

## MECHANISMY SNIŽUJÍCÍ TOXICITU RIZIKOVÝCH PRVKŮ U ROSTLIN

JAN FIŠER, MARTINA NOVÁKOVÁ a TOMÁŠ MACEK

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha  
fiserj@vscht.cz*

Došlo 17.4.13, přijato 22.7.13.

Klíčová slova: stres, těžké kovy, rostliny, tolerance, rezistence, akumulace

### Obsah

1. Úvod
2. Mechanismy ovlivňující vstup rizikových prvků do rostlin
  - 2.1. Kořenové exudáty
  - 2.2. Půdní mikroorganismy
  - 2.3. Plasmatická membrána a membránové transportéry
3. Mechanismy detoxikace rizikových prvků v rostlinných buňkách
  - 3.1. „Heat shock“ proteiny
  - 3.2. Fytochelatiny
  - 3.3. Metalothioneiny
  - 3.4. Organické kyseliny a aminokyseliny
4. Závěr

### 1. Úvod

Minerální látky hrají ve výživě rostlin důležitou roli. Rostliny je získávají v podobě iontů především absorpcí kořeny z půdního roztoku. Malá část může být také absorbována listy z ulpělých prachových částic a dešťové vody<sup>1</sup>. Některé rostliny přijímají minerální látky a ostatní živiny i jinými způsoby (rostliny holoparazitické, hemiparazitické a masožravé). Těžké kovy jako např. Cu a Zn jsou esenciální pro zdravý růst a vývoj rostlin. Avšak zvýšená koncentrace těchto kovů a neesenciálních chemických prvků vede k toxickým symptomům a inhibici růstu většiny rostlin<sup>2</sup>. Příkladem rostlin, které se dokázaly přizpůsobit širokému spektru stresových podmínek, jsou tzv. halofyty. Vedle tolerance k vysoké koncentraci iontů Na<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup>,

suchu, horku, chladu, mrazu jsou odolné také ke zvýšené koncentraci těžkých kovů<sup>3</sup>.

Rizikové prvky (těžké kovy a toxické metaloidy) v rostlinách indukují tvorbu reaktivních forem kyslíku a to buď přímo Haberovou-Weissovou reakcí nebo nepřímo jako důsledek jejich toxicity (interakce kovů s antioxidačním systémem rostlinných buněk, narušení elektronového transportního řetězce nebo interakce s metabolismem esenciálních prvků)<sup>4</sup>.

Většina rostlin rostoucích na stanovištích se zvýšeným obsahem rizikových prvků disponuje mechanismy omezujícími vstup kovu do rostliny nebo mechanismy účinné detoxikace kovu v kořenech s minimálním následným přenosem do nadzemních částí. Existují však také hypertolerantní druhy rostlin nazývané hyperakumulátory<sup>5</sup>, které aktivně transportují rizikové prvky ze zeminy do nadzemních částí a akumulují je tam v koncentracích 100 až 1000krát vyšších oproti nehyperakumulujícím druhům a koncentraci v zemině<sup>6</sup>. Hyperakumulátory nejčastěji detoxikují ionty rizikových prvků vazbou na ligand a následným uložením ve vakuole.

Tento referát je zaměřen na shrnutí základních mechanismů, které rostliny využívají k ochraně proti stresu způsobeným rizikovými prvky. Zprvu jsou zmíněny faktory působící v okolí rostlinných kořenů. Kořenové exudáty vylučované rostlinami a půdní mikroorganismy mohou významně ovlivnit dostupnost rizikových prvků pro rostliny a tím jejich toxicitu. Další kapitola je věnována plasmatické membráně. Ta tvoří osmotické rozhraní buňky a má tak rozhodující vliv na vstup rizikových prvků do buňky, resp. rostliny. Kapitola o „heat shock“ proteinech (HSP) zmiňuje jejich možnou roli v ochraně proteinů a membrán při stresu rizikovými prvky. Poslední tři kapitoly patří mechanismům detoxikace iontů rizikových prvků v rostlinných buňkách.

### 2. Mechanismy ovlivňující vstup rizikových prvků do rostlin

#### 2.1. Kořenové exudáty

Rostliny vylučují kořeny množství látek ve formě tzv. kořenových exudátů. Jejich složení se velmi liší v závislosti na rostlinném druhu a přírodních podmínkách. Kořenové exudáty jsou tvořeny především sloučeninami odvozenými od produktů fotosyntézy a dále pak ionty H<sup>+</sup>, anorganickými ionty a vodou<sup>7</sup>.

Exkrece exudátů z kořenů klesá s věkem rostliny a zvyšuje se při stresu, jako je např. nedostatek životního prostoru, živin nebo suchu. Jejich uvolňování je tedy ovlivňováno půdní ekologií a vývojovými fázemi rostlin.

