

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



Bc. Aneta Hrdinová

**Thorium jako environmentální stresový faktor pro růst rostlin
v kontaminovaném prostředí.**

Thorium as an environment stressor for plant growth

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2016

Školitelka diplomové práce:

Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D., Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

Konzultanti diplomové práce:

Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Dr., Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

RNDr. Petr Soudek, Ph.D., Ústav experimentální biologie rostlin AVČR

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svoji Diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. a za konzultace Prof. RNDr. Jany Albrechtové, Dr. a RNDr. Petra Soudka, Ph.D.

V Praze dne

Aneta Hrdinová

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za trpělivý přístup, cenné rady, ochotu a laskavost při vedení mé práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Soudkovi, Ph.D. za trpělivé vedení při zpracovávání vzorků.

Prof. RNDr. Janě Albrechtové, Dr. děkuji za cenné rady při sepisování mé diplomové práce.

Mgr. Monice Kofroňové a Ing. Šárce Petrové, PhD. Děkuji za optimismus, podporu a pomoc se zpracováváním vzorků.

Děkuji také celému kolektivu laboratoře 207 za přátelskou atmosféru a optimismus.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině a zejména rodičům za podporu a povzbuzování, které mi poskytovali během mého studia.

Nakonec bych ráda poděkovala grantům, pod jejichž záštitou jsem vypracovala svoji práci:

- Projekt NPUI LO 1417 - Centrum experimentální biologie rostlin UK (2015-2019, MSM/LO)

Abstrakt:

Thorium je prvek patřící mezi těžké kovy, který je charakteristický svojí radioaktivitou podobně jako uran nebo radon. Thorium zatím není prvek, který by byl v průmyslu běžně využíván, ale vzhledem k jeho radioaktivním vlastnostem má velký potenciál pro budoucí využití na výrobu jaderné energie. Díky tomu ale bude stále častěji docházet k jeho uvolňování do půdy, vody a atmosféry a prostřednictvím rostlin by se pak mohl stát součástí potravinového řetězce a představovat tak závažná zdravotní rizika i pro člověka.

Publikací věnovaných thoriu a jeho vlivu na rostliny zatím není mnoho. Většina z těchto prací je přitom zaměřená pouze na schopnosti rostlin akumulovat thorium a případně také sledují distribuci thoria v rostlinném těle. Dosud ale dle mých údajů chybí práce, která by sledovala, jaký vliv má thorium na fyziologické vlastnosti rostlin.

Za modelový organismus byl vybrán druh *Nicotiana glutinosa* (L.), středně akumulující thorium, pěstovaný hydroponicky. Hoaglandova živná média se lišila přítomností thoria, kyseliny vinné, putrescinu a fosfátů. V první části práce jsem sledovala akumulaci thoria rostlinami tabáku pod vlivem výše zmíněných modifikací média. Ve druhé části jsem sledovala vliv thoria na fotosyntetický aparát (obsah fotosyntetických pigmentů, rychlá fluorescence PSII), na detoxifikační mechanismy: aktivitu enzymů (askorbátperoxidáza, kataláza, peroxidáza, glutathion-S-transferáza) a akumulaci prolinu. Ve třetí části jsem pak sledovala vliv jednotlivých modifikací média na výše vyjmenované fyziologické parametry.

Deficience fosforu v médiích způsobila přibližně 10x vyšší akumulaci thoria rostlinami. Avšak vybraný druh *N. glutinosa* nemá schopnost dostatečné akumulace Th pro fytoremediaci kontaminovaného prostředí. Aplikace putrescinu na listy vedla k vyšší translokaci thoria do nadzemních částí rostlin, zatímco vliv kyseliny vinné na akumulaci thoria rostlinami nebyl prokázán. Přítomnost thoria způsobila v rostlinách zvýšení obsahu fotosyntetických pigmentů, ale též snížení hodnot vybraných fluorescenčních parametrů. Dále také vedla ke zvýšení akumulace volného prolinu a ke snížení aktivity některých vybraných antioxidačních enzymů. Exogenní aplikace putrescinu projevila potenciál ve fytoremediačních metodách pro podporu translokace těžkých kovů do nadzemních částí rostlin.

Klíčová slova: antioxidační enzymy, fluorescence, fosfát, fytoremediace, fyziologický stres, kyselina vinná, prolin, putrescin, ROS, Thorium,

Abstract:

Thorium is an element belonging to heavy metals, which is characterized by its radioactivity similarly to uranium and radon. Thorium is not commonly used in industry, but because of its radioactive properties it has a great potential for future use in nuclear energetics. Thus, increasing release of Th into the soil, water and atmosphere can be expected in near future and through plant biomass it could become a part of food chains and webs and, thus, to represent a considerable health risks to humans. Studies devoted to research on thorium and its effects on plants has not been published much yet. The majority of these studies focus mainly only on plant abilities to accumulate thorium and/or monitoring distribution of thorium in plant body. But till now, a study is still missing, which would monitor the effect of thorium on the physiological characteristics of plants.

Plants of *Nicotiana glutinosa* (L.) medium Thorium accumulation were hydroponically cultivated Hoagland nutrient media differed in the presence of thorium, tartaric acid, putrescine and phosphates. In first part of the present study I monitored accumulation of thorium by tobacco plants under the influence of the above-mentioned modifications of media. In the second part, I studied the Th effect on the photosynthetic apparatus (contents of photosynthetic pigments, rapid fluorescence PSII,) and on detoxification mechanisms: activity of enzymes (ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase, glutathione-s-transferase) and proline accumulation. In the third part I observed the effect of different modifications of the above-mentioned media on the above listed physiological parameters.

Deficiency of phosphorus in the medium caused about 10-times higher Th accumulation in plants. However, the selected species – *N. glutinosa* does not have ability to accumulate Th enough for phytoremediation of contaminated environment. The application of putrescine on leaves lead to higher Th translocation to shoots but the effect of tartaric acid on Th accumulation was not observed. The presence of thorium in plants caused an increase in contents of photosynthetic pigments and a decrease in values of selected fluorescence parameters. Also an increase in accumulation of free proline and a decrease in the activity of antioxidant enzymes were observed as a consequence of Th presence in the media. Exogenous application of putrescine showed a potential in phytoremediation methods to support translocation of heavy metals to shoots.

Key words: antioxidant enzymes, chlorophyll, fluorescence, phytoremediation, proline, putrescine, ROS, stress physiology, tartaric acid, Thorium

Obsah

Seznam zkratk:	1
1. Úvod	2
1.1. Cíle práce	3
1.2. Hypotézy	3
2. Literární úvod	4
2.1. Thorium	4
2.1.1. Historický objev thoria	5
2.1.2. Fyzikálně-chemické charakteristiky thoria	5
2.1.3. Výskyt thoria	5
3.1.3. Antropogenní využití thoria.....	9
2.2. Fytoremediace	10
2.2.1. Fytodekontaminace.....	11
2.2.1.1. Fytoextrakce	11
2.2.1.2. Rhizofiltrace	13
2.2.1.3. Fytovolatilizace	13
2.2.1.4. Fytodegradace	14
2.2.1.5. Rhizodegradace	14
2.2.2. Fytostabilizace	14
2.3. Vliv thoria na fyziologii rostlin	15
2.3.1. Fosfor a dostupnost radionuklidů pro rostliny	22
2.3.2. Nízkomolekulární organické kyseliny a dostupnost radionuklidů pro rostliny	23
2.3.3. Polyaminy a příjem a translokace radionuklidů v rostlinách	24
2.4. Nespecifické stresové markery	25
2.4.1. Stresový stav rostlin způsobený těžkými kovy	26
2.4.1.1. Oxidativní stres	28
2.4.2. Specifická aktivita antioxidantních enzymů	30
2.4.3. Prolin	31
2.4.4. Fotosyntetické parametry jako nespecifické markery stresu	32
2.4.4.1. Pigmenty	33
2.4.4.2. Fluorescence chlorofylu	35
3. Materiál a metody	37
3.1. Nicotiana glutinosa	38
3.2. Kultivace rostlin	38
3.3. Design pokusů	41
3.4. Stanovení obsahu thoria	42
3.5. Stanovení obsahu vody	43

3.5. Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů.....	43
3.6. Rychlá kinetika fluorescence - OJIP test	44
3.7. Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	44
4.7.1. Extrakce proteinů.....	44
3.7.2. Stanovení obsahu proteinů.....	45
3.7.3. Determinace enzymatické aktivity	46
3.8. Stanovení obsahu prolinu	49
3.10. Statistické zpracování	50
4. Výsledky.....	51
4.1. Akumulace thoria.....	51
4.1.1. Akumulace Th v kořenech.....	51
4.1.2. Akumulace Th ve stoncích	53
4.1.3. Akumulace Th v listech.....	54
4.1.4. Akumulace Th v nadzemní biomase.....	56
4.1.5. Poměr akumulace Th v S/R.....	57
4.2. Reakce rostlin na přítomnost Th v médiu – nespecifické indikátory stresu	59
4.2.1. Obsah vody v listech	59
4.2.2. Parametry fotosyntetického aparátu	60
4.2.2.1. Obsah fotosyntetických pigmentů.....	61
4.2.2.2. Fluorescenční parametry a OJIP křivka	65
4.2.3. Detekce oxidativního stresu.....	68
4.2.3.1. Specifická aktivita antioxidačních enzymů	68
4.2.3.2. Akumulace prolinu	73
4.3. Porovnání reakce rostlin na Th v různě modifikovaných médiích.....	74
4.3.1. Akumulace thoria	75
4.3.2. Obsah vody.....	76
4.3.3. Parametry fotosyntetického aparátu	78
4.3.3.1. Fotosyntetické pigmenty.....	78
4.3.3.2. Fluorescence chlorofylu	87
4.3.4. Detekce oxidativního stresu.....	90
4.3.4.1. Aktivita vybraných antioxidačních enzymů	90
4.3.4.2. Akumulace prolinu	97
5. Diskuse	99
5.1. Experimentální systém.....	99
5.2. Metodické přístupy použité v práci.....	100
5.2.1. Obsah thoria v rostlinách.....	100
5.2.1. Parametry fotosyntetického aparátu	101
5.2.3. Detekce oxidativního stresu.....	102

5.3. Diskuze experimentálních výsledků	103
5.3.1. Akumulace thoria	103
5.3.2. Obsah vody v listech	106
5.3.3. Parametry fotosyntetického aparátu	106
5.3.3.1. Obsah fotosyntetických pigmentů	107
5.3.3.2. Fluorescenční parametry	109
5.3.4. Detekce oxidativního stresu.....	111
5.3.4.1. Specifická aktivita antioxidantních enzymů	111
5.3.4.2. Akumulace prolinu	115
5.4. Vyhodnocení testování hypotéz.....	117
5.5. Přínos práce, začlenění výsledků do širšího kontextu směřování dalšího výzkumu	118
6. Závěr	120
Seznam citované literatury:	123

Seznam zkratek:

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonic acid)

APX - askorbátperoxidáza

CAT - kataláza

CDNB - 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

Čh, Sh - čerstvá hmotnost, suchá hmotnost

DCNB - 1,2-dichloro-4-nitrobenzen

dH₂O - destilovaná voda

DMF - dimethylamid kyseliny mravenčí

F_o - minimální hodnota fluorescence

F_m - maximální fluorescence

F_v - variabilní fluorescence

F_v/F_m - poměr mezi variabilní a maximální fluorescencí

F_v/F_o - poměr mezi variabilní a minimální fluorescencí

GPX - guajakolperoxidáza

GR - glutathionreduktáza

GST - glutathion-S-transferáza

pNBC - 4-nitrobenzyl chlorid

pNBoC - 4-nitrobenzoyl chlorid

PUFA - polynenasycené mastné kyseliny

PUT - putrescin

PX - peroxidáza

ROS - reaktivní formy kyslíku

SOD - superoxiddismutáza

Sv - sievert, jednotka radiace

TA - kyseliny vinná

Th - thorium

TRIS - 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

ÚEB AVČR - Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky

1. Úvod

Těžké kovy včetně radionuklidů jsou přirozenou součástí životního prostředí. V přírodě běžně nalezneme místa s vyšší koncentrací těžkých kovů, ovšem tyto kovy jsou vázané v horninách, a jako takové jsou pro rostliny jenom těžko dostupné. Prostřednictvím lidské činnosti ale již celá staletí dochází k uvolňování těchto kovů z nedostupné formy sloučenin, čímž se stávají snadněji dostupné pro všechny živé organismy.

Zvyšující se zájem o využívání těžkých kovů, ale též potřeba fosilních paliv, jejichž nedílnou součástí jsou těžké kovy včetně radionuklidů, zřejmě souvisí se zvyšující se populací lidí, ale též se změnami životního stylu lidí, které vedly po tisíciletí a staletí k rozvoji zemědělství a průmyslu. Kovy (hlavně měď, stříbro a zinek) byly jedněmi z prvních surovin, které lidé začali využívat a to již na konci doby kamenné přibližně před 6500 lety. Od této doby využívání těžkých kovů neustává, naopak, jejich potřeba se neustále zvyšuje. Od průmyslové revoluce také dochází ke stále vyššímu využívání fosilních paliv, což vedlo ke stále většímu znečištění životního prostředí těžkými kovy včetně radionuklidů během posledních 300 let.

Přímé využívání radionuklidů (především uranu) a s tím spojená kontaminace životního prostředí je výsadou až posledního století, kdy se začal zejména uran využívat v jaderné energetice. Znečištěná území radionuklidy najdeme také v České republice. Jedná se zejména o uranové haldy, které vedle uranu obsahují také vysoké množství thoria, ten je mnohdy v haldách obsažen ve vyšší koncentraci nežli samotný uran. Tyto haldy jsou náchylné k erozím, díky kterým může opětovně docházet k uvolňování radionuklidů do prostředí. Proto je nutné haldy stabilizovat a uchránit je tak proti erozím např. pomocí obnovy vegetace. Pro rekultivaci radionuklidy kontaminovaného prostředí je vhodné využít rostlinné druhy, které jsou schopné akumulovat velké množství kovů ve své stélce a translokovat je do nadzemních částí rostlin. Tyto hyperakumulující druhy tedy můžeme využít pro fytořemediaci kontaminovaných ploch, kdy dochází k odstraňování kovů z půdy za pomoci rostlin.

Thorium zatím nepředstavuje kov, který by měl široké využití, naopak jeho využívání v dnešní době je spíše sporadické, což je zřejmě způsobené strachem, který radioaktivita vyvolává. Nicméně se jedná o prvek, který má značný potenciál pro budoucí využití v jaderné energetice. Proto jsem se ve své práci zaměřila právě na tento kov, jehož spotřeba se v blízké době bude zcela jistě zvyšovat a spolu s tím se také bude zvyšovat plocha kontaminovaná tímto kovem. V předložené diplomové práci se jednak věnuji schopnosti druhu tabáku *Nicotiana glutinosa* (L.) akumulovat thorium ve své stélce a též sledování stresových fyziologických

markerů, které indukují, jaký vliv má thorium na tyto rostliny a jak různé faktory ošetření rostlin mohou odpověď rostlin tabáku změnit.

1.1. Cíle práce

- 1. Vyhodnotit vliv sledovaných faktorů ošetření (fosfátová výživa, přidání kyseliny vinné do média a postřik putrescinem) na akumulaci Th v rostlinách *Nicotiana glutinosa* (L.) a jejich orgánech.**
- 2. Vyhodnotit odpověď *Nicotiana glutinosa* (L.) na přítomnost Th v médiu na úrovni fyziologických markerů:**
 - obsahu vody v rostlinách
 - vybraných parametrů fotosyntetického aparátu
 - detekce oxidativního stresu
- 3. Vyhodnotit, jak bude odpověď rostliny na Th na úrovni fyziologických markerů ovlivněna různými faktory ošetření rostlin (fosfátová výživa, přidání kyseliny vinné do média a postřik putrescinem)**

1.2. Hypotézy

1. Přítomnost Th v rostlině způsobuje vznik oxidativního stresu.
2. Akumulace Th v rostlině vede ke snižování obsahu fotosyntetických pigmentů.
3. Přítomnost organických kyselin v médiu povede ke zvyšování obsahu Th v rostlině.
4. Ošetření polyaminy postřikem nadzemních částí rostlin povede k nižší akumulaci Th v rostlinách. Vyšší koncentrace putrescinu vede k nižšímu příjmu Th kořeny.
5. Absence fosfátových iontů v médiu povede k vyšší akumulaci Th

2. Literární úvod

Ionizující záření je přirozenou součástí přírody a vesmíru a my mu tedy nemůžeme uniknout. Rozlišujeme dva typy ionizujícího záření, a to kosmické a přírodní záření. Kosmické záření dopadající na Zemi pochází jednak z vesmíru, ale také přímo ze Slunce. Kosmické záření je tvořeno především protony (jádry helia) a ty po vstupu do atmosféry interagují s atomy prvků obsažených v atmosféře za vzniku tzv. kosmogenních radionuklidů (např. tritium ^3H , uhlík ^{14}C). Přírodní záření je tvořeno dvěma typy radionuklidů. A to primárních radionuklidů (^{40}K , ^{232}Th , ^{235}U a ^{238}U), které již byly součástí výbuchu supernovy na počátku vzniku naší sluneční soustavy. Z těchto radionuklidů v jejich rozpadových řadách vznikají tzv. sekundární radionuklidy (např. ^{233}Th , ^{233}Pa), které mají mnohem kratší poločas rozpadu. Dodnes známe tři rozpadové řady a to thoriovou, uranovou a aktinouranovou rozpadovou řadu (ATSDR 1999, Musílek 2012).

Přibližně 80 % z celkového záření, kterému jsme vystaveni je přírodního nebo kosmického původu, ale toto číslo se zřejmě bude v důsledku zvyšujícího se podílu umělé radioaktivity a v důsledku využívání a zpracovávání přírodních radionuklidů snižovat, přičemž celkové ozáření se může zvyšovat. Vzhledem k nadějnému využívání thoria v jaderné energetice se dá očekávat, že se bude zvyšovat ozáření v místech těžby thoria. Nyní průměrná světová expozice ozáření je 3,5 mSv za rok, ale již dnes existují místa, např. v blízkosti hald, kde tyto hodnoty překračují i 100 mSv za rok.

2.1. Thorium

Thorium je přirozeně se vyskytující mírně radioaktivní prvek, který se vyskytuje po celém světě. Radíme ho spolu s uranem mezi primární (neboli původní) radionuklidy a díky jeho vysoké hustotě - $11,7 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$ ho zároveň radíme mezi těžké kovy (viz kap. 2.4.1.). Thorium je prvek, který je v malém množství přítomen ve všech horninách, půdách nebo ve vodě a v nízkých koncentracích je také přítomný ve všech živých organismech.

2.1.1. Historický objev thoria

První zmínky o Thoriumu pochází z roku 1828, kdy jej objevil švédský chemik Jons Jakob Berzelius, který jej pojmenoval Thorium podle skandinávského boha hromu Thorovi. Ovšem na radioaktivní vlastnosti thoria jako první upozornil až roku 1898 v Berlíně Gerhard C. Schmidt a nezávisle zhruba o tři měsíce později ve Francii také Marie Curie popsala radioaktivitu tohoto prvku. Schmidt již v té době poukazyval na podobné chování thoria a uranu. Předpokládal, že za podobnou aktivitu může vysoká relativní atomová hmotnost obou prvků (kterou odhadl jako $240 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro uran a $232 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro thorium). Relativní atomová hmotnost thoria se ale podařila prokázat až roku 1909 (Fry a Thoennessen 2013).

2.1.2. Fyzikálně-chemické charakteristiky thoria

Thorium je druhým prvkem z řady aktinoidů. Jedná se o slabě radioaktivní kov, který nemá žádný stabilní izotop. Více než 99 % thoria se v přírodě vyskytuje ve formě ^{232}Th . Dále se v přírodě vyskytují izotopy ^{234}Th (s poločasem rozpadu 24 dní), ^{231}Th (s poločasem rozpadu 1,06 dní), ^{230}Th (s poločasem rozpadu 7 000 let), ^{228}Th (s poločasem rozpadu 1,9 let) a ^{227}Th (s poločasem rozpadu 18,7 dní). Poločas rozpadu majoritního izotopu ^{232}Th je téměř 14 mld. let. Dodnes již bylo objeveno celkem 33 izotopů thoria 206-238, z nichž ale většina byla vyrobena uměle, ale předpokládá se, že jich může existovat ještě dalších 70 (ATSDR 1990, Fry a Thoennessen 2013).

Elementární thorium je stříbřitě bílý lesklý kov s elektronovou konfigurací $[\text{Rn}]: 7s^2 5f^0 6d^2$. Jeho elektronegativita dle Paulinga je 1,3. Elementární thorium má protonové číslo 90 a vyskytuje se pouze v oxidačním stavu +4. Jedná se tedy o silný kationt, který s dalšími prvky ochotně vytváří sloučeniny. Proto také v přírodě nemůžeme najít čisté elementární thorium (Roos a Jakobsen 2007, Suchara et al. 2007).

2.1.3. Výskyt thoria

Thorium se do životního prostředí uvolňuje přirozeně prostřednictvím vulkanické činnosti a erozí. Stále častěji se thorium uvolňuje do prostředí také prostřednictvím antropogenních činností - spalování fosilních paliv, zpracovávání rud, těžba uranu a thoria

(ATSDR 1990), ale rovněž používáním fosfátových hnojiv, která obsahují vysoká množství uranu a thoria (Roos a Jakobsen 2007).

Dlouho se myslelo, že thorium je vzácný prvek, ale ukázalo se, že se na Zemi vyskytuje v poměrně vysoké koncentraci, průměrně $9,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Jeho koncentrace v zemské kůře odpovídá přibližně poloviční koncentraci celkového množství olova ($16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a zhruba dvojnásobné koncentraci arzenu ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). V porovnání s uranem ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) je potom thorium v zemské kůře přibližně 3x hojnější (Patniak 2003, Ragheb 2011).

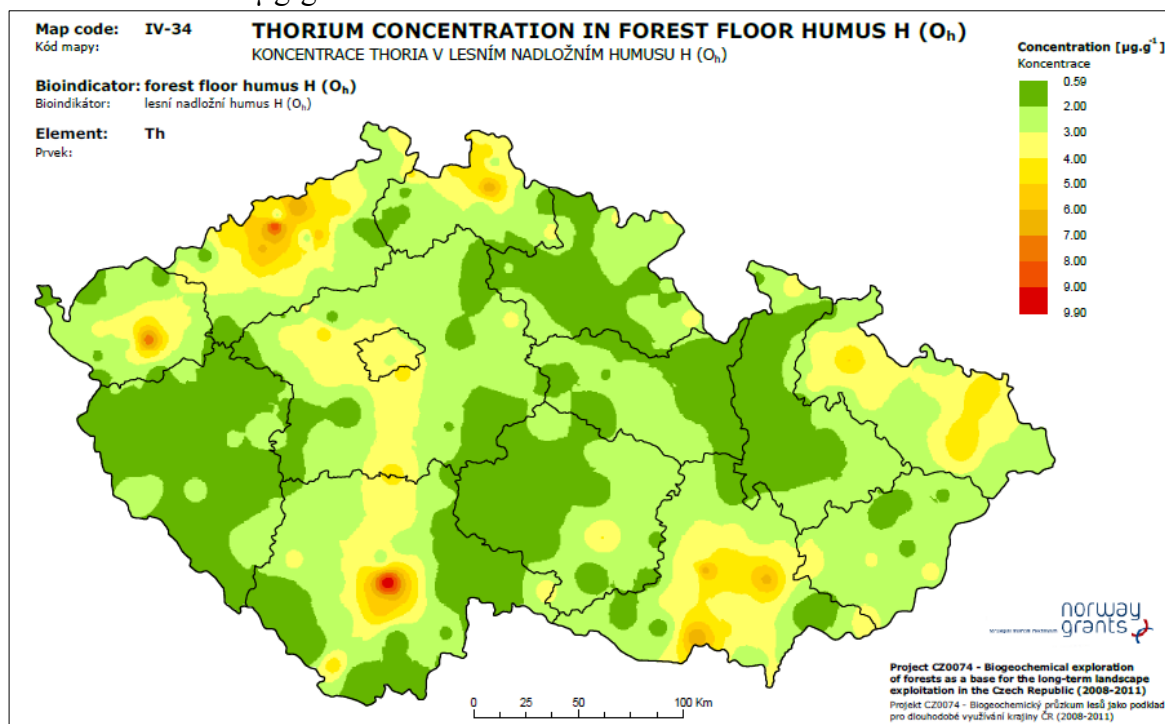
Thorium je rozšířené po celém světě, ovšem jeho největší zásoby jsou v Indii, Brazílii, Austrálii a USA. Celosvětově zásoby thoria shrnuje tabulka 1.

Státy	tun
Indie	846 000
Brazílie	632 000
Austrálie	595 000
Spojené státy Americké	595 000
Egypt	380 000
Turecko	374 000
Venezuela	300 000
Kanada	172 000
Rusko	155 000
Jihoafrická republika	148 000
Čína	100 000
Norsko	87 000
Grónsko	86 000
Finsko	60 000
Švédsko	50 000
Kazachstán	50 000
Ostatní země	1 725 000
Svět celkem	6 355 000

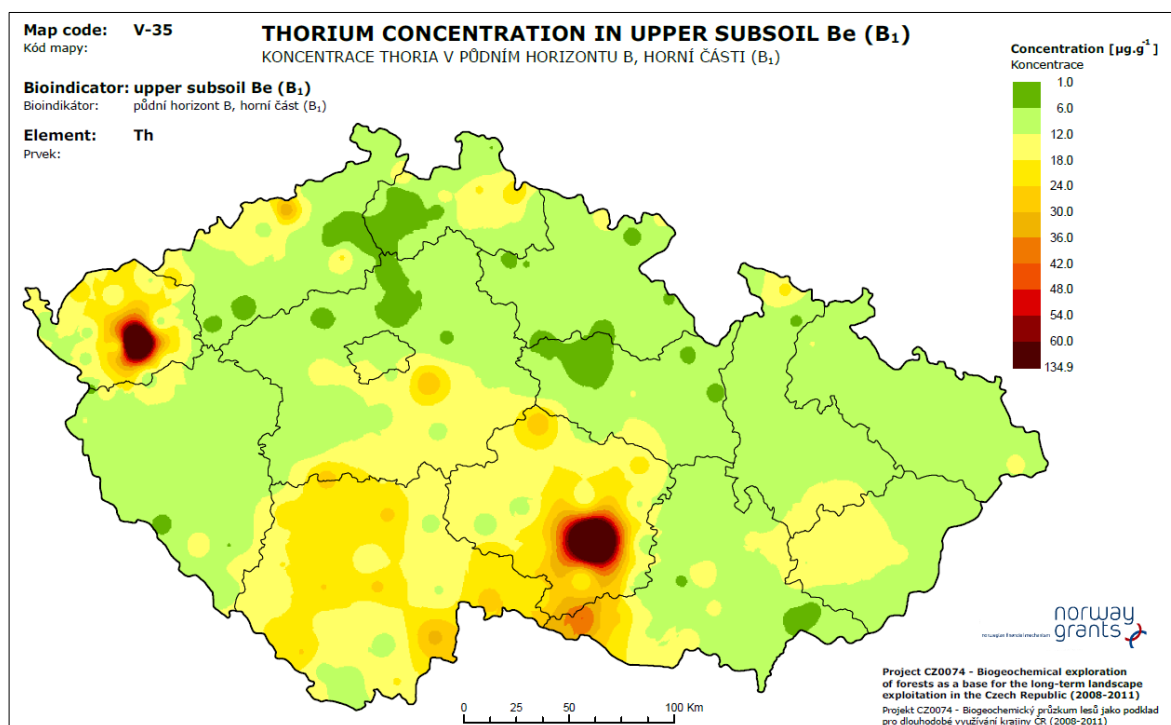
Tab. 1.: Odhadované zdroje thoria (převzato z World Nuclear Association)

Doposud zatím nemáme přesné informace o zásobách thoria v České republice. Nicméně sledováním jeho obsahu v půdě se v rámci práce věnované biochemickému průzkumu lesů věnovali pracovníci z VÚKOZ, v.v.i.. Obrázek 1 znázorňuje obsah thoria v půdním horizontu A, který bývá také označován jako humusový horizont. V tomto horizontu dochází k promíchávání organické hmoty s minerální částí půdy. Obrázky 2 a 3 znázorňují koncentrace thoria v půdním horizontu B, který bývá označen jako anorganický horizont. Tento horizont byl v práci rozdělen na svrchní (obr. 2) a spodní (obr. 3) horizont (VÚKOZ, v.v.i.).

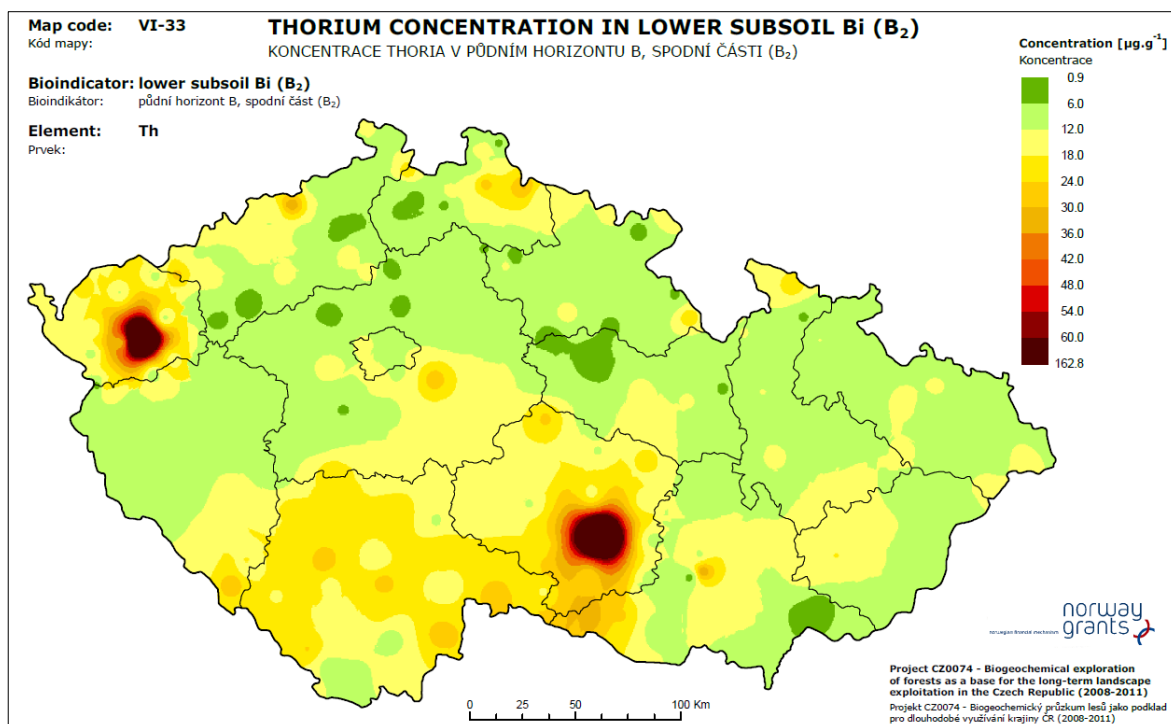
Z map je patrné, že množství thoria v nadložním humusu je v celé republice velice nízké. Jeho maximální koncentrace v jihočeském a ústeckém kraji nedosahují ani $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Ale koncentrace thoria v anorganickém horizontu půdy je již mnohem vyšší, přičemž nejvyšší množství thoria bylo zjištěno v Karlovarském kraji a na Vysočině, kde dosahovalo vyšší koncentrace než $160 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.



Obr. 1.: Koncentrace thoria v lesním humusu (převzato z VÚKOZ, v.v.i.)



Obr. 2.: Koncentrace thoria v lesích ve svrchní části půdního horizontu B (převzato z VÚKOZ, v.v.i.)



Obr. 3.: Koncentrace thoria v lesích ve spodní části půdního horizontu B (převzato z VÚKOZ, v.v.i.)

Tato práce se ale věnovala pouze sledování množství thoria v lesních půdách a tak můžeme předpokládat, že na našem území najdeme půdy a rudy, které budou obsahovat vyšší množství thoria, podobně jako například v Indii. Na sledování obsahu thoria v českých masivech se ve své práci zaměřil Goliáš (2002). Nicméně ve své práci detailně sledoval pouze 7 míst, kde se vyskytuje thorium, proto stále nemáme přesné informace o celkovém množství thoria na našem území. Nejvyšší obsah thoria naměřil v lokalitě Brtná poblíž Dolního Žandova, kde sledovaný materiál obsahoval $126\text{--}542\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Th.

Thorium je na rozdíl od uranu špatně rozpustné ve vodě, což je dáno jeho velkou reaktivitou, která vede k tvorbě komplexů s dalšími prvky. Jeho obsah v mořské vodě je průměrně $7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. O to vyšší množství thoria ale najdeme v pískách, zejména v monazitových pískách, které jsou nejdůležitějším zdrojem thoria. Monazitové písky $[(\text{Ce},\text{La},\text{Th},\text{Nd},\text{Y})\text{PO}_4]$ jsou fosforečnany vzácných zemin, které mohou obsahovat až 26 % thoria, v průměru ale obsahuje 6-7 % Th. Thorium se vyskytuje i v dalších vzácných minerálech jako je thoranit (ThO_2), který obsahuje až 88 % thoria, thorit (ThSiO_4) 64,1 % nebo brannerit obsahující až 47 % thoria (Suchara et al. 2007, Ragheb 2011).

3.1.3. Antropogenní využití thoria

Thorium zatím nemá moc široké využití, což je dáno zřejmě obavami z jeho radioaktivity. Pro antropogenní využití thoria se používají zejména monazitové písků, ze kterých se získávají prvky vzácných zemin a thorium tak představuje odpadní produkt.

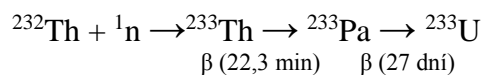
V průmyslové výrobě je významné využívání zejména oxidu thoričitého. ThO_2 je vysoce nerozpustnou a teplotně stabilní sloučeninou, jehož teplota tání je $3300\text{ }^\circ\text{C}$. Tyto vlastnosti ho tak předurčují k využívání ve výrobě materiálů, od nichž se očekává vysoká tepelná odolnost. Oxid thoričitý se používá například k výrobě keramiky, skla nebo tavících kelímků, které musí být teplotně vysoce odolné. Dále se také používá na výrobu žíhací punčochy pro plynové osvětlení nebo se z něj vytváří elektrody, které se používají pro obloukové svařování. Malé množství thoria se přidává také do slitin hořčíku, což vede ke zvýšení mechanické odolnosti materiálu. Takové slitiny se potom používají například v leteckém průmyslu nebo v kosmonautice. Všechny tyto produkty jsou ale určeny zejména pro průmyslové a laboratorní použití (ATSDR 1990, Patniak 2003).

Ovšem využití ThO_2 může být také více praktické, jelikož se používá ve sklářském průmyslu. Skláři přidávají thorium do skloviny, čímž docílí zvýšení indexu lomu a snížení rozptylu světla vyrobeného skla. Z takto vyrobeného skla se následně vyrábí například čočky, které se používají do fotoaparátů nebo laboratorních přístrojů (Saxena et al. 1991).

Thorium se vedle uhlíku, olova nebo uranu také využívá k radiometrickému datování stáří hornin. Například Hall a Henderson (2001) použili datování pomocí uranu a thoria k určení stáří jezer v Antarktidě. Thomas et al. (2009) pomocí uranového a thoriového datování byli schopni určit nejen stáří fosilních korálů, ale také dokázali namodelovat zvyšující se a snižující se hladinu moří v předposledním interglaciálu (před zhruba 137 000 lety).

Ovšem největší potenciál thoria, je v jeho využívání jako paliva na výrobu jaderné energie. Výzkum a vývoj thoriem poháněných jaderných reaktorů je v plném proudu. Nejvíce se tímto výzkumem zabývají země, které mají velké nerostné bohatství thoria – Čína, Austrálie, USA, Rusko, ale také rozvojové země jako je Indie, Brazílie nebo Turecko, které jednak mají velké nerostné bohatství thoria, ale především nemají prakticky žádné zdroje uranu. Thorium tak pro ně představuje „levnou“ alternativu, jak získat energii (Ünak 2000). Nejdál se ve výzkumu využití thoria dostali v Indii, kde dnes již stojí jaderná elektrárna, poháněná i thoriem – Kalpakkam.

Izotop thoria ^{232}Th jako samotný není štěpitelný. Aby se mohl využít jako palivo, musí se nejprve změnit na izotop s lichým počtem neutronů. To znamená, že nejprve musí izotop ^{232}Th zachytit neutron, aby se postupně přeměnil na ^{233}U , který již je štěpitelný. Tuto přeměnu znázorňuje rovnice (Nuttin et al. 2005):



Výhodou thoria na produkci energie je, že thorium je oproti uranu přibližně 3 x hojnější, je méně radiotoxické a jeho těžba je ekonomičtější než těžba uranu. Další výhodou je, že všechny vzniklé produkty při přeměně ^{232}Th na ^{233}U jsou krátkodobé a mohou tedy být také využity na tvorbu energie. Vyhořelé palivo díky tomu nebude tolik radioaktivní (v porovnání s uranovým palivem) a bude tedy představovat menší nebezpečí. Vůbec největší výhodou ale je, že thorium je oproti uranu lehčí prvek, který je poměrně stabilní, takže je prakticky nemožné využít ho k tvorbě jaderných zbraní (Ünak 2000, IAEA 2013, Ashley et al. 2015).

2.2. Fytoremediace

Na planetě je zatím málo míst, která by byla kontaminovaná thoriem. Tato místa bychom dnes našli především v Indii. Ale znečištění thoriem se bude zvyšovat spolu s jeho využitím v jaderné energetice, z tohoto důvodu je důležité se již dnes zabývat tím, jaký vliv bude mít thorium na rostliny a jak ho budou rostliny přijímat a transportovat do nadzemních částí, čímž mu otevřou cestu i do potravinového řetězce živočichů včetně člověka. Důležité je také zjistit, jaké úpravy hlušiny povedou k vyššímu příjmu thoria do rostliny a co ovlivňuje jejich translokaci do nadzemních částí, což by mohlo vést k využívání rostlin k odstraňování nadbytečného množství thoria z půdy.

Fytoremediace je souhrnný název pro metody odstraňování kontaminantů (těžké kovy, radionuklidy, herbicidy, pesticidy, barviva, léky, detergenty) z prostředí pomocí rostlin. Přestože fytoremediace jsou poměrně novým a aktuálním tématem výzkumu, ve světě se již využívají běžně rostliny k čištění kontaminovaných půd a vod (Huang et al. 1998, Lee a Yang 2010, Mihucz et al 2008).

Termín fytoremediace označuje všechny metody využívání rostlin ke stabilizaci, akumulaci nebo rozkladu nebezpečných kontaminantů, jako jsou těžké kovy, metaloidy,

polycyklické aromatické uhlovodíky a radioaktivní sloučeniny, které zatěžují životního prostředí (Sharma a Pandey 2014). Fytoremediace by tak mohla být alternativou k dnes využívaným klasickým způsobům odstranění kontaminujících látek z prostředí za pomoci těžké techniky, což je drahá metoda, která vede k intenzivnímu narušování životního prostředí. Hlavní výhodou fytoremediace je právě šetrný přístup k přírodě. Díky fytoremediaci v půdě vzrůstá množství organického uhlíku, který stimuluje aktivitu mikroorganismů. A jak jsem již psala, oproti klasickým způsobům dekontaminace pomocí těžké techniky se jedná o levný způsob dekontaminace prostředí, který předpokládá využívání známých agrotechnických postupů běžně používaných při zemědělském hospodaření. Díky těmto vlastnostem, jsou fytoremediační metody pozitivně vnímány širokou veřejností.

Fytoremediace ale má také několik nevýhod oproti klasickým metodám dekontaminace. Hlavní nevýhodou je nutná biologická přístupnost kontaminantů z vody a půdy do rostliny. Další nevýhodami jsou velká časová náročnost (často pomalý růst, nízký transport kontaminantů rostlinou a často i malá velikost vhodných rostlin schopných akumulace velkého množství kontaminantů v biomase) a možnost ovlivnění průběhu dekontaminace změnou životních podmínek (dostupnost vody, živin). A jako další velká nevýhoda potom bývá vnímána „neschopnost“ rostlin odstranit 100 % kontaminujících látek z prostředí (Kučerová et al. 1999, Sharma a Pandey 2014, Vaněk et al. 2002).

Fytoremediační metody, ačkoliv si jsou podobné, lze podle metodického postupu rozdělit do dvou velkých skupin – fytodekontaminace a fytostabilizace.

2.2.1. Fytodekontaminace

Fytodekontaminace zahrnuje soubor metod, které vedou k odstranění kontaminantů z půdy a vod.

2.2.1.1. Fytoextrakce

Tato metoda někdy bývá také nazývána jako fytoakumulace. Metoda je založena na příjmu kontaminantů, zejména těžkých kovů kořeny rostlin a jejich následné translokace a akumulace v nadzemních orgánech rostlin. Aby mohla být použita tato metoda, musí rostliny přijímat velké množství kovů z půdy do kořenů a musí je translokovat do nadzemních částí.

Zároveň by také měly produkovat velké množství nadzemní biomasy a samozřejmě by měly tolerovat velké koncentrace kovů nahromaděné v jejich biomase. Takovým rostlinám říkáme hyperakumulátory.

Výhodou této metody je díky sklizni vytvořené biomasy trvalé odstranění kontaminantů z půdy. Kromě toho je množství odpadního produktu, který se musí zlikvidovat, podstatně menší oproti konvenčním metodám. Použití hyperakumulujících druhů je ale omezeno pomalým růstem rostlin, mělkým kořenovým systémem a nízkou produkcí biomasy. Proto jsou tyto metody vhodné spíše na „dočišťování“ půd (Rascio a Navari-Izzo 2011, Sharma a Pandey 2014).

Dnes již existují dvě práce, které se zabývaly fytoakumulací v místech s vysokým obsahem Th. První práce (Hinton et al. 2005) sledovala akumulaci schopnosti dominantních druhů stromů, které rostly v mokřadech kontaminovaných uranem a thoriem v Jižní Karolině. Mezi vybranými dřevinami existovaly významné rozdíly ve schopnosti akumulovat Th a U (nejméně Th, resp. U akumulovala borovice kadidlová (*Pinus taeda*) – 0,2 mg·kg⁻¹ resp. U 0,3 mg·kg⁻¹, nejvíce Th akumulovala tupela lesní (*Nissa sylvatica*) – 6,2 mg·kg⁻¹, nejvíce U akumulovala ambroň lesní (*Liquidambar styraciflua*) – 8,2 mg·kg⁻¹). Nicméně všechny druhy stromů byly schopné akumulovat přibližně 10x vyšší množství Th a U než je běžně udáváno pro rostliny. Proto autoři navrhli, že by se mohlo jednat o přirozenou fytoremediaci prostředí.

Druhá práce (Mihucz et al. 2008) se již zabývala fytoremediací opuštěných uranových hald v Maďarsku. Celkem na tyto haldy bylo nasazeno 20 druhů stromů, z nichž nejúspěšnější byly druhy *Populus nigra*, *Populus canescens*, *Populus alba*, *Quercus pubescens*, *Eleagnus angustifolia* a *Robinia pseudoacacia*. Tyto stromy měly zabránit erozím půdy a jejímu odplavení. Všechny stromy akumulovaly poměrně velké množství U (v rozmezí 28,7-1045 ng·g⁻¹) i Th (v rozmezí 2,62-73 ng·g⁻¹) v listech. Nejvyšší množství obou radionuklidů byly naměřeno v listech topolů. Nejnižší množství U resp. Th potom bylo naměřeno v listech dubu. Autoři tyto výsledky vysvětlují velmi pomalým růstem dubu a naopak rychlým růstem topolů. Mimoto druh *P. canescens* byl jedinou dřevinou, která se na haldách vyskytovala přirozeně, proto ji považují za U, Th-hyperakumulující rostlinu.

K fytoextrakci je vhodné využití i bylin. Například Kötschau et al. (2014) sledovali možné využití slunečnice v půdách znečištěných uranem v Německu, které obsahovaly 7,75 μg·g⁻¹ U. Zjistili, že slunečnice je vhodnou rostlinou pro fytoremediaci půd znečištěných uranem a dalšími těžkými kovy. Maximální extrakce všech těžkých kovů (Cd, Co, Cr, Cu, Fe,

Mn, Ni, Pb, Th, U, Zn) z kontaminované půdy bylo dosaženo po 140-170 dnech. Jako hlavní výhodu využití slunečnice vidí její možné další využití jako biopaliva, protože sklizený materiál může být použit pro výrobu energie. To by mohlo přispět ke snížení pěstování bioenergetických rostlin první generace na orné půdě, která by měla sloužit především pro pěstování rostlin určených ke krmným a potravinářským účelům. Podobnou práci na akumulaci uranu slunečnicemi provedli také Mihalík et al. (2012).

2.2.1.2. Rhizofiltrace

Rhizofiltrace je podobná metoda jako fytoextrakce, pouze rostliny jsou používány pro čištění podzemních, povrchových a odpadních vod za účelem odstranění kovů nebo jiných anorganických sloučenin rozpustných ve vodném prostředí. Pro tento způsob fytodekontaminace je ideální použít rostliny s rychle rostoucím kořenovým systémem. Hlavní nevýhodou této metody je nutnost předpěstování rostlin a jejich pravidelná sklizeň a likvidace (Sharma a Pandey 2014).

Rhizofiltrace se ukázala jako zvláště vhodná při záchytu radionuklidů, které byly akumulovány kořeny rostlin *Phaseolus vulgaris*. Fazole byly předpěstovány v hydroponických médiích a po třech týdnech byly přesazeny do vody uměle kontaminované uranem nebo cesiem (v rozmezí 100-700 $\mu\cdot l^{-1}$) bez přídavku dalších hnojiv. Po 72 hodinách rostliny obsahovaly 317-1019 x více (v závislosti na koncentraci, ve které rostly) uranu a cesia než byla počáteční koncentrace obou prvků v rostlinách. Přičemž většina uranu a cesia (až 95 % z celkově akumulovaných prvků) byla imobilizována v kořenech. Tato studie tak potvrdila, že fazole má dobrou schopnost pro rhizofiltraci vod kontaminovaných uranem a/nebo cesiem (Yang et al. 2015).

2.2.1.3. Fytovolatilizace

Fytovolatilizace zahrnuje použití rostlin k přetransformování kontaminujících látek (organické sloučeniny jako trichlorethen, ale i anorganické látky, které mají těkavé formy jako některé kovy) přijatých kořeny do těkavých forem a jejich následnou transpiraci do atmosféry. Výhodou je, že jsou tyto látky převedeny na méně toxickou formu, ale nevýhodou je jejich uvolnění do atmosféry (Sharma a Pandey 2014).

Tato metoda není vhodná pro odstraňování radioaktivních prvků z půdy, ale již se využívá pro odstraňování některých těžkých kovů, např. arzenu pomocí kapradiny *Pteris vittata* (Sakakibara et al. 2010).

2.2.1.4. Fytodegradace

Fytodegradace také označovaná jako fytotransformace se používá k odstraňování organických polutantů z půdy a vod za pomoci rostlin a s nimi asociované mikroflóry. Tento proces zahrnuje degradaci složitých organických molekul na jednoduché molekuly. Jeho význam spočívá hlavně v nápravě/odstraňování organických nečistot jako jsou chemická barviva, herbicidy, ropné látky, detergenty apod. (Sharma a Pandey 2014). Například práce Al-Baldawi et al. (2015) se zabývá degradováním nafty, uvolněné do podzemních vod pomocí trvalky sítiny *Scirpus grossus*. Tato rostlina byla schopná v umělých podmínkách degradovat 81,5 % ropných uhlovodíků ve vodě kontaminované 0,1 % nafty. Ovšem tato degradace je zřejmě umožněná díky interakci sítiny s bakteriemi, které usnadňují rozklad ropných uhlovodíků. Tato metoda využívající i bakterie se potom nazývá rhizodegradace.

2.2.1.5. Rhizodegradace

Někdy bývá označována jako fytostimulace. Jedná se o degradaci kontaminantů v kořenech rostlin, nebo v rhizosféře. Předpokládá se, že samotný rozklad provádí mikroorganismy (bakterie, houby a aktinomycety), které jsou součástí rhizosféry. Rostliny do půdy vylučují různé cukry, aminokyseliny a enzymy, které stimulují růst mikroorganismů a ty jsou potom schopné degradovat různé organické polutanty (Sharma a Pandey 2014, Al-Baldawi et al. 2015).

2.2.2. Fytostabilizace

Fytostabilizace je proces využívající rostliny, resp. kořenový systém rostlin ke znehynění kontaminujících látek v půdě a ve vodě. Tento proces vede ke snížení mobility kontaminantů a zabraňuje jejich migraci do podzemních vod, čímž zároveň snižuje jejich biologickou dostupnost do potravinového řetězce. Fytostabilizace se používá hlavně u kovy znečištěných půd a může mít podobu akumulace (zabudování kovů do rostlinných struktur), srážení nebo redukce kovů (převedení na nerozpustnou formu). Například Andreatza et al.

(2011) hodnotili potenciál využití podzemnice olejné (*Arachis pintoi*) rostoucí na vinicích, které často bývají kontaminované mědí. Zjistili, že podzemnice je vhodnou rostlinou pro fytostabilizaci a fytoextrakci takových míst, protože rostliny dosahovaly vysoké produkce biomasy v kontaminovaných půdách a tak byly schopné poměrně velké množství mědi akumulovat v kořenech. Rostliny byly schopné odstranit až 2500 g·ha⁻¹ mědi.

Výhodou samotné fytostabilizace proti ostatním fytoředičným metodám jsou změny, které jsou indukované rostlinou, a které vedou ke změnám v chemismu půdy. Rostliny tak nemusí kontaminanty akumulovat v biomase, takže není nutná likvidace biomasy jakožto nebezpečného odpadu (Sharma a Pandey 2014).

O fytoředičce se toho stále zatím mnoho neví, především stále neznáme možný potenciál různých druhů rostlin k čištění kontaminovaného prostředí. Nicméně již poměrně dlouho jsme schopni využívat fytoředičnou schopnost některých rostlin, a to například k čištění odpadních vod a přírodních koupališť, tzv. biotopů, nebo k přirozeným ředičným bývalých dolů a hlušín, které tu zůstaly po těžbě. O možnostech využití rostlin k „dočištění“ míst kontaminovaných radionuklidy máme zatím omezené množství informací. Předložená práce se pokusí přispět k pochopení této problematiky a to zejména vysvětlením, jak můžeme podpořit vyšší příjem a akumulaci thoria v rostlinách a jeho translokaci do nadzemních částí.

2.3. Vliv thoria na fyziologii rostlin

Zatím existuje poměrně málo prací, které by se věnovaly vlivu thoria na rostliny. První práce, které se věnují thoriumu, se zabývají jeho potenciálem, jakožto možného prvku, který by se dal využít v jaderné energetice. Tyto články pochází ze 70. let 20. století. Nejstarší mně dostupná práce, která popisuje akumulaci několika prvků včetně thoria různými skupinami rostlin (zejména lišejníky a mechy, ale také některými nahosemennými a krytosemennými rostlinami) pochází z roku 1974 (Horovitz et al. 1974). Avšak další práce zabývající se thoriumem a rostlinami se začínají objevovat teprve koncem 90 let 20. stol. Celkem se mi podařilo sehnat pouze 20 prací, které by odpovídaly tomuto tématu, přičemž 7 prací je mladší víc jak 5 let.

Thorium je pro rostliny neesenciální prvek, což znamená, že ho ke své existenci vůbec nepotřebují. V půdě bývá obsažen sice v poměrně nízkém (průměrně 9,6 mg/kg), ale určitě ne v bezvýznamném množství. Thorium bývá v půdě často vázáno v anorganických sloučeninách, v takovém stavu ovšem není pro rostliny biologicky dostupné a proto se s toxicitou způsobenou

thoriumem ve volné přírodě téměř nesetkáme. Naproti tomu vyšší množství biologicky dostupného thoria, které se vyskytuje například na uranových haldách, ale také jako součást fosfátových hornin, z nichž se vyrábí fosfátová hnojiva (Roos a Jakobsen 2007), by mohlo vést k jeho vyšší akumulaci rostlinami. Thorium by se tak mohlo stát součástí potravního řetězce člověka. Nejspíš proto se naprostá většina dostupných prací, který byly dosud publikovány, zabývá akumulacími experimenty.

V práci zaměřené pouze na thorium Zararsiz et al. (1997) sledovali, jak se mění biologická dostupnost Th v závislosti na kyselosti půdy. Autoři sledovali množství naakumulovaného Th ve dvou druzích rostlin (ječmen *Hordeum vulgare* a vikev *Vicia sativa*), které představují důležitý zdroj potravy v Turecku. Rostliny rostly v kyselé (pH 5) nebo zásadité (pH 8) půdě, obohacené o Th (4500 ppm). V obou případech autoři zjistili, že pH má velký vliv na akumulaci Th rostlinami. Zatímco v zásadité půdě ječmen resp. vikev akumulovaly v nadzemních částech rostlin 6,2 resp. 7,6 ppm Th, tak v kyselých půdách to bylo již 10,2 resp. 11,2 ppm Th. Velký vliv pH substrátu na biologickou dostupnost thoria v roce 2010 potvrdili také Guo et al. (2010), kteří provedli akumulacími experimenty na pšenici.

Další práce byly zaměřené na distribuci Th v rostlině. Většina z těchto prací přitom byla orientována na kulturní plodiny - borůvky, okurka a pepř, 16 druhů léčivých rostlin, pšenice, zelenina a ovoce (15 druhů) a tabák (Morton et al. 2002, Ůnak et al. 2007, Oufuni et al. 2011, Shtangeeva et al. 2005, Sathyapriya et al. 2012, Soudek et al. 2013).

