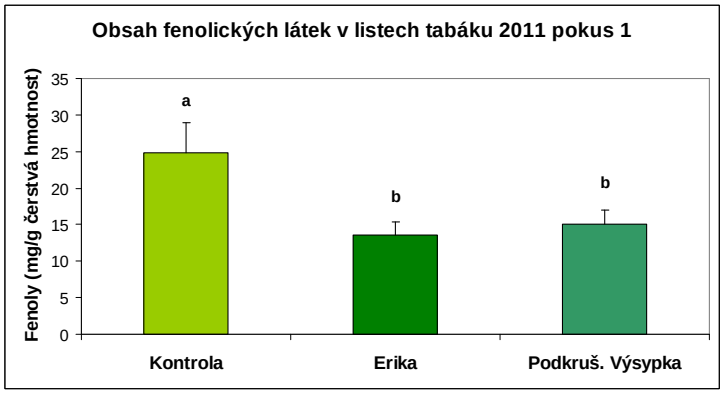
4.2.1. Obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku

V pokusu 1 v roce 2011 byl naměřen statisticky průkazný nižší obsah rozpustných fenolických látek u substrátových variant Erika a Podkrušnohorská výsypka (graf 13).

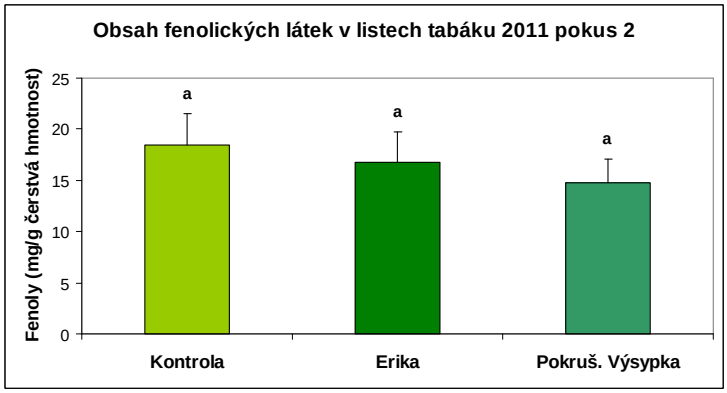
V pokusu 2 v roce 2011 nebyl nalezen žádný statisticky průkazný rozdíl v obsahu rozpustných fenolických látek v listech tabáku (graf 14).

V substrátové části pokusu 3 (a) v roce 2012 byl naměřen statisticky významný nižší obsah fenolických látek u substrátové varianty podkrušnohorská výsypka (graf 15).

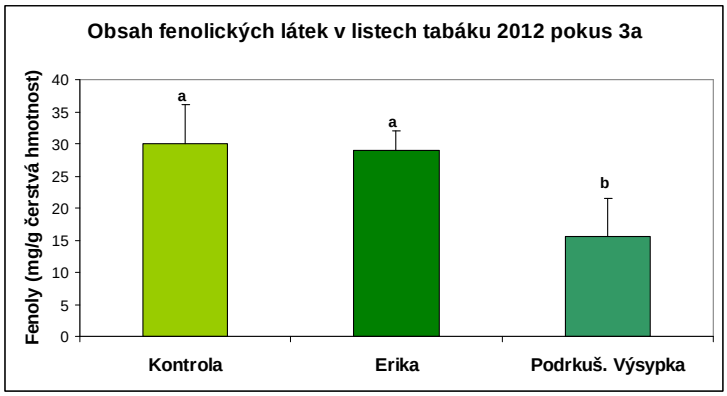
V pokusu 3 (b) s kontrolovanou zálivkou $HgCl_2$ v roce 2012 nebyl naměřen statisticky významný rozdíl v obsahu rozpustných fenolických látek v listech tabáku (graf 16).



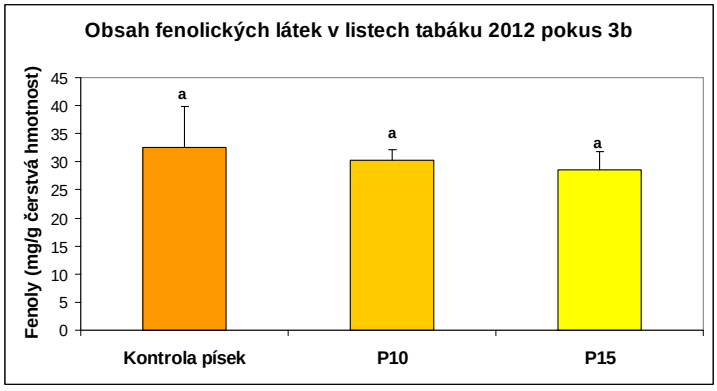
Graf 13 *Obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku v roce 2011 pokus 1 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*



Graf 14 *Obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku v roce 2011 pokus 2 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*



Graf 15 *Obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku v roce 2012 pokus 3a v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

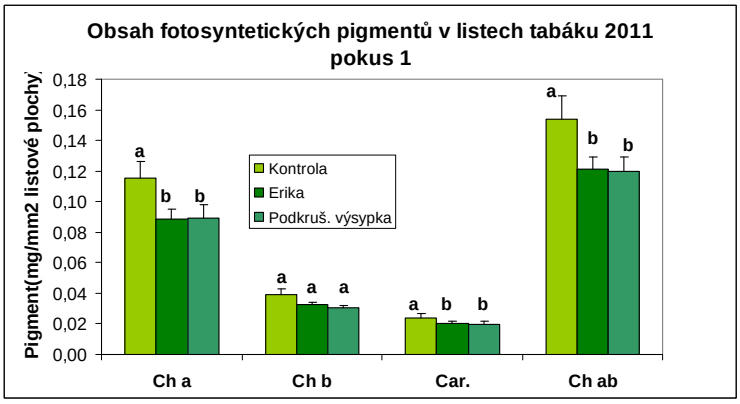


Graf 16 *Obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku v roce 2012 pokus 3b v závislosti na variantě substrátu, P10 – písková varianta 10ppm $HgCl_2$, P15 – písková varianta 15 ppm $HgCl_2$, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

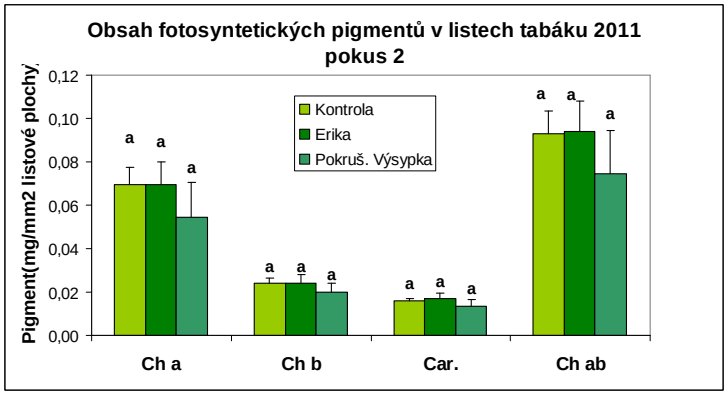
4.2.2. Obsah fotosyntetických pigmentů v listech tabáku

V roce 2011 v pokusu 1 byl naměřen statisticky významný nižší obsah chlorofylu a, karotenoidů a celkového množství chlorofylu na substrátových variantách Erika a Podkrušnohorská výsypka (graf 17). V roce 2011 v pokusu 2 nebyly naměřeny žádné statisticky prokazatelné rozdíly v obsahu fotosyntetických pigmentů (graf 18).

V roce 2012 nebyly z časových důvodů odebrány vzorky pro rozbor fotosynteticky aktivních pigmentů, protože v této diplomové práci slouží pouze jako obecný bioindikátor stresu.



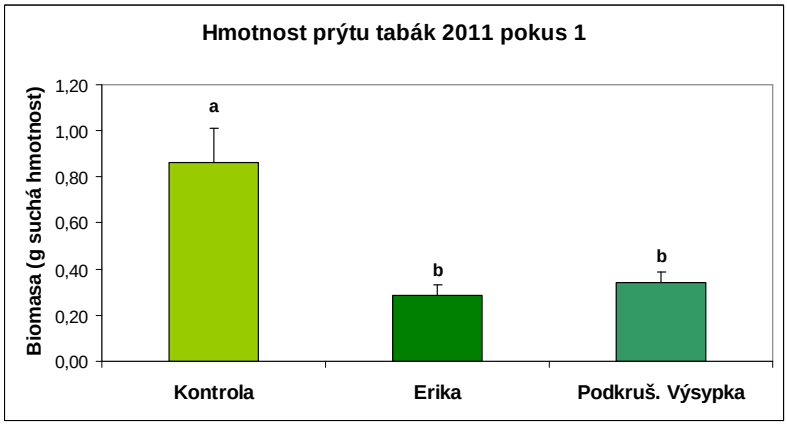
Graf 17 *Obsah fotosyntet. pigmentů v listech tabáku v roce 2011 pokus 1 v závislosti na variantě substrátu, Ch a, b, ab – Chlorofyl a, b, ab; car. – karotenoidy, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*



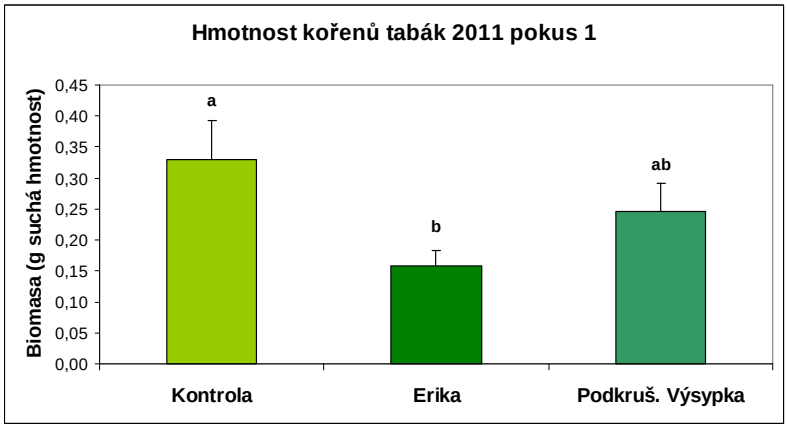
Graf 18 *Obsah fotosyntetických pigmentů v listech tabáku v roce 2011 pokus 2 v závislosti na variantě substrátu, Ch a, b, ab – Chlorofyl a, b, ab; car. – karotenoidy, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*

4.2.3. Vliv toxických substrátů na tvorbu biomasy rostlin tabáku

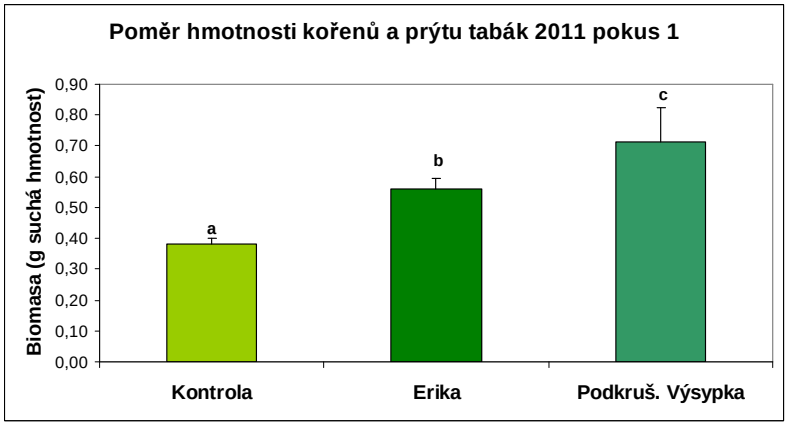
V roce 2011 v pokusu 1 byla statisticky prokázána nižší hmotnost kořenů a prýtů u rostlin rostoucích na substrátové variantě Erika oproti kontrole. U varianty pěstované na substrátu z Podkrušnohorské výsypky byla statisticky prokázána nižší hmotnost prýtu oproti kontrole. Nejvyšší poměr hmotnosti kořenů a prýtů byl statisticky prokázán na stanovišti Podkrušnohorská výsypka (graf 19, 20, 21).



