

Uloga fitohelatina u toleranciji na teške metale u biljaka

Jurić, Dragan

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:285590>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Uloga fitohelatina u toleranciji na teške metale u biljaka
The role of phytochelatin in tolerance to heavy metals in plants

SEMINARSKI RAD

Dragan Jurić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

