

AGNIESZKA OLKO

*Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Biologii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: agnieszkaolko@poczta.umcs.lublin.pl*

FIZJOLOGICZNE ASPEKTY TOLERANCJI ROŚLIN NA METALE CIĘŻKIE

WSTĘP

Istota i definicja tolerancji roślin na metale ciężkie jest przedmiotem rozważań fizjologów, biochemików i genetyków roślin. Obecnie definiuje się tę cechę jako zdolność roślin do utrzymania homeostazy jonów metali ciężkich na poziomie komórkowym i tkanekowym. Wiele metali ciężkich pełni ważne funkcje w metabolizmie roślin (Zn, Cu, Mo, Mn, Ni, Fe), dlatego też prawidłowy przebieg procesów życiowych wymaga utrzymania ich dostępnej puli w komórce. Z drugiej strony, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia tych niezbędnych jonów metali ponad wymagany dla metabolizmu zakres, wywołuje objawy toksyczności, podobnie jak obecność jonów takich metali jak Hg, Cd czy Pb. Fizjologiczna granica, między stanem ich niedoboru a stanem toksyczności ich nadmiaru, jest stosunkowo wąska. Dlatego też uważa się, że wykształcenie sprawnego systemu kontroli homeostazy jonów metali ciężkich, odpowiada za tolerancję roślin na ten czynnik abiotyczny (NELSON 1999, KRÄMER 2005, CLEMENS 2006).

Obecnie przyjmuje się (CLEMENS i współaut. 2002), że z utrzymaniem homeostazy jonów metali ciężkich u roślin wiążą się liczne procesy fizjologiczne, a zwłaszcza:

- mobilizacja jonów w środowisku glebowym i ich pobieranie z gleby do korzenia (adsorpcja wymienna jonów w apoplaście komórek korzenia, transport jonów przez plazmolemmę do symplastu);

- krótkodystansowy transport jonów w korzeniu (kompleksowanie i kompartmentacja jonów metali w komórkach korzenia, transport jonów metali między komórkami korzenia);

- załadunek ksylemu i długodystansowy transport ksylemowy jonów;

- rozładunek ksylemu;

- transport jonów w apoplaście i symplacie komórek liści (transport jonów metali między komórkami liścia, kompleksowanie i kompartmentacja jonów metali w komórkach i strukturach liścia).

Pobieranie jonów metali ciężkich przez korzeń jest uzależnione od wielu czynników środowiskowych, a wśród nich głównie od pH, temperatury, dostępności tlenu, całkowitej zawartości danego metalu oraz obecności innych pierwiastków w glebie (McLAUGHLIN i współaut. 1999). Niektóre metale klasyfikuje się jako mało dostępne, ze względu na ich słabą rozpuszczalność w wodzie i duże powinowactwo do koloidów glebowych (np. Fe, Pb). Rośliny, poprzez aktywność fizjologiczną korzeni, mogą zwiększać biodostępność tych metali, zakwaszając glebę lub wydzielając ligandy hydroksylowe, kompleksujące trudno dostępne jony. Przykładem takiej aktywności może być wydzielanie fitosideroforów kompleksujących głównie jony Fe^{3+} , a także wydzielanie kwasów organicznych. Pewne gatunki roślin, wydzielając eksudaty korzeniowe, zmniejszają biodostępność metali

ciężkich. Przykładem może być wydzielanie przez korzenie cytrynianu dla podwyższenia tolerancji na glin (DE LA FUENTE i VERENICE 1997, MA i współaut. 2001), czy wydzielanie kwasów pektynowych immobilizujących Pb w środowisku. Znajomość tych procesów można wykorzystać w praktyce, na przykład w fitoremediacji, gdzie poprzez odpowiednią modyfikację środowiska zwiększa się lub

zmniejsza biodostępność pierwiastków glebowych. Dodatek do gleby związków chelatujących (np. EDTA) w metodzie fitoekstracji, zwiększa wydajnie biodostępność metali oraz ich translokację do części nadziemnych. Natomiast wapnowanie gleby lub wzbogacanie nawozami organicznymi (kompost, obornik) stabilizuje metale w glebie i efektywnie obniża ich fitoprzyswajalność.

KRÓTKODYSTANSOWY TRANSPORT JONÓW METALI W KORZENIACH I LIŚCIACH

Transport krótkodystansowy jonów metali w korzeniu może odbywać się apoplastem (przestwory międzykomórkowe, ściany komórkowe, martwe komórki) lub symplastem (cytoplasma poszczególnych komórek połączonych plazmodesmami) do granicy endodermy (KOPCEWICZ i LEWAK 1998). Komórki tej warstwy posiadają promieniste suberynowe zgrubienia (pasemka Caspary'ego), stanowiące nieprzepuszczalną barierę dla transportu wody i rozpuszczonych w niej jonów metali. Dlatego transport jonów od tej warstwy korzenia do wiązek przewodzących zachodzi przez symplast, a wnikanie jonów przez plazmolemmę zachodzi z udziałem transporterów błonowych w komórkach korzenia. Mechanizm ten wpływa na skład pierwiastkowy soku ksylemu i floemu, a tym samym stanowi kolejny poziom kontroli homeostazy jonów metali ciężkich w roślinie (GAYMARD i współaut. 1998, TESTER i LEIGH 2001). Natomiast krótkodystansowy transport jonów metali w liściach odbywa się bez przeszkód drogą symplastu, jak i apoplastu (KARLEY i współaut. 2000).

