

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Andrea Burešová

Reakce rostlin na toxické spolupůsobení arsenu v kombinaci s kadmiem
Plant responses to combined arsenic and cadmium stress

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D

Konzultant: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D

Praha, 2022

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala mé školitelce RNDr. Petře Maškové, Ph.D za odborné vedení, ochotu a trpělivost, které mi pomohly při psaní této bakalářské práce. Velký dík patří také mé rodině a všem blízkým za jejich podporu.

Prohlášení

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

V Praze, 2.5.2022

.....

Andrea Burešová

Abstrakt

Arsen i kadmium jsou neesenciální, vysoce toxické, karcinogenní prvky, které se v prostředí často vyskytují současně. Vzhledem k časté kontaminaci prostředí oběma prvky je nezbytné zkoumat nejen strategie rostlin pro nakládání s jedním (polo)kovem, ale i mechanismy, které vedou k toleranci či naopak citlivosti v přítomnosti obou prvků. Současná expozice více toxickým prvkům může vést k většímu poškození rostlin, ale může mít také za následek nasazení většího množství a intenzity obranných strategií. Zásadním problémem je kontaminace potravního řetězce skrze plodiny rostoucí na kontaminovaných půdách, což v důsledku představuje riziko pro zdraví lidí i zvířat. Cílem výzkumu v tomto směru je akumulaci a translokaci do nadzemních částí co nejvíce omezit, například pomocí porozumění mechanismům stojícím za akumulací a translokací těžkých kovů, nebo stabilizací toxických prvků v půdě, nebo vyčištěním kontaminované půdy. Jednou z metod čištění půd je fytoremediace, ve které jsou většinou naopak využívány rostliny s vysokou tolerancí vůči toxickým prvkům, nazývané hyperakumulátory. Znalosti o ovlivnění obranných strategií a mechanismů vlivem interakce více prvků jsou důležité pro identifikaci rostlinných druhů schopných aktivovat tyto obranné mechanismy, které mohou být použity pro fytoremediaci na místech znečištěných více prvky zároveň. Cílem této bakalářské práce je shrnout dostupné informace pojednávající o reakcích rostlin na současnou expozici As a Cd, porovnat je s jednotlivou expozicí těmto prvkům a pokud možno nastínit možné mechanismy, stojící za tolerancí či naopak citlivostí studovaných rostlin.

Klíčová slova

Akumulace, Arsen, Detoxifikace, Fytochelatiny, Kadmium, Koexpozice, Oxidativní stres, Těžké kovy, Translokace

Abstract

Arsenic and cadmium are both non-essential, highly toxic and carcinogenic elements that often occur together in the environment. Given the frequent co-contamination of the environment, it is necessary to investigate both plant strategies for dealing with one metal(loid) and the mechanisms that lead to tolerance or, conversely, sensitivity in the presence of both elements. Simultaneous exposure to multiple toxic elements may lead to extensive plant damage, however it may also result in the increasing engagement and intensity of defence strategies. Contamination of the food chain through crops growing on contaminated soils is a major concern, one that poses a risk to both human and animal lives. The aim of this research field is to reduce accumulation and translocation to aboveground edible parts as much as possible, for example by understanding the mechanisms behind heavy metal accumulation and translocation, or by stabilising toxic elements in the soil, or by cleaning up contaminated soil. One method of clean-up is phytoremediation, which usually utilizes plants with high tolerance to toxic elements, called hyperaccumulators. The knowledge of how defence strategies and mechanisms are affected by the interaction of multiple elements is important for identifying plant species capable of activating these defence mechanisms, which can be used for phytoremediation at sites contaminated by multiple elements simultaneously. The aim of this bachelor thesis is to summarize the available information about plant responses to simultaneous exposure to As and Cd, to compare them with single exposure to these elements and, if possible, to outline the mechanisms behind the tolerance or sensitivity of the plants investigated.

Key words

Accumulation, Arsenic, Detoxification, Phytochelatins, Cadmium, Co-exposure, Oxidative stress, Heavy metals, Translocation

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk..... | 1 |
| 1 ÚVOD..... | 2 |
| 2 TĚŽKÉ KOVY..... | 3 |
| 2.1 Strategie rostlin pro nakládání s těžkými kovy..... | 3 |
| 2.2 Toxicita těžkých kovů u rostlin..... | 4 |
| 2.3 Obranné mechanismy rostlin..... | 4 |
| 2.3.1 Fytochelatiny a glutathion..... | 4 |
| 2.3.2 Tvorba ROS a antioxidační mechanismy..... | 5 |
| 3 ARSEN..... | 6 |
| 3.1 Arsen v prostředí..... | 6 |
| 3.2 Příjem arsenu..... | 7 |
| 3.2.1 Způsoby příjmu As ^V | 8 |
| 3.2.2 Způsoby příjmu As ^{III} | 8 |
| 3.3 Translokace arsenu..... | 8 |
| 3.4 Mechanismy toxicity arsenu u rostlin..... | 9 |
| 3.5 Detoxifikace arsenu v rostlinách..... | 10 |
| 4 KADMIUM..... | 10 |
| 4.1 Kadmium v prostředí..... | 11 |
| 4.2 Příjem, akumulace a translokace kadmia..... | 11 |
| 4.3 Mechanismy toxicity kadmia u rostlin..... | 12 |
| 4.4 Detoxifikace kadmia v rostlinách..... | 13 |
| 4.4.1 Chelatace a sekvestrace do vakuol..... | 13 |
| 5 VLIV KOEXPOZICE ARSENU A KADMIA NA ROSTLINY..... | 15 |
| 5.1 Vliv na akumulaci..... | 16 |
| 5.2 Vliv na translokaci..... | 16 |
| 5.2.1 Vliv na translokaci arsenu..... | 16 |
| 5.2.2 Vliv na translokaci kadmia..... | 17 |
| 5.3 Vliv na projevy toxicity..... | 18 |
| 5.3.1 Růst..... | 18 |
| 5.3.2 Cytohistologické změny..... | 20 |
| 5.3.3 Fotosyntéza..... | 21 |
| 5.4 Vliv na detoxifikaci..... | 22 |
| 5.4.1 Fytochelatiny a sekvestrace do vakuol..... | 22 |
| 5.4.2 Vylučování exudátů..... | 23 |
| 5.4.3 Oxidativní stres a antioxidační kapacita..... | 23 |
| 6 ZÁVĚR..... | 24 |
| Literární zdroje..... | 25 |
| Online zdroje..... | 30 |

Seznam zkratek

Arsen a kadmium

As – arsen
Cd – kadmium
As^{III} – arsenitan
As^V – arseničnan
MMA – monomethylarsonous acid
DMA – dimethylarsinous acid
TMAO – trimethylarsine oxide

Organizace

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry
EFSA – European Food Safety Authority
IARC – International Agency for Research on Cancer
WHO – World Health Organization

Transportéry

ABCC – ATP-Binding Cassette subfamily C
ACR3 – Arsenic Compounds Resistance 3
CAX – Ca²⁺ Exchangers
HMA – Heavy Metal ATPases
IRT – železem regulované transportéry
NIP – Nodulin 26-like Intrinsic Protein
NRAMP – Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
Pht – Fosfátový Transportér
YSL – Yellow Stripe Like
ZIP – ZRT a IRT proteiny
ZRT – zinkem regulované transportéry

Detoxifikace

GSH – glutathion
GSSH – oxidovaný glutathion
PC – fytochelatiny
PCS – fytochelatinsyntáza
APX – askorbátperoxidáza
AsA – kyselina askorbová
CAT – kataláza
GPX – glutathionperoxidáza
GR – glutathionreduktáza
HAC1 – High Arsenic Content 1
POD – peroxidáza
SOD – superoxiddismutáza

Ostatní

ATP – adenosintrifosfát
ROS – reaktivní formy kyslíku
RuBisCO – ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza oxygenáza

1 ÚVOD

Kontaminace prostředí těžkými kovy a polokovy, mezi něž patří kadmium a arsen, je velkým problémem současnosti. Arsen a kadmium se do půdy mohou dostávat přirozeně skrze geologické procesy, zásadnější je však kontaminace půdy lidskou činností, například skrze pesticidy, herbicidy či metalurgický průmysl.

Plodiny rostoucí na kontaminovaných půdách mají nižší výnosy a mohou skrze akumulaci toxických prvků představovat značné riziko pro zdraví lidí i zvířat. Ukázkovým příkladem je rýže, která je kritickou složkou jídelníčku pro více než polovinu světové populace, ale je také jednou ze vstupních bran pro arsen a kadmium do potravního řetězce. Podle Evropského úřadu pro potravinovou bezpečnost jsou významným zdrojem arsenu a kadmia v potravě i další obilniny a mimo ně také zelenina, speciálně arsen se v některých oblastech světa vyskytuje ve větším množství i v pitné vodě (EFSA, 2009a; EFSA, 2009b). Porozumění mechanismům detoxifikace a translokace může například umožnit výběr vhodnějších kultivarů zemědělských plodin, což je klíčové nejen pro zajištění dostatečných výnosů při stále se zvětšující poptávce související s nárůstem populace, ale také pro omezení kontaminace potravního řetězce.

Speciální skupinou rostlin jsou hyperakumulátory, které se hojně využívají ve fytoremediaci, což je metoda čištění půd pomocí rostlin. Na stanovištích znečištěných více prvky je třeba počítat s interakcemi těchto prvků. Rostlina, která je vhodná pro fytoremediace arsenu, může v přítomnosti kadmia reagovat odlišně a naopak, proto je zapotřebí zkoumat mechanismy tolerance a toxicity také u hyperakumulujících rostlin.

V mé bakalářské práci nejprve představím obecnou toxicitu těžkých kovů a definuji důležité pojmy. Další kapitoly nastiňují mechanismy toxicity arsenu a kadmia a reakce rostlin při samostatné expozici těmto prvkům. Jádrem celé práce je kapitola *Vliv koexpozice arsenu a kadmia na rostliny*, v níž se snažím shrnout dostupné informace na toto téma a tam, kde je to možné, představit i zapojené mechanismy. V této kapitole jsem se snažila o logickou posloupnost, nejprve tedy popisují vliv koexpozice na *akumulaci* prvků a jejich následnou *translokaci* po rostlině. Když se těžký kov dostane do rostliny, začne se skrze různá poškození projevovat *toxicita*. Aby rostlina této toxicitě zabránila, může aktivovat *detoxifikační mechanismy*, o nichž pojednává závěrečná část kapitoly.

2 TĚŽKÉ KOVY

Termín „těžké kovy“ je v literatuře definován několika způsoby. Jedním z přístupů je definovat těžké kovy na základě hustoty, různí autoři však určují hranici pro těžký kov odlišně (v rozmezí 3,5-7 g/cm³) a nedá se říct, že by panovala obecná shoda. Další možností je definovat těžké kovy podle protonového čísla, ani zde se však autoři neshodnou, která hodnota by měla být hraniční (Duffus, 2002). V biologii je tento termín obvykle využíván ve vztahu ke kovům a polokovům, které jsou spojovány se znečištěním a toxicitou, ale zahrnuje i některé prvky, které jsou v nízkých koncentracích nezbytnými živinami (Gratão et al., 2005). Mezi těžké kovy jsou řazeny např. kadmium (Cd), olovo (Pb), chrom (Cr) či rtuť (Hg), z esenciálních prvků železo (Fe), měď (Cu), kobalt (Co), zinek (Zn) či nikl (Ni) (Küpper et al., 1996; Zhang et al., 2018). Také o arsenu (As) je často referováno jako o těžkém kovu, přesnější by však bylo označení „těžký polokov“, nicméně i v této práci bude někdy zahrnován pod pojmem „těžké kovy“.

2.1 Strategie rostlin pro nakládání s těžkými kovy

Rostliny můžeme podle strategie nakládání s těžkými (polo)kovy rozdělit na tři skupiny. První skupinou jsou indikátory neboli akumulátory, tyto rostliny jsou citlivé a nemají strategii vyhýbání se těžkému kovu. Akumulují rostoucí množství kovu úměrně rostoucím koncentracím v půdě, dokud není toxicita tak velká, že začnou chřadnout a hynou. Druhá skupina je označovaná jako exkludery, tyto rostliny prvek akumulují a následně aktivně odstraňují přebytečné množství kovu ze svých pletiv, což vede ke stabilně nízkým koncentracím v nadzemních částech nehledě na koncentraci v půdě. Poslední skupinou jsou hyperakumulátory, které aktivně akumulují kovy ve svých prýtech a mají účinné mechanismy detoxifikace. (Přehledně v Corpas et al., 2013; Ku and Andresen, 2016.)

Hyperakumulátory jsou významné pro fytoremediace. Aby rostlina byla klasifikována jako hyperakumulátor, musí splňovat následující požadavky, které se liší u rozdílných těžkých kovů. Pro účely této bakalářské práce zde zmíním jen požadavky relevantní pro As a Cd: (1) koncentrace (polo)kovů v nadzemní části jsou pro As > 1000 mg/kg a pro Cd > 100 mg/kg, (2) biokoncentrační faktor (poměr koncentrace kovu v rostlině a půdě) je vyšší než 1,0, (3) translokační faktor (poměr koncentrace kovu v prýtech a kořenech) je vyšší než 1,0 (přehledně v Sun et al., 2008). Nejvýznamnějším hyperakumulátorem As je bezpochyby kapradina *Pteris vittata* (Ma et al., 2001) a další zástupci rodu *Pteris*, například *P. biaurita*, *P. quadriaurita*, *P. ryukyuensis* a *P. cretica* (Srivastava et al., 2006). Mezi hyperakumulátory Cd patří např. *Rorippa globosa* (Sun et al., 2007), lilek černý (*Solanum nigrum*) (Sun et al., 2008b), dvouzubec chlupatý (*Bidens pilosa*) (Sun et al., 2009), penízek modravý (*Noccaea caerulea*) a *Sedum alfredii* (Zhang et al., 2018).