Graf 19 *Suchá hmotnost prýtů tabáku v roce 2011 pokus 1 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

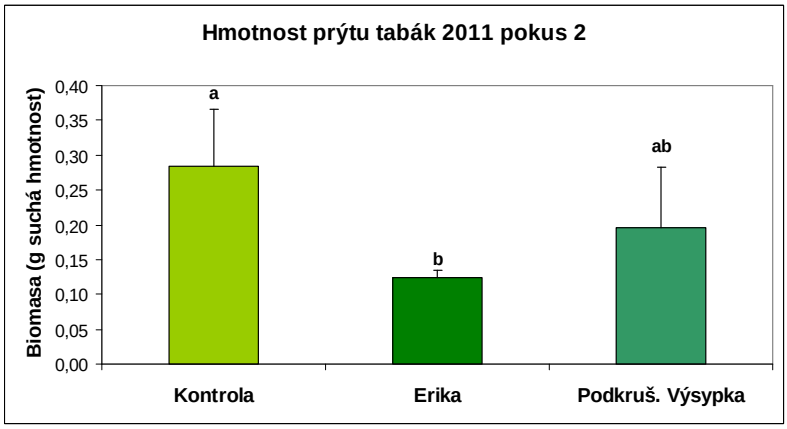


Graf 20 *Suchá hmotnost kořenů tabáku v roce 2011 pokus 1 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

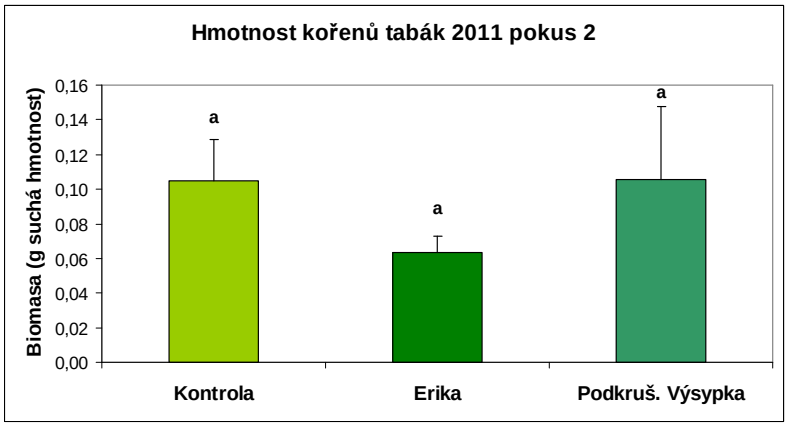


Graf 21 *Poměr suché hmotnosti kořenů a prýtů tabáku v roce 2011 pokus 1 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

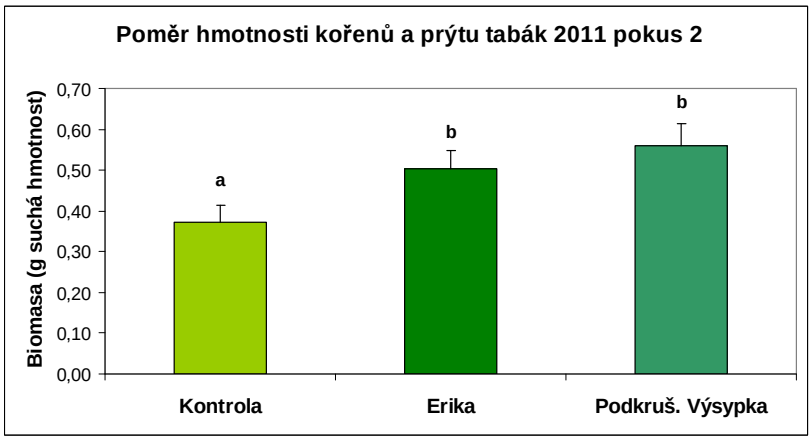
V roce 2011 v pokusu 2 byla statisticky potvrzena nižší hmotnost prýtu u substrátové varianty Erika. Hmotnosti kořenů se u rostlin statisticky významně nelišily. Poměr hmotnosti kořenů a prýtu byl statisticky vyšší u substrátových variant Erika a Podkrušnohorská výsypka (graf 22, 23, 24).



Graf 22 *Suchá hmotnost prýtů tabáku v roce 2011 pokus 2 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

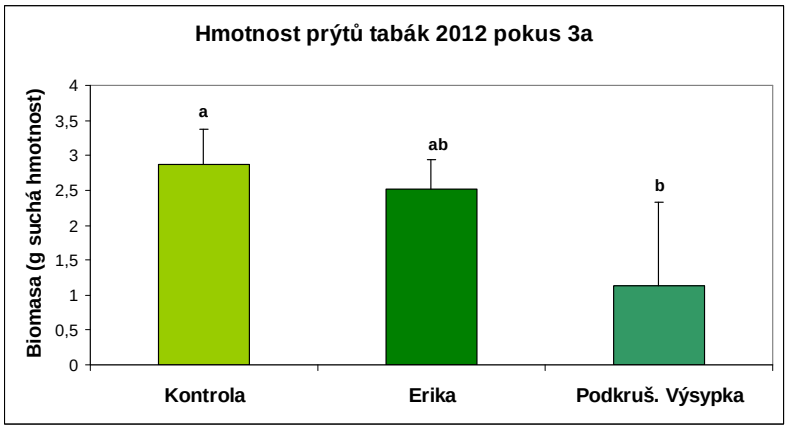


Graf 23 *Suchá hmotnost kořenů tabáku v roce 2011 pokus 2 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

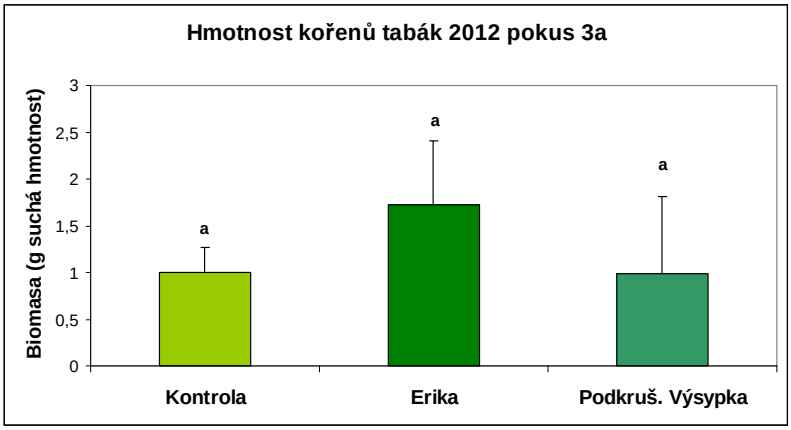


Graf 24 *Poměr suché hmotnosti prýtů a kořenů tabáku v roce 2011 pokus 2 v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

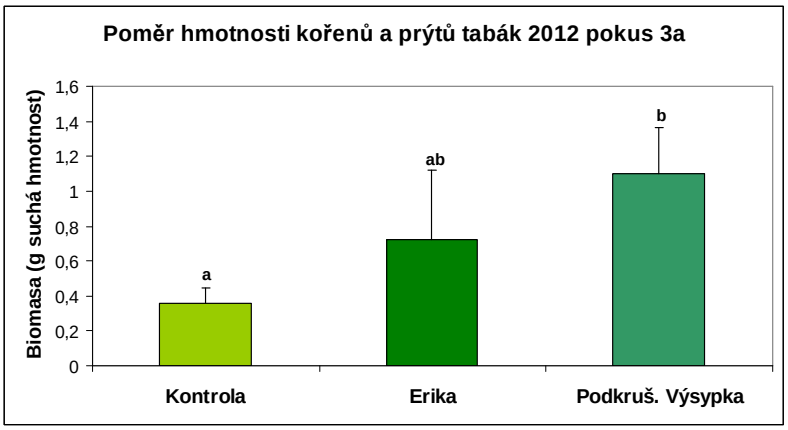
V roce 2012 v pokusu 3 (a) byla statisticky prokázána nižší hmotnost prýtů u substrátové varianty Podkrušnohorská výsypka oproti kontrole. V hmotnosti kořenů nebyl naměřen statisticky významný rozdíl. Poměr kořenů a prýtů byl statisticky nejvyšší u varianty Podkrušnohorská výsypka, což je ale velice pravděpodobně zapříčiněno heterogenitou v růstu jednotlivých rostlin (graf 25, 26, 27).



Graf 25 *Suchá hmotnost prýtů tabáku v roce 2012 pokus 3a v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

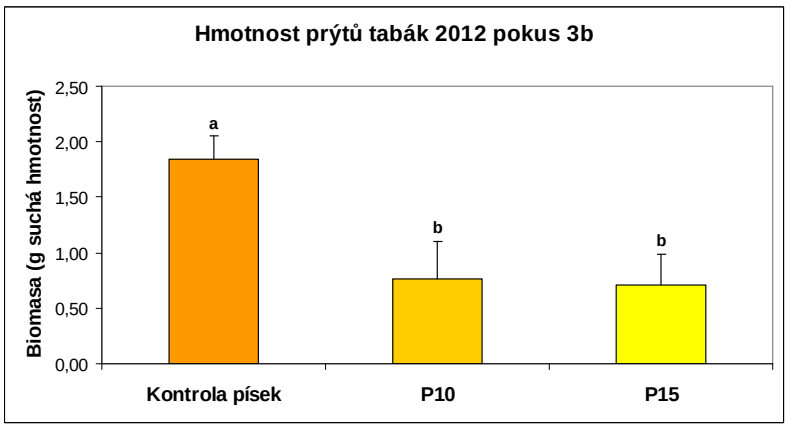


Graf 26 *Suchá hmotnost kořenů tabáku v roce 2012 pokus 3a v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

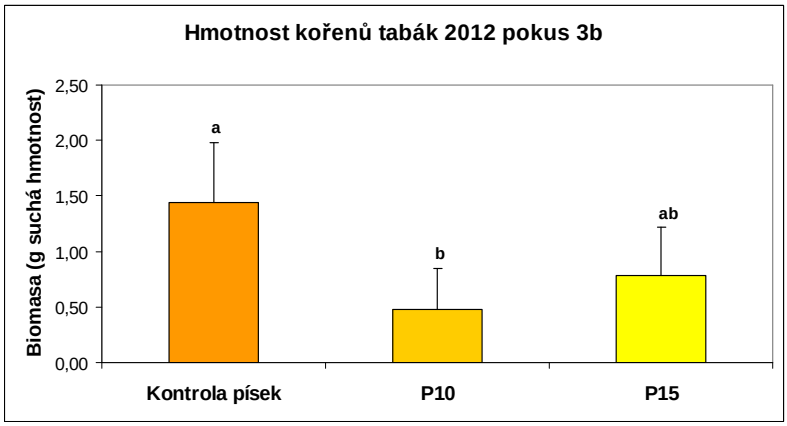


Graf 27 *Poměr suché hmotnosti prýtů a kořenů tabáku v roce 2012 pokus 3a v závislosti na variantě substrátu, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině α = 0,05, one-way ANOVA*