Udział transporterów błonowych w zachowaniu homeostazy jonów metali w komórkach i tkankach jest znaczący. Poprzez zmianę poziomu ekspresji transporterów oraz ich aktywności, regulowane jest wnikanie jonów metali do komórek oraz ich przepływ między organellami, komórkami i tkankami w całej roślinie (GROTZ i GUERINOT 2006, KRÄMER i współaut. 2007). Czynnikiem dodatkowo komplikującym wyjaśnienie udziału transporterów błonowych w utrzymaniu homeostazy jonów metali w roślinie jest ich mała specyficzność względem transportowanych jonów. Powoduje to wnikanie do komórek, a następnie transport w całej roślinie nie tylko jonów metali niezbędnych dla roślin, ale także jonów balastowych np. Pb^{2+} czy Cd^{2+} (CLEMENS 2006). Dotąd opisane roślinne transportery błonowe jonów metali ciężkich zalicza się do pięciu grup białek transportujących. Są to ATPazy, białka ABC, CDF (ang. cation diffusion facilitator), Nramp (ang. natura resistance macrophage protein) i CAX (ang. cation exchanger).

KOMPLEKSOWANE JONÓW METALI CIĘŻKICH W CYTOZOLU KOMÓREK KORZENI I LIŚCI

Wyjątkowo, jak na przykład w ksylemie, jony metali ciężkich spotykane są w formie wolnej. Po wnikięciu do symplastu jony metali niemal natychmiast są kompleksowane przez niskocząsteczkowe ligandy. Dlatego też dalszy ich transport w obrębie rośliny należy rozpatrywać w kontekście wymiany między ligandami (HAYDON i COBBETT 2007). Do kluczowych chelatorów jonów metali ciężkich u roślin zalicza się: fitochelatyny, metalotioneiny, kwasy organiczne i aminokwasy, a także fitynę, flawonoidy czy olejki gorczyczne.

Fitochelatyny (ang. phytochelatin, PC), to bogate w cysteinę γ -Glu-Cys peptydy (GRILL i współaut. 1985). Powstają enzymatycznie z

glutationu lub jego homologów przy udziale syntazy fitochelatynowej, której aktywatorami są jony metali ciężkich (Cd, Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg i Au) (GRILL i współaut. 1989). W cytozolu, grupy tiolowe reszt cysteinowych obecnych tam fitochelatyn tworzą z jonami metali kompleksy o małej masie cząsteczkowej LMW (ang. low molecular weight). W badaniach przeprowadzonych na *Schizosaccharomyces pombe* wykazano dalszy transport kompleksów LMW do wakuoli, z udziałem tonoplastowych transporterów Hmt11, gdzie wspólnie z jonami S^{2-} i jonami metali łączą się one w wielcząsteczkowe agregaty HMW (ang. high molecular weight) (ORITZ i

współaut. 1995). Przypuszcza się, że podobny mechanizm może funkcjonować u roślin, jednak jak dotąd homologi tonoplastowych transporterów Hmt1 wykryto poza drożdżami wyłącznie u *Caenorhabditis elegans* (VATAMANIUK i współaut. 2005). Funkcja fitochełatyn u roślin wiąże się z ich mechanizmami tolerancji na metale ciężkie. Uważa się, że fitochełatyny biorą udział w detoksyfikacji jonów metali ciężkich, w tak zwanym stresie ostrym, wywołanym krótką ekspozycją roślin na wysokie stężenia metali ciężkich, zwłaszcza u roślin o niskiej tolerancji na metale (TRIPATHI i współaut. 1996, MISHRA i współaut. 2006, SETH i współaut. 2008). Natomiast u roślin o wysokim poziomie tolerancji na metale ciężkie, rola fitochełatyn w detoksyfikacji jonów metali, w warunkach stresu ostrego, wydaje się mieć mniejsze znaczenie dla ich tolerancji względem metali ciężkich, pomimo obserwowanej u nich indukcji syntezy fitochełatyn w tych warunkach (DE VOS i współaut. 1992, DE KNECHT i współaut. 1995, EBBS i współaut. 2002). W przypadku stresu chronicznego, polegającego na długiej ekspozycji roślin na małe dawki metali ciężkich, rola fitochełatyn w detoksyfikacji jonów metali jest również niewielka. Wynika to prawdopodobnie z wysokich kosztów energetycznych wiążących się z syntezą fitochełatyn, powodujących ograniczenie ewolucyjnego rozwoju tego mechanizmu tolerancji na metale u roślin (STEFFENS 1990). Obecnie wyróżnia się 6 rodzin tych γ -Glu-Cys peptydów. Wspólnym elementem ich budowy jest dipeptyd γ -Glu-Cys, a różnicuje je rodzaj C-terminalnego aminokwasu. U większości roślin terminalnym aminokwasem jest glicyna (Gly), a substratem w tworzeniu tych peptydów jest glutation (γ -Glu-Cys-Gly) (GEKELER i współaut. 1989). U pewnych gatunków rzędu *Fabales*, prekursorem syntezy fitochełatyn jest homoglutation (γ -Glu-Cys- β -Ala), a terminalnym aminokwasem w budowie tych γ -Glu-Cys peptydów jest β -alanina (GRILL i współaut. 1985). Pewne gatunki *Poaceae*, zawierają hydroksymetyloglutation (γ -Glu-Cys-Ser), który jest substratem syntezy γ -Glu-Cys peptydów z seryną jako C-terminalnym aminokwasem (KLAPHECK i współaut. 1994). U *Zea mays* stwierdzono obecność tripeptydu γ -Glu-Cys-Glu oraz jego pochodnych – fitochełatyn o wzorze $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Glu}$, a także pochodnych dipeptydu γ -Glu-Cys, nazywanych fitochełatynami bezglicynowymi o wzorze $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ (MEUWLY i współaut. 1995). Szóstą rodziną γ -Glu-Cys peptydów są fitoche-