Morton et al. (2002) se zaměřili na akumulaci Th a U v nadzemních částech borůvek, které jsou známé svojí schopností akumulovat těžké kovy. Borůvky rostly v albánských horách v místě s přirozeně vyšším obsahem Th ($42 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a U ($22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Celkové naakumulované množství prvku se mezi stonkem a listem v případě U téměř nelišilo, ale v případě Th se tento poměr významně lišil ve prospěch listů. Na základě těchto výsledků autoři vyslovili hypotézu, že thorium je na rozdíl od uranu v rostlinách více mobilní prvek. Ke stejným výsledkům dospěl i Oufuni et al. (2011), který sledoval příjem Th do několika druhů léčivých rostlin, které se používají k léčbě hypertenze a diabetu.

V pracích Shantgeeva et al. (2004, 2005, 2006), které byly vypracovány na pšenici, v práci Ůnak et al. (2007), kde sledovali příjem U a Th u okurek a pepřovníku, nebo v práci Sathyapriya et al. (2012) provedené na různých druzích zeleniny, došli autoři k částečně odlišnému závěru. Všechny práce nezávisle na rostlinném druhu dokumentovaly snižující se akumulaci Th směrem od kořenů přes stonky až k listům, resp. plodům. Předpokládají tedy, že

mobilita Th je velmi malá a směrem k listům se snižuje. Například Sathyaptiya et al. (2012) sledovali akumulaci thoria u různých druhů zeleniny a ovoce, které rostly v thoriem kontaminované půdě na polích v jižní Indii. Zjistili, že nejvyšší koncentrace thoria obsahovaly rostliny tvořící hlízy (kolokázie, maniok, jam), přičemž thorium se akumulovalo zejména v hlízách. Naproti tomu nejméně pak bylo thorium akumulováno v ovocných a zeleninových plodech (banány, papája, rajčata, tykev nebo fazole).

Zajímavá byla také práce Ünak et al. (2007), kde sledovali příjem nejen thoria, ale také uranu u dvou kulturních rostlin – okurka a pepřovník. Pro svoji studii si autoři vybrali právě tyto dva druhy, protože se jedná o rostliny, jejichž plody se konzumují prakticky na celém světě a ve všech sociálních vrstvách. Rostliny byly pěstovány v půdě uměle kontaminované uranem nebo thoriem v množství 263, 1316 a 2633 ppm. Reakce rostlin na oba prvky se výrazně lišila. Pepřovník pěstovaný v nejnižší koncentraci uranu i thoria v půdě prospíval a oproti kontrole rostl výrazně lépe, ale vyšší koncentrace uranu již nepřežil. Okurka se jevila jako druh více citlivý ke kontaminaci způsobené uranem. Při nejnižší koncentraci uranu v půdě rostlina sice vzrostla, ale dařilo se jí výrazně hůř než kontrole, vyšší koncentrace uranu také nepřežila. Naproti tomu v případě thoria byl u okurky pozorován negativní vliv až u rostlin, které rostly v půdě s nejvyšší koncentrací thoria. Ale i v této koncentraci rostliny stále rostly. Podobnou reakci sledovali také u pepřovníku. Vzhledem k tomu, že tento pokus trval celý rok, tak se také věnovali, vlivu thoria na tvorbu plodů. Množství plodů bylo u thoriem nejméně ovlivněných rostlin mírně vyšší oproti kontrole, ale s vyšší aplikací thoria se množství plodů snižovalo. Zdá se tedy, že mírné stresové podmínky mohou některé rostliny spíše posílit – tzv. efekt hormoneze.

Nicméně všechny výše uvedené práce prezentují v kořenech 10x až 100x vyšší množství akumulovaného Th oproti nadzemním částem rostlin. Je známo, že kořeny rostlin jsou schopné akumulovat vysoká množství různých prvků a představují tedy první přirozenou bariéru pro transport kovu včetně radionuklidů, která chrání nadzemní části rostlin (Shtangeeva et al. 2005). V případě thoria se ale jedná o velmi dobrou bariéru. To je způsobeno fyzikálně-chemickými vlastnostmi thoria. Thorium se vyskytuje pouze ve 4 valentní formě. Jedná se tedy o silný kationt, který je považován za vysoce reaktivní, nepohyblivý a špatně rozpustný ve vodě (Oufuni et al 2011). Díky těmto vlastnostem je thorium málo mobilní a snadno se váže na záporně nabitá místa buněčné stěny. Přesto stále zatím nevíme prostřednictvím jakého přenašeče je thorium přijímáno do rostlin, ale vzhledem k tomu, že si je chemicky podobný s uranem, tak můžeme předpokládat, že budou oba prvky přijímány stejnými přenašeči. Ovšem ani v případě uranu zatím neznáme přenašeč, který je odpovědný za jeho transport do buněk.

Mihalík et al. (2012) ve své práci o fytoextrakci uranu slunečnicemi sledovali příjem a translokaci uranu a železa v rostlinách pěstovaných v kontaminované půdě. V experimentu zkoumali vliv aplikace kyseliny vinné na příjem a translokaci uranu, zinku a železa. V případě železa a uranu pozorovali stejné chování, tedy jednak docházelo k nižšímu příjmu obou prvků, ale zároveň docházelo k jejich vyšší translokaci do nadzemních částí rostlin, na rozdíl od zinku, který byl stále nejvíc akumulován v kořenech. Na základě tohoto pozorování navrhli hypotézu, že by příjem a translokace uranu mohly probíhat prostřednictvím transportéru pro železnaté ionty. Soudek et al. (2013) na základě této hypotézy a na základě svých pozorování, kdy zjistil, že deficiencie železa vede k vyššímu příjmu thoria rostlinami tabáku, navrhl, že vzhledem k chemické podobnosti thoria a uranu, by za příjem a translokaci thoria mohl být odpovědný tentýž přenašeč železnatých iontů. Více se touto hypotézou zabývali Wang et al. (2015), kteří sledovali vliv dvoumocných kovových kationtů na akumulaci thoria v rostlinách *Brassica juncea*, pěstovaných v hydroponických médiích. Zjistili, že Zn^{2+} neměl žádný vliv na akumulaci thoria, proto předpokládají, že transport thoria neprobíhá přes Zn^{2+} kanály. Ale Fe^{2+} ionty inhibovaly akumulaci thoria v kořenech. Tyto výsledky tak jsou v souladu s výsledky zjištěnými Soudkem et al. (2013) a ukazují, že by thorium skutečně mohlo být přijímáno přenašeči pro železnaté ionty.

Vlivu akumulace thoria na příjem a akumulaci dalších prvků v rostlinách pšenice si všimli i Shtangeeva et al. (2005). Zjistili, že koncentrace thoria se během experimentů v listech moc neměnila, ale v porovnání s kontrolou se významně měnily koncentrace dalších prvků - rostliny ošetřené Th měly vyšší obsah sodíku a nižší obsah železa a vápníku. Ošetření rostlin thoriem mělo také významný vliv na kořeny, kde bylo pozorováno významné snížení obsahu vápníku. Vyšší akumulace thoria tedy vedla k významnému snížení obsahu vápníku ve všech orgánech (to by mohlo být způsobené schopností thoria vytěsnit vápník z jeho vazeb). Kromě toho ale také došlo k významnému zvýšení poměru K/Na v listech. Ačkoliv tedy nedocházelo k významné translokaci Th do listů, tak právě listy byly částí rostliny, která nejcitlivěji reagovala na thorium a to změnou obsahu živin.

Ovšem toxický účinek thoria závisí především na celkovém množství akumulovaného thoria v rostlinách. Jeho dostupnost a schopnost translokace může být ovlivněna různými vlivy prostředí, jako jsou deficiencie fosforu, přítomnost organické kyseliny v rhizosféře nebo arbuskulární mykorhiza.

Na možný vliv arbuskulární mykorhizy na příjem a akumulaci thoria rostlinami upozornili Roos a Jakobsen (2007). Rostlina *Medicago truncatula* byla pěstována v přítomnosti

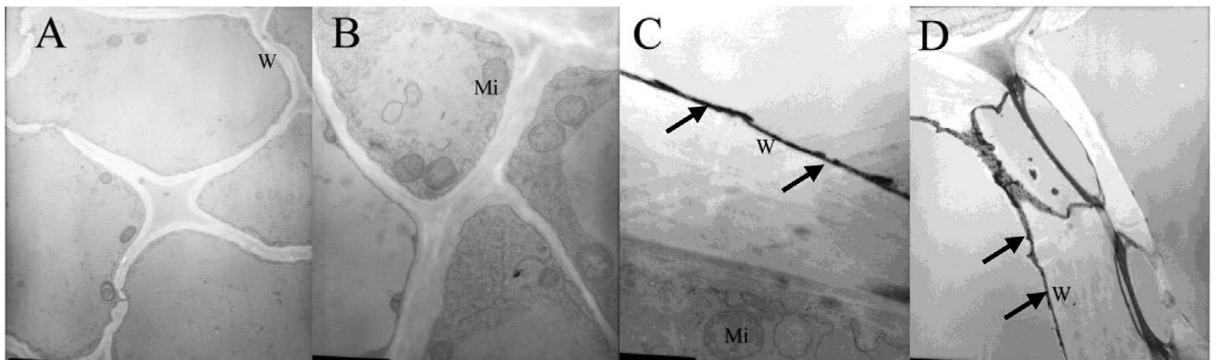
a v nepřítomnosti arbuskulární mykorhizy. Všechny rostliny byly hnojeny fosfátovou horninou sedimentárního původu, která pocházela z Minjingu v Číně. Hornina obsahovala poměrně vysoké množství Th ($270 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a U ($370 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Mezi rostlinami nebyl pozorován rozdíl v příjmu fosforu, ale rozdíl v koncentraci Th, Al, Fe a U v nadzemních částech byl značný (ve stejném pořadí prvků 350x, 180x, 80x a 30x vyšší koncentrace v rostlinách nemykorhizních ve srovnání s mykorhizními rostlinami). Mykorhizní rostliny vykazovaly mnohem menší přenos těžkých kovů z kořene do nadzemních částí rostlin. Mykorhizní houby jsou pro rostliny důležité pro svojí schopnost uvolňovat esenciální kovy z fosfátových hornin (Smith et al. 2004), ale z výsledků také vyplývá, že mykorhiza může vést ke snížení absorpce kovů a umožnit tak růst rostlin i v prostředí kontaminovaném těžkými kovy, čehož se dá s výhodou využít v zemědělské výrobě.

Významný vliv, který může výrazně ovlivnit biologickou dostupnost thoria pro rostliny, měla přítomnost fosfátů. Přídavek fosfátů do média měl za následek okamžitý pokles celkového množství naakumulovaného thoria v rostlinách pšenice (Guo et al. 2010), *Nicotiana tabacum* (Soudek et al. 2013) a *Brassica juncea* (Wang et al. 2015, Zhou et al. 2016).

Také přídavek organické kyseliny (viz kap. 3.4.2.) výrazně ovlivnil příjem a translokaci thoria v rostlinách. Jako první testoval vliv nízkomolekulárních organických kyselin (kyselina citrónová, kyselina šťavelová a kyselina vinná) přidaných do médií na akumulaci thoria rostlinami Soudek et al. (2013). Rostliny tabáku rostly v hydroponickém médiu obsahující 0,25 mM thoria a 0,5 mM organické kyseliny. V listech sice nepozorovali žádné změny v celkovém obsahu thoria, ale v kořenech bylo pozorováno výrazné zvýšení množství naakumulovaného thoria, zejména v přítomnosti kyseliny citrónové a kyseliny vinné. Ale v práci Wang et al. (2015), kde sledovali také vliv různých hydroponických podmínek na akumulaci thoria v rostlinách *Brassica juncea*, došli k opačnému výsledku. Přítomnost organické kyseliny (kyselina citrónová, kyselina šťavelová a kyselina mléčná) vedla sice k nižšímu příjmu thoria do kořenů, ale k jeho vyšší translokaci do nadzemních částí rostlin.

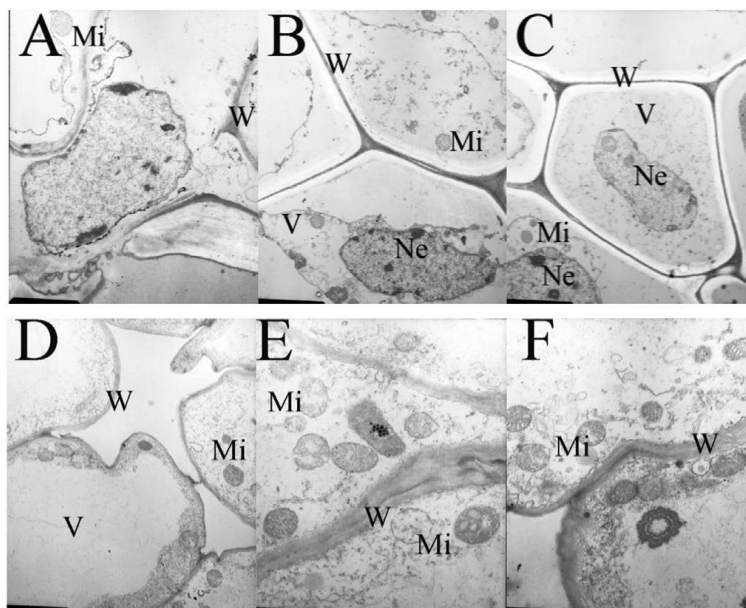
Soudek et al. (2013) ve své práci sledovali také působení polyaminů (zejména putrescin), kterými byly ošetřovány listy tabáku, rostoucí v médiu obsahující 0,1 mM thoria. U rostlin, které byly stříkány polyaminy, došlo ke snížení akumulovaného thoria ve všech orgánech. Výsledky tedy prokázaly, že polyaminy mohou ovlivnit příjem thoria rostlinami, ale sami autoři upozorňují, že nižší akumulace Th rostlinami mohla být také způsobená zvýšením pH média po přidání polyaminů, proto se jim nepodařilo prokázat přímý vliv polyaminů na akumulaci thoria.

Všechny výše zmíněné práce se zabývaly akumulací thoria na úrovni orgánů rostlin. Teprve letos v březnu vyšel první článek (Zhou et al. 2016), který se zabývá distribucí thoria na úrovni buněk. Rostliny *Brassica juncea* rostly v hydroponických médiích s 0,05-0,5mM přídatkem thoria. Výsledky ukázaly, že Th se přednostně akumuluje v buněčných stěnách, poté v plasmatické membráně a cytosolu a nejmenší množství thoria se akumuluje v jednotlivých organelách a dalších kompartmentech. Buněčná stěna obsahuje záporně nabitá místa, fosfáty a proteiny, na které se thorium přednostně váže (viz obr. 4). Proto buněčná stěna a její složení hraje zřejmě nejdůležitější roli v toleranci rostlin vůči thoriumu.

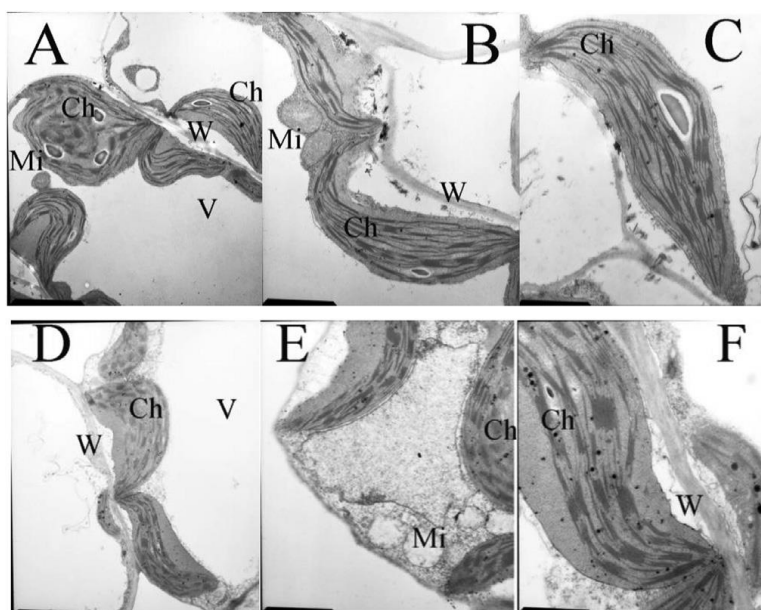


Obr. 4.: Buňky primární kůry kořene *B. juncea*; A,B - kontrolní rostliny; C,D - rostliny rostoucí v přítomnosti Th (0,5mM) po dobu 14 dní; šipky označují místa, kde se sráží Th, W - buněčná stěna, Mi – mitochondrie (převzato z Zhou et al. 2016)

Vyšší koncentrace thoria (0,5 mM) v médiu vedla k deformacím kořenových buněk, zejména k deformacím buněčné stěny a k poškození mitochondrií, které byly jakoby napučené (viz obr. 5). V buňkách listů sice nebyly pozorovány žádné deformace na úrovni buněčné stěny nebo chloroplastů, ale struktura tylakoidů byla oproti kontrole narušená a mitochondrie byly opět ve srovnání s kontrolou „nateklé“ (viz obr. 6).



Obr. 5.: Buňky primární kůry kořene *B. juncea*; A,B,C – kontrolní rostliny; D,E,F – rostliny rostoucí v přítomnosti Th (0,5mM) po dobu 14 dní; W – buněčná stěna, Mi – mitochondrie, Ne – jádro, V – vakuola (převzato z Zhou et al. 2016)



Obr 6.: Buněčná struktura mezofylových buněk listů *B. juncea*; A,B,C – kontrolní rostliny; D,E,F – rostliny rostoucí v přítomnosti Th (0,5mM) po dobu 14 dní; W – buněčná stěna, Mi – mitochondrie, Ch – chloroplast, Ne – jádro, V – vakuola (převzato z Zhou et al. 2016)

Výsledky této práce potvrzují, že se rostliny s nízkým množstvím thoria v médiu umí velmi dobře vypořádat, tyto koncentrace dokonce podpořily jejich růst. Ale vysoké koncentrace thoria vedly k omezení růstu rostlin v důsledku poškození organel.

Práci se zcela odlišnými výsledky publikovali Evseeva et al. (2011). Sledovali vliv thoria a uranu na reprodukční schopnosti borovice lesní (*Pinus sylvestris*), která rostla přirozeně v oblasti, kde se ukládá hlušina ze zpracování uranové rudy. Za experimentální rostlinu si

vybrali borovici, protože jehličnaté stromy jsou považovány za rostliny, které citlivěji reagují na záření než krytosemenné rostliny. Ve sledovaném místě se nacházely stromy s maximálním stářím kolem 30 let. Pro experiment si vybrali 12-15 let staré stromy, které byly vystavené 12x vyššímu množství radioaktivity než rostliny z kontrolního stanoviště. Radiace ve srovnání s kontrolními stromy vedla prokazatelně ke snížení hmotnosti nadzemní biomasy, ke snížení životaschopnosti semenáčků (prvních 30 dnů přežilo pouze 12 % semenáčků) a k poklesu reprodukční schopnosti rostlin. Tento pokles byl dán zvýšeným množstvím jalových semen v šišce (60 % semen bylo jalových ve srovnání s kontrolními stromy, kde jich bylo jalových jenom 10 %) a zvýšenou četností cytogenetických poruch semen.

Z výše uvedených informací vyplývá, že thorium v nízkých koncentracích může působit jako pozitivní faktor, který stimuluje rostliny k růstu, ale ve vyšších koncentracích působí toxicky. Z tohoto důvodu je důležité sledovat různé modifikace média/půdy, které ovlivní příjem thoria rostlinami. Já se ve své práci budu zabývat vlivem deficiencie fosforu, přítomnosti kyseliny vinné v hydroponickém živném médiu a postřikem putrescinu na listy.

2.3.1. Fosfor a dostupnost radionuklidů pro rostliny

Fosfor je pro rostliny esenciální makroprvek, který potřebují ke svému životu. Je součástí mnoha pro rostliny klíčových molekul, jako jsou nukleové kyseliny, fosfolipidy nebo makroergní sloučeniny (ATP). Anorganický fosfát se pak také podílí na regulaci některých enzymatických reakcí.

V půdě se fosfor vyskytuje v omezeném množství. Po dusíku se jedná o druhý nejčastěji limitující prvek pro rostliny. Rostliny fosfor přijímají z půdního roztoku ve formě fosfátového aniontu H_2PO_4^- . Ten je ve vodě poměrně málo rozpustný a v půdě bývá silně vázán na ionty kovů, které jsou adsorbovány na negativně nabitěm povrchu půdních částic (Pavlová 2005).

Nedostatek biologicky dostupného fosforu v půdě vede v zemědělství často k nadbytečnému hnojení půd. Pro výrobu fosfátových hnojiv se používají fosforitová hnojiva, která jsou vulkanického nebo sedimentačního původu, ale častěji se používají horniny sedimentačního původu. Tyto horniny vedle fosforu obsahují také velké množství těžkých kovů a radionuklidů, zejména uranu a thoria. Prostřednictvím fosfátových hnojiv tedy dochází k uvolňování radionuklidů zpět do biologického cyklu (Roos a Jakobsen 2007).

Fosfor vytváří s těžkými kovy a radionuklidy stabilní fosfáty. Dochází tedy k jejich mineralizaci, která vede ke snížení jejich biologické dostupnosti do rostlin (Guo et al. 2010). Proto se zdá, že bychom mohli kontaminované půdy ošetřit aplikací fosfátů, abychom snížili biologickou dostupnost těžkých kovů. Nicméně museli bychom zajistit, že se bude jednat o „čisté“ fosfátové hnojivo, které nebude kontaminované dalšími prvky.

2.3.2. Nízkomolekulární organické kyseliny a dostupnost radionuklidů pro rostliny

Nízkomolekulární organické kyseliny se vyznačují nízkou molekulovou hmotností. Patří mezi ně kyseliny octová, mravenčí, máselná, jablečná, šťavelová, vinná atd.

Nízkomolekulární organické kyseliny mají pro rostliny velký význam. Rostliny mohou zvýšenou tvorbou organických kyselin reagovat na nedostatek esenciálních prvků. U rostlin rostoucích v deficienci esenciálních prvků dochází ke zvýšené syntéze a akumulaci organických kyselin v listech a v xylému. Přítomnost organických kyselin v xylému vede k vyšší translokaci esenciálních prvků z kořenů do nadzemních částí rostlin. Například řepa obecná (*Beta vulgaris*), která rostla v hydroponickém médiu v nedostatku železa, zvýšila množství organických kyselin v xylému a v listech oproti kontrole přibližně 2-3x (Lopéz-Millán et al. 2001).

Rostliny mají také schopnost vylučovat organické kyseliny do rhizosféry a tím ji ovlivňovat. Exudace nízkomolekulárních organických kyselin kořeny do rhizosféry vede ke snížení pH půdy a následně k uvolnění různých prvků z jejich vazeb, což umožňuje jejich snadnější absorpci kořeny rostlin. Právě tato vlastnost organických kyselin – schopnost uvolňovat různé prvky, například těžké kovy a radionuklidy z jejich vazeb, je dnes často zkoumána v souvislosti s fytoremediacemi. Organické kyseliny totiž mohou být jednou z modifikací, která povede ke zvýšení desorpce těžkých kovů z půdního roztoku a umožní jejich snazší absorpci rostlinami. Tato modifikace půdy by mohla vést ke zvýšené akumulaci těžkých kovů rostlinami. Experimentálně se vliv organických kyselin na vyšší příjem těžkých kovů potvrdil například pro uran. Rostliny rodu *Brassica* byly pěstovány v půdě s vyšším obsahem uranu. Výsledky této práce ukázaly, že přítomnost organické kyseliny (zejména kyselina citronová) vedla ke zvýšenému příjmu uranu rostlinami (Huang et al. 1998). Také práce Mihalíka et al. (2010) ukázala, že kovy-tolerantní rostliny slunečnice (*Helianthus annuus*) a vrba

(*Salix sp.*), které rostly v kontaminované půdě a byly zalévány roztokem organických kyselin, akumulovaly vyšší množství uranu než kontrolní rostliny. Oproti kontrole bylo větší množství uranu translokováno do nadzemních částí rostlin, což opět podpořilo možné využití organických kyselin ve fytoředičních metodách.

Použití organických kyselin pro fytořediaci půdy musí být ale provedeno citlivě. Tak, aby nedocházelo k vyšší rozpustnosti těžkých kovů, než je množství, které jsou rostliny schopné akumulovat. Vyšší množství uvolněných kovů, potažmo radionuklidů by se mohlo uvolnit do půdního roztoku a mohlo by dojít ke kontaminaci podzemních vod.

2.3.3. Polyaminy a příjem a translokace radionuklidů v rostlinách

Polyaminy jsou přítomné ve všech prokaryotických i eukaryotických organismech. Jedná se o organické sloučeniny, které obsahují více než jednu aminoskupinu NH_2^- . Mezi 4 základní polyaminy syntetizované rostlinnými buňkami patří putrescin, kadaverin, spermidin a spermin.

Stále zřejmě neznáme všechny funkce polyaminů. Vzhledem k tomu, že jsou ale všudypřítomné v relativně velkém množství (mM množství), tak jsou pro přežití rostlin zřejmě nezbytné. Polyaminy se v buňkách účastní různých buněčných procesů zahrnující podporu růstu a dělení buněk nebo inhibici produkce ethylenu. Dále v buňkách interagují s negativně nabitými makromolekulami, jako jsou DNA, RNA, transkripční a translační komplexy nebo proteiny ale také interagují s membránami buněčných organel, čímž tyto makromolekuly stabilizují. V neposlední řadě se také účastní programované buněčné smrti (Groppa et al. 2007, Gill a Tuteja 2010, Minocha et al. 2014).

Polyaminy mají v rostlinách také důležitou antioxidační funkci. Již několikrát bylo zjištěno, že dochází ke zvyšování endogenního množství polyaminů v rostlinách, které byly vystavené stresovým podmínkám. Polyaminy mohou mít významnou roli jednak ve zhášení kyslíkových radikálů, ale také patrně iniciují syntézu antioxidačních enzymů v buňkách a ovlivňují jejich aktivitu (Groppa et al. 2007).

Syntéze polyaminů u rostlin vystavených suchu se věnovali Bae et al. (2008). Za modelovou rostlinu si vybrali kakaovník (*Theobroma cacao*), který je velmi citlivý k nedostatku vody. Zjistili, že rostliny rostoucí v suchu po dobu 13 dnů hromadily v listech více polyaminů než nestresované rostliny. Nejvíce přitom akumulovaly putrescin, jehož koncentrace

byla 4 x vyšší oproti kontrolním rostlinám. Stresované rostliny nevykazovaly pouze vyšší obsah polyaminů, ale také vyšší obsah enzymů, které katalyzují biosyntézu polyaminů. Největší zvýšení obsahu polyaminů a aktivity vybraných enzymů bylo pozorováno ve fotosyntetizujících listech. Rovněž stres způsobený těžkými kovy vede ke zvyšování obsahu polyaminů v rostlinách. Qiao et al. (2015) sledovali zvýšení obsahu putrescinu v rostlinách *Lemna minor*, které rostly v prostředí uměle kontaminovaném kadmíem. A stejně jako v předchozí práci i oni sledovali v rostlinách zvýšenou aktivitu enzymů, které katalyzují biosyntézu polyaminů.

Tato antioxidační vlastnost polyaminů je dnes často sledována v souvislosti se znečištěným prostředím. Exogenní aplikace polyaminů by mohla pomoci rostlinám lépe se vyrovnat se stresem způsobeným kontaminantem, což by mohlo být přínosné pro využití polyaminů ve fytořediačních metodách. Například u rostlin pšenice (*Triticum aestivum*) rostoucích v médiích s přidavkem kadmia nebo mědi, které byly na listy stříkány roztokem sperminu, bylo patrné celkové snížení peroxidace lipidů, zvýšení aktivity askorbátperoxidázy a glutathionreduktázy, a docházelo také k celkovému snížení obsahu glutathionu. Tato práce tak potvrdila, že polyaminy mají antioxidační funkci, která chrání rostliny před oxidativním poškozením (Groppa et al. 2007). Mé výsledky jsou ale opět v rozporu se zjištěním Soudek et al. (2013).

Vlivem exogenní aplikace polyaminů se zabývali i Soudek et al. (2013). V experimentu sledovali, jak na exogenní aplikaci putrescinu budou reagovat rostliny tabáku rostoucí v médiu obohaceném o thorium. Zjistili, že rostliny, na jejichž listy byl pravidelně stříkán putrescin, obsahovaly v kořenech 2-3x méně thoria oproti kontrolním rostlinám, také ve stoncích byl celkový obsah thoria nižší, ale v listech k žádným významným změnám nedošlo. Exogenní aplikace putrescinu tedy vedla celkově k nižšímu příjmu thoria a k jeho vyšší translokaci do nadzemních částí rostlin.

2.4. Nespecifické stresové markery

Všechny živé organismy jsou během své existence vystavené nežádoucím vlivům, které negativně ovlivňují jejich život. Rostliny jsou organismy vázané k substrátu, proto se nemohou vyhnout negativnímu působení prostředí, ve kterém rostou. Naopak s negativním působením prostředí se musí umět vyrovnat. Během svého života jsou vystaveny působení různých stresorů

– faktorů vyvolávajících zátěž. Na stresové faktory rostliny reagují různými fyziologickými změnami, např. regulací genové exprese (Sahr 2004), změnou složení a vlastností plasmatické membrány, syntézou osmoticky aktivních látek a antioxidantů (např. glutathion) nebo zvýšenou syntézou fytochelatinů. S mnoha z těchto obranných mechanismů se setkáme u řady různých stresových faktorů, proto je označujeme jako nespecifické stresové markery (Pavlová 2005).

Ve své práci budu pomocí vybraných nespecifických stresových markerů měřit fyziologický stav rostlin tabáku ovlivněných přítomností thoria v různě modifikovaných médiích.

2.4.1. Stresový stav rostlin způsobený těžkými kovy

Kovy jsou nedílnou součástí přírody. V ekosystémech se pohybují v biologických a biogeochemických cyklech. Prostřednictvím autotrofních organismů – převážně rostlin, které přijímají kovy v anorganické formě a zabudovávají je do své biomasy, přecházejí kovy do živých částí ekosystému a stávají se dostupnými pro živé organismy. Rostliny jako primární producenti tak mohou zpřístupňovat kovy dalším organismům. Tuto křehkou rovnováhu biogeochemických cyklů stále častěji narušuje lidská činnost (těžba a důlní činnost, zpracování rud, automobilová doprava, zemědělství, spalování fosilních paliv) a významně tak přispívá k dalšímu přísunu kovů do živých částí ekosystémů (Kafka a Punčochářová 2002).

Skupina těžkých kovů bývá nejčastěji definována jako skupina prvků s hustotou vyšší než 5 g/cm^3 . Patří mezi ně například železo, olovo, nikl, ale také radioaktivní uran nebo thorium. Těžké kovy bývají někdy také označovány jako kovy toxické. Toxicita kovů je závislá na mnoha faktorech jako je teplota, hodnota pH, chemická forma nebo oxidační stav prvku. Avšak nejvýznamnějším faktorem určujícím toxické působení kovu je množství akumulovaného prvku v organismech. Mezi toxické kovy patří např. kadmium, arzen, rtuť, ale také „lehký kov“ hliník (s hustotou $2,7 \text{ g/cm}^3$), který někdy řadíme mezi těžké kovy díky obdobnému působení na organismy jako těžké kovy.

Rostliny z půdního roztoku spolu s esenciálními prvky rostlinné výživy přijímají i jim podobné toxické kovy. Jejich toxicita spočívá především v nahrazování esenciálních prvků v biomolekulách, čímž mění jejich funkci. Známe je například nahrazování síry selenem nebo zinku kadmiem (Lee a Morel 1995). Selen je chemicky podobný síře a tak může být metabolizován stejnou cestou jako síra. Do organismu se tedy dostává prostřednictvím stejných

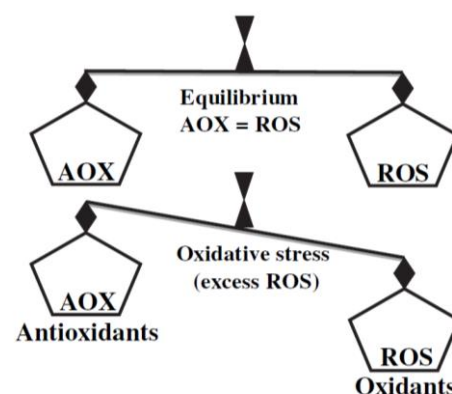
transportérů jako síra a může být také využit k tvorbě selenocysteinů nebo selenomethioninů. Tyto analogy aminokyselin obsahujících selen v proteinech jsou pro buňky toxické (Van Hoewyk et al. 2007). Ovšem některé těžké kovy jsou pro správné fungování živých organismů nezbytné, tedy esenciální, ale pouze ve správné koncentraci. Pokud se však v rostlinách vyskytují v nadbytku, tak se i tyto prvky (železo, nikl, měď) stávají toxickými (Pitter 1999, Nieboer a Richardson 1980).

Těžké kovy včetně radionuklidů mají tendenci se akumulovat v živých organismech. V nadbytku mohou způsobovat několik různých typů stresu – radioaktivní ozáření (platí pouze pro radionuklidy), chemickou toxicitu a oxidativní stres.

Radionuklidy, běžně se vyskytující v životním prostředí, mohou být zdrojem kontaminace a při velmi vysoké koncentraci v okolí mohou zapříčinit stres způsobený ozářením. S tímto stresem se ale běžně ve volné přírodě neseškáváme. Teprve díky lidské činnosti došlo k různému lokálnímu zvýšení koncentrace radionuklidů v prostředí do takové míry, aby mohly způsobovat stres ozářením. S nejvyššími koncentracemi radionuklidů se můžeme setkat pouze za mimořádných podmínek, např. na uranových haldách nebo při havárii jaderného reaktoru – Černobyl, či Fukušima. Radionuklidy způsobují v buňkách změny na molekulární úrovni, především mutace v DNA (Kuchma et al. 2011).

Při nadměrné akumulaci těžkých kovů rostlinami dochází primárně k hromadění kovů v buňkách a ke vzniku toxicity. Těžké kovy mají velkou afinitu k vazbě s aminoskupinami (-N<), iminoskupinami (-C(=N)-) a thiolovými skupinami (-SH) biomolekul a dále látkami tvořící snadno cheláty v buňkách. Rostliny na přítomnost těžkých kovů reagují tvorbou specifických (fytochelatinů, metalothioneinů) nebo nespecifických (glutathion, prolin) obranných látek (Pitter 1999).

Důležité je také sekundární působení kovů způsobující oxidativní stres. Oxidativní stres je v posledních letech intenzivně studován a to v souvislosti s různými poruchami metabolismu a sníženou obranyschopností. Oxidativní stres je definován jako stav vychýlení rovnováhy při oxidativních reakcích mezi vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS – z anglického „reactive oxygen species“) a jejich odstraňováním antioxidanty (viz obr. 7, Gill a Tuteja 2010).

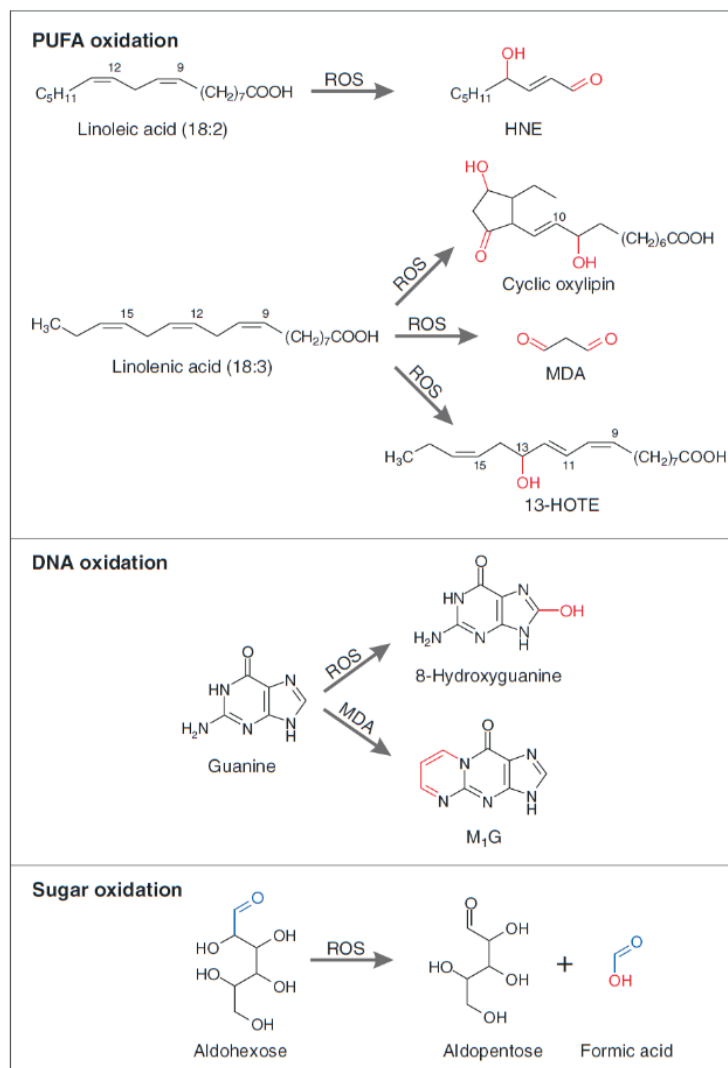


Obr. 7.: Rovnovážný stav mezi antioxidanty (AOX) a tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) (převzato z Gill a Tuteja 2010)

2.4.1.1. Oxidativní stres

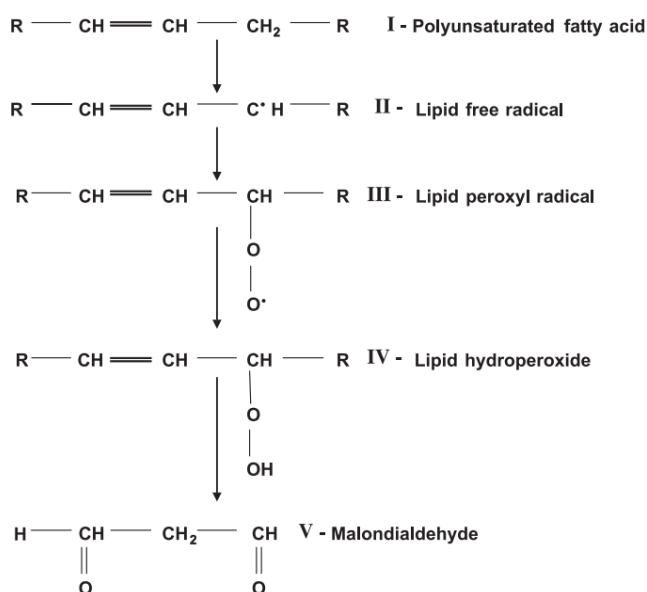
Oxidativní stres je provázen nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Mezi ROS řadíme volné radikály s alespoň jedním volným elektronem, který je dělá vysoce reaktivní. Patří sem superoxid $O_2^{\cdot-}$, hydroxyperoxyl HO_2^{\cdot} a hydroxylový radikál $\cdot OH$, ale počítáme mezi ně i H_2O_2 , O_2 a O_3 , které sice nemají náboj, ale jsou reaktivní a tudíž potenciálně škodlivé.

Oxidativní stres v buňkách negativně ovlivňuje zejména fungování biologických membrán, které vede ke zvýšenému úniku iontů, ale vede též k oxidaci DNA, aminokyselin a sacharidů (viz obr. 8). Nejčastěji se jedná o oxidační modifikaci polyneenasycených mastných kyselin (PUFA - z anglického „polyunsaturated fatty acids“) respektive jejich peroxidaci, která vede ke změně fluidity membrány, poškození membránových proteinů, ale též k inaktivaci membránových receptorů, enzymů a iontových kanálů (Vandenhove et al. 2006, Vranová et al. 2002).



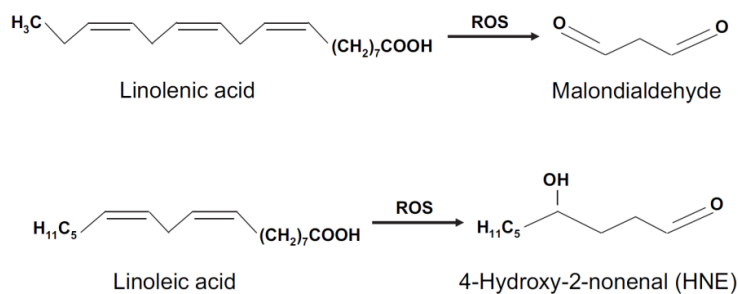
Obr. 8.: ROS způsobují oxidační modifikace polyneenasycených mastných kyselin (PUFA), DNA a sacharidů; PUFA a guanin jsou znázorněny jako volné molekuly, i když v buňce se vyskytují navázané v komplexu s lipidy a DNA. Změny způsobené ROS jsou zvýrazněny červeně, oxidovaná skupina sacharidů je znázorněná modře (převzato z Møller et al. 2007)

Hlavní cílovou skupinou ROS jsou nenasycené mastné kyseliny obsahující dvojnou vazbu. Převážně oxidují kyselinu linolovou (18:2) a kyselinu linoleovou (18:3), které jsou významnou součástí fosfolipidové i galaktolipidové (thylakoidní) membrány. ROS vedou k nekontrolovatelnému procesu přeměny lipidů na hydroxyperoxydily lipidů. Peroxidace lipidů zahrnuje tři části. První fází je iniciace – vznik lipidového radikálu, ten je nestabilní a v další fázi - propagace reaguje s dalšími lipidy. Řetězová reakce pokračuje až do doby, než dojde k terminaci. Terminace je proces, ve kterém dochází ke sloučení dvou radikálů nebo radikálu a antioxidantu za vzniku neradikálové sloučeniny (viz obr. 9; Halliwell a Gutteridge 1984, Gutteridge 1995, Møller et al. 2007)



Obr. 9.: Schématické znázornění peroxidace lipidů (převzato z Grotto et al. 2009)

Vzniklé lipoperoxydily jsou nestabilní molekuly, ze kterých mohou následně vznikat sekundární produkty jako malondialdehyd (viz obr. 10), který patří mezi ty nejvíce zastoupené, dále může vznikat propanal nebo hexanal nebo 4-hydroxy-2-nonenal (Gill a Tuteja 2010, Ayala et al. 2014).



Obr. 10.: Vznik sekundárních produktů peroxidace polynenasycených mastných kyselin (převzato z Gill a Tuteja 2010)

Já jsem se ve své práci při hodnocení vlivu thoria na fyziologický stav rostlin tabáku zaměřila na kvantitativní měření malondialdehydu, který je používán jako biomarker oxidativního stresu a na sledování aktivity vybraných antioxidantních enzymů, kterým bude věnována následující podkapitola. V dalším přehledu popisují pouze látky syntetizované rostlinami, které se používají jako markery stanovení stresové zátěže, které jsem použila ve své diplomové práci.

2.4.2. Specifická aktivita antioxidantních enzymů

Enzymy jsou bílkovinné molekuly, které mají v buňkách biokatalytickou funkci. Ve své práci jsem se zaměřila pouze na vysoce specializované enzymy s antioxidantní funkcí, které si rostlina vyvinula zřejmě jako obranu proti ROS. Řadíme mezi ně enzymy: superoxidodismutáza (SOD), askorbátperoxidáza (APX), kataláza (CAT), guajakolperoxidáza (GPX), glutathionreduktáza (GR), glutathion-S-transferáza (GST), peroxidáza (PX) a další (Mittler et al. 2004). V různých pracích byly zjištěny rozdílné změny v aktivitách enzymů v závislosti na druhu, genotypu, vnějších podmínkách a koordinací mezi enzymatickým a neenzymatickým antioxidantním systémem, mezi který patří např. akumulace volného prolinu, kterou jsem se také zabývala, akumulace glutathionu nebo akumulace fytochelatinů.

První enzym, který v organismech reaguje s ROS je SOD. SOD mění O_2^{\bullet} na méně toxický H_2O_2 . Katalázy a peroxidázy (PX, APX) následně odbourávají peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tato antioxidantní funkce enzymů je předurčuje ke sledování míry oxidativního stresu, kterému jsou organismy vystaveny.

Kataláza je enzym s jedním z nejvyšších aktivit ze všech enzymů. Za 1 minutu je schopný převést asi 6 mil molekul H_2O_2 na H_2O a O_2 (Gill a Tuteja 2010). Kataláza se nachází v mitochondriích a peroxizomech (Møller et al. 2007). Jedná se o hojně studovaný enzym. Mnoho prací potvrdilo, že zvyšující se množství kovů v substrátu vede ke zvyšující se aktivitě CAT. Např. v široce pěstovaném v médiu obohaceném o zinek nebo kadmium došlo ke zvýšení aktivity CAT a APX, ale množství PX a GST se snížilo (Soudek et al. 2014). Zvýšení aktivity CAT a APX bylo pozorováno i u druhu rákosu *Phragmites australis* pěstovaném v hydroponickém médiu obohaceném o kadmium. K nejvýraznějšímu nárůstu aktivity enzymů došlo v kořenech, kde byla naměřená trojnásobná hodnota oproti kontrole (Iannelli et al. 2002). Ale existují také práce, kde pozorovali snížení specifické aktivity katalázy, v přítomnosti

těžkých kovů a radionuklidů. Gallego et al. (1996) sledovali aktivitu CAT a APX u slunečnice: rostliny rostly v médiích obohacených o železo, měď nebo kadmium. U všech rostlin byl pozorován pokles enzymatické aktivity v závislosti na zvyšující se koncentrace kovů v médiu. Pokles byl nejvíce znatelný u enzymu katalázy. Také v práci Saenen et al. (2015) pozorovali sníženou aktivitu CAT a APX se zvyšující se koncentrací uranu v médiu u *Arabidopsis thaliana*.

Enzym APX hraje v rostlinách a řasách důležitou roli ve zhášení ROS. APX nalezneme v celé buňce, v chloroplastech, mitochondriích, peroxizomech, cytosolu, ale také v apoplastu (Mittler 2002). APX má vyšší afinitu k peroxidu vodíku než CAT nebo PX, proto může hrát ve zhášení ROS důležitější roli (Gill a Tuteja 2010). Také u tohoto enzymu byly pozorovány různé reakce na stres způsobený přítomností těžkých kovů. Jeho aktivita poklesla ve slunečnici (Gallego et al. 1996). Vyšší aktivita byla zjištěná u čiroku (Soudek et al. 2014) nebo pšenice rostoucí v půdě bohaté na kadmium (Khan et al. 2007).

Peroxidáza je lokalizovaná v cytosolu, ve vakuole a v buněčné stěně. PX je další enzym schopný katalyzovat rozklad peroxid vodíku. Soudek et al. (2014) píše o klesající aktivitě PX u čiroku při zvyšující se koncentraci Cd a Zn v médiu. Zhang et al. (2007) ale pozoroval zvyšující se aktivitu PX i CAT u dvou druhů rostlin (*Kandelia candel* a *Bruguiera gymnorhiza*), rostoucích v médiu obohaceném o olovo, kadmium a rtuť.

Kroměvýše uvedených antioxidačních enzymů byla v práci sledována také aktivita glutathion-S-transferázy. Jedná se o velkou skupinu izoenzymů, která má schopnost katalyzovat konjugaci redukovaného glutathionu s toxickými substráty. Jeho další důležitou funkcí je schopnost vázat se na N konce molekul, čímž je chrání před ROS (Sheehan et al. 2001). Tento enzym ve své práci sledovali např. Soudek et al. (2014), kteří pozorovali jeho nižší aktivitu v kořenech i nadzemních částech čiroku rostoucím v hydroponickém médiu obohaceném o kadmium. Ale v médiích s přidaným zinkem pozorovali nižší aktivitu pouze v kořenech čiroku, v nadzemních částech rostlin se aktivita GST zvýšila.

2.4.3. Prolin

Prolin je heterocyklická aminokyselina, která je syntetizována z kyseliny glutamové. V rostlinách má několik významných rolí. Kromě toho, že je stavební jednotkou proteinů, volný prolin funguje v první řadě jako zásobárna uhlíku a dusíku a také jako osmoticky aktivní látka.

Mimoto má důležitou roli v ochraně buněk před ROS – zháší singletový kyslík $^1\text{O}_2$ (Matysik et al. 2002) a je schopný vázat některé těžké kovy.

Během abiotického stresu dochází ke zvyšování koncentrace volného prolinu v buňkách (z 5 % až na 80 % volně se vyskytujících aminokyselin v buňce, Matysik et al. 2002), což je způsobeno jednak vyšší syntézou prolinu, ale také jeho sníženou degradací (Chen et al. 2001). Zároveň se jedná o osmoprotektant, který v buňce pomáhá udržovat redukční prostředí. Jeho další významnou rolí je role antioxidantní. Prolin je schopný vychytávat volné radikály a tvořit s nimi stabilní komplexy (Hare et al. 2001). Wu et al. (1998) ve své práci dále popisují schopnost prolinu chelatovat kovy (pozorovali tvorbu měďnatého komplexu u sinice *Anacystis nidulans*).

Již dlouho je známo, že dochází k akumulaci volného prolinu u vyšších rostlin vystavených salinitě, mrazu (Nanjo et al. 1999) nebo suchu (Yamada et al. 2005), ale méně se sledovala koncentrace volného prolinu u rostlin ošetřených různými kovy. Ku et al. (2012) ve své práci sledovali obsah volného prolinu u druhu tabáku *Nicotiana benthamiana* ošetřeném různými koncentracemi mědi. Zjistili, že opravdu dochází ke zvyšování množství volného prolinu se zvyšující se koncentrací mědi. I další autoři prokázali, že dochází ke zvyšování množství volného prolinu u rostlin *Silene vulgaris*, *Oryza sativa*, *Cynara scolymus* stresovaných kovy (Schat et al. 1997, Chen et al. 2001, Naser Karimi et al. 2012). Nicméně v dostupné literatuře jsem nenašla žádnou práci, která by sledovala vliv některého z radionuklidů včetně thoria na akumulaci prolinu. I přesto jsem se rozhodla na základě výše uvedených reakcí na jiné kovy použít akumulaci prolinu v rostlinách jako stresový marker při zkoumání reakce tabáku na přítomnosti thoria v médiu.

2.4.4. Fotosyntetické parametry jako nespecifické markery stresu

U rostlin vystavených nadměrnému působení těžkých kovů můžeme často sledovat poškození a úbytek fotosyntetických pigmentů (Naser Karimi et al. 2012). Toto poškození chlorofylu způsobí snížení fotosyntézy a následně i zpomalení růstu rostliny. Poškození chlorofylů bývá způsobeno nahrazením Mg^{2+} - centrálního iontu chlorofylu, iontem těžkého kovu, nebo inhibicí aktivity enzymů odpovědných za syntézu fotosyntetických pigmentů (Bhattacharya et al. 2010). Ovšem poškození může být také způsobeno změnou stavby

chloroplastů (Zhou et al. 2016) nebo poškozením membrány chloroplastů vlivem působení ROS (Møller et al. 2007).

Stres u rostlin tedy můžeme měřit prostřednictvím fotosyntetických parametrů, jako je obsah fotosyntetických pigmentů nebo měření rychlé kinetiky fluorescence chlorofylu a z ní odvozených fluorescenčních parametrů.

2.4.4.1. Pigmenty

Chloroplasty vyšších rostlin obsahují fotosyntetické pigmenty - karotenoidy a dva typy chlorofylu (chlorofyl a a chlorofyl b), které absorbují světelnou energii. Již několikrát bylo zjištěno, že abiotický stres vede ke změnám obsahu pigmentů v rostlinách (Naser Karimi et al. 2012, Liu et al 2014). Karotenoidy jsou významné nejen pro absorpci energie, ale také jsou považovány za významné antioxidanty. Chrání fotosyntetické struktury před poškozením ROS (zejména $\cdot\text{O}^{2-}$), které vznikají během fotosyntézy, zřejmě proto nedochází k tak velkému úbytku vlivem stresu, jaký pozorujeme u chlorofylů (Stahl a Sies 2003).

V případě chlorofylů při stresu můžeme pozorovat jejich velký úbytek, zřejmě vlivem oxidativního stresu (Naser Karimi et al. 2012) Jako citlivější se přitom jeví chlorofyl a. Bidwell (1979, cit. dle Chettri et al. 1998) připisuje vyšší citlivost chlorofylu a k jeho přeměně na chlorofyl b. Stres totiž vyvolává oxidaci methylové skupiny na molekule chlorofylu a za vzniku aldehydové skupiny, kterou obsahuje chlorofyl b. To znamená, že ve stresovaných buňkách nemusí nutně docházet k výrazné změně celkového obsahu chlorofylů. Významnějším znakem stresové zátěže (aplikace kovů) by tudíž měl být poměr mezi oběma chlorofyly, který více vypovídá o změnách v obsahu obou chlorofylů (Chettri et al. 1998). Ovšem Soudek et al. (2014) ve své práci o čiroku pěstovaném v médiu obohaceném o kadmium a zinek zjistil, že na stres způsobený kadmium a zinkem citlivěji reaguje chlorofyl b.

Působení těžkých kovů vede ke snížení koncentrace fotosyntetických pigmentů. To pozorovali např. Naser Karimi et al. (2012) u artyčoku *Cynara scolymus*, kde pozorovali snižující se koncentraci chlorofylu a, chlorofylu b a celkového chlorofylu se zvyšujícím se množstvím olova v médiu. Mnohem více ale došlo ke snížení obsahu chlorofylu a, proto se zdá, že chlorofyl a je více citlivý na stres způsobený TK, což potvrzuje výše uvedenou teorii. Také u slunečnice rostoucí v médiu a vystavené železu, mědi nebo kadmia došlo ke snížení celkového obsahu chlorofylů (Gallego et al. 1996). Další podobnou práci provedli Martins et

al. (2011), kteří sledovali efekt přidaného kadmia na mladé a staré listy druhu *Nicotiana tabacum* pěstovaném v hydroponickém médiu. Zjistili, že k poklesu celkového obsah karotenoidů dochází především v mladých listech, na kterých se objevují i chlorózy. Zároveň sledovali také poměr karotenoidů a chlorofylů, který se v mladých listech se zvyšujícím se obsahem kadmia také zvyšuje (ve starších listech nedocházelo k významným změnám poměru). Na základě těchto výsledků následně i experimentálně potvrdili, že k translokaci kadmia dochází zejména do mladých listů.