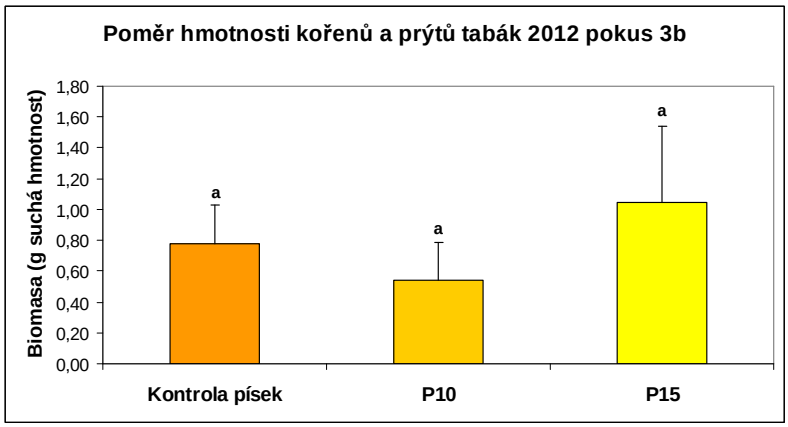
V roce 2012 v pokusu 3 (b) s kontrolovanou zálivkou $HgCl_2$ byla statisticky prokázána nižší hmotnost prýtů u obou kontaminovaných variant oproti kontrole a nižší hmotnost kořenů u varianty P10. Poměr hmotnosti kořenů a prýtu se mezi variantami statisticky významně nelišil (graf 28, 29, 30).



Graf 28 *Suchá hmotnost prýtu tabáku v roce 2012 pokus 3b v závislosti na variantě substrátu, P10 – písková varianta 10ppm $HgCl_2$, P15 – písková varianta 15 ppm $HgCl_2$, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*



Graf 29 *Suchá hmotnost kořenů tabáku v roce 2012 pokus 3b v závislosti na variantě substrátu, P10 – písková varianta 10ppm $HgCl_2$, P15 – písková varianta 15 ppm $HgCl_2$, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*

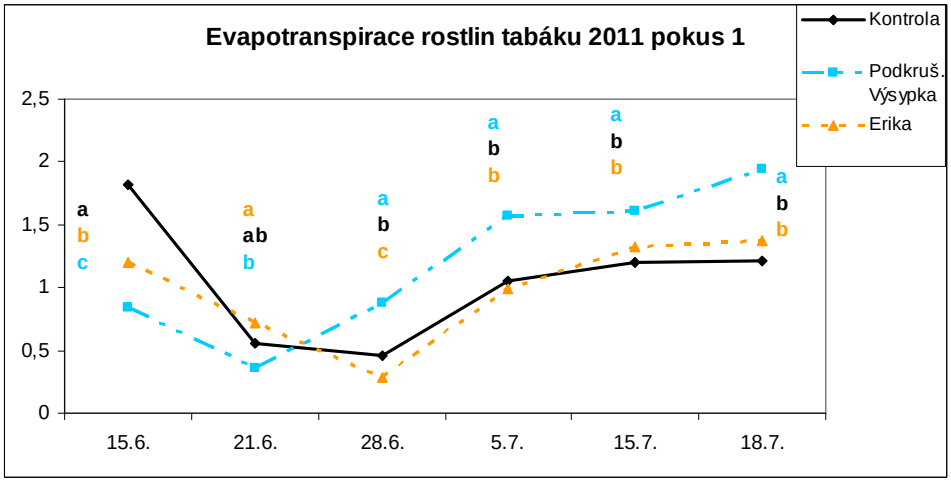


Graf 30 *Poměr hmotnosti kořenů a prýtu tabáku v roce 2012 pokus 3b v závislosti na variantě substrátu, P10 – písková varianta 10ppm $HgCl_2$, P15 – písková varianta 15 ppm $HgCl_2$, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*

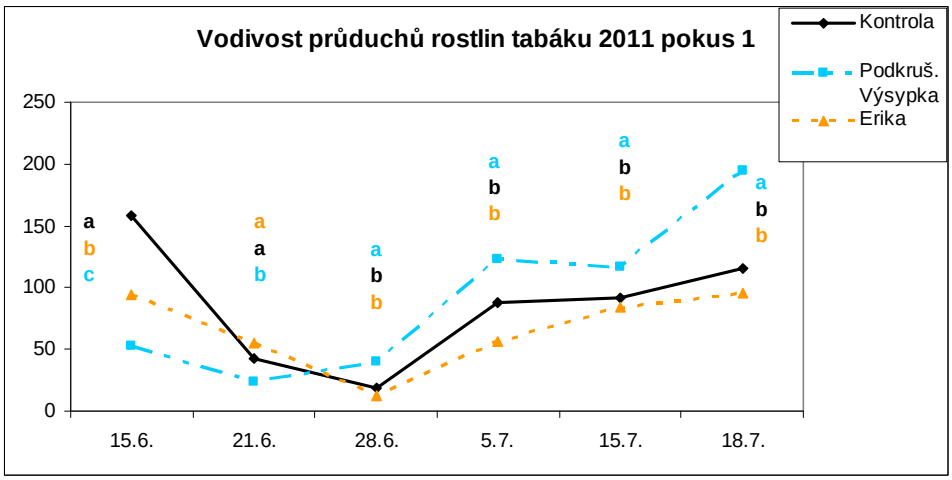
4.2.4. *Vliv toxických substrátů na vybrané fyziologické parametry rostlin tabáku*

V pokusu 1 v roce 2011 byla naměřena statisticky významně vyšší transpirace (graf 31) a vodivost průduchů (graf 32) u rostlin ze substrátové varianty Podkrušnohorská výsypka. Zbylé dvě varianty se až na počáteční měření významně nelišily. Čistá fotosyntéza rostlin (graf 33) vykazovala variabilní výsledky, ze kterých nebylo možné odvodit jednoznačné závěry.

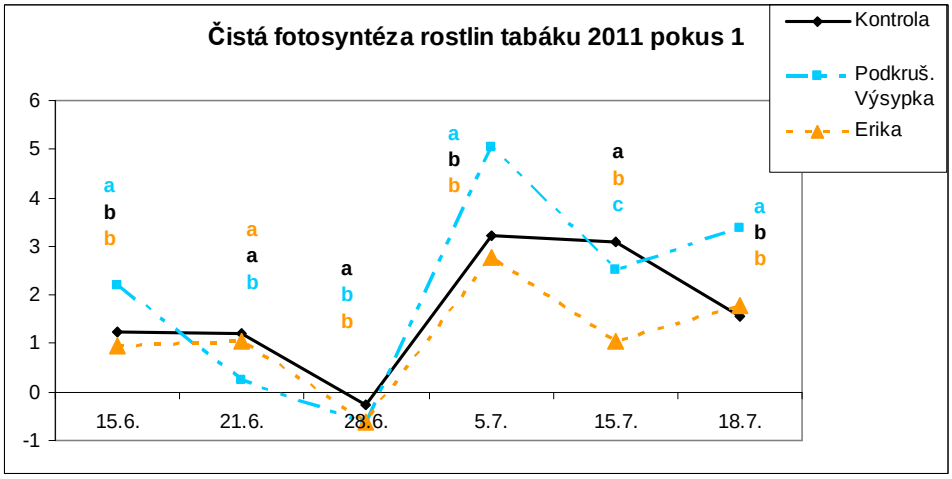
Graf 31 *Evapotranspirace rostlin tabáku v roce 2011 pokus 1, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině* $\alpha = 0,05$*, one-way ANOVA*



Graf 32 *Vodivost průduchů rostlin tabáku v roce 2011 pokus 1, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině* $\alpha = 0,05$*, one-way ANOVA*

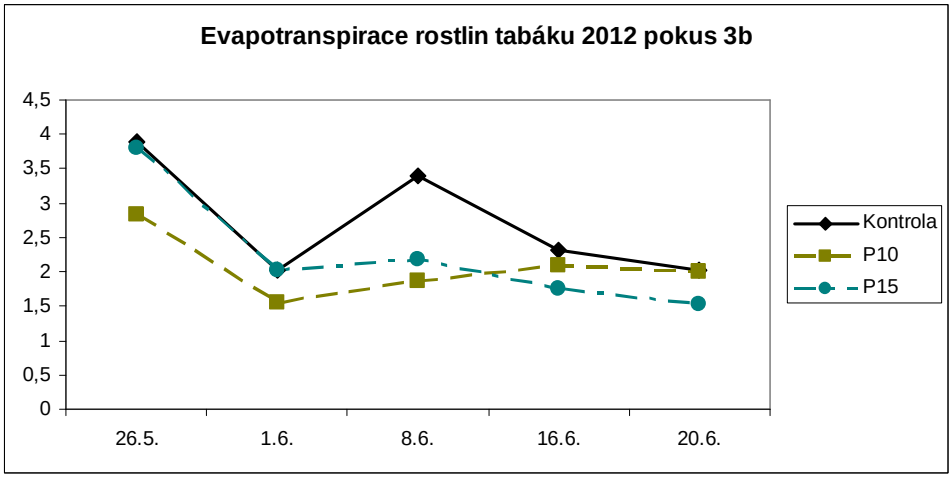


Graf 33 *Čistá fotosyntéza průduchů rostlin tabáku v roce 2011 pokus 1, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*

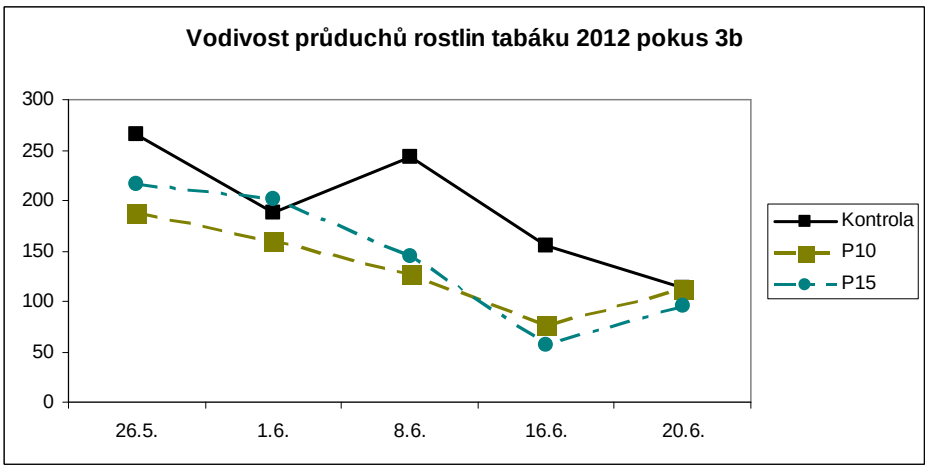


V Pokusu 3b v roce 2012 byl zaznamenán trend nižší transpirace (graf 34) a vodivosti průduchů (graf 35) u rostlin tabáku u obou kontaminovaných variant. Čistá fotosyntéza rostlin (graf 36) vykazovala vysokou variabilitu mezi jednotlivými dny měření.