2.2 Toxicita těžkých kovů u rostlin

Toxicita těžkých kovů je ovlivněna mnoha aspekty, jako je koncentrace těžkého kovu v substrátu, úroveň tolerance, půdní a klimatické faktory nebo ontogenetické stadium rostliny (přehledně v Yadav et al., 2021). Toxicita se projevuje na všech úrovních od narušení metabolismu přes strukturální změny až po vnější makroskopické projevy. Častým mechanismem toxicity těžkých kovů je jejich interakce s vazebnými místy enzymů, čímž narušují enzymatické funkce (přehledně v Ku and Andresen, 2016). Těžké kovy jsou také silnými mutageny, přičemž kadmium patří spolu se rtutí podle Liu et al. (1995) mezi nejvíce toxické v tomto ohledu, s mutagenním efektem již při koncentracích 10^{-7} – 10^{-5} M. Mezi neodmyslitelné důsledky těžkých kovů patří i oxidativní stres, stejně jako u mnoha jiných abiotických stresorů (Gratão et al., 2005). Výsledkem popsaných mechanismů může být denaturace proteinů nebo snížení aktivity fotosyntézy a jiných významných metabolických drah. Tento vnitřní typ poškození sice na první pohled nevidíme, nicméně mezi jeho následky patří makroskopické projevy, jako je zpomalení až úplná inhibice růstu, chlorózy či opadávání listů a nižší počet semen či květů, což jsou parametry, které ovlivňují hospodářské výnosy, můžeme je snadno pozorovat a patří mezi hojně zkoumané indikátory toxicity (např. Liu et al., 2007; Hédiji et al., 2015; Sánchez-Pardo et al., 2015; Anjum et al., 2017; Ronzan et al., 2017).

2.3 Obranné mechanismy rostlin

Vzhledem k tomu, že rostliny jsou sesilní organismy a nemohou před stresem utéct, musely si evolučně vyvinout množství mechanismů, prostřednictvím nichž se dokáží stresu bránit. V případě stresu těžkými kovy je možnou strategií snažit se omezit příjem kovu neboli avoidance, nicméně často se stane, že se kov do rostliny dostane. V takovém případě je nutné nasadit detoxifikační mechanismy. Mezi ně patří komplexace těžkých kovů pomocí fytochelatinů a následná sekvestrace těchto komplexů do vakuol (Grill et al., 1985; Ronzan et al., 2017). Dále vylučování těžkého kovu z buňky (exudace) či tvorba mechanických bariér v kořeni, například v podobě lignifikace buněčné stěny, omezující pohyb toxických iontů v apoplastu (Lux et al., 2011). V neposlední řadě je také potřeba vypořádat se s oxidativním stresem pomocí antioxidačních mechanismů (viz podkapitola níže).

2.3.1 Fytochelatiny a glutathion

Fytochelatiny a glutathion jsou schopny vázat těžké kovy a následně je sekvestrovat do vakuol, v nichž jsou skladovány, aby se omezila jejich toxicita v cytosolu. Fytochelatiny (PC) jsou enzymaticky syntetizované peptidy bohaté na cystein. Jejich strukturu tvoří opakování dipeptidu γ -GluCys s koncovou aminokyselinou, kterou je obvykle glycin, ale existují i jiné varianty. Struktura je zapisována jako $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$, přičemž n se obvykle pohybuje mezi čísly 2-11. Podle toho pak rozlišujeme fytochelatiny na PC₂, PC₃ a tak dále. Za vznik PC v buňkách je odpovědný enzym fytochelatinsyntáza (PCS), jehož substrátem je glutathion (GSH) se strukturou $\gamma\text{-GluCysGly}$ (Grill et al., 1985; Cobbett and Goldsbrough, 2002). Glutathion je v rostlinách mimo jiné důležitý jako redoxní pufr v aerobních buňkách a ve své oxidované formě (GSSG) jako substrát glutathionreduktázy (GR),

kteřá hraje roli v odpovědi na oxidativní stres (Gratão et al., 2005). Ku and Andresen (2016) shrnuli, že tvorba PC je nejučinněji indukována Cd a As, ale také Ag, Pb, Cu, Hg, Zn, Sn a Au.

2.3.2 Tvorba ROS a antioxidační mechanismy

Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) v rostlinných buňkách je nevyhnutelná a vzhledem k neustále probíhajícím oxidoredukčním reakcím v různých organelách je přirozenou součástí metabolismu, zejména v souvislosti s na kyslík bohatým prostředím chloroplastu. ROS mají v buňce i signalizační funkci, například H_2O_2 je důležitou signální molekulou pro správný růst a vývoj rostlin a odpověď na abiotické stresy (Niu and Liao, 2016). Abiotické stresy včetně toxicity těžkých kovů tvorbu ROS významně navyšují. Zvýšená produkce ROS nakonec vede k oxidačnímu poškození, které rostliny tlumí pomocí enzymatických a neenzymatických antioxidačních mechanismů (Gratão et al., 2005).

Při redukci O_2 na H_2O může dojít k přenosu jednoho, dvou nebo tří elektronů na O_2 za vzniku superoxidu (O_2^-), peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylového radikálu ($\cdot OH$). O_2^- a H_2O_2 mají ve srovnání s ostatními ROS relativně nízkou reaktivitu. O_2 může také přijmout přebytečnou energii, což vede ke vzniku singletového kyslíku (1O_2), který je ve srovnání s O_2 vysoce reaktivní molekulou (Gratão et al., 2005).

V první linii obrany proti oxidativnímu stresu stojí enzym superoxiddismutáza (SOD), který přeměňuje O_2^- na H_2O_2 . Podle kovových kofaktorů rozlišujeme Cu/Zn-SOD, lokalizovanou v cytosolu, peroxizomech a chloroplastech, Mn-SOD v mitochondriích a peroxisomech a Fe-SOD v chloroplastech (Gratão et al., 2005; Sharma, 2012). H_2O_2 je následně detoxifikováno pomocí askorbátperoxidázy (APX), glutathionperoxidázy (GPX), peroxidázy (POD) či katalázy (CAT). Kataláza degraduje H_2O_2 na H_2O a O_2 a vyskytuje se hlavně v peroxizomech a glyoxisomech, nicméně byla popsána i její přítomnost v mitochondriích (Anjum et al., 2016a). APX degraduje H_2O_2 v askorbát-glutathionovém cyklu v chloroplastech, cytosolu, mitochondriích, apoplastu a peroxisomech (Anjum et al., 2016a). GPX je v buňce lokalizována v cytosolu, chloroplastech, mitochondriích a endoplasmatickém retikulu (Milla et al., 2003). Glutathionreduktáza (GR) redukuje GSSH na GSH, který se dále účastní askorbát-glutathionového cyklu (Gratão et al., 2005). Mezi neenzymatické antioxidanty patří díky schopnosti účinně zhaset ROS například prolin (Shah and Dubey, 1997), sacharidy (Matros et al., 2015), kyselina askorbová (AsA), glutathion, flavonoidy nebo karotenoidy (Gratão et al., 2005). Z neenzymatických antioxidantů si jako příklad blíže popíšeme funkci AsA, což je nejhojnější antioxidant ve stroma chloroplastu, apoplastu, cytosolu a vakuole. Úloha AsA spočívá v přímé redukci superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu a zhasení singletového kyslíku, mimo jiné dokáže i regenerovat membránově vázané karotenoidy prostřednictvím askorbát-glutathionového cyklu (Sharma, 2012).

3 ARSEN

Arsen (As) je neesenciální toxický polokov, o němž je známo, že je nebezpečný pro všechny živé organismy, je karcinogenní už při velmi nízkých koncentracích, a proto je podle IARC (International Agency for Research on Cancer) považován za karcinogen třídy 1 (IARC, 2022). Podle americké organizace ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) byl v roce 2019 zařazen na první místo na seznamu nejvýznamnějších nebezpečných látek (ATSDR, 2020). Odhaduje se, že okolo 140 milionů lidí z 50 zemí světa je vystaveno koncentraci vyšší, než je podle Světové Zdravotnické Organizace bezpečnostní limit pro arsen v pitné vodě (10 µg/l) (WHO, 2022). Kontaminace spodních vod As je nejvýznamnější v zemích s přirozeně zvýšeným obsahem arsenu v půdě, například v Bangladéši, Indii, Číně nebo Vietnamu (Mondal et al., 2022). Jako zásadní problém je vnímána také kontaminace potravního řetězce, mimo jiné skrze rýži, která je kritickou složkou jídelníčku pro více než polovinu světové populace (Kumar et al., 2022). Mezi hlavní nežádoucí účinky, které jsou uváděny v souvislosti s dlouhodobým příjmem anorganického arsenu u lidí, patří kožní léze, rakovina, neurotoxicita, kardiovaskulární onemocnění, abnormální metabolismus glukózy a diabetes. Objevují se také důkazy o negativních dopadech na vývoj plodu a kojenců, zejména o snížené porodní hmotnosti (EFSA, 2009b).

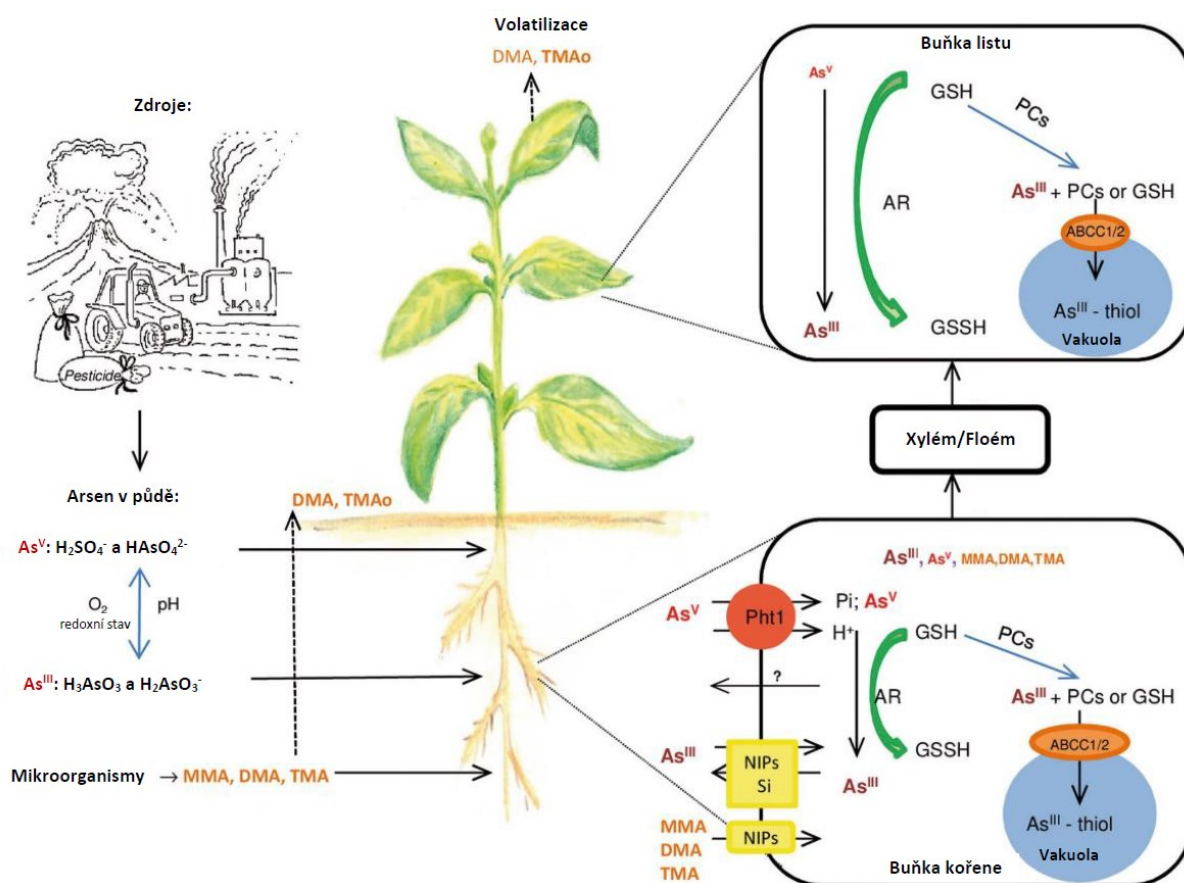
3.1 Arsen v prostředí

Půda je kontaminována As v důsledku lidské činnosti i skrze přirozené procesy. Mezi přirozené procesy patří například zvětrávání hornin a sopečné emise. Z antropogenních zdrojů stojí za zmínku používání arsen-obsahujících herbicidů, insekticidů a pesticidů na zemědělských půdách, spalování fosilních paliv, těžební a metalurgický průmysl, produkce odpadu či výroba polovodičů (přehledně např. v Kofroňová et al., 2018; Kumar et al., 2022)

V půdě se arsen vyskytuje buď v organické nebo anorganické formě, přičemž anorganické formy jsou považovány za toxičtější a v prostředí jsou hojnější (Johnson and Hiltbold, 1969). Z tohoto důvodu se tato bakalářská práce bude soustředit převážně na ně. Anorganické sloučeniny obsahují buď pětimocný (arseničnany) nebo trojmocný (arsenitany) iont arsenu. Jejich zastoupení v půdě závisí mimo jiné na redoxním stavu prostředí – v oxidativním prostředí převažují arseničnany, naopak v redoxním je převaha arsenitanů (Obrázek 1) (přehledně např. v Zhao et al., 2009). Mezi organické sloučeniny arsenu vyskytující se v půdě patří metylované formy (monomethylarsonous acid – MMA, dimethylarsinous acid – DMA, trimethylarsine oxide – TMAO), které v půdě vznikají aktivitou mikroorganismů (přehledně v Kofroňová et al., 2018), dále arsenobetain, arsenocukry a arsenolipidy. Organické formy jsou až na výjimky méně toxické než anorganické formy (Ali et al., 2009).