Tenká vrstva půdy přímo ovlivňovaná aktivitou kořenů se nazývá rhizosféra. Kořenové exudáty se mohou účastnit rhizosférických procesů jako získávání živin a esenciálních prvků (např. Fe a Zn)<sup>8</sup>. Je známo, že travní druhy rostlin mohou zvýšit příjem Fe mobilizací iontů  $\text{Fe}^{3+}$  pomocí fyto-sideroforů, organických sloučenin, které tyto ionty váží a vzniklé komplexy jsou následně absorbovány kořeny<sup>9,10</sup>.

Exudáty však také mohou přispívat k toleranci rostlin k rizikovým prvkům. Např. kationt  $\text{Al}^{3+}$  je toxický pro mnoho rostlin rostoucích v kyselé půdě již v mikromolárních koncentracích. Některé rostliny detoxikují ionty  $\text{Al}^{3+}$  uvolňováním organických kyselin z kořenů. Citrát, oxalacetát a malát jsou jedny z běžně vylučovaných organických kyselin tvořící stabilní a netoxické komplexy s  $\text{Al}^{3+}$ . Vylučování malátu bylo např. popsáno u pšenice seté (*Triticum aestivum*), vylučování citrátu u fazolu obecné (*Phaseolus vulgaris*) a oxalacetátu u pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*). Některé rostliny uvolňují i několik organických kyselin současně<sup>11</sup>.

Podobný mechanismus byl objeven i u kultivaru rýže (*Oryza sativa*) tolerantního k Pb. Ta uvolňuje ve svých kořenových exudátech kyselinu šťavelovou, která může snížit mobilitu iontů olova v rhizosféře<sup>12</sup>.

Z uvedených příkladů vyplývá, že kořenové exudáty mohou ovlivňovat absorpci prvků rostlinami změnou fyzikálního a chemického charakteru prostředí rhizosféry jako např. změnou pH v rhizosféře, chelatací a komplexací rizikových prvků<sup>13</sup>. Kořenové exudáty také mohou svými stimulačními či antimikrobiálními účinky ovlivnit počet a aktivitu půdních mikroorganismů, které představují významné činitele v půdních procesech<sup>14</sup>.

## 2.2. Půdní mikroorganismy

Půdní mikroorganismy hrají důležitou roli v recyklaci živin, udržování půdní struktury, detoxikaci škodlivých chemikálií, regulaci rostlinných škůdců a růstu rostlin. Kromě toho rostliny a bakterie vzájemně interagují tak, že rostlina může poskytovat specifický zdroj uhlíku bakteriím, které svou činností snižují fyto-toxicitu kontaminované zeminy<sup>15</sup>.

Rhizosférické mikroorganismy mohou svou činností měnit biologickou dostupnost rizikových prvků, a to např. uvolňováním chelatajících látek, okyselováním zeminy či změnou redoxního potenciálu zeminy<sup>16</sup>. Např. bakterie *Sphingomonas macrogoltabidus*, *Microbacterium liquefaciens* a *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, původně izolované z rhizosféry hyperakumulátoru tařinky zední (*Alyssum murale*), v důsledku okyselení půdy významně zvyšují akumulaci Ni touto rostlinou<sup>17</sup>.

Pokud je koncentrace rizikových prvků v prostředí příliš vysoká, může se jejich toxický účinek projevit i u tolerantních rostlin, jak můžeme dokumentovat na příkladu železa. Rizikové prvky totiž mohou ovlivňovat absorpci živin, a tak následně deficienci Fe v rostlinách. Nedostatek Fe se projevuje chlorosou z důvodu inhibice vývoje chloroplastů a biosyntézy chlorofylu<sup>15</sup>. Negativní vliv rizikových prvků na rostliny může být snížen přítomností

mikroorganismů tvořících komplexy Fe s mikrobiálními siderofory (látky vážící a přenášející Fe)<sup>18</sup>. Rostliny jsou schopny absorbovat tyto komplexy, které mohou sloužit jako zdroj Fe.

Mikroorganismy mohou také snížit rozpustnost iontů kovů, a tak i toxicitu, změnou redoxního stavu reakcí, při které je kov terminálním akceptorem elektronů. Kromě využívání  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{S}^0$  většinou mikroorganismů byla studována redukce  $\text{Cr}^{6+}$  na  $\text{Cr}^{3+}$ . Tuto reakci je schopna provést řada heterotrofních organismů a to buď aerobně, nebo anaerobně<sup>15</sup>. Např. bakterie *Pseudomonas maltophilia*<sup>19</sup> redukuje rozpustný a toxický  $\text{Cr}^{6+}$  na netoxický a nerozpustný  $\text{Cr}^{3+}$  a navíc minimalizuje mobilitu dalších toxických iontů, jako jsou  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Cd}^{2+}$ .