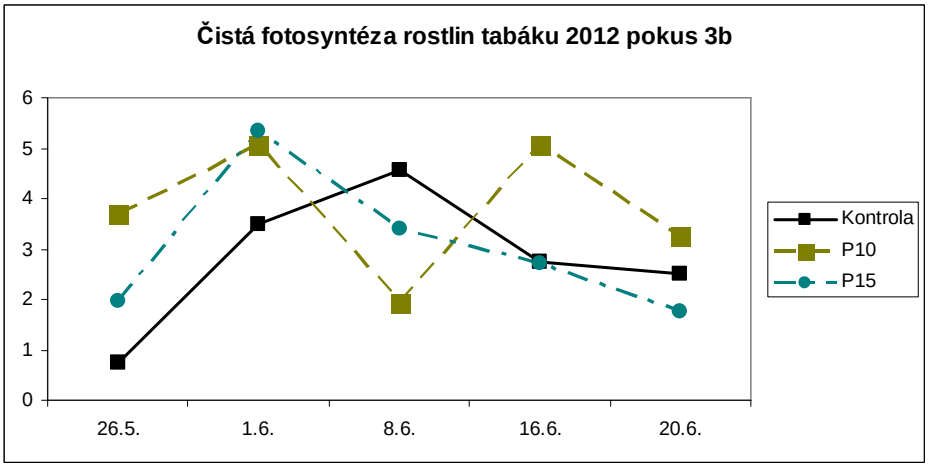
Graf 34 *Evapotranspirace rostlin tabáku v roce 2012 pokus 3b, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*



Graf 35 *Vodivost průduchů rostlin tabáku v roce 2012 pokus 3b, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$, one-way ANOVA*



Graf 36 *Čistá fotosyntéza rostlin tabáku v roce 2012 pokus 3b, úsečky nad sloupci odpovídají směrodatné odchylce, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině* $\alpha = 0,05$*, one-way ANOVA*



5. DISKUZE

5.1. Metodické přístupy

Výsledky z terénního výzkumu by mohly být využity při dalších rekultivačních postupech na výsypkách. Získaná data o obsahu biochemických látek v jehlicích borovice budou využita v dálkovém průzkumu Země například při tvorbě chlorofylových map (Schlerf et al., 2010) či při hodnocení využitelnosti ligninu (Serrano et al., 2002) a rozpustných fenolických látek (Skidmore et al., 2010) jako dalšího indikátoru stresu detekovatelného pomocí dálkového průzkumu Země.

Hrnkové pokusy byly zařazeny jako ověření zda jsou hlavními stresovými faktory na výsypkách detekované těžké kovy (As a Hg) či jiné vlastnosti substrátu nebo

podmínky na stanovišti. Dále byly pokusy zaměřeny na vyhodnocení vlivu toxických substrátů na fyziologický stav rostlin pomocí měření vybraných fyziologických parametrů. Zálivkové varianty hrnkových pokusů byly zařazeny pro ověření vlivu rtuti na vodní režim rostlin . Rtuť, jako jeden z hlavních kontaminantů výsypek vyskytující se ve vysokých koncentracích, by mohla ovlivňovat vodní režim rostlin rostoucích na výsypkách. Z rozborů však není patrné, v jaké koncentraci se vyskytuje rtuť v dostupných formám pro rostliny. Proto byla na základě dostupné literatury (Askari et al., 2007; Zhou et al., 2009) pro hrnkové pokusy zvolena forma $HgCl_2$ v koncentracích blízkých celkovým koncentracím rtuti na výsypkách, která je pro rostliny dostupná a má na ně negativní vliv.

5.2. Terénní výzkum

5.2.1. Chemické složení výsypkových substrátů

Půdní rozbory potvrdily, že As a Hg se na všech výsypkových stanovištích vyskytují v koncentracích převyšující limity dané vyhláškou č. 382/2001 Sb. a potvrdila se tak jejich předpokládaná role hlavních kontaminantů vybraných výsypek.

Toto překročení limitů bylo naměřeno i na kontrolním stanovišti Svatava. Dalším významným kontaminantem na stanovištích Lítov a Lomnice se ukázala měď, která také na těchto dvou stanovištích překročila limity dané výše zmíněnou vyhláškou. Tato zjištění se shodují se studií (Suchara et al., 2011), kde jsou těžební a průmyslové oblasti severovýchodních Čech označeny za jeden ze dvou nejvíce kontaminovaných regionů České republiky mnoha prvky v toxických koncentracích (Ag, Al, As, Be, Bi, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg, La, Li,Mo, Nd, Ni, Pr, Sb, Se, Sn, Sr, Th, U, V a Y). Na stanovišti Lomnice se navíc k daným limitům koncentrace blížil i zinek.

5.2.2. Obsah As a Hg v jehlicích borovice

5.2.2.1. Dostupnost As a Hg z půdy

Relativně nízké obsahy As a Hg v jehlicích oproti naměřeným koncentracím v půdě můžou být zapříčiněny mnoha faktory. Zásadním faktorem je dostupnost těchto prvků z půdy ve formách, které jsou rostliny schopné přijímat. Ze studie (Gustafsson and Jacks, 1995) vyplývá, že v minerálním horizontu lesních půd bývá dominantní forma arsenu As^V. Ta je v půdách nekontaminovaných vnějším dodáním arsenu silně

vázána na sloučeniny síry. Dále je zde naznačeno, že v humusovém horizontu je As vázán na oxidy Fe a Al, což ho činí nedostupným a je pravděpodobné, že je As dostupnější z hlubších vrstev půdy. To by podporovalo výsledky, které dokumentují zvýšený obsah As v jehlicích borovice ze stanoviště Erika, kde je substrát velmi písčitý a humusový horizont zde více méně chybí. Na stanovištích Svatava a Lomnice se stromy nacházejí na substrátu s humusovým horizontem, což může vysvětlovat nižší koncentrace As v jehlicích borovice. Na stanovišti Lítov je pravděpodobné, že je zde ve vysoké míře zastoupen minerální horizont, kde by mohl být As silně vázán na sloučeniny síry, jak naznačuje již zmíněná studie.

Dostupnost As závisí také na pH půdy a úzce souvisí s formou v jaké se v půdě vyskytuje železo. Nejdostupnější je As při pH okolo 3 a 11 a nejméně dostupný při pH 7 a to zřejmě díky tomu, že při pH 7 se Fe nejvíce vyskytuje ve formě oxidu, který je schopen na sebe As vázat. (Al-Abed et al., 2007). To by vysvětlovalo nízký obsah As v jehlicích borovice na stanovišti Svatava, kde bylo naměřeno téměř neutrální pH a s vysokým obsahem As v jehlicích na stanovišti Erika, kde se pH pohybuje okolo 4. Na stanovišti Lomnice jsou hodnoty pH velice variabilní a místo, ze kterého se získávali hodnoty pH se neshoduje s místem odběru jelic. Na stanovišti Lítov se hodnoty pH pohybují mezi hodnotymi 2 – 3, ale z výsledků je zřejmé, že zde zřejmě více působí vliv půdních horizontů než hodnoty pH.

Arsen (As^{V}) je chemicky velice podobný fosforu, což tyto dva prvky předurčuje k vzájemné kompetici o vazby na oxidy Fe a Al v substrátu a vzájemné vyvazování se z těchto sloučenin (Gustafsson and Jacks, 1995). Podobnost těchto dvou prvků také může hrát významnou roli v jejich příjmu rostlinami. Oba prvky jsou přijímány transportéry pro fosfor. Při pH 4-8 kyselina H_3AsO_4 disociuje na aniony $H_2AsO_4^-$ a $HAsO_4^{2-}$, které jsou podobné přijímaným sloučeninám fosforu (Zhao et al., 2010). U citlivých rostlin na kontaminace arsenem byla zjištěna vyšší afinita těchto transportéru k fosforu, což zvýhodňuje příjem fosrforu při jeho vyšších koncentracích (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002). To by také podporovalo výsledky nižšího obsahu Arsenu v jehlicích borovice na stanovištích Svatava a Lomnice, kde by mohl být vyšší obsah fosforu v humusovém půdním horizontu narozdíl od ostatních stanovišť.

Dostupnost Hg pro rostliny ovlivňuje několik faktorů. Rtuť je v půdách v naprostém množství (cca 90%) obsažena ve formách nedostupných pro rostliny (vázaná na minerály), ale díky dynamice různých reakcí v půdě, se může z těchto forem vyvázat (Yao et al., 2011). Jedním z hlavních faktorů, který zvyšuje dostupnost rtuti je

pH. S rostoucí acidifikací půdy roste koncentrace iontové formy Hg dostupné pro rostliny, ale od pH 7 je taktéž znatelný trend zvyšování její dostupnosti (Yin et al., 1996; Jing et al., 2007).

Dalším důležitým faktorem je složení půdy a to hlavně organického horizontu. V kombinaci s různými půdními typy mohou složky organického horizontu zvyšovat i snižovat dostupnost rtuti pro rostliny. Organická složka půd kyselina fulvonová zvyšuje dostupnost rtuti v půdě nebo například vápencové půdy mají malou schopnost rtuť vázat. Tyto dva faktory by mohly vysvětlovat nejvyšší obsah rtuti v jehlicích borovice na stanovišti Svatava, kde se pH pohybuje mírně nad hodnotou 7 a je zde zastoupena organická vrstva půdy. Oproti tomu na stanovištích Lítov a Erika organická složka není zastoupena v takové míře a je možné, že i přes kyselou povahu substrátu je rtuť více vázána pevnými vazbami na minerály. Stanoviště Lomnice má také zastoupenou organickou vrstvu půdy avšak na této lokalitě jsou velice variabilní hodnoty pH.

Nezanedbatelnou roli v dostupnosti rtuti v substrátu hraje i stáří půd. Dle (Hatzinger and Alexander, 1995) klesá dostupnost rtuti se zvyšujícím se stářím půd. Rtuť je vyvazována pevnými vazbami na minerální sloučeniny půd. Svou roli zde také hrají mikroorganismy a vypařování rtuti do ovzduší (Boening, 2000), čímž se také může snižovat dostupnost rtuti pro rostliny. To by mohlo podpořit zjištěné meziroční úbytky obsahu rtuti v jehlicích borovice, kde by tento úbytek mohl být částečně vysvětlen snižováním dostupností rtuti v půdě. Je zde důležité zmínit, že substráty na výsypkách nejsou stejně staré. Nejstarší jsou substráty na stanovišti Erika, kde neproběhla biologická rekultivace, (i borovice lesní zde roste z náletu). Výsypka Lítov je cca o 20 let mladší než stanoviště Erika a výsypka Lomnice je cca o 35 let mladší než stanoviště Erika (osobní sdělení RNDr. Petr Rojík, Ph.D., Sokolovská uhelná, právní nástupce, a.s.). Naměřené obsahy Hg v substrátech ani v jehlicích však neodpovídají této hypotéze: nejvyšší obsah Hg v substrátu byl zjištěn na poměrně mladé výsypce Lomnice, naopak nejvyšší obsah Hg v jehlicích byl pozorován na stanovišti Svatava, které se nachází mimo výsypky. Výše zmíněná rolí stáří substrátu, zde zřejmě působí jen minimálně nebo vůbec.