Dodnes ale existuje jenom málo prací, které byly věnovány vlivu radionuklidů respektive thoria na obsah pigmentů. Nejvíce se jimi zabývá Saenen s kolektivem, kteří sledovali vliv uranu (U) na modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*. V pokusu sledovali, jak bude různé pH média ovlivňovat příjem a translokaci U do nadzemních částí rostlin. Zjistili, že pH silně ovlivňuje translokaci U do listů. Se zvyšujícím se pH (7,5), se snižoval příjem U kořeny, ale jeho translokace do nadzemních částí byla větší. Naopak při pH 4,5 byl příjem U vyšší, ale translokace do nadzemní biomasy byla nižší. Zajímavé bylo také zjištění, že uran neovlivnil fotosyntetické parametry, ale při pH 4,5 docházelo k účinnějšímu přenosu elektronů z PS II na elektron transportní řetězec a docházelo tedy ke zvýšení kvantového výtěžku PS II. Přesto tyto rostliny rostly pomaleji oproti kontrole, proto autoři předpokládají, že energie získaná při fotosyntéze byla spíše využita na obranné mechanismy a vyrovnávání se s oxidativním stresem (Saenen et al. 2013, 2014, 2015). V práci Saenen et al. (2013) autoři sledovali obsah fotosyntetických pigmentů u slunečnic, které byly pěstované v zahradním substrátu obohaceném o uranovou hlušinu z Umerského dolu (v koncentracích 0, 25, 50, 75%). Obsah chlorofylů a, b i celkového obsahu chlorofylů se se zvyšujícím se množstvím uranové hlušiny snižoval. Největší snížení bylo pozorováno u chlorofylu b. V této práci tedy autoři došli k opačnému závěru o citlivosti chlorofylu a a b k těžkým kovům než výše uvedené práce. Tyto výsledky tak potvrzují pouze hypotézu, že vlivem abiotického stresu dochází ke snižování obsahu chlorofylů (Jagetyia a Purohit 2006). Ale pozorování bylo ve shodě s výsledky uvedenými v práci Soudek et al. (2014), kteří zjistili, že se poměr chlorofylu a a chlorofylu b v rostlinách široce vystavených kadmiu a zinku zvyšuje, což tedy ukazuje na větší citlivost chlorofylu b.

Shtangeeva et al. (2006) provedli polní pokus na rostlinách *Tritium repens* a *Plantago major*, které zalévali roztoky U a Th (60mg/l H₂O) a zjistili, že dochází ke snížení koncentrace chlorofylů po vystavení rostlin oběma radionuklidům, ale výraznější snížení bylo pozorováno

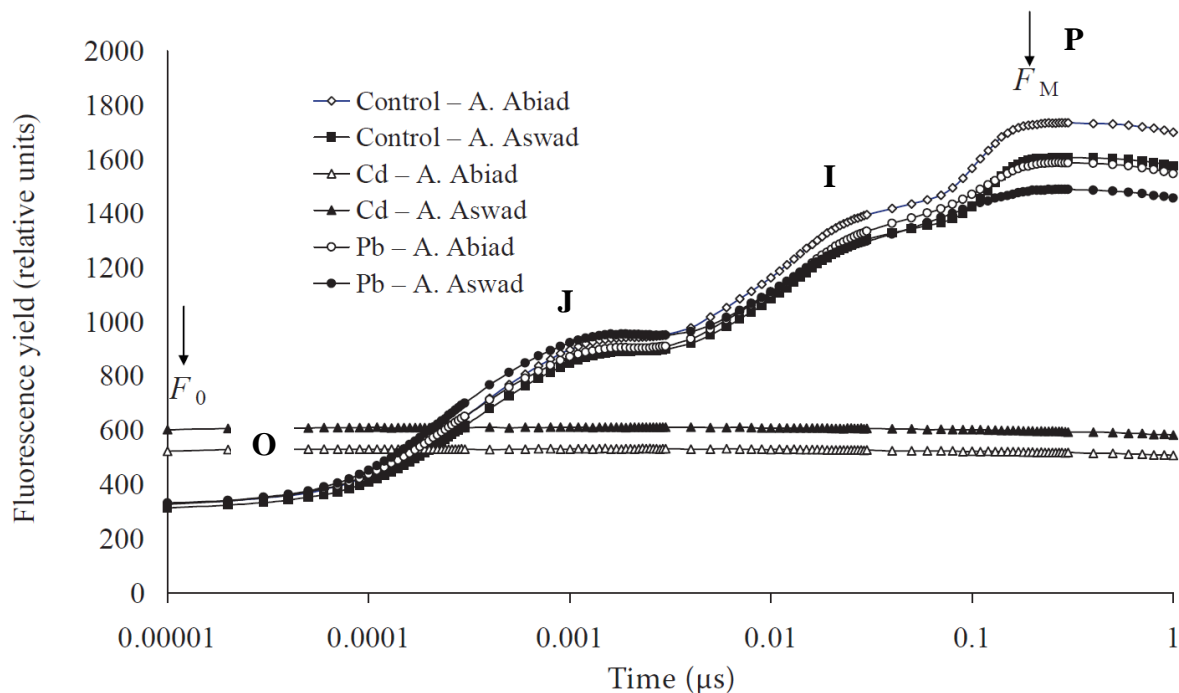
v případě rostlin vystavených ošetření uranem. Hafez a Ramadan (2002; cit. dle Shtangeeva et al. 2006) vysvětlují pokles biosyntézy chlorofylu nahrazením Mg^{2+} iontů (UO_2) $^{2+}$ ionty.

2.4.4.2. Fluorescence chlorofylu

Světelná energie, kterou pohltí molekula chlorofylu a, může být použita pro fotosyntézu. Přebytek energie pak může být přeměněn na teplo nebo znovu emitován z reakčního centra PS II jako fluorescence chlorofylu (přibližně 2 % z absorbovaného záření) (Pavlová 2005).

Měření fluorescence chlorofylu, zejména rychlé kinetiky fluorescence se v posledních letech stala stabilní metodou v ekofyziologických studiích. Jedná se o rychlý a neinvazivní způsob testování fyziologického stavu rostlin, kterým můžeme měřit poškození fotosyntetického aparátu rostlin nejen v laboratorních podmínkách, ale také přímo v přírodě. Rychlá kinetika fluorescence chlorofylu je definovaná jako záznam přechodu fluorescence chlorofylu během několika málo sekund z temnostně adaptovaného stavu fotosyntetického aparátu po ozáření krátkým pulzem světla. Temnostně adaptovaná rostlina má všechna centra PS II „otevřená“ a spolu s přenašeči elektronů se vyskytují v redukováném stavu. V tomto stádiu dosahuje fluorescence minimální hodnoty – F_0 . Po silném saturačním ozáření dojde velmi rychle k „zaplnění“ a následnému „uzavření“ PS II. Dochází tedy k oxidaci molekuly chlorofylu v reakčním centru PS II a redukci prvního z přenašečů elektronů v elektrotransporním řetězci. Ve stavu oxidace molekuly chlorofylu reakčního centra PS II je maximum absorbované světelné energie emitováno fluorescencí a tento stav je definován jako maximální fluorescence – F_m . Rozdíl mezi F_m a F_0 potom nazýváme jako variabilní fluorescence – F_v . V tomto stádiu se na fluorescenci podílí pouze PS II (Lichtenthaler et al. 2005).

Analýza OJIP křivky (obr. 11) a z ní získaných parametrů, které vypovídají o stavu PS II v rostlině, se běžně používá pro sledování vlivu různých stresových faktorů nebo fotosyntetických inhibitorů. Já jsem sledovala tvar OJIP křivky, poměr variabilní a maximální fluorescence chlorofylu (F_v/F_m) a poměr variabilní a minimální fluorescence chlorofylu (F_v/F_0).



Obr. 11.: OJIP křivka přechodné fluorescence chlorofylu a měřená na listech dvou syrských odrůd ječmene (A. Abiad, A. Aswad) pěstovaných v médiích s přísadkou olova (50 μM) nebo kadmia (25 μM) a v kontrolním médiu po dobu 24 hod. Hodnoty fluorescence jsou uvedené v arbitrálních jednotkách, O – minimální hodnota fluorescence, J, I – rovnovážné stavy mezi vkladem excitační energie do PSII a jeho tokem ven z PSII prostřednictvím kaskády chinonů, P – maximální hodnota fluorescence (převzato z Kalaji a Loboda 2007).

Poměr F_v/F_m se používá jako měřítko kvantové účinnosti PS II, pokud jsou všechna centra PS II otevřena. F_v/F_m proto ukazuje potenciální účinnost centra PS II a může být použit jako indikátor výkonosti světelné fáze fotosyntézy (Vandhout et al. 2014). F_v/F_m je nejčastěji používaný poměr fluorescence chlorofylu, ale je celkem stabilní, takže změny indukující stres na něm zjistíme v relativně pokročilé fázi stresové reakce. Hodnota F_v/F_m obecně udávána pro zdravé rostliny se pohybuje v rozmezí 0,79-0,84. Ve stresových podmínkách ale hodnota F_m klesá a klesá tak i poměr dalších fluorescenčních parametrů a OJIP křivka se stává „plošší“ (Žurek et al. 2013).

Je známo, že některé těžké kovy mohou interferovat s chloroplasty, čímž mohou snižovat účinnost fotosyntézy. Například expozice kadmia na rostliny salátu *Lactuca sativa* vedla se zvyšující se koncentrací Cd jednak k mírnému snižování hodnoty F_m , ale překvapující bylo, že vedla k poměrně velkému zvýšení hodnoty F_0 (ze 400 na 1200), což se projevilo také výrazným snížením hodnoty parametru F_v/F_m (Dias et al. 2012). Několik autorů sledovalo také vliv uranu na fluorescenci chlorofylu. Saenen et al. (2014) sledovali vliv několika koncentrací uranu na rostliny *Arabidopsis thaliana*. Rostliny rostoucí v roztocích (pH 4,5) s nízkou

koncentrací uranu (do 25 μM), měly hodnotu parametru F_v/F_m mírně vyšší než kontrola, ale se zvyšující se koncentrací, docházelo již ke snižování tohoto parametru. Tyto rozdíly se neprojevíly u rostlin rostoucích při pH 7,5. Podobný experiment provedli Vandhout et al. (2014), kteří sledovali vliv 50 μM uranu na fluorescenci chlorofylu u *Arabidopsis thaliana*. Opět se potvrdilo, že u rostlin vystavených uranu dochází k mírnému navýšení fluorescenčního parametru F_v/F_m .

Lichtenthaler et al. (2005) ale doporučují spíše používat parametr F_v/F_o definovaný jako hodnota, která je přímo úměrná aktivitě komplexu rozkládajícího vodu donoru elektronů pro opětovnou redukci PS II. Někdy bývá tento parametr také definován jako maximální výtěžek fotochemických procesů (Roháček 2002). Tento parametr je totiž citlivější ke změnám ve fluorescenci, způsobených změnami podmínek, ve kterých rostliny rostou. Hodnota F_v/F_o obecně udávána pro zdravé rostliny se pohybuje v rozmezí 4-6.

Přesto, že fluorescenční parametr F_v/F_o citlivěji reaguje na změny v prostředí, je stále poměrně málo používán. Zabývali se jím například Peixoto et al. (2002), kteří sledovali reakci dvou druhů čiroku (tolerantní a citlivý) pěstovaných v hydroponickém médiu obohaceném o hliník ($185 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). U obou druhů došlo k výraznému poklesu parametru F_v/F_o v přítomnosti hliníku v médiu. V případě citlivého druhu se ale jednalo o pokles vyšší než 63 % (ze 4 na 1,5). Také poměr F_v/F_m se snížil, ale tato změna nebyla tak výrazná (z 0,8 na 0,6). Z důvodu tohoto rozdílu mezi sledovanými parametry, budu v práci používat pro detekci stresu fotosyntetického aparátu způsobeného thoriem oba parametry.

3. Materiál a metody

Pěstování rostlin v pokusech probíhalo ve skleníku v Ústavu experimentální botaniky (ÚEB) AVČR. V ÚEB AVČR byly také provedeny některé z laboratorních analýz: stanovení obsahu pigmentů v prvním pokusu, mineralizace rostlinného materiálu před stanovením obsahu Th, stanovení obsahu proteinů, stanovení aktivity enzymů, měření rychlé kinetiky fluorescence PS II.

Celkem byly v ÚEB AVČR provedeny tři pokusy.

3.1. *Nicotiana glutinosa*

Za modelový organismus byla vybrána rostlina tabáku, druh *Nicotiana glutinosa* L. cv. La Burley 21.

Tabák lepkavý je jednoletá bylina z čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Obvykle dorůstá do výšky 1-2 m. Lodyha je přímá, někdy chudě větvená, listy jsou jednoduché, krátce řapíkaté, kopinaté 10-20 cm dlouhé. Květy jsou uspořádané v hroznovitém květenství s 12 mm dlouhými růžovočervenými kališními lístky. Původní rozšíření v Jižní Americe ve státech Peru a Bolívie, dnes se jako okrasná rostlina rozšířila až do Evropy (McBride 1962).

Tato rostlina byla zvolena na základě předchozích akumulčních experimentů na dvou druzích tabáku a jejich 6 kultivarech a 14 transformantech, které provedl doc. Soudek (Soudek et al. 2013), který zjistil, že se jedná o středně tolerantní druh z hlediska akumulace Th.

3.2. Kultivace rostlin

Semena tabáku byla vyseta do hrubého perlitu a následně po cca 2 měsících byly semenáčky přesazeny do samostatných květináčů s perlitem. Vždy byly vybírány průměrně stejně velké semenáčky. Zhruba po měsíci byly květináče s rostlinami umístěny do kultivačních nádob s upraveným Hoaglandovým médiem (složení viz tab. 2; Hoagland a Arnon 1938 upraveno dle Soudek et al. 2013), kde byly kultivovány po dobu 14 dnů. Celkem byly rostliny ošetřeny 12-ti různými kombinacemi složením média, z toho v polovině případů bylo do média přidáno Th ve formě 0,2 mM Th(NO₃)₄. Na každou variantu médií bez thoria byly použity čtyři rostliny, které byly dále využity na biochemické analýzy. Také u variant s thoriem byly 4 rostliny určené na biochemické analýzy a další 4 rostliny byly použity k analýze obsahu thoria.

Celkem bylo použito 6 modifikací média (tab. 3). Nebyl tedy testován pouze vliv thoria (0,2 mM Th(NO₃)₄) na rostliny tabáku, ale současně byl testován i vliv dalších látek, které na základě údajů z literatury ovlivňují příjem kovů do rostlin nebo jejich transport v rostlině. Byl tedy sledován vliv přidané organické kyseliny (0,2 mM kys. vinná) a nedostatek fosforu (z Hoaglandova média byly vynechány fosforečnany) na rostliny rostoucí v ne/přítomnosti thoria. Část testovacích rostlin byla také vystavena exogenním polyaminům. Na tyto rostliny byl každý den stříkán roztok obsahující 0,25 mM putrescin. Aby nedošlo ke kontaminacím, byly rostliny stříkané putrescinem pěstovány v jiné místnosti skleníku.

Hoaglandovo živné médium (pH 5)	1,5 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O 2 mM K ₂ SO ₄ 4 mM CaCl ₂ · 2H ₂ O 1,87 mM NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 130 μM NaH ₂ PO ₄ · 12H ₂ O 138,8 μM H ₃ BO ₃ 20,8 μM MnSO ₄ · H ₂ O 2,3 μM ZnSO ₄ · 7H ₂ O 3,3 μM CuSO ₄ · 5H ₂ O 0,2 μM Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 200 μM FeSO ₄ · 7H ₂ O 4 mM NaNO ₃ 4 mM NH ₄ Cl 2 m NH ₄ NO ₃
------------------------------------	---

Tab. 2: Složení Hoaglandova živného roztoku (Soudek et al. 2013)

Rostliny byly kultivovány v médiích po dobu 14 dnů. Kultivace rostlin probíhala ve skleníku za stálých podmínek (23 °C, 16 hod denní perioda, vzdušná vlhkost okolo 60 %) (Soudek et al. 2013). Poté byly odebrány vzorky pro biochemické analýzy.

s putrescinem			bez putrescinu		
- Th - P (obr. 12a)	- Th + P (obr. 12b)	- Th + P + kyselina vinná (obr. 12c)	- Th - P (obr. 12d)	- Th + P (obr. 12e)	- Th + P + kyselina vinná (obr. 12f)
+ Th - P (obr. 12g)	+ Th + P (obr. 12h)	+ Th + P + kyselina vinná (obr. 12i)	+ Th - P (obr. 12j)	+ Th + P (obr. 12k)	+ Th + P + kyselina vinná (obr. 12l)

Tab. 3: Složení kultivačních médií



Obr. 12: Rostliny tabáku rostoucí v upravených médiích podle tabulky č. 2 (pokus 1)

3.3. Design pokusů

Pokus 1

V říjnu roku 2014 byl proveden první experiment.

Byly vybrány čtyři rostliny z každého média obohaceného o thorium. Rostliny byly rozebrány na kořeny, stonek a listy a následně byly použity na stanovení obsahu thoria.

Ze zbývajících rostlin byl odebrán druhý list, který byl použit na stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a relativního obsahu vody. Druhý list pod apexem byl zbaven střední žilky, obě poloviny listu byly dány do Eppendorfových zkumavek a uloženy v mrazáku při - 24 °C. Poté byly rostliny rozděleny na jednotlivé orgány (kořeny, stonek, listy, popř. i květy). Vzorky byly uloženy do uzavíratelných sáčků, popsány a uloženy v mrazáku při - 80 °C. Tyto vzorky byly použity na extrakci proteinů a stanovení aktivit vybraných antioxidantních enzymů.

Pokus 2

Druhý experiment byl proveden v říjnu roku 2015. Byl použit stejný model experimentu jako při pokusu 1.

Čtyři rostliny z každého média obohaceného o thorium byly opět použity na stanovení obsahu thoria v jednotlivých orgánech rostlin (kořen, stonek, listy).

Zbylé rostliny byly nejprve použity na měření parametrů rychlé kinetiky fluorescence (OJIP test) za použití fluorpenu FluorPen FP 100. Poté byly z rostlin odebrány vzorky na stanovení obsahu prolinu, fotosyntetických pigmentů a sušiny viz tab. 4. Z listů byly odebírány korkovrtem terčíky o ploše 0,7854 cm² ze středu čepele, případně byly odebrány větší části čepele bez střední žilky. Vzorky na stanovení obsahu prolinu byly odebírány korkovrtem o ploše 0,4417 cm² a ihned uloženy do tekutého dusíku a následně uchovávány v mrazáku při - 80 °C. Vzorky na stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a relativního obsahu vody byly uchovávány v mrazáku při - 24 °C a do týdne byly dále zpracovány.

Pigmenty	1 terč	3 list	
Sušina	1 terč	3 list	
Prolin	0,5 g listu (bez střední žilky)	6 list	kořeny

Tab. 4.: Design odběru vzorků na biochemické analýzy z druhého experimentu

Pokus 3

Poslední experiment byl proveden na přelomu měsíců březen/duben roku 2016. Opět byla použita stejná média jako v předchozích pokusech, ale tentokrát do každého z nich bylo nasazeno 8 rostlin.

Rostliny byly nejprve použity na měření parametrů rychlé kinetiky fluorescence (OJIP test) za použití ručního fluorpenu FluorPen FP 100. Následně byly z rostlin odebrány vzorky na stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů, sušiny a prolinu (tab. 5). Vzorky na stanovení obsahu prolinu byly opět odebírány korkovrtem a ihned uloženy do tekutého dusíku. Vzorky na stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a sušiny byly uchovávány v mrazáku při - 24 °C a ještě týž den byly dále zpracovány.

Pigmenty	1 terč	3 list	
Sušina	1 terč	3 list	kořen
Prolin	0,5 g listu (bez střední žilky)	6 list	kořeny

Tab. 5.: design odběru vzorků na biochemické analýzy ze třetího experimentu

3.4. Stanovení obsahu thoria

Jednotlivé orgány rostlin byly usušeny v lyofilizátoru LAB CONCO. Vysušené vzorky byly homogenizovány a následně bylo odváženo 0,25 g vzorku do mineralizačních zkumavek. Před mineralizací bylo do každé zkumavky přidáno 5 ml mineralizační kyseliny (tab. 6). Zkumavky se nechaly 1 den stát v klidu v digestoři. Před samotnou mineralizací byly do zkumavek přidány ještě 2 ml mineralizační kyseliny.

sloučeniny	objem v l
HNO ₃ (65%)	830 ml
HClO ₄ (60%)	150 ml
H ₂ O	20 ml

Tab. 6: Složení mineralizační kyseliny

Mineralizace probíhala v mikrovlnné rozkladném systému Anthon PAAR asi 2 hodiny. Vzorky byly převedeny do 15 ml plastových uzavíratelných zkumavek. Samotné stanovení množství thoria bylo provedeno v servisní laboratoři prof. M. Mihaljeviče na Ústavu geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů Přírodovědecké fakulty UK (podle metodiky Zhao et al. 1994).

3.5. Stanovení obsahu vody

Z jedné poloviny druhého listu (1 pokus)/ jednoho terčíku třetího listu (2 a 3 pokus) a z kořene druhého řádu byl stanoven obsah vody, který je dán vztahem:

$$\text{Obsah vody (\%)} = (\text{čerstvá hmotnost} - \text{hmotnost sušiny}) / \text{čerstvá hmotnost} * 100$$

3.5. Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

Z druhé poloviny listu/ druhého terčíku byly spektrofotometricky stanovovány koncentrace pigmentů – chlorofylu a, chlorofylu b a celkových karotenoidů.

V prvním experimentu byla použita metodika používaná v ÚEB. Polovina listu nastříhána na malé kousky a následně zalita 10 ml 100% methanolem. Vzorky byly uchovávány v umělohmotných zkumavkách. Extrakce probíhala ve tmě 1 týden. Výsledný extrakt byl zředěn, tak aby bylo možné stanovit obsah pigmentů (tmavší vzorky zředěny 100x, světlejší 10x). Pigmenty byly měřeny na mikrodestičkách v přístroji Tecan Infinite N200 a následně byly zpracovávány softwarem Magellan. Pro výpočet koncentrace fotosyntetických pigmentů byly použity rovnice z práce Lichtenthaler (1987).

Ve druhém a třetím experimentu byla použita metodika používaná v laboratoři prof. Albrechtové na PřF UK dle Porra et al. (1989). Z listů byly odebrány terčíky o průměru 1 cm, které byly uloženy do mrazáku při - 24 °C. Zmražené vzorky listů byly extrahovány v 10

ml dimethylamidu kyseliny mravenčí (DMF) ve skleněných lahvičkách uzavřených parafilmem. Po celou dobu extrakce byly vzorky uchovávány ve tmě v lednici při 4 °C. Poté, co byly ze vzorků vyextrahovány pigmenty (po 4 dnech), byly vzorky změřeny na spektrofotometru Evolution 201. V programu Thermo insight byly zaznamenávány absorbance ve vlnových délkách 480, 647, 664 a 750 nm. Pro výpočet koncentrace fotosyntetických pigmentů byly použity rovnice z práce Wellburn (1994). Obsah fotosyntetických pigmentů byl vztažen na hmotnost sušiny (µg/g).

3.6. Rychlá kinetika fluorescence - OJIP test

Po 14 denní kultivaci rostlin, ještě před samotnou sklizní, byly rostliny adaptovány na tmu v zatemněné místnosti, přikryté látkou. Po cca 30 minutách temnostní adaptace byl měřen rychlý nástup indukované fluorescence pomocí kapesního fluorimetru FluorPen 2 (PSI). Měření bylo provedeno vždy na druhém listu od vzrostného vrcholu. Měření probíhalo na pěti místech listu. Data byla stažena z fluorpenu do počítače a v softwaru FluorPen byla data přenesena do excelu a tam dále zpracována (Strasser et al. 2000).

3.7. Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

4.7.1. Extrakce proteinů

Rostlinný materiál (kořeny, stonky a listy) byl v tekutém dusíku rozmělněn na prášek. Přibližně 3 g rozdrčeného materiálu bylo homogenizováno v 0,1M Tris/HCl pufru (tab. 7), kde na 1 g sušiny bylo použito 10 ml pufru. Roztok byl po dobu 30 minut za stálého chladu míchán na míchačce. Poté byl nejprve centrifugován (při 4 °C, 27 000 rpm, po dobu 30 minut) a následně přefiltrován přes Miracloth Filter. Pelet byl vyhozen a dále byl použit pouze supernatant.

Do supernatantu byl přidán síran amonný (40% nasycení). Homogenát byl opět 30 minut míchán a následně 30 minut centrifugován. Vzorky byly přefiltrovány přes Miracloth Filter. Pelet byl opět vyhozen (vysrážely se v něm těžké proteiny, které nebyly potřebné pro další práci).

Do roztoku byl přidán síran amonný (80% nasycení). Vzorek byl opět 30 minut míchán a následně 30 minut centrifugován. Zbylý roztok byl vylit. Pelet byl rozpuštěn ve 2,5 ml 25 mM Tris/HCl pufr (viz tab. 7) a převeden na PD 10 kolonu. Byla provedena eluce 3,5 ml 25mM Tris/HCl pufr. Vzorke byly zmrazeny a skladovány při - 80 °C.

0,1M Tris/HCl pufr (pH 7,8)	0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 % PVP K30, 5 mM DTE, 1 % Nonidet P 40
25 mM Tris/HCl pufr (pH 7,8)	25 mM Tris/HCl

Tab. 7: Chemické složení pufrů (dle Soudek et al. 2014)

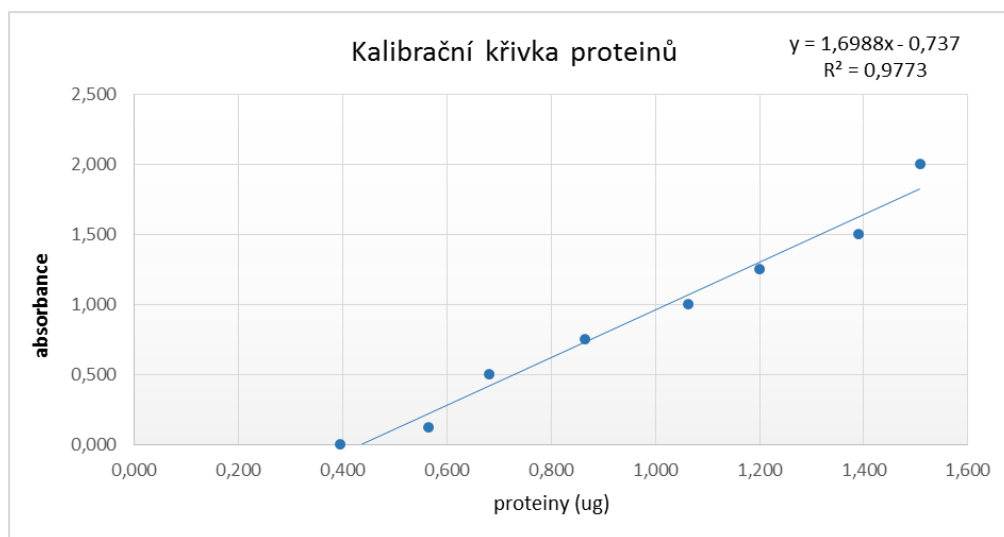
3.7.2. Stanovení obsahu proteinů

Pro stanovení obsahu enzymů bylo nutné nejprve zjistit množství proteinů ve vzorcích pomocí Bradfordova testu (Bradford 1976). Tato fotometrická metoda je založená na úměrném navázání barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein.

Vzorke byly měřeny na mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 5 μ l vzorku ve třech opakováních. Pomocí multikanálové pipety bylo ke vzorkům přidáno 250 μ l pufru. Po 10 minutách byla měřena absorbance vzorků na multifunkčním readeru Tecan Infinite N200 při 595 nm. Výsledky byly zpracovány softwarem Magellan, odkud byla data přenesena do excelu.

Ke stanovení koncentrace proteinů v roztoku bylo nutné nejprve vytvořit kalibrační křivku proteinů (viz graf 1). Jako standard byl použit albumin hovězího séra BSA v množství 125 - 2000 μ g*ml⁻¹. Standardní křivka byla vytvořena vynesemím hodnot absorbance proti jejich koncentracím.

Množství proteinů bylo vyjádřeno v μ g/ml.



Graf 1.: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů pomocí spektrofotometrické metody

3.7.3. Determinace enzymatické aktivity

Z rostlin tabáku *N. glutinosa* byly extrahovány čtyři enzymy, které se běžně využívají jako indikátory antioxidační aktivity a to peroxidáza (PX), askorbátperoxidáza (APX), kataláza (CAT) a glutation-S-transferáza (GST). Sledovaným parametrem byla změna absorbance vzorku v závislosti na čase při pokojové teplotě po přidání specifického substrátu.

Aktivita peroxidázy byla stanovena použitím barevné reakce s použitím standartních substrátů guajakolu a diammonium 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6) sulfonové kyseliny (ABTS) (Drotar et al. 1985).

Aktivita katalázy byla detekována pomocí spotřeby peroxidu vodíku (Verma a Dubey 2003).

Aktivita glutation-S-transferázy byla zjištěna pomocí reakce s 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB), 1,2-dichloro-4-nitrobenzenem (DCNB), fluorodifenem, 4-nitrobenzyl chloridem (pNBC), 4-nitrobenzoyl chloridem (pNBoC) (Habig et al. 1974).

Aktivita askorbát-peroxidázy byla detekována pomocí snížení absorbance askorbátu (Vanacker et al. 1998). Složení roztoků a substrátů pro stanovení specifické aktivity jednotlivých enzymů je shrnuto v tabulce 8. V tabulce 9 jsou popsány veličiny potřebné pro výpočet specifické aktivity enzymů.

enzym	substrát	reagencie	zásobní roztok	pipetovaný objem
APX		55,56 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7	3,17 g/250 ml dH ₂ O	36 ml
		60 mM askorbát sodný	0,1189 g /10 ml dH ₂ O	10 µl
		3 % H ₂ O	3 ml/30 ml dH ₂ O	41 µl
		směs pufr-substrát		180 µl
		extrakt enzymů		20 µl
CAT		100 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7	5,7055 g /250 ml dH ₂ O	30 ml
		200 mM H ₂ O ₂	102 µl/5 ml dH ₂ O	12 ml
		směs pufr-substrát		140 µl
		extrakt enzymů		10 µl
PX	ABTS	50 mM K ₂ HPO ₄ pH 7	2,8528 g/250 ml dH ₂ O	27 ml
		100 mM ABTS	5,1462 g/100 ml dH ₂ O	540 µl
		4,5 mM H ₂ O ₂	0,4598 ml/l dH ₂ O	570 µl
			směs pufr-substrát	
		extrakt enzymů		10 µl
	guajakol	50 mM Tris/HCl, pH 6	1,5143 g/250 ml dH ₂ O	27 ml
		3,4 mM guajakol	38 µl/100 ml dH ₂ O	600 µl
		9 mM H ₂ O ₂	0,9195 ml/l dH ₂ O	600 µl
			směs pufr-substrát	
		extrakt enzymů		10 µl
GST		0,1 M Tris/HCl, pH 7,5	3,0285 g/250ml dH ₂ O	23,7 ml
	DCNB	GSH	0,0369 g/2 ml dH ₂ O	500 µl
	fluorodifen	DCNB	0,0115 g/2 ml etanol	1 ml
		fluorodifen	0,0196g/2 ml etanol	250 µl
	CDNB	0,1 M Tris/HCl, pH 6,4	3,0285 g/250ml dH ₂ O	23,7 ml
	pNBC	GSH	0,0369 g/2 ml dH ₂ O	500 µl
	pNBoc	CDNB	0,0122 g/2 ml etanol	1 ml
		pNBC	0,0051g/2 ml etanol	1 ml
		pNBoc	0,0056g/2 ml etanol	1 ml
		směs pufr-substrát		150 µl
	extrakt enzymů		40 µl	

Tab. 8.: Složení roztoků a substrátů pro stanovení aktivity jednotlivých enzymů

enzym	substrát	Extinkční koeficient [mM ⁻¹ .cm ⁻¹]	výška vzorku v jamce [mm]	vlnová délka [nm]
PX	ABTS	35	5,94	414
	guajakol	26,6	5,94	420
CAT	H ₂ O ₂	0,036	4,63	240
GST	DCNB	8,5	5,68	345
	fluordifen	17,2	5,68	400
	CDNB	9,6	5,68	340
	pNBC	1,8	5,68	310
	pNBoC	1,9	5,68	310
APX	askorbát sodný	2,8	5,94	290

Tab. 9.: Veličiny pro výpočet specifické aktivity enzymů

Specifická aktivita enzymů byla vypočítána podle následující rovnice:

$$\text{specifická aktivita} = \left\{ \left(\frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{vzorku}}} - \frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{blank}}} \right) \cdot V_{\text{celk.}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{enzyme}}} \right) \cdot 1000 \right\} / C_{\text{Bradford}}$$

$\frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{vzorku}}}$ změna absorbance vzorku v čase

$\frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{blank}}}$ změna absorbance blanku v čase

$V_{\text{celk.}}$ celkový objem kyvety

V_{enzyme} objem pipetovaného vzorku

d výška vzorku v kyvetě

ε extinkční koeficient

1000 převod jednotek z mg na μg

C_{Bradford} obsah proteinu ve vzorku

Aktivita enzymů byla vyjádřena v $\mu\text{kat}/\text{mg}$ proteinu.

Stanovení enzymů bylo provedeno v roztoku proteinů na readeru Tecan Infinite N200. Pro získání dat byl použit software Magellan, odkud byla data přenesena do excelu.

3.8. Stanovení obsahu prolinu

Pro stanovení obsahu prolinu v listech a kořenech byla použita upravená metodika, která vychází z práce Bates et al. (1973).

Listy byly zbaveny střední žilky a pro další pokus bylo použito cca 0,5 g vzorku. Vzorky byly pomocí tekutého dusíku homogenizovány a zality dH₂O na celkový objem 8 ml. Takto připravené vzorky byly uchovávány v mrazáku při -24 °C.

Během dalšího zpracování byly ke vzorkům přidány 2 ml 15% kyseliny sulfosalicylové (která rozpouští volné aminokyseliny). Vzorky byly 30 minut míchány na třepače za pokojové teploty a následně 5 minut centrifugovány při 5000 otáček.

V nových zkumavkách byl smíchán 1 ml vzorku, 1 ml ninhydrinové kyseliny (viz tab. 10) a 1 ml kys. octové (ninhydrin reaguje s volnou aminoskupinou, proto se používá k vizualizaci aminokyselin). Směs byla promíchána na Vortexu a následně 70 minut vařena ve vodní lázni. Poté byla reakce zastavena ponořením vzorků do vody s ledem. Do vzorku byly přidány 3 ml toluenu a následně byly zkumavky uzavřeny. Roztoky byly ještě jednou důkladně promíchány na Vortexu (1 min) a ponechány v lednici stát do druhého dne.

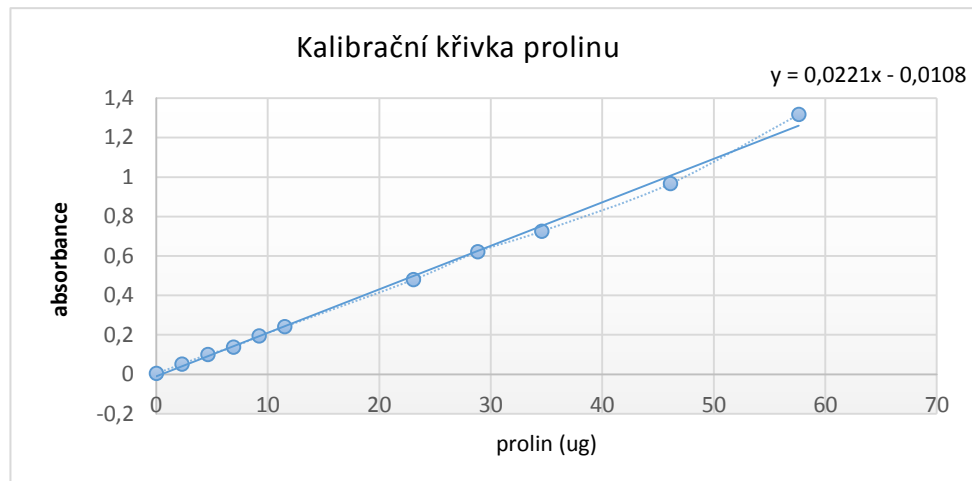
ninhydrin	1,25 g
kyselina octová	30 ml
kyselina trihydrogenfosforečná	7,62 ml
dH ₂ O	12,38 ml

Tab. 10: Chemické složení ninhydrinové kyseliny

Na spektrofotometru Evolution 201, v programu Thermo insight byla zaznamenávána absorbance horní vrstvy vzorku – toluen s prolinem ve vlnové délce 520 nm. Jako blank byl použit čistý toluen.

Pro kvantitativní stanovení obsahu prolinu ve vzorcích bylo nutně připravit kalibrační křivku prolinu (viz graf 2). Jako standart byl použit 0,001M roztok prolinu v koncentracích 20-500 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Standartní křivka byla vytvořena vynesemím hodnot absorbance proti jejich koncentracím hmotnosti.

Obsah prolinu byl vyjádřen v $\mu\text{mol/g}$ (Čh) resp. v $\mu\text{mol/g}$ (Sh).



Graf 2.: Kalibrační křivka prolinu

3.10. Statistické zpracování

Výsledky byly zpracovávány v excelu a dále statisticky analyzovány v programu NCSS 9. Rozdíly mezi více faktory byly hodnoceny metodou vícefaktorové analýzy rozptylu (GLM) a použitím vícenásobného porovnání pomocí Tukey-Kramerova testu. Pro statistické hodnocení nulové hypotézy o shodě středních hodnot mezi dvěma soubory byl použit dvouvýběrový t-test, v případě, že proměnné nevykazovaly normální rozdělení nebo shodu rozptylu, byl použit neparametrický Wilcoxonův test. Pro hodnocení nulové hypotézy o shodě středních hodnot mezi více soubory byla použita jednorozměrná analýza rozptylu ANOVA, případně jeho neparametrická obdoba Kruskal-Wallisův test.

Statisticky významné rozdíly mezi více faktory jsou označeny * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) a *** ($p < 0,001$). Nulová hypotéza o shodě mediánů byla zamítnuta či potvrzena standardně na 95% hladině významnosti. Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) jsou označeny odlišnými písmeny (a, b).

4. Výsledky

Výsledky z jednotlivých pokusů jsou pro lepší přehlednost řazeny podle stanovených cílů práce.

4.1. Akumulace thoria

Cíl práce: Vyhodnotit vliv sledovaných faktorů ošetření (fosfátová výživa, přidání kyseliny vinné do média a postřik putrescinem) na akumulaci Th v rostlinách *Nicotiana glutinosa* (L.) a jejich orgánech.

Hodnocení akumulace Th rostlinami bylo součástí prvního a druhého experimentu. Rostliny byly kultivovány po dobu 14 dní v různě modifikovaných médiích (deficience P, přítomnost organické kyseliny a přítomnost polyaminu) obsahujících 200 μM Th/l. Byl zkoumán příjem a akumulace Th kořeny a jeho následná translokace a akumulace do nadzemních částí rostlin (stonek, listy). Pro stanovení obsahu Th v jednotlivých orgánech byly odebírány vždy vzorky ze 4 rostlin rostoucích v jednotlivých médiích obohacených o Th. Rozdíly akumulace Th u rostlin z různých médií byly porovnávány vícerozměrnou analýzou rozptylu (ANOVA GLM).

4.1.1. Akumulace Th v kořenech

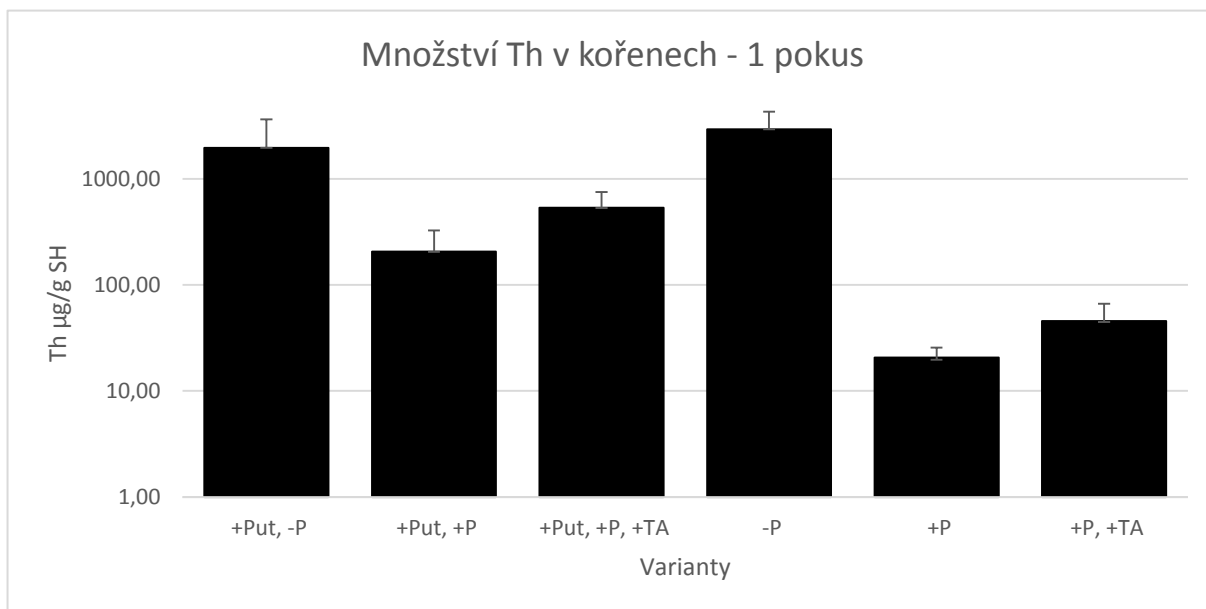
Graf 3 a graf 4 znázorňují akumulaci thoria v kořenech v pokusech 1 a 2. Z důvodu velkých rozdílů mezi jednotlivými hodnotami akumulace Th v kořenech bylo použito logaritmické měřítko. V kořenech na rozdíl od stonků a listů byly naměřeny poměrně velké rozdíly mezi jednotlivými médii. Nejvíce akumulovaného Th obsahovaly rostliny rostoucí v médiích s deficiencí P, naopak rostliny rostoucí v plném Hoaglandově médiu obsahovaly v kořenech Th nejméně. Z grafů je také patrné, že aplikace putrescinu na listy způsobila vyšší akumulaci Th v kořenech (pouze v prvním pokusu u rostlin rostoucích v médiích s deficiencí P tomu tak není). Z výsledků (tab. 11 a 12) ale jednoznačně vyplývá, že nejsilnější a statisticky průkazný vliv na akumulaci Th v kořenech má fosfátová výživa.

Analýza rozptylu - 3 faktory (1 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,732859	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,812350	n.s.
Fosfor (P)	0,006694	**

Tab. 11.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 1 pokus

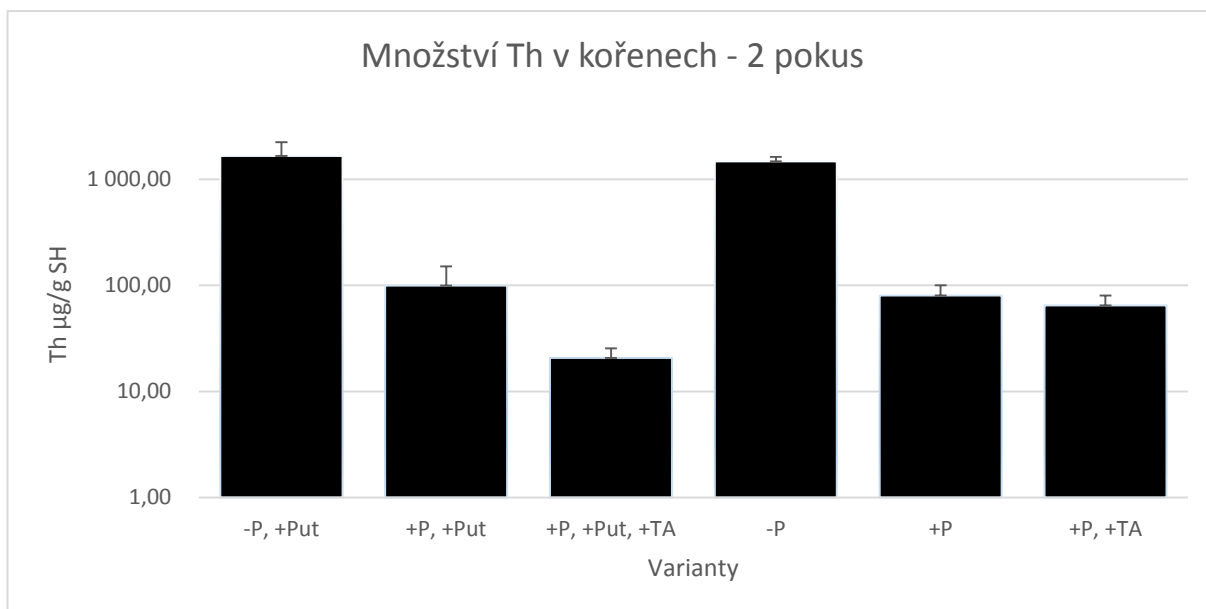
Analýza rozptylu - 3 faktory (2 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,169039	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,909889	n.s.
Fosfor (P)	0,000117	***

Tab. 12.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 2 pokus



Graf 3.: Celkové množství naakumulovaného Th v kořenech rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th



Graf 4.: Celkové množství naakumulovaného Th v kořenech rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th

4.1.2. Akumulace Th ve stoncích

Rostliny přijímají živiny ze substrátu kořeny, ve kterých dochází také k největší akumulaci Th. Translokace do nadzemních částí rostlin je ale omezená, což je patrné i na nižších obsahích Th v nadzemních částech rostlin oproti kořenům (v některých variantách i řádové rozdíly).

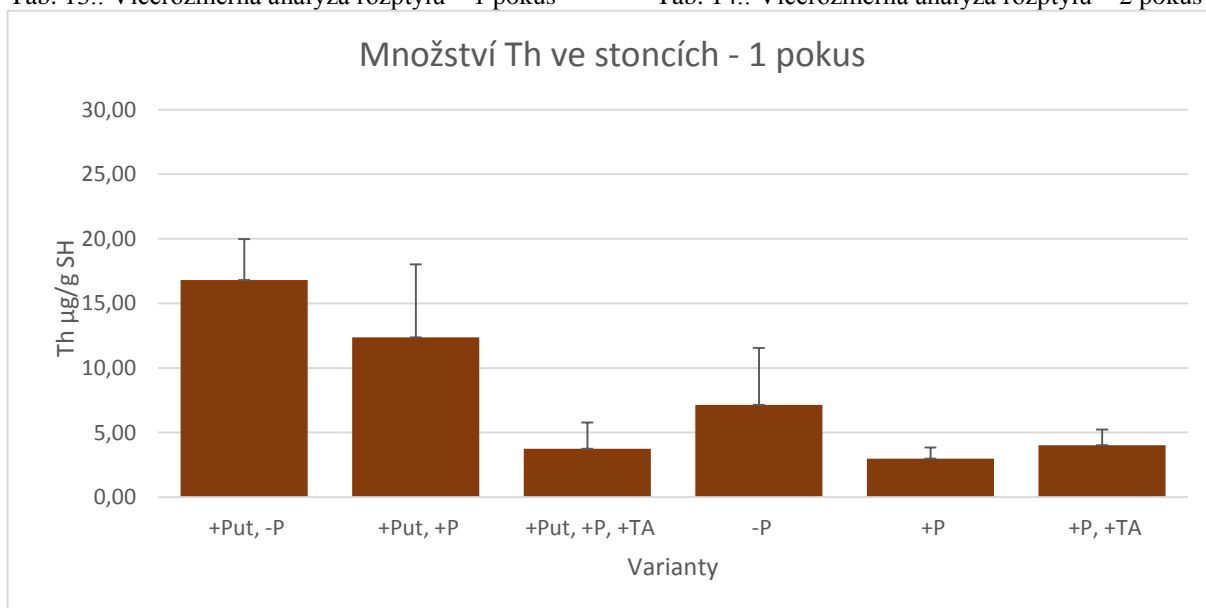
Nejvyšší akumulace Th ve stoncích (graf 5 a graf 6) byla opět zjištěna u rostlin rostoucích v deficienci fosforu. Tento rozdíl také částečně potvrdily výsledky analýzy rozptylu (tabulka 3 a 4). V prvním pokusu sice nevidíme žádný významný efekt sledovaných faktorů, ale můžeme vidět trend k vyšší akumulaci Th při ošetření putrescinem (varianty +Put, -P a +Put, +P v grafu 3 a 4, efekt putrescinu se blíží průkaznosti ($p = 0,059260$)). Ve druhém pokusu již vidíme signifikantní rozdíl způsobený deficiencí P, podobně jako tomu bylo u kořenů. Z grafů je dále také patrné, že podobně jako u kořenů, docházelo k větší akumulaci Th u rostlin stříkaných putrescinem, ale rozdíl mezi variantami opět není statisticky průkazný (tab. 13 a 14).

Analýza rozptylu - 3 faktory (1 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,059260	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,130506	n.s.
Fosfor (P)	0,081393	n.s.

Tab. 13.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 1 pokus

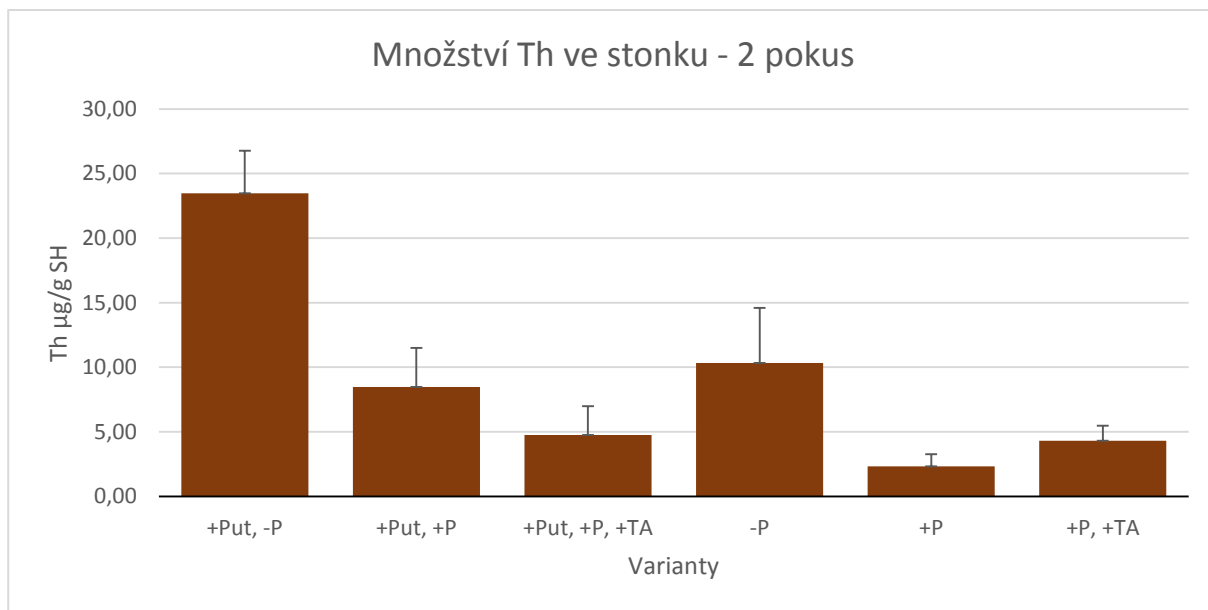
Analýza rozptylu - 3 faktory (2 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,072714	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,742784	n.s.
Fosfor (P)	0,001929	**

Tab. 14.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 2 pokus



Graf 5.: Celkové množství naakumulovaného Th ve stoncích rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th



Graf 6.: Celkové množství naakumulovaného Th ve stoncích rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th

4.1.3. Akumulace Th v listech

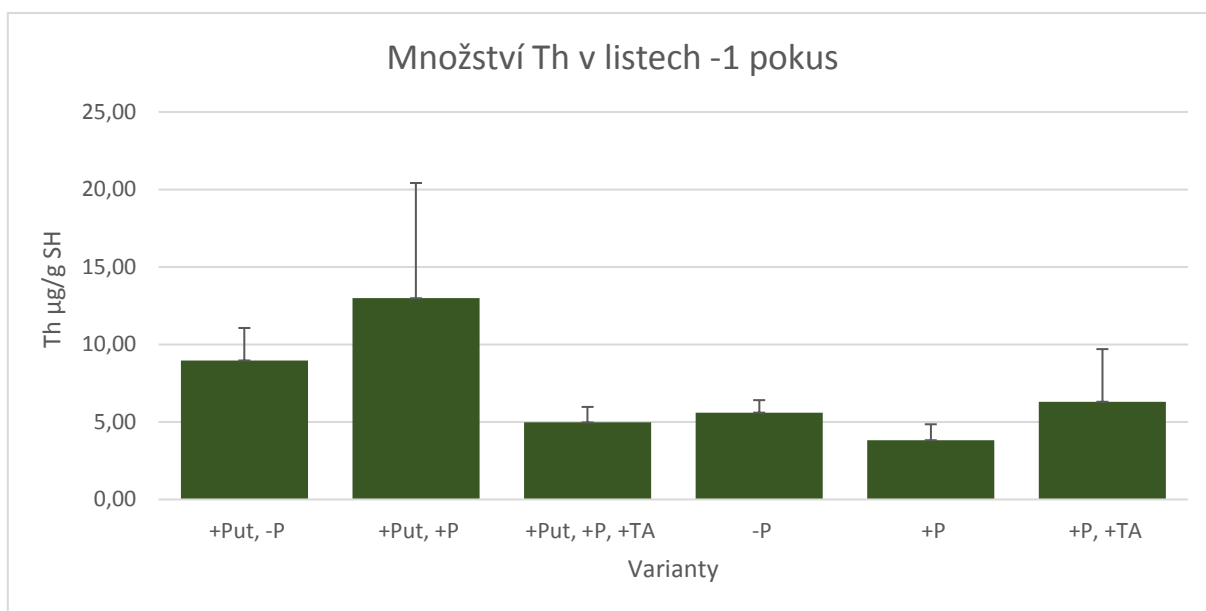
Největší rozdíly mezi oběma pokusy byly zjištěny v případě akumulace Th v listech. U jednotlivých variant nejsou žádné signifikantní rozdíly a z grafů (graf 7 a graf 8) nemůžeme mluvit ani o žádných trendech týkající se akumulace. Obecně z grafů lze pouze tvrdit, že rostliny, které byly stříkané putrescinem, opět akumulovaly větší množství Th v listech než rostliny bez postřiku, ale tento rozdíl mezi variantami není statisticky průkazný (tab. 15 a 16).