Efekt přítomných mikroorganismů se může pozitivně projevit také z hlediska koordinace produkce rostlinného ethylenu. Rizikové prvky zvyšují produkci rostlinného stresového hormonu ethylenu, který inhibuje růst kořenů. Některé bakterie obsahují enzym ACC-deaminasa, která může štěpit rostlinný prekurzor ethylenu ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu) na amoniak a  $\alpha$ -ketobutyrát a snižovat tak hladinu ethylenu ve stresovaných rostlinách. Tím je zabráněno inhibici růstu kořenů ethylenem<sup>20</sup>.

Z uvedeného vyplývá, že rhizosféra hraje klíčovou roli v příjmu, akumulaci nebo detoxikaci rizikových prvků rostlinami.

## 2.3. Plasmatická membrána a membránové transportéry

Plasmatická membrána rostlin může být považována za první bariéru a strukturu, jejíž funkce mohou být rizikovými prvky negativně ovlivněny. Poškození plasmatické membrány působením rizikových prvků nastává v důsledku oxidace proteinů a vzniku křížových vazeb u proteinů s thiolovou skupinou, inhibice klíčových membránových enzymů nebo změny složení a fluidity membránových lipidů. Vstupu iontů rizikových prvků do buňky nelze zcela zamezit, ale membránové transportéry mohou exportovat ionty z buňky ven nebo do vakuol a snížit tak jejich koncentraci v cytosolu<sup>2</sup>.

Příkladem restrikce absorpce iontů rizikových prvků kořeny vyšších rostlin je omezení příjmu arzeničnanů. V kořenech medvědky vlnatého (*Holcus lanatus*) jsou arzeničnanové ionty absorbovány stejným mechanismem jako ionty fosfátové. Genotyp tolerantní k arzeničnanu ale vykazuje mnohem nižší rychlost absorpce obou aniontů než genotyp netolerantní. Nicméně absorpce probíhá stále a nakonec může dosáhnout koncentrace arzeničnanů v rostlině vysokých hodnot<sup>21</sup>. Bylo zjištěno, že rostliny disponují několika třídami transportérů kovů účastnících se homeostázy kovů, a tak mohou hrát klíčovou roli i v toleranci rostlin k rizikovým prvkům. Mezi tyto transportéry patří např. P-ATPasy (P-type metal ATPases), Nramp (natural resistance associated macrophage protein), ZIP (zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter protein), Ctr (copper transporter), ABC (ATP-binding cas-

sette) a CDF (cation diffusion facilitator)<sup>2</sup>.

P-ATPasy fungují jako membránové pumpy řady kationtů v mnoha organismech. Mají společný enzymový mechanismus, ve kterém dochází k tvorbě fosforylovaného meziprojektu, odtud označení P-ty. Jsou rozdělovány do pěti hlavních skupin (typ 1–5), které jsou dále členěny podle jejich substrátové specifity. ATPasy z podskupiny P<sub>1B</sub> se účastní transportu těžkých kovů a někdy bývají také označovány jako CPx-ATPasy, protože ve své aminokyselinné sekvenci obsahují konzervovaný motiv Cys-Pro-Cys/His/Ser. Analýza P<sub>1B</sub> transportérů naznačila existenci dvou hlavních skupin<sup>22</sup>, a to pro monovalentní kationty Cu<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup> a divalentní kationty Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>.

Proteiny Nramp jsou vysoce konzervované membránové proteiny účastnící se transportu iontů kovů (Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> a Co<sup>2+</sup>) v řadě organismů<sup>23</sup>.

Skupina transportérů ZIP hraje důležitou roli v transportu iontů Zn<sup>2+</sup>. V rostlinách jsou schopné přenášet také Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> a Cu<sup>2+</sup> (cit.<sup>24</sup>).

Transportéry Ctr, nebo též SLC31, se nacházejí ve všech eukaryotních organismech, kde zprostředkovávají specifickou absorpci mědi<sup>25</sup>.

Přenašeče ABC jsou skupinou membránových proteinů nalezených v prokaryotních i eukaryotních organismech a mající široký rozsah transportních funkcí. Většina proteinů ABC je doprovázena hydrolýzou ATP a kromě iontů kovů transportují také cukry, lipidy, peptidy, pigmenty, xenobiotika a antibiotika. Známý jsou tři hlavní podtypy nazvané PDR (pleiotropic drug resistance proteins), MRP (multidrug resistance-associated proteins) a MDR (multidrug resistance proteins). Používané názvy jsou spíše historické a nemusí vždy odpovídat skutečné funkci transportéru<sup>26</sup>. ABC proteiny jsou přenašeči komplexů fytochelatinu-Cd a glutathion-Cd přes tonoplast do vakuol<sup>27</sup>. Transportér AtPDR8 je lokalizován na plasmatické membráně kořenových vlásků huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a podílí se na toleranci k těžkým kovům. Transgenní huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*) se zvýšenou produkcí tohoto přenašeče<sup>28</sup> je tolerantní k jinak toxické koncentraci Cd a Pb.