łatyny o wzorze $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gln}$, gdzie terminalnym aminokwasem w budowie cząsteczki jest glutamina (KUBOTA i współaut. 2000).

Metalotioneiny (ang. metallothioneins, MT), to niskocząsteczkowe białka, bogate w cysteinę, mające zdolność kompleksowania jonów miedzi, cynku i kadmu poprzez grupy tiolowe reszt cysteinowych. W zależności od położenia reszt cysteinowych w łańcuchu polipeptydowym wydziela się trzy klasy metalotionein. Wszystkie metalotioneiny roślinne wraz z grzybowymi zaliczane są do klasy drugiej metalotionein (COBBETT i GOLDSBROUGH 2002). Metalotioneiny zostały dobrze scharakteryzowane u zwierząt, natomiast u roślin wyizolowano jedynie wiele genów i cDNA metalotionein oraz dwa białka: jedno ze zboża (LANE i współaut. 1987) i jedno z *Arabidopsis* (MURPHY i współaut. 1997). Sugeruje się również możliwość wykrycia trzeciego roślinnego białka metalotioneiny u *Quercus suber* (MIR i współaut. 2004). Ogólnie uważa się, że funkcja metalotionein u roślin wiąże się z ich mechanizmami detoksyfikacji i homeostazy jonów metali, zwłaszcza jonów miedzi (COBBETT i GOLDSBROUGH 2002). Wszystkie informacje dotyczące fizjologicznej funkcji roślinnych metalotionein oparte są jednak prawie wyłącznie na badaniach ekspresji genów metalotionein, co uniemożliwia obecnie jednoznaczne stwierdzenie ich funkcji u roślin. Wiadomo jest natomiast, że roślinne geny metalotionein występują w formie wielogenowych rodzin, których poszczególni członkowie wydają się być niezależnie regulowani w zależności od stadium rozwojowego czy też działania różnych bodźców jak zranienie, atak patogenu, stres oksydacyjny a także stres metali ciężkich. Udział metalotionein roślinnych w mechanizmach tolerancji na metale ciężkie potwierdzają dodatkowo komplementacyjne badania przeprowadzone z udziałem drożdży w których wykazano, że heterologiczna ekspresja różnych genów MT pochodzących od *Thlaspi caerulescens* odpowiada za wzrost ich tolerancji na miedź i kadm, a wysoka tolerancja roślin *T. caerulescens* populacji St Felix-de-Pallieres (okolice Ganges we Francji) na kadm może wynikać z wyjątkowo wysokiego, konstytutywnego poziomu ekspresji genów MT u tych roślin (ROOSENS i współaut. 2004). Ponadto przeprowadzone ostatnio badania wskazują, że metalotioneiny mogą również funkcjonować u roślin jako donory/akceptory jonów metali (np. Zn^{2+}) względem enzymów i metalozależnych białek wiążących się z DNA, a przez to

regulować ekspresję genów i metabolizm komórki (CASTIGLIONE i współaut. 2007).