Ve studii (Jing et al., 2007) bylo zjištěno, že kationty Cu a Zn kompeticí o vazebná místa na minerální sloučeniny v půdě zvyšují dostupnost rtuti. Oba prvky jsou na výsypkách zastoupeny ve vysokých koncentracích a mohly by mít vliv na dostupnost rtuti pro borovice.

Výsledky studie (Fleck et al., 1999) na stromech borovic naznačují, že významný vliv na obsah rtuti v jehlicích může mít koncentrace rtuti obsažená v ovzduší, ale domnívám, že stanoviště jsou od sebe málo vzdálená aby se mohl vytvořit, tak výrazný gradient koncentrace rtuti v ovzduší aby to výrazně ovlivnilo její obsahy v jehlicích.

5.2.2.2. Příjem As a Hg rostlinami a transport do nadzemních částí

Další důležitou oblastí, která má vliv na obsah As a Hg v jehlicích borovice, je jejich příjem rostlinou a schopnost translokace těchto prvků do nadzemních částí rostlin. U některých vzorků jehlic borovice lesní byly obsahy As a Hg pod možnou hranicí detekce, což by mohlo být částečně zapříčiněno níže popsanými interakcemi s myhorhizními houbami a nízkým transportem těchto prvků do nadzemních částí rostlin.

Studie naznačují, že jistý ochranný vliv mohou mít mykorhizní houby interagující s kořeny rostlin. Odolnost těchto hub vůči těžkým kovům závisí stejně jako u rostlin na jejich druhu. Některé mykorhizy jsou schopné akumulovat rtuť či arsen a tím zabraňovat jejímu pronikání do rostlin (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002; Crane et al., 2010). Vzhledem k tomu, že kořeny borovice lesní interagují s mykorrhizními houbami (Schulz et al., 2012), mohla by tato interakce přispívat k nízkému příjmu obou prvků do rostlin.

Z dalších studií vyplývá, že rtuť i arsen se akumulují v kořenech (Castro et al., 2009; Bhattacharya et al., 2010; Yao et al., 2011) a k jejich transportu do nadzemních částí dochází v malém množství. Na obsahu rtuti v jehlicích bude mít zřejmě významný podíl příjem rtuti z ovzduší jak ukazuje studie (Brun et al., 2010) na smrcích (*Picea* abies) či (Fleck et al., 1999) na borovici smolné (*Pinus resinosa*).

Nebylo možno se v diplomové práci podrobněji věnovat roli mykorhizy, případně zjišťovat obsah a lokalizaci Hg a As v kořenovém systému či mykorhizních strukturách. Hlavním důvodem je, že analýza mykorhiz nebyla součástí projektu zabývajícího se dálkovým průzkumem Země v rámci kterého vypracovávám tuto diplomovou práci a proto se zde nebudu mikorhizními houbami více zabývat.

5.2.2.3. Obsah fotosyntetických pigmentů v jehlicích v závislosti na TK v substrátu

Vyhodnocení obsahu fotosyntetických pigmentů bylo zařazeno pro jeho vlastnosti nespecifického bioindikátoru stresu (Tausz et al., 1998). Díky schopnosti odrážet zdravotní stav rostlin, je chlorofylu věnována značná pozornost v dálkovém průzkumu Země, pro možnost jeho využití jako indikátoru stresu ve sledování zdravotního stavu porostu (Misurec et al., 2012).

Snížení obsahu chlorofylu v rostlinách je reakcí na různé stresové podmínky. As i Hg vyvolávají v rostlinách snížení obsahu chlorofylu (Stoeva et al., 2005; Gauba et al., 2007), což dobře koresponduje s výsledky analýz na jehlicích borovice, ale myslím si, že důležitou roli na stanovištích Lítov a Erika hrají i nízké hodnoty pH. Podoba obsahů fotosyntetických látek na stanovišti Lomnice a Svatava může mít dva důvody. V první řadě, jak již bylo zmíněno, stromy na stanovišti Lomnice rostou na navezeném substrátu a proto mohou být půdní podmínky bližší kontrolnímu stanovišti. Dále pak může určitou roli hrát fakt, že jsou zde stromy cca o 5 let mladší než na stanovištích Lítov a Erika a může u nich převažovat investice uhlíku do primárního metabolismu zajišťujícího růst než do obranných látek jako jsou například fenolické látky. Tuto domněnku by mohla podpořit teorie o prioritizaci uhlíkových sinků, kdy se uhlík přednostně alokuje do dýchacího řetězce, do růstu stonku a kořenů a až po té do obranných látek a reprodukčních orgánu (Klap et al., 2000). Potlačení využívání uhlíku k tvorbě obranných látek bylo potvrzeno i na smrcích (Polak et al., 2006).

5.2.2.4. Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice v závislosti na obsahu As a Hg v substrátu

Přestože studie naznačují jistou spojitost zvýšeného obsahu fenolických látek s těžkými kovy ať už skrze přímou detoxifikaci těžkých kovů (Lavid et al., 2001) či skrze jejich antioxidatviní funkci proti ROS, které mohou být indukovány těžkými kovy (Michalak, 2006), z analýz jehlic borovice není patrná spojitost mezi obsahy fenolických látek a As a Hg v jehlicích borovice nebo v půdě.

Na stanovištích nebyl naměřen vyšší obsah fenolických látek oproti kontrolnímu stanovišti (kromě stanoviště Lítov v roce 2010, což bude probráno dále), což mohlo mít několik příčin. Jak již bylo řečeno výše, obsah dostupných forem As a

Hg pro rostliny je ovlivněn mnoha faktory. K detoxifikaci těchto látek dochází hlavně v kořeni (Castro et al., 2009) a nízké obsahy As a Hg v jehlicích tomuto odpovídají. Navíc obsah As v jehlicích nedosáhl známých toxických hodnot v pletivech rostlin 3 – 10 $mg.kg^{-1}$ (Tlustoš et al. 2007; Alloway, 1990; Kabata-Pendias a Pendias, 2001). Hllavními detoxifiakčními sloučeninami As a Hg jsou fytochelatiny a metalothyoneiny (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002; Valega et al., 2009), které ke své syntéze potřebují glutathion. Pokud koncentrace As a Hg nepřevyšují schopnost rostlin detoxifikovat je skrze tyto sloučeniny, tak se domnívám, že není potřeba syntézy fenolických látek jako obranného mechanismu prosti As a Hg. Dalším důležitým faktorem je různorodost ve formách rozpustných fenolických látek. Analýzami byl zjišťován celkový obsah rozpustných fenolických látek, takže případné změny v obsahu jednotlivých složek a to hlavně flavonoidů a taninů (Lavid et al., 2001; Michalak, 2006) se mohly vzájemně vykompenzovat a nemusely se výrazně projevit v celkovém obsahu rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice.

Důležitá je role fenolických látek v koloběhu C a N v ekosystémech. Jak už bylo popsáno v kapitole o fenolických látkách a ligninu, vyšší obsah fenolických látek by mohl do jisté míry inhibovat činnost půdních mikroorganismů a pokud je na výsypkách dusík málo dostupný, tak je pro rostliny nežádoucí tvořit vysoké obsahy fenolických látek v jehlicích.

Zvýšený obsah rozpustných fenolických látek v druhé roce odběru, stejně tak jako zvýšený obsah rozpustných fenolických látek na stanovišti Lítov v roce 2010 nekoresponduje se meziročními změnami obsahů As a Hg v jehlicích a mohl být zapříčiněn jiným druhem biotického či abiotického stresu, který nejsem schopná z dostupných informací přesně identifikovat.

Vzhledem k známým gradientům obsahů rozpustných fenolických látek v rámci osluněné a neosluněné části koruny (Vrchotova et al., 2004; Haberle et al., 2009) byly odebírány jehlice pouze z osluněných částí horních a spodních větví stromů borovice. Analýzy obsahů rozpustných fenolických látek neukázaly významné statistické rozdíly mezi pozicí v koruně, což dobře koresponduje s uvedenou literaturou. Z hlediska dálkového průzkumu Země (který pracuje s daty získanými z osluněných částí koruny), kde by případné gradienty v osluněných částech koruny ovlivňovali možnou predikci stavu vegetace, jsou tyto výsledky vítány.

Vyšší obsahy rozpustných fenolických látek (v některých případech statisticky průkazné) jsou běžným jevem u jehličnanů (Soukupová et al., 2001).

5.2.2.5. Obsah ligninu v jehlicích borovice v závislosti na obsahu As a Hg v substrátu

Rostliny reagují na různé stresové faktory (jak bylo popsáno v kapitole o ligninu) zvýšenou tvorbou ligninu (Lee et al., 2007; Neves et al., 2010). V několika studiích byla naměřena vyšší lignifikace za přítomnosti těžkých kovů jako je kadmium (50μM) (Elobeid et al., 2012), mangan (10mM) (Gao et al., 2012) či měď (Lin et al., 2005). Jak tu již bylo několikrát zmíněno lignin a fenolické látky mají vliv na složení opadu (obsah ligninu, N, poměr C/N) ovlivňuje složení mikrobiálních společenstev rozkladačů i dynamiku rozkladu organické hmoty a další dostupnost živin pro rostliny (Albrechtova et al., 2008).

Na zvolených stanovištích došlo oproti očekávání ke snížení obsahu ligninu v jehlicích borovice v roce 2010 a to nejvíce na stanovišti Lítov. Možnou příčinou by mohla být kompetice o prekurzory syntézy rozpustných fenolických látek a ligninu (fenylananin) či o enzymy zajišťující tuto syntézu (PAL). Naznačovaly by to výsledky vyšších obsahů rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice v roce 2010.

5.3. Hrnkové pokusy

Hrnkové pokusy byly provedeny za účelem vyhodnocení vlivu toxických substrátů na fyziologický stav rostlin pomocí měření vybraných fyziologických parametrů v částečně kontrolovaných podmínkách. Zálivkové varianty hrnkových pokusů byly zařazeny pro ověření vlivu rtuti na vodní režim rostlin. Rtuť, jako jeden z hlavních kontaminantů výsypek vyskytující se ve vysokých koncentracích, by mohla ovlivňovat vodní režim rostlin rostoucích na výsypkách. Z rozborů však není patrné, v jaké koncentraci se vyskytuje rtuť v dostupných formám pro rostliny. Proto byla na základě dostupné literatury (Askari et al., 2007; Zhou et al., 2009) pro hrnkové pokusy zvolena forma $HgCl_2$, která je pro rostliny dostupná a má inhibiční účinek na akquaporiny, čímž ovlivňuje jak vodní provoz rostlin, tak transport CO_2 do místa karboxylace v chloroplastech (Terashima and Ono, 2002).

5.3.1.1. Obsah rozpustných fenolických látek v rostlinách tabáku v závislosti na toxickém substrátu

Jak již bylo zmíněno u terénních pokusů, ze studií vyplývá, že se obsahy rozpustných fenolických látek vlivem stresu do určité míry zvyšují (Pasqualini et al., 2003, Redha et al., 2012; Sanchez-Rodriguez et al., 2012). Tento trend nebyl u rostlin tabáku potvrzen.