Skupina přenašečů CDF je také zahrnuta do transportu iontů těžkých kovů, zejména Zn, Cd a Co. Příkladem je protein ZAT z huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) indukovaný zvýšenou koncentrací Zn. Expres genu pro ZAT transportér v transgenních rostlinách vede ke zvýšení rezistence k Zn, a proto se předpokládá, že se účastní homeostázy a tolerance k Zn. Rostlina *Stylosanthes hamata*, schopná růstu v kyselé půdě s vysokou koncentrací Mn<sup>2+</sup>, disponuje transportérem CDF ShMTP1. To, že je uvedený transportér důležitý při toleranci rostlin k těžkým kovům, dokazuje fakt, že transgenní rostliny huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a kvasinky exprimující gen *ShMT-PI* jsou tolerantní k Mn<sup>2+</sup> v důsledku depozice těchto iontů do organel<sup>22</sup>.

### 3. Mechanismy detoxikace rizikových prvků v rostlinných buňkách

#### 3.1. „Heat shock“ proteiny

V případě abiotického stresu je pro přežití rostlinných buněk klíčové zachovat funkční konformaci proteinů. Proteiny tepelného šoku, neboli „Heat shock“ proteiny (HSP), se chovají jako proteinové chaperony a jsou zodpovědné za správné sbalování proteinů, jejich agregaci do funkčních multimerů, jejich translokaci a řízenou degradaci. V mnoha buněčných procesech přispívají ke stabilizaci proteinů a membrán a k udržení nativní konformace buněčných proteinů v případě expozice abiotickým stresovým faktorům. Takto mohou hrát roli i v obraně rostlin proti stresu rizikovými prvky<sup>29</sup>. Bylo prokázáno, že je možno indukovat toleranci k rizikovým prvkům pomocí krátkého tepelného šoku. Tento krátký tepelný stres před vystavením vlastnímu působení rizikovými prvky snižuje poškození membrány<sup>30</sup>. mRNA pro HSP syntetizované při stresu rizikovými prvky byly pozorovány v různých rostlinách a rostlinných buněčných kulturách. V rýži (*Oryza sativa*) tepelný šok a stres těžkými kovy zvyšuje úroveň mRNA nízkomolekulárního HSP (16–20 kDa). V kořenech trávničky přímořské (*Armeria maritima*) byla v přítomnosti Cu pozorována exprese HSP17. Vyšší hladiny malých HSP v přítomnosti těžkých kovů byly také pozorovány u buněčných kultur silenky nadmuté (*Silene vulgaris*) a rajčete peruánského (*Lycopersicon peruvianum*). V buněčné kultuře rajčete peruánského (*Lycopersicon peruvianum*) byl prokázán velký HSP70 v karyoplasmě, cytoplasmě a cytoplazmatické membráně při reakci na stres Cd (cit.<sup>2</sup>), což může naznačovat účast HSP70 v ochraně membrán před poškozením Cd. Těžké kovy také negativně ovlivňují fotosyntézu a i zde bylo zjištěno, že malé HSP hrají významnou roli v ochraně funkce chloroplastů<sup>31</sup>.

#### 3.2. Fytochelatinu

Fytochelatinu (PC) jsou peptidy s obecnou strukturou ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-X (n = 2–11, X je Gly, Ser,  $\beta$ -Ala, Glu, Gln)<sup>32</sup>. Prvně byly objeveny v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*<sup>33</sup>, poté v rostlinách<sup>34</sup> a dalších organismech<sup>35,36</sup>. PC jsou syntetizovány jako odpověď na expozici fyziologickým i nefyziologickým iontům kovů a v rostlinách hrají klíčovou roli v detoxikaci rizikových prvků. Proces syntézy PC probíhá enzymaticky transpeptidasovou reakcí glutathionu ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), nebo jeho homologů, katalyzovanou  $\gamma$ -glutamylcysteindipeptidyltranspeptidasou ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly + ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly  $\rightarrow$  ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n+1</sub>-Gly + Gly). Pro tento enzym se častěji používá triviální název fytochelatinu synthasa a jejími nejsilnějšími aktivátory jsou ionty Cd<sup>2+</sup> následované ionty Ag<sup>+</sup>, Bi<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> a Au<sup>+</sup> (cit.<sup>37</sup>). Glutathion je syntetizován z cysteinu (Cys) a kyseliny glutamové (Glu) dvoustupňovou ATP-dependentní enzymatickou reakcí katalyzovanou  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasou ( $\gamma$ -ECS) a glutathionsynthetasou (GS) (Glu + Cys  $\rightarrow$   $\gamma$ -Glu-Cys + Gly  $\rightarrow$   $\gamma$ -Glu-Cys-Gly)<sup>38</sup>.