Kwasy organiczne i aminokwasy stanowią ważną grupę chelatorów jonów metali ciężkich, ze względu na obecność w ich cząsteczkach wysoce reaktywnych grup funkcyjnych zawierających O, N lub S. Ponadto, różnice w zawartości kwasów między tolerancyjnymi i nietolerancyjnymi ekotypami różnych gatunków roślin wskazują, że mogą one pełnić rolę komórkowych chelatorów jonów metali ciężkich. Wśród kwasów organicznych najefektywniejszymi ligandami jonów metali ciężkich są: cytrynowy, jabłkowy, malonowy, szczawiowy. Badania możliwości udziału kwasów organicznych w detoksyfikacji i transporcie jonów metali ciężkich u roślin dotyczą w znacznej mierze pędów. Wzrost stężenia kwasu jabłkowego najczęściej obserwuje się w tolerancji roślin na cynk, a u Zn-tolerancyjnych ekotypów *Silene vulgaris* jest ono 4–7 razy wyższe w liściach, w porównaniu z roślinami nietolerancyjnymi (MATHYS 1977). Korzenie badano rzadziej, ale najczęściej zawartość kwasów organicznych w ich komórkach jest znacznie niższa i ulega mniejszym zmianom w odpowiedzi na stres metali ciężkich. W dotychczas przeprowadzonych badaniach potwierdzono aktywność kwasów organicznych w tworzeniu połączeń z jonami takich metali jak Al, Cd, Fe, Ni, i Zn (KROTZ i współaut. 1989, YANG i współaut. 1997, MA i współaut. 2001, NIGAM i współaut. 2001). Kwasy organiczne w komórkach roślinnych są produkowane głównie w mitochondriach w cyklu Krebsa i w mniejszym stopniu w glioksysomach w cyklu glioksalowym. Gromadzone są natomiast preferencyjnie w wakuolach. W roślinie transportowane są w ksylemie wraz z prądem transpiracyjnym, o czym świadczy wzrost ich stężenia w soku ksylemu w nocy przy zahamowanej transpiracji (SCHURR i SCHULZE 1996). Możliwy jest również ich transport we floemie w kierunku od liści do korzeni (IMSANDE i TOURAINE 1994). Istnieje wiele faktów przemawiających za istotną rolą kwasów organicznych w utrzymaniu homeostazy jonów metali ciężkich u roślin. Ich gromadzenie w wakuoli, która w komórce jest miejscem akumulacji jonów metali ciężkich, tłumaczy się jako udział kwasów organicznych w detoksyfikacji jonów metali ciężkich u roślin. Możliwość taką potwierdza wysoka stabilność kompleksów jonów metali ciężkich z kwasami organicznymi w warunkach kwaśnego pH (5.5) wakuoli (SALT i współaut. 1999). Natomiast

obecność kwasów organicznych w tkankach przewodzących, zwiększa efektywność długodystansowego transportu jonów metali ciężkich poprzez ograniczanie adsorpcji ich wolnych jonów na ściankach naczyń oraz ich migracji poza tkanki przewodzące (SENDEN i WOLTERBEEK 1990). Obecności kompleksów jonów metali ciężkich z kwasami organicznymi w ksylemie sprzyja kwaśne pH soku ksylemu (SALT i współaut. 1999). Ponadto uważa się, że kwasy organiczne pełnią ważną funkcję w utrzymaniu właściwego pH w różnych przedziałach komórek korzeni przy nadmiarze jonów dodatnich, np. aminowych (IMSANDE i TOURAINE 1994), co pośrednio może również wskazywać na ich rolę w utrzymaniu homeostazy przy nadmiarze jonów metali ciężkich.

Spośród aminokwasów najlepiej znanym chelatorem jonów metali ciężkich u roślin jest histydyna, tworząca kompleksy głównie z jonami niklu (KRÄMER i współaut. 1996), a także cynku (SALT i współaut. 1999) i miedzi (PICH i SCHOLZ 1996). Histydynę wykrywano głównie w ksylemie, zwłaszcza u hiperakumulatorów niklu traktowanych wysokimi stężeniami tego metalu (KRÄMER i współaut. 1996). Uważa się, że aminokwas ten jest głównym chelatorem jonów niklu u roślin w procesach jego załadunku do ksylemu i transporcie długodystansowym (KERKEB i KRAMER 2003). Nadekspresja jednego z enzymów szlaku biosyntezy histydyny (ATP-PRT1) u *Arabidopsis thaliana* zwiększała tolerancję tych roślin na nikiel co wskazuje, iż konstytutywnie wysoki poziom syntezy histydyny, spotykany u hiperakumulatorów niklu, może stanowić jeden z mechanizmów tolerancji tych roślin na nikiel (KRÄMER i współaut. 1996, INGLE i współaut. 2005). U *T. caerulescens* natomiast, histydyna stanowi drugi, pod względem ilości, ligand jonów tego metalu w liściach i pierwszy w korzeniach. Istnieją również badania, sugerujące funkcje histydyny jako podstawowego liganda jonów cynku w rozwijających się i starzejących komórkach. Komórki na tym etapie rozwoju charakteryzują się dużą zawartością jonów cynku, które ze względu na brak wykształconych przedziałów komórkowych gromadzone są w cytozolu. Wyższe pH cytozolu w stosunku do wakuoli powoduje z kolei, że w tych warunkach kompleksowe połączenia jonów cynku z kwasami organicznymi są słabsze niż z histydyną (KÜPPER i współaut. 2004). Niebiałkowy aminokwas nikotianamina, znany jest u roślin jako chelator jonów żelaza (Fe^{2+} i Fe^{3+}) oraz w mniejszym