3.2 Příjem arsenu

Způsoby příjmu kořeny se u jednotlivých forem arsenu liší. Dosud nejsou známy specifické transportéry pro arsen a tento prvek je přijímán skrze transportní dráhy esenciálních prvků. Arsen se v periodické tabulce prvků nachází ve skupině V.A společně s fosforem, sloučeniny obou prvků mají proto analogické chemické vlastnosti. As^V je nejhojnější formou arsenu v půdě a sloučeniny obsahující tento iont jsou schopny využívat společné přenašeče (Pht) s fosforečnany, které umožňují jednosměrný transport (Obrázek 1) (přehledně shrnuje např. Kofroňová et al., 2018; Kumar et al., 2022). As^{III} využívá jiné transportní dráhy, mezi něž patří homology aquaporinů z rodiny NIP a u rýže transportéry Si, které na rozdíl od Pht tvoří systém umožňující obousměrný transport (Obrázek 1) (Ma et al., 2008; Sourı et al., 2017). Vybrané způsoby příjmu různých forem arsenu budou zmíněny v této kapitole, širší přehled způsobů a transportérů transportních drah je shrnutý například v přehledných článcích Kumar et al. (2022) a Mondal et al. (2022).



Obrázek 1 – Formy As v půdě, příjem do rostlin, translokace a detoxifikace v rostlinách

Formy As v půdě závisí na redoxním stavu, pH a přítomnosti bakterií. Arsen se může vyskytovat buď jako As^V , As^{III} nebo v organické formě. As^{III} může vstupovat do kořenových buněk prostřednictvím NIPs a/nebo přenašečů křemíku. As^V vstupuje do buněk prostřednictvím fosfátového transportéru (Pht). As^V se ihned po příjmu většinou redukuje na As^{III} . Enzymatickou reakci zprostředkovává arsenátoreduktáza (AR). As^{III} může být vázán na glutathion nebo fytochelatin a transportován do vakuoly. Translokace As z kořene do prýtu se u jednotlivých druhů rostlin velmi liší. Všechny formy As mohou být transportovány do prýtu. V kořenových i listových buňkách může být As^{III} chelátován a sekvestrován do vakuoly.

Převzato z Kofroňová et al. (2018)

3.2.1 Způsoby příjmu As^V

Mezi fosfátové transportéry, kterými rostliny přijímají As^V, patří transportéry modelového organismu *Arabidopsis thaliana* AtPht1;1, AtPht1;4, AtPht1;5 a AtPht1;7 až 9 (Mondal et al., 2022). Z nich byla u dvojíých knockout mutantů *AtPht1;1* a *AtPht1;4* pozorována vyšší odolnost vůči arsenu v substrátu a snížení růstu vlivem arsenu bylo u mutantů poloviční oproti wt (Shin et al., 2004). AtPht1;5 slouží rostlinám ke správné translokaci fosfátu do nadzemních orgánů, loss of function mutanty *AtPht1;5* měly pozměněnou alokaci fosfátů mezi kořeny a nadzemními částmi, ale disponovaly jen mírnou tolerancí k As^V v substrátu (Nagarajan et al., 2011). Vliv na příjem arsenu mohou mít i transkripční faktory WRKY, regulující expresi *AtPht1;1* u *Arabidopsis thaliana* (Castrillo et al., 2013).

U rýže je As^V přijímán pomocí transportérů OsPht1;1 (Kamiya et al., 2013), OsPht1;4 (Cao et al., 2017) a OsPht1;8 (Wang et al., 2016), které slouží k příjmu a translokaci fosfátu do nadzemních částí a u nichž se knockout mutace projeví snížením příjmu As^V do kořenů a u posledního jmenovaného i sníženou translokací do zrn.

V neposlední řadě je také důležité zmínit hyperakumulátor As *Pteris vittata* a jeho transportéry PvPht1;3 a PvPht1;4. Transportér PvPht1;3 má podle DiTusa et al. (2016) dokonce vyšší afinitu k As^V než k fosfátu. U transgenních rostlin tabáku s vneseným *PvPht1;3* pod konstitutivním 35S CaMV (cauliflower mosaic virus) promotorem bylo pozorováno signifikantní zvýšení akumulace i translokace arsenu do nadzemních částí (Cao et al., 2019). Role transportéru PvPht1;4 se zdá být odlišná, u transgenních rostlin tabáku s vneseným *PvPht1;4* pod konstitutivním 35S CaMV promotorem byla akumulace i translokace arsenu nižší (Sun et al., 2020).

3.2.2 Způsoby příjmu As^{III}

K příjmu sloučenin As^{III} dochází především na zaplavených rýžových polích, kde tato forma vlivem redukčních podmínek převažuje (přehledně v Zhao et al., 2010). Příjem As^{III} probíhá skrze nodulin 26-like intrinsic proteiny (NIPs) (Souri et al., 2017). Toto bylo pozorováno například u *Arabidopsis thaliana* skrze obousměrné transportéry AtNIP1;1, AtNIP1;2 (Kamiya et al., 2009) a AtNIP3;1 (Xu et al., 2015). U rýže byly objeveny As^{III}-transportující transportéry křemíku OsLsi1 (OsNIP2;1), které jsou zodpovědné za import do buněk, a OsLsi2 zodpovědné za export z buněk (Ma et al., 2008).

3.3 Translokace arsenu

Z hlediska výhodnosti translokace můžeme definovat dva směry zájmů – u plodin, které konzumujeme, je žádoucí, aby obsah toxického prvku v nadzemních jedlých částech byl co nejmenší. Na druhou stranu pokud chceme rostliny využít pro remediaci znečištěných půd, je vysoká schopnost translokace vítána. Translokace arsenu do nadzemních částí je u většiny rostlin, s výjimkou hyperakumulátorů, minimální (Zhao et al., 2009). Rostliny mohou translokovat arsen buď xylémovou nebo floémovou cestou (Obrázek 1) (Kofroňová et al., 2018). U rýže byla popsána xylémová translokace As^{III} skrze

transportér OsLsi2, který je pravděpodobně zodpovědný za nakládání As^{III} do xylému. Tím způsobená translokace do prýtu v důsledku vede k akumulaci arsenu do zrn rýže, čímž se toxická látka dostává do potravního řetězce (Ma et al., 2008). Arsen může být translokován i floémem, Duan et al. (2016) navrhli, že by se na tom u *Arabidopsis thaliana* mohly podílet transportéry inositolu AtINT2 a AtINT4. Floémová translokace arsenu je nicméně prozatím stále málo prozkoumaným tématem (Kofroňová et al., 2018).

3.4 Mechanismy toxicity arsenu u rostlin

Vliv toxicity arsenu na rostliny se projevuje na mnoha různých úrovních, od narušení metabolických drah až po makroskopické projevy, jako je menší vzrůst či předčasné opadávání listů. Obě anorganické formy arsenu jsou pro rostliny toxické, ale mechanismus působení je rozdílný, společnou mají například zvýšenou tvorbu ROS, která vede k oxidativnímu poškození (Gratão et al., 2005).

Významným projevem toxicity As je snížení rychlosti fotosyntézy, což souvisí se schopností arsenu vyvolat v rostlině nedostatek železa, jež způsobí mimo jiné i narušení dráhy biosyntézy chlorofylu (přehledně v Mondal et al., 2022). Arsen také podporuje degradaci chlorofylu, což ještě více inhibuje rychlost fotosyntézy (Farnese et al., 2017). Mezi další projevy toxicity patří změna vodivosti průduchů, intercelulární koncentrace CO_2 či rychlosti transpirace (Mondal et al., 2022). Arsen také narušuje metabolismus rostlinných hormonů, což bylo ukázáno například na auxinu u *Oryza sativa* (Ronzan et al., 2019).

Jak již bylo zmíněno výše, As^{V} je chemickým analogem fosforu, právě tato jeho vlastnost je klíčová pro jeho toxicitu. První projev toxicity As^{V} nastává hned při vstupu do buňky, kdy s fosfáty kompetuje o společné transportéry, čímž může způsobit v buňce nedostatek fosfátu. Bylo ukázáno, že rostliny dostatečně zásobené fosfátem mají vyšší toleranci k toxicitě As^{V} a naopak (přehledně shrnuje Finnegan and Chen, 2012). V živočišných buňkách byla popsána schopnost As^{V} interferovat s fosfátovým metabolismem skrze nahrazení fosfátu v ATP za vzniku ADP- As^{V} (Huang and Mitchell, 1972; Gresser, 1981), takto vzniklá molekula dále narušuje metabolismus, může se účastnit například hexokinázové reakce v glykolýze (Gresser, 1981). U rostlin As^{V} také interferuje s fosfátovým metabolismem, narušuje například oxidativní fosforylaci a tím i syntézu ATP (Zhao et al., 2010).

As^{III} je považován za toxicitější oproti As^{V} , jeho toxicita spočívá v afinitě k -SH skupinám, což mu umožňuje vázat se na enzymy obsahující blízko sebe umístěné cysteinové zbytky nebo dithiolové kofaktory, které může inaktivovat (přehledně shrnuje Finnegan and Chen, 2012). Takto může vázat až tři thiolové skupiny, přičemž čím vyšší je počet vazeb, tím jsou komplexy s As^{III} stabilnější (Raab et al., 2005).

3.5 Detoxifikace arsenu v rostlinách

Prvním krokem po vstupu As^{V} do buňky je většinou jeho redukce na As^{III} (Obrázek 1), což je sice toxičtější forma, ale na druhou stranu pro rostliny snadněji detoxifikovatelná. Arsenátreduktáza (AR) zodpovědná za tento proces byla identifikována u *A. thaliana* a pojmenována HAC1 (High Arsenic Content1) (Chao et al., 2014). Arsenátreduktázová aktivita byla objevena i u dalších enzymů v jiných rostlinných druzích, jejichž přehled je shrnutý v přehledném článku Mondal et al. (2022). Po redukcí je As^{III} díky výše popsané afinitě k thiolovým (-SH) skupinám vyvazován proteiny bohatými na tyto funkční skupiny, mezi něž patří fytochelatiny (PC) a glutathion (GSH), a tvoří komplexy (přehledně např. v Kofroňová et al., 2018; Kumar et al., 2022). Vzhledem k vyšší stabilitě při vazbě tří -SH skupin je preferována tvorba komplexů s PC3 oproti PC2 nebo glutathionu (Raab et al., 2005). Poté dochází k sekvestraci komplexů do vakuoly skrze transportéry ABCC (ATP-Binding Cassette subfamily C) na vakuolární membráně (Obrázek 1), konkrétně byly popsány AtABCC1 a AtABCC2 u *A. thaliana* (Song et al., 2010) a OsABCC1 u rýže (Song et al., 2014). Sekvestrace do vakuol v kořenových buňkách zabraňuje translokaci a je tedy jedním z klíčových faktorů, které rozhodují o množství arsenu v nadzemních částech rostlin (Song et al., 2014). U As-hyperakumulátoru *Pteris vittata* byl popsán ještě transportér PvACR3 z rodiny ACR3 (Arsenic Compounds Resistance 3), který do vakuoly transportuje volný As^{III} (Indriolo et al., 2010). Arsen v buňkách také indukuje oxidativní stres, na který rostliny musí reagovat. Tato reakce se liší v závislosti na rostlinném druhu, orgánu či míře stresu. V rostlinách vystavených As byla pozorována přítomnost všech důležitých enzymatických i neenzymatických antioxidantů zmiňovaných v kapitole 2.3.2 (Sharma, 2012).

4 KADMIUM

Kadmium (Cd) je těžký kov, všeobecně vnímaný jako toxický pro všechny živočichy a rostliny. Koncentrace kadmia v městské půdě na většině míst světa nepřesahují 5 mg/kg a ve vodním prostředí se pohybují v nízkých (nanomolárních) koncentracích (Ku and Andresen, 2016). Nicméně i v nízkých koncentracích se jedná o vysoce nebezpečnou látku. Momentálně je kadmium podle ATSDR klasifikováno jako 7. nejvýznamnější nebezpečná látka (ATSDR, 2020). Co se týče karcinogenity kadmia, je stejně jako arsen klasifikováno Mezinárodní Agenturou pro Výzkum Rakoviny (IARC) jako karcinogen třídy 1 (IARC, 2022). Limit přípustného týdenního příjmu kadmia pro člověka byl v roce 2009 stanoven na 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti, přičemž průměrný dospělý Evropan se této hodnotě blíží nebo ji mírně překračuje a podskupiny, jako jsou například děti, vegetariáni a kuřáci, tuto hodnotu překračují přibližně dvojnásobně (EFSA, 2009a). Absorpce kadmia z potravy se u člověka pohybuje v jednotkách procent, velké nebezpečí představuje chronická expozice, jelikož kadmium má biologický poločas rozpadu v rozmezí 10 až 30 let a v lidském těle se účinně zadržuje v játrech a ledvinách, u nichž může způsobit poruchu funkce až selhání. Kadmium může také způsobit demineralizaci kostí, a to buď přímým poškozením kostí nebo nepřímo v důsledku poruchy funkce ledvin (EFSA, 2009a).

4.1 Kadmium v prostředí

Kadmium se v přírodě může nacházet v minerálech například se zinkem (Sanità di Toppi and Gabrielli, 1999). V naprosté většině se vyskytuje jako dvojmocná forma Cd^{2+} . V nízkém pH byla pozorována přítomnost volných Cd^{2+} iontů, při pH 6-7 kadmium existuje v jiných formách, například ve sloučeninách s uhličitany (přehledně v Ismael et al., 2019). Tento těžký kov je široce rozšířen v půdě, vodě i atmosféře. V prostředí se vyskytuje přirozeně v důsledku sopečné činnosti či zvětrávání hornin, lidskými vlivy se dostává do prostředí například z topných systémů, metalurgického průmyslu, spaloven odpadů, cementáren nebo jako kontaminant ve fosfátových hnojivech (přehledně např. v Gallego et al., 2012).

4.2 Příjem, akumulace a translokace kadmia

Kadmium má pro vstup do rostlin obdobnou strategii jako arsen, kdy využívá transportní dráhy esenciálních prvků (především Zn, Fe, Ca), se kterými kompetuje o vazebná místa transportérů a díky své vysoké mobilitě je snadno přijímáno (přehledně v Hasan et al., 2009). Tento proces zahrnuje nemalé množství transportních drah.