Pro většinu publikovaných studií bylo použito iontů  $\text{Cd}^{2+}$ . PC váží ionty  $\text{Cd}^{2+}$  pomocí thiolových skupin cysteinu a komplexy PC-Cd jsou následně přenášeny transportéry ze skupiny ABC do vakuol. Tak je zamezeno toxickým projevům  $\text{Cd}^{2+}$  v cytosolu<sup>39</sup>.

V modelových pokusech s kvasinkami a následně i rostlinami byly objeveny dva druhy komplexů PC označené jako HMW (high molecular weight) a LMW (low molecular weight). Komplexy HMW PC s Cd obsahují více  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{S}^{2-}$  v porovnání s LMW. Tak vznikají částice složené z krystalického jádra tvořeného CdS obaleného fytochelatinu. Inkorporací sulfidu do komplexů HMW se zvyšuje množství iontů Cd vázané na molekulu a celková stabilita komplexu<sup>40</sup>.

Také studium akumulace Hg rostlinou brukev řepka (*Brassica napus*) odhalilo<sup>41</sup>, že akumulace Hg koreluje s koncentrací PC. Pokusy s dalšími rostlinami byla potvrzena úloha PC v detoxikaci některých těžkých kovů a zmírnění oxidačního stresu<sup>42,43</sup>.

I když indukce PC *in vivo* a aktivace fytochelatin-synthasy *in vitro* byla potvrzena pro řadu kovů, role PC v detoxikaci všech těchto iontů není jistá. Komplexy PC s kovy *in vivo* byly zprvu identifikovány pouze pro ionty  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  (cit.<sup>40</sup>), později také pro  $\text{As}^{3+}$  (cit.<sup>44</sup>) a  $\text{Pb}^{2+}$  (cit.<sup>45</sup>). Vedle účasti PC v detoxikaci těžkých kovů mohou tyto peptidy hrát v buňce další důležité role, včetně homeostázy esenciálních těžkých kovů, metabolismu síry, nebo mohou fungovat jako antioxidanty<sup>40</sup>.

### 3.3. Metalothioneiny

Metalothioneiny jsou charakterizovány jako nízkomolekulární, kovy vázající, kódované polypeptidy. Zástupci této skupiny mají obvykle velikost 5–10 kDa a obsahují velké množství cysteinových zbytků, které jsou přítomny v typickém uspořádání a umožňují vazbu ke kovům<sup>46</sup>.

Dříve se předpokládalo, že metalothioneiny jsou záležitostí živočišné říše, zatímco v rostlinách ochranu proti rizikovým prvkům zajišťují enzymově syntetizované fytochelatinu. Avšak v roce 1983 byl z obilí pšenice seté (*Triticum aestivum*) izolován první malý protein bohatý na cystein a označen jako metalothionein. Dosud je to jediný izolovaný rostlinný metalothionein z přirozeného zdroje. Všechny další aminokyselinové sekvence rostlinných metalothioneinů jsou odvozeny z mRNA, cDNA nebo z dat získaných sekvenací genů<sup>46</sup>.

Klasifikace metalothioneinů byla v minulosti několikrát změněna. Nyní jsou rozděleny do 15 skupin podle taxonomických parametrů a distribuce cysteinových zbytků v sekvenci<sup>47</sup>. Patnáctá skupina, připadající na rostlinné metalothioneiny, byla rozdělena na 4 podskupiny<sup>37</sup>.

Příspěvek rostlinných metalothioneinů k homeostáze iontů kovů je podobný jako v ostatních organismech; tyto proteiny hrají specifickou roli v přenosu esenciálních iontů kovů jako  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  k různým metaloenzymům a transkripčním faktorům<sup>46</sup>. Indukce některých savčích metalothioneinů zvýšenou úrovní iontů kovů poukazuje na jejich účast při detoxikaci nadbytečného množství kovů, a to jak

v případě esenciálních kovů, tak i neesenciálních těžkých kovů (např.  $\text{Cd}^{2+}$  nebo  $\text{Hg}^{2+}$ )<sup>48</sup>. Předpokládané funkce metalothioneinů zahrnují také inaktivaci reaktivních forem kyslíku<sup>46</sup>.

Role metalothioneinů v rezistenci rostlin k rizikovým prvkům, konkrétně k mědi, byla zjištěna Van Hoofem a spol.<sup>49</sup>. Metalothioneinový gen *SvMT2b* ze sileny nadmuté (*Silene vulgaris*) má významně zvýšenou úroveň transkripce v kořenech i nadzemních částech v populaci rostlin rezistentních k mědi, a to jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti Cu. U genotypu kostřavy červené (*Festuca rubra* cv. Merlin) byla v laboratorních podmínkách prokázána rezistence k několika kovům, které indukovaly transkripci metalothioneinového genu *mcMT1*. Komplementačními studii v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* senzitivních k těžkým kovům byla potvrzena účast proteinu kódovaného genem *mcMT1* při vazbě esenciálních (Zn, Cu) i neesenciálních kovů (Cd, Pb, Cr)<sup>50</sup>.