stopniu jonów miedzi i cynku (VON WIREN i współaut. 1999, WNITZ i współaut. 2003). Do podstawowych funkcji nikotianaminy u roślin należy utrzymanie homeostazy wymienionych jonów w całej roślinie (CURIE i BRIAT 2003, WNITZ i współaut. 2003). Funkcjonuje ona między innymi jako chelator jonów żelaza, miedzi i cynku podczas transportu we floemie, jako chelator jonów miedzi i cynku podczas transportu w ksylemie, oraz jako chelator jonów żelaza w procesie rozładunku ksylemu. Sugeruje się również udział nikotianaminy w sekwestracji jonów żelaza w wakuoli w warunkach ekspozycji roślin na wysokie dawki tego metalu (HAYDON i COBBETT 2007). Istnieją badania wskazujące na rolę nikotianaminy w procesach toleran-

cji i hiperakumulacji jonów cynku i niklu u roślin. Transgeniczna nadekspresja syntazy nikotianaminy u *Arabidopsis* lub tytoniu zwiększała tolerancję tych roślin względem niklu (DOUCHKOV i współaut. 2005, KIM i współaut. 2005). Podobnie u hiperakumulatora cynku *A. thaliana* obserwowano wyższy poziom ekspresji genów syntazy nikotianaminy w porównaniu z pokrewnym gatunkiem nie będącym hiperakumulatorem cynku *A. thaliana* a heterologiczna ekspresja genów syntazy nikotianaminy pochodzących od *A. thaliana* AhNAST2 i AhNAS3 odpowiednio u *S. pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* wykazała u tych organizmów wzrost tolerancji na cynk (TALKE i współaut. 2006).

KOMPARTMENTACJA JONÓW METALI W KOMÓRKACH KORZENI I LIŚCI

Różne organella komórkowe wykazują różne zapotrzebowanie na określone jony metali. Większość biomolekuł zawierających Fe, Zn lub Cu jest zlokalizowana poza cytozolem, dlatego też dostarczenie odpowiedniej ilości jonów metali ciężkich do tych przedziałów jest konieczne dla zachowania homeostazy w komórce (GROTZ i GUERINOT 2006, KRÄMER i współaut. 2007). Szczególne znaczenie odgrywa sekwestracja jonów metali ciężkich w wakuoli, która u roślin pełni funkcje organellum gromadzącego zbędne i toksyczne substancje w komórce. Proces ten ma również kluczowe znaczenie w detoksyfikacji jonów metali ciężkich u roślin. Uważa się, że rodzaj ligandu może określać kierunek transportu jonów metali ciężkich w roślinie. I tak, jony metali ciężkich przeznaczone do magazynowania w wakuolach komórek korzenia mogą być kompleksowane przez PC, metalotioneiny (EVANS i współaut. 1992), a jony kierowane do transportu w ksylemie mogą być kompleksowane przez histydynę, nikotianaminę (KRÄMER i współaut. 1996) lub cytrynian (SENDEN i współaut. 1994). Pewną funkcję w tym względzie przypisuje się również metalochaperonom, występującym u roślin białkom, aktywnym w dostarczaniu jonów metali do specyficznych białek w obrębie komórki (GROTZ i GUERINOT 2006). Sugeruje się, że podobnie jak to jest u drożdży metalochaperony mogą być odpowiedzialne za transport jonów miedzi do transporterów RAN1 w błonie pęcherzyków aparatu Golgiego (HIMELBLAU i AMASINO 2000), za dostarczanie jonów miedzi białkom chloroplasto-

wym takim jak plastocyanina i dysmutaza nadtlenkowa (ABDEL-GHANY i współaut. 2005) oraz transport jonów miedzi do mitochondriów w warunkach stresowych (BALANDIN i CASTRESANA 2002). Ponadto w kompartmentacji jonów metali ciężkich w różnych przedziałach komórkowych, zasadniczą rolę odgrywają transportery błonowe zlokalizowane w błonach tych organelli.

Ściana komórkowa jest mechaniczną i chemiczną barierą dla swobodnego wnikania metali do symplastu i u niektórych gatunków może zatrzymywać 80–95% ilości metalu pobieranego przez komórki, co wykazano zwłaszcza dla jonów miedzi, cynku, ołowiu i niskich stężeń glinu. Akumulację jonów metali obserwuje się tu najczęściej w przestrzeniach między micellami celulozy. Również grupy karboksylowe kwasów poligalaturonowych, składników chemicznych budujących ściany komórkowe, są zaangażowane w tworzenie kompleksów z jonami metali. Podobną chelatującą rolę odgrywają związki fenolowe obecne w ścianie komórkowej. Oprócz elektrostatycznego wiązania do grup karboksylowych lub innych grup obdarzonych ładunkiem, w ścianie komórkowej opisano też trwałe wiązanie jonów metali. Wykryto i wyekstrahowano takie trwałe kompleksy jonów miedzi z białkami ze ścian komórkowych roślin *Armeria maritima* (NEUMANN i współaut. 1995).