Biologická dostupnost kadmia pro rostliny se zvyšuje při nízkém pH. Prvním krokem příjmu kadmia je jeho hromadění v apoplastu, tento proces je pasivní a zahrnuje elektrostatické interakce mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami a kationty Cd^{2+} (přehledně shrnuje Ismael et al., 2019). Dalším krokem je transport skrze plazmatickou membránu do buněk. K tomu je využíváno množství transportních drah, mezi něž patří transportéry z rodin ZIP, pojmenované podle sekvenční podobnosti se **Z**RT (zinkem regulované transportéry) a **I**RT (železem regulované transportéry) **p**roteiny. Dále NRAMP (natural resistance-associated macrophage protein), YSL (yellow stripe-like), které transportují kadmium v chelátech, a v neposlední řadě i kationtové kanály HACC (hyperpolarization-activated calcium channels), DACC (depolarization-activated calcium channels) a VICC (voltage-insensitive cation channels) (přehledně shrnují Ismael et al., 2019; Haider et al., 2021).

Prvně zmiňovanou rodinou jsou transportéry ZIP, což jsou proteiny, které umí přenášet těžké kovy z extracelulárního prostoru a z lumen organel do cytoplazmy (Ismael et al., 2019). Z konkrétních zástupců byl u *Arabidopsis thaliana* identifikován AtIRT1, transportér železa, který je zodpovědný za příjem těžkých kovů včetně Cd (Vert et al., 2002). U rýže se jedná o transportéry OsIRT1 a OsIRT2, přičemž OsIRT1 má vyšší afinitu ke kadmiu než OsIRT2 a je pravděpodobně odpovědný nejen za příjem, ale také za translokaci kadmia do prýtu (Nakanishi et al., 2006). Z této rodiny zprostředkovává příjem kadmia ještě transportér OsZIP1 (Ramesh et al., 2003).

Další transportéry jsou z rodiny YSL (Yellow Stripe-Like), tyto transportéry hrají roli v příjmu chelatizovaného kadmia (Curie et al., 2009). Rostliny mohou vylučovat látky, které komplexují kovy včetně Cd a pomocí YSL je následně přijímají. YSL mohou sloužit i pro vyloučení komplexovaného kadmia z buňky, čímž se účastní nakládání kadmia do xylému (přehledně v Ismael et al., 2019).

Z konkrétních transportérů a komplexů, které transportují Cd do buňky, zmíním například ZmYS1 u kukuřice seté (*Zea mays*), který v malé míře transportuje i komplexy Cd-fytosideroforů (Schaaf et al., 2004). Další transportér je SnYSL3, který podle Feng et al. (2017) u Cd-hyperakumulátoru *Solanum nigrum* pravděpodobně při nadbytku kadmia transportuje komplexy Cd-nikotinaminů.

Na nakládání kadmia do xylému se kromě YSL mohou účastnit také zinkové transportéry z rodiny HMA (Heavy Metal ATPases), konkrétně HMA2 a HMA4 (Wong and Cobbett, 2009), o této rodině bude blíže pojednáno v kapitole o detoxifikaci kadmia, jelikož transportéry z této rodiny se účastní také transportu kadmia do vakuol.

4.3 Mechanismy toxicity kadmia u rostlin

Jak již bylo popisováno u arsenu, i toxicita kadmia se projevuje na mnoha úrovních, od subcelulární úrovně zahrnující narušení metabolických drah až po okem viditelné projevy. Vzhledem k velkému množství mechanismů toxicity kadmia budou v této kapitole popsány jen vybrané, širší přehled shrnuje například Sanità di Toppi and Gabbrielli (1999).

Toxicita kadmia je v mnoha případech spojena s jeho vysokou afinitou k záporně nabitým funkčním skupinám makromolekul. To se projevuje už při kompetici o transportní dráhy, což může mít za následek nedostatek esenciálních živin, jako jsou Fe, Zn, Mg, Cu, Mn a další (Ku and Andresen, 2016). Vysoká afinita Cd^{2+} k thiolovým funkčním skupinám (-SH) proteinů vede k nefunkční vazbě kadmia na ligandy jiných dvojmocných iontů kovů a způsobuje tím inhibici enzymů (Zulfıqar et al., 2022), nejvíce náchylné jsou k tomuto molekuly obsahující vazebná místa pro Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} a Fe^{2+} (Moulis, 2010). Konkrétním příkladem inhibice enzymu může být narušení hydrolýzy RNA vlivem inhibice ribonukleázové aktivity u rýže (Shah and Dubey, 1997). U zástupců čeledi bobovité (Fabaceae) bylo pozorováno snížení aktivity nitrogenázy, klíčového enzymu pro fixaci vzdušného N_2 (Wahid et al., 2007; Hasan et al., 2008). Kadmium také může inhibovat enzymy pro opravu DNA, čímž nepřímo zvyšuje míru poškození DNA a působí tedy jako mutagen (Jin et al., 2003).

Kadmium narušuje u rostlin i metabolické dráhy včetně fotosyntézy. Klíčovým mechanismem je nahrazení centrálního atomu Mg^{2+} v chlorofylu, což fotosyntézu znemožňuje (Küpper et al., 1996). Takto vzniklý chlorofyl se označuje [Cd]-Chl, má krátkou životnost a je nestabilní, takže velmi rychle disipuje většinu absorbované excitační energie ve formě tepla a neúčastní se přenosu elektronu v transportním řetězci (přehledně shrnuje Ku and Andresen, 2016). Další možností narušení fotosyntézy je například nahrazení Mg^{2+} v katalytickém centru enzymu RuBisCO (Ku and Andresen, 2016).

V neposlední řadě je kadmium také příčinou zvýšené tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS), která vede k oxidativnímu stresu. Cd přispívá k oxidativnímu stresu nejen tvorbou ROS, ale vzhledem ke své vysoké afinitě ke karboxylovým (-COOH) a thiolovým (-SH) funkčním skupinám proteinů, včetně antioxidantních enzymů, může zároveň sabotovat obranné antioxidantní mechanismy (Zulfiqar et al., 2022).

Výše popsané mechanismy se posléze manifestují na makroskopické úrovni, což zahrnuje například zpomalení až úplnou inhibici růstu rostliny (přehledně například v Hasan et al., 2009), tento efekt bude hojně diskutován v kapitole 5 o interakci As a Cd. U řady rostlinných druhů, včetně rýže, pšenice či kukuřice, byl také popsán inhibiční vliv kadmia na klíčení rostlin a vitalitu semenáčků (přehledně shrnuje Zulfiqar et al., 2022).

4.4 Detoxifikace kadmia v rostlinách

Rostliny mají několik způsobů, jak se vypořádat s toxicitou kadmia, možnou obranou je omezit příjem toxického kovu. Toho lze u kadmia v některých případech docílit dostatečným zásobením esenciálními živinami, což je možné díky výše popsané kompetici o vazebná místa (Nazar et al., 2012). Téma detoxifikace kadmia v rostlinných buňkách je v literatuře rozsáhle studováno a obsahem přesahuje možnosti této bakalářské práce, proto se zbytek této kapitoly bude zaměřovat primárně na chelataci a sekvestraci kadmia do vakuoly, jakožto pravděpodobně nejvýznamnějšího mechanismu detoxifikace kadmia. Širší přehled je k nalezení například v přehledných člancích Zhang et al. (2018) a Ismael et al. (2019).

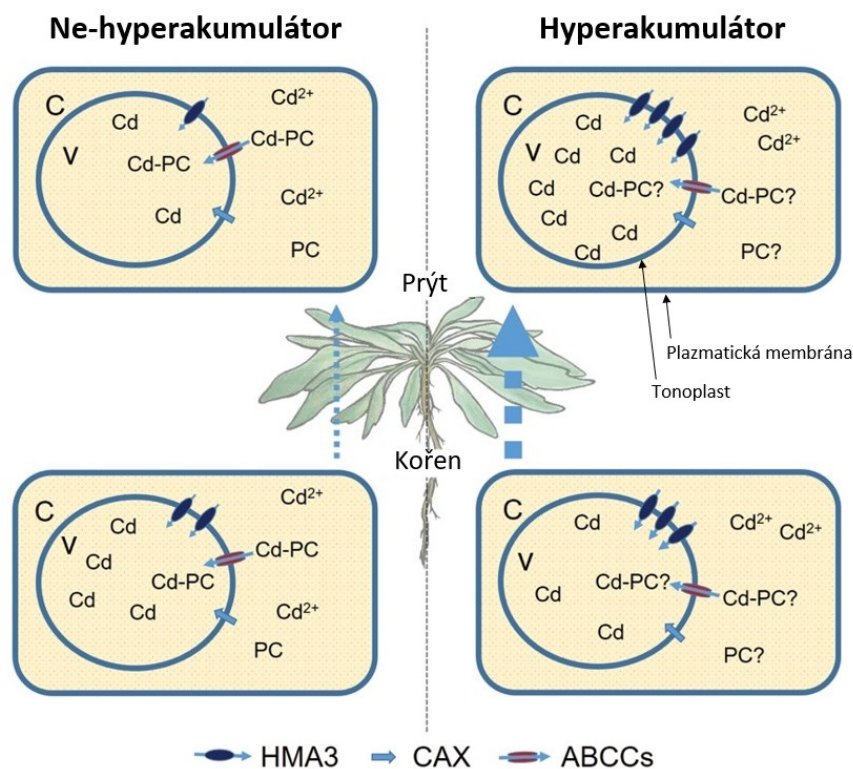
4.4.1 Chelatace a sekvestrace do vakuol

Kadmium přijaté do buňky je detoxifikováno sekvestrací do vakuol, čímž je docíleno ochrany cytosolu před jeho škodlivými účinky. K sekvestraci je využíváno spektrum transportérů lokalizovaných v tonoplastu, mezi něž patří transportéry z rodiny ABCC, které přenášejí komplexy PC-Cd. Byly identifikovány u *Arabidopsis thaliana* a jsou to konkrétně AtABCC1, AtABCC2 (Park et al., 2012) a AtABCC3 (Brunetti et al., 2015). První dva zmíněné jsou schopny přenášet i komplexy PC-As (Song et al., 2010), jak bylo popsáno v kapitole o detoxifikaci arsenu. Další transportéry nepřenášejí komplexy PC-Cd, ale samotné kadmiové ionty, a patří sem importní transportéry HMA3 z rodiny HMA (Heavy Metal ATPases), rodina CAX (Ca^{2+} exchangers) a exportní NRAMP, které slouží nejen k sekvestraci do vakuol, ale i k transportu do buněk přes plazmatickou membránu (přehledně shrnuje Zhang et al., 2018).

Povaha detoxifikace se liší v závislosti na tom, zda rostlina je či není hyperakumulátor Cd. U hyperakumulátorů je popisována zvýšená exprese HMA3 oproti nehyperakumulátorům, což se zdá být jedním z klíčových faktorů pro toleranci rostlin vůči toxicitě kadmia (přehledně např. v Ismael et al., 2019). Transportéry HMA3 zprostředkovávají sekvestraci do vakuol nejen pro kadmium, ale také pro zinek, olovo nebo kobalt (Zhang et al., 2018). Do této rodiny patří například transportéry NcHMA3 u *Noccaea caerulea* (Ueno et al., 2011) či SaHMA3 u *Sedum alfredii* (Zhang et al., 2016).

HMA3 se vyskytují i u nehyperakumulujících rostlin, ovšem ve značně nižší míře než u hyperakumulátorů, jsou to například AtHMA3 u *A. thaliana* (Chao et al., 2012) nebo OsHMA3 u *Oryza sativa* (Ueno et al., 2010).

Na kadmium citlivé rostliny mají tendenci kadmium spíše komplexovat s fytochelatiny a následně ho sekvestrovat do vakuol již v kořenových buňkách. Toto bylo pozorováno například v kořenech ječmene, kde komplexy PC-Cd tvořily značnou část celkového obsahu kadmia (Persson et al., 2006). Naproti tomu hyperakumulátory kadmium spíše translokují do nadzemních částí a sekvestraci do vakuol provádí až v listu (Zhang et al., 2018). Mezi klíčové faktory účinné detoxifikace patří již zmíněná zvýšená exprese *HMA3* či efektivní translokace Cd do nadzemních částí, což vyžaduje mimo jiné efektivní mechanismus nakládání kadmia do xylému (Ismael et al., 2019).



Obrázek 2 – Vakuolární transportéry HMA3, CAX a ABCC účastní se sekvestrace Cd do vakuoly.