V roce 2011 v pokusu 1 byl naměřen významně nižší obsah rozpustných fenolických látek v listech tabáku u substrátových variant Erika a Podkrušnohorská výsypka. Jak naznačují studie, může mít vliv na obsah rozpustných fenolických látek dostupnost živin ze substrátu (Mellisho et al., 2011). Na stanovišti Erika i Podkrušnohorská výsypka jsou substráty tvořeny vysokým obsahem jílu a dalším ředěním s pískem v hrnkových pokusech mohla být hlavní příčinou deficience živin.

Proto bylo v roce 2012 přistoupeno k dodávání živin živným roztokem aby se zamezilo případným rozdílům v obsahu rozpustných fenolických látek způsobených tímto faktorem. V roce 2012 nebyly potvrzeny žádné rozdíly v obsahu rozpustných fenolických látek v listech tabáku a to ani v zálivkových variantách.

Získané výsledky u variant se substrátem z terénních stanovišť bych si vysvětlovala již zmiňovanou dostupností As a Hg do rostlin a akumulací a detoxifikací v kořenech rostlin (Castro et al., 2009 (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002; Valega et al., 2009)). U zálivkových variant by bylo možné vysvětlit tento jev zvolením nízkých koncentrací $HgCl_2$, nebo možností, že Hg vůbec nemá přímý vliv na akumulaci fenolických látek.

5.3.1.2. Vliv toxických substrátů na hmotnost prýtu a kořenů rostlin tabáku

V pokusu 1 v roce 2011 byla prokázáná inhibice růstu nadzemních částí i kořenů rostlin tabáku u obou toxických variant substrátu, pravděpodobně způsobená toxicitou substrátu, což by potvrzovala například studie na semenáčcích rýže, u kterých došlo k redukci růstu při koncentraci 50µM As (Shri et al. 2009). Tuto doměnku se však nepodařilo v pokusech 2 v roce 2011 potvrdit (snížený růst prýtu pouze u substrátové varianty Erika). V pokusu 3a v roce 2012 s přidaným živným roztokem bylo obtížné vyhodnotit rozdílný růst rostlin dle substrátových variant z důvodu velké variability růstu rostlin u substrátové varianty Podkrušnohorská výsypka. Avšak trend v poměru suché hmotnosti prýtů ku suché hmostnosti kořenů, který se byl u kontroly nejnižší a u substrátové varianty Podkrušnohorská výsypka nejvyšší, byl zachován jako u

předchozích pokusů. Tyto výsledky naznačují, že by hlavní roli v inhibici růstu rostlin mohly hrát vyšší obsahy As a Hg ve výsypkových substrátech. Inhibiční roli Hg by potvrzovaly i pokusy 3b s kontrolovanou zálivkou $HgCl_2$, kdy u kontaminovaných variant byla prokázána nižší hmotnost prýtů (u varianty P10 i kořenů) oproti kontrole.

5.3.1.3. Vliv toxických substrátů na vybrané fyziologické parametry rostlin tabáku

V pokusu 1 v roce 2011 byla prokázána vyšší transpirace a s tím související vodivost průduchů u substrátové varianty Podkrušnohorská výsypka oproti zbylým dvěma variantám (kontrolní a substrát z výsypky Erika), které se od sebe významně nelišily. Čistá fotosyntéza rostlin vykazovala variabilní výsledky, ze kterých nebylo možné odvodit jednoznačné závěry. Vyšší variabilita rychlosti čisté fotosyntézy by mohla být zapříčiněna jejími rychlými odezvami na světelné podmínky, které se během měření mohly měnit.

Výsledky gazometrických měření pokusu 2 v roce 2011 nejsou ve výsledcích uvedeny z důvodu veliké variability naměřených hodnot mezi jednotlivými dny měření a to u všech sledovaných parametrů. Tato variabilita by mohla být zapříčiněna již zmiňovanou schopností rychlé odezvy rychlosti čisté fotosyntézy na světelné podmínky.

Ačkoliv gazometrické měření pobíhalo vždy přibližně ve stejné denní době (12-16), je možné, že transpirace i vodivost průduchů se mohla rychle měnit v závistosti na změnách teploty listu. Denní období mezi 12-16 hodinou které bylo vybráno pro gazometrické měření jako část dne, kdy jsou rostliny fotosynteticky aktivní.

Výsledky pokusu 3a v roce 2012 nebyly do výsldeků zřazeny ze stejných důvodů jako pokus 2 v roce 2011. U tohoto pokusu navíc došlo k velké variabilitě v růstu rostlin na substrátové variantě Podkrušnohorská výsypka.

V Pokusu 3b v roce 2012 byl zaznamenán trend nižší transpirace a vodivosti průduchů u rostlin tabáku u obou variant ošetřených $HgCl_2$. Tyto výsledky by mohly být zapříčiněny inhibičním vlivem chloridu rtuťnatého na činnost aquaporinů a následně způsobeným vodním deficitem. Role $HgCl_2$ v inhibici aquaporinů je využívána v mnoha studiích zabývajících se vodním režimem rostlin (Voicu et al., 2010). Dalším faktorem by mohly být vysoké teplotní výkyvy, kdy 1.6. 2012 došlo k prudkému ochlazení. Je možné, že kontrolní rostliny se s tímto náhlým stresem dokáží vyrovnat rychleji, než rostliny stresované přítomností rtuti.

Výsledky hrnkových pokusů ukázaly vyšší citlivost rostlin k TK z výsypkových substrátů nebo zálivky $HgCl_2$ spíš na začátku vegetační sezony (květen, červen) oproti pokusům prováděným v srpnu a září. Voicu et al. (2010) uvádějí podobné zjištění pro listy topolu (*Populus tremuloides* Michx.), kdy snížení hydraulické vodivosti čepele listů způsobené HgCl2 bylo výraznější v červnu než v srpnu. Citlivost rostlin k $HgCl_2$ se tedy může měnit v závislosti na ontogenezi listu nebo klimatických podmínkách v průběhu vegetační sezony.

5.3.2. Vyhodnocení vstupních hypotéz

5.3.2.1. Terénní výzkum

Z vyhodnocení obsahu chlorofylu v jehlicích borovice a na základě literatury můžeme u stanovišť Lítov a Erika potvrdit zatížení stromů stresem. Obsah rozpustných fenolických látek ani obsahy ligninu v jehlicích borovice nekorelují s obsahy As a Hg v půdě ani v jehlicích borovice. Z dostupné literatury vyplývá, že vlivem stresových podmínek zpravidla dochází ke zvyšování obou typů látek. Na základě všech informací se domnívám, že As ani Hg netvoří na výsypkách hlavní stresový faktor pro stromy borovice. Tomuto závěru nasvědčuje např. fakt, že borovice z vážně kontaminovaného stanoviště Lomnice vykazovaly dle sledovaných nespecifických indikátorů stresu relativně dobrý fyziologický stav a v roce 2010 dokonce téměř nedetekovatelné obsahy As v jehlicích.

Hypotéza 1: Těžké kovy mění obsah rozpustných fenolických látek, ligninu a fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice byla potvrzena jen pro případ fotosyntetických pigmentů.

Na základě prvkové analýzy výsypkových substrátů se jako nejvíce kontaminované jevily výsypky Lítov a Lomnice (kromě As a Hg přesahovala vyhláškou stanovený limitní obsah i Cu a u Lomnice byl pozorován i vysoký obsah Zn v substrátu). Ze získaných výsledků je patrné, že kromě samotné přítomnosti těžkých kovů v substrátu, hrají důležitou roli i další jeho vlastnosti, např. pH, množství organické hmoty či konkrtétní forma těžkého kovu. Jako důležitý faktor ovlivňující fyziologický stav stromů rostoucích na výsypkách se též ukázaly rekultivační techniky – např. převrstvení rekultivovatelným substrátem v roce 1997 na výsypce Lomnice. **Hypotéza 2:** vliv výsypkových substrátů s vysokým obsahem As a Hg na fyziologický stav borovic není jednoznačný. Získaná data ze všech biochemických analýz naznačují,

že stromy jsou na výspkách Lítov a Lomnice vystaveny stresovým podmínkám. Avšak není možné určit do jaké míry se na tomto stresu účastní As a Hg.

Hypotéza 3: Na základě dostupné literatury a získaných výsledků je možné potvrdit původní hypotézu 3, že stáří jehlic borovice má vliv na obsah rozpustných fenolických látek. Původní hypotézu o vlivu tohoto faktoru na obsah ligninu v jehlicích borovice je možné na základě získaných dat zamítnout.

5.3.2.2. Hrnkové pokusy

Hypotéza 1: Na základě detekce sníženého obsahu chlorofylu a nižší suché hmotnosti prýtů a kořenů oproti kontrolním rostlinám můžeme potvrdit původní hypotézu, že vybrané kontaminované substráty mají vliv na fyziologický stav rostlin tabáku.

Hypotéza 2: Vyhodnocení hypotézy, že těžké kovy mění obsah fenolických látek v listech tabáku není jednoznačné. V pokusu 2 se obsah fenolických látek v závislosti na přítomnosti TK v substrátu neměnil. Naopak v pokusu 1 a 3a vykazovaly rostliny pěstované na substrátu z Podkrušnohorské výsypky nižší obsah fenolických látek než kontrola.

Hypotéza 3: Díky vysoké variabilitě získaných dat není možné vyhodnotit hypotézu, že těžké kovy mají vliv na vodní režim a rychlost čisté fotosyntézy rostlin tabáku.

Hypotéza 4: Stejně tak pro rtuť ve formě $HgCl_2$ může být zamítnuta hypotéza o jejím vlivu na zvýšení rozpustných fenolických látek v listech tabáku. Z časových důvodů nebyly provedeny analýzy fotosyntetických pigmentů a není možné vyhodnotit hypotézu vlivu $HgCl_2$ na snížení obsahu fotosyntetických pigmentů v listech tabáku.

Hypotéza 5: Z výsledků pokusů s kontrolovanou zálivkou $HgCl_2$ může být potvrzen vliv rtuti v této anorganické podobě na snížení transpirace rostlin tabáku avšak nemůže být vyhodnocen její vliv na rychlost čisté fotosyntézy s důvodu vysoké variability získaných výsledků.

6. ZÁVĚRY

Byl zmapován obsah rozpustných fenolických látek, ligninu a fotosyntetických pigmentů v jehlicích borovice na vybraných sokolovských výsypkách. Obsah rozpustných fenolických látek v jehlicích borovice na vybraných výsypkách sledovaný po dvě vegetační sezony byl velmi podobný i přes značné rozdíly v obsahu sledovaných těžkých kovů v substrátu. Obsah ligninu v jehlicích již vykazoval vyšší variabilitu mezi stanovišti. V obou případech se jeví výsypka Lítov jako nejzatíženější stanoviště a s použitím obsahů rozpustných fenolických látek jako nespecifických indikátorů stresu můžeme vyhodnotit fyziologický stav borovic na stanovišti Lítov jako nejhorší. Tento závěr podporují i výsledky analýzy obsahu fotosyntetických pigmentů z let 2009 i 2010, kdy borovice ze výsypky Lítov vždy vykazovaly nejnižší obsah pigmentů. Výsledky analýz jehlic ukazují poměrně malý obsah As a Hg v jehlicích v porovnání s jejich obsahy v substrátu. Vzhledem k tomu, že borovice lesní není známa jako hyperakumulátor těžkých kovů, bylo toto zjištění očekáváno.