Analýza rozptylu - 3 faktory (1 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,659880	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,240867	n.s.
Fosfor (P)	0,615058	n.s.

Tab. 15.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 1 pokus

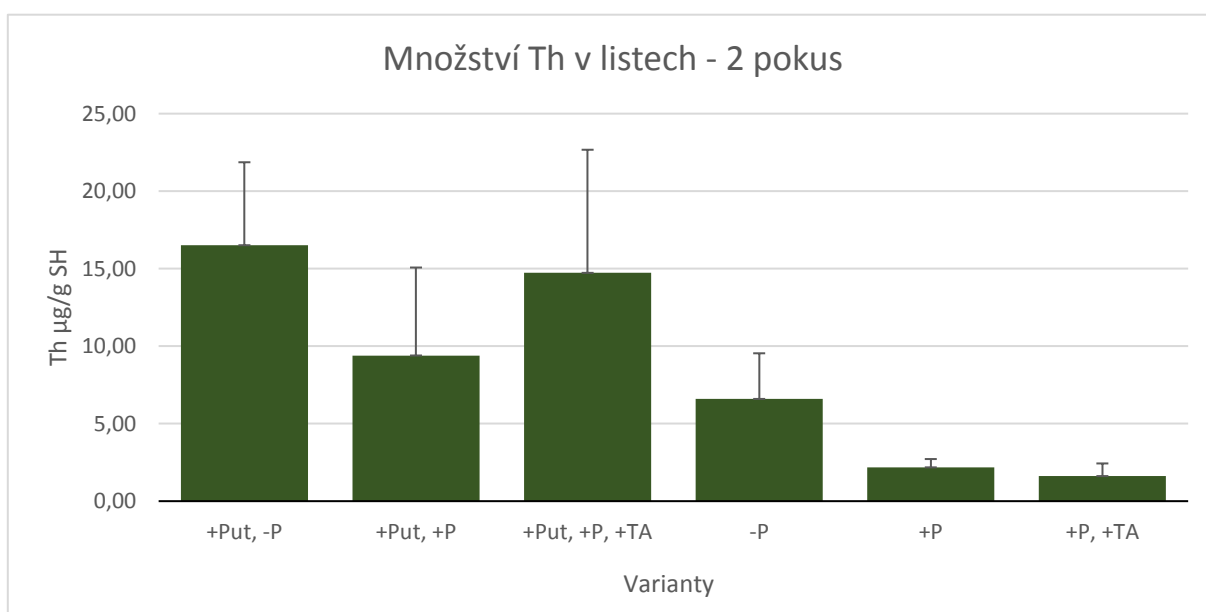
Analýza rozptylu - 3 faktory (2 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,442376	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,328385	n.s.
Fosfor (P)	0,581549	n.s.

Tab. 16.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 2 pokus



Graf 7.: Celkové množství naakumulovaného Th v listech rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním $200 \mu\text{M Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství Th je měřeno v $\mu\text{g/g SH}$)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th



Graf 8.: Celkové množství naakumulovaného Th v listech rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním $200 \mu\text{M Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus (množství Th je měřeno v $\mu\text{g/g SH}$)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th

4.1.4. Akumulace Th v nadzemní biomase

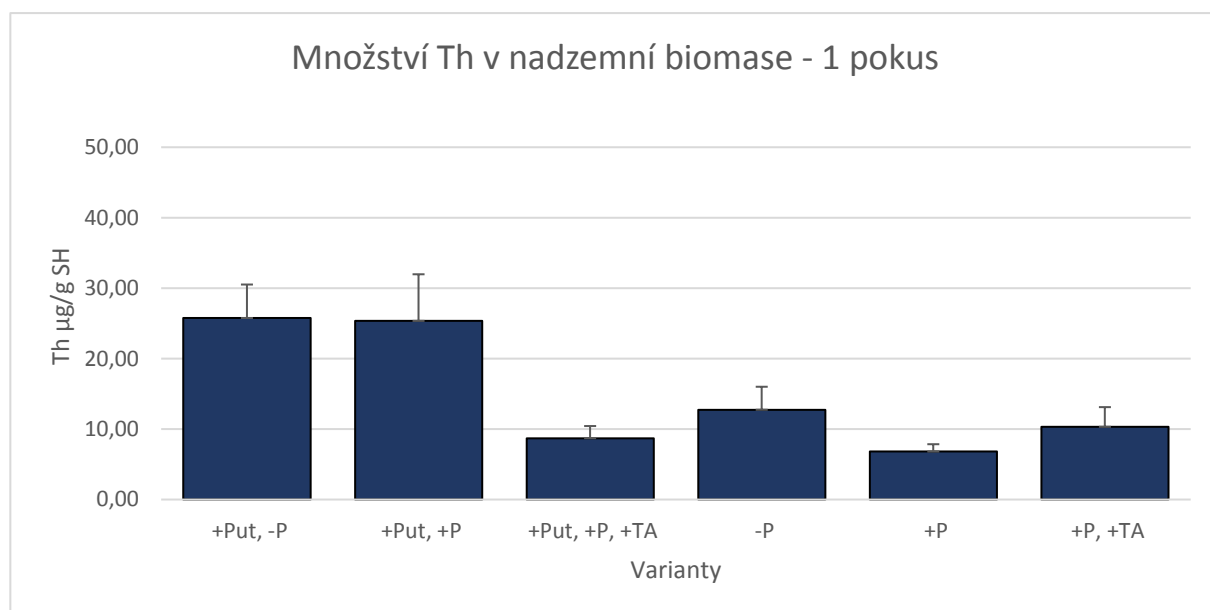
Graf 9 a graf 10 znázorňují akumulaci Th v celé nadzemní biomase rostlin. Z grafů vyplývá, že exogenní aplikace putrescinu zřejmě usnadňuje vyšší akumulaci Th v nadzemní části rostlin, vyjma kombinace s kyselinou vinnou v médiu. Vyšší akumulaci Th v nadzemní biomase opět můžeme vidět u rostlin rostoucích v deficienci P a u rostlin ošetřovaných postřikem putrescinu. Žádné výsledky ale nejsou statisticky významné (tab. 17 a 18).

Analýza rozptylu - 3 faktory (1 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,97613	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,61113	n.s.
Fosfor (P)	0,226748	n.s.

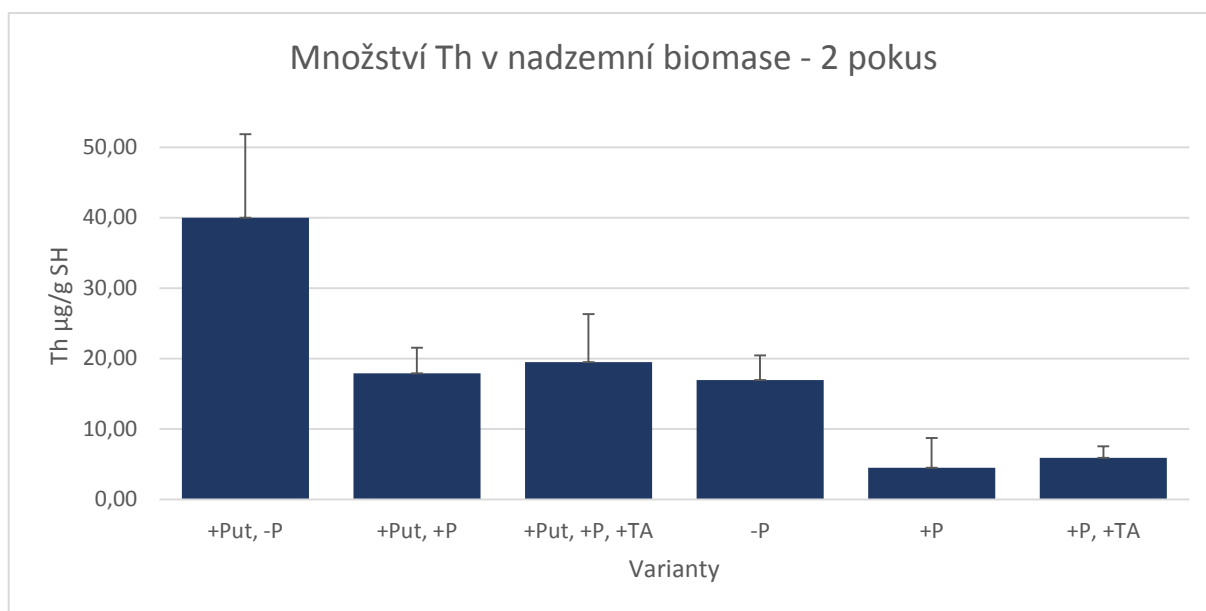
Tab. 17.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 1 pokus

Analýza rozptylu - 3 faktory (2 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,264526	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,294691	n.s.
Fosfor (P)	0,904942	n.s.

Tab. 18.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 2 pokus



Graf 9.: Celkové množství naakumulovaného Th v nadzemní biomase rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)
Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th



Graf 10.: Celkové množství naakumulovaného Th v nadzemní biomase rostlin kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th

4.1.5. Poměr akumulace Th v S/R

Pro lepší představu o vlivu sledovaných faktorů na translokaci Th do nadzemních částí rostlin byl porovnáván poměr Th v nadzemní biomase a kořenech, který bývá nazýván jako translokační faktor (viz graf 11 a graf 12).

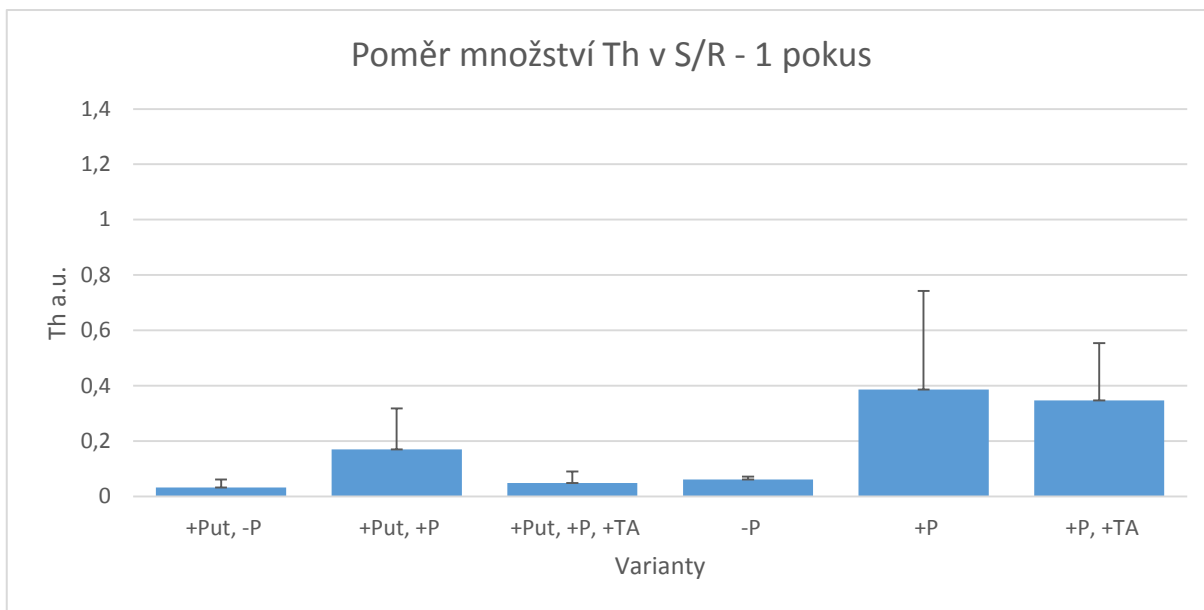
Největší signifikantní rozdíl je opět vidět u rostlin rostoucích v deficienci P, což souhlasí s výše popsanými výsledky. Deficientní rostliny akumulují největší množství Th ve všech orgánech, ale celková translokace Th do nadzemních částí je poměrně malá. Nejvyšší hodnota translokačního faktoru v prvním pokusu (graf 9) byla zjištěna u rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou a ve fosfátovém médiu s přidanou kyselinou vinnou. Ve druhém pokusu byla nejvyšší hodnota naměřena ve fosfátovém médiu s přidanou kyselinou vinnou, na jejichž listy byl stříkán putrescin. To znamená, že putrescin zvyšuje translokaci Th do nadzemní biomasy, ale výsledky nejsou statisticky průkazné (tab. 19 a 20).

Analýza rozptylu - 3 faktory (1 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,205782	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,461226	n.s.
Fosfor (P)	0,001934	**

Tab. 19.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 1 pokus

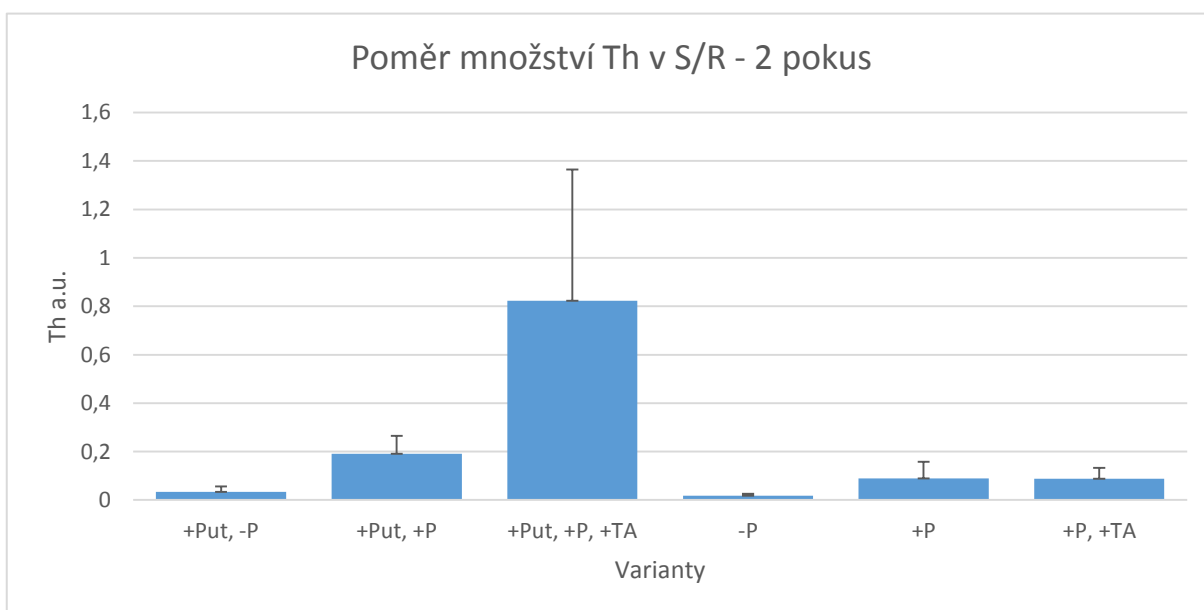
Analýza rozptylu - 3 faktory (2 pokus)		
	p-hodnota	signifikance
Putrescin (Put)	0,07700	n.s.
Kys. Vinná (TA)	0,777722	n.s.
Fosfor (P)	0,001379	**

Tab. 20.: Vícerozměrná analýza rozptylu – 2 pokus



Graf 11.: Poměr množství naakumulovaného Th v R/S kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství Th je měřeno v $\mu\text{g/g}$ SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u. – arbitrální jednotky; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th



Graf 12.: Poměr množství naakumulovaného Th v R/S kultivovaných v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus (množství Th je měřeno v $\mu\text{g/g}$ SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u. – arbitrální jednotky; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th

V prvním pokusu rostliny vykvetly a bylo tedy stanovováno i množství Th ve květech. Z důvodu velmi malých hodnot akumulace Th (řádově jednotky) a absenci statisticky významných rozdílů zde tato data nejsou uvedena.

Všechny výše uvedené výsledky ukazují, že akumulace Th se směrem od kořenů k listům resp. květům snižuje. Obsah Th v nadzemní biomase byl přibližně 100x nižší nežli obsah Th v kořenech. Dále také můžeme konstatovat, že největší vliv na příjem Th má deficiencie P, ale významně ji ovlivňuje exogenní přidání putrescinu, který byl stříkán na rostliny.

4.2. Reakce rostlin na přítomnost Th v médiu – nespecifické indikátory stresu

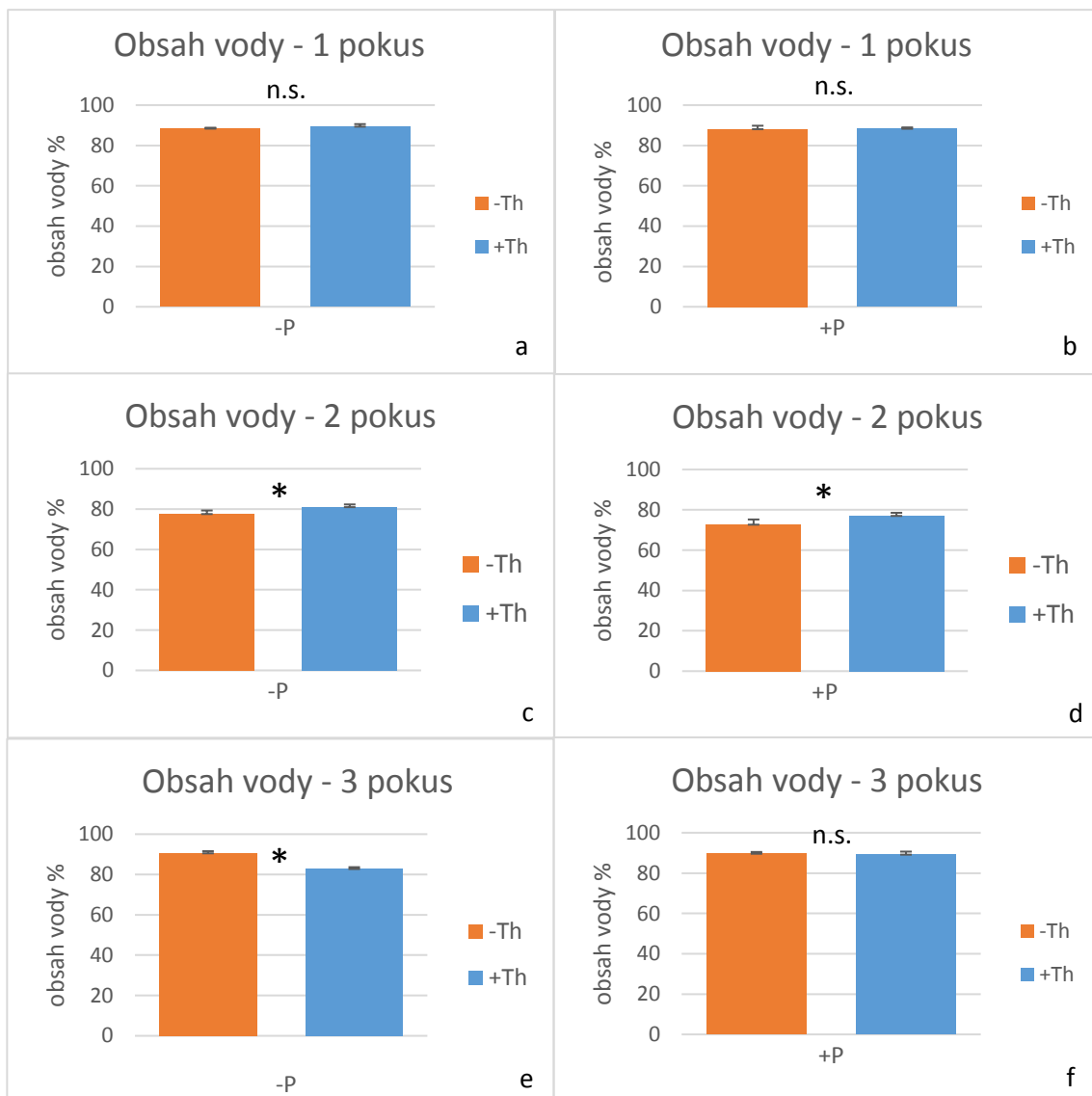
Cíl práce: Vyhodnotit odpověď *Nicotiana glutinosa* (L.) na přítomnost Th v médiu na úrovni fyziologických markerů:

- obsahu vody v rostlinách
- vybraných parametrů fotosyntetického aparátu
- detekce oxidativního stresu

Z výsledků publikovaných v předchozí kapitole jasně plyne, že největší vliv na akumulaci Th rostlinami měla fosfátová výživa. Proto v následující kapitole budou reakce na přítomnost Th rozděleny podle přítomnosti resp. nepřítomnosti P v médiích. Výsledné hodnoty budou porovnávány dvouvýběrovým t-testem.

4.2.1. Obsah vody v listech

Pro stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů na sušinu bylo nutné také stanovit obsah vody v listech. Graf 13 (a-f) naznačuje, že přítomnost Th v médiu neměla vliv na obsah vody v listech, ačkoliv některé výsledky vyšly signifikantní. Zdá se, že ani P výživa nemá vliv na relativní obsah vody v listech. Signifikantní výsledky jsou tedy spíše výsledkem přirozených rozdílů mezi rostlinami.



Graf 13.: Stanovení obsahu vody; a) 1 pokus -P, b) 1 pokus +P; c) 2 pokus -P; d) 2 pokus +P, e) 3 pokus -P, f) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky obsahu vody
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

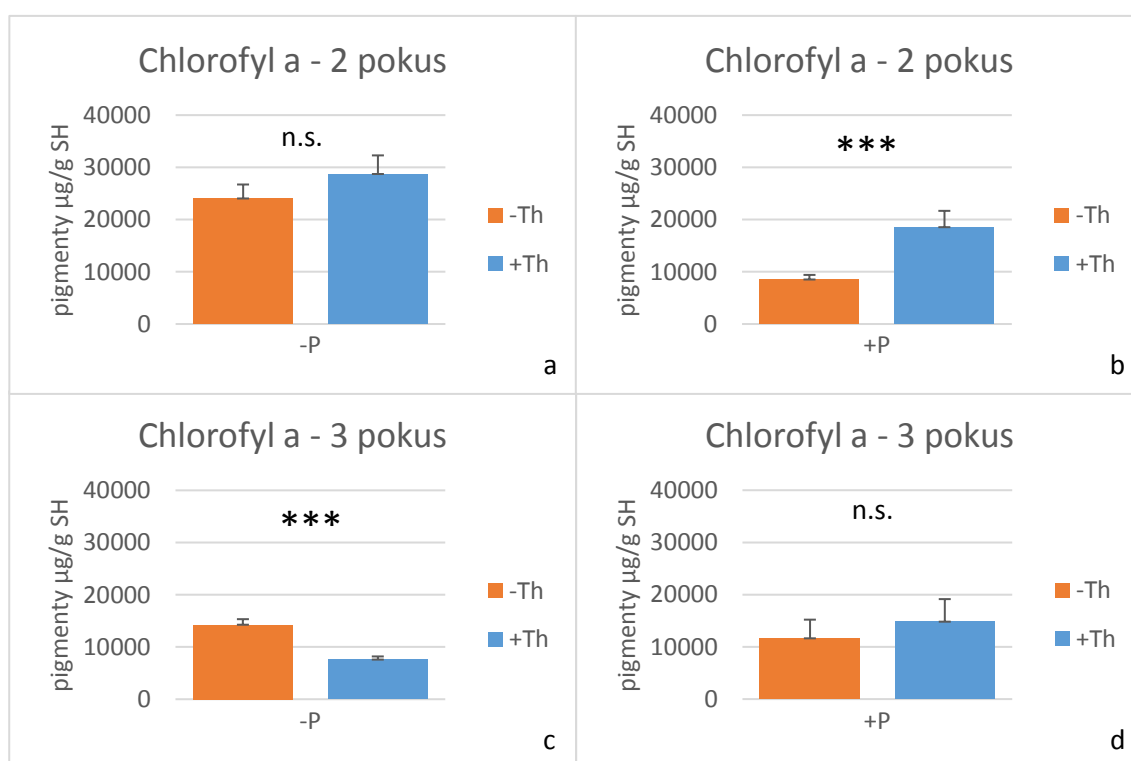
4.2.2. Parametry fotosyntetického aparátu

Jedny ze sledovaných parametrů byly parametry fotosyntetického aparátu. V prvním pokusu byla pro stanovení fotosyntetických pigmentů použita extrakce do methanolu a metodika dle Lichtenhaler (2001). Kvůli metodické chybě v extrakci nebudou tyto výsledky prezentovány. Prezentovány budou pouze výsledky z druhého a třetího pokusu, kde byla použita extrakce do DMF a metodika dle Porra et al. (1989).

4.2.2.1. Obsah fotosyntetických pigmentů

Cílem tohoto experimentu bylo zjištění množství fotosyntetických pigmentů v rostlinách rostoucích v ne/přítomnosti Th a v deficienci a přítomnosti P.

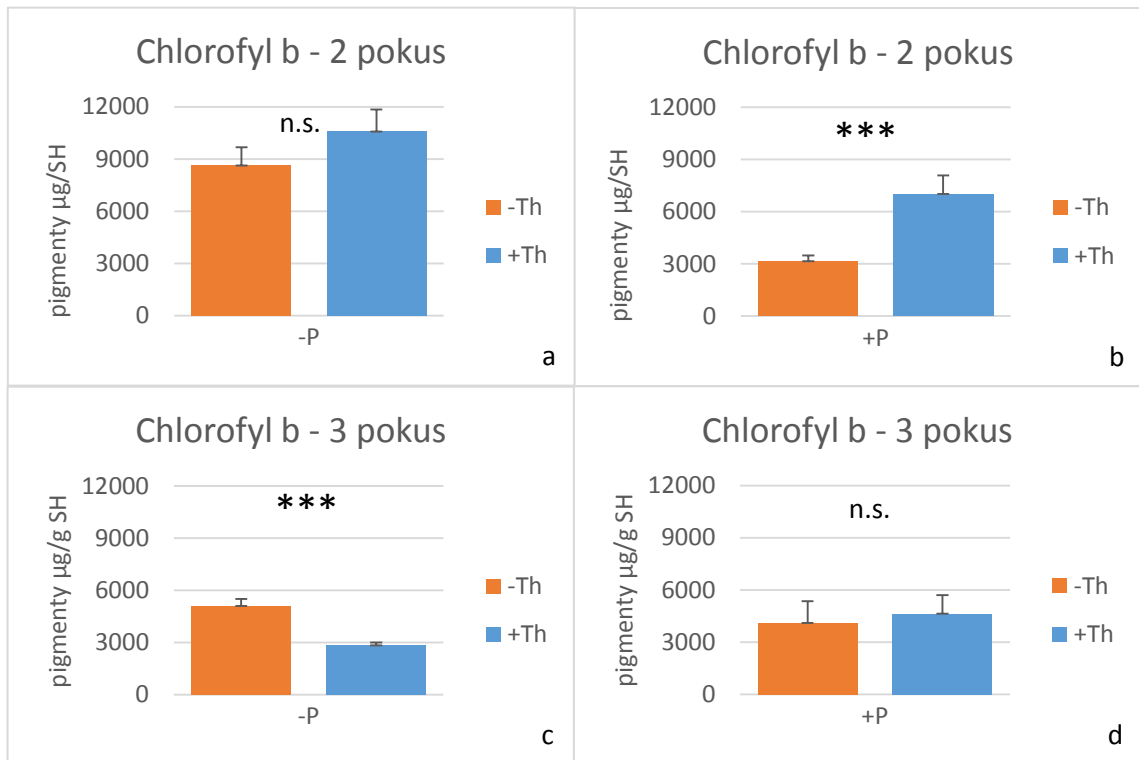
Prvním zkoumaným pigmentem byl chlorofyl a (graf 14, a-d), který je považován za pigment, který je více citlivý k poškození než chlorofyl b (Bidwell 1979, cit. dle Chettri et al. 1998). Ve druhém pokusu se v závislosti na přítomnosti Th v médiu obsah chlorofylu a u rostlin rostoucích v deficienci fosforu neměnil (graf 14a), avšak při optimální výživě s přítomností Th obsah chlorofylu a v listech průkazně vzrostl (graf 14b). Ve třetím pokusu ovšem vyšla akumulace u deficientních rostlin opačně než ve druhém pokusu: při deficienci P se obsah chlorofylu a v rostlinách ošetřených Th oproti kontrole průkazně snižoval (graf 14c), při optimální P výživě nebyly zaznamenávány průkazné rozdíly v obsahu chlorofylu a v závislosti na přítomnosti Th (graf 14d).



Graf 14.: Stanovení obsahu chl a v SH; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchytky množství pigmentu
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

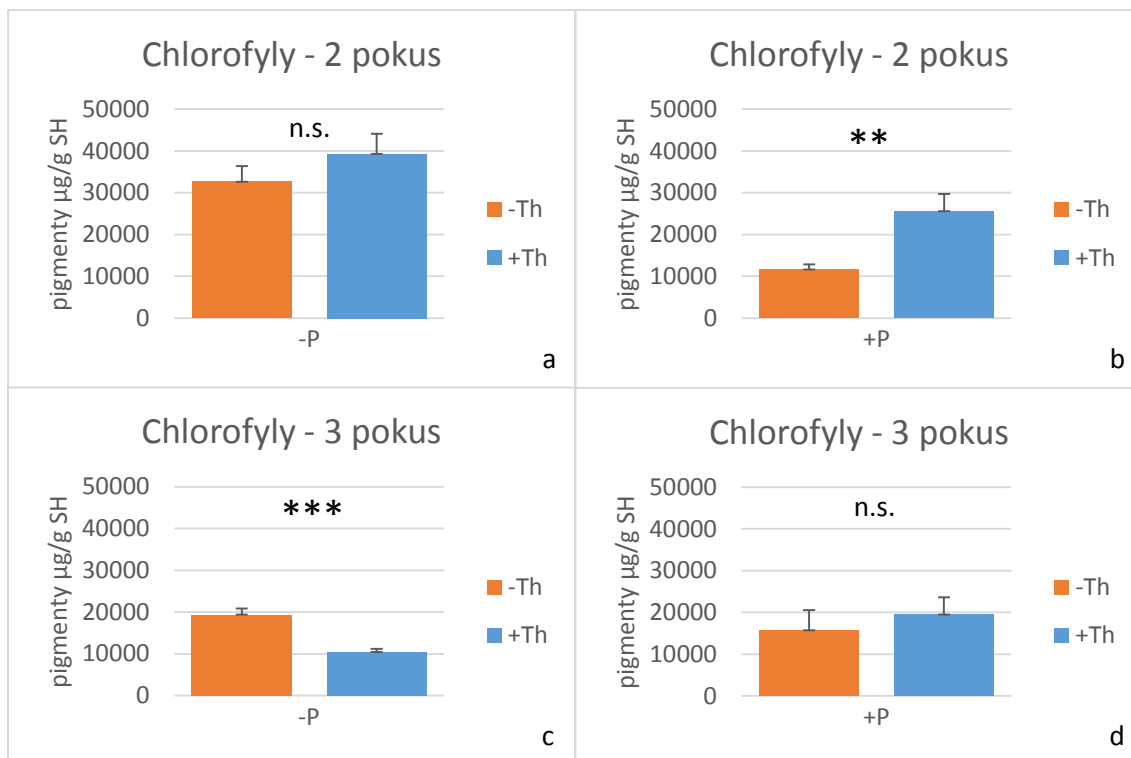
Druhým sledovaným pigmentem byl chlorofyl b (graf 15, a-d). Ve druhém pokusu můžeme vidět, že se obsah chlorofylu b v závislosti na přítomnosti Th v médiu neměnil u rostlin rostoucích v deficienci fosforu (graf 15a), ale při optimální výživě s přítomností Th v médiu

došlo k výraznému nárůstu chlorofylu b v listech (graf 15b). Ve třetím pokusu rostliny rostoucí v přítomnosti Th a v deficienci P obsahovaly menší množství chlorofylu b (graf 15c). U rostlin s optimální fosfátovou výživou nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl (graf 15d).



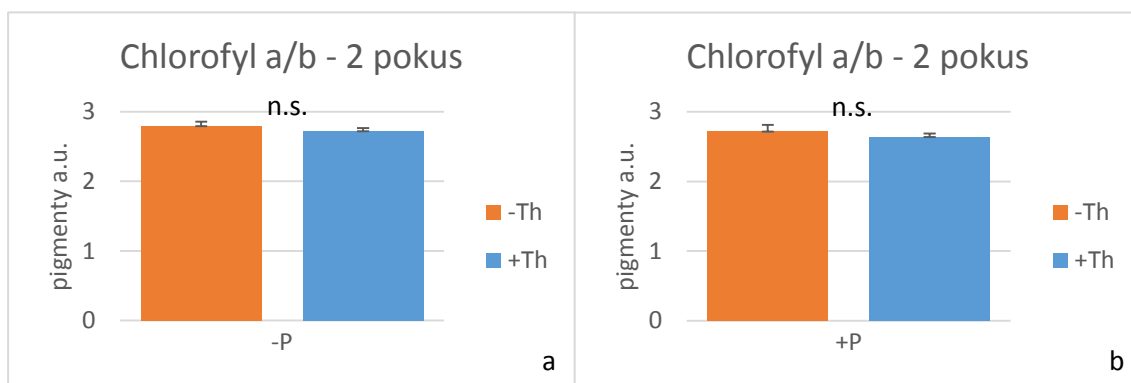
Graf 15.: Stanovení obsahu chl b v SH; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchytky množství pigmentu
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

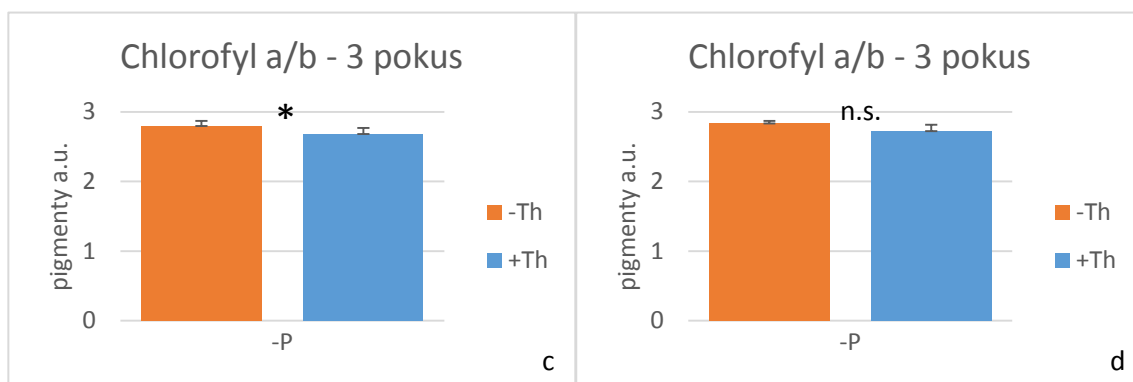
Bylo sledováno také celkové množství chlorofylů (graf 16, a-d). Tyto výsledky byly podobné výsledkům obsahu chlorofylu a, tzn.: ve druhém pokusu byla vyšší akumulace celkového množství chlorofylů naměřena u rostlin rostoucích v přítomnosti Th při optimální fosfátové výživě (graf 16b). Naopak ve třetím pokusu celkový obsah chlorofylů vypovídal spíše reakci chlorofylu b na přítomnost Th v deficientním médiu (graf 16c).



Graf 16.: Stanovení obsahu chlorofylů; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchytky množství pigmentu
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

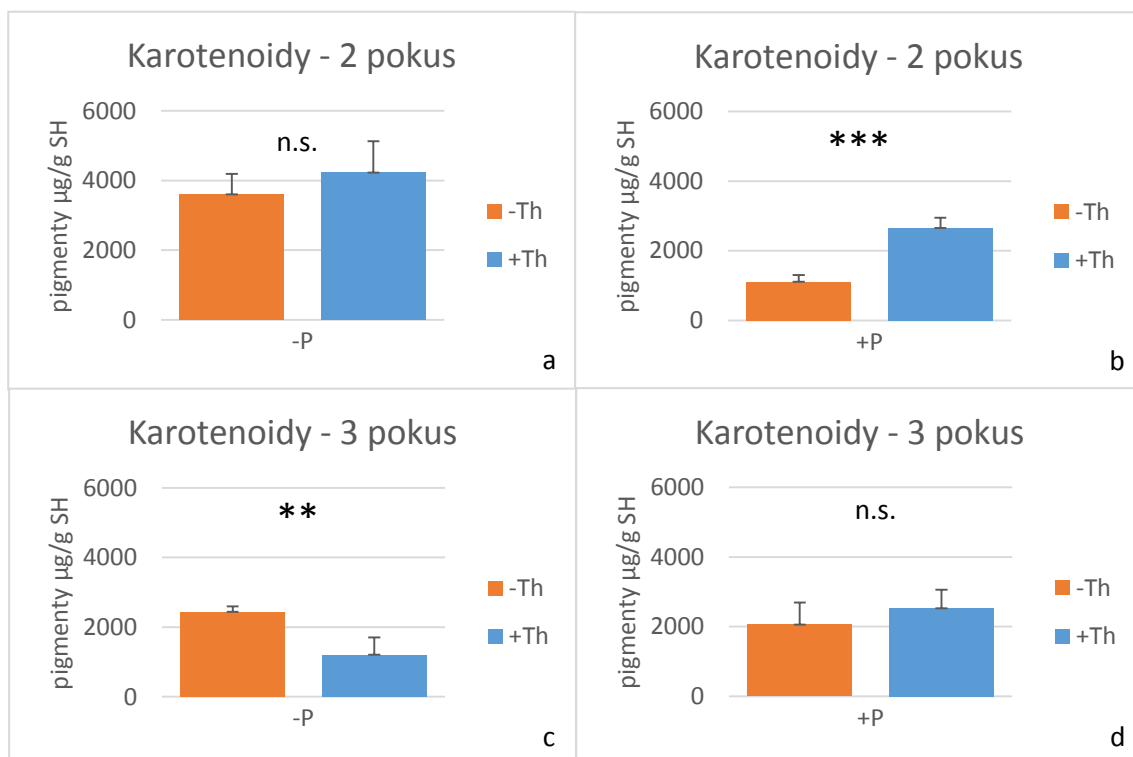
Žádné významné rozdíly nebyly zjištěny ani v případě sledování poměru chlorofylu a a chlorofylu b (graf 17, a-d). Nicméně na všech grafech můžeme vidět, že poměr chl a/chl b byl nezměněn u rostlin v přítomnosti Th. Pouze u třetího pokusu při deficienci P se poměr chl a/chl b statisticky významně snižoval u rostlin ošetřených Th (graf 17c).





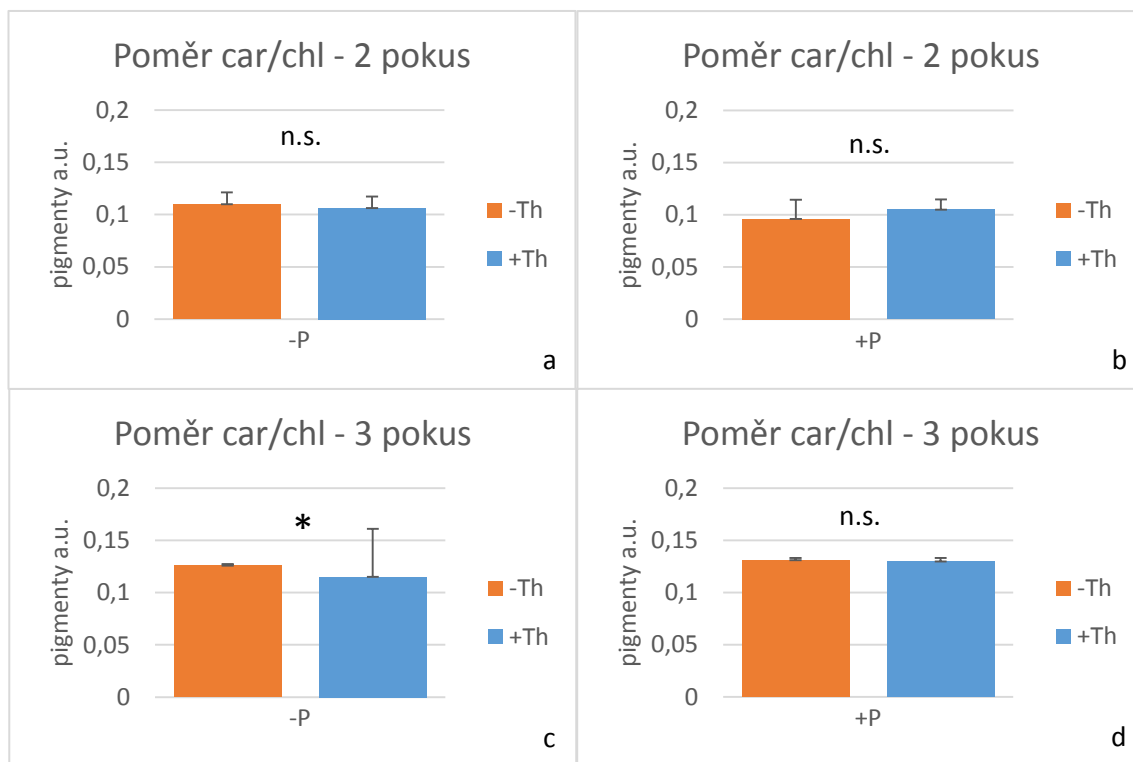
Graf 17.: Stanovení podílu chl a/b ; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
 P – fosfor, Th – thorium, a.u. – arbitrální jednotky, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentu
 hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

Dalšími sledovanými pigmenty byly celkové karotenoidy (graf 18, a-d). Průkazně vyšší obsah karotenoidů byl zjištěn v listech rostlin s přidaným Th v médiu při optimální výživě ve druhém pokusu (graf 18b). Pouze ve třetím pokusu v médiích bez fosforu byl průkazně snížený obsah karotenoidů zjištěn u rostlin rostoucích v médiu s přidaným Th (graf 18c).



Graf 18.: Stanovení obsahu karotenoidů ; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
 P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentu
 hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

Nakonec byl v pokusu sledován podíl karotenoidů a chlorofylů (graf 19, a-d). Ve většině případů neměla přítomnost Th v médiu průkazný vliv na poměr car/chl, pouze ve 3. pokusu při deficienci fosforu se poměr car/chl s přidáním Th snižoval (graf 19c).

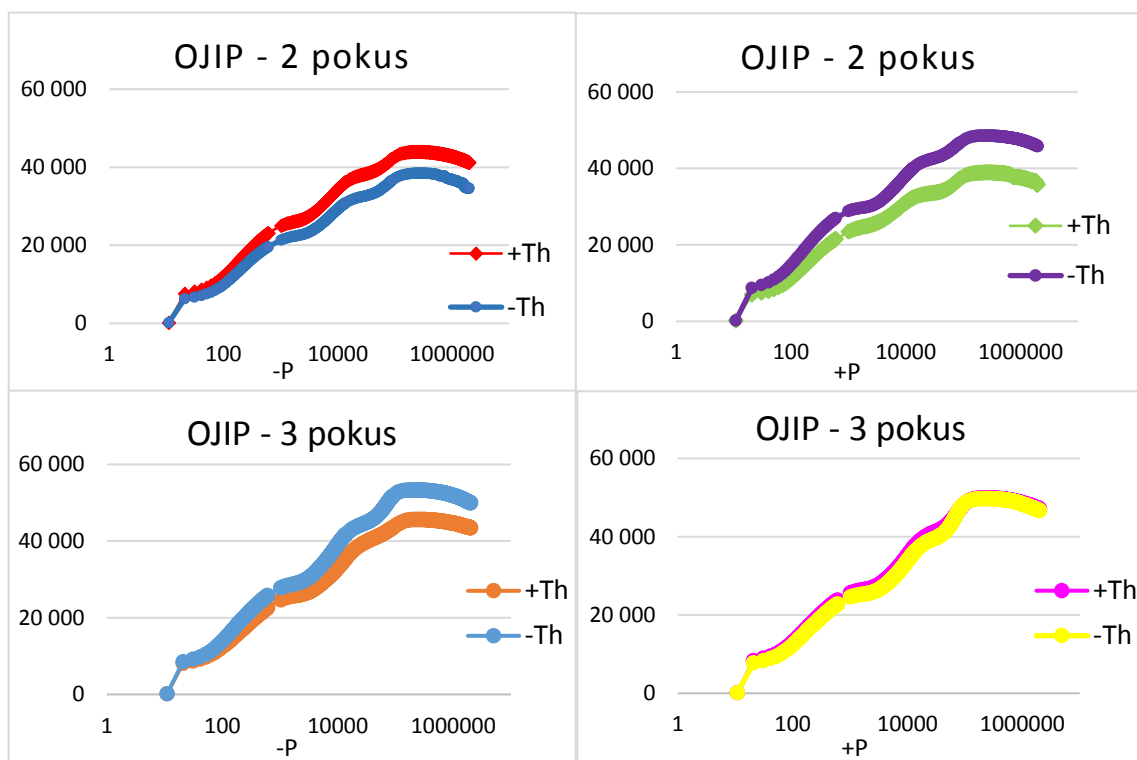


Graf 19.: Stanovení podílu car/chl; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, a.u. – arbitrální jednotky, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentu
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

4.2.2.2. Fluorescenční parametry a OJIP křivka

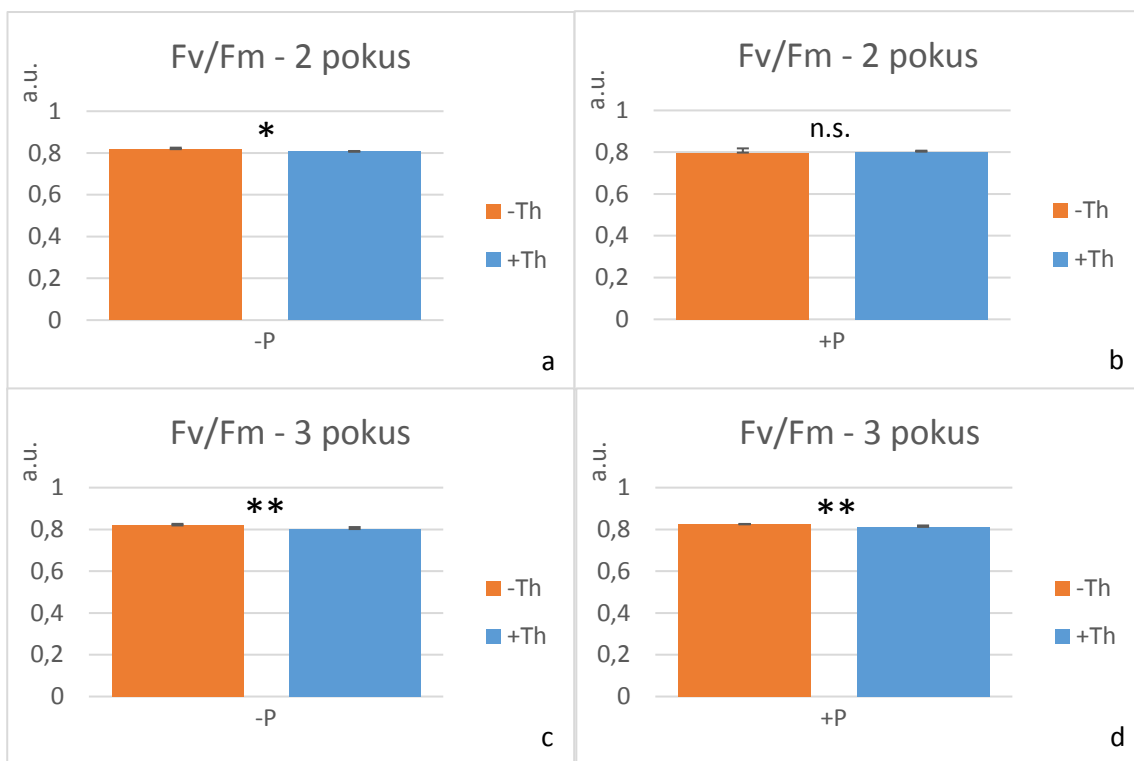
Rostliny ve 2 a 3 pokusu byly dále použity na měření parametrů rychlé kinetiky fluorescence – OJIP křivka a fluorescenční parametry. Celkem byly stanovovány dva fluorescenční parametry – poměrně stabilní parametr F_v/F_m a parametr F_v/F_o , který citlivěji reaguje na změnu fluorescence v závislosti na stresu.

V případě OJIP křivky (graf 20, a-d) není na první pohled patrný žádný významný efekt přítomnosti Th. Fosfátová výživa ani přítomnost Th neměli vliv na tvar OJIP křivky. Z grafů (graf 20a, 20c) ale můžeme vidět, že všechny stresované rostliny, rostoucí v přítomnosti Th na deficientním médiu, ale i rostliny, které rostly pouze v deficientním médiu bez přidaného Th a rostliny z druhého pokusu, které rostly v přítomnosti Th v médiu s optimální výživou (graf 20b – zelená křivka), dosahují nižších hodnot maximální fluorescence než kontrola – tedy rostliny rostoucí v médiu s optimální výživou (graf 20b – fialová křivka, graf 20d – žlutá křivka).



Graf 20.: OJIP křivky; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, a.u. -arbitrální jednotky

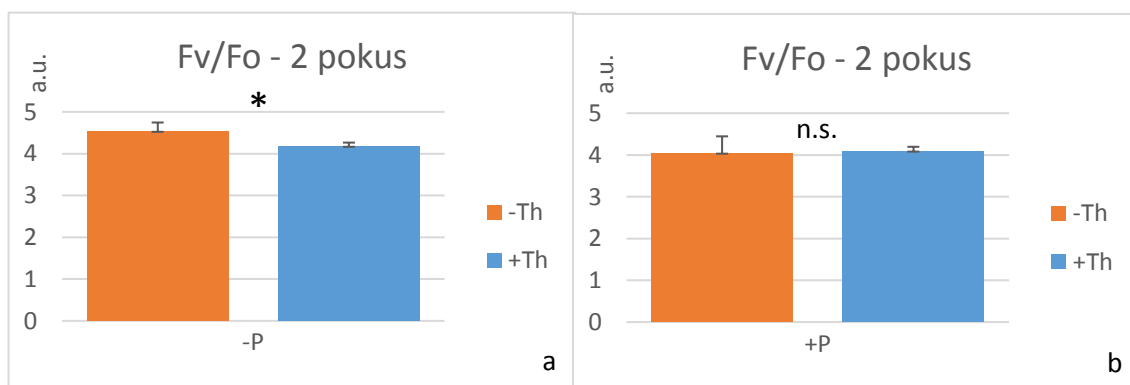
Nejprve byl stanoven poměr variabilní a maximální fluorescence (graf 21, a-d). Tento poměr bývá poměrně stabilní a významné rozdíly upozorňují na stres u rostlin (Žurek et al. 2013). Ve druhém pokusu se fluorescenční parametr F_v/F_m snižoval v závislosti na Th pouze u deficientních rostlin (graf 21a). Ve třetím pokusu již můžeme vidět významné snížení fluorescenčního parametru F_v/F_m v závislosti na Th u deficientních rostlin (graf 21c) i u rostlin s optimální výživou (graf 21d).

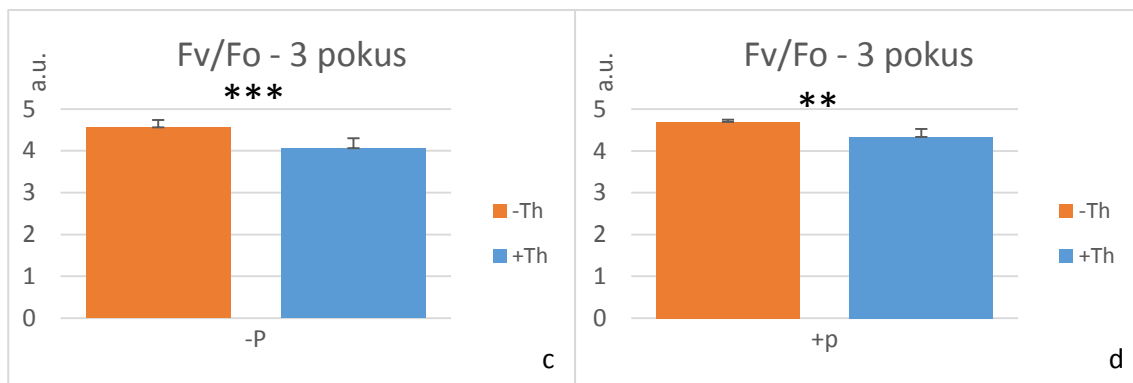


Graf 21.: Stanovení fluorescence F_v/F_m ; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, a.u. -arbitární jednotky, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky F_v/F_m
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $*$ = 0,05, $**$ = 0,01, $***$ = 0,001

Byl stanovován také poměr mezi variabilní a minimální fluorescencí. Tento fluorescenční parametr je citlivější ke změnám prostředí a ke stresu nežli předchozí F_v/F_m .

Graf 22 (a-d) opět ukazuje, že existují významné rozdíly i v parametru F_v/F_o u rostlin rostoucích v přítomnosti resp. nepřítomnosti Th v médiu. Stejně jako v předchozím případě je tento rozdíl významnější u rostlin rostoucích v deficienci P, poměr F_v/F_o se s přítomností Th v médiu snižuje (graf 22a, 22c). Významný rozdíl znovu také vidíme u rostlin s optimální výživou, kde se poměr F_v/F_o s přítomností Th v médiu také snižuje (graf 22d).