Zvýšená sekvestrace Cd do vakuol v kořenech u nehyperakumulujících druhů rostlin omezuje přenos Cd z kořenů do prýtu (tenká šipka). U hyperakumulátorů je většina Cd transportována do prýtu (tlustá šipka) a sekvestrována do vakuol listových buněk, zvýšená exprese HMA3 hraje u těchto rostlin klíčovou roli v sekvestraci Cd. (V – vakuola; C – cytosol)

Převzato z Zhang et al. (2018)

5 VLIV KOEXPOZICE ARSENU A KADMIA NA ROSTLINY

Mechanismy popsané v předchozích kapitolách se při koexpozici oběma prvky mohou zásadně lišit vzhledem k možným interakcím mezi prvky. Porozumění reakcím rostlin na koexpozici oběma prvky je klíčové vzhledem k jejich častému společnému výskytu v prostředí. Interakce obou těžkých kovů může probíhat na několika úrovních. Patří sem kompetice o vazebná místa na půdních částicích ovlivňující jejich biologickou dostupnost, kompetice o vazebná místa transportních drah ovlivňující příjem či transport těžkého kovu po rostlině a významnou roli mohou hrát také kompetice o vazbu na metaloenzymy a jiné proteiny či peptidy, například fytochelatiny (přehledně shrnuje Sneller et al., 2000). Tabulka níže obsahuje přehled důležitých informací k výzkumům citovaným v této kapitole a slouží pro lepší orientaci a možnost porovnat zejména použité koncentrace mezi jednotlivými výzkumy.

| Literární zdroj | Rostlinný druh | Forma As | Forma Cd | Koncentrace As | Koncentrace Cd | Koncentrace As+Cd | A/H/P |
|----------------------------|---------------------------|--|--|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| Sun et al., 2009 | <i>Bidens pilosa</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdCl ₂ ·2.5H ₂ O | 0, 25, 50, 125 mg/kg | 0, 5, 10, 25 mg/kg | kombinace všech možností | P |
| Sánchez-Pardo et al., 2015 | <i>Cynara cardunculus</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdSO ₄ | 0, 5, 10, 20, 40 a 80 μM | 5 μM | Cd 5 + As všechny | H |
| Zanella et al., 2016 | <i>Nicotiana tabacum</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdSO ₄ | 50 μM, 200 μM | 60 μM | As 50 + Cd 60 | A |
| Sun et al., 2008a | <i>Oryza sativa</i> | As ^V - Na ₃ AsO ₄ ·12H ₂ O | CdCl ₂ ·2.5H ₂ O | 60 mg/kg | 5 mg/kg | As 60 + Cd 5 | P |
| Abid et al., 2019 | <i>Pteris vittata</i> | As ^V - Na ₃ AsO ₄ | CdCl ₂ | 50 μM | 50 μM | As 50 + Cd 50 | H |
| Drava et al., 2012 | <i>Pteris vittata</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdSO ₄ | 0, 667, 1.335 μM | 0, 133, 267 μM | kombinace všech možností | H |
| Ronzan et al., 2017 | <i>Pteris vittata</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdSO ₄ | 100 μM | 60 μM | As 100 + Cd 60 | H |
| Xiao et al., 2008 | <i>Pteris vittata</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdCl ₂ | 400 mg/kg | 0, 10, 20, 60, 80 mg/kg | As 400 + všechny Cd | P |
| Sun et al., 2007 | <i>Rorippa globosa</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdCl ₂ ·2.5H ₂ O | 50, 250 mg/kg | 10, 25, 50 mg/kg | kombinace všech možností | P |
| Sneller et al., 2000 | <i>Silene vulgaris</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ | CdSO ₄ | 2,5; 5; 10; 20; 40 μM | 0,25; 0,5; 5; 20; 50 μM | Cd 0,25 + As 2,5; 5 | H |
| | | | | | | Cd 0,5 + As všechny | |
| | | | | | | Cd 5 + As 5; 10; 20; 40 | |
| | | | | | | Cd 20 + As 5; 20 | |
| Sun et al., 2008b | <i>Solanum nigrum</i> | As ^V - Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O | CdCl ₂ ·2.5H ₂ O | 0, 50, 250 mg/kg | 10, 25, 50 mg/kg | kombinace všech možností | P |
| | | | | | | Cd 50 + As 10; 20 | |
| Ghiani et al., 2014 | <i>Trifolium repens</i> | As ^{III} - NaAsO ₂ | CdSO ₄ | 5, 10 a 20 mg/kg | 20, 40 a 60 mg/kg | Cd 20 + As 5, 10, 20 | P |
| | | | | | | Cd 40 + As 5, 10, 20 | |
| | | | | | | Cd 60 + As 5, 10, 20 | |
| Liu et al., 2007 | <i>Triticum aestivum</i> | As ^V - Na ₃ AsO ₄ ·12H ₂ O | CdCl ₂ ·2.5H ₂ O | 0, 1, 2, 4, 8 mg/l | 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/l | kombinace všech možností | H |
| Anjum et al., 2016 | <i>Zea mays</i> | As ^{III} - NaAsO ₂ | CdCl ₂ | 200 μM | 100 μM | As 200 + Cd 100 | P |
| Anjum et al., 2017 | <i>Zea mays</i> | As ^{III} - NaAsO ₂ | CdCl ₂ | 200 μM | 100 μM | As 200 + Cd 100 | P |

Tabulka 1 – Přehled literárních zdrojů

Tabulka obsahuje přehled zkoumaných rostlin, forem As a Cd a použitých koncentrací. Sloupec A/H/P obsahuje informaci, zda byly experimenty prováděny na agaru (A), v hydroponii (H) nebo v pevném substrátu (P). Seřazeno podle rostlinných druhů podle abecedy.

5.1 Vliv na akumulaci

Interakce obou prvků (např. konkurence o vazebná místa na půdních částicích ovlivňující biologickou dostupnost) může zásadně ovlivnit akumulaci (Sneller et al., 2000). Pro akumulaci arsenu i kadmia je zásadní jejich biologická dostupnost v substrátu. V některých výzkumech byla při koexpozici oběma prvkům pozorována relativně vyšší akumulace As oproti Cd, což naznačuje možnost, že biologická dostupnost As se zvýšila a Cd naopak snížila. Toto bylo pozorováno například u *Rorippa globosa* (Sun et al., 2007), *Trifolium repens* (Ghiani et al., 2014), *Cynara cardunculus* (Sánchez-Pardo et al., 2015), *Pteris vittata* (Xiao et al., 2008; Ronzan et al., 2017; Abid et al., 2019) a částečně i na *Triticum aestivum*, kde přítomnost As snížila akumulaci Cd semenáčky, ale Cd výrazně neovlivnilo akumulaci As (Liu et al., 2007). V kontrastu s tímto stanoviskem jsou výzkumy na rýži (*Oryza sativa*) a tabáku (*Nicotiana tabacum*). U rýže byly při současné expozici As + Cd naměřené hodnoty obou prvků v kořenech i nadzemních částech signifikantně nižší oproti samostatným ošetřením. Z toho lze usuzovat, že koexpozice vedla ke snížené akumulaci obou prvků (Sun et al., 2008a). Tyto výsledky lze považovat za vcelku příznivé, vzhledem k tomu, že rýže je důležitá potravina. Ve druhém výzkumu, který byl proveden na tabáku, byla v přítomnosti obou prvků akumulace As v kořenech snížena a naopak Cd bylo akumulováno více oproti samostatné expozici (Zanella et al., 2016). Došlo tedy k opačnému jevu než u výzkumů uvedených výše. Zvýšení akumulace Cd vlivem arsenu bylo pozorováno i u Cd hyperakumulátoru *Solanum nigrum* (Sun et al., 2008b). Rozdílné výsledky mohou být způsobeny jednak interakcí obou prvků v médiu/substrátu, jednak interakcí přímo v rostlině. Působení obou prvků může v rostlině vyvolat silnější obranné mechanismy, což umožní přijmout větší množství prvků, toto popisuje např. Ronzan et al. (2017) u *Pteris vittata*. Vzhledem k odlišným transportním drahám pro As a Cd je nepravděpodobná interakce As s Cd transportéry a naopak, nicméně ani tuto možnost nelze vyloučit, protože neznáme všechny mechanismy, které by se v takové interakci mohly účastnit.

5.2 Vliv na translokaci

5.2.1 Vliv na translokaci arsenu

Co se týče plodin, je žádoucí, aby translokace do nadzemních částí byla co nejnižší. U sazenic rýže byla pozorována při samostatném i současném ošetření nízká míra translokace arsenu, i tak ale byla jeho translokace při koexpozici s kadmíem signifikantně snížena oproti samostatnému ošetření (Sun et al., 2008a). Stojí za zmínku, že v této studii bylo použito pouze malé množství kadmia (5 mg/kg).

Výzkum na arsen-tolerantním artyčoku (*Cynara cardunculus*), což je rostlina uvažovaná jako potenciálně vhodná pro fytořemediaci půd znečištěných As a Cd (Leonardi et al., 2016; Leonardi et al., 2021), ukázal na vyšší translokaci arsenu do nadzemních částí při koexpozici arsenu a kadmíu, přičemž bylo použito široké spektrum koncentrací arsenu společně s nízkou koncentrací kadmia v médiu (Sánchez-Pardo et al., 2015). Autoři navrhují vysvětlení, že Cd poškodilo v kořenech specifická vazebná místa pro As a v důsledku toho vyvolalo vyšší translokaci As do prýtu.

Z hlediska fytořemediace je další významnou rostlinou hyperakumulátor As *Pteris vittata*, což se odráží ve větším počtu výzkumů prováděných na této rostlině. Zajímavé je, že tyto výzkumy přináší rozdílné výsledky. Zvýšenou akumulaci i translokaci arsenu při současné expozici As + Cd pozorovali Xiao et al. (2008), ovšem pouze při nižších koncentracích kadmia, přičemž při vystavení vyšším koncentracím kadmia nastal pokles translokace. Snížení translokace arsenu při koexpozici oběma prvky v porovnání se samostatným ošetřením arsenem pozorovali i Ronzan et al. (2017), v jejichž experimentu byla také použita relativně vysoká koncentrace kadmia (viz Tabulka 1). Autoři navrhuji, že nižší translokace As mohla být způsobena zvýšenou hladinou fytochelatinů v kořeni (podrobněji v kapitolách 3.5 a 5.5.1), která prostřednictvím komplexace As a pravděpodobně i sekvestrací do vakuol kořenových buněk zabránila translokaci do listů. V kontrastu s výše popsány výzkumy na *Pteris vittata* jsou výsledky od Abid et al. (2019), kde výzkumníci nepozorovali při koexpozici pokles akumulace arsenu do kořenů ani translokaci do listů. Autoři však nediskutují možné mechanismy, které by za tím mohly stát. Vysvětlení rozkolu ve výsledcích lze hledat v rozdílných použitých koncentracích. Výzkumy Abid et al. (2019) a Ronzan et al. (2017) byly oba prováděny v hydroponii, proto jsou lépe porovnatelné. Ronzan et al. (2017) použili dvakrát vyšší koncentraci As než Abid et al. (2019), proto je možné, že toxicita u druhé jmenované studie nebyla tak vysoká, aby vyvolala výše zmiňovanou zvýšenou hladinu fytochelatinů v kořenech, a As mohl být nadále translokován. Na základě zmíněných informací se zdá, že nízké koncentrace kadmia u kapradiny podporují translokaci arsenu, zatímco vyšší koncentrace ji budou spíše inhibovat. Z hlediska fytořemediačního potenciálu je to zřejmě příznivá zpráva, jelikož koncentrace kadmia na většině míst světa nepřesahují hodnotu 5 mg/kg (Ku and Andresen, 2016), takže inhibice translokace vysokými koncentracemi by neměla být překážkou. Je však důležité mít na paměti, že i jiné faktory mohou mít na translokaci vliv a použité koncentrace tedy nutně nemusí být jedinou příčinou odlišných výsledků. Důležitou roli budou nepochybně hrát také zkoumané rostlinné druhy, dále například trvání experimentu a v neposlední řadě to, zda výzkumníci zvolili pěstování v hydroponii či v pevném substrátu.

5.2.2 Vliv na translokaci kadmia

Co se týče plodin, je k dispozici opět studie na rýži od Sun et al. (2008a), v níž bylo pozorováno snížení translokace kadmia do nadzemních částí při koexpozici oběma prvky, důležité je však zmínit, že rýže translokovala velmi nízké koncentrace kadmia i při samotném ošetření, což kopíruje situaci u translokace arsenu.

U artyčoku se translokace Cd do nadzemních částí při koexpozici oběma prvky snižovala s rostoucí dávkou As v médiu (Sánchez-Pardo et al., 2015), což lze považovat za přesvědčivý důkaz inhibice translokace kadmia vlivem arsenu u této rostliny. Zmíněný trend byl pozorován i u hyperakumulátorů Cd *Solanum nigrum* (Sun et al., 2008b) a *Bidens pilosa* (Sun et al., 2009), kde u téměř všech použitých koncentrací kadmia došlo při přidání arsenu do substrátu ke snížení translokace, přičemž čím vyšší byla koncentrace arsenu, tím nižší byla translokace kadmia do nadzemních částí. Jedinou výjimkou z tohoto

pozorování byla kombinace koncentrací 10 mg/kg Cd + 50 mg/kg As, která u *Solanum nigrum* měla za následek podpoření translokace kadmia do nadzemních částí oproti rostlinám vystaveným pouze 10 mg/kg Cd (Sun et al., 2008b).

U výzkumů na *Pteris vittata* je situace opět složitější. Abid et al. (2019) při koexpozici uvádí sníženou translokaci kadmia do listů oproti jednoduché expozici, arsen tedy translokaci inhiboval. Naopak Ronzan et al. (2017) pozorovali signifikantní zvýšení translokace kadmia vlivem arsenu, ačkoliv v samostatném i kombinovaném ošetření byla míra translokace Cd velmi nízká. Zaměření tohoto výzkumu bylo spíše na vliv Cd na toleranci rostlin k As, zřejmě i proto autoři zvýšenou translokaci Cd šíře nediskutují. Je možné, že stejně jako u arsenu zde bude nějaká souvislost s fytochelatiny, nicméně autoři nezkoumali komplexy PC-Cd, ale pouze PC-As, o jejich vlivu lze tedy v tomto případě pouze spekulovat. Nejmarkantnějším rozdílem mezi těmito dvěma výzkumy je koncentrace použitých prvků a jejich poměry (Tabulka 1), a to hlavně koncentrace arsenu, která byla ve studii Ronzan et al. (2017) dvojnásobná oproti druhé studii.

5.3 Vliv na projevy toxicity

5.3.1 Růst

Inhibice růstu je často výsledkem vnitřních procesů, které nejsou tak snadno vidět. Proto je právě růst významným indikátorem toxicity zkoumaných látek. Pokud rostliny vystavíme více toxickým prvkům zároveň, dalo by se předpokládat, že toxický efekt na růst bude znásobený. To ale nemusí nastat vždycky, jelikož jeden z prvků může toxický efekt toho druhého zmírnit (mitigovat).