Metalothioneiny jsou také vhodným terčem pro genetické modifikace rostlin s cílem zvýšit jejich vazebnou schopnost přípravou různých fúzních proteinů<sup>51,52</sup>.

Ne všechny rostlinné metalothioneiny jsou vždy indukované kovy. Např. u pšeničného metalothioneinu  $E_c$  bylo zjištěno, že je regulován spíše fytohormonem kyselinou abscisovou než zinkem<sup>53</sup>. Mimo to, jak již bylo zmíněno, rostliny jsou schopné v odpovědi na zvýšenou úroveň rizikových prvků, zejména Cd, enzymaticky syntetizovat fytochelatinu.

### 3.4. Organické kyseliny a aminokyseliny

Organické kyseliny a aminokyseliny mohou být vylučovány do prostředí jako součást kořenových exudátů (viz výše) nebo se mohou účastnit komplexace iontů kovů v rostlinných buňkách. Kovy jsou v cytosolu organickými kyselinami a aminokyselinami komplexovány a výsledné komplexy jsou deponovány ve vakuolách, odkud mohou být v případě potřeby zpětně mobilizovány<sup>54</sup>.

Komplexace iontů kovů, jako např.  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ , s organickými kyselinami a aminokyselinami se děje díky jejich vysoké afinitě k ligandům obsahujícím kyslíkové atomy. Organické kyseliny, jako malát, citrát a oxalát, se účastní komplexace iontů kovů zejména ve vakuolách, protože při pH cytosolu mají nízkou asociační konstantu<sup>6,55</sup>. To bylo potvrzeno studií na hyperakumulátoru zinku *Arabidopsis halleri*, ve kterém je zinek v nadzemních částech komplexován malátem<sup>56</sup>. Také u penízku modravého (*Thlaspi caerulescens*) je zinek v nadzemních částech převážně vázán karboxylovými kyselinami. Oproti tomu v kořenech je zinek komplexován hlavně histidinem a volný se vyskytuje v xylémové míze<sup>57</sup>.

Téměř tři čtvrtiny všech známých hyperakumulátorů kovů jsou rostliny hyperakumulující Ni. U rostliny *Alyssum lesbiacum* je tento znak spojen se schopností produkovat volný histidin. Po vystavení rostliny Ni se koncentrace histidinu v xylémové šťávě zvyšuje, zatímco u tařinky horské (*Alyssum montanum*), která není hyperakumulátorem niklu, zůstává nízká. Pokud je ale tařinka horská

(*Alyssum montanum*) zásobována exogenním histidinem, transportuje více Ni do nadzemních částí a má k němu zvýšenou toleranci<sup>58</sup>. Podobné výsledky byly získány i s brukví hořčičnou (*Brassica juncea*), která také není hyperakumulátorem Ni. Chelatace histidinem však není jediným obecně rozšířeným mechanismem tolerance k niklu, protože nebyla pozorována např. u hyperakumulátoru *Thlaspi goesingense*<sup>59</sup>. V latexu extrémního hyperakumulátoru Ni *Sebertia acuminata* je většina Ni vázána na citrát<sup>60</sup>.

Další intenzivně studovanou molekulou v souvislosti s odpovědí rostlin na abiotický stres je prolin. Mnoho rostlin jej akumuluje za nedostatku vody, zvýšené koncentrace solí, nízké a vysoké teploty a dalších environmentálních stresů. Jeho zvýšená produkce je u rostlin také spojena se stresem rizikovými prvky, a to zvýšením tolerance rostlin ke kovům<sup>61</sup>. Tento jev lze pozorovat u trávničky přímořské (*Armeria maritima*), metlice trsnaté (*Deschampsia cespitosa*) a silenky nadmuté (*Silene vulgaris*) tolerantních k těžkým kovům, které mají v různých částech konstitutivně zvýšenou úroveň prolinu<sup>61</sup>. Vliv prolinu na toleranci rostlin k těžkým kovům byl potvrzen na transgenních řasách *Chlamydomonas reinhardtii*. Ty po vnesení genu pro pyrrolin-5-karboxylátsynthetasu, která katalyzuje první krok v syntéze prolinu, měly o 80 % vyšší hladinu prolinu, rychleji rostly v přítomnosti Cd a vázaly 4krát více Cd než netransgenní řasy<sup>62</sup>.

Poslední zmíněnou kyselinou je aminokyselina cystein, jehož úloha byla již podrobně diskutována v kapitole věnované problematice fytochelatinů.

#### 4. Závěr

Cílem tohoto přehledného referátu je představit čtenářům základní mechanismy, které jsou podle současných znalostí zahrnuty v rezistenci a toleranci rostlin k nadbytku rizikových prvků v prostředí. Principem těchto mechanismů je snížení koncentrace rizikových prvků v cytosolu buňky a zabránění tak projevu toxických příznaků. Dosaženo je toho snížením absorpce kovů do cytosolu, vazbou kovu v cytosolu vhodným ligandem či transportem kovů z cytosolu do apoplastu nebo vakuoly.