Graf 22.: Stanovení fluorescence Fv/Fo; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, a.u. -arbitární jednotky, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky Fv/Fm
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

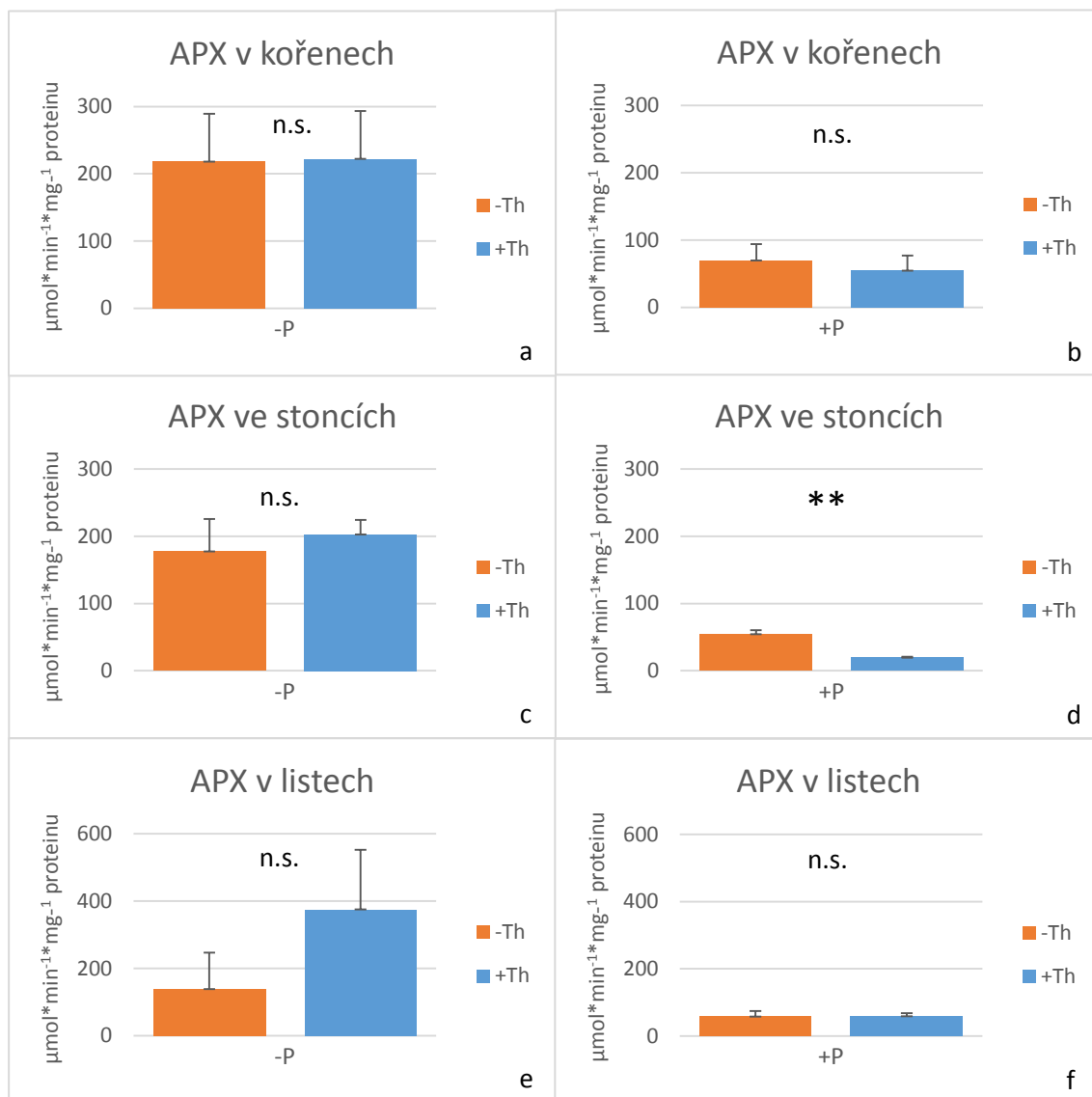
4.2.3. Detekce oxidativního stresu

4.2.3.1. Specifická aktivita antioxidantních enzymů

Celková specifická aktivita antioxidantních enzymů byla stanovována pouze v prvním experimentu. Tento experiment měl za cíl sledovat aktivitu 4 enzymů – APX (graf 23), CAT (graf 24), PX (graf 25) a GST (graf 26).

Graf 23 znázorňuje aktivitu APX v jednotlivých orgánech rostliny. Ve všech P-deficientních médiích graf (23a, 23c, 23d) byla pozorována zvýšená aktivita APX oproti rostlinám z optimální P výživy (graf 23b, 23d, 23f). Vyšší aktivita APX potom byla změřena zejména u rostlin rostoucích v médiích s přidaným Th, nicméně žádné výsledky nejsou signifikantní. Jediný významný výsledek byl zjištěn u stonků rostlin rostoucích v přítomnosti P (graf 23d). Tady můžeme pozorovat sníženou aktivitu APX u rostlin rostoucích v +Th.

Celková aktivita APX u rostlin rostoucích v +P médiu byla přibližně třetinová než aktivita APX u rostlin rostoucích na deficientním médiu. Z grafů dále plyne, že ve všech orgánech rostliny dochází přibližně ke stejné aktivitě tohoto enzymu.

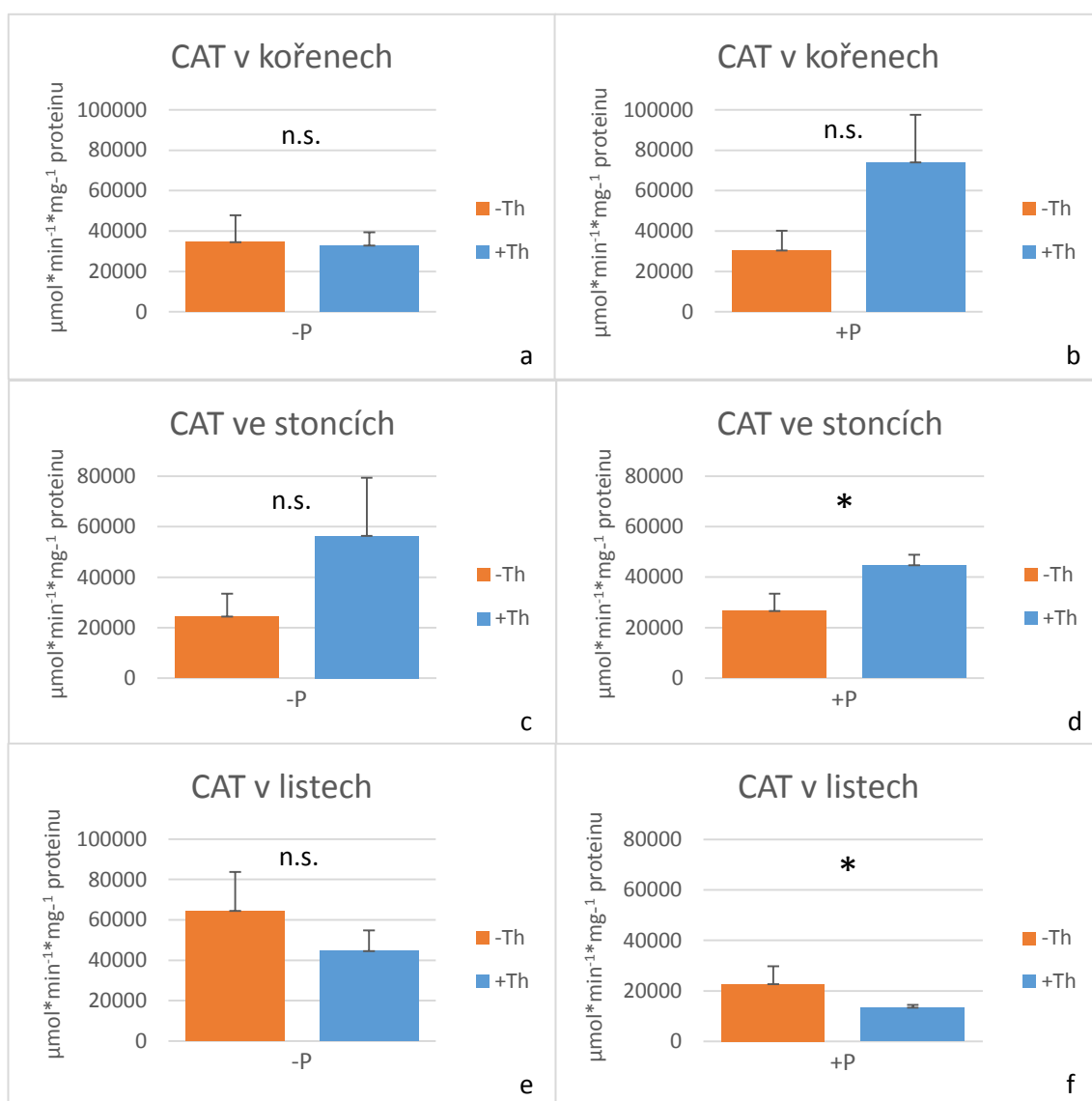


Graf 23.: Stanovení aktivity APX; a) kořeny -P, b) kořeny +P; c) stonček -P; d) stonček +P; e) listy -P; f) listy +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství APX
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

Specifickou aktivitu CAT ukazuje graf 24 (a-f). Aktivita CAT se v závislosti na přítomnosti Th v optimálním médiu průkazně zvyšovala pouze ve stoncích rostlin (graf 24d), obdobný trend je ale také vidět u kořenů (graf 24b). V listech potom bylo naměřeno průkazné snížení aktivity CAT (graf 24f). U rostlin rostoucích v deficičním médiu je vidět podobný trend, jako v optimálním médiu - u stonků (graf 24c) je podobný trend navýšení aktivity jako v +P médiu, v listech (graf 24e) je pak vidět trend k poklesu aktivity CAT podobně jako v +P médiu. Enzym se tedy chová v různých orgánech odlišně.

Grafy dále ukazují, že rostliny rostoucí v optimálním fosfátové výživě stejně jako rostliny rostoucí v deficienci fosforu se chovají podobně ve všech orgánech. Rozdílná významnost výsledků je zřejmě dána nízkým počtem pozorování.

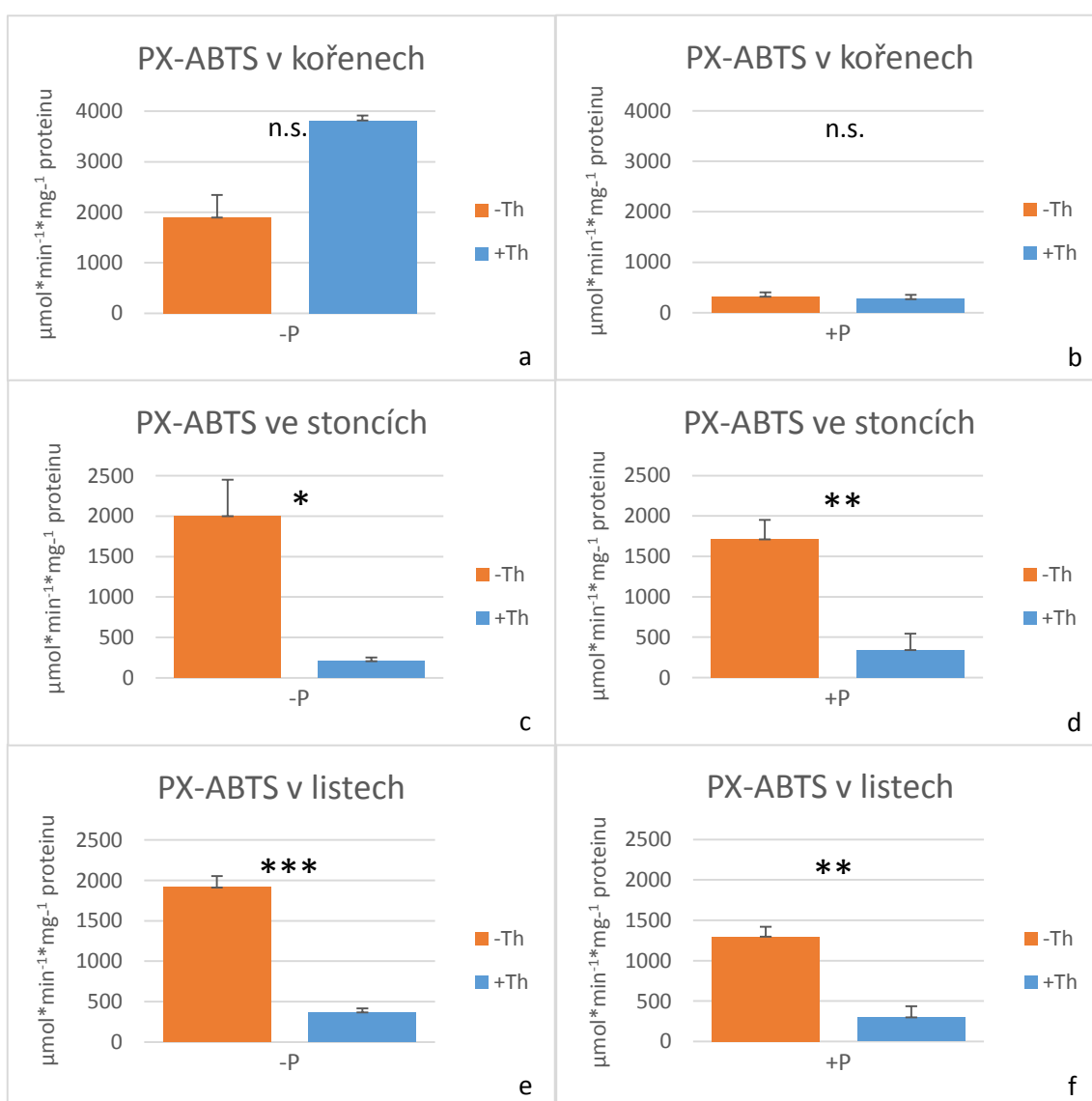
Celková aktivita CAT se v jednotlivých orgánech rostlin rostoucích v optimálním fosfátové výživě u -Th varianty prakticky neměnila, ale u +Th rostlin se směrem od kořenů po listy snižovala. V deficientním médiu -P pak byla aktivita CAT u + Th rostlin v kořenech nejnižší, naopak nejvyšší byla ve stoncích, ale u rostlin rostoucích v -Th médiu byla ve stoncích nejnižší a nejvyšší v listech.



Graf 24.: Stanovení aktivity CAT; a) kořeny -P, b) kořeny +P; c) stoněk -P; d) stoněk +P; e) listy -P; f) listy +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchytky množství CAT
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

V grafu 25 (a-f) je zobrazena specifická aktivita PX-ABTS. Ve stoncích a v listech byly pozorovány významné rozdíly mezi aktivitou PX v médiích v závislosti na přítomnosti Th a to jak v deficientním -P, tak v médiu s optimální fosfátovou výživou. Vyšší aktivita PX byla vždy naměřena u rostlin bez přidaného Th. V deficientních médiích byla aktivita PX mírně vyšší než v +P médiích.

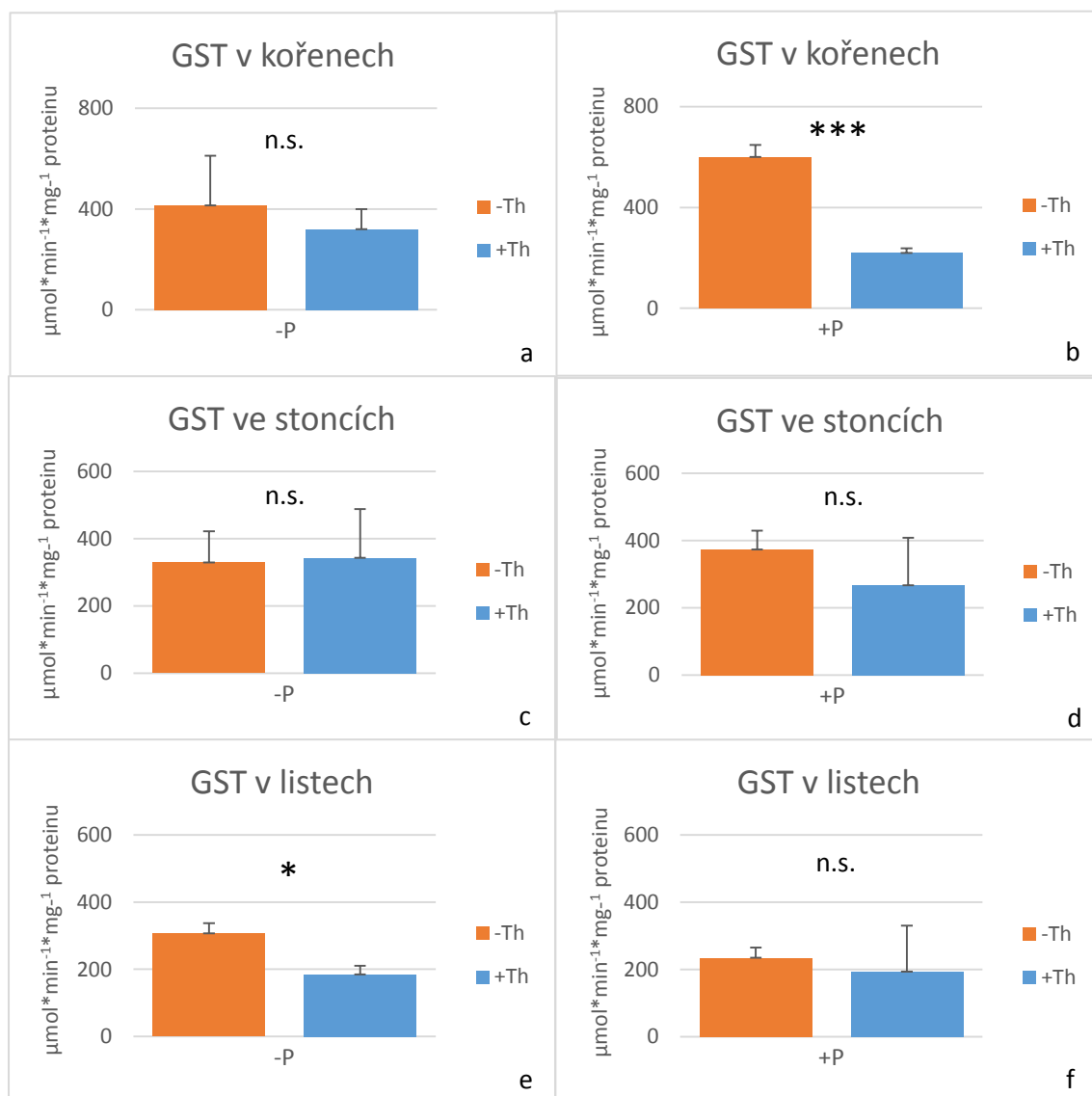
V kořenech nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v aktivitě PX. Expozice Th ale způsobila trend ke zvýšení specifické aktivity PX v kořenech rostlin rostoucích v P-deficientním médiu (graf 25a). Celkově byla aktivita PX v deficientních médiích přibližně 4x, resp. 8x (v +Th variantě) vyšší než v médiích +P.



Graf 25.: Stanovení aktivity PX-ABTS; a) kořeny -P, b) kořeny +P; c) stonky -P; d) stonky +P; e) listy -P; f) listy +P

P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství PX-ABTS
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

Posledním zkoumaným enzymem byla GST (graf 26, a-f). Rostliny vykazují trend k vyšší aktivitě GST v téměř všech orgánech ve variantách -Th, avšak významně vyšší aktivita GST u kontrolních rostlin byla shledána pouze v kořenech rostlin (graf 26b) v optimální P výživě a listech rostlin P-deficientních (graf 26e). Celková specifická aktivita GST byla mírně vyšší v kořenech oproti nadzemním orgánům rostlin.



Graf 26.: Stanovení aktivity GST; a) kořeny -P; b) kořeny +P; c) stonek -P; d) stonek +P; e) listy -P; f) listy +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství GST
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

Z výše uvedených grafů vyplývá, že aktivita všech enzymů byla ve všech orgánech rostlin tabáku přibližně stejná. Pouze aktivita enzymu PX-ABTS v deficientní médiu +Th byla výrazně vyšší v kořenech, než jeho aktivita v nadzemních orgánech rostlin.

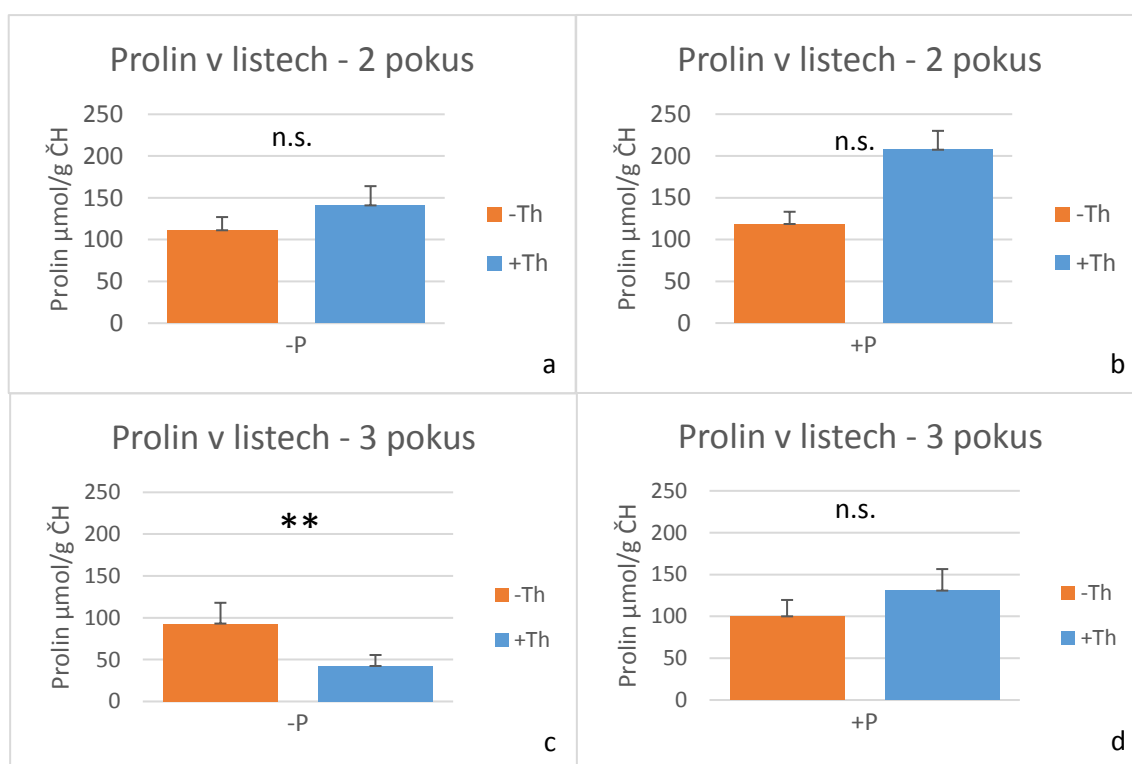
Dále se také zdá, že největší vliv na specifickou aktivitu enzymu APX měla přítomnost P. Na specifickou aktivitu PX potom měla největší vliv expozice Th.

4.2.3.2. Akumulace prolinu

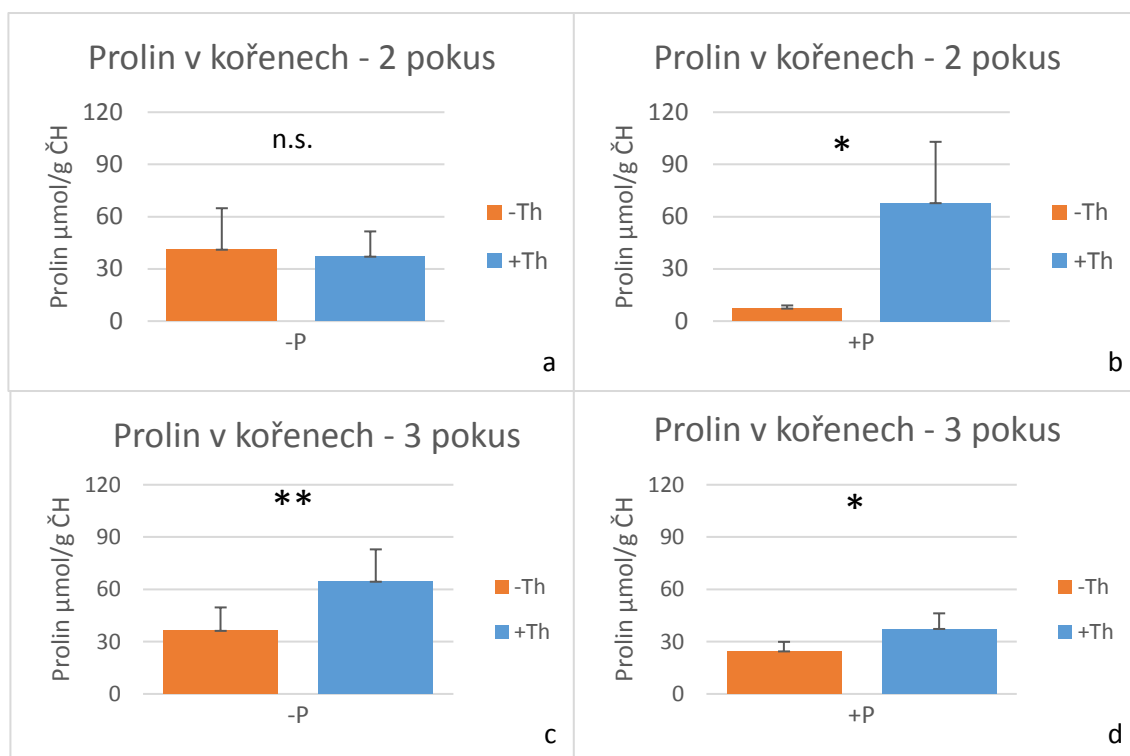
V této kapitole budou demonstrovány výsledky z akumulace prolinu v listech (graf 27, a-d) a kořenech (graf 28, a-d).

V listech byl jediný průkazný výsledek naměřen ve třetím pokusu u rostlin rostoucích v P-deficientním médiu, kde můžeme vidět pokles obsahu prolinu v závislosti na přítomnosti Th v médiu (graf 27c). V ostatních grafech je patrný opačný trend, tedy trend zvyšujícího se prolinu v listech v závislosti na přítomnosti Th v médiu a to jak v +P médiu (graf 27a, 27d), tak i v P-deficientním médiu (graf 27b).

V kořenech byly pozorovány statisticky významné rozdíly v akumulaci prolinu v závislosti na přítomnosti Th v médiu. Rostliny rostoucí na +Th médiu akumulovaly v kořenech více prolinu než rostliny rostoucí na médiu bez Th. Celkově se z grafů zdá, že vyšší množství prolinu bylo naměřeno vždy u P-deficientních rostlin, s výjimkou +Th kořenů ve druhém pokusu.



Graf 27.: Obsah prolinu v listech; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchytky množství prolinu
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001



Graf 28.: Obsah prolinu v kořenech; a) 2 pokus -P, b) 2 pokus +P; c) 3 pokus -P; d) 3 pokus +P
P – fosfor, Th – thorium, úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství prolinu
hvězdy nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001

Z výše uvedených grafů akumulace prolinu vyplývá, že zatímco v kořenech jsou výsledky téměř ve všech případech konzistentní, tzn., že je vidět zvyšující se množství volného prolinu v závislosti na přítomnosti Th v médiu, tak v případě listů výsledky nejsou jednoznačné.

4.3. Porovnání reakce rostlin na Th v různě modifikovaných médiích

Cíl práce: Vyhodnotit, jak bude odpověď rostliny na Th na úrovni fyziologických markerů ovlivněna různými faktory ošetření rostlin (fosfátová výživa, přidání kyseliny vinné do média a postřik putrescinem)

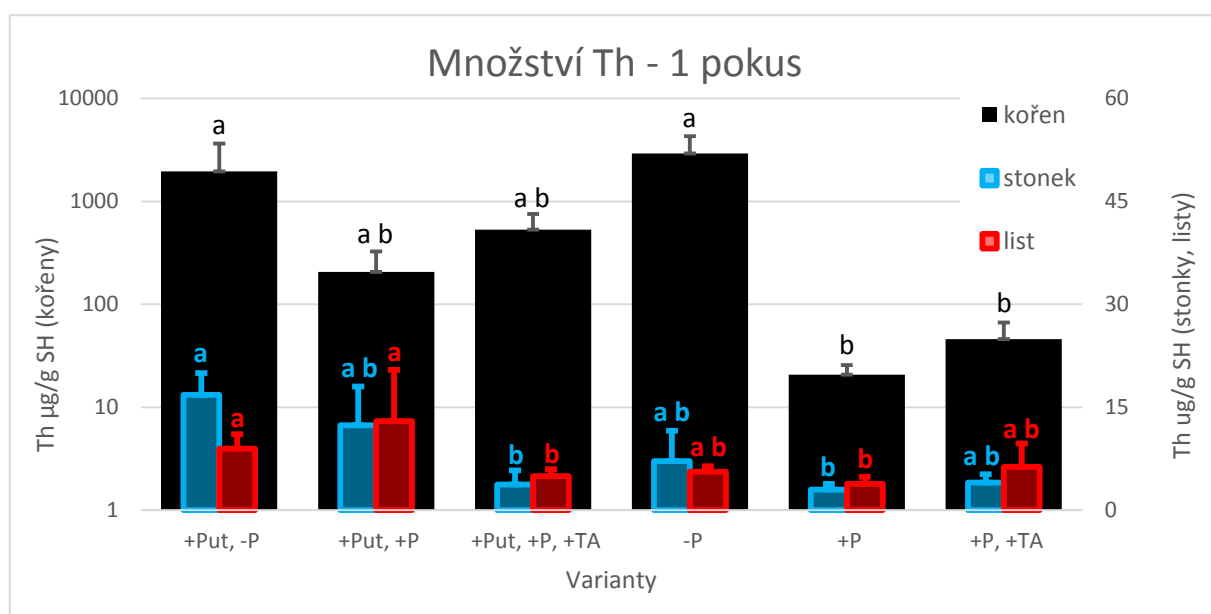
V první části výsledků jsem popisovala akumulaci Th v jednotlivých částech rostliny. Protože přítomnost fosfátů v médiu měla nejsilnější efekt na akumulaci Th v rostlinách, tak jsem se ve druhé části věnovala vyhodnocení reakce rostlin na Th rostoucích v optimální výživě a fosfátové deficienci. Tato část bude věnována vyhodnocení reakce rostlin rostoucích na médiích s Th, která ale byla ovlivněna dalšími modifikacemi. Hodnoty byly porovnávány

jednocestnou ANOVOU (one-way ANOVA), kdy každá kombinace jednotlivých faktorů média (P-výživa, kyselina vinná, postřik putrescinem, Th) byla pojatá jako nezávislá ošetření.

4.3.1. Akumulace thoria

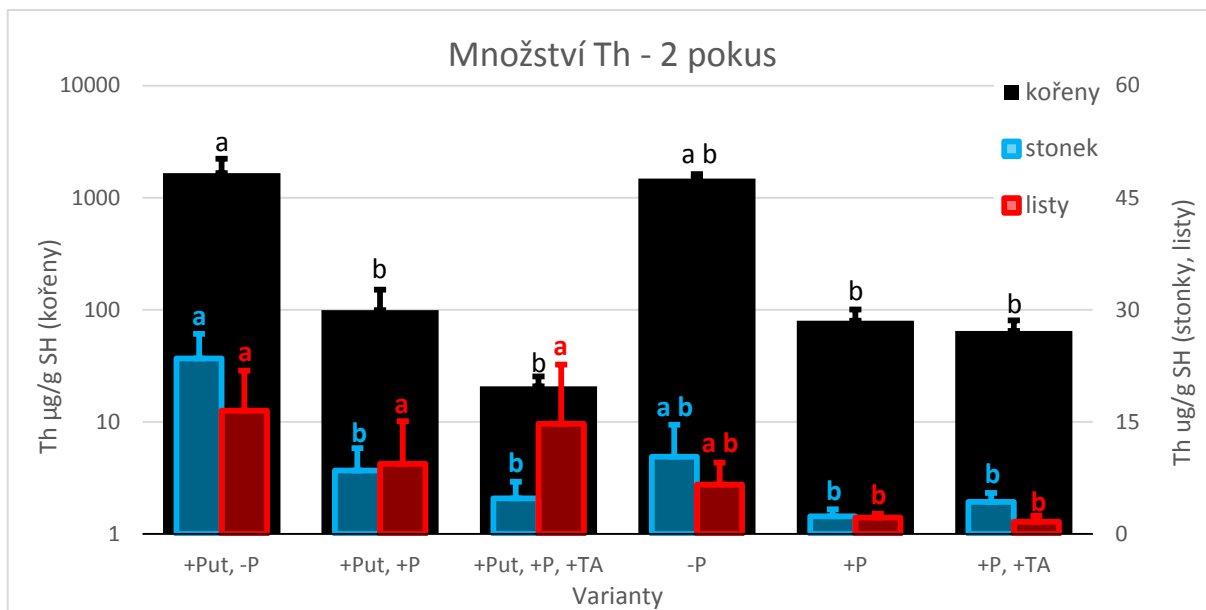
Graf 29 a graf 30 ukazují významný vliv modifikace média na příjem, akumulaci a translokaci Th v rostlinách tabáku. Z důvodu velkých rozdílů mezi jednotlivými hodnotami akumulace Th v kořenech bylo v této variantě použito logaritmické měřítko. Z grafů jednoznačně vyplývá, že největší vliv na akumulaci Th v rostlinách (zejména v kořenech) měla přítomnost resp. nepřítomnost P: rostliny z obou médií bez P obsahovaly vždy průkazně nejvyšší množství Th v kořenech. Dále z grafů můžeme vyzorovat celkově vyšší příjem Th u rostlin, kterým byl aplikován putrescin na listy. Rostliny ošetřené pouze putrescinem akumulovaly při obou variantách fosfátové výživy průkazně nejvíce Th v listech oproti ostatním variantám ošetření, což bylo konzistentní u obou experimentů.

Překvapující byl výsledek příjmu a akumulace Th u rostlin, které rostly v médiích s přidanou kyselinou vinnou, u které jsem předpokládala, že podpoří příjem a translokaci Th do nadzemních částí rostlin. V prvním pokusu sice můžeme vidět vyšší akumulaci Th v kořenech u rostlin ošetřených kombinací kyseliny vinné a putrescinu při optimální P výživě, ale výsledky nejsou statisticky významné. Ve druhém pokusu byla naopak zjištěna v přítomnosti kyseliny vinné spíše nižší akumulace Th v kořenech, ale výsledky opět nejsou signifikantní.



Graf 29.: Celkové množství naakumulovaného Th v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



Graf 30.: Celkové množství naakumulovaného Th v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství Th je měřeno v µg/g SH)
Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05

4.3.2. Obsah vody

Ve všech následujících grafech představuje první sloupec zbarven šedě, popř. černě kontrolní rostliny, které rostly v plném Hoaglandově médiu, modré sloupce zastupují rostliny rostoucí v plném Hoaglandově médiu obohaceném o thorium, kyselinu vinnou a/nebo putrescin. Sloupce zabarvené fialově potom představují rostliny z modifikovaných médií (thorium, putrescin), které rostly ve P-deficienci v médiích obohacených o thorium a/nebo putrescin..

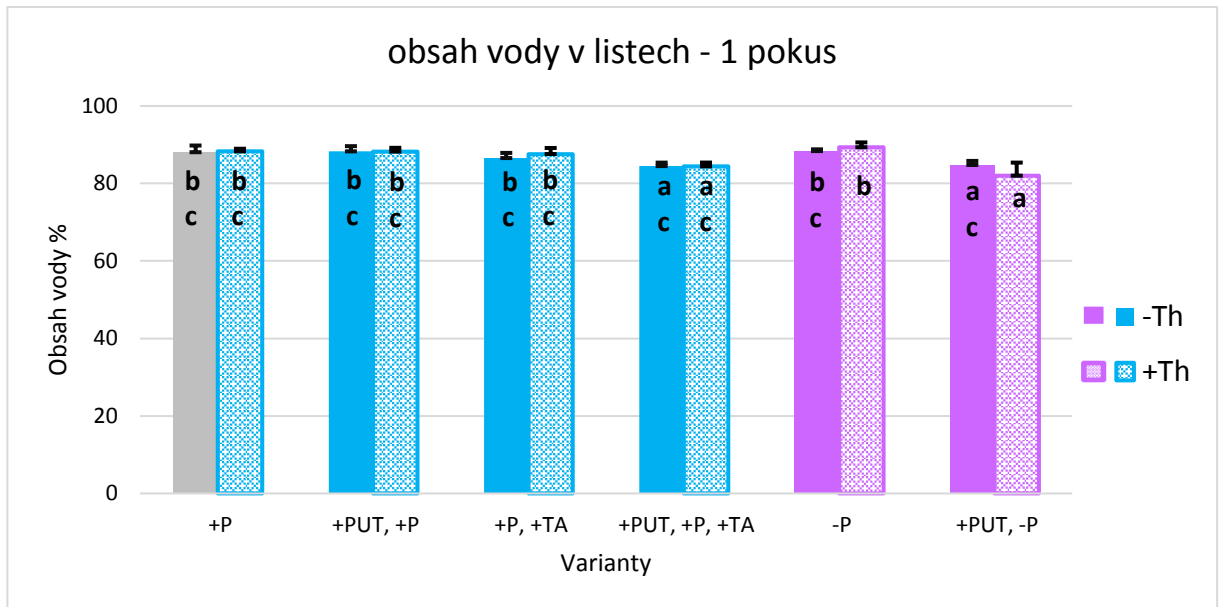
V grafu 31, 32 a 33 je zobrazen obsah vody v listech. Z grafů je patrné, že nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními, které by se opakovaly v jednotlivých pokusech. Celkově ale rostliny z druhého pokusu obsahovaly nejméně vody, což mohlo být způsobeno tím, že se jednalo o rostliny napěstované během suchého, horkého léta.

V prvním (graf 31) pokusu byl významný rozdíl oproti kontrole změřen pouze u P-deficientních rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, na které byl stříkán putrescin. Tyto rostliny oproti kontrole obsahovaly signifikantně méně vody.

Ve druhém pokusu (graf 32) byl oproti kontrole zjištěn jeden rozdíl u rostlin rostoucích v optimálním médiu. Významně vyšší obsah vody obsahovaly rostliny rostoucí v přítomnosti thoria a kyseliny vinné. U P-deficientních rostlin byl také pouze jeden významný výsledek a to

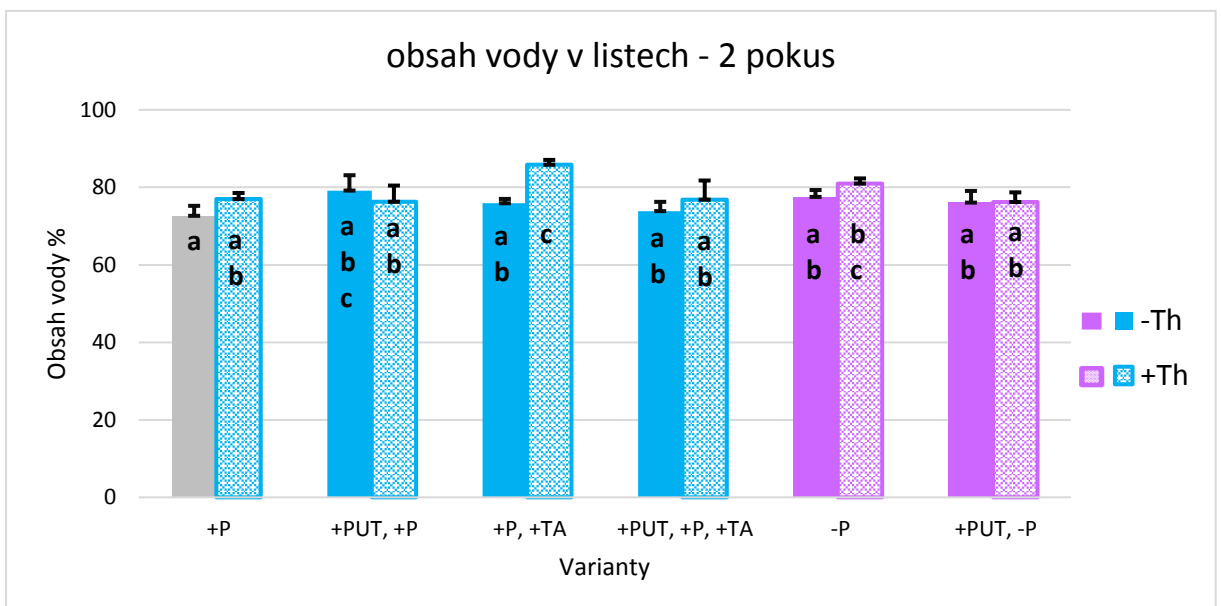
u rostlin, které rostly v přítomnosti Th. Tyto rostliny opět obsahovaly více vody než rostliny z kontrolního média.

Ve třetím pokusu (graf 33) byl ve fosfátových médiích oproti kontrole zjištěn pouze jeden významně nižší obsah vody a to u rostlin rostoucích v přítomnosti kyseliny vinné. V případě P-deficientních rostlin byly významně nižší obsahy vody v listech oproti kontrole naměřeny celkem u třech médiích – médium +Th, médium +Th, +PUT a médium +PUT.



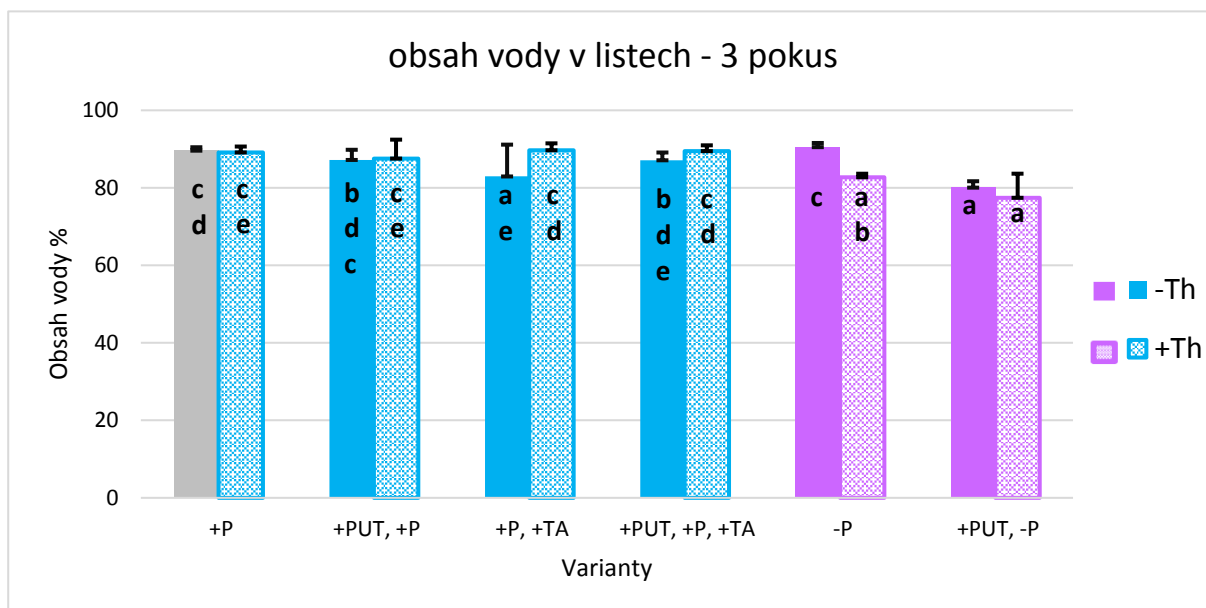
Graf 31.: Obsah vody v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (obsah vody je vztažen na %)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky obsahu vody, písmena v sloupcích znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



Graf 32.: Obsah vody v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus (obsah vody je vztažen na %)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky obsahu vody, písmena v sloupcích znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



Graf 33.: Obsah vody v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním $200 \mu\text{M Th}(\text{NO}_3)_4$ – 3 pokus (obsah vody je vztažen na %)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky obsahu vody, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

4.3.3. Parametry fotosyntetického aparátu

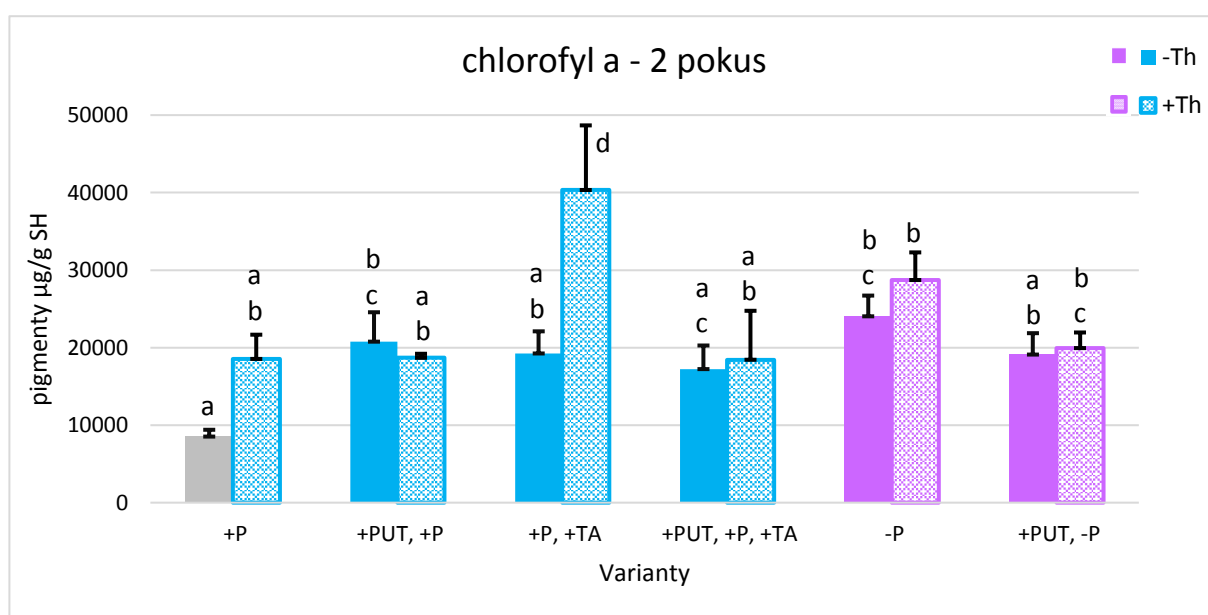
4.3.3.1. Fotosyntetické pigmenty

Ve druhém a třetím pokusu byly sledovány fotosyntetické pigmenty. Jednotlivě byl sledován obsah chlorofylu a (graf 34, 35), chlorofylu b (graf 36, 37), celkové chlorofyly (graf 38, 39), poměr chl a/chl b (graf 40, 41), celkové karotenoidy (graf 42, 43) a poměr car/chl (graf 44, 45).

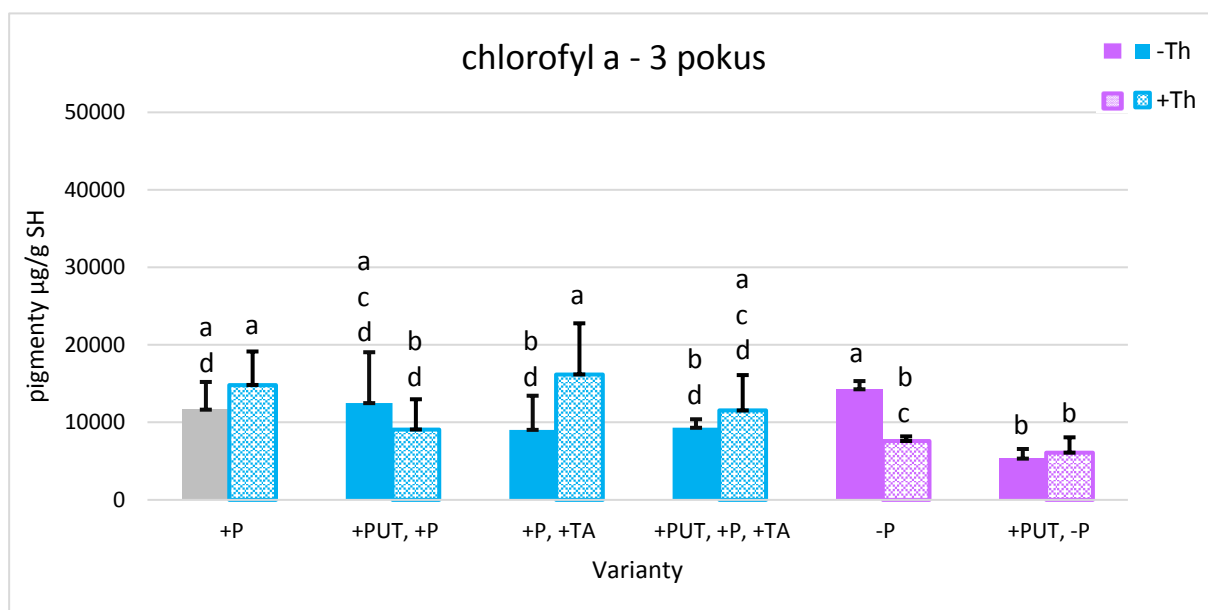
Průkazně nejvyšší obsah chlorofylu a byl u obou pozorování zjištěn u rostlin rostoucích ve fosfátovém mediu s přidávkem kyseliny vinné. Ovšem ostatní výsledky nejsou pro oba pokusy konzistentní. Ve druhém pokusu (graf 34) můžeme vidět, že kontrolní rostliny obsahovaly méně chlorofylu a než rostliny ze všech ostatních médií. Signifikantně vyšší obsah chlorofylu a byl v případě rostlin rostoucích v médiích s fosforem zjištěn ve dvou médiích. Jednak v mediu, kde na rostliny byl aplikován putrescin, ale mnohem vyšší obsah chlorofylů a byl naměřen u rostlin rostoucích v mediu obohaceném o kyselinu vinnou a thorium. Rostliny,

kteře rostly v deficienci fosforu, se v celkovém obsahu chlorofylu a mezi sebou významně nelišily, avšak oproti kontrole obsahovaly významně vyšší obsah chlorofylu a.

Ve třetím pokusu (graf 35) nebyl u rostlin rostoucích ve fosfátových médiích zjištěn žádný významný rozdíl v obsahu chlorofylu a. Rostliny, které rostly pouze v deficienci fosforu, také nevykazovaly žádný významný rozdíl ve srovnání s kontrolou, ale ostatní rostliny rostoucí v P-deficienci v přítomnosti thoria, a rostliny rostoucí v P-deficienci ať už v přítomnosti nebo nepřítomnosti thoria na které byl aplikován putrescin, také obsahovaly významně nižší obsah chlorofylu a.



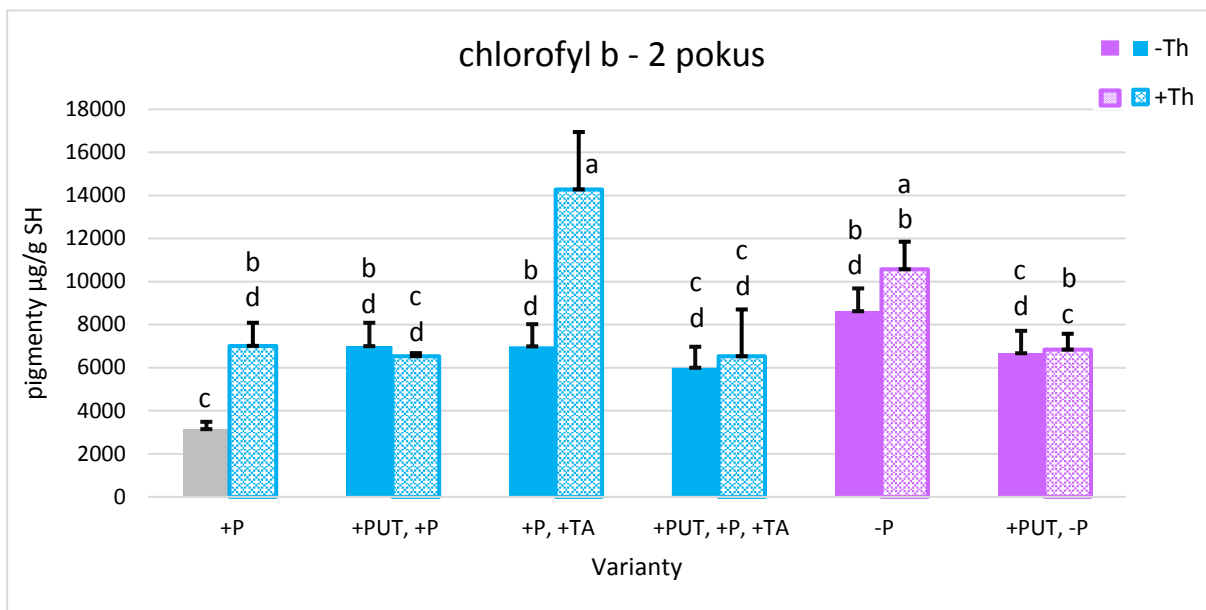
Graf 34.: Stanovení obsahu chlorofylu a v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství pigmentu je měřeno v µg/g SH)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



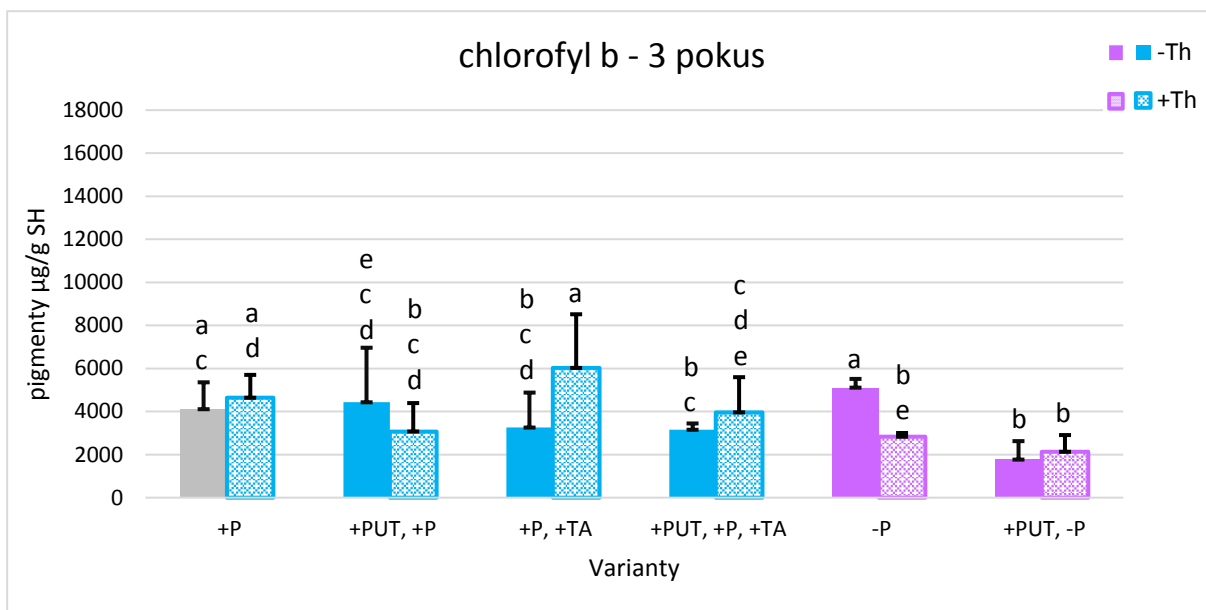
Graf 35.: Stanovení obsahu chlorofylu a v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 3 pokus (množství pigmentu je měřeno v µg/g SH)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05

Nejvyšší obsah chlorofylů b byl u obou pokusů také zjištěn u rostlin rostoucích ve fosfátovém médiu s přidaným thoriem a kyselinou vinnou, ale ostatní výsledky znova nejsou konzistentní. Kontrolní rostliny ve druhém pokusu (graf 36) opět obsahovaly celkově nejvyšší množství chlorofylu b. Významně vyšší obsah chlorofylu b byl také zjištěn u rostlin rostoucích ve fosfátovém médiu s aplikací putrescinu. U obou P-deficientních rostlin, ať už v přítomnosti nebo nepřítomnosti thoria byl také zjištěn významně vyšší obsah chlorofylu b.