Pro lidstvo velmi důležitou rostlinnou čeledí jsou lipnicovité, do kterých patří významné obilniny. Tyto druhy navíc často patří mezi citlivé na toxicitu těžkých kovů. U pšenice seté (Liu et al., 2007), rýže seté (Sun et al., 2008a) a kukuřice seté (Anjum et al., 2017) byla pozorována inhibice růstu při expozici As + Cd. U semenáčků pšenice seté v hydroponickém médiu docházelo se vzrůstající koncentrací arsenu i kadmia v médiu ke stále vyšší inhibici klíčení semen a růstu semenáčků, přičemž kadmium mělo výraznější vliv než arsen. Autoři zmiňují, že koexpozice měla na inhibici klíčení semen aditivní účinek, tedy inhibice byla vyšší než při jednotlivém ošetření. Naproti tomu ohledně přírůstku biomasy a prodlužování kořenů na sebe jednotlivé prvky působily antagonisticky (Liu et al., 2007). U rýže seté byly některé výsledky podobné, samostatné expozice arsenu i kadmiu měly za důsledek inhibici růstu, přičemž efekt kadmia byl opět silnější než efekt arsenu. Při koexpozici oběma prvky byl arsen schopen mitigovat toxický efekt kadmia na růst nadzemních částí (Sun et al., 2008a), což pravděpodobně souvisí s výše zmiňovanou sníženou translokací obou prvků při koexpozici. Silnější efekt kadmia oproti arsenu při jednotlivých expozicích byl pozorován také u kukuřice seté, koexpozice oběma prvkům vedla k silnější inhibici růstu než jednotlivé expozice, tato inhibice zahrnovala například úbytek biomasy, nižší průměr stonku a nižší počet zrn v klasu, které zároveň měly nižší průměrnou hmotnost (Anjum et al., 2017). Autoři neměřili akumulaci ani translokaci, takže s těmito parametry zde

nelze porovnávat, nicméně pozorovali inhibici fotosyntézy, což může být jednou z příčin inhibovaného růstu. Významná inhibice růstu je vedle kontaminace potravního řetězce dalším problémem toxicity těžkých kovů, jelikož vede ke snižování výnosů plodin.

Výše zmiňovaný mitigační efekt byl kromě rýže pozorován také u As-tolerantní *Cynara cardunculus*. Kadmium v nízké koncentraci (5 μ M) bylo schopno úplně zabránit arsenem způsobené inhibici růstu kořenů v širokém spektru koncentrací arsenu, přičemž efektivita této mitigace byla lehce snížena při použití vysoké koncentrace arsenu (Sánchez-Pardo et al., 2015). Vysvětlení je možné pomocí výše popisovaného ovlivnění translokace (viz podkapitoly 5.2.1 a 5.2.2) a fytochelatinů. Autoři sice neměřili obsah fytochelatinů, ale je možné, že nižší míra translokace Cd mohla být způsobena vyšší produkcí PC v rámci obrany proti toxicitě obou prvků. Tím by Cd bylo ve vyšší míře sekvestrováno do vakuol a nebylo by tolik translokováno, zároveň As by translokován byl, vzhledem k navrhovanému mechanismu poškození As-vazebných míst (podrobněji podkapitola 5.2.1).

U As hyperakumulátoru *Pteris vittata* máme opět k dispozici několik výzkumů. Xiao et al. (2008) a Ronzan et al. (2017) se shodují na zvýšené inhibici růstu při koexpozici As + Cd (ve všech zkoumaných koncentracích) oproti kontrolním rostlinám i rostlinám vystaveným pouze arsenu. Ronzan et al. (2017) kromě inhibice růstu pozorovali ještě zvýšenou tvorbu listů, tyto listy však byly chlorotické a neměly správný vývoj. Autoři Drava et al. (2012) se s výše uvedenými pozorováními ohledně inhibice růstu ve většině koncentracích shodují, přičemž největší pokles růstu pozorovali při kombinaci 667 μ M As + 267 μ M Cd, což byla v této studii pro As nejnižší a pro Cd nejvyšší použitá koncentrace (Tabulka 1).

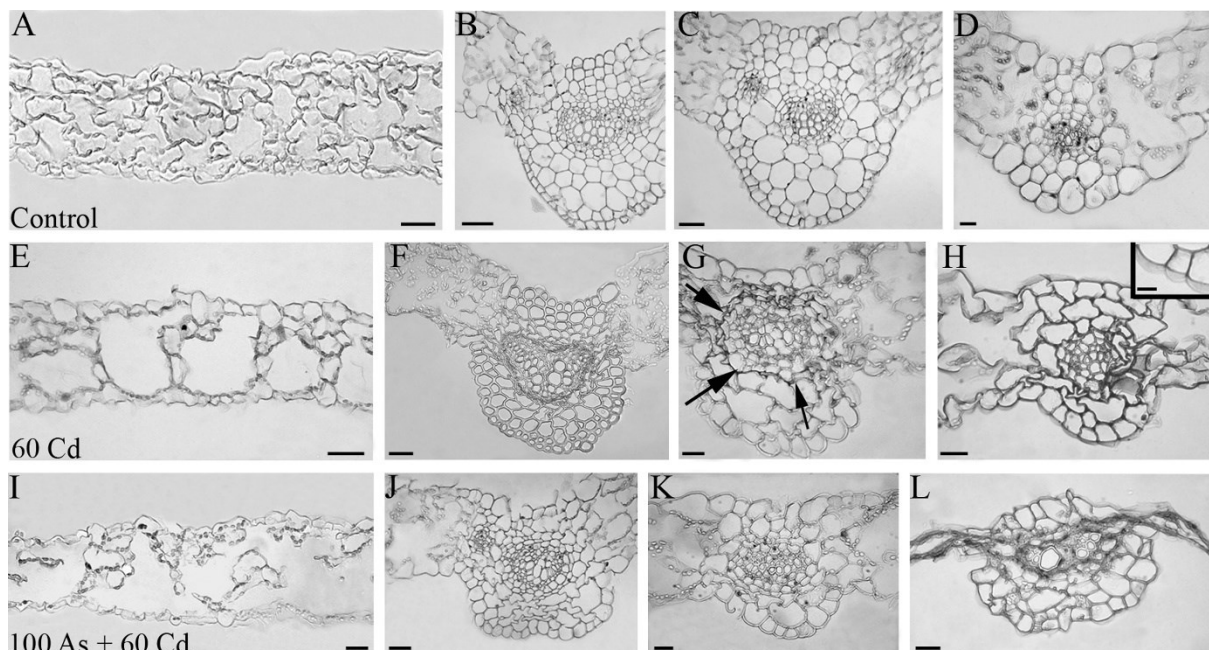
Ovlivnění růstu rostlin vlivem toxicity As a Cd bylo zkoumáno i na několika hyperakumulátorech kadmia. U *Rorippa globosa*, rostliny z čeledi brukvovitých, která je zároveň As-exkluder, byla zaznamenána zvýšená míra růstu vlivem jednotlivé i kombinované expozice oběma prvkům oproti kontrole, avšak pouze v nízkých koncentracích, při rostoucích koncentracích toxických prvků byl růst naopak inhibován (Sun et al., 2007). Autoři tuto rostlinu vzhledem k její silné schopnosti akumulovat Cd a vylučovat As, ale také odolnosti vůči nepříznivým podmínkám prostředí, rychlému růstu nebo krátkému životnímu cyklu, navrhuje jako ideální pro remediaci půd znečištěných oběma prvky. U *Solanum nigrum* pozorovali Sun et al. (2008b) zásadní snížení míry růstu u naprosté většiny použitých kombinací koncentrací, přičemž při určité koncentraci Cd se inhibice růstu zvyšovala s rostoucí koncentrací As, což může být způsobeno sníženou translokací kadmia do prýtu, v němž jsou u hyperakumulátoru účinnější detoxifikační mechanismy. Autoři ovšem uvádí, že snížená biomasa rostlin mohla být také ovlivněna relativně malým množstvím dusíku v substrátu při tomto experimentu. U *Bidens pilosa* bylo pozorováno podpoření růstu vlivem kadmia, přičemž vliv arsenu byl naopak inhibiční, a to v samostatné i kombinované expozici (Sun et al., 2009). Hyperakumulátory kadmia jsou dobrými kandidáty pro využití v remediacích, i přes inhibice růstu jsou autoři toho názoru, že zkoumané

rostliny měly velmi dobrou toleranci ke koexpozici oběma prvkům a navrhuje je proto jako vhodné pro remediaci půd kontaminovaných As a Cd.

5.3.2 Cytologické změny

Výzkumy se shodují na velmi podobných poškozeních rostlin napříč rostlinnými orgány při koexpozici arsenu a kadmium. Prvotní změny lze pozorovat u kořenového systému, který zkoumali Zanella et al. (2016) u druhu *Nicotiana tabacum*. Tyto změny se projeví jak na buněčné úrovni, tak na úrovni pletiv postranních kořenů, které autoři zkoumali. Při expozici kadmium bez arsenu byla v meristematických buňkách pozorována přítomnost různě velkých vakuol a jádra buněk obsahovala větší množství zmenšených jadérek. Koexpozice oběma prvkům měla za následek velmi podobné změny a poškození, které se však projeví s nižší intenzitou, což autoři vysvětlují jako důsledek snížené vakuolizace buněk (Zanella et al., 2016). Na úrovni primární struktury kořenů tabáku došlo při vystavení kadmium (samostatně i při koexpozici s arsenem) ve snaze o vytvoření mechanické bariéry k ztlustění buněčných stěn vlivem nadměrné depozice ligninu v kortikálních buňkách, dále k hypertrofii buněk a jejich jader a byla zaznamenána zvýšená tvorba kořenových vlásků (Zanella et al., 2016). Tyto změny mohou souviset s navýšenou akumulací Cd při koexpozici a s tím spojenou snahou rostliny vytvořit co nejsilnější mechanickou bariéru pro pohyb iontů v apoplastu, nicméně autoři konstatují, že v případě tabáku nebyla tato strategie velmi úspěšná, protože v pletivech rostlin byly i tak pozorovány vysoké hladiny As i Cd.

Obdobné strukturální změny jako u kořenů byly pozorovány i ve struktuře pletiv fotosyntetických orgánů *Pteris vittata*, přičemž při expozici arsenu se pletiva zásadně nelišila od pletiv kontrolních rostlin (Obrázek 3) a změny se vyskytovaly hlavně při expozici Cd, ať už samostatně nebo v koexpozici s As. Ronzan et al. (2017) pozorovali při expozici Cd ztlustění buněčných stěn vlivem zvýšené depozice kutin v epidermálních buňkách a depozice ligninu. V bazální oblasti orgánu došlo ke ztlustění buněčných stěn ve všech pletivech kolem středního žebra, včetně epidermis (Obrázek 3–F). Ve středních a apikálních oblastech došlo k hypertrofii parenchymatických buněk lemujících střední žebro a v důsledku toho k mechanickému poškození, až rozdrčení endodermis (Obrázek 3–G,H). Většina změn při koexpozici As+Cd byla obdobná těm, které nastaly při expozici Cd, avšak projeví se s vyšší intenzitou, což může souviset s popisovanou vyšší mírou translokace Cd do prýtu při koexpozici. Oproti expozici Cd se při koexpozici navíc projeví ukládání metabolitů v buněčných stěnách a mezibuněčných prostorech parenchymu středního žebra. Průměrná tloušťka buněčné stěny epidermálních buněk byla při koexpozici oběma prvkům menší než u expozice Cd, nicméně i tak byla téměř dvakrát vyšší než u kontrolních rostlin, což odpovídá výsledkům translokace (Ronzan et al., 2017).



Obrázek 3 – Změna stavby listu na průřezu bazální (B, F, J), střední (A, C, E, G, I, K) a apikální (D, H, L) oblasti čepele (A, E, I) a středního žebra (B-D, F-H, J-L) u *Pteris vittata* po ošetření Cd a Cd+As

A-D – kontrolní rostliny, E-H – rostliny ošetřené 60 μ M Cd, I-L – rostliny ošetřené 60 μ M Cd + 100 μ M As

A – příčný průřez čepele s laločnatými buňkami v houbovitém parenchymu a s omezenými mezibuněčnými prostory

B-D – střední žebro ukazující cévní svazek obklopený endodermis

E – příčný průřez čepele s širokými mezibuněčnými prostory

F – střední žebro s velmi silným ztluštěním buněčné stěny ve všech pletivech

G-H – hypertrofie v buňkách parenchymu (G), rozdrčení endodermis (G-H, šipky v G) a ztluštění buněčné stěny v epidermis

I – zesílené mezibuněčné prostory ve srovnání s E

J-L – střední žebro se silným ztluštěním buněčné stěny ve všech pletivech, hypertrofií v buňkách parenchymu (J), kolapsem buněk parenchymu a rozdrčením endodermis (K-L)

Měřítka = 10 μ m (H), 20 μ m (G-I, K-L), 40 μ m (A-B, E-F, J) a 50 μ m (D)

Převzato z Ronzan et al. (2017)

5.3.3 Fotosyntéza

Jak již bylo zmiňováno v samostatných kapitolách o arsenu a kadmii, toxicita těžkých kovů má vliv na mnohé fyziologické procesy a ani fotosyntéza není výjimkou. Anjum et al. (2017) pozorovali při samostatném vystavení kukuřice arsenu či kadmii snížení nejen čisté rychlosti fotosyntézy, ale také rychlosti transpirace a vodivosti průduchů. Efekt současné expozice byl takřka totožný, s tím rozdílem, že pokles byl znatelnější. Také došlo k poklesu obsahu chlorofylu v listech, přičemž redukce chlorofylu a (Chl a) byla výraznější než redukce chlorofylu b (Chl b). Autoři navrhují, že výraznější redukce Chl a oproti Chl b mohla být způsobena ionty Cd²⁺, které rychleji degradují Chl a oproti Chl b, což souvisí s inhibicí aktivity enzymů obsahujících -SH skupinu důležitých pro biosyntetickou dráhu tetrapyrolu vedoucí k tvorbě chlorofylu (Anjum et al., 2017).

5.4 Vliv na detoxifikaci

Aby rostlina zabránila diskutovaným poškozením, má k dispozici celou škálu obranných mechanismů, mezi které patří například výše uvedená tvorba mechanických bariér depozicí ligninu, dále sekvestrace toxických látek do vakuol, vylučování exudátů, chelatace těžkých (polo)kovů pomocí fytochelatinů či zhášení ROS pomocí antioxidantů. Vystavení rostlin více toxickým prvkům zároveň může mít za následek silnější reakci rostliny, která vede k vyšší intenzitě obranných mechanismů. Právě to může být jedním z důvodů vzájemné mitigace toxických účinků těžkých kovů a polokovů.