Znalosti získané studii rostlin schopných vypořádat se s toxickou koncentrací rizikových prvků mohou být dále využity pro přípravu transgenních rostlin se schopností efektivně akumulovat rizikové prvky z půdy a přenášet je do nadzemních, sklíditelných částí<sup>63–65</sup>. Tento způsob remediac kontaminované půdy je nazýván fytoremediace a může být alternativou ke klasickým fyzikálně-chemickým metodám dekontaminace půdy znečištěné rizikovými prvky<sup>66–69</sup>.

*Tento referát vznikl za podpory grantu MŠMT LH12087.*

#### LITERATURA

- Forbes J. C., Watson R. D.: *Plants in Agriculture*. Cambridge University Press, Cambridge 1992.
- Hall J. L.: *J. Exp. Bot.* 53, 1 (2002).
- Manousaki E., Kalogerakis N.: *Int. J. Phytorem.* 13, 959 (2011).
- Yadav S. K.: *S. Afr. J. Bot.* 76, 167 (2010).
- Baker A. J. M.: *J. Plant Nutr.* 3, 643 (1981).
- Rascio N., Navari-Izzo F.: *Plant Sci.* 180, 169 (2011).
- Uren N. C., v knize: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P., ed.), kap. 1, CRC Press, New York 2000.
- Bertin C., Yang X., Weston L. A.: *Plant Soil* 256, 67 (2003).
- Römheld V., Marschner H.: *Plant Soil* 123, 147 (1990).
- Rudolph A., Becker R., Scholz G., Prochazka Z., Toman J., Macek T., Herout V.: *Biochem. Physiol. Pflanz.* 180, 557 (1985).
- Ma J. F., Ryan P. R., Delhaize E.: *Trends Plant Sci.* 6, 273 (2001).
- Yang Y. Y., Jung J. Y., Song W. Y., Suh H. S.: *Plant Physiol.* 124, 1019 (2000).
- Yuanwen K., Dazhi W., Chuanwen Z., Guoyi Z.: *Chin. J. Plant Ecol.* 27, 709 (2003).
- Hartmann A., Schmid M., van Tuinen D., Berg G.: *Plant Soil* 321, 235 (2009).
- Jing Y., He Z., Yang X.: *J. Zhejiang Univ., Sci., B.* 8, 192 (2007).
- Smith S. E., Read D. J.: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego 1997.
- Abou-Shanab R. A., Angle J. S., Delorme T. A., Chaney R. L., Van Berkum P., Moeaad H., Ghanem K., Ghazlan H. A.: *New Phytol.* 158, 219 (2003).
- Glick B. R.: *Scientifica* 2012, 1 (2012).
- Blake E. C., Choate D. M., Bardhan S., Revis N., Barton L. L., Zocco T. G.: *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1365 (1993).
- Glick B. R.: *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 1 (2005).
- Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Vooijs R., Bokum W. T., Schat H., Meharg A. A.: *Plant Physiol.* 126, 299 (2001).
- Hall J. L., Williams L. E.: *J. Exp. Bot.* 54, 2601 (2003).
- Nevo Y., Nelson N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 609 (2006).
- Pedas P., Schjoerring J., Husted S.: *Plant Physiol. Biochem.* 47, 377 (2009).
- Petris M. J.: *Eur. J. Physiol.* 447, 752 (2004).
- Jasinski M., Ducos E., Martinoia E., Boutry M.: *Plant Physiol.* 131, 1169 (2003).
- Park J., Song W. Y., Ko D., Eom Y., Hansen T. H., Schiller M., Lee T. G., Martinoia E., Lee Y.: *Plant J.* 69, 278 (2012).
- Kim D. Y., Bovet L., Maeshima M., Martinoia E., Lee Y.: *Plant J.* 50, 207 (2007).