Z hlediska možnosti použití sledovaných látek (rozpustné fenolické látky, fotosyntetické pigmenty a lignin) pro vyhodnocení fyziologického stavu borovice při rekultivaci výsypek kontaminovaných těžkými kovy se jako nejvhodnější zatím ukázaly fotosyntetické pigmenty. Z hlediska vyhodnocování fyziologického stavu vegetace na výsypkách pomocí dálkového průzkumu Země je toto zjištění pozitivní, neboť metodika pro tvorbu chlorofylových map či obecně hodnocení zdravotního stavu vegetace je již dobře zpracována z jehličnanů především pro smrk ztepilý (Schlerf et al., 2010; Mišurec et al., 1012). Tato studie proto slouží jako podklad pro tvorbu chlorofylové mapy pro borovici lesní, která dle mých znalostí, dosud nebyla publikována.

Výsledky hrnkových pokusů ukázaly, že rtuť by mohla být jedním z hlavních toxických kontaminantů na výsypkových substrátech. Rozpustné fenolické látky se ukázaly jako nevhodný indikátor stresu těžkými kovy na výsypkových substrátech.

Vliv toxických substrátů na fyziologické parametry rostlin se ukázal jako nejednoznačný díky možné kombinaci s dalšími faktory prostředí, které mají vliv na tyto parametry.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Al-Abed SR, Jegadeesan G, Purandare J, Allen D. 2007. Arsenic release from iron rich mineral processing waste: Influence of pH and redox potential. *Chemosphere* **66**(4): 775-782.

Albrechtova J, Seidl Z, Aitkenhead-Peterson J, Lhotakova Z, Rock BN, Alexander JE, Malenovsky Z, McDowell WH. 2008. Spectral analysis of coniferous foliage and possible links to soil chemistry: Are spectral chlorophyll indices related to forest floor dissolved organic C and N? *Science of the Total Environment* **404**(2-3): 424-432.

Alloway BJ, Jackson AP, Morgan H. 1990. The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. *Science of the Total Environment* **91**: 223-236.

Askari S, Uddin F, Azmat R. 2007. Biosorption of Hg: I. Significant improvement with marine green algae in the anatomy of hypocotyl of Trigonella foenumgraecum under Hg stress. *Pakistan Journal of Botany* **39**(4): 1089-1096.

Aspinwall MJ, King JS, Booker FL, McKeand SE. 2011. Genetic effects on total phenolics, condensed tannins and non-structural carbohydrates in loblolly pine (Pinus taeda L.) needles. *Tree Physiology* **31**(8): 831-842.

Bech J, Duran P, Roca N, Poma W, Sanchez I, Barcelo J, Boluda R, Roca-Perez L, Poschenrieder C. 2012. Shoot accumulation of several trace elements in native plant species from contaminated soils in the Peruvian Andes. *Journal of Geochemical Exploration* **113**: 106-111.

Bhattacharya P, Samal AC, Majumdar J, Santra SC. 2010. Accumulation of arsenic and its distribution in rice plant (Oryza sativa L.) in Gangetic West Bengal, India. *Paddy and Water Environment* **8**(1): 63-70.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**(2): 179-194.

Boening DW. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* **40**(12): 1335-1351.

Bradeen DA, Winget GD, Gould JM, Ort DR. 1973. Site-specific inhibition of photophosphorylation in isolated spinach-chloroplasts by mercuric-chloride. *Plant Physiology* **52**(6): 680-682.

Brun CB, Peltola P, Astrom ME, Johansson MB. 2010. Spatial distribution of major, trace and ultra trace elements in three Norway spruce (Picea abies) stands in boreal forests, Forsmark, Sweden. *Geoderma* **159**(3-4): 252-261.

Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello RM, Jucoski GD, Battisti V, Redin M, Linares CEB, Dressler VL, Flores EMD, Nicoloso FT, Morsch VM, Schetinger MRC. 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere* **65**(6): 999-1006.

Castro R, Pereira S, Lima A, Corticeiro S, Valega M, Pereira E, Duarte A, Figueira E. 2009. Accumulation, distribution and cellular partitioning of mercury in several halophytes of a contaminated salt marsh. *Chemosphere* **76**(10): 1348-1355.

Cavusoglu K, Ergene A, Yalcin E, Tan S, Yapar K. 2009. Cytotoxic effects of lead and mercury ions on root tip cells of Cicer arietinum L. *Fresenius Environmental Bulletin* **18**(9): 1654-1661.

Chapman EEV, Dave G, Murimboh JD. 2012. Bioavailability as a Factor in Risk Assessment of Metal-Contaminated Soil. *Water Air and Soil Pollution* **223**(6):

2907-2922.

Chen YA, Chi WC, Huang TL, Lin CY, Thi TQN, Hsiung YC, Chia LC, Huang HJ. 2012. Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **55**: 23-32.

Crane S, Dighton J, Barkay T. 2010. Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. *Fungal Biology* **114**(10): 873-880.

Dong JH, Yu M, Bian ZF, Zhao YD, Cheng W. 2012. The safety study of heavy metal pollution in wheat planted in reclaimed soil of mining areas in Xuzhou, China. *Environmental Earth Sciences* **66**(2): 673-682.

Du X, Zhu YG, Liu WJ, Zhao XS. 2005. Uptake of mercury (Hg) by seedlings of rice (Oryza sativa L.) grown in solution culture and interactions with arsenate uptake. *Environmental and Experimental Botany* **54**(1): 1-7.

Elobeid M, Gobel C, Feussner I, Polle A. 2012. Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *Journal of Experimental Botany* **63**(3): 1413-1421.

Fleck JA, Grigal DF, Nater EA. 1999. Mercury uptake by trees: An observational experiment. *Water Air and Soil Pollution* **115**(1-4): 513-523.

Frouz J 2007. Tvorba nové krajiny na Sokolovsku: Sokolovská uhelná a.s.

Gao L, Peng KJ, Chen YH, Wang GP, Shen ZG. 2012. Roles of apoplastic peroxidases, laccases, and lignification in the manganese tolerance of hyperaccumulator Phytolacca americana. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**(1): 151-159.

Gao S, Chao OY, Tang L, Zhu JQ, Xu Y, Wang SH, Chen F. 2010. Growth and antioxidant responses in Jatropha curcas seedling exposed to mercury toxicity. *Journal of Hazardous Materials* **182**(1-3): 591-597.

Gauba N, Mahmooduzzafar, Siddiqi TO, Umar S, Iqbal M. 2007. Leaf biochemistry of Lycopersicon esculentum Mill. at different stages of plant development as affected by mercury treatment. *Journal of Environmental Biology* **28**(2): 303-306.

Ge CL, Ding Y, Wang ZG, Wan DZ, Wang YL, Shang Q, Luo SS. 2009. Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences-China* **21**(6): 806-813.

Godbold DL, Huttermann A. 1988. Inhibition of photosynthesis and transpiration in relation to mercury-induced root damage in spruce seedlings. *Physiologia Plantarum* **74**(2): 270-275.

Grace SC, Logan BA. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**(1402): 1499-1510.

Gustafsson JP, Jacks G. 1995. ARSENIC GEOCHEMISTRY IN FORESTED SOIL PROFILES AS REVEALED BY SOLID-PHASE STUDIES. *Applied Geochemistry* **10**(3): 307-315.

Haberle KH, Nunn AJ, Reiter IM, Werner H, Heller W, Bahnweg G, Gayler S, Lutz C, Matyssek R. 2009. Variation of defence-related metabolites in the foliage of adult beech and spruce: a conceptual approach to approximating traded-off carbon. *European Journal of Forest Research* **128**(2): 99-108.

Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**(366): 1-11.

Hatzinger PB, Alexander M. 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science & Technology* **29**(2): 537-545.

Huang Y, Xiong ZT, Dai LP, Gao JO. 2008. Effect of Cu stress on the invertase activity and root growth in two Populations of Rumex dentatus L. with different Cu tolerance. *Environmental Toxicology* **23**(4): 443-450.

Iqbal N, Masood A, Nazar R, Syeed S, Khan NA. 2010. Photosynthesis, Growth and Antioxidant Metabolism in Mustard (Brassica juncea L.) Cultivars Differing in Cadmium Tolerance. *Agricultural Sciences in China* **9**(4): 519-527.

Javot H, Maurel C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* **90**(3): 301-313.

Jing YD, He ZL, Yang XE. 2007. Effects of pH, organic acids, and competitive cations on mercury desorption in soils. *Chemosphere* **69**(10): 1662-1669.

Juang KW, Lee YI, Lai HY, Wang CH, Chen BC. 2012. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research* **19**(4): 1315-1322.

Juknys R, Vitkauskaite G, Racaite M, Vencloviene J. 2012. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Central European Journal of Biology* **7**(2): 299-306.

Kimimura M, Katoh S. 1972. Studies on electron-transport associated with photosystem i .1. functional site of plastocyanin - inhibitory effects of hgcl2 on electron-transport and plastocyanin in chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* **283**(2): 279-&.

Kinraide TB. 1991. IDENTITY OF THE RHIZOTOXIC ALUMINUM SPECIES. *Plant and Soil* **134**(1): 167-178.

Kjellbom P, Larsson C, Johansson I, Karlsson M, Johanson U. 1999. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* **4**(8): 308-314.

Klap JM, Voshaar JHO, De Vries W, Erisman JW. 2000. Effects of environmental stress on forest crown condition in Europe. Part IV: Statistical analysis of relationships. *Water Air and Soil Pollution* **119**(1-4): 387-420.

Klepzig KD, Kruger EL, Smalley EB, Raffa KF. 1995. Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle-vectored fungus. *Journal of Chemical Ecology* **21**(5): 601-626.

Klepzig KD, Smalley EB, Raffa KF. 1996. Combined chemical defenses against an insect-fungal complex. *Journal of Chemical Ecology* **22**(8): 1367-1388.

Kuraz V, Frouz J, Kuraz M, Mako A, Shustr V, Cejpek J, Romanov OV, Abakumov EV. 2012. Changes in some physical properties of soils in the chronosequence of self-overgrown dumps of the Sokolov quarry-dump complex, Czechia. *Eurasian Soil Science* **45**(3): 266-272.

Lange BM, Lapierre C, Sandermann H. 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin - structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiology* **108**(3): 1277-1287.

Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* **212**(3): 323-331.

Laštuvka Z 1967. Metoda vodních kultur vyšších rostlin.In Minár J: Univerzita J. E. Purkyne v Brne, Brno, 83 s.

Lee BR, Kim KY, Jung WJ, Avice JC, Ourry A, Kim TH. 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (Trifolium repens L.). *Journal of Experimental Botany* **58**(6): 1271-1279.

Lewis NG, Yamamoto E. 1990. Lignin - occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 455-496.

Lin CC, Chen LM, Liu ZH. 2005. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in

soybean roots. *Plant Science* **168**(3): 855-861.

Lomonte C, Sgherri C, Baker AJM, Kolev SD, Navari-Izzo F. 2010. Antioxidative response of Atriplex codonocarpa to mercury. *Environmental and Experimental Botany* **69**(1): 9-16.

Maksimovic I, Kastori R, Krstic L, Lukovic J. 2007. Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. *Biologia Plantarum* **51**(3): 589-592.