Ve třetím pokusu (graf 37) nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi rostlinami rostoucími v modifikovaných fosfátových médiích, ale rostliny, které rostly pouze v P-deficientním médiu, rostliny rostoucí v P-deficientním médiu s aplikací putrescinu a rostliny rostoucí v P-deficientním médiu s přidavkem thoria a s postřikem putrescinu na listy obsahovaly významně nižší množství chlorofylu b ve srovnání s kontrolou.



Graf 36.: Stanovení obsahu chlorofylu b v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus (množství pigmentu je měřeno v $\mu\text{g/g}$ SH)
 Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

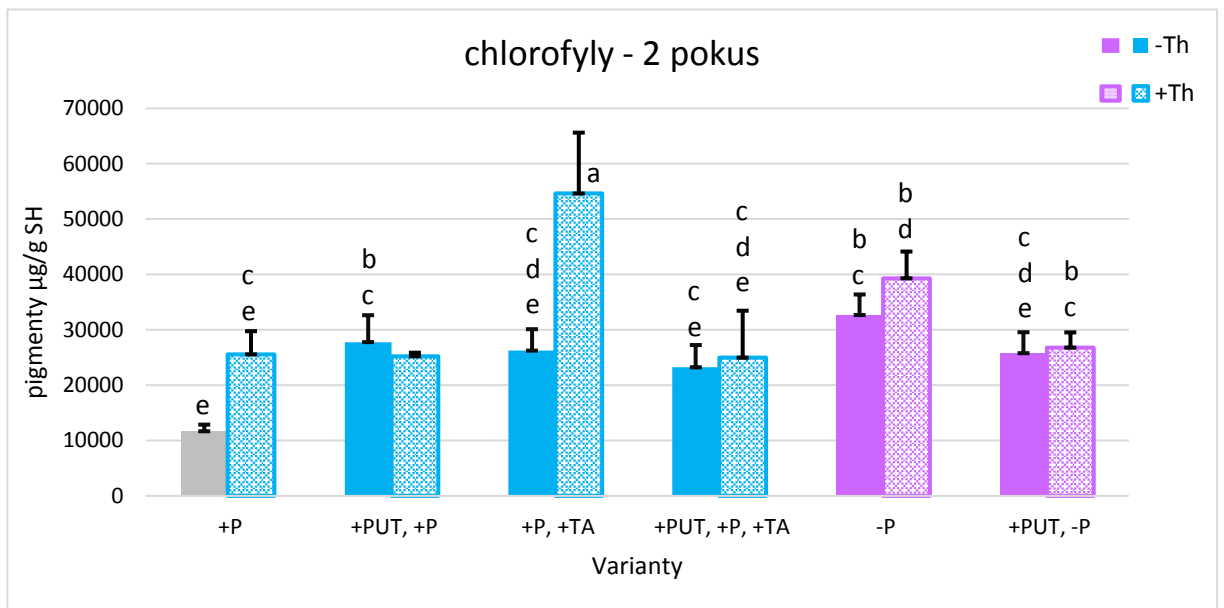


Graf 37.: Stanovení obsahu chlorofylu b v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 3 pokus (množství pigmentu je měřeno v $\mu\text{g/g}$ SH)
 Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

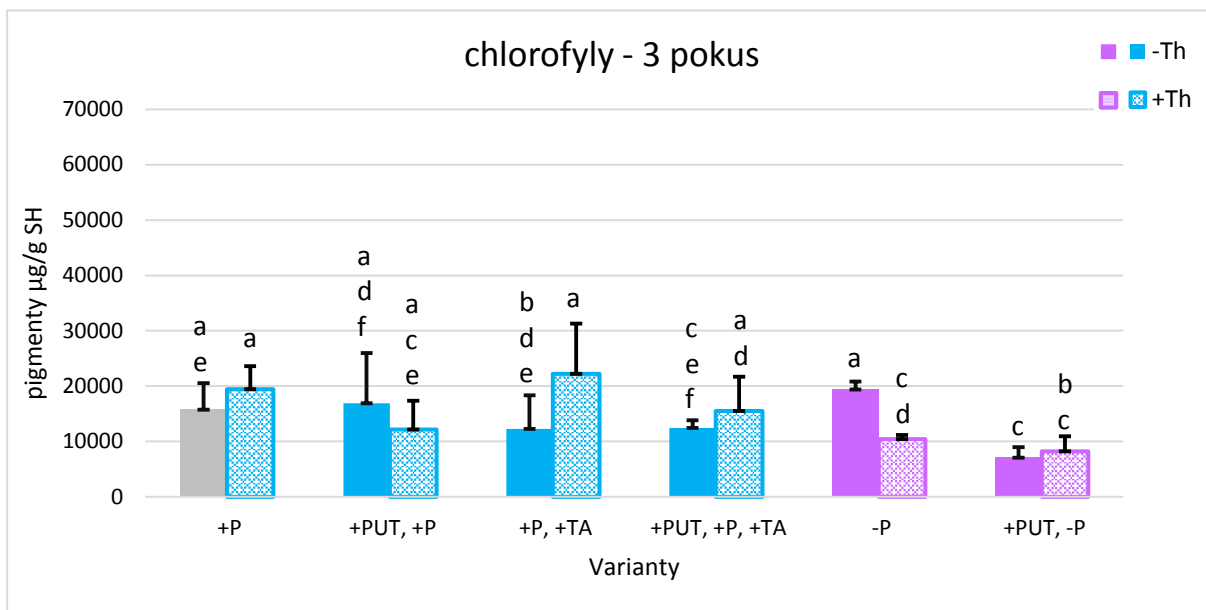
Výsledky z předchozích grafů jasně ukazují stejné trendy v obsazích chlorofylu a i chlorofylu b v pokusu 2 a pokusu 3. V následujících dvou grafech se tento trend opět potvrdil, tzn., že nejvyšší obsah celkových chlorofylů je opět patrný u rostlin rostoucích ve fosfátovém mediu s přidavkem thoria a kyseliny vinné, ale ostatní data opět nejsou při srovnávání obou

pokusů konzistentní. Nicméně se zde opakují stejné trendy v akumulaci celkových chlorofylů, které byly zjištěny v obsazích obou chlorofylů zvlášť.

Mezi oběma médii nejsou vidět pouze tyto rozdíly. Zajímavý je také rozdíl mezi oběma pokusy v celkových obsazích chlorofylů. Z grafů je patrné, že rostliny z pokusu 3 (graf 39) obsahovaly přibližně poloviční množství chlorofylů než rostliny z pokusu 2 (graf 38). Tento trend byl zjištěn u všech médií s výjimkou jediného média, kde rozdíly nebyly tak velké. Tedy u rostlin, které rostly v médiích s optimální výživou, bez dalších modifikací.



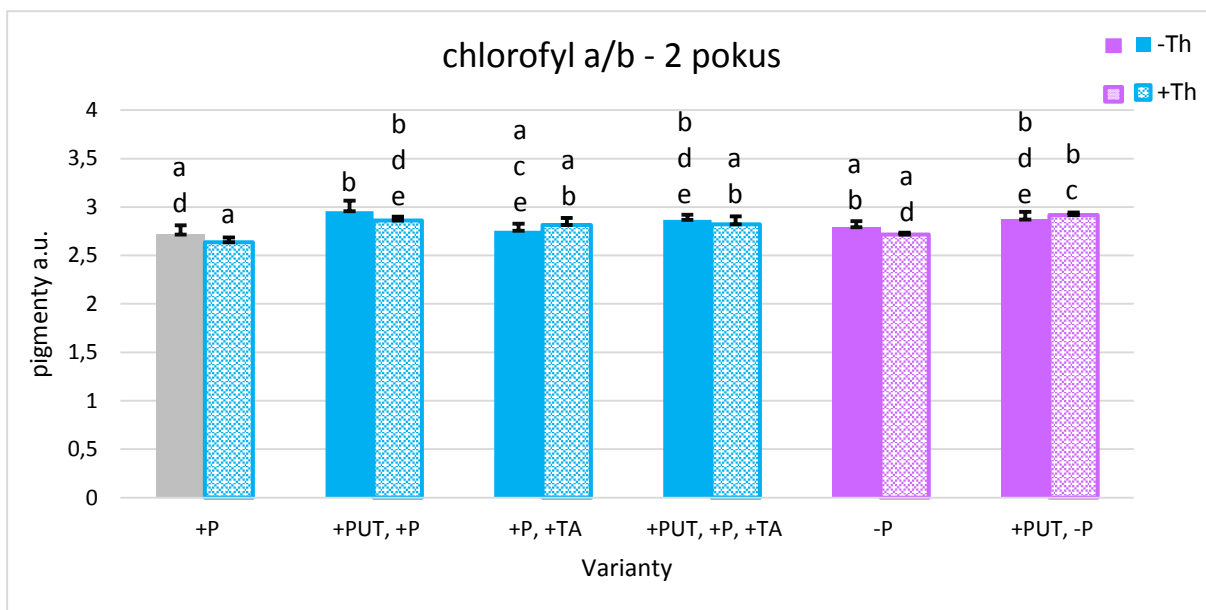
Graf 38.: Stanovení obsahu chlorofylů v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství pigmentu je měřeno v µg/g SH)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



Graf 39.: Stanovení obsahu chlorofylů v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 3 pokus (množství pigmentu je měřeno v $\mu\text{g/g}$ SH)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

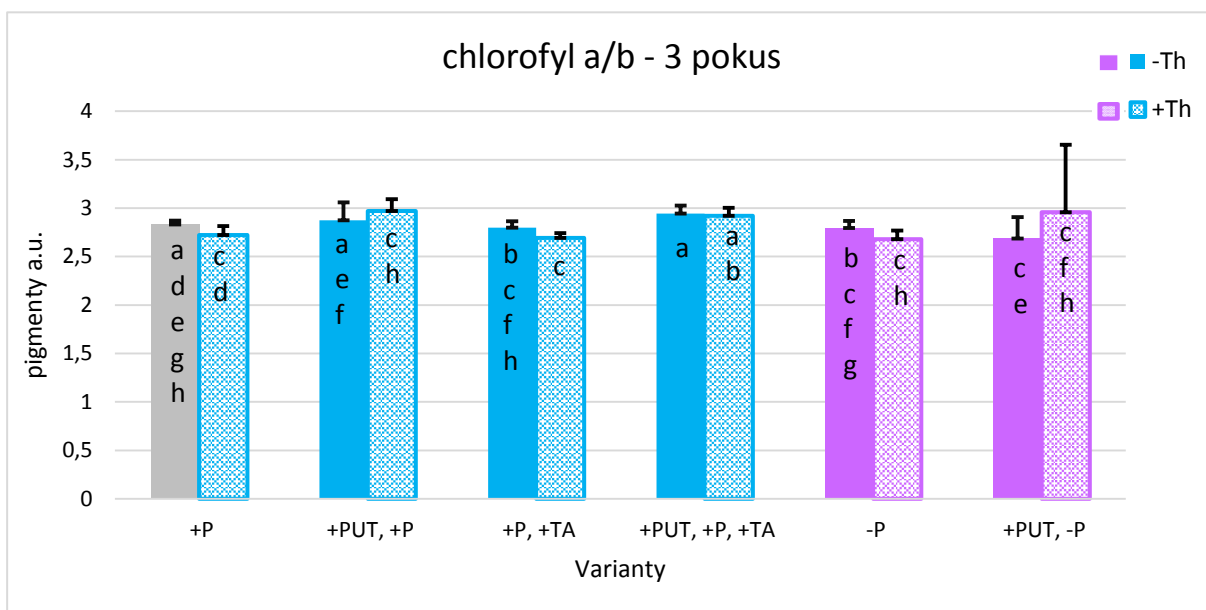
Když se podíváme na poměr chl a/chl b (graf 40, 41), tak můžeme vidět v obou pokusech podobný trend – poměr mezi chlorofyly byl vyšší vždy u rostlin, které byly ošetřeny putrescinem.

Ve druhém pokusu (graf 40) byl významný rozdíl v poměru obou chlorofylů oproti kontrolním rostlinám zjištěn ve fosfátovém médiu s aplikací kyseliny vinné a v P-deficientním médiu s přidavkem thoria a aplikací putrescinu na listy rostlin tabáku. Ve třetím pokusu (graf 41) byl signifikantní rozdíl oproti kontrole zjištěn pouze u rostlin rostoucích v médiích s přidavkem thoria a kyseliny vinné.



Graf 40.: Stanovení podílu chl/a/b v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus

Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u. -arbitární jednotky, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



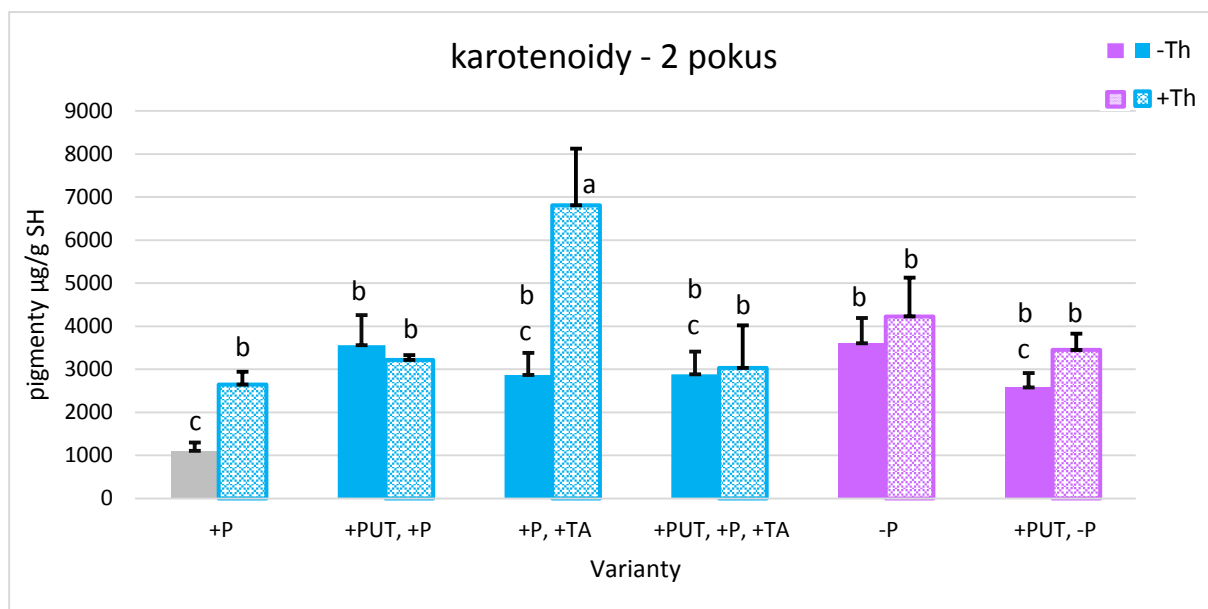
Graf 41.: Stanovení podílu chl/a/b v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus

Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u. -arbitární jednotky, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

Dalšími sledovanými pigmenty byly celkové karotenoidy (graf 42 a 43). Výsledky mezi oběma pokusy spolu opět nekorelují.

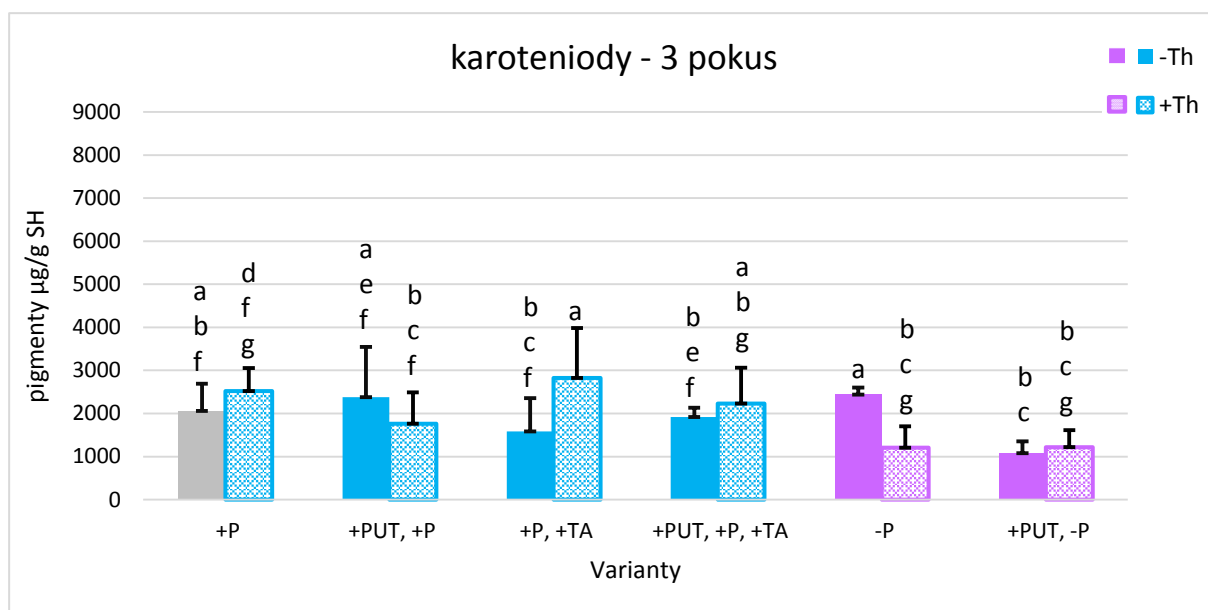
Ve druhém pokusu bylo průkazně nejvyšší množství karotenoidů zjištěno u rostlin rostoucích na fosfátovém médiu s přidaným thoriem kyselinou vinnou (graf 42). Naopak průkazně nejnižší obsah karotenoidů byl změřen u kontrolních rostlin.

Ve třetím pokusu (graf 43) nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi rostlinami, které rostly v kontrolním médiu a ostatními rostlinami rostoucími na různě modifikovaných médiích.



Graf 42.: Stanovení obsahu karotenoidů v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství pigmentu je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

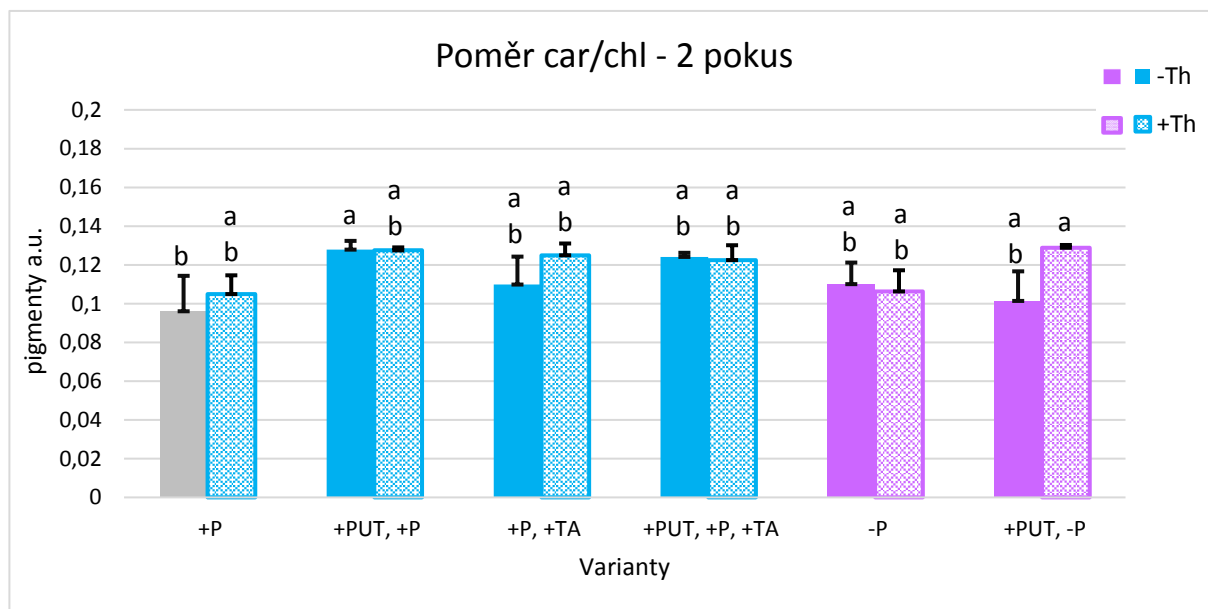


Graf 43.: Stanovení obsahu karotenoidů v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 3 pokus (množství pigmentu je měřeno v µg/g SH)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

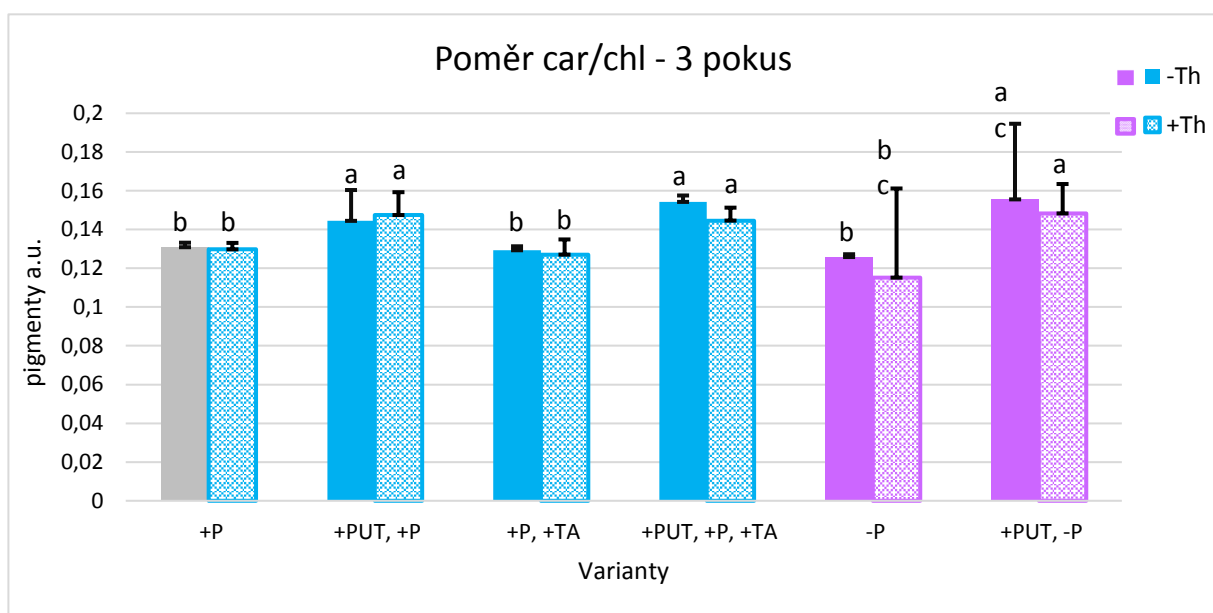
V obou pokusech byl poměr mezi karotenoidy a chlorofyly vyšší vždy u rostlin ošetřených putrescinem (graf 44 a graf 45). Ve druhém pokusu (graf 44) byl významný rozdíl ve fosfátových médiích zjištěn pouze u rostlin rostoucích v přítomnosti kyseliny vinné, na jejichž listy byl stříkán putrescin. U P-deficientních médií byl významný rozdíl zjištěn u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, na které byl stříkán putrescin.

Ve třetím pokusu (graf 45) byl oproti kontrole zjištěn významně vyšší poměr mezi karotenoidy a chlorofyly u všech rostlin, na které byl stříkán putrescin.



Graf 44.: Stanovení podílu car/chl v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u. -arbitální jednotky, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



Graf 45.: Stanovení podílu car/chl v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM Th(NO₃)₄ – 3 pokus

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u. -arbitární jednotky, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství pigmentů, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

Z předchozích grafů je vidět, že všechny výsledky byly v rámci svých pokusů konzistentní, ale v případě poměrů byl vidět u obou pokusů stejný trend. Rozdíly mezi oběma pokusy mohly být opět způsobené napěstováním rostlin z druhého pokusu během suchého léta.

4.3.3.2. Fluorescence chlorofylu

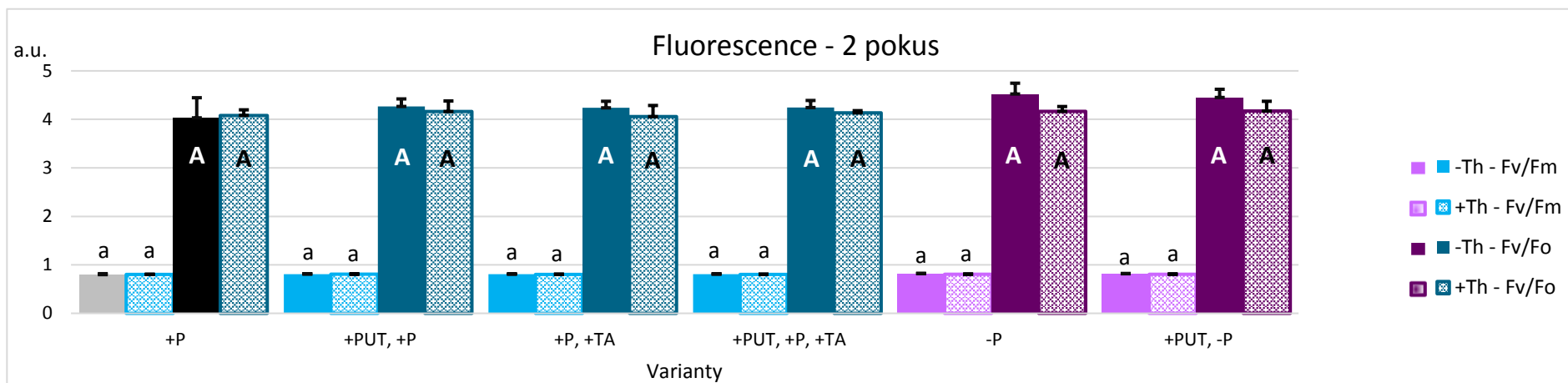
Ve druhém (graf 46) a třetím (graf 47) pokusu byla sledována fluorescence chlorofylu a z OJIP křivky stanoveny parametry F_v/F_m , F_v/F_o , které byly porovnávány u rostlin pěstovaných ve 12 různých médiích.

Ve 2 pokusu nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly ve výsledných hodnotách obou fluorescenčních parametrů mezi jednotlivými médii (graf 46).

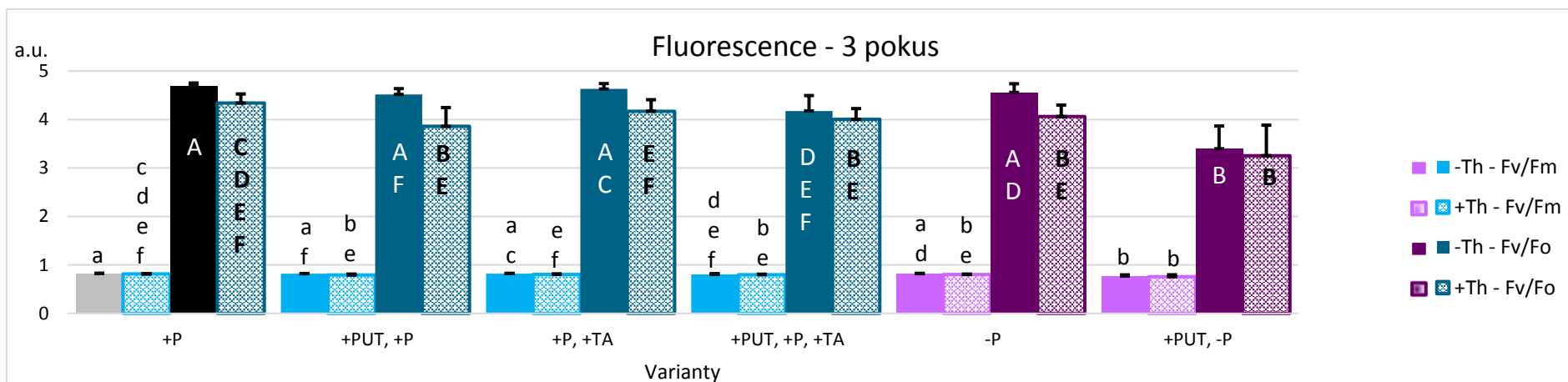
Ve třetím pokusu (graf 47) již byly zjištěny rozdíly u obou parametrů, ale je zajímavé, že hodnoty parametru F_v/F_o , který bývá považován za citlivější (Lichtenthaler et al. 2005), jsou sice na první pohled vidět větší rozdíly, ale signifikantně významné výsledky byly zjištěny u obou parametrů stejné. V šedém resp. černém sloupečku znázorňující hodnoty parametru F_v/F_m resp. F_v/F_o naměřených u kontrolních rostlin, které rostly v plném Hoaglandově mediu bez přídavku thoria byly naměřeny nejvyšší hodnoty. U rostlin, které rostly v modifikovaných

médiích bez thoria, byly zjištěny významně nižší hodnoty pouze ve dvou médiích – v +P médiu s přidanou kyselinou vinnou a s aplikací putrescinu a v P-deficientním médiu s aplikací putrescinu. Ovšem u rostlin, rostoucích v přítomnosti Th, bylo zjištěné signifikantní snížení obou fluorescenčních parametrů u všech rostlin, nezávisle na dalších modifikacích média. Nejnížší hodnoty byly naměřeny u rostlin rostoucích v P-deficientním médiu, které byly stříkány putrescinem na listy.

Hodnoty naměřené u stresovaných rostlin ve třetím pokusu sice byly nižší oproti kontrole, ale pouze ve třech médiích – médium +PUT, +P +Th, médium +PUT, -P, +Th a médium +PUT, -P, dosahovaly nižších hodnot ve fluorescenčním parametru F_v/F_o , které již jsou obecně považovány za hodnoty vykazující stres. Ovšem v případě druhého parametru F_v/F_m byly „stresové“ hodnoty naměřené pouze u výše zmíněných P-deficientních médiích, nezávisle na přítomnosti Th.



Graf 46.: Fluorescenční parametry naměřené v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 2 pokus
šedý sloupec – kontrola pro Fv/Fm, černý sloupec – kontrola pro Fv/Fo, Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u.– arbitální jednotky, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P;
úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky fluorescence, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



Graf 47.: Fluorescenční parametry naměřené v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 3 pokus
šedý sloupec – kontrola pro Fv/Fm, černý sloupec – kontrola pro Fv/Fo, Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, a.u.– arbitální jednotky, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P;
úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky fluorescence, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

4.3.4. Detekce oxidativního stresu

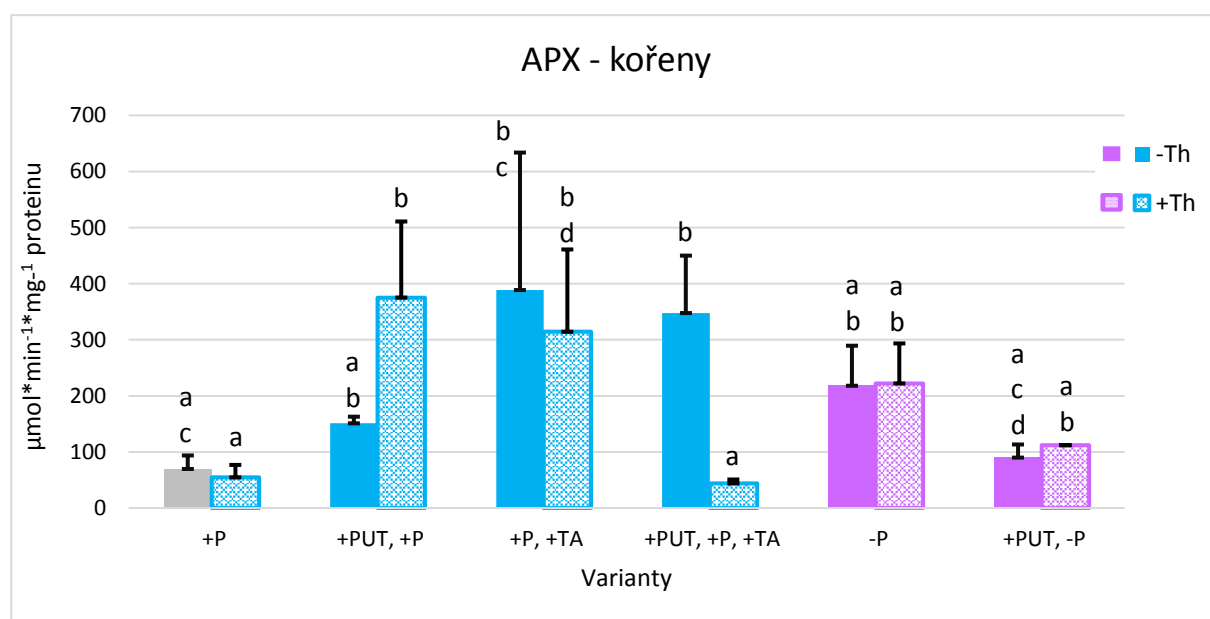
4.3.4.1. Aktivita vybraných antioxidačních enzymů

Měření specifické aktivity antioxidačních enzymů bylo součástí prvního pokusu. Celkem byly stanovovány 4 enzymy – APX (graf 48, 49, 50), CAT (graf 51, 52, 53), PX (graf 54, 55, 56), GST (graf 57, 58, 59).

Prvním enzymem byla APX. Aktivita APX byla u kontrolních rostlin ve všech orgánech přibližně stejná a nebyl zjištěn žádný významný rozdíl ani po přidání thoria do média. V případě kořenů (graf 48) ale můžeme vidět, že různé další modifikace fosfátových médií vedly k průkaznému zvýšení aktivity APX v kořenech. U P-deficientních médií nebyl oproti kontrole pozorován žádný významný rozdíl.

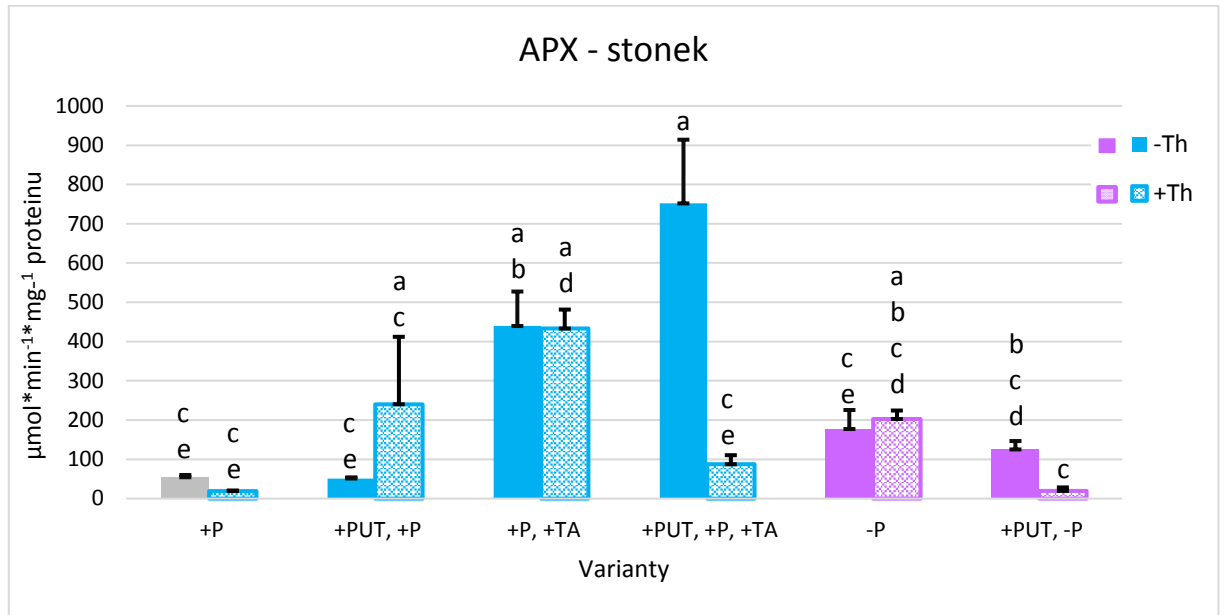
U stonků (graf 49) opět nevidíme žádný významný rozdíl u P-deficientních rostlin ve srovnání s kontrolou. Významně vyšší aktivita APX byla změřená u rostlin rostoucích ve fosfátových médiích s přidáním kyseliny vinnou, bez ohledu na přítomnosti thoria a v médiích s přidáním kyseliny vinnou a s aplikací putrescinu na listy.

U listů (graf 50) byl významný rozdíl v aktivitě APX oproti kontrolním rostlinám zjištěn ve fosfátovém médiu s přidáním kyseliny vinnou a u rostlin rostoucích v P-deficientním médiu ošetřených thorium. V případě listů můžeme (s výjimkou P-deficientního média) také vidět trend vyšší aktivity APX u rostlin rostoucích v médiích, které neobsahovaly thorium.

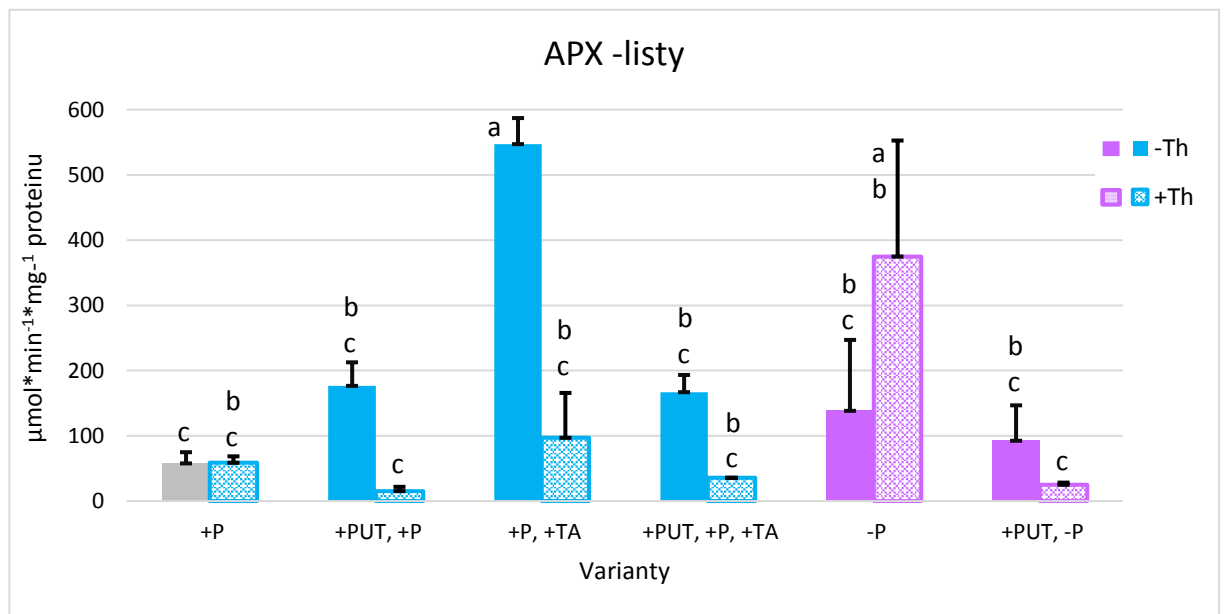


Graf 48.: Stanovení aktivity APX v kořenech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidáním 200 μM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství APX je měřeno v μmol*min⁻¹*mg⁻¹ proteinu)

Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



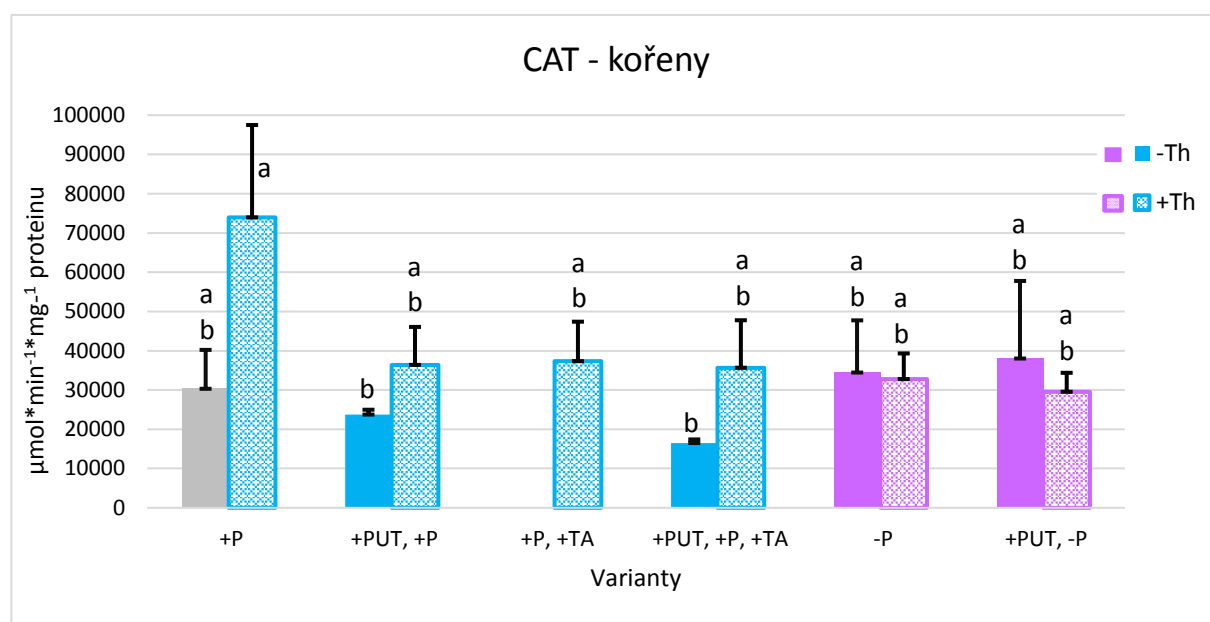
Graf 49.: Stanovení aktivity APX ve stoncích tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přídáním $200 \mu\text{M Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství APX je měřeno v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu)
Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



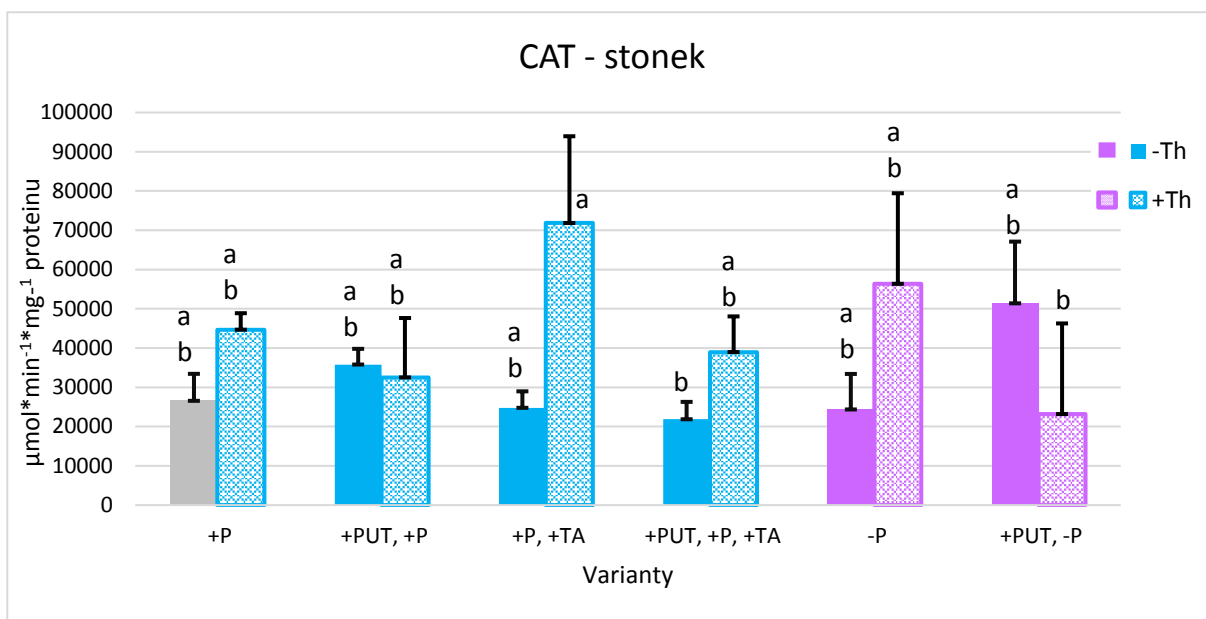
Graf 50.: Stanovení aktivity APX v listech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přídáním $200 \mu\text{M Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství APX je měřeno v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu)
Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

Druhým stanovovaným enzymem byla CAT (graf 51, 52, 53). V případě kořenů nebyl oproti kontrole zjištěn žádný významný rozdíl (graf 51). Ale můžeme vidět trend vyšší aktivity CAT u rostlin rostoucích ve fosfátových médiích s přidavkem thoria oproti médiím bez přidaného thoria. U stonků (graf 52) také nebyl mezi ošetřeními prokázán žádný signifikantní rozdíl. Také v případě listů (graf 53) nebyl oproti kontrole zjištěn žádný signifikantní rozdíl, ale celkově nejvyšší aktivita CAT byla naměřena u P-deficientních médií bez ohledu na přidavku thoria.

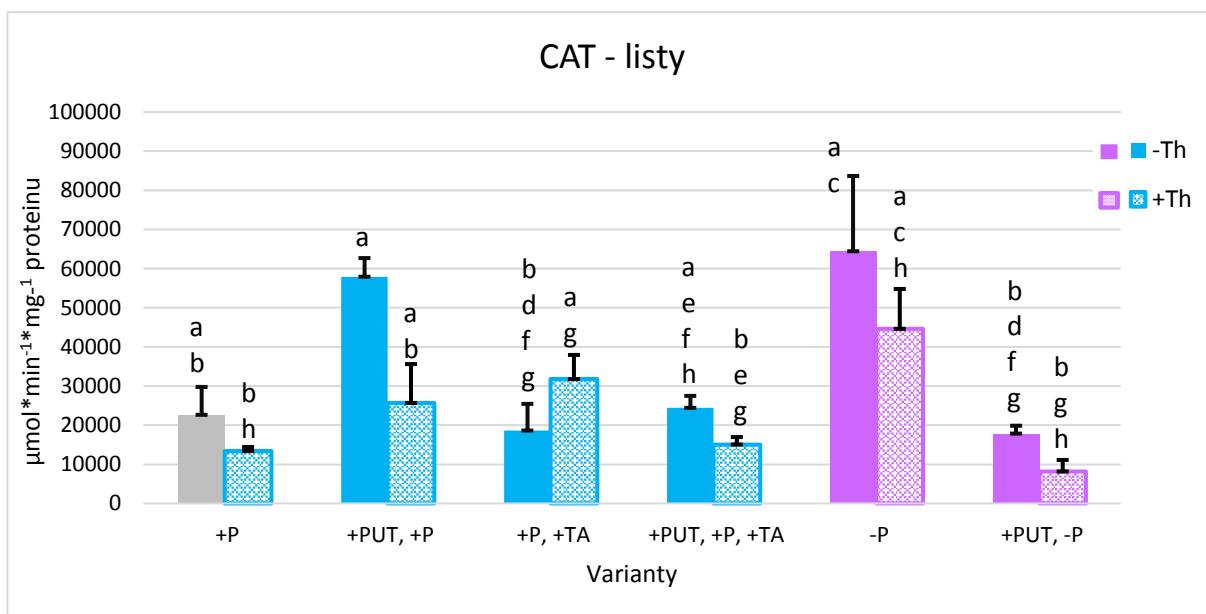
V případě tohoto enzymu můžeme vidět trend vyšší aktivity CAT u rostlin, na které nebyl stříkán putrescin, tento trend je patrný zejména u nadzemních orgánů rostlin, které rostly v přítomnosti thoria.



Graf 51.: Stanovení aktivity CAT v kořenech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství CAT je měřeno v µmol*min⁻¹*mg⁻¹ proteinu)
Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



Graf 52.: Stanovení aktivity CAT ve stoncích tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství CAT je měřeno v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$



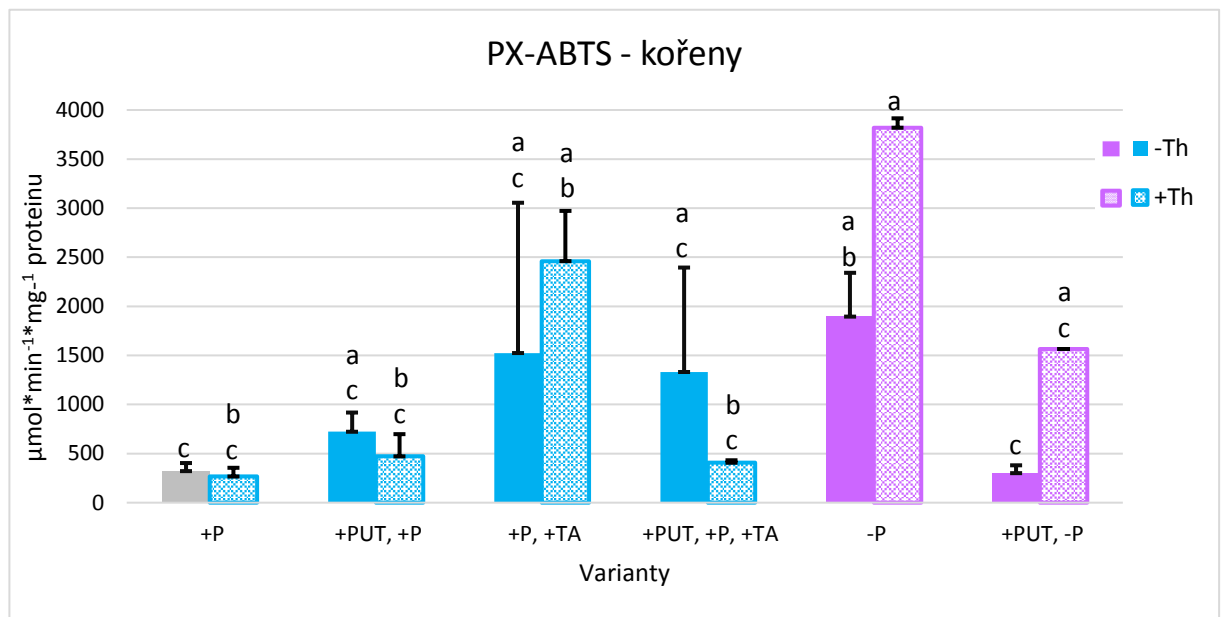
Graf 53.: Stanovení aktivity CAT v listech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidaným 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství CAT je měřeno v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

Grafy 54, 55 a 56 zobrazují specifickou aktivitu enzymu PX-ABTS. Významný rozdíl v aktivitě PX v kořenech (graf 54) oproti kontrole byl zjištěn ve fosfátovém mediu s přidávkou

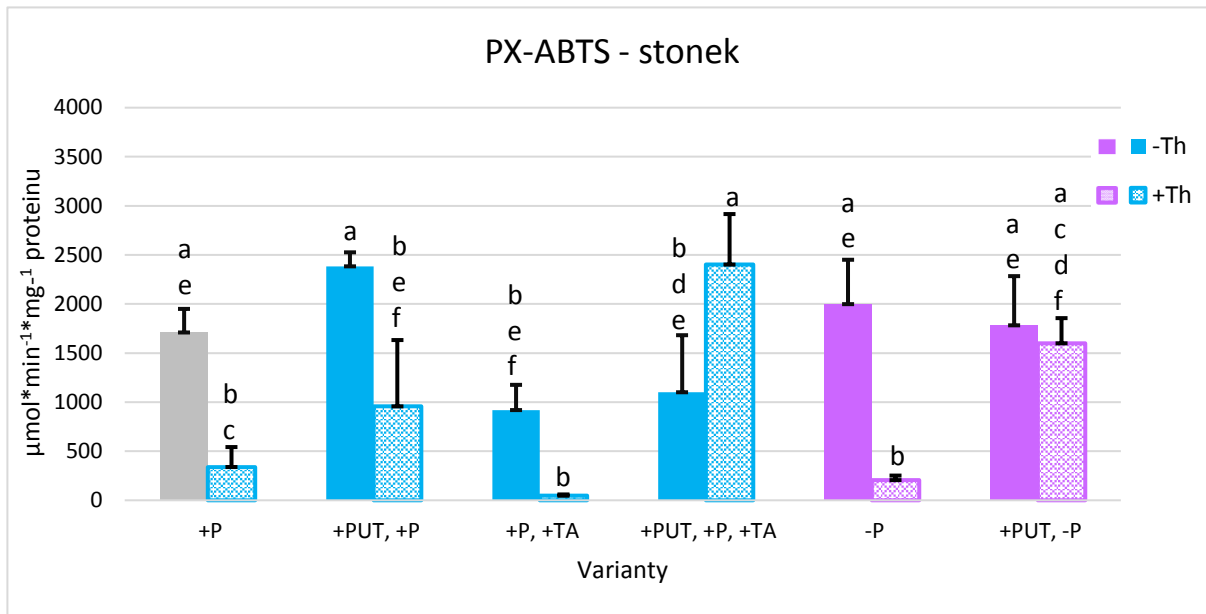
thoria a kyseliny vinné a také v obou P-deficientních médiích s přidavkem thoria. Největší aktivita PX byla naměřena u rostlin rostoucích v P- deficientním médiu, ošetřených thoriem.