Rośliny tolerancyjne na metale ciężkie mogą akumulować ich jony w idioblastach. U *A. maritima* rosnącej na glebach bogatych w miedź, idioblasty, nazywane komórkami

taninowymi, chelatują miedź poprzez grupy hydroksylowe związków fenolowych. Nie stwierdzono takiej funkcji idioblastów w roślinach *A. maritima* uprawianych na glebach bogatych w cynk, u których gromadzony jest on głównie w ścianach komórkowych.

W akumulacji metali u roślin biorą również udział jednokomórkowe lub wielokomórkowe włoski. Mechanizm ten obserwuje się u hiperakumulatorów jak i gatunków nie akumulujących metali. Przeprowadzone badania potwierdzają udział włosków sekwestracji jonów ołowiu (*Nicotiana tabacum*) (MARTELL 1974), kadmu (*Brassica juncea*) (SALT i RAUSER 1995), niklu (*Alyssum lesbiacum*)

(KRÄMER i współaut. 1997), cynku (*Avicennia marina*) (MACFARLANE i BURCHETT 1999).

Również ekskrecja pełni ważną rolę w kompartmentacji i wydzielaniu metali u metalofitów. ERNST i współaut. (1992) oraz NEUMANN i współaut. (1995) opisują wydzielanie metali ciężkich przez gruczoły solne epidermy liścia u roślin *A. maritima*, a NEUMANN i współaut. (1997) przypisują taką rolę hydattodom w roślinach *Minuartia verna*. W tolerancyjnych roślinach *S. vulgaris*, metale ciężkie wydzielane są z komórek na powierzchnię liści przez ektodesmy (BRINGEZU i współaut. 1999).

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF PLANT HEAVY METAL TOLERANCE

SUMMARY

It is a common characteristic of all life forms that some of the elements present in the environment are accumulated and others are rejected. The rates of accumulation are necessarily governed by physiological requirements rather than toxicity. Because metals like Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni are essential for normal running a vast number of metabolic processes, plants evoke special systems of metal uptake and transport during evolution. On the other hand, the same metals present in an excess in plant cells may become seriously toxic to the cells. Moreover, the low specificity of the metal uptake and transport systems makes them to function also as an entrance for nonessential and toxic substances (Cd, Pb). The existence of a complex systems for metal uptake and transport processes, able to respond to continuously changing environmental conditions, is necessary for maintaining metal homeostasis in plants. It is highly probable that these

complex systems of metal uptake and transport can function as systems of heavy metal tolerance in plants, as well. According to the recent reports, the main processes involved in maintaining heavy metal homeostasis in plants are: metal ions mobilization and uptake from the soil, their short distance transport in roots, complexation by different ligands in cytosol, compartmentation in root cells, xylem loading and long distance transport in xylem, distribution in shoots, xylem unloading, ions trafficking in apoplastic and symplastic passage of leave cells, their chelating in cytosol and compartmentation in leave cells and structures. Although some of these processes are well recognized, a number of them remain still enigmatic. It is strongly believed that further investigation of these processes should help to explain differences in metal tolerance between plant varieties as well as the phenomenon of heavy metal hyperaccumulation in plants.

LITERATURA

- ABDEL-GHANY S. E., BURKHEAD J. L., GOGOLIN K. A., ANDRES-COLAS N., BODECKER J. R., PUIG S., PENARUBIA L., PILON M., 2005. *AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7*. FEBS Lett. 579, 2307-2312.
- BALANDIN T., CASTRESANA C., 2002. *AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17*. Plant Physiol. 129, 1852-1857.
- BRINGEZU K., LICHTENBERG O., LEOPOLD I., NEUMANN D., 1999. *Heavy metal tolerance of Silene vulgaris*. J. Plant Physiol. 154, 536-546.
- CASTIGLIONE S., FRANCHIN C., FOSSATI T., LINGUA G., TORRIGIANI P., BIONDI S., 2007. *High zinc concentration reduce rooting capacity and alter metallothionein gen expression in white poplar (Populus alba L. cv. VILLAFRANCA)*. Chemosphere 67, 1117-1126.
- CLEMENS S., 2006. *Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants*. Biochimie 88, 1707-1719.
- CLEMENS S., PALMGREN M. G., KRAMER U., 2002. *A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation*. Trends Plant Sci. 7, 309-315.
- COBBETT C. S., GOLDSBROUGH P., 2002. *Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis*. Annu. Rev. Biol. 53, 159-182.
- CURIE C., BRIAT J. F., 2003. *Iron transport and signaling in plants*. Ann. Rev. Plant Biol. 123, 825-832.
- DE LA FUENTE J. M., VERENICE R. R., 1997. *Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis*. Science 276, 5318-1566.
- DE KNECHT J. A., VON BAREN N., TEN BOOKUM W. M., SANG H.W.W. F., KOEVOETS P. L. M., SCHAT H., VERKLEIJ J. A. C., 1995. *Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant Silene vulgaris*. Plant Sci. 106, 9-18.
- DE VOS C. H. R., VONK M. J., VOOIJIS R., SCHAT H., 1992. *Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in Silene cucubalus*. Plant Physiol. 98, 700-706.