5.4.1 Fytochelatiny a sekvestrace do vakuol

Jak již bylo zmíněno, fytochelatiny (PC) jsou jedním z hlavních nástrojů pro detoxifikaci těžkých (polo)kovů v rostlině. Konkrétní frakce PC a jejich případný poměr se liší v závislosti na použitém (polo)kovu. V kořenech rostlin *Silene vulgaris* při expozici kadmii převažovaly PC3, zatímco u kořenů rostlin vystavených arsenu byla spíše převaha PC2. Rostliny, které byly vystaveny působení obou prvků, měly obsah PC2 a PC3 v kořenech téměř totožný, pouze u kombinace Cd5 + As40 (viz Tabulka 1) byla značná převaha PC2 nad PC3 (Sneller et al., 2000). Autoři na posunu od převahy jednoho druhu PC při jednotlivé expozici ke kombinaci více druhů PC při koexpozici poukazují na aditivní účinek As a Cd na produkci fytochelatinů, jež je pravděpodobně důsledkem společného využívání tohoto detoxikačního systému (Sneller et al., 2000). U rostlin tabáku ošetřených kadmii byl pozorován v nízké míře výskyt PC5 a ve vysoké míře PC3, který byl abundantní i při současném ošetření s arsenem. Rostliny ošetřené pouze arsenem měly stejně jako u předchozí studie nejabundantnější frakci PC2 (Zanella et al., 2016). V průběhu experimentu byl u tabáku pozorován nárůst produkce fytochelatinů u wild type i transgenních rostlin s podpořenou expresí fytochelatinsyntázy (PCS), přičemž nejvyšší obsah byl měřen právě u transgenních rostlin. Tyto rostliny byly díky podpořené produkci fytochelatinů schopny efektivnějšího boje proti stresu způsobenému těžkými (polo)kovy – měly menší inhibici růstu, vyšší schopnost akumulace arsenu i kadmia a zvýšenou míru sekvestrace kadmia do vakuol (Zanella et al., 2016). Tvorba komplexů s arsenem byla pozorována i u *Pteris vittata* (Ronzan et al., 2017). Autoři pozorovali dvojnásobné množství PC-As komplexů v kořenech oproti listům při expozici samotnému As. U rostlin vystavených oběma prvkům byla naopak koncentrace komplexů 5× vyšší v listech než v kořenech, přičemž nejčetnější frakcí byly komplexy s PC3. Dále se ukázala schopnost tvorby komplexů s PC2 a PC4 v kořeni i nadzemních částech při koexpozici. Především tvorba komplexů s delším řetězcem (PC3 a PC4) byla silně indukována přítomností Cd v médiu, což ukazuje na vysokou toxicitu kadmia pro *Pteris vittata* (Ronzan et al., 2017). Fytochelatiny s delším řetězcem jsou spojovány s adaptačními reakcemi vůči těžkým kovům u tolerantních rostlin (Zhang et al., 2004). Zvýšenou syntézou PC v kořenech vysvětlují Ronzan et al. (2017) skutečnost, že rostliny byly při koexpozici schopny akumulovat větší množství As, ale translokace do listů byla snížena.

5.4.2 Vylučování exudátů

Další možností vypořádání se s toxicitou těžkých (polo)kovů je jejich vyloučení (exudace) skrze listy. Tyto exudáty mohou být buď ve formě krystalů nebo solného roztoku (Zanella et al., 2016; Ronzan et al., 2017). Tato forma detoxifikace je oproti ostatním méně efektivní, přesto se k ní mnohé rostlinné druhy v některých případech uchylují. O menší efektivitě vypovídají výsledky od Zanella et al. (2016), kteří u tabáku sice po dvou týdnech koexpozice As + Cd pozorovali vyloučené krystaly, ale tyto krystaly neobsahovaly zkoumané toxické prvky. Po delší expozici, když už byly prvky detekovatelné v krystalech, se ukázala významná role fytochelatinů. U transgenních rostlin tabáku s podpořenou expresí fytochelatinsyntázy se při expozici Cd + As (současně i samostatně) nikdy neobjevily zmíněné prvky ve vyloučených krystalech, a to ani po 8 týdnech expozice. U wt rostlin tabáku bez podpořené exprese PCS se v krystalech po 5-6 týdnech při samostatné expozici začalo objevovat kadmium, přičemž u současné expozice arsen zbrzdil vylučování kadmia o další 2 týdny (Zanella et al., 2016). Výzkumníci navrhuji vysvětlení pomocí sekvestrace Cd do vakuol. V rostlinách s podpořenou expresí PCS byla při expozici kadmiu vysoká akumulace PC-Cd komplexů ve vakuolách, nebylo tedy třeba vylučovat kadmium exudáty. Jelikož při koexpozici těchto rostlin oběma prvky byla sekvestrace kadmia do vakuol snížena, je podle autorů zapotřebí hledat jiné vysvětlení. Vlivem koexpozice obsahovala pletiva zvýšené množství fytochelatinů, které tvořily komplexy s As i Cd, právě komplexy PC-As mohly kompetovat s PC-Cd při transportu do vakuol. PC-Cd komplexy, které zůstaly v cytosolu, mohly následně být transportovány floémem zpět do kořenů a mohly vyvolat zvýšenou akumulaci kadmia v kořenech těchto rostlin (Zanella et al., 2016).

5.4.3 Oxidativní stres a antioxidační kapacita

Stresové působení arsenu a kadmia vyvolává tvorbu ROS, čímž způsobuje oxidativní stres, který musí být následně mírněn aktivitou enzymatických a neenzymatických antioxidačních systémů. Současná přítomnost více různých potenciálně toxických prvků může sice zvýšit míru poškození pletiv, ale také může posílit intenzitu obranných mechanismů, což může ve výsledku negativní efekt zmírnit (Ronzan et al., 2017). Vzhledem k dostupnosti zdrojů se tento odstavec bude zabývat antioxidační aktivitou v několika druzích obilnin. U rostlin kukuřice bylo pozorováno kontinuální zvyšování obsahu enzymatických i neenzymatických antioxidantů (SOD, POD, CAT, APX, GPX, GR, GSH, AsA) v čase, a to při současném i samostatném ošetření As a Cd, ačkoliv při koexpozici byl efekt výraznější (Anjum et al., 2016b). Zvyšování antioxidační aktivity vlivem koexpozice oběma prvky bylo pozorováno také u rýže, zajímavé ovšem je, že při expozici jednotlivým prvky se aktivita nejen enzymatických (SOD a POD), ale i neenzymatických (GSH a AsA) antioxidantů v listech rýže snížila (Sun et al., 2008a). Tyto výsledky naznačují, že oxidační poškození způsobené kadmii může být skrze zvýšenou aktivaci obranných mechanismů zmírněno arsenem a naopak (Sun et al., 2008a). Výsledky výzkumu na pšenici korespondují s těmi na kukuřici a rýži pouze v případě peroxidázy, jejíž aktivita se zvyšovala s rostoucí koncentrací arsenu i kadmia v hydroponickém médiu (Liu et al., 2007). Pro superoxidodismutázu

a katalázu jsou výsledky o něco komplikovanější, při samostatné aplikaci As docházelo s rostoucí dávkou ke zvyšování aktivity SOD. Při samostatné aplikaci Cd nejprve došlo k nárůstu, ale při vyšších koncentracích byl zaznamenán pokles aktivity SOD, toto se projevilo i při koexpozici s nízkou dávkou As. Při koexpozici vysoké dávky As s kadmii se aktivita SOD snižovala s rostoucí dávkou Cd. Aktivita katalázy byla při nízké dávce Cd (2 mg/l) pozitivně ovlivněna zvyšující se dávkou As a při vyšší dávce Cd (8 mg/l) negativně ovlivněna zvyšující se dávkou As (Liu et al., 2007). Aktivita antioxidantních enzymů se podle popisovaných výsledků zdá být závislá na dávce toxického prvku ale i rostlinném druhu. Autoři uvádí, že hlavním problémem u rostlin pšenice bylo to, že jejich antioxidantní odpověď nebyla správně synchronizována a nebyly tak schopny účinně zhaset ROS, je možné, že vzniklá toxicita při vysokých koncentracích prvků už byla pro rostliny natolik závažná, že nezvládaly efektivně spouštět antioxidantní mechanismy.

6 ZÁVĚR

Souběžná kontaminace prostředí více prvky, jako jsou arsen a kadmium, je závažným problémem současnosti, je třeba zkoumat rostlinné mechanismy a s tím spojené reakce na tento druh stresorů. Kombinovaná expozice rostlin arsenu a kadmiu nemusí vždycky znamenat znásobení toxického účinku, ve skutečnosti je tomu v mnoha případech právě naopak – jeden těžký kov mitiguje účinek toho druhého. Zajímavá je naprosto zřejmá citlivost As-hyperakumulátoru *Pteris vittata* vůči kadmiu, což ukazuje na diametrálně odlišné mechanismy toxicity obou prvků. Nicméně je možné, že *Pteris vittata* bude přesto možné využít pro fytoremediaci míst znečištěných oběma prvky, alespoň pokud by Cd bylo v nízké koncentraci (např. 5–10 mg/kg). Dalším potenciálním kandidátem pro remediaci je As-tolerantní *Cynara cardunculus*. Zmiňované Cd-hyperakumulátory *S. nigrum*, *B. pilosa* a *R. globosa* jsou také navrhovány jako vhodné pro remediace míst kontaminovaných oběma prvky, a to navzdory zvýšené toxicitě při koexpozici, jelikož rostliny měly i tak podle autorů výzkumů relativně vysokou odolnost. Situace se tedy v tomto ohledu jeví vcelku pozitivně.

Zkoumané obilniny (rýže, kukuřice, pšenice) mají společnou vysokou citlivost k oběma prvkům, přičemž účinek Cd je pro ně ničivější. U rýže byla popsána mitigace toxického účinku Cd na růst pomocí As, což pravděpodobně souviselo s inhibovanou translokací. To je samo o sobě příznivou zprávou, nicméně skutečně důležitý je obsah toxických prvků v konzumovaných částech rostliny, tedy zrnech, což je parametr, který autoři neměřili. Za vzájemným mitigačním efektem obou prvků může stát například zapojení vyšší intenzity obranných mechanismů, z nichž se jako jeden z klíčových faktorů jeví fytochelatin. Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout dostupné poznatky o vlivu koexpozice arsenu a kadmia na rostliny. Toto téma je ve vědecké literatuře prozatím stále málo prozkoumané, s čímž souvisí nevelké množství dostupných výzkumů, což ale v žádném případě nesnižuje jeho důležitost.

Literární zdroje

- Abid R, Manzoor M, De Oliveira LM, da Silva E, Rathinasabapathi B, Rensing C, Mahmood S, Liu X, Ma LQ** (2019) Interactive effects of As, Cd and Zn on their uptake and oxidative stress in As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Pollution* **248**: 756–762
- Ali W, Isayenkov SV, Zhao F-J, Maathuis FJM** (2009) Arsenite transport in plants. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2329–2339
- Anjum NA, Sharma P, Gill SS, Hasanuzzaman M, Khan EA, Kachhap K, Mohamed AA, Thangavel P, Devi GD, Vasudhevan P, et al** (2016a) Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environ Sci Pollut Res* **23**: 19002–19029
- Anjum SA, Tanveer M, Hussain S, Ashraf U, Khan I, Wang L** (2017) Alteration in Growth, Leaf Gas Exchange, and Photosynthetic Pigments of Maize Plants Under Combined Cadmium and Arsenic Stress. *Water, Air, and Soil Pollution* **228**: 13
- Anjum SA, Tanveer M, Hussain S, Shahzad B, Ashraf U, Fahad S, Hassan W, Jan S, Khan I, Saleem MF, et al** (2016b) Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 11864–11875
- Brunetti P, Zanella L, De Paolis A, Di Litta D, Cecchetti V, Falasca G, Barbieri M, Altamura MM, Costantino P, Cardarelli M** (2015) Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **66**: 3815–3829
- Cao Y, Feng H, Sun D, Xu G, Rathinasabapathi B, Chen Y, Ma LQ** (2019) Heterologous Expression of *Pteris vittata* Phosphate Transporter PvPht1;3 Enhances Arsenic Translocation to and Accumulation in Tobacco Shoots. *Environ Sci Technol* **53**: 10636–10644
- Cao Y, Sun D, Ai H, Mei H, Liu X, Sun S, Xu G, Liu Y, Chen Y, Ma LQ** (2017) Knocking Out *OsPT4* Gene Decreases Arsenate Uptake by Rice Plants and Inorganic Arsenic Accumulation in Rice Grains. *Environ Sci Technol* **51**: 12131–12138
- Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile-Escanciano A, Tc M, Mouriz A, Catarcha P, Sobrino-Plata J, Olsson S, et al** (2013) WRKY6 Transcription Factor Restricts Arsenate Uptake and Transposon Activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 2944–2957
- Chao D-Y, Chen Y, Chen J, Shi S, Chen Z, Wang C, Danku JM, Zhao F-J, Salt DE** (2014) Genome-wide Association Mapping Identifies a New Arsenate Reductase Enzyme Critical for Limiting Arsenic Accumulation in Plants. *PLoS Biol* **12**: e1002009
- Chao D-Y, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE** (2012) Genome-Wide Association Studies Identify Heavy Metal ATPase3 as the Primary Determinant of Natural Variation in Leaf Cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **8**: e1002923
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159–182
- Corpas FJ, Gupta DK, Palma JM, eds** (2013) Plants as Accumulators of Metals. In *Corpas FJ, Gupta DK, Palma JM, eds, Heavy Metal Stress in Plants*, 1st ed. 2013. Springer, Berlin, Heidelberg
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**: 1–11
- DiTusa SF, Fontenot EB, Wallace RW, Silvers MA, Steele TN, Elnagar AH, Dearman KM, Smith AP** (2016) A member of the Phosphate transporter 1 (Pht1) family from the arsenic-hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is a high-affinity arsenate transporter. *New Phytol* **209**: 762–772