Malenovsky Z, Albrechtova J, Lhotakova Z, Zurita-Milla R, Clevers J, Schaepman ME, Cudlin P. 2006. Applicability of the PROSPECT model for Norway spruce needles. *International Journal of Remote Sensing* **27**(23-24): 5315-5340.

Meharg AA, Hartley-Whitaker J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* **154**(1): 29-43.

Mellisho CD, Gonzalez-Barrio R, Ferreres F, Ortuno MF, Conejero W, Torrecillas A, Garcia-Mina JM, Medina S, Gil-Izquierdo A. 2011. Iron deficiency enhances bioactive phenolics in lemon juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**(12): 2132-2139.

Meng B, Feng XB, Qiu GL, Cai Y, Wang DY, Li P, Shang LH, Sommar J. 2010. Distribution Patterns of Inorganic Mercury and Methylmercury in Tissues of Rice (Oryza sativa L.) Plants and Possible Bioaccumulation Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(8): 4951-4958.

Merry RH, Tiller KG, Alston AM. 1986. The effects of contamination of soil with copper, lead and arsenic on the growth and composition of plants .1. effects of season, genotype, soil-temperature and fertilizers. *Plant and Soil* **91**(1): 115-128.

Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* **15**(4): 523-530.

Misurec J, Kopackova V, Lhotakova Z, Hanus J, Weyermann J, Entcheva-Campbell P, Albrechtova J. 2012. Utilization of hyperspectral image optical indices to assess the Norway spruce forest health status. *Journal of Applied Remote Sensing* **6**.

Neves GYS, Marchiosi R, Ferrarese MLL, Siqueira-Soares RC, Ferrarese O. 2010. Root Growth Inhibition and Lignification Induced by Salt Stress in Soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science* **196**(6): 467-473.

Ollinger SV, Smith ML, Martin ME, Hallett RA, Goodale CL, Aber JD. 2002. Regional variation in foliar chemistry and N cycling among forests of diverse history and composition. *Ecology* **83**(2): 339-355.

Paivoke A. 1983. The long-term effects of lead and arsenate on the growth and development chlorophyll content and nitrogen-fixation of the garden pea. *Annales Botanici Fennici* **20**(3): 297-306.

Pasqualini V, Robles C, Garzino S, Greff S, Bousquet-Melou A, Bonin G. 2003. Phenolic compounds content in Pinus halepensis Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* **52**(1): 239-248.

Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **52**(3): 199-223.

Patra M, Sharma A. 2000. Mercury toxicity in plants. *Botanical Review* **66**(3): 379-422.

Polak T, Rock BN, Campbell PE, Soukupova J, Solcova B, Zvara K, Albrechtova J. 2006. Shoot growth processes, assessed by bud development types, reflect

Norway spruce vitality and sink prioritization. *Forest Ecology and Management* **225**(1-3): 337-348.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta* **975**(3): 384-394.

Radotic K, Micic M, Jeremic M. 2005. New insights into the structural organization of the plant polymer lignin. *Biophysics from Molecules to Brain: in Memory of Radoslav K. Andjus* **1048**: 215-229.

Rahman MA, Hasegawa H, Rahman MM, Islam MN, Miah MAM, Tasmen A. 2007. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (Oryza sativa L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* **67**(6): 1072-1079.

Rascio N, Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**(2): 169-181.

Rastgoo L, Alemzadeh A. 2011. Biochemical responses of Gouan (Aeluropus littoralis) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science* **5**(4): 375-383.

Redha A, Al-Mansor N, Suleman P, Al-Hasan R, Afzal M. 2012. Modulation of antioxidant defenses in Conocarpus lancifolius under variable abiotic stress. *Biochemical Systematics and Ecology* **43**: 80-86.

Requejo R, Tena M. 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* **66**(13): 1519-1528.

Rodriguez E, Peralta-Videa JR, Israr M, Sahi SV, Pelayo H, Sanchez-Salcido B, Gardea-Torresdey JL. 2009. Effect of mercury and gold on growth, nutrient uptake, and anatomical changes in Chilopsis linearis. *Environmental and Experimental Botany* **65**(2-3): 253-262.

Rotter, Pavel Rizikové prvky v lesních půdách. Diplomová práce, Masarykova Univerzita.

Sanchez-Rodriguez E, Ruiz JM, Ferreres F, Moreno DA. 2012. Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chemistry* **134**(2): 775-782.

Schlerf M, Atzberger C, Hill J, Buddenbaum H, Werner W, Schuler G. 2010. Retrieval of chlorophyll and nitrogen in Norway spruce (Picea abies L. Karst.) using imaging spectroscopy. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* **12**(1): 17-26.

Schulz H, Schafer T, Storbeck V, Hartling S, Rudloff R, Kock M, Buscot F. 2012. Effect of raw humus under two adult Scots pine stands on ectomycorrhization, nutritional status, nitrogen uptake, phosphorus uptake and growth of Pinus sylvestris seedlings. *Tree Physiology* **32**(1): 36-48.

Serrano L, Penuelas J, Ustin SL. 2002. Remote sensing of nitrogen and lignin in Mediterranean vegetation from AVIRIS data: Decomposing biochemical from structural signals. *Remote Sensing of Environment* **81**(2-3): 355-364.

Sersen F, Kralova K, Bumbalova A. 1998. Action of mercury on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts. *Photosynthetica* **35**(4): 551-559.

Sharma I. 2012. Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia* **67**(3): 447-453.

Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D,

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**(4): 1102-1110.

Singleton VL 1965. Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdicphosphotungistic acid reagents.In Rossi VA: American Journal of Enolology and Viticulture.

Skidmore AK, Ferwerda JG, Mutanga O, Van Wieren SE, Peel M, Grant RC, Prins HHT, Balcik FB, Venus V. 2010. Forage quality of savannas - Simultaneously mapping foliar protein and polyphenols for trees and grass using hyperspectral imagery. *Remote Sensing of Environment* **114**(1): 64-72.

Smolander A, Kanerva S, Adamczyk B, Kitunen V. 2012. Nitrogen transformations in boreal forest soils-does composition of plant secondary compounds give any explanations? *Plant and Soil* **350**(1-2): 1-26.

Sobrino-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Caceres ML, Escobar C, Del Campo FF, Hernandez LE. 2009. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* **77**(7): 946-954.

Soukupova J, Rock BN, Albrechtova J. 2001. Comparative study of two spruce species in a polluted mountainous region. *New Phytologist* **150**(1): 133-145.

Soukupova J, Rock BN, Albrechtova J. 2002. Spectral characteristics of lignin and soluble phenolics in the near infrared - a comparative study. *International Journal of Remote Sensing* **23**(15): 3039-3055.

Souza VL, de Almeida AAF, Lima SGC, Cascardo JCD, Silva DD, Mangabeira PAO, Gomes FP. 2011. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in Genipa americana L. (Rubiaceae). *Biometals* **24**(1): 59-71.

Stoeva N, Berova M, Zlatev Z. 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum* **49**(2): 293-296.

Suchara I, Sucharova J, Hola M, Reimann C, Boyd R, Filzmoser P, Englmaier P. 2011. The performance of moss, grass, and 1- and 2-year old spruce needles as bioindicators of contamination: A comparative study at the scale of the Czech Republic. *Science of the Total Environment* **409**(11): 2281-2297.

Tausz M, Jimenez MS, Grill D. 1998. Antioxidative defence and photoprotection in pine needles under field conditions. A multivariate approach to evaluate patterns of physiological responses at natural sites. *Physiologia Plantarum* **104**(4): 760-764.

Terashima I, Ono K. 2002. Effects of HgCl2 on CO2 dependence of leaf photosynthesis: Evidence indicating involvement of aquaporins in CO2 diffusion across the plasma membrane. *Plant and Cell Physiology* **43**(1): 70-78.

Thapa G, Sadhukhan A, Panda SK, Sahoo L. 2012. Molecular mechanistic model of plant heavy metal tolerance. *Biometals* **25**(3): 489-505.

Tlustos P, Szakova J, Vyslouzilova M, Pavlikova D, Weger J, Javorska H. 2007. Variation in the uptake of Arsenic, Cadmium, Lead, and Zinc by different species of willows Salix spp. grown in contaminated soils. *Central European Journal of Biology* **2**(2): 254-275.

Urbanova M, Kopecky J, Valaskova V, Sagova-Mareckova M, Elhottova D, Kyselkova M, Moenne-Loccoz Y, Baldrian P. 2011. Development of bacterial community during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. *Fems Microbiology Ecology* **78**(1): 59-69.

Ushio M, Miki T, Kitayama K. 2009. Phenolic Control of Plant Nitrogen Acquisition

through the Inhibition of Soil Microbial Decomposition Processes: A Plant-Microbe Competition Model. *Microbes and Environments* **24**(2): 180-187.

Ustin SL, Gitelson AA, Jacquemoud S, Schaepman M, Asner GP, Gamon JA, Zarco-Tejada P. 2009. Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sensing of Environment* **113**: S67-S77.

Valega M, Lima AIG, Figueira E, Pereira E, Pardal MA, Duarte AC. 2009. Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, Halimione portulacoides (L.) Aellen: Strategies underlying tolerance in environmental exposure. *Chemosphere* **74**(4): 530-536.

Ventrella A, Catucci L, Piletska E, Piletsky S, Agostiano A. 2009. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. *Bioelectrochemistry* **77**(1): 19-25.

Voicu MC, Zwiazek JJ. 2010. Inhibitor studies of leaf lamina hydraulic conductance in trembling aspen (Populus tremuloides Michx.) leaves. *Tree Physiology* **30**(2): 193-204.

Vrchotova N, Triska J, Urban O, Peknic L. 2004. Variability of catechin and 4-hydroxyacetophenone distribution in Norway spruce needles in relation to their position, age, and growing conditions. *Environmental Pollution* **131**(1): 55-59.

Wahsha M, Bini C, Fontana S, Wahsha A, Zilioli D. 2012. Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. *Journal of Geochemical Exploration* **113**: 112-117.

Wang JX, Feng XB, Anderson CWN, Xing Y, Shang LH. 2012. Remediation of mercury contaminated sites - A review. *Journal of Hazardous Materials* **221**: 1-18.

Wang LH, Zhou Q, Huang XH. 2009. Photosynthetic responses to heavy metal terbium stress in horseradish leaves. *Chemosphere* **77**(7): 1019-1025.

Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophyll-a and chlorophhyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutioN. *Journal of Plant Physiology* **144**(3): 307-313.

Yao AJ, Qiu RL, Qing CL, Mu SS, Reardon EJ. 2011. Effects of humus on the environmental activity of mineral-bound Hg: influence on Hg plant uptake. *Journal of Soils and Sediments* **11**(6): 959-967.

Yin YJ, Allen HE, Li YM, Huang CP, Sanders PF. 1996. Adsorption of mercury(II) by soil: Effects of pH, chloride, and organic matter. *Journal of Environmental Quality* **25**(4): 837-844.

Zhang WH, Tyerman SD. 1999. Inhibition of water channels by HgCl2 in intact wheat root cells. *Plant Physiology* **120**(3): 849-857.

Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* **181**(4): 777-794.

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA 2010. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annual Review of Plant Biology, Vol 61*, 535-559.

Zhou ZS, Guo K, Elbaz AA, Yang ZM. 2009. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of Medicago sativa. *Environmental and Experimental Botany* **65**(1): 27-34.