- DOUCHKOV D., GRYCZKA C., STEPHAN U. W., HELL R., BÄU H., 2005. *Etopic of nicotianamine synthase genes result in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco*. Plant Cell Environ. 28, 365–374.
- EBBS S., LAU I., AHNER B., KOCHIAN L., 2002. *Phytochelatins synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator Thlaspi caerulescens (J. and C. Presl)*. Planta 214, 635–640.
- ERNST W. H. O., VERKLEIJ J. A. C., SCHAT H., 1992. *Metal tolerance in plants*. Acta Bot. Neerl. 41, 229–248.
- EVANS K. M., GATEHOUSE J. A., LINDSAY W. P., SHI J., TOMMEY A. M., ROBINSON N. J., 1992. *Expression of metallothionein-like gene Ps-MT- α in Escherichia coli and Arabidopsis thaliana and analysis of trace metal accumulation: implications for Ps-MT- α function*. Plant Mol. Biol. 20, 1019–1028.
- GAYMARD F., PILOT G., LACOMBE B., BOUCHEZ D., BRUNEAU D., BOUCHERAZ J., MICHAUX-FERRIERE N., THIBAUD J. B., SENTENAC H., 1998. *Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap*. Cell 94, 647–655.
- GEKELER W., GRILL E., WINNACKER E. L., ZENK M. H., 1989. *Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins*. Z Naturforsch 44c, 361–369.
- GRILL E., LÖFFER S., WINNACKER E. L., ZENK M. H., 1989. *Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatinsynthase)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6838–6842.
- GRILL E., WINNACKER E. L., ZENK M. H., 1985. *Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants*. Science 230, 674–676.
- GROTZ N., GUERINOT M. L., 2006. *Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants*. BBA-Mol. Cell. Res. 1763, 595–608.
- HAYDON M. J., COBBETT C. S., 2007. *Transporters of ligands for essential metal ions in plants*. New Phytol. 174, 499–506.
- HIMELBLAU E., AMASINO R. M., 2000. *Delivering copper within plant cells*. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 205–210.
- IMSANDE J., TOURAINE B. N., 1994. *Demand and the regulation of nitrate uptake*. Plant Physiol. 105, 3–7.
- INGLE R. A., MUGFORD S. T., REES J. D., CAMPBELL M. M., SMITH J. A. C., 2005. *Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contribution to nickel tolerance in hyperaccumulator plants*. Plant Cell 17, 2089–2106.
- KARLEY A. J., LEIGH R. A., SANDERS D., 2000. *Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells*. Trends Plant Sci. 5, 465–470.
- KERKEBL, KRAMER U., 2003. *The role of free histidine in xylem loading of nickel in Alysum lesbiacum and Brassica juncea*. Plant Physiol. 137, 901–910.
- KIM S., TAHASHI M., HIGUCHI K., TSUNODA K., NAKANISHI H., YOSHIMURA E., MORI S., NISHIZAWA N. K., 2005. *Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants*. Plant Cell Physiol. 46, 1809–1818.
- KLAPHECK S., FLIEGER W., ZIMMER I., 1994. *Hydroxymethyl-phytochelatins (γ -glutamylcysteine)-serine are metal-induced peptides of the Poaceae*. Plant Physiol. 104, 1325–1332.
- KOPCEWICZ J., LEWAK S., 1998. *Podstawy fizjologii roślin*. PWN, Warszawa.
- KRÄMER U., 2005. *Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils*. Curr. Opin. Biotechnol. 16, 133–141.
- KRÄMER U., COTTERHOWELLS J. D., CHARNOCK J. M., BAKER A. J. M., 1996. *Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel*. Nature 379, 635–638.
- KRÄMER U., GRIME G. W., SMITH J. A. C., HAWES C. R., BAKER A. J. M., 1997. *Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant Alyssum lesbiacum*. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B 130, 346–350.
- KRÄMER U., TALKE I. N., HANIKENNE M., 2007. *Transition metal transport*. FEBS Lett. 581, 2263–2272.
- KROTZ R. M., EVANGELOU B. P., WAGNER G. J., 1989. *Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide, and organic acid in tobacco suspension cells*. Plant Physiol. 91, 780–787.
- KÜPPER H., MIJOVILOVICH A., MEYER-KLAUCKE W., KRONECK P. M. H., 2004. *Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator Thlaspi caerulescens (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy*. Plant Physiol. 134, 748–757.
- KUBOTA H., SATO K., HAMADA T., MAITANI T., 2000. *Phytochelatins homolog induced in hairy roots of horseradish*. Phytochemistry 53, 239–245.
- LANE B., KAJOIK R., KENNEDY T., 1987. *The wheat-germ E protein is a zinc-containing metallothionein*. Biochem. Cell Biol. 65, 1001–1005.
- MA J. F., RYAN P. R., DELHAIZE E., 2001. *Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids*. Trends Plant Sci. 6, 273–278.
- MACFARLANE G. R., BURCHETT M. D., 1999. *Zinc distribution and excretion in the leaves of the grey mangrove, Avicennia marina (Forsk.) Vierh.* Environ. Exp. Bot. 41, 167–175.
- MARTEL E. A., 1974. *Radioactivity of tobacco trichomes and insoluble cigarette smoke particles*. Nature 249, 215–217.
- MATHYS W., 1977. *The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbaceous plants*. Physiol. Plant 40, 130–136.
- MCLAUGHLIN M. J., PARKER D. R., CLARKE J. M., 1999. *Metals and micronutrients – food safety issues*. Field Crop Res. 60, 143–163.
- MEUWLY P., THIBAUT P., SCHWAL A. L., RAUSER W. E., 1995. *Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize*. Plant J. 7, 391–400.
- MIR G., DOMENECH J., HUGUET G., GUO W.-J., GOLDSBROUGH P., ATRIAN S., MOLINAS M., 2004. *A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress*. J. Exp. Bot. 55, 2483–2493.
- MISHRA S., SRIVASTAVA S., TRIPATHI R. D., GOVINDARAJAN R., KURIAKOSE S. V., PRASAD M. N. V., 2006. *Phytochelatins synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in Bacopa monnieri L.* Plant Physiol. Bioch. 44, 25–37.
- MURPHY A., ZHOU J., GOLDSBROUGH P., TAIZ L., 1997. *Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 113, 1293–1301.
- NELSON N., 1999. *Metal ion transporters and homeostasis*. EMBO J. 18, 4361–4371.
- NEUMANN D., ZUR NIEDEN U., LICHTENBERGER O., LEOPOLD I., 1995. *How does Armeria maritima tolerate high heavy metal concentrations?* J. Plant Physiol. 146, 704–717.
- NEUMANN D., ZUR NIEDEN U., SCHWEIGER W., LEOPOLD I., LICHTENBERGER O., 1997. *Heavy metal tolerance*.