- Drava G, Roccotiello E, Minganti V, Manfredi A, Cornaraz L** (2012) Effects of cadmium and arsenic on *Pteris vittata* under hydroponic conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 1375-1380
- Duan G-L, Hu Y, Schneider S, McDermott J, Chen J, Sauer N, Rosen BP, Daus B, Liu Z, Zhu Y-G** (2016) Inositol transporters AtINT2 and AtINT4 regulate arsenic accumulation in *Arabidopsis* seeds. *Nature Plants* 2: 15202
- Duffus JH** (2002) "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 74: 793–807
- EFSA** (European Food Safety Authority) (2009a) Scientific Opinion on Arsenic in Food - Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal* 7: 1351
- EFSA** (European Food Safety Authority) (2009b) Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal* 980: 1-139
- Farnese FS, Oliveira JA, Paiva EAS, Menezes-Silva PE, da Silva AA, Campos FV, Ribeiro C** (2017) The Involvement of Nitric Oxide in Integration of Plant Physiological and Ultrastructural Adjustments in Response to Arsenic. *Front Plant Sci* 8: 516
- Feng S, Tan J, Zhang Y, Liang S, Xiang S, Wang H, Chai T** (2017) Isolation and characterization of a novel cadmium-regulated Yellow Stripe-Like transporter (SnYSL3) in *Solanum nigrum*. *Plant Cell Rep* 36: 281–296
- Finnegan PM, Chen W** (2012) Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front Physio* 3: 182
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP** (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83: 33–46
- Ghiani A, Fumagalli P, Nguyen Van T, Gentili R, Citterio S** (2014) The combined toxic and genotoxic effects of Cd and As to plant bioindicator *Trifolium repens* L. *PLoS ONE* 9: e99239
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA** (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biol* 32: 481
- Gresser MJ** (1981) ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *Journal of Biological Chemistry* 256: 5981–5983
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH** (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230: 674–676
- Haider FU, Liqun C, Coulter JA, Cheema SA, Wu J, Zhang R, Wenjun M, Farooq M** (2021) Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211: 111887
- Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S, Ahmad A** (2009) Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J Environ Biol* 30: 165–174
- Hasan SA, Hayat S, Ali B, Ahmad A** (2008) 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environmental Pollution* 151: 60–66
- Hédiji H, Djebali W, Belkadhi A, Cabasson C, Moing A, Rolin D, Brouquisse R, Gallusci P, Chaïbi W** (2015) Impact of long-term cadmium exposure on mineral content of *Solanum lycopersicum* plants: Consequences on fruit production. *South African Journal of Botany* 97: 176–181
- Huang C-H, Mitchell RA** (1972) Arsenate and phosphate as modifiers of adenosine triphosphate driven energy-linked reduction. Kinetic study of the effects of modifiers on inhibition by adenosine diphosphate. *Biochemistry* 11: 2278–2283

- Indriolo E, Na G, Ellis D, Salt DE, Banks JA** (2010) A Vacuolar Arsenite Transporter Necessary for Arsenic Tolerance in the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata* Is Missing in Flowering Plants. *The Plant Cell* **22**: 2045–2057
- Ismael MA, Elyamine AM, Moussa MG, Cai M, Zhao X, Hu C** (2019) Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics* **11**: 255–277
- Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA** (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature genetics* **34**: 326–329
- Johnson LR, Hiltbold AE** (1969) Arsenic Content of Soil and Crops Following Use of Methanearsonate Herbicides. *Soil Science Society of America Journal* **33**: 279–282
- Kamiya T, Islam R, Duan G, Uraguchi S, Fujiwara T** (2013) Phosphate deficiency signaling pathway is a target of arsenate and phosphate transporter *OsPT1* is involved in As accumulation in shoots of rice. *Soil Science and Plant Nutrition* **59**: 580–590
- Kamiya T, Tanaka M, Mitani N, Ma JF, Maeshima M, Fujiwara T** (2009) NIP1;1, an Aquaporin Homolog, Determines the Arsenite Sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 2114–2120
- Kofroňová M, Mašková P, Lipavská H** (2018) Two facets of world arsenic problem solution: crop poisoning restriction and enforcement of phytoremediation. *Planta* **248**: 19–35
- Ku H, Andresen E** (2016) Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* **8**: 269–285
- Kumar A, Basu S, Rishu AK, Kumar G** (2022) Revisiting the mechanisms of arsenic uptake, transport and detoxification in plants. *Environmental and Experimental Botany* **194**: 104730
- Küpper H, Küpper F, Spiller M** (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot* **47**: 259–266
- Leonardi C, Pappalardo H, Genovese C, Puglia G, Bua GD, Dugo G, Raccuia SA** (2016) Mechanisms of phytoextraction in *Cynara cardunculus* L. growing under cadmium and arsenic stress. *Acta Hort* **139**–144
- Leonardi C, Toscano V, Genovese C, Mosselmans JFW, Ngwenya BT, Raccuia SA** (2021) Evaluation of cadmium and arsenic effects on wild and cultivated cardoon genotypes selected for metal phytoremediation and bioenergy purposes. *Environ Sci Pollut Res* **28**: 55102–55115
- Liu D, Jiang W, Wang W, Zhai L** (1995) Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the allium test. *Israel J Plant Sci* **43**: 125–133
- Liu X, Zhang S, Shan X, Christie P** (2007) Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **68**: 305–313
- Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ** (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* **62**: 21–37
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Xu X-Y, Su Y-H, McGrath SP, Zhao F-J** (2008) Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 9931–9935
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang WH, Cai Y, Kennelley ED** (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* **409**: 579
- Matros A, Peshev D, Peukert M, Mock H-P, Van den Ende W** (2015) Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **82**: 822–839

- Milla MAR, Maurer A, Huete AR, Gustafson JP** (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways: *Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis*. *The Plant Journal* **36**: 602–615
- Mondal S, Pramanik K, Ghosh SK, Pal P, Ghosh PK, Ghosh A, Maiti TK** (2022) Molecular insight into arsenic uptake, transport, phytotoxicity, and defense responses in plants: a critical review. *Planta* **255**: 87
- Moulis J-M** (2010) Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* **23**: 877–896
- Nagarajan VK, Jain A, Poling MD, Lewis AJ, Raghobhama KG, Smith AP** (2011) *Arabidopsis* Pht1;5 Mobilizes Phosphate between Source and Sink Organs and Influences the Interaction between Phosphate Homeostasis and Ethylene Signaling. *Plant Physiology* **156**: 1149–1163
- Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, Mori S, Nishizawa NK** (2006) Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Science and Plant Nutrition* **52**: 464–469
- Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Syeed S, Khan NA** (2012) Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. *AJPS* **03**: 1476–1489
- Niu L, Liao W** (2016) Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Front Plant Sci* **7**: 230
- Park J, Song W, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee TG, Martinoia E, Lee Y** (2012) The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal* **69**: 278–288
- Persson DP, Hansen TH, Holm PE, Schjoerring JK, Hansen HCB, Nielsen J, Cakmak I, Husted S** (2006) Multi-elemental speciation analysis of barley genotypes differing in tolerance to cadmium toxicity using SEC-ICP-MS and ESI-TOF-MS. *J Anal At Spectrom* **21**: 996
- Raab A, Schat H, Meharg AA, Feldmann J** (2005) Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic–phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist* **168**: 551–558
- Ramesh SA, Shin R, Eide DJ, Schachtman DP** (2003) Differential Metal Selectivity and Gene Expression of Two Zinc Transporters from Rice. *Plant Physiology* **133**: 126–134
- Ronzan M, Piacentini D, Fattorini L, Federica DR, Caboni E, Eiche E, Ziegler J, Hause B, Riemann M, Betti C, et al** (2019) Auxin-jasmonate crosstalk in *Oryza sativa* L. root system formation after cadmium and/or arsenic exposure. *Environmental and Experimental Botany* **165**: 59–69
- Ronzan M, Zanella L, Fattorini L, Della Rovere F, Urgast D, Cantamessa S, Nigro A, Barbieri M, Sanità di Toppi L, Berta G, et al** (2017) The morphogenic responses and phytochelatin complexes induced by arsenic in *Pteris vittata* change in the presence of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* **133**: 176–187
- Sánchez-Pardo B, Cantero C, Zornoza P** (2015) Alleviation of arsenic stress in cardoon plants via the supply of a low cadmium concentration. *Environmental and Experimental Botany* **109**: 229–234
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**: 105–130
- Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wirén N** (2004) ZmYS1 Functions as a Proton-coupled Symporter for Phytosiderophore- and Nicotianamine-chelated Metals. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 9091–9096

- Shah K, Dubey R** (1997) Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as a possible enzyme protectant. *Biologia Plantarum* **40**: 121–130
- Sharma I** (2012) Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia* **67**: 447–453
- Shin H, Shin H-S, Dewbre GR, Harrison MJ** (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *The Plant Journal* **39**: 629–642
- Sneller FEC, Van Heerwaarden LM, Schat H, Verkleij JAC** (2000) Toxicity, metal uptake, and accumulation of phytochelatins in *Silene vulgaris* exposed to mixtures of cadmium and arsenate. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 2982–2986
- Song W-Y, Park J, Mendoza-Cózatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, et al** (2010) Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 21187–21192
- Song W-Y, Yamaki T, Yamaji N, Ko D, Jung K-H, Fujii-Kashino M, An G, Martinoia E, Lee Y, Ma JF** (2014) A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 15699–15704
- Souri Z, Karimi N, Sandalio LM** (2017) Arsenic Hyperaccumulation Strategies: An Overview. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**: 67
- Srivastava M, Ma LQ, Santos JAG** (2006) Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Science of The Total Environment* **364**: 24–31
- Sun D, Feng H, Li X, Ai H, Sun S, Chen Y, Xu G, Rathinasabapathi B, Cao Y, Ma LQ** (2020) Expression of New *Pteris vittata* Phosphate Transporter PvPht1;4 Reduces Arsenic Translocation from the Roots to Shoots in Tobacco Plants. *Environ Sci Technol* **54**: 1045–1053
- Sun Y, Li Z, Guo B, Chu G, Wei C, Liang Y** (2008a) Arsenic mitigates cadmium toxicity in rice seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 264–270
- Sun Y, Zhou Q, Diao C** (2008b) Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology* **99**: 1103–1110
- Sun Y, Zhou Q, Liu W, An J, Xu Z-Q, Wang L** (2009) Joint effects of arsenic and cadmium on plant growth and metal bioaccumulation: A potential Cd-hyperaccumulator and As-excluder *Bidens pilosa* L. *Journal of Hazardous Materials* **165**: 1023–1028
- Sun Y, Zhou Q, Wei S, Ren L** (2007) Growth responses of the newly-discovered Cd-hyperaccumulator *Rorippa globosa* and its accumulation characteristics of Cd and As under joint stress of Cd and As. *Front Environ Sci Eng China* **1**: 107–113
- Ueno D, Milner MJ, Yamaji N, Yokosho K, Koyama E, Clemencia Zambrano M, Kaskie M, Ebbs S, Kochian LV, Ma JF** (2011) Elevated expression of TcHMA3 plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*: Cd transporter of hyperaccumulator. *The Plant Journal* **66**: 852–862
- Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang CF, Ando T, Yano M, Ma JF** (2010) Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16500–16505
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* **14**: 1223–1233
- Wahid A, Ghani A, Ali I, Ashraf MY** (2007) Effects of Cadmium on Carbon and Nitrogen Assimilation in Shoots of Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] Seedlings. *J Agron Crop Sci* **193**: 357–365

Wang P, Zhang W, Mao C, Xu G, Zhao F-J (2016) The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany* **67**: 6051–6059

Wong CKE, Cobbett CS (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **181**: 71–78

Xiao X, Chen T, An Z, Lei M, Huang Z, Liao X, Liu Y (2008) Potential of *Pteris vittata* L. for phytoremediation of sites co-contaminated with cadmium and arsenic: The tolerance and accumulation. *Journal of Environmental Sciences* **20**: 62–67

Xu W, Dai W, Yan H, Li S, Shen H, Chen Y, Xu H, Sun Y, He Z, Ma M (2015) Arabidopsis NIP3;1 Plays an Important Role in Arsenic Uptake and Root-to-Shoot Translocation under Arsenite Stress Conditions. *Molecular Plant* **8**: 722–733

Yadav V, Arif N, Kováč J, Singh VP, Tripathi DK, Chauhan DK, Vaculík M (2021) Structural modifications of plant organs and tissues by metals and metalloids in the environment: A review. *Plant Physiology and Biochemistry* **159**: 100–112

Zanella L, Fattorini L, Brunetti P, Roccotiello E, Cornara L, D'Angeli S, Della Rovere F, Cardarelli M, Barbieri M, Sanità di Toppi L, et al (2016) Overexpression of AtPCS1 in tobacco increases arsenic and arsenic plus cadmium accumulation and detoxification. *Planta* **243**: 605–622

Zhang J, Martinoia E, Lee Y (2018) Vacuolar Transporters for Cadmium and Arsenic in Plants and their Applications in Phytoremediation and Crop Development. *Plant and Cell Physiology* **59**: 1317–1325

Zhang J, Zhang M, Shohag MdJI, Tian S, Song H, Feng Y, Yang X (2016) Enhanced expression of SaHMA3 plays critical roles in Cd hyperaccumulation and hypertolerance in Cd hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Planta* **243**: 577–589

Zhang W, Cai Y, Downum KR, Ma LQ (2004) Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environmental Pollution* **131**: 337–345

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

Zhao F-J, McGrath SP, Meharg AA (2010) Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 535–559

Zulfiqar U, Ayub A, Hussain S, Waraich EA, El-Esawi MA, Ishfaq M, Ahmad M, Ali N, Maqsood MF (2022) Cadmium Toxicity in Plants: Recent Progress on Morpho-physiological Effects and Remediation Strategies. *J Soil Sci Plant Nutr* **22**: 212–269

Online zdroje

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2020) ATSDR's Substance Priority List. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>

IARC (International Agency for Research on Cancer) (2022) List of Classifications - Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–131. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>

WHO (World Health Organization) (2022) Arsenic. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>