U stonků (graf 55) byl významný rozdíl ve fosfátových médiích zjištěn téměř u všech rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, s výjimkou média s přidavkem thoria, kyseliny vinné a s aplikací putrescinu. V P-deficientních médiích byla zjištěna signifikantně nižší aktivita PX u rostlin rostoucích pouze v P-deficientním médiu s přidavkem thoria.

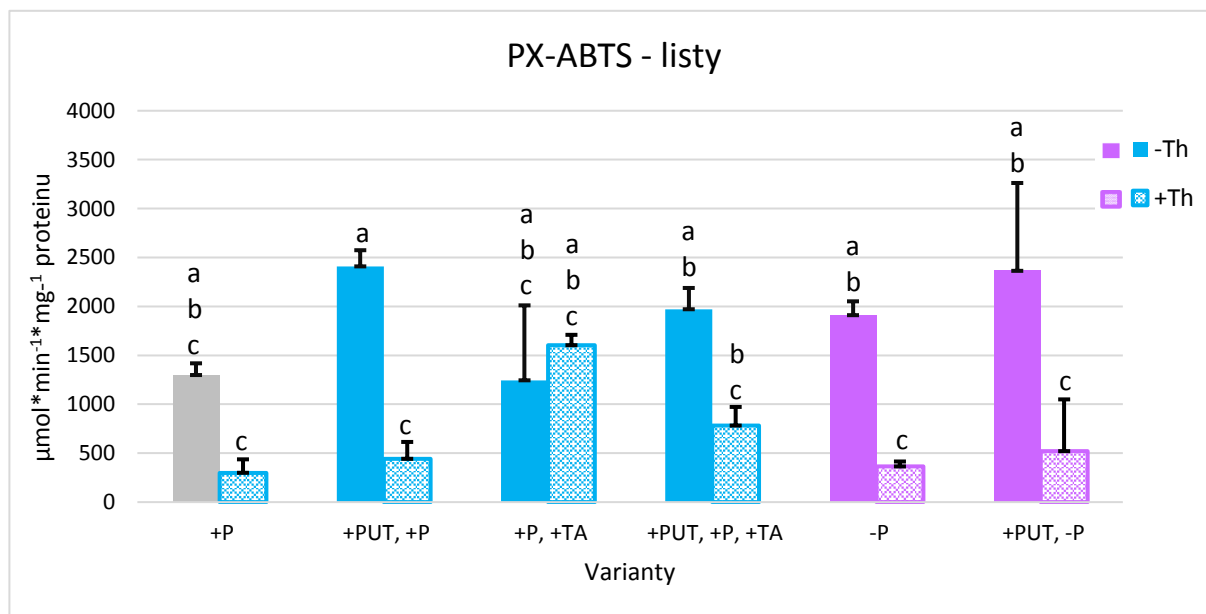
V případě listů (graf 56) nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi kontrolou a ostatními médii. Z grafů je patrný trend ve snižující se aktivitě PX v nadzemních orgánech rostlin ošetřených thoriem, oproti médiím bez thoria.



Graf 54.: Stanovení aktivity PX v kořenech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidaným 200 μM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství PX je měřeno v μmol*min⁻¹*mg⁻¹ proteinu)
Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



Graf 55.: Stanovení aktivity PX ve stoncích tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství PX je měřeno v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

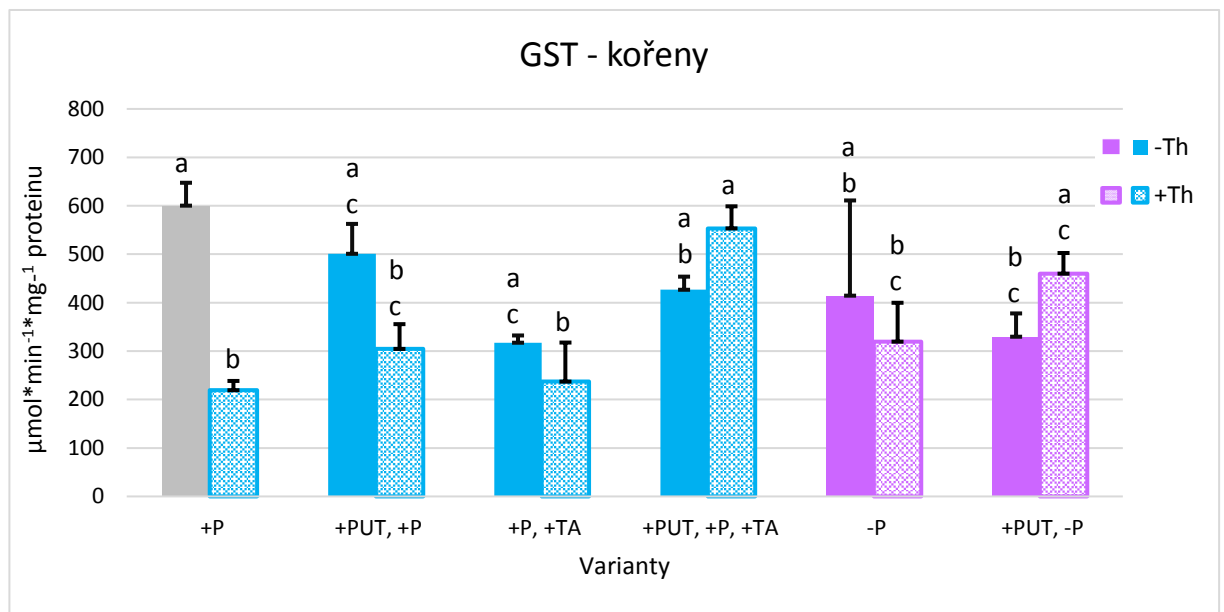


Graf 56.: Stanovení aktivity PX v listech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství PX je měřeno v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

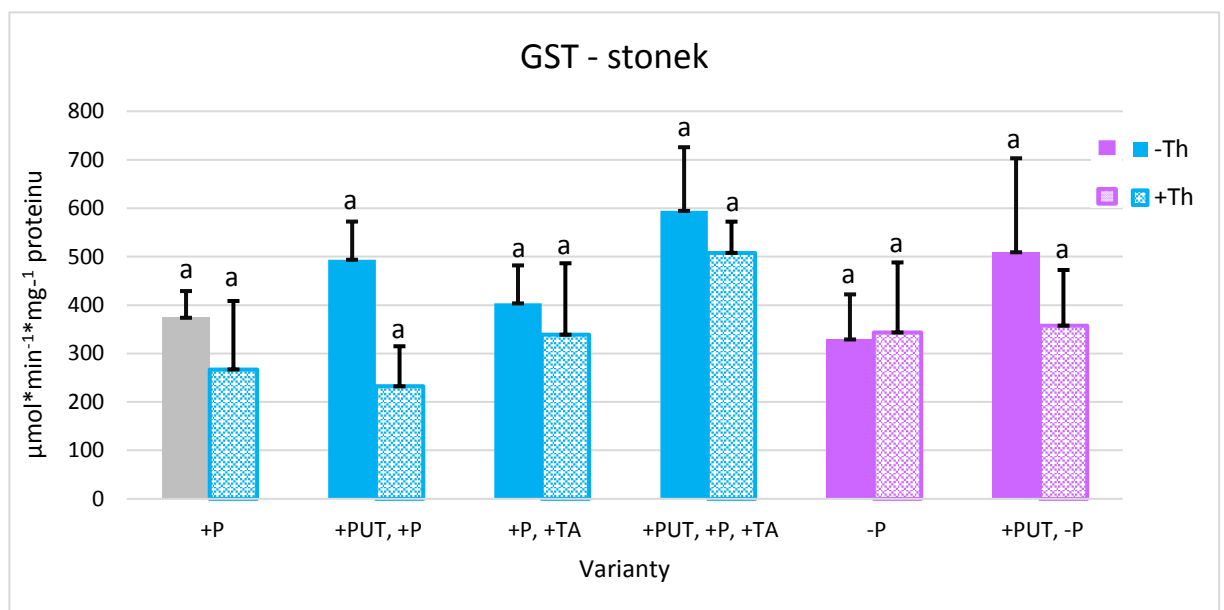
Posledním sledovaným enzymem byla GST (graf 57, 58, 59). Nejvyšší aktivita GST byla v případě kořenů (graf 57) naměřena u rostlin rostoucích v kontrolním mediu optimální fosfátovou výživou. Nejnižší aktivita GST v kořenech potom byla naměřena u rostlin rostoucích

v obou fosfátových médiích a rostlin rostoucích ve fosfátovém médiu s přidavkem kyseliny vinné.

Ve stoncích (graf 58) nebyl změřen žádný signifikantní rozdíl mezi médii, ale je zde naznačen trend, kdy se zdá, že rostliny stříkané putrescinem (s výjimkou fosfátového média) vykazovaly vyšší aktivitu GST v listech. U listů (graf 59) také nebyl změřen žádný významný rozdíl ve specifické aktivitě GST.

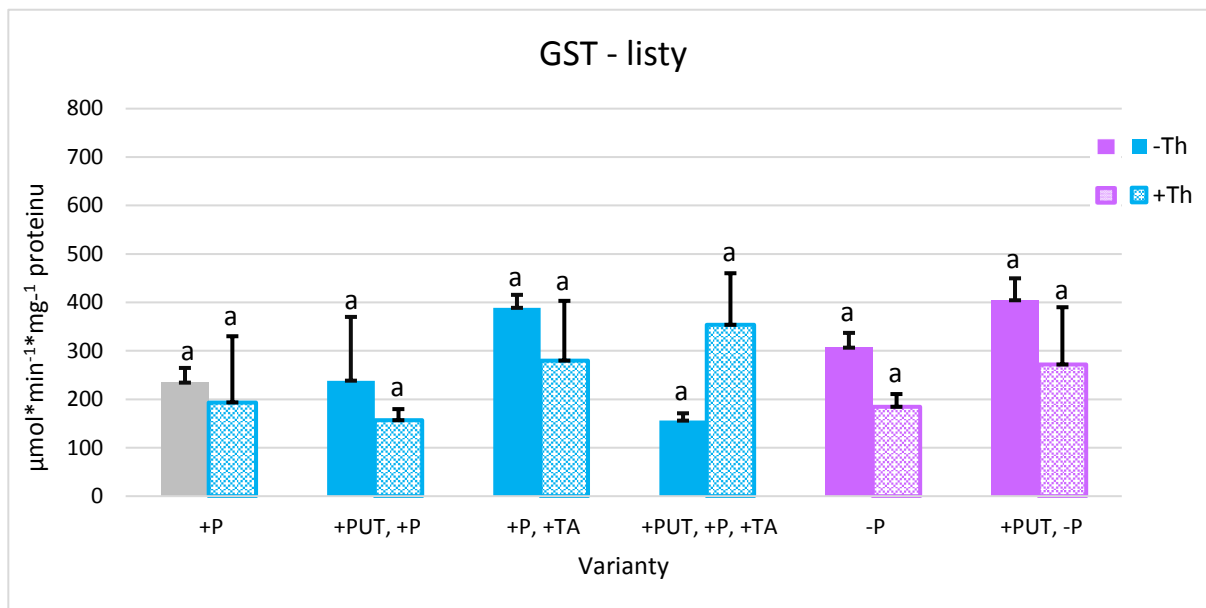


Graf 57.: Stanovení aktivity GST v kořenech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství GST je měřeno v µmol*min⁻¹*mg⁻¹ proteinu)
Put – putrescín, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



Graf 58.: Stanovení aktivity GST ve stoncích tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově médiu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 1 pokus (množství GST je měřeno v µmol*min⁻¹*mg⁻¹ proteinu)

Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

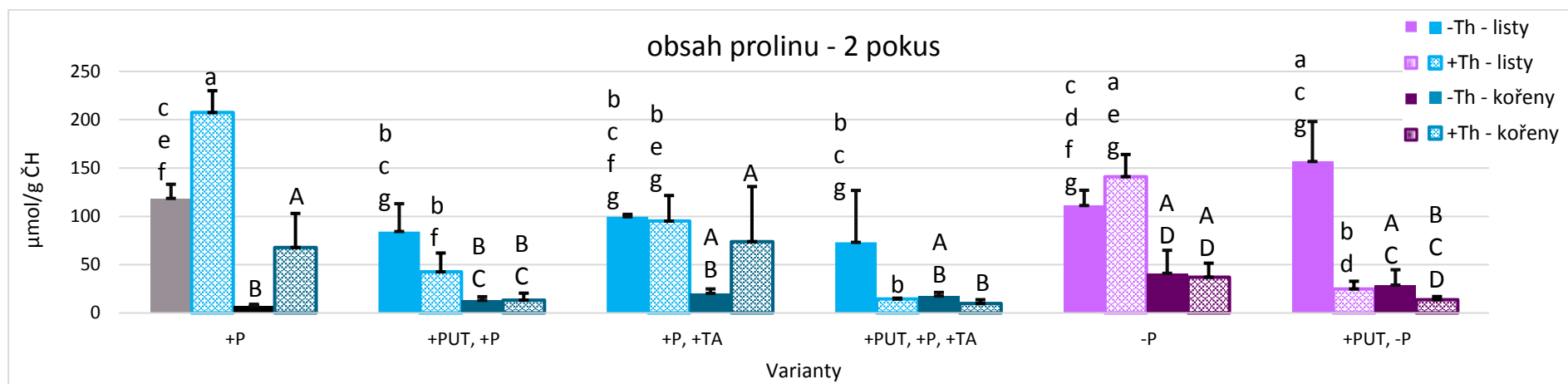


Graf 59.: Stanovení aktivity GST v listech tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 μM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ – 1 pokus (množství GST je měřeno v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu)
Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství Th, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$

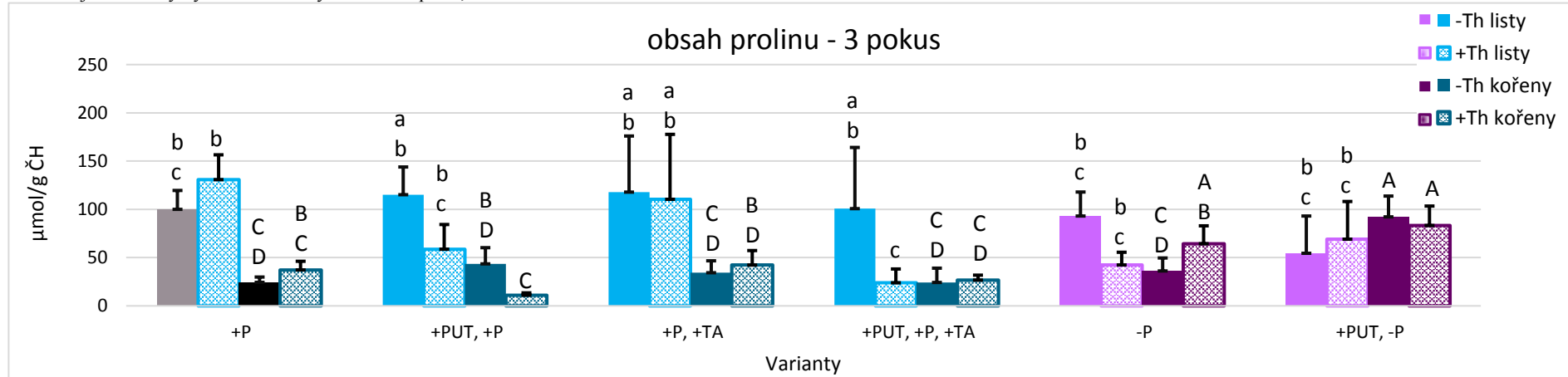
4.3.4.2. Akumulace prolinu

Obsah prolinu v listech a kořenech byl měřen ve 2 a 3 pokusu. Z grafů můžeme vidět, že listy povětšinou obsahovaly vyšší obsah prolinu. V grafu 60 můžeme vidět, že u listů (světlé sloupce) byly ve fosfátových médiích zjištěny dva významné rozdíly a to vyšší obsah prolinu u rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou s přidavkem thoria a významně nižší obsah prolinu u rostlin rostoucích ve fosfátovém médiu obohaceném o thorium, kyselinu vinnou a vnější aplikaci putrescinu. U kořenů (tmavé sloupce) můžeme oproti kontrole vidět pouze významně vyšší obsah prolinu a to opět u rostlin rostoucích v optimálním médiu s přidavkem thoria a u rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou s přidavkem thoria a kyseliny vinné. U P-deficientních rostlin bylo významně vyšší množství prolinu změřeno u obou P-deficientních médiích, kde rostliny rostly v přítomnosti nebo nepřítomnosti thoria a u rostlin rostoucích v P-deficientním médiu, na které byl stříkán putrescin.

Druhý graf (graf 61) znázorňuje obsahy prolinu ze třetího pokusu. U listů oproti kontrole nevidíme žádné významné rozdíly. U kořenů můžeme oproti kontrole vidět významné rozdíly pouze u P-deficientních rostlin a to ve 3 médiích - -P, +Th; -P, +PUT; -P, +PUT, +Th.



Graf 60.: Stanovení obsahu prolinu v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 2 pokus (množství prolinu je měřeno v µmol/g ČH)
 šedý sloupec – kontrola pro listy, černý sloupec – kontrola pro kořeny
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství prolinu, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05



Graf 61.: Stanovení obsahu prolinu v tabáku kultivovaném v modifikovaném Hoaglandově mediu s přidáním 200 µM Th(NO₃)₄ – 3 pokus (množství prolinu je měřeno v µmol/g ČH)
 šedý sloupec – kontrola pro listy, černý sloupec – kontrola pro kořeny
 Put – putrescin, P – fosfor, TA – kyselina vinná, růžové čtverečky –P, modré čtverečky +P; úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky množství prolinu, písmena nad sloupci znázorňují statisticky významné rozdíly na hladině p < 0,05

5. Diskuse

5.1. Experimentální systém

Thorium se v přírodě nevyskytuje v elementární podobě, ale vždy je vázané v různých více či méně rozpustných sloučeninách. Často se také vyskytuje v přítomnosti dalších těžkých kovů (zejména uranu). Ovšem reakce rostlin se na jednotlivé kovy liší, některé z nich jsou rostlinám v určitém množství prospěšné (např. železo, měď), ale jiné mohou působit toxicky i ve velmi malé koncentraci (kadmium). Abychom byli schopni určit, jaký vliv má určitý kov na rostliny, tak musíme pochopit jednak proces a mechanismus příjmu a akumulace kovu v rostlinách a jejich jednotlivých orgánech a pletivech, ale také samotnou obranu rostlin vůči toxicitě způsobené kovy.

Já jsem se ve své práci zaměřila pouze na sledování vlivu thoria na rostliny jednoho kultivaru, a to tabáku *Nicotiana glutinosa* L. Kvůli snazší interpretaci výsledků a manipulaci s rostlinami, byly rostliny pěstovány v perlitu a zality Hoaglandovým médiem. Toto médium obsahuje veškeré živiny potřebné pro růst rostlin dodané dle přesného rozpisu. Hlavní výhodou použití média je, že všechny rostliny byly vystaveny přesně definovaným koncentracím živin, zatímco v půdě se nachází rozdílné živiny v různých formách, které se mohou zásadně lišit svojí dostupností pro rostliny a též v různých koncentracích. Živinové médium bylo upraveno předem vybranými modifikacemi jeho složení (přítomnost či absence thoria, kyseliny vinné, fosfátu), s ohledem na možný vliv na příjem a akumulaci thoria rostlinami.

V přírodě jsou rostliny rostoucí v místech s vysokou koncentrací kovů ovlivněny také ostatními podmínkami prostředí, abiotickými (sluneční záření, sucho, extrémní teploty, extrémní pH) i biotickými (možné napadení herbivory a patogeny, interakce s půdními mikroorganismy apod.). Abych co nejvíce eliminovala vliv vnějších atmosférických podmínek na rostliny, tak byly rostliny tabáku pěstovány ve skleníku za stálých podmínek (teplota, vzdušná vlhkost a světelné podmínky) a já jsem se tak mohla zaměřit na sledování stresu způsobeným pouze thoriem.

V práci jsem se potom zaměřila jednak na akumulaci thoria v jednotlivých orgánech rostlin v závislosti na různých modifikacích média. Dále jsem se orientovala na sledování nesespecifických stresových markerů, pomocí kterých jsem byla schopná určit, zda se rostliny nacházely ve stresovaném stavu.

V první části diskuze budu nejprve diskutovat metodické přístupy, které byly použity v této práci. V další části se budu věnovat diskuzi dat, které jsem získala, a nakonec bude diskutován přínos práce a začlenění výsledků do širšího kontextu směřování dalšího výzkumu.

5.2. Metodické přístupy použité v práci

5.2.1. Obsah thoria v rostlinách

Než začneme u rostlin sledovat stres způsobený kovy pomocí různých stresových markerů, je nejprve důležité zjistit, zdali rostlina daný kov vůbec přijímá a akumuluje. Takových prací zaměřených na různé druhy rostlin a různé kovy již bylo provedeno mnoho, např. Soudek et al. (2014) nebo Saenen et al. (2013), sledovali schopnost rostlin čiroku resp. *Arabidopsis thaliana* akumulovat uran. Andreazza et al. (2011) zase sledovali schopnost podzemnice olejné akumulovat měď. Pro přesnější sledování akumulace kovu v rostlinném těle je dobré sledovat zvláště jejich akumulaci v jednotlivých orgánech. Díky přesnějšímu rozpoznání akumulace kovu v jednotlivých orgánech rostlin totiž získáme lepší představu o schopnosti rostlin imobilizovat kovy v kořenech a jejich potenciálu translokovat je do nadzemních částí (McGrath a Zhao 2003).

Sledováním akumulace thoria v jednotlivých orgánech rostlin se již zabývalo několik autorů, např. jeho sledováním v rostlinách tabáku (Soudek et al. 2013), pšenice (Shtangeeva a Ayrault 2004) nebo borůvky (Morton et al. 2002).

Já jsem ve své práci použila metodiku stanovení obsahu thoria v jednotlivých orgánech rostlin používanou Dr. Soudkem v ÚEB AVČR (Soudek et al. 2013). Akumulace thoria byla stanovována vždy z předem určených celých rostlin, které byly rozděleny po jednotlivých orgánech. Usušené vzorky orgánů rostlin byly vždy rozmělněny a promíchány tak, aby pro samotné měření byl použit směsný vzorek a nedocházelo tak k ovlivnění výsledků, vybráním například pouze spodních listů. Samotná metodika měření obsahu thoria v rostlinách je založená na mineralizaci vzorků rostlin, což jsem provedla v laboratoři Dr. Soudka a následném měření obsahu thoria v roztoku mineralizačních kyselin a rozloženého vzorku rostliny. Toto měření bylo založeno na bázi hmotností spektrofotometrie a bylo provedeno v servisní

laboratoři prof. M. Mihaljeviče na Ústavu geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů Přírodovědecké fakulty UK standardně používanou metodikou.

5.2.1. Parametry fotosyntetického aparátu

Thorium je sice radioaktivní kov, ale já jsem se ve své práci zaměřila na měření oxidativního stresu, který Th způsobuje toxicitou chemickou, nikoliv radiační (Vandenhove et al. 2006). Všechny mnou použité metody zatím nebyly sledovány u žádných rostlin rostoucích v přítomnosti thoria. V předložené práci jsem nejprve sledovala obsah fotosyntetických pigmentů a vybrané fluorescenční parametry. Obsah fotosyntetických pigmentů (chlorofylu a, chlorofylu b a celkový obsah karotenoidů) v listech byl stanovován spektrofotometricky.

Existuje mnoho metod stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů, které se liší zejména použitým rozpouštědlem. Já jsem v prvním pokusu použila metodiku používanou v laboratoři na ÚEB AV ČR dle Lichtenthaler (1987), kde jsem jako rozpouštědlo použila methanol. V této části práce jsem ale udělala metodickou chybu, proto zde tato data nejsou prezentována. Z důvodu této chyby jsem se rozhodla v dalších dvou experimentech použít metodiku dle Porra et al. (1989), která je standardně používána v Laboratoři ekofyziologické anatomie na PřF UK. V této práci doporučují používat jako rozpouštědlo DMF. Hlavní výhodou použití rozpouštědla DMF je pomalá degradace chlorofylů a karotenoidů, díky čemuž získáme přesnější hodnoty a též relativně dlouhá doba stability extraktu: nejméně 20 dní, pokud jsou extrakty skladovány při 4°C a ve tmě (Inskeep a Bloom 1985). Jako nevýhodu ale můžeme vnímat karcinogenní vlastnosti rozpouštědla a nutnost extrahovat vzorky v digestoři ve tmě a v chladu, aby nedocházelo k rozkladu chlorofylů. Přestože je tato metoda složitější, tak se ukázalo, že je přesnější než použití metanolu jako rozpouštědla. Pro stanovení obsahu pigmentů ve vzorcích byly použity upravené rovnice dle Wellburn (1994). Wellburn se v této práci zaměřil na přesné stanovení koeficientů specifické absorpce chlorofylů a celkových karotenoidů a upravil tedy rovnice, které byly použité v původní práci Porra et al. (1989).

Další metodou, která je často používána ke sledování poškození PSII, je měření rychlé fluorescence chlorofylu a. Já jsem se rozhodla zaměřit na tvar OJIP křivky a z ní získaných parametrů F_v/F_m a F_v/F_o . Pro sledování rychlé kinetiky fluorescence chlorofylu a jsem zvolila tyto parametry, protože se jedná o rychlé měření pomocí kapesního fluorimetru a navíc listy rostlin se během měření nepoškozují a jsou pak využitelné pro další analýzy.

Je obecně známo, že se tvar OJIP křivky mění v závislosti na poškození rostlin vyvolaném vysokou teplotou nebo suchem (De Ronde et al. 2004). Tvar OJIP křivky se ale také mění za přítomnosti toxického množství kovů. Např. Kalaji a Loboda (2007) analyzovali tvar OJIP křivky u dvou odrůd pšenice, které rostly v médiích s přídavkem kadmia nebo olova. Výsledný tvar OJIP křivky (obr. 11) se oproti kontrole snížil u rostlin rostoucích v přítomnosti olova, ale u rostlin rostoucích v přítomnosti kadmia došlo zcela ke ztrátě typického tvaru OJIP křivky. Tato změna mohla být způsobená schopností kadmia vytěsnit hořčík z jeho vazby v molekule chlorofylu, který pak ztrácí schopnost elektrony transportovat. Výsledky této práce ukazují, že měření tvaru OJIP křivky může být použito pro sledování zvýšené koncentrace těchto dvou kovů v rostlinách v přírodě. Já jsem se ve své práci pokusila zjistit, jestli má také thorium vliv na typický tvar OJIP křivky a zdali bude možné pomocí OJIP křivky sledovat také poškození rostlin způsobené tímto kovem.

5.2.3. Detekce oxidativního stresu

Oxidativní stres byl sledován jednak pomocí měření aktivity vysoce specializovaných antioxidačních enzymů, ale také prostřednictvím měření akumulace prolinu v listech a kořenech rostlin.

Specifická aktivita enzymů s antioxidační funkcí je poměrně často sledována u rostlin rostoucích ve stresových podmínkách způsobených těžkými kovy. Jednotlivé metodiky se od sebe liší zejména dobou, kdy jsou vzorky promíchávány se síranem amonným a dobou centrifugace vzorků. Některé metodiky se také liší složením pufrů, které se používají pro extrakci proteinů ze vzorků. Já jsem použila metodiku, která se používá v laboratoři Dr. Soudka na ÚEB AV ČR, takže se jedná o ozkoušenou metodiku, která sice je časově náročná (trvá přibližně 6 hodin), ale ze získaného roztoku proteinů můžeme stanovit 4 různé enzymy. Ostatní metodiky jsou sice časově méně náročné, ale umožňují stanovit aktivitu pouze 1 enzymu. Podmínkou těchto metod je tedy dostatečné množství biomasy rostlin, které jsem já ale neměla, z důvodu menšího počtu testovaných rostlin daného prostorovým omezením ve skleníku. Ovšem výhodou těchto metod, stanovení pouze jednoho enzymu je rychlé zpracování vzorků, které samozřejmě snižuje riziko poškození enzymů.

Prolin je aminokyselina, kterou rostliny akumulují zejména v době, kdy jsou vystavené stresu. Díky jeho antioxidační a osmoregulační funkci se opět jedná o jeden z často sledovaných parametrů detekce oxidativního stresu u rostlin, vystavený abiotickému stresu. Pro stanovení volného prolinu jsem použila standartní metodiku dle Bates et al. (1973), která je založená na spektrofotometrickém stanovení prolinu ve vzorku. Tato metodika s menšími úpravami (delší vaření, delší centrifugace s menším množstvím otáček apod.) je standardně používána pro sledování abiotického stresu u rostlin, např. sledování vlivu salinity u slivoní (Marin et al. 2010) nebo sledování vlivu hliníku na *Lactuca sativa* (Silva a Matos 2016).

5.3. Diskuze experimentálních výsledků

5.3.1. Akumulace thoria

Kořeny rostlin jsou hlavním orgánem, kterým vyšší rostliny přijímají živiny z půdy. Spolu s nimi ale přijímají také prvky, které nepotřebují. V prvním a druhém experimentu byla sledována akumulace thoria v rostlinách tabáku. Z obou experimentů (graf 29, 30) je patrné, že celkový obsah thoria se snižoval směrem od kořenů k listům resp. květům, přičemž kořeny rostlin rostoucí v médiích s optimální výživou akumulovaly přibližně 10x více thoria než nadzemní části rostlin. Toto zjištění bylo v souladu se zjištěním Soudka et al. (2013), kteří pěstovali rostliny druhu *Nicotiana tabacum* taktéž v perlitu a zalévané Hoaglandovým médiem obohaceném o 0,1 M thorium. V této práci ale sledovali také postupnou akumulaci thoria v čase od 1 až po 16 dní. Zjistili, že také v průběhu času je akumulace thoria do nadzemních částí rostlin tabáků přibližně 10x nižší než v kořenech. K obdobným výsledkům došli i Matveyeva et al. (2016), kteří zkoumali akumulaci uranu a thoria u čtyřech druhů rostlin (*Xanthium strumarium*, *Phragmites communis*, *Artemisia nitrosa* a *Artemisia serotina*), které běžně rostou na skalách a hlušinách s vyšší koncentrací těchto radionuklidů. U všech rostlin byl opět zjištěn přibližně 10x vyšší obsah thoria, ale i uranu v kořenech oproti nadzemní biomase rostlin.

Velmi zajímavou práci, zaměřenou na akumulaci thoria v jednotlivých orgánech různých druhů ovoce a zeleniny provedli Sathyapryia et al. (2012). Za modelové rostliny si vybrali 16 druhů rostlin (ovoce a zeleniny), které vytváří různé životní formy. Tyto rostliny byly pěstovány na jižním pobřeží Indie, v místě s vysokou hodnotou radiace na pozadí. Vybrané rostliny byly rozdělené podle NNMB (National Nutrition Monitoring Board) do 4

skupin v závislosti na části rostliny, která se konzumuje - zelené listy (např. kari, amaranth), kořeny a hlízy (např. jam, tapioca), plody zeleniny (např. rajčata, lilek) a plody ovoce (např. banány, papája). Nejvyšší koncentrace thoria a uranu byly naměřeny u hlíznaté a kořenové zeleniny, přičemž hlízy obsahovaly vůbec nejvyšší množství obou prvků. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny v plodech zeleniny a ovoce. V této práci tedy opět došli ke stejnému závěru tedy, že akumulace thoria se směrem od kořenů k plodům snižuje, přičemž v kořenech je obsah thoria a uranu několikanásobně vyšší oproti nadzemním orgánům rostliny. Tyto výsledky mají význam i pro běžnou populaci, protože právě hlíznatá a kořenová zelenina patří mezi nejvýznamnější zdroje obživy. Kontaminace této zeleniny způsobená radionuklidy by mohla prostřednictvím potravinové pyramidy ohrozit také populaci lidí.

V práci jsem dále sledovala akumulaci thoria rostlinami v závislosti na různých modifikacích média. Z jednotlivých modifikací měla průkazný vliv na akumulaci thoria rostlinami fosfátová výživa, ale tento vliv byl zjištěn pouze v kořenech a ve stoncích (tab. 11, 12, 14). To zřejmě souvisí se sníženou dostupností thoria po přidavku $(\text{PO}_4)^{3-}$, která je dána vysokou reaktivitou thoria s tímto aniontem. Thorium je velmi silný kationt, schopný vytěsnit Na^+ z jeho vazeb. Přidáním fosfátů do média tedy dochází k mineralizaci Th (Guo et al. 2010). Rostliny rostoucí v deficienci fosforu potom v kořenech akumulovaly přibližně 100x vyšší množství Th oproti nadzemní biomase, kde byl celkové množství naakumulovaného thoria srovnatelné s rostlinami rostoucími v médiích s optimální výživou. Vliv přítomnosti fosfátů na sníženou schopnost akumulace thoria rostlinami ve svých pracích pozorovali také Soudek et al. (2013), Roos a Jakobsen (2007) a s pozorováním Guo et al. (2010). Zdá se tedy, že rostliny tabáku jsou schopné bránit se nadměrné akumulaci thoria jeho imobilizací na povrchu buněčné stěny buněk primární kůry kořenů (Zhou et al. 2016).

Ovšem oproti mému očekávání, rostliny rostoucí v přítomnosti kyseliny vinné nevykazovaly žádné změny v akumulaci thoria. Na základě výsledků práce Huang et al. (1998), kteří sledovali akumulaci uranu u rostlin rodu *Brassica*. Tato práce ukázala, že přítomnost organických kyselin vedla k vyššímu příjmu uranu rostlinami a také ke zvýšené translokaci kovů do nadzemních částí rostliny, jsem očekávala, že organické kyseliny zvýší rozpustnost thoria v médiích, čímž by se stalo přístupnější pro rostliny, ale to se nestalo. Soudek et al. (2013) ve své práci sice také popisují zvýšenou akumulaci thoria rostlinami tabáku, které rostly v přítomnosti organických kyselin, ovšem tyto výsledky jim nevyšly statisticky průkazné. Mé pozorování je ve shodě s prací Wang et al. (2015), kteří sledovali akumulaci thoria rostlinami

Brassica juncea. Aplikace organických kyselin do médií jednak vedla k nižšímu příjmu thoria kořeny rostlin, ale zároveň vedla k jeho vyšší translokaci do nadzemní biomasy. Vliv organických kyselin na akumulaci thoria rostlinami tabáku se mi v pokusech nepodařilo potvrdit, nicméně v jiných pracích sledovali pozitivní vliv organických kyselin na akumulaci kovů. Zřejmě tedy neexistuje jednoznačný vliv organických kyselin na zvýšený příjem kovů.

Z grafů 9 a 10, je patrné, že určitý vliv na translokaci thoria do nadzemní biomasy měl postřik putrescinem na listy. Putrescin se v rostlinách sice běžně syntetizuje, ale bylo zjištěno, že stresované rostliny ho syntetizují ve vyšší míře (Marco et al. 2011). Proto bych spíše očekávala, že postřik putrescinem na listy rostlin tabáku povede k nižší akumulaci thoria rostlinami. Mnou získané výsledky jsou ale v rozporu s prací Soudek et al. (2013), kteří u putrescinem ošetřených rostlin sledovali snížený obsah thoria a to ve všech orgánech.

Vedle schopnosti aktivně přijímat kovy z půdy a tvorby velké biomasy je také důležitá schopnost rostlin translokovat kovy do nadzemní biomasy. Tato vlastnost je důležitá pro účinnost rostlin ve využití pro fytoextrakci (McGrath a Zhao 2003). Ze zjištěných hodnot akumulace kovu v jednotlivých orgánech rostliny jsme následně schopni dopočítat tzv. translokační faktor kovu pro daný druh rostliny. Translokační faktor je definován jako poměr koncentrace kovu v nadzemní biomase a v kořenech a ilustruje nám tedy schopnost rostlin translokovat kovy do nadzemní biomasy (Trotta et al. 2006). Rostliny můžeme označit za hyperakumulátory pokud je hodnota translokačního faktoru > 1 , avšak pouze za předpokladu, že také hodnota biokoncentračního faktoru (tedy poměr koncentrace kovu v rostlině a v půdě) je větší než 1. Ovšem pokud je hodnota biokoncentračního nebo translokačního faktoru $\ll 1$, potom se jedná o rostliny, které se stresu způsobeném daným kovem vyhýbají (Baker 1981). Takové to rostliny, přestože mohou produkovat velké množství biomasy, tak nejsou vhodné pro fytoextrakci, protože počet sklizní potřebných ke snížení koncentrace kovu v půdě o polovinu by byl vyšší než 100, tzn., že za předpokladu, že se za rok sklídí 2 sklizně tak by dekontaminace takových ploch trvala 50 let (McGrath a Zhao 2003). Z grafů 11 a 12 je zřejmé, že vybraný druh *Nicotiana glutinosa* zdaleka nedosahuje potřebných hodnot a proto tyto rostliny nejsou vhodné pro fytoremediaci thoriem kontaminovaného prostředí. Z výsledků ale můžeme vidět, že aplikace putrescinu na listy podporuje translokaci Th do nadzemních částí rostlin. Putrescin, popř. i ostatní polyaminy by tedy mohly být použity ve fytoremediálních metodách pro podporu translokace těžkých kovů do nadzemních částí

roślin. Ovšem tento vliv polyaminů na translokaci těžkých kovů do nadzemní biomasy rostlin je nutné ještě dále ověřit.

5.3.2. Obsah vody v listech

Sledování obsahu vody se někdy používá u rostlin rostoucích v místě kontaminovaném těžkými kovy, ale vzhledem k jeho ovlivnění okolními prostředími tato metoda není příliš spolehlivá. Výsledky obsahu vody (grafy 31, 32 a 33) vyšly v jednotlivých pokusech pokaždé jinak, přestože rostliny byly pěstované hydroponicky a bylo tedy možné očekávat plnou saturaci rostlin vodou. Z rozdílných výsledků usuzují, že obsah vody v rostlinách reaguje citlivě na podmínky okolí. Z tohoto důvodu také usuzují, že sledování obsahu vody v listech rostlin není relevantní pro design pokusů, který byl zvolen a nemá tedy výpovědní hodnotu o možném stresu u rostlin způsobeném thoriem.

5.3.3. Parametry fotosyntetického aparátu

Chloroplasty jsou buněčné orgány, které jsou velmi citlivé na vznik oxidativního stresu. Vznik oxidativního stresu je způsoben zejména zvýšenou produkcí a koncentrací singletového kyslíku v chloroplastech (Wang et al. 2009). Nadměrné zvýšení množství tohoto reaktivního kyslíku, ale i dalších ROS vlivem oxidativního stresu vede následně k poškození chloroplastů. Chloroplasty jsou totiž složitým systémem membrán s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, které jsou potencionálním cílem pro peroxidaci způsobenou ROS (Halliwell a Gutteridge 1984). Poškození chlorofylů, zejména pigment-proteinových komplexů, můžeme také sledovat nepřímo a to za pomoci měření fluorescence. Výhodou této metody je, že je rychlá a neinvazivní, takže rostlinu nijak nepoškodíme a na rozdíl od chlorofylů ji měříme přímo na živé rostlině.

Z tohoto důvodu jsem se ve své práci zaměřila jednak na sledování fotosyntetických pigmentů a dále na sledování rychlé kinetiky fluorescence a z ní vycházejících parametrů.

5.3.3.1. Obsah fotosyntetických pigmentů

Prezentované výsledky byly rozdělené na dvě části. V první části jsem porovnávala pouze rostliny rostoucí v médiu s přidaným thoriem a v médiu bez thoria. Nezávisle na sobě jsem přitom porovnávala rostliny rostoucí v médiích s optimální fosfátovou výživou a rostliny rostoucí ve fosfor deficientních médiích. Tento koncept vyhodnocení a prezentace byl zvolen na základě akumulačních experimentů, kde se jednoznačně prokázalo, že rostliny rostoucí v deficienci fosforu akumulují až 10-ti násobně vyšší množství thoria ve stélce oproti rostlinám rostoucím ve fosfátových médiích. Na základě této akumulace očekávám, že rostliny z fosfor deficientních médiích budou více stresované a to jednak vyšší akumulací Th v rostlinném těle, ale také samotnou deficiencí P.

V první části výsledků v případě chlorofylu a (graf 14, a-d) vyšly dva významné výsledky a to jeho vyšší množství u rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou za přítomnosti thoria ve srovnání s rostlinami rostoucími v P-médiu bez thoria, ale též u rostlin, které rostly v P-deficientním médiu, kde ovšem obsahovaly rostliny ovlivněné thoriem méně chlorofylu a než neovlivněné rostliny. Obdobný výsledek byl také patrný v případě chlorofylu b (graf 15, a-d). Ačkoliv u obou chlorofylů vyšli dva rozdílné signifikantní rozdíly, tak u ostatních dvou pokusů, přestože výsledky nejsou průkazné, vyšlo, že rostliny rostoucí v přítomnosti thoria obsahovaly vždy vyšší obsah chlorofylů a i b. Tyto výsledky korespondovaly také s celkovým obsahem chlorofylů (graf 16, a-d) v rostlinách. Vyšší obsah chlorofylů a (graf 34, 35) i b (graf 36, 37) a obsah celkových chlorofylů (graf 38, 39) ve druhé části výsledků opět ukázaly, že rostliny rostoucí v přítomnosti thoria opět obsahovaly vyšší množství chlorofylů než „kontrolní“ rostliny.

Dále jsem také měřila poměr mezi chlorofylem a a chlorofylem b. V první části (graf 17, a-d) výsledky ukázaly nižší hodnoty tohoto poměru u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, ovšem významný rozdíl vyšel pouze v jednom případě. Toto pozorování se potvrdilo také ve druhé části výsledků (graf 40 a 41), kde jsem již porovnávala všechna média. Jedinou výjimkou, kde vyšel u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria vyšší poměr chlorofylů oproti rostlinám rostoucím za nepřítomnosti thoria, bylo P-deficientní médium s aplikací putrescinu. To tedy znamená, že u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria byl rozdíl v obsahu obou chlorofylů menší než u „kontrolních rostlin“, nicméně všechny rostliny obsahovaly téměř 3x vyšší množství chlorofylu a oproti chlorofylu b.

Dále je z grafů patrné, že rostliny ze třetího pokusu obsahovaly přibližně poloviční množství chlorofylů. Tento rozdíl připisují rozdílné době, kdy byly rostliny pěstovány (2 pokus - léto 2015, 3 pokus –jaro 2016).

Podle Bidwella (1979, cit. dle Chettri et al. 1998) na oxidativní stres citlivěji reaguje chlorofyl a, ale podle Soudka et al. (2014) reagoval na přítomnost kovů (kadmia a zinku) v rostlinách čiroku chlorofyl b. Z mých výsledků ale plyne, že u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, došlo k nárůstu obou chlorofylů, tudíž nelze jednoznačně říci, který z těchto chlorofylů citlivěji reaguje na přítomnost thoria v médiu. Podle mého názoru zde však můžeme pozorovat tzv. efekt hormeze. Tedy můžeme pozorovat, že stres způsobený thoriem byl zřejmě mírný a měl tedy pozitivní vliv na obsah chlorofylů v rostlinách tabáku, ačkoliv výsledky nejsou většinou průkazné. O tomto efektu již ve své práci píše Ůnak et al. (2007), kteří pozorovali, že při nízké koncentraci Th v půdě (až 1316 ppm) se rostlinám dařilo výrazně lépe oproti rostlinám kontrolním. Podobný efekt kadmia na rostliny *Lonicera japonica* zjistili Jia et al. (2014). Nízké množství kadmia v půdě (10 mg/kg) totiž vedlo ke zvýšení množství obou chlorofylů a karotenoidů v rostlinách. Vyšší množství kadmia pak již vedlo ke snížení celkového množství všech fotosyntetických pigmentů. Ovšem většina prací popisuje negativní efekt kovů na obsah pigmentů. Například v práci Gallego et al. (1996), Naser Karimi et al. (2012) nebo Saenen et al. (2013) vždy sledovali úbytek obsahu chlorofylu a, chlorofylu b i celkových chlorofylů u různých druhů rostlin (*Helianthus annuus*, *Cynara scolymus*, resp. *Arabidopsis thaliana*), které byly vystaveny různým kovům (železo měď nebo kadmium, olovo, resp. uran).

Dále jsem se ve své práci zaměřila na sledování obsahu karotenoidů v rostlinách. Karotenoidy totiž mají vedle schopnosti absorpce energie také antioxidační vlastnosti (Stahl a Sies 2003). V případě obsahu karotenoidů v listech tabáku byly v první části (graf 18, a-d) opět vidět dva významné rozdíly. A to jednak u rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou za přítomnosti thoria v porovnání s rostlinami rostoucími v médiu bez fosfátů a bez thoria, ale též u rostlin, které rostly v P-deficientním médiu, kde ale rostliny ovlivněné thoriem obsahovaly méně celkových karotenoidů než thoriem neovlivněné rostliny. U dalších dvou grafů (graf 42 a 43) s neprůkaznými výsledky můžeme opět vidět trend vyššího obsahu karotenoidů u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria. Také ve druhé části výsledků se opět ukázalo, že rostliny rostoucí v přítomnosti thoria obsahují vyšší množství karotenoidů, než thoriem nestresované rostliny. Mé experimenty sice nejsou úplně signifikantní, ale ukazují, že karotenoidy by mohly hrát ochrannou roli v v případě reakce rostlin na thorium

Nakonec byl sledován poměr karotenoidů a chlorofylů (graf 19, a-d a graf 44 a 45). Ovšem, podíl těchto pigmentů vyšel podobně u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, jako u rostlin rostoucích v jeho nepřítomnosti. Jediný významný rozdíl vyšel pouze ve třetím pokusu u rostlin rostoucích na P-deficientních médiích, kdy u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria byl zjištěn nižší poměr fotosyntetických pigmentů. Všechny rostliny pak obsahovaly přibližně 10x vyšší obsah chlorofylů než karotenoidů. Tudíž se mi nepodařilo prokázat výrazný vliv thoria na obsah chlorofylů a karotenoidů.

Mé výsledky opět souhlasí s pozorováním Jia et al. (2014) která psal o efektu hormeze u Cd-hyperakumulujících rostlin *Lonicera japonica* rostoucích v přítomnosti kadmia. Také práce ukázala, že u rostlin *Arabidopsis thaliana* vystavených olovu a nízkým koncentracím mědi (150 μM) a rtuti (200 μM) dochází k nárůstu celkového obsahu karotenoidů. Ovšem ve vyšších koncentracích mědi a rtuti došlo k poklesu jejich obsahu. Na další kovy – mangan a zinek potom rostliny reagovaly pouze snížením obsahu karotenoidů (Baek et al. 2012). V práci věnované vlivu uranu (50 μM) na rostliny *Arabidopsis thaliana* došlo naopak k poklesu koncentrace celkových karotenoidů v listech (Vanhoudt et al 2014).

5.3.3.2. Fluorescenční parametry

Jak jsem již psala analýza OJIP křivky a z ní získaných fluorescenčních parametrů se běžně používá pro sledování vlivu různých stresových faktorů na rostliny, včetně těžkých kovů (např. Kalaji a Loboda 2007, Dias et al. 2012).

Tvary OJIP křivky (graf 20, a-d) na první pohled nevykazovaly žádné rozdíly mezi rostlinami rostoucími v přítomnosti thoria a kontrolními rostlinami. Výsledky nasvědčují, že fosfátová výživa, ani přítomnost thoria v médiu neměly vliv na tvar OJIP křivky. Ovšem, když se podíváme na fluorescenční parametry F_v/F_m (graf 21, a-d) a F_v/F_o (graf 22, a-d), tak můžeme vidět, že oba parametry vykazují nižší hodnotu u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria. Přesto ale zjištěné výsledky obou parametrů jsou v normě a nevykazují tedy hodnoty typické pro stresované rostliny. Hodnota parametru F_v/F_m pro nestresované rostliny je v rozmezí 0,79-0,84 (Žurek et al. 2013) a hodnota parametru F_v/F_o je 4-6 (Roháček 2002).

V další části jsem mezi sebou porovnávala fluorescenční parametry u všech médií. Ve druhém pokusu nebyl patrný žádný významný rozdíl (graf 46), ale ve třetím pokusu (graf 47)

bylo opět vidět, že rostliny rostoucí v médiích obohacených o thorium vykazují signifikantně nižší hodnoty obou fluorescenčních parametrů. Ovšem zajímavá byla reakce rostlin rostoucích v médiích obohacených o thorium, na jejichž listy byl zároveň stříkán putrescin. Tyto rostliny již vykazovaly hodnoty fluorescenčního parametru F_v/F_o nižší než 4, což znamená, že se již jedná o stresované rostliny. Výsledky mé práce tak jednak naznačují, že v rostlinách rostoucích v přítomnosti thoria dochází ke snížení obou sledovaných fluorescenčních parametrů. Toto snížení by mohlo být umocněné použitím vyšší koncentrace thoria v médiu. Zdá se tedy, že s koncentrací thoria (0,2 mM $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$), kterou jsem v pokusu použila já, se rostliny zřejmě umí velmi dobře vypořádat. Dále pak výsledky naznačují, že vliv thoria na fluorescenci může být umocněn použitím dalších ošetření rostlin např. putrescinem.

Tvaru OJIP křivky a z ní odvozených parametrů se na rostlinách rostoucích v přítomnosti thoria zatím nikdo nevěnoval. Ale již existuje práce (Saenen et al. 2014), která se věnovala parametru F_v/F_m u rostlin *Arabidopsis thaliana* rostoucích v médiu za přítomnosti uranu. V této práci sledovali rostliny rostoucí na médiích se zvyšující se koncentrací uranu. Použitá média se také lišila hodnotou pH. Zatímco u rostlin rostoucích na médiích s pH 7.5 nebyl zjištěn žádný rozdíl, tak u rostlin rostoucích v kyselém médiu (pH 4,5) došlo k nárůstu tohoto parametru, ale hodnoty výsledné hodnoty opět nevykazovaly, že by rostliny byly stresované. Snížení obou fluorescenčních parametrů sledovali také Peixoto et al. (2002) u dvou druhů široce rostoucích v přítomnosti hliníku. V této práci také upozorňují, že fluorescenční parametr F_v/F_o reagoval citlivěji na přítomnost hliníku v médiu. Také mé výsledky ukázaly, že fluorescenční parametr F_v/F_o reaguje citlivěji na změny okolních podmínek, z čehož můžeme usoudit, že tento parametr má větší výpovědní hodnotu o fyziologickém stavu rostliny a můžeme doporučit sledovat jej i v dalších pracích.

V závislosti na akumulaci thoria v rostlinách, která byla vyšší u rostlin rostoucích ve fosfor deficientních médiích jsem očekávala, že tyto rostliny budou vykazovat větší míru stresu. Nicméně v případě obsahu fotosyntetických pigmentů a ve fluorescenčních parametrech nebyly zjištěné žádné výrazně odlišné koncentrace těchto pigmentů resp. hodnot těchto parametrů u rostlin rostoucích v deficienci fosforu oproti rostlinám, které rostly ve fosfátových médiích. Významný rozdíl byl pozorován pouze v případě fluorescenčního parametru F_v/F_o a to pouze u rostlin ze třetího pokusu rostoucích v P-deficientním médiu, na které byl stříkán putrescin. Z těchto výsledků vyplývá, že si tyto rostliny, ačkoliv obsahovaly až 10x vyšší množství thoria

v biomase, dokáží s thoriem poradit a to zejména jeho imobilizací v kořenech (zřejmě jeho navázáním na buněčné stěny kořenových buněk).

5.3.4. Detekce oxidativního stresu

5.3.4.1. Specifická aktivita antioxidačních enzymů

Jak jsem již psala v úvodu, specifická aktivita enzymů nereaguje stejně na všechny těžké kovy. Některé kovy vedou ke zvýšení jejich aktivity, jiné naopak k poklesu aktivity enzymů. To je zřejmě dáno specifickou reakcí rostliny na dané kovy, kdy může dojít ke snížení aktivity jednoho enzymu, ale ke zvýšení aktivity jiného enzymu. Z výsledků mé práce je také patrné, že různé modifikace médií mají také velký vliv na specifickou aktivitu enzymů. Proto bylo poměrně složité interpretovat výsledky.