29. Lindquist S., Craig E. A.: *Annu. Rev. Genet.* 22, 631 (1988).
30. Neumann D., Lichtenberger O., Günther D., Tschiersch K., Nover L.: *Planta* 194, 360 (1994).
31. Heckathorn S. A., Mueller J. K., LaGuidice S., Zhu B., Barrett T., Blair B., Dong Y.: *Am. J. Bot.* 91, 1312 (2004).
32. Kotrba P., Najmanova J., Macek T., Ruml T., Mackova M.: *Biotechnol. Adv.* 27, 799 (2009).
33. Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., Murasigu A., Wada-Nakagawa Y., Hayashi Y.: *Tetrahedron Lett.* 25, 3869 (1984).
34. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H.: *Science* 230, 674 (1985).
35. Howe G., Merchant S.: *Plant Physiol.* 98, 127 (1992).
36. Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Ward J. T., Rea P. A.: *J. Biol. Chem.* 276, 20817 (2001).
37. Cobbett C. S., Goldsbrough P.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159 (2002).
38. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N.: *Plant Physiol.* 119, 73 (1999).
39. Sanita Di Toppi L., Gabbriellini R.: *Environ. Exp. Bot.* 41, 105 (1999).
40. Cobbett C. S.: *Plant Physiol.* 123, 825 (2000).
41. Iglesia-Turino S., Febrero A., Jauregui O., Caldelas C., Araus J. L., Bort J.: *Plant Physiol.* 142, 742 (2006).
42. Zhang H., Xu W., Guo J., He Z., Ma M.: *Plant Sci.* 169, 1059 (2005).
43. Tsuji N., Hirayanagi N., Okada M., Miyasaka H., Hirata K., Zenk M. H., Miyamoto K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 653 (2002).
44. Raab A., Feldmann J., Meharg A. A.: *Plant Physiol.* 134, 1113 (2004).
45. Scheidegger Ch., Sigg L., Behra R.: *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2546 (2011).
46. Freisinger E.: *Dalton Trans.* 47, 6663 (2008).
47. Binz P. A., Kägi J. H. R., v knize: *Metallothionein IV* (Klaassen C. D., ed.), Birkhäuser Verlag, Basel 1999.
48. Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P. S.: *Aquat. Toxicol.* 76, 160 (2006).
49. Van Hoof N. A. L. M., Hassinen V. H., Hakvoort H. W. K., Ballintijn K. F., Schat H., Verkleij J. A. C., Ernst W. H. O., Karenlampi S. O., Tervahauta A. I.: *Plant Physiol.* 126, 1519 (2001).
50. Ma M., Lau P. S., Jia Y. T., Tsang W. K., Lam S. K. S., Tarn N. F. Y., Wong Y. S.: *Plant Sci.* 164, 51 (2003).
51. Macek T., Mackova M., Truksa M., Singh-Cundy A., Kotrba P., Yancey N., Scouten W. H.: *Chem. Listy* 90, 690 (1996).
52. Vrbova M., Kotrba P., Horacek J., Smykal P., Svabova L., Vetrovcova M., Smykalova I., Griga M.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 112, 321 (2013).
53. Kawashima I., Kennedy T. D., Chino M., Lane B. G.: *Eur. J. Biochem.* 209, 971 (1992).
54. Meharg A. A.: *Plant Soil* 274, 163 (2005).
55. Pavlíková D., Pavlík M., Vašičková S., Száková J., Tlustoš P., Vokáč K., Balík J.: *Appl. Organometal. Chem.* 18, 619 (2004).
56. Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J. L., Traverse A. S., Marcus M. A., Manceau A.: *Plant Physiol.* 130, 1815 (2002).
57. Salt D. E., Prince R. C., Baker A. J. M., Raskin I., Pickering I. J.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 713 (1999).
58. Krämer U., Cotter-Howells J. D., Charnock J. M., Baker A. J. M., Smith J. A. C.: *Nature* 379, 635 (1996).
59. Persans M. W., Yan X., Patnoe J.-M. M. L., Krämer U., Salt D. E.: *Plant Physiol.* 121, 1117 (1999).
60. Callahan D. L., Baker A. J. M., Kolev S. D., Wedd A. G.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 2 (2006).
61. Sharma S. S., Dietz K. J.: *J. Exp. Bot.* 57, 711 (2006).
62. Siripornadulsil S., Traina S., Verna D. P. S., Sayre R. T.: *Plant Cell* 14, 2837 (2002).
63. Macek T., Kotrba P., Svatoš A., Nováková M., Demnerová K., Macková M.: *Trends Biotechnol.* 26, 146 (2008).
64. Pavlikova D., Macek T., Mackova M., Szakova J., Balík J.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 233 (2004).
65. Fišer J., Macková M., Nováková M., Macek T.: *Listy Cukrov. Řepář.* 126, 399 (2010).
66. Schnoor J. L., Licht L. A., McCutcheon S. C., Wolfe N. L., Carreira L. H.: *Environ. Sci. Technol.* 29, 318 (1995).
67. Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Kotyza J., Vaněk T.: *Chem. Listy* 102, 346 (2008).
68. Musilová L., Uhlík O., Macková M., Macek T.: *Chem. Listy* 106, 1029 (2012).
69. Uhlík O., Strejček M., Hroudová M., Demnerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 107, 614 (2013).

**J. Fišer, M. Nováková, and T. Macek** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Mechanisms Decreasing Toxicity of Hazardous Elements in Plants**

The supply of minerals in plants is provided by the absorption of compounds dissolved in soil. Plants are also exposed to dissolved toxic heavy metals. Since plants cannot avoid contacts with heavy metals they developed a number of mechanisms decreasing the toxic effects. The important factors are, e.g. root exudates, soil microorganisms, plasmatic membrane, membrane transporters, heat-shock proteins, phytochelators, metallothioneins, organic acids and amino acids are introduced.