- rance of *Minuartia verna*. J. Plant Physiol. 151, 101–108.
- NIGAM R., SRIVASTAWA S., PRAKASH S., SRIVASTAWA M. M., 2001. Cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots. Plant Soil 230, 107–113.
- ORTIZ D., RUSCITTI T., MCCUE K. F., OW D. W., 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. J. Biol. Chem. 270, 4721–4728.
- PICH A., SCHOLZ G., 1996. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill): Nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. J. Exp. Bot. 47, 41–47.
- ROOSENS N. H., BERNARD C., LEPLAE R., VERBRUGGEN N., 2004. Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. FEBS Lett. 577, 9–16.
- SALT D. E., RAUSER W. E., 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. Plant Physiol. 107, 1293–1301.
- SALT D. E., PRICE R. C., BAKER A. J. M., RASKIN I., PICKERIN I. J., 1999. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 33, 713–717.
- SCHURR U., SCHULZE E. D., 1996. Effect of drought on nutrient and ABA transport in *Ricinus communis*. Plant Cell Environ. 19, 665–674.
- SENDEN M. H. M., WOLTERBEEK H. A. T., 1990. Effect of citric acid on the transport of cadmium through xylem vessels of excised tomato stem-leaf systems. Acta Bot. Neerl. 39, 297–303.
- SENDEN M. H. M., VAN DER MEER A. J. G. M., VERBURG T. G., WOLTERBEEK H. Th., 1994. Effects of cadmium on the behaviour of citric acid in isolated tomato xylem cell walls. J. Exp. Bot. 45, 597–606.
- SETH C. S., CHATURVEDI P. K., MISRA V., 2008. The role of phytochelatin and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. Ecotox. Environ. Safe 71, 76–85.
- STEFFENS J. C., 1990. The heavy-metal binding peptides of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41, 553–575.
- TALKE I. N., HANIKENNE M., KRAMER U., 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. Plant Physiol. 142, 148–147.
- TESTER M., LEIGH R. A., 2001. Partitioning of nutrient transport processes in roots. J. Exp. Bot. 52, 445–457.
- TRIPATHI R. D., RAI U. N., GUPTA M., CHANDRA P., 1996. Induction of phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L) royle under cadmium stress. Bull. Environ. Contam. Tox. 56, 505–512.
- VATAMANIUK O. K., BUCHER E. A., SUNDARAM M. V., REA P. A., 2005. CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. J. Biol. Chem. 280, 23684–23690.
- VON WIREN N., KLAIR S., BANSAL S., BRIAT J. F., KHORD H., SHIOIRI T., LEIGH R. A., HIDER R. C., 1999. Nicotianamine chelates both Fe-III and Fe-II. Implications for metal transport in plants. Plant Physiol. 119, 1107–1114.
- WNITZ H., FOX T., WU Y.-Y., FENG V., CHEN W. Q., CHANG H. S., ZHU T., VULPE C., 2003. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. J. Biol. Chem. 278, 47644–47653.
- YANG X. E., BALIGAR V. C., FOSTER J. C., MARTENS D. C., 1997. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels. Plant Soil 196, 271–276.