V této práci jsem se zaměřila na měření specifické aktivity 4 enzymů s antioxidační funkcí – APX, CAT a PX, které katalyzují rozklad peroxidu vodíku (Chaoui et al. 1997) a GST, jehož nejvýznamnější funkcí je zřejmě schopnost katalyzovat konjugaci glutathionu s toxickými substráty, např. s těžkými kovy (Sheehan et al. 2001). Vzhledem k tomu, že z akumulčních experimentů vyplynulo, že největší vliv na akumulaci thoria měla přítomnost fosforu, tak jsem se v první části věnovala zvlášť porovnání rostlin rostoucích v médiích s fosforem za přítomnosti resp. nepřítomnosti thoria a zvlášť pozorování rostlin rostoucích v P-deficientním médiu opět za přítomnosti resp. nepřítomnosti thoria. Tento design byl zvolen, abychom eliminovali vliv fosforu na specifickou aktivitu enzymů. V další části potom už byly mezi sebou porovnávány všechny varianty ošetření.

První enzym, který jsem měřila, byla APX. Z grafu 23 (a-f) je patrné, že rostliny rostoucí v médiích s optimální fosfátovou výživou vykazovaly nižší aktivitu APX než rostliny rostoucí na P-deficientním médiu. Ovšem nebyl zjištěn žádný rozdíl v aktivitě APX mezi kontrolními rostlinami a rostlinami rostoucími v přítomnosti thoria (s výjimkou stonků rostlin rostoucích v médiích s optimální výživou). Z těchto výsledků se tedy zdá, že thorium na rozdíl od přítomnosti fosforu nemá vliv na aktivitu APX.

V další části, pak byla porovnávána specifická aktivita APX současně u všech variant (graf 48, 49, 50). Opět je patrné, že deficiencie fosforu v médiích vedla ke zvýšení aktivity APX

oproti kontrole (šedý sloupec), ovšem statisticky významný rozdíl byl zjištěn pouze v listech rostlin rostoucích ve variantě -P, +Th. Významné zvýšení aktivity APX bylo dále pozorováno u rostlin, rostoucích ve fosfátových médiích s přidavkem kyseliny vinné a/nebo putrescinem. Z výsledků mé práce tedy lze vyvodit, že na přítomnost thoria rostliny nereagují zvýšenou aktivitou APX, ale její vyšší aktivita je spíše spojená s reakcí na další modifikace média (deficience fosforu, kyseliny vinná a putrescin). Také v dříve publikované práci zjistili, že aktivita APX se neliší v kořenech ani stoncích druhu *Phaseolus vulgaris*, který rostl v médiu v přítomnosti kadmia nebo zinku, ale v listech již sledovali nárůst jeho aktivity (Chaoui et al. 1997). Podobně práce Erdei et al. (2002), ve které také sledovali vliv kadmia a zinku avšak na rostliny ječmene, ukázaly, že u rostlin rostoucích v přítomnosti kadmia dochází k mírnému nárůstu aktivity APX pouze v kořenech, ale v přítomnosti zinku již nepozorovali žádné změny v aktivitě APX. Rozdílnou aktivitu APX v přítomnosti kadmia a zinku sledovali také Soudek et al. (2014). Rostliny čiroku rostly v médiích se zvyšující se koncentrací obou kovů. Zatímco u rostlin rostoucích v přítomnosti kadmia nepozorovaly žádný rozdíl v aktivitě APX, tak u rostlin rostoucích v přítomnosti zinku pozorovaly zvyšující se aktivitu APX v závislosti na množství zinku v médiu. Ovšem práce Saenen et al. (2015) ukázala, že přítomnost uranu v médiu vedla ke snížení aktivity APX u rostlin *Arabidopsis thaliana*.

Druhým sledovaným enzymem byla CAT. V první části výsledků, kde jsem opět sledovala pouze vliv thoria u rostlin rostoucích v médiu za přítomnosti resp. nepřítomnosti fosforu, byl pozorován významný rozdíl ve stoncích a v listech rostlin rostoucích v médiích s optimální výživou (graf 24, a-f). Ale zatímco stonky vykazovaly vyšší aktivitu CAT v přítomnosti thoria, tak v listech byla naopak za přítomnosti thoria naměřená nižší aktivita CAT. Z výsledků jasně vyplývá, že aktivita CAT není ovlivněna přítomností resp. nepřítomností fosforu. Při porovnávání specifické aktivity CAT u všech rostlin rostoucích na jednotlivých médiích a to zvláště v jednotlivých orgánech (graf 51, 52, 53), nebyl v případě kořenů a stonků naměřen žádný významný rozdíl, ale z grafů je patrný trend, kde rostliny rostoucí v médiích s optimální výživou za přítomnosti thoria vykazovaly vyšší specifickou aktivitu CAT než rostliny rostoucí na médiích bez thoria. Ani v případě listů nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi kontrolními rostlinami a rostlinami rostoucími v upravených médiích.

To znamená, že ani v případě specifické aktivity CAT se mi nepodařilo prokázat vliv thoria na její aktivitu v rostlinách tabáku. Mé pozorování je v souladu s prací Erdei et al. (2002), věnované vlivu kadmia a zinku na rostliny ječmene. Ani v této práci nebyl prokázán vliv těchto

kovů na aktivitu CAT. Oproti tomu rostliny *Suaeda fruticosa* (solnička), pěstované v půdě obohacené o různé koncentrace zinku a olova vykazovaly postupně zvyšující se aktivitu CAT (Bankaji et al. 2016). Solnička je typický halofytní druh, proto u ní autoři sledovali také kombinaci halofytního prostředí (200mM NaCl) a přítomnost obou kovů. Zatímco na zvyšující se přítomnost kovů reagovaly zvyšující se aktivitou CAT, tak v kombinaci s přítomností solí docházelo ke snížení aktivity CAT a to rovnoměrně se zvyšující se koncentrací kovu v půdě. Snížená aktivita CAT mohla být způsobená nižší biodostupností kovů, protože pouze slané prostředí nemělo žádný vliv na aktivitu CAT. To by znamenalo, že rostliny byly vystaveny menšímu stresu. Všechny tyto experimenty ovšem trvaly delší dobu, ale práce Srivastava et al. (2010) sledovala pouze krátkodobé vystavení rostlin *Hydrilla verticillata* různým koncentracím uranu. Z výsledků jednoznačně vyplývá, že rostliny do 30 minut zvýšily aktivitu CAT, ale též APX, ale během 24 hod se aktivita vrátila na původní hladinu. Z těchto výsledků se dá usuzovat, že rostliny reagují zvýšenou aktivitou antioxidantních enzymů pouze v bezprostředním začátku vystavení stresu, ale postupem času se jejich aktivita snižuje. Během této doby si rostliny zřejmě vytvoří jiné obranné mechanismy, které postupně začnou převládat (např. akumulace prolinu, glutathionu, karotenoidů, fytochelatinů).

Třetím sledovaným enzymem byla PX. V první části výsledků (graf 25, a-f) nebyly u kořenů zjištěny žádné významné rozdíly, ale z grafů je patrné, že rostliny rostoucí v deficienci P vykazovaly vyšší aktivitu PX než rostliny z fosfátových médií. Ve stoncích a v listech již byl změřen signifikantní rozdíl mezi rostlinami rostoucími v přítomnosti resp. nepřítomnosti thoria. Rostliny rostoucí v přítomnosti thoria vykazovaly nižší aktivitu PX oproti rostlinám rostoucím v médiích bez thoria. Tento rozdíl byl patrný u všech rostlin nezávisle na přítomnosti fosforu v médiu. Tyto výsledky tak potvrzují vliv přítomnosti thoria na antioxidantní systém a to snížením aktivity PX.

Výsledky z druhé části (graf 54, 55, 56) korelují s výsledky z druhé části. Aktivita PX v kořenech byla ve srovnání s rostlinami rostoucími v kontrolním médiu zvýšená jednak v P-deficientních médiích a dále v médiích obsahujících kyselinu vinnou. Vliv thoria v kořenech opět nebyl prokázán, ale v listech a stoncích rostlin tabáku rostoucích za přítomnosti thoria se výše zmíněný trend poklesu aktivity PX opět potvrdil. Z těchto výsledky tedy plyne, že rostliny rostoucí v přítomnosti thoria vykazují významně nižší aktivitu PX ve srovnání s kontrolními rostlinami.

Aktivitu PX ve své práci na čiroku rostoucím v přítomnosti zinku a kadmia sledovali také Soudek et al. (2014). Ve srovnání s kontrolními rostlinami pozorovali sníženou aktivitu PX u obou kovů, výraznější snížení pak pozorovali zejména v kořenech čiroku. Ale je zajímavé, že ve většině mě dostupných pracích píší o zvyšující se aktivitě PX v závislosti na přítomnosti těžkých kovů. Např. u rostliny *Pityrogramma calomelanos* vystavené různým koncentracím arzenu byla pozorována zvyšující se aktivita PX v závislosti na zvyšující se koncentraci arzenu v médiu. U této kapradiny již byla potvrzena schopnost hyperakumulace arzenu. Zřejmě proto má tato rostlina oproti běžným druhům vyšší kapacitu ke zvýšení množství enzymatických antioxidantů (Campos et al. 2016). Také druh *Solanum nigrum* rostoucí v médiu v přítomnosti kadmia vykazoval zvyšující se aktivitu PX spolu se zvyšujícím se množstvím kadmia v médiu (Deng et al. 2010). Nebo práce Shah et al. (2001), ve které se zaměřili na sledování vlivu kadmia na sazenice dvou odrůd rýže pěstované v živném médiu obohaceném o kadmium. Opět i v této práci shledali, že v přítomnosti kadmia dochází k nárůstu aktivity PX. Tento nárůst ale trval pouze prvních 15 dní a poté došlo opět ke snížení její aktivity.

Posledním sledovaným enzymem byla GST. V první části výsledků (graf 26, a-f), ve kterých byla sledována aktivita GST samostatně ve fosfátovém a fosfor deficientním médiu za přítomnosti resp. nepřítomnosti thoria, byl významný rozdíl zjištěn jednak u kořenů rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou. U rostlin rostoucích v přítomnosti Th byl ve srovnání s kontrolními rostlinami patrný trend nižší aktivity GST. Tento trend je vidět také u rostlin rostoucích na P-deficientních médiích. Dále byl významný rozdíl zjištěn v listech rostlin, rostoucích v P-deficientním médiu, kde rostliny rostoucí v přítomnosti thoria opět vykazovaly nižší aktivitu GST.

Z výsledků z druhé části (graf 57, 58, 59) můžeme vidět trend nižší aktivity GST u kořenů rostlin tabáku, rostoucích v přítomnosti thoria. Kořeny rostlin rostoucí v přítomnosti thoria vykazovaly významně nižší aktivitu GST v kořenech ve srovnání s kontrolou (s výjimkou dvou médií - +PUT, +P, +TA a +PUT, -P). Tento trend nižší aktivity GST za přítomnosti thoria je také patrný u stonků a listů rostlin tabáku, nicméně mezi jednotlivými médii nevyšly žádné signifikantní rozdíly. Z těchto výsledků se zdá, že by thorium mohlo mít vliv na aktivitu GST, resp. přítomnost thoria zřejmě vede ke snížení aktivity GST. Ovšem tento závěr není potvrzen statisticky, přestože trend snižující se aktivity GST za přítomnosti thoria se opakuje ve všech orgánech.

Aktivitu GST ve své práci sledoval Soudek et al. (2014). Rostliny široce rostly v médiích s přídavkem kadmia nebo zinku. U rostlin rostoucích v přítomnosti zinku došlo oproti kontrole ke snížení aktivity GST až při vyšších koncentracích zinku v médiu, naopak na přítomnost kadmia reagovaly rostliny sníženou aktivitou GST již při nízkých koncentracích, se zvyšující se koncentrací kadmia v médiu bylo toto snížení stále výraznější a to zejména v kořenech. Také práce Nepovím et al. (2004), ve které sledovali vliv těžkých kovů – niklu, kadmia a olova na aktivitu GST a PX v kořenech křenu ukázala, že přítomnost všech těchto kovů vede ke snížení aktivity GST i PX v kořenech křenu ve srovnání s kontrolou.

Aktivita enzymů zcela jistě hraje důležitou roli ve zhášení ROS. Nicméně z výsledků mé práce, ale také z výsledků prezentovaných v článkách, které v práci cituji se zdá, že rostliny vždy nereagují na stres způsobený těžkými kovy zvýšenou aktivitou těchto antioxidantních enzymů. Naopak někdy vlivem stresu dochází k útlumu jejich aktivity, to ale může být spojené se zvyšující se aktivitou dalších antioxidantů, jako jsou glutathion, karotenoidy, nebo zvýšená aktivita SOD (superoxiddismutázy).

5.3.4.2. Akumulace prolinu

Prolin patří mezi molekuly, které mají schopnost vycytávat a zhášet ROS, ale také jsou schopné vázat některé těžké kovy – jedná se tedy o další detoxifikační mechanismus rostlin (Hare et al. 2001). Vedle toho je prolin také schopný chránit buněčné membrány před oxidativním stresem a to zvýšením aktivity dalších antioxidantů (Matysik et al. 2002).

Já jsem ve své práci měřila koncentraci volného prolinu a to zvlášť v listech a zvlášť v kořenech. Výsledky byly opět rozděleny na dvě části. V první části jsem sledovala obsah prolinu zvlášť v rostlinách rostoucích ve fosfátovém médiu a zvlášť v rostlinách rostoucích v P-deficientním médiu. Ve druhé části jsem potom porovnávala mezi sebou všechny rostliny rostoucí v jednotlivých médiích.

Je obecně známo, že vyšší akumulace těžkých kovů vede k vyšší tvorbě ROS a ty následně indukují zvýšení hladin prolinu (Sativa a Matos 2016). Já jsem v listech (graf 26, a-d) zjistila pouze jeden významný rozdíl, a to v P-deficientním médiu ve třetím pokusu, kde rostliny rostoucí v přítomnosti thoria obsahovaly méně prolinu, což je v rozporu s detoxifikační funkcí prolinu. Zajímavé ale je, že v ostatních médiích, ačkoliv zde není statisticky významný rozdíl,

tak je zde patrný trend vyššího obsahu prolinu v listech rostlin rostoucích v médiích s přidavkem thoria. Naopak v kořenech (graf 27, a-d) můžeme (s výjimkou -P médií z druhého pokusu) vidět významně vyšší množství prolinu u rostlin rostoucích v médiích obohacených o thorium.

V další části výsledků, kde byla porovnávána všechna média, resp. rostliny v nich rostoucí, mezi sebou (graf 60, 61). Trend vyššího množství prolinu v listech rostlin rostoucích v přítomnosti thoria byl zjištěn pouze v P-deficientních médiích a dále v médiích s optimální fosfátovou výživou. U rostlin rostoucích v přítomnosti putrescinu a/nebo kyseliny vinné tento trend prokázán nebyl. Nicméně ve srovnání s kontrolou nebyly v listech zjištěny žádné významné rozdíly. V kořenech byl změřen významně vyšší obsah prolinu v rostlinách rostoucích v přítomnosti thoria a to u rostlin rostoucích v médiu s optimální výživou, dále u rostlin rostoucích ve fosfátovém médiu za přítomnosti kyseliny vinné a u rostlin rostoucích v médiu s fosfátovou deficiencí.

Výše uvedené výsledky prokázaly, že deficiencie fosforu má velký vliv na obsah prolinu v rostlinách. Z výsledků z první části se dá odvodit, že obsah prolinu v rostlinách byl ovlivněn rovněž přítomností thoria v médiích. Tímto se mi podařilo prokázat, že akumulace volného prolinu v rostlinných buňkách může přispět k odolnosti vůči stresu způsobeným thoriem. Nicméně bylo by dobré se této problematice věnovat dál a rostliny vystavit např. vyšším koncentracím thoria, než kterou jsem použila já.

Sativa a Matos (2016) ve své práci sledovali vliv různých koncentrací hliníku na dva kultivary *druhu Lactuca sativa*. U obou kultivarů došlo k nárůstu obsahu prolinu. Ovšem u jednoho kultivaru byl pozorován významný nárůst koncentrace prolinu až při velmi vysokých koncentracích (20 mg/l) hliníku v médiu. U druhého kultivaru došlo k nárůstu obsahu prolinu již při koncentraci 0,05 mg/l hliníku v médiu. Vyšší koncentrace hliníku ale vedla k nižší koncentraci prolinu, proto byl tento kultivar považován za více citlivý na přítomnost hliníku v médiu, než druhý kultivar. Krátkodobé experimenty (1 den) provedené na vodních rostlinách *Hydrilla verticillata* také ukázaly, že tato rostlina reaguje na přítomnost uranu v roztoku zvýšením akumulace prolinu v pletivech, ale toto zvýšení akumulace bylo pouze mírné (Srivastava et al. 2010). Ovšem zajímavé bylo zjištění, že laboratorní rostliny *Hydrilla verticillata* rostoucí v Hoaglandově roztoku akumulovaly uran podstatně méně oproti rostlinám, které byly sledovány v přirozeném prostředí. Autoři podobně jako my v případě

thoria předpokládají, že ze sníženou schopností akumulace uranu v Hoaglandově roztoku mohla přítomnost fosfátů, na který se uran navázal a stal se tedy méně dostupným pro rostliny.

Vyšší akumulace thoria ve fosfor deficientních rostlinách ani v případě sledování specifické aktivity vybraných antioxidantních enzymů a akumulace prolinu neukázala žádný významný rozdíl oproti rostlinám rostoucích ve fosfátových médiích. Tyto výsledky tak potvrdily pozoruhodnou schopnost rostlin vypořádat se s vyšší akumulací thoria jeho imobilizací v kořenech.

5.4. Vyhodnocení testování hypotéz

6. Přítomnost Th v rostlině způsobuje vznik oxidativního stresu.

U rostlin rostoucích v médiích obohacených o thorium došlo k průkaznému poklesu obou fluorescenčních parametrů Fv/Fm a Fv/Fo. Tyto rostliny také vykazovaly významný pokles aktivity PX ve stoncích a v listech a dále pokles aktivity GST v celé rostlině, ovšem průkazný rozdíl byl patrný pouze v kořenech. Také akumulace prolinu, která byla vyšší u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, potvrzuje, že thorium způsobuje vznik oxidativního stresu v rostlinách *Nicotiana glutinosa*. Tuto hypotézu jsem tedy potvrdila.

7. Akumulace Th v rostlině vede ke snižování obsahu fotosyntetických pigmentů.

Tuto hypotézu se mi na základě výsledků mé práce podařilo vyvrátit. V práci jsem naopak sledovala zvýšený obsah fotosyntetických pigmentů u rostlin rostoucích v přítomnosti thoria. Toto zvýšení ale může být způsobené vystavením rostlin nízké koncentraci thoria, která mohla rostliny stimulovat – efekt hormoneze.

8. Přítomnost organických kyselin v médiu povede ke zvyšování obsahu Th v rostlině.

Tuto hypotézu se mi nepodařilo potvrdit ani vyvrátit. Přítomnost kyseliny vinné neměla průkazný vliv na akumulaci thoria rostlinami.

9. Ošetření polyaminy postřikem nadzemních částí rostlin povede k nižší akumulaci

Th. Vyšší koncentrace putrescinu povede k nižšímu příjmu Th kořeny.

Postřik putrescinu na listy tabáku neměl průkazný vliv na jeho akumulaci kořeny rostlin. Naopak jsem u těchto rostlin pozorovala vyšší translokaci thoria do nadzemních biomasy rostlin

ve srovnání s rostlinami rostoucími ve fosfátových médiích. Tuto hypotézu jsem tedy na základě svých výsledků opět zamítla.

10. Absence fosfátových iontů v médiu povede k vyšší akumulaci Th v rostlinách.

Tuto hypotézu se mi podařilo potvrdit. Ovšem vyšší příjem thoria rostlinami rostoucími v P-deficientních médiích je zřejmě způsobený jeho vyšší dostupností pro rostliny, jelikož přítomnost fosfátů vede k mineralizaci Th, čímž se thorium stává pro rostliny nedostupným.

5.5. Přínos práce, začlenění výsledků do širšího kontextu směřování dalšího výzkumu

V přírodě existuje přibližně 298 tisíc popsaných druhů cévnatých rostlin (Mora et al. 2011). Ovšem schopnost hyperakumulace těžkých kovů byla potvrzena pouze zhruba u 400 druhů rostlin, což představuje asi 0,2% všech dosud známých krytosemenných rostlin (McGrath a Zhao 2003). Hyperakumulující rostliny bývají většinou ty, jež přirozeně rostou v místech s vysokým obsahem kovů. Tyto hyperakumulující rostliny se během evoluce vybavily velkým množstvím obranných drah, při kterých vznikají a zpětně se regenerují sloučeniny, které umožňují rostlinám aktivně ovlivňovat jak stres způsobený těžkými kovy (např. imobilizace kovů v substrátu jejich navázáním na kořenové exudáty nebo jejich imobilizace ve vakuole prostřednictvím fytochelatinů), tak i následky vzniklé jejich působením (ROS vznikající během oxidativního stresu) (Halliwell 2006). Tento fenomén – schopnost hyperakumulace je tedy v přírodě poměrně vzácný a my bychom se měli snažit poznat tyto druhy rostlin, abychom v budoucnu mohli využívat jejich potenciál ve fytořediačních metodách.

Prací, které by se věnovaly vlivu thoria na rostliny, zatím není mnoho. Většina z těchto prací byla zaměřená na sledování akumulace thoria zejména u kulturních plodin (Zararzis et al 1997, Chen et al. 2005). Některé z těchto prací se dále věnovaly modifikacím vnějšího prostředí, které by mohly vést k vyšší akumulaci thoria rostlinami a jeho následné translokaci do nadzemní biomasy (Soudek et al. 2013, Guo et al. 2010). Podle mého mínění by další výzkum tedy mohl směřovat ke zkoumání rostlin, u kterých již byla potvrzena schopnost hyperakumulace některých kovů. Tyto rostliny by totiž mohly mít potenciál i pro akumulaci thoria a mohly by tak být použity pro fytořediaci prostředí kontaminovaném tímto kovem,

kterých vzhledem k pravděpodobnému brzkému (desetiletí) využívání thoria v energetice bude rychle přibývat.

Já jsem se ve své práci zaměřila pouze na jeden druh tabáku *Nicotiana glutinosa* L. Tento druh byl vybrán na základě pilotního pokusu, který provedl Dr. Soudek (Soudek et al. 2013) na několika druzích a kultivarech tabáku, u nichž sledoval jejich schopnost akumulovat thorium. Námí vybraný druh *N. glutinosa* v této pilotní práci vyšel z hlediska akumulace thoria v rostlinné stélce přibližně uprostřed všech sledovaných druhů a kultivarů. Nejedná se tedy o hyperakumulující druh, ale ani o druh, který se vyhýbá akumulaci thoria. Tento druh tak může modelovat nejčastěji se vyskytující reakci různých druhů rostlin na přítomnost thoria v životním prostředí. Pilotní práce Soudka et al. (2013) byla ale zaměřená pouze na akumulaci schopnosti rostlin, ovšem pro přesné pochopení reakce rostlin na přítomnost thoria, je nutné také sledovat, jaký vliv má thorium na fyziologii rostlin. Vzhledem k tomu, že práce Soudka et al. (2013) potvrdila, že různé genotypy rostlin tabáku reagují na přítomnost thoria v médiu jeho rozdílnou akumulací, tak rostliny tabáku představují ideální skupinu rostlin, pro sledování jejich reakce na stres vyvolaný akumulací tohoto radionuklidu.

Předložená diplomová práce je první prací, která se zabývá sledováním vlivu thoria na fyziologii rostlin – resp. sledováním fotosyntetických parametrů (obsah fotosyntetických pigmentů a fluorescenční parametry) a detekcí oxidativního stresu (specifická aktivita vybraných antioxidantních enzymů a akumulace volného prolinu) u rostlin vystavených thoriumu. Sledování těchto stresových markerů tak představuje hlavní přínos této práce. Nicméně je nutné provést další experimenty, které by byly věnovány vlivu thoria na další druhy rostlin a zejména práce zaměřené na sledování dalších stresových markerů, jako jsou např. aktivita SOD, obsah cysteinů nebo glutathionů. Zejména pak sledování aktivity SOD nebo sledování odpadních produktů peroxidace lipidů – malondialdehyd a hexanalnebo 4-hydroxy-2-nonenal, v buňkách by nám daly lepší představu o vzniku oxidativního stresu v rostlinách. Též je možno se zaměřit na strukturální analýzu pletiv rostlin ovlivňovaných thoriumem.

6. Závěr

Již dnes je důležité zvyšovat povědomí o možné kontaminaci prostředí thoriem v blízké budoucnosti. Thorium má velký potenciál, pro využití v jaderné energetice (dnes se předpokládá, že jeho využívání začne v průběhu příštích dvou desetiletí), ale zároveň se jedná o radioaktivní prvek, který ohrožuje zdraví zvířat i lidí. Proto je důležité sledovat, jakým způsobem se rostliny vyrovnávají s thoriem – jak ho akumulují a jak se vyrovnávají se stresem, který thorium způsobí.

Dnes očekáváme, že k největším kontaminacím půd thoriem bude docházet v rozvojových zemích jako je Čína, Indie nebo Brazílie, které mají velké nerostné bohatství tohoto kovu. Ovšem v těchto zemích jsou již dnes půdy kontaminované nejrůznějšími těžkými kovy a kontaminace způsobená thoriem tak povede pouze ke zhoršení již tak špatných podmínek. Například Indie je jedním z předních míst ve výrobě železné rudy (Banerjee et al. 2016), a spolu s Čínou mají největší textilní průmysl, který je jedním z předních zdrojů kontaminace životního prostředí těžkými kovy.

Tato práce měla snahu ukázat schopnost běžných rostlin (nikoliv hyperakumulátorů) akumulovat thorium a dále jsem se pokusila naznačit, jak bude akumulace thoria ovlivněna dalšími modifikacemi média, které by již mohly být využívány během fytořemediací kontaminovaných prostředí. Dalším cílem této práce bylo ukázat, jak rostliny reagují a jestli vůbec reagují na thorium změnou jejich fyziologie, resp. změnou fotosyntetických parametrů a vznikem oxidativního stresu.

Splnění cílů diplomové práce:

4. Vyhodnotit vliv sledovaných faktorů ošetření (fosfátová výživa, přidání kyseliny vinné do média a postřik putrescinem) na akumulaci Th v rostlinách *Nicotiana glutinosa* (L.) a jejich orgánech.

Rostliny tabáku *Nicotiana glutinosa* thorium přijímají, ale jeho akumulace rostlinami byla ovlivněna různými modifikacemi média. Jednoznačně největší vliv na příjem a akumulaci thoria rostlinami měla přítomnost, resp. nepřítomnost fosfátů v médiu. Jejich přítomnost v médiích totiž vedla k tvorbě $\text{Th}(\text{PO}_3)_4$ komplexů, které jsou ve vodě špatně rozpustné. Takto navázané thorium se pro rostliny stává špatně dostupné. Z tohoto důvodu rostliny rostoucí v médiích s deficiencí fosforu akumulovaly přibližně 10x více thoria než tyto rostliny rostoucí

v médiích s optimální výživou. K tomuto zvýšení akumulace thoria došlo pouze v kořenech, translokace do nadzemních částí rostlin zůstala neovlivněná. Zajímavé ale bylo zjištění, že přítomnost kyseliny vinné ani exogenní aplikace putrescinu na listy tabáku neměla průkazný vliv na příjem thoria rostlinami.

Nicméně jsme zjistili, že exogenní aplikace putrescinu na listy, ačkoliv neměla průkazný vliv na příjem thoria kořeny rostlin, tak měla významný vliv na jeho translokaci do nadzemní biomasy rostlin, zejména pak na akumulaci thoria v listech rostlin tabáku. Překvapivým zjištěním pro mě ale bylo, že kyselina vinná neměla žádný vliv na akumulaci a translokaci thoria v rostlinách, ačkoliv jsem předpokládala, že podpoří jeho příjem rostlinami tabáku. Tento cíl považuji za splněný.

5. Vyhodnotit odpověď *Nicotiana glutinosa* (L.) na přítomnost Th v médiu na úrovni fyziologických markerů:

- obsahu vody v rostlinách
- vybraných parametrů fotosyntetického aparátu
- detekce oxidativního stresu

Obsah vody byl ve všech třech provedených experimentech značně závislý na všech okolních podmínkách prostředí. Z důvodu nekonzistentnosti výsledků jsem tedy nebyla schopná zhodnotit, jaký vliv měla přítomnost thoria a dalších modifikací v médiích na obsah vody v listech tabáku.

Překvapujícím výsledkem potom bylo naměřené vyšší množství fotosyntetických pigmentů (chlorofylů a karotenoidů) v listech rostlin rostoucích v médiích obohacených o thorium oproti rostlinám thoriem neovlivněných. V závislosti na těchto výsledcích jsem usoudila, že množství thoria, které bylo použito, rostliny spíše stimuloval k vyšší tvorbě fotosyntetických pigmentů. Na rozdíl od fotosyntetických pigmentů jsem v případě fluorescenčních parametrů naměřila pokles obou hodnot vybraných parametrů (F_v/F_m a F_v/F_o). Nicméně tento pokles u rostlin stále nesignalizoval stres, resp. hodnoty fluorescence stále dosahovaly hodnot typických pro nestresované rostliny.

Stres způsobený thoriem způsobil změnu specifické aktivity enzymů CAT, PX a GST. V případě katalázy byl vidět trend vyšší aktivity ve stoncích a v kořenech rostlin rostoucích

v přítomnosti thoria, ovšem v listech byla pozorována nižší aktivita tohoto enzymu. Specifická aktivita PX vykazovala jednak trend vyšší aktivity v kořenech rostlin rostoucích v přítomnosti thoria a dále průkazně nižší aktivitu tohoto enzymu ve stoncích a listech rostlin tabáku rostoucích opět za přítomnosti thoria. V případě specifické aktivity enzymu GST došlo k poklesu jeho aktivity ve všech orgánech rostlin rostoucích v přítomnosti thoria, ale pouze v případě kořenů a listů byl tento pokles významný.

Oxidativní stres jsme dále měřili prostřednictvím akumulace volného prolinu. V kořenech i v listech rostlin tabáku došlo ke zvýšení akumulace prolinu, ale průkazné zvýšení jeho množství bylo zjištěno pouze v kořenech. Tento cíl opět považuji za splněný.

6. Vyhodnotit, jak bude odpověď rostliny na Th na úrovni fyziologických markerů ovlivněna různými faktory ošetření rostlin (fosfátová výživa, přidání kyseliny vinné do média a postřik putrescinem)

Ačkoliv měl fosfor velký vliv na akumulaci thoria rostlinami tabáku, tak jsem u těchto rostlin nepozorovala téměř žádné významné rozdíly ve fyziologických parametrech, které jsem sledovala. Jediný významný rozdíl, který jsem pozorovala, byl ve specifické aktivitě APX, která byla u rostlin rostoucích v P-deficientním médiu, nezávisle na přítomnosti resp. nepřítomnosti thoria výrazně vyšší, než u rostlin rostoucích v médiích s optimální fosfátovou výživou. Žádný významný vliv nebyl zjištěn ani u rostlin rostoucích v přítomnosti kyseliny vinné.

Exogenní aplikace putrescinu vedla k vyšší translokaci thoria do nadzemní biomasy, což mělo jednoznačný vliv pouze na fluorescenci. V případě obou sledovaných fluorescenčních parametrů totiž došlo ke snížení jejich hodnot a v případě rostlin zároveň rostoucích v deficienci fosforu, parametr F_v/F_o dosáhl hodnot běžně udávaných pro stresované rostliny. Dále také můžeme sledovat trend vyšší aktivity GST ve všech orgánech rostlin a trend vyšší aktivity PX v listech a stoncích rostlin, na jejichž listy byl putrescin stříkán.

Modifikace médií zřejmě neměly zvlášť významný vliv na reakci rostlin. Významný vliv byl zjištěn pouze v případě deficiencie fosforu, které vedla k vyšší akumulaci thoria rostlinami a také k vyšší specifické aktivitě APX. Stanovený cíl považuji za splněný.

Seznam citované literatury:

- Al-Baldawi I. A., Abdulwahab I. A., Anuar S. R. S., Suja N., Mushrifah I. (2015): Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel-contaminated water using *Scirpus grossus*. *Ecological Engineering* 74 : 463-473.
- Andrezza R., Bortolon L., Pienitz S., Giacometti M., Roehrs D. D., Lambais M. R., Camargo F. A. O. (2011): Potential phytoextraction and phytostabilization of perennial peanut on copper-contaminated vineyard soils and copper mining waste. *Biological Trace Element Research* 3: 1729-1739.
- Ashley S. F., Fenner R. A., Nuttali W. J., Parks G. T. (2015): Life-cycle impacts from novel thorium-uranium-fuelled nuclear energy systems. *Energy Conversion and Management* 101: 136-150.
- ATSDR (1990): Toxicological profile for thorium [p. 1-186].
- ATSDR (1999): Public health statement ionizing radiation [p. 1-15].
- Ayala A. et al. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 6: 1-31.
- Bae H., Kim S. H., Kim M. S., Sicher R. C., Lary D., Strem M. D., Natarajan S., Bailey B. A. (2008): The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 174-188.
- Baek S. A., Han T., Ahn S. K., Kang H., Cho M. R., Lee S. C., Im K. H. (2012): Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*. 28: 446-452.
- Baker A. J. M. (1981): Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metal. *Journal of Nutrition* 3: 643-654.
- Bankaji I., Cacador I., Sleimi N. (2016): Assessing of tolerance to metallic and saline stresses in the halophyte *Suaeda fruticosa*: The indicator role of antioxidative enzymes. *Ecological Indicators* 64: 297-308.
- Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. (1973): Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39: 205-207.
- Bhattacharya T., Chakraborty S., Banerjee D. K. (2010): Heavy metal uptake and its effect on macronutrients, chlorophyll, protein, and peroxidase activity of *Paspalum distichum* grown on sludge-dosed soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 169: 15-26.
- Bidwell 1979 (cit. dle Chettri M. K., Cook C. M., Vardaka E. Sawides T., Lanaras T. (1998): The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens: *Cladonia convolute* and *Cladonia rangiformis*. *Plant Physiology and Chemistry* 32: 561-570).
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Campos N. V., Araújo T. O., Silva S. A., Silva L. F., Azevedo A. A., Nesi A. N. (2016): Arsenic hyperaccumulation induces metabolic reprogramming in *Pityrogramma calomelanos* to reduce oxidative stress. *Physiologia plantarum* 157: 135-146.
- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M. H., Ferjani E. E. (1997): Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139-147.
- Chen C. T., Chen L. M., Lin C. C., Kao C. H. (2001): Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science* 160: 283-290.
- Chen S. B., Zhu Y. G., Hu Q. H. (2005): Soil to plant transfer of ²³⁸U, ²²⁶Ra and ²³²Th on a uranium mining-impacted soil from southeastern China. *Journal of Environmental Radioactivity* 82: 223-236.
- Chettri M. K., Cook C. M., Vardaka E. Sawides T., Lanaras T. (1998): The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens: *Cladonia convolute* and *Cladonia rangiformis*. *Plant Physiology and Chemistry* 32: 561-570.

- De Ronde J. A., Cress W. A., Krüger G. H. J., Strasser R. J., Van Staden J. (2004): Photosynthetic response of transgenic soybean plants, contacting an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology* 161: 1211-1224.
- Deng X., Xia Y., Hu W., Zhang H., Shen Z. (2010): Cadmium-induced oxidative damage and protective effects of N-acetyl-L-cysteine against cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. *Journal of Hazardous Materials*. 180: 722-729.
- Dias O., Approbato A. U., Legracie J. R., Martinez C. A. (2012): Soil-nutrient availability modifies the response of young pioneer and late successional trees to elevated carbon dioxide in a Brazilian tropical environment. *Environmental and Experimental Botany* 77: 53-62.
- Drotar A., Phelps P., Fall R. (1985): Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* 42: 35-40.
- Erdei S., Hegedus A., Hauptmann G., Szalai J., Horvát G. (2002): Heavy metal induced physiological changes in the oxidative response system. *Acta Biologica Szegedinsis* 46: 89-90.
- Evseeva T. I., Geraskin S. A., Belykh E. S., Maistrenko T. A., Brown J. E. (2011): Assessment of the reproductive capacity of *Pinus sylvestris* trees growing under conditions of chronic exposure to radionuclides of uranium and thorium series. *Russian Journal of Ecology* 42: 382-387.
- Fry C., Thoennessen M. (2013): Discovery of actinium, thorium, protactinium, and uranium isotopes. *Atomic Data and Nuclear Data Tables* 99: 345-364.
- Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121: 151-159.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Goliáš V. (2002): Thorium occurrences in the Czech Republic and their mineralogy. *Uranium deposits, Czech Geological Survey* [p. 53-56].
- Groppa M. D., Tomaro M. L., Benavides M. P. (2007): Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium and copper-treated wheat leaves. *BioMetals* 20: 185-195.
- Grotto D, Santa Maria L., Valentini J, Paniz C, Schmitt G., Garcia S. C. (2009): Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova* 32: 169-174.
- Guo P., Jia X., Duan T., Xu J., Chen H. (2010): Influence of plant activity and phosphates on thorium bioavailability in soils from Baotou area, Inner Mongolia. *Journal of Environmental Radioactivity* 101: 767-772.
- Gutteridge J. M. C. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41: 1819-1828.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 25: 7130-7139.
- Hafez a Ramadan 2002 (cit. dle Shtangeeva I., Lin X., Tuerler A., Rudneva E., Surin V., Henkelmann R. (2006): Thorium and uranium uptake and bioaccumulation by wheat-grass and plantain. *Forest Snow and Landscape Research* 80: 181-190).
- Hall B. L., Henderson G. M. (2001): Use of uranium-thorium dating to determine past ¹⁴C reservoir effects in lakes: examples from Antarctica. *Earth and Planetary Science Letters* 193: 565-577.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219: 1-14.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *American Society of Plant Biologists* 141: 312-322.

- Hare P. D., Cress W. A., Van Standen J. (2001): The effects of exogenous proline and proline analogues on in vitro shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* 34: 203-207.
- Hinton T. G., Knox A. S., Kaplan D. I., Sharitz R. (2005): Phytoextraction of uranium and thorium by native trees in a contaminated wetland. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 264: 417-422.
- Hoagland D. R., Arnon D. I. (1938): Synthetic media for hydroponic culture. *Circular, California agricultural experiment station* 347: 35-37.
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Horovitz C. T., Schock H. H., Horovitz-Kisimova L. A. (1974): The content of scandium, thorium, silver, and other trace elements in different plant species. *Plant and Soil* 40: 397-403.
- Huang J. W., Blaylock M. J., Kapulnik Y., Ensley B. D (1998): Phytoremediation of uranium-contaminated soils: Role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environmental Science & Technology* 32: 2004-2008.
- IAEA (2013): Climate change and nuclear power. [p. 79-82].
- Iannelli M. A., Pietrini F., Fiore L., Petrilli L., Massacci A. (2002): Antioxidant response to cadmium in *Pragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 977-982.
- Inskeep W. P. A, Bloom P. R. (1985): Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiology*, 77: 483-485.
- Jagetiya B. L., Purhoit P. (2006): Effect of various concentrations of uranium tailings on certain growth and biochemical parameters in sunflower. *Biologia* 61: 103-107.
- Jia L., Liu Z., Chen W., Ye Y., Yu S., He X. (2014): Hormesis effects induced by cadmium in growth and photosynthetic performance in a hyperaccumulator, *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Plant Growth Regulation* 34: 13-21.
- Kafka Z., Punčochářová J. (2002): Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chemické Listy* 96: 611-617.
- Kalaji H. M., Loboda T. (2007): Photosystem II of barely seedlings under cadmium and lead stress. *Plant Soil Environment* 53: 511-516.
- Khan N. A., Samiullah S., Singh S., Nazar R. (2007): Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and crop science* 193: 435-444.
- Kötschau A., Büchel G., Einax J. W., Tümping W., Merten D. (2014): Sunflower (*Helianthus annuus*): phytoextraction capacity for heavy metals on a mining-influenced area in Thuringia, Germany. *Environmental Earth Sciences* 72: 2023-2031.
- Ku H. M., Tan C. W., Su Y. S., Chiu C. Y., Chen C. T., Jan F. J. (2012): The effect of water deficit and excess copper on proline metabolism in *Nicotiana benthamiana*. *Biologia Plantarum* 56: 337-343.
- Kuchma O., Vornam B., Finkeldey R. (2011): Mutation rates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers. *Mutation Research* 725: 29-35.
- Kučerová P., Macková M., Macek T. (1999): Perspektivy fytořediacie při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chemické listy* 93:19-26.
- Lee J. G., Morel F. M. M. (1995): Replacement of zinc by cadmium in marine phytoplankton. *Marine ecology progress series* 127: 305-309.
- Lee M., Yang M. (2010): Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 173: 589-596.

- Lichtenthaler H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- Lichtenthaler H. K., Langsdorf G., Lenk S., Buschmann C. (2005): Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43: 355-369.
- Liu Z., Zhang X. Z., Miao J., Huang L. K., Frazier T., Zhao B. Y. (2014): Evaluation of salinity tolerance and genetic diversity of thirty-three Switchgrass (*Panicum virgatum*) populations. *Bioenergy research* 7: 1329-1342.
- Lopéz-Millán A. F., Morales F., Abadía A., Abadía J. (2001): Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *Physiologia Plantarum* 112: 31-38.
- Marco F., Alcázar R., Tiburcio A. F., Carrasco P. (2011): Interaction between polyamines and abiotic stress pathway responses unraveled by transcriptome analysis of polyamine overproducers. *Journal of Integrative Biology* 15: 775-781.
- Marin J. A., Andreu P., Carrasco A., Arbeloa A. (2010): Determination of proline concentration, an abiotic stress marker, in root exudates of excised root cultures of fruit tree rootstocks under salt stress. *Revue des Régions Arides* 24: 722-727.
- Martins L. L., Mourato M. P., Cardoso A. I., Pinto A. P., Mota A. M., Goncalves M. L. S., Varennes A. (2011): Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1375-1383.
- Matveyeva I., Jačimovič R., Planinšek P., Smodiš B., Burkibayev M. (2016): Uptake of uranium, thorium and radium isotopes by plants growing in dam impoundment Tasotkel and the Lower Shu region (Kazachstan). *Radiochimica Acta* 104: 51-57.
- Matysik J., Bhalu B., Mohanty P. (2002): Molecular mechanisms of Quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants 82: 525-532.
- McBride J. F. (1962): Flora of Peru, *Solanaceae*. Field museum of natural history, botanical series 13 (1): 267.
- McGrath S. P., Zhao F. J. (2003): Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 277-282.
- Mihalík J., Tlust'oš P., Szaková J. (2010): Comparison of willow and sunflower for uranium phytoextraction induced by citric acid. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 285: 279-285.
- Mihalík J., Henner P., Frelon S., Camilleri V., Février L. (2012): Citrate assisted phytoextraction of uranium by sunflowers: Study of fluxes in soils and plants and resulting *intra-planta* distribution of Fe and U. *Environmental and Experimental Botany* 77: 249-258.
- Mihucz V. G., Varga Z., Tatár E., Vigár I., van Grieken R., Koleszár Z., Záray G. (2008): Redistribution of uranium and thorium by soil/plant interaction in a recultivated mining area. *Microchemical Journal* 90: 44-49.
- Minocha R., Majumdar R., Minocha S. S. (2014): Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Plant Science* 5: 1-17.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. V. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9: 490-198.
- Møller I. M., Jensen P. E., Hansson A. (2007): Oxidative modification to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Mora c., Tittensor D. P., Adl S., Simpson A. G. B., Worm B. (2011): How many species are there on Earth and in the Ocean? *PLOS Biology* 9: 1-8.
- Morton L. S., Evans C. V., Estes G. O. (2002): Natural uranium and thorium distributions in podzolized soils and native blueberry. *Journal of Environmental Quality* 31: 162-167.
- Musílek L. (2012): Ionizující záření kolem nás – proč je člověk vystaven radiaci po celý život. Dostupné na: <http://atominfo.cz/2012/02/ionizujici-zareni-kolem-nas-proc-je-clovek-vystaven-radiaci-po-cely-zivot/>.

- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kabukari Y., Shinozaki K., Y., Schinozaki K. (1999): Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 461: 205-210.
- Naser Karimi L., Khanahmadi M., Moradi B. (2012): Accumulation and phytotoxicity of lead in *Cynara scolymus*. *Indian Journal of Science and Technology* 11: 3634-3641.
- Nepovím A., Podlípna R., Soudek P., Schröder P., Vaněk T. (2004): Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere* 57: 1007-1015.
- Nuttin A., Heuer D., Billebaud A., Brissot R., Le Brun C., Liatard E., Loiseaux J. M., Mathieu L., Meplan O., Merle-lucotte E., Niefenecker H., Perdu F. (2005): Potential of thorium molten salt reactors detailed calculations and concept evolution with a view to large scale energy production. *Progress in Nuclear Energy* 46: 77-99.
- Oufuni L., Taj S., Manaut B., Eddouks M. (2011): Transfer of uranium and thorium from soil to different parts of medicinal plants using SSNTD. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 287: 403-410.
- Patniak P. (2003): *Handbook of inorganic chemicals*. [p. 927-931].
- Pavlová L. (2005): *Fyziologie rostlin*. Nakladatelství Karolinum, Praha [p. 130-159].
- Piexoto H. P., Da Matta F. M., Da Matta J. C. (2002): Responses of the Photosynthetic apparatus to aluminium stress in two *Sorghum* cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 25: 821-832.
- Pitter P. (1999): *Hydrochemie*. Nakladatelství VŠCHT, Praha [p. 75-162].
- Porra R. J., Thompson W. A., Kriedemann P. E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standart by atomic absorption spectroscopy. *Biochemica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 975: 384-394.
- Qiao X., Wang P., Shi G., Yang H. (2015): Zinc conferred cadmium tolerance in *Lemna minor* L. via modulating polyamines and proline metabolism. *Plant Growth Regulation* 77:1-9.
- Ragheb M. (2011): Thorium resources in rare earth elements [p. 1-54].
- Rascio N., Navari-Izzo F. (2011): Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180: 169-181.
- Roháček K (2002): Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29.
- Roos P., Jakobsen I. (2008): Arbuscular mycorrhiza reduces phytoextraction of uranium, thorium and other elements from phosphate rock. *Journal of Environmental Radioactivity* 99: 811-819.
- Saat A., Kamsani A. S., Karmi W. N. A. N., Talib N. H. M., Wood A. K., Hamzah Z. (2015): Potential of *Melastoma malabathricum* as bio-accumulator for uranium and thorium from soil. *Advancing of Nuclear Science and Energy for National Development* 1659: 1-8.
- Saenen E., Horemans N., Vandhoudt N., Vandenhove H., Biermans G., van Hees M., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A. (2013): Effects of pH on uranium uptake and oxidative stress responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 2125-2133.
- Saenen E., Horemans N., Vandhoudt N., Vandenhove H., Biermans G., van Hees M., Wannijn J., Vangronsveld j., Cuypers A. (2014): The pH strongly influences the uranium-induced effects on the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 82:254-261.
- Saenen E., Horemans N., Vandhoudt N., Vandenhove H., Biermans G., van Hees M., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A. (2015): Oxidative stress responses induced by uranium exposure at low in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Environmental Radioactivity* 150: 36-43.
- Saffar A. Najjar M. B. B., Mianabadi M. (2009): Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Sciences* 9: 44-50.

- Sahr T., Voigt G., Paretzke H. G., Schramel P., Ernst D. (2004): Caesium-affected gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 165: 747-754.
- Sakakibara M., Watanabe A., Inoue M., Sano S., Kaise T. (2010): Phytoextraction and phytovolatilization of arsenic from As-contaminated soils by *Pteris vittata*. *Proceedings of the annual international conference on soils, sediments, water and energy* 12: 267-272.
- Sathyapriya R. S., Nair S., Kamesh V., Prabhath R. K., Nair M., Acharya R., Rao D. D. (2012): Estimation of thorium intake due to consumption of vegetables by inhabitants of high background radiation area by INAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 294: 387-390.
- Saxena A. K., Vagiswari A., Manjula M. (1991): Optical glass: Its Manufacture in India – a historical perspective. *Indian Journal of History of Science* 26: 219-232.
- Schat H., Sharma S. S., Vooijs R. (1997): Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101: 477-482.
- Shah K., Kumar R. G., Verma S., Dubbey R. S. (2001): Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161: 1135-1144.
- Sharma P., Pandey S. (2014): Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation* 2: 178-191.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360: 1-16.
- Shtangeeva I., Ayrault S. (2004): Phytoextraction of thorium soil and water media. *Water, Air, and Soil Pollution* 154: 19-35.
- Shtangeeva I., Ayrault S., Jain J. (2005): Thorium uptake by wheat at different stages of plant growth. *Journal of Environmental Radioactivity* 81: 283-293.
- Shtangeeva I., Lin X., Tuerler A., Rudneva E., Surin V., Henkelmann R. (2006): Thorium and uranium uptake and bioaccumulation by wheat-grass and plantain. *Forest Snow and Landscape Research* 80: 181-190.
- Silva P., Matos M. (2016): Assessment of the impact of aluminium on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 131: 151-156.
- Smith S. E., Smith F. A., Jakobsen I., (2004): Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162: 511-524.
- Skórzynska-Polit E., Drażkiewicz M., Krupa Z. (2010): Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 169-175.
- Soudek P., Petrová Š., Vaňková R., Mihaljevič M., Vaněk T. (2013): Composition of hydroponic medium affects thorium uptake by tobacco. *Chemosphere* 92: 1090-1098.
- Soudek P., Kufner D., Petrová Š., Vaňková R., Song J., Vaněk T. (2014): Accumulation of heavy metals using *Sorghum* sp. *Chemosphere* 104: 15-24.
- Spitteler G. (2003): The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiologia Plantarum* 119: 5-18.
- Srivastava S., Bhainsa K. C., D'Souza S. F. (2010): Investigation of uranium accumulation potential and biochemical responses of an aquatic weed *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Bioresource Technology* 101: 2573-2579.
- Stahl W., Sies H. (2003): Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of Medicine* 24: 345-351.
- Strasser R. J., Srivastava A., Michael M. T. (2000): The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaption* 445-483.

- Suchara I., Sucharová J., Holá M. (2007): Bio-monitoring of the atmospheric deposition of elements in the czech republic results of the international bio-monitoring programme 2000. *Acta Pruhonica* 87: 80-82.
- Thomas A. L., Henderson G. M., Deschamps P., Yokoyama Y., Mason A. J., Bard E., Hamelin B., Durand N., Camoin G. (2009): Penultimate deglacial sea-level timing from uranium/thorium dating of Tahitian corals. *Science* 324: 1186-1189.
- Trotta A., Falaschi P., Cornara L., Minganti V., Fusconi A., Drava G., Berta G. (2006): Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the As hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Chemosphere* 65: 74-81.
- Ünak T., Yildirim Y., Tokucu G., Ünak G., Öcal J., Konyali D., Kilic S. (2007): Study of the effect of uranium and thorium on the growing of pepper (*Capsicum annuum* var. *longum*) and cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 273: 763-766.
- Van Hoewyk D., Takahashi H., Inoue E., Hess A., Tamaoki M., Pilon-Smith E. A. H. (2007): Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 132: 236-253.
- Vanacker H., Carver T. L. W., Foyer C. H. (1998): Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barely leaves. *Plant Physiology* 117: 1103-1114.
- Vandenhove H., Cuypers A., Van Hees M., Koppen G., Wannijn J. (2006): Oxidative stress reaction induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 795-805.
- Vaněk T., Soudek P., Tykva R., Kališová I. (2002): Možnosti využití fytořemediace pro odstranění kontaminace způsobené toxickými kovy a radionuklidy. Dostupné na: www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/zahlazovani/Z07_P_07.htm.
- Vanhoudt N., Horemans N., Biermans G., Saenen E., Wannijn J., Nauts R., Van Hees M., Vandenhove H. (2014): Uranium affects photosynthetic parameters in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 97: 22-29.
- Verma S., Dubey R. S. (2003): Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- Vranová E., Atichartpongkul S., Villaroel R., Montagu M. V., Inzé D., Camp W. V. (2002): Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10870-10875.
- Wang H., Feng T., Peng X., Yan M., Tang X. (2009): Up-regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1354-1362.
- Wang D., Zhou S., Liu L., Du L., Wang J., Huang Z., Ma L., Ding S., Zhang D., Wang R., Jin Y., Xia C. (2015): The influence of different hydroponic conditions on thorium uptake by *Brassica juncea* var. *foliosa*. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 6941-6949.
- Wellburn A. R. (1994): The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology* 144 (3): 307-313.
- Wu et. al 1998 (cit. dle Chen C. T., Chen L. M., Lin C. C., Kao C. H. (2001): Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science* 160: 283-290).
- World Nuclear Association, dostupné na: <http://www.world-nuclear.org/>
- Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Shinozaki K. Y., Schinozaki K., Yoshida Y. (2005): Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 1975-1981.
- Yamauchi Y., Furutera A., Seki K., Toyoda Y., Tanaka K., Sugimoto Y. (2008): Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 786-793.

- Yang M., Jawitz J. W., Lee M. (2015): Uranium and cesium accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) and its potential for uranium rhizofiltration. *Journal of Environmental Radioactivity* 140: 42-49.
- Zararsiz A., Kirmaz R., Önertoy S., Arıkan P. (1997): A case study on uptake of thorium from soil to plant by using X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 221: 173-177.
- Zhang F. Q., Wang Y. S., Lou Z. P., Dong J. D. (2007): Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere* 67: 44-50.
- Zhao F., McGrath S. P., Crosland A. R. (1994): Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulfur by inductively-coupled plasma-atomic emission-spectroscopy (ICP-AES). *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 25: 407-418.
- Zhou S., Kai H., Zha Z., Fang Z., Wang D., Du L., Zhang D., Feng X., Jin Y., Xia C. (2016): Subcellular distribution and chemical forms of thorium in *Brassica juncea* var. *foliosa*. *Journal of Environmental Radioactivity* 157: 60-66.
- Žurek G., Rybka K., Pogrzeba M., Krzyżak J., Prokopiuk K. (2014): Chlorophyll a fluorescence in evaluation of the effect of heavy metal soil contamination on perennial grasses. *PLOS One* 9: 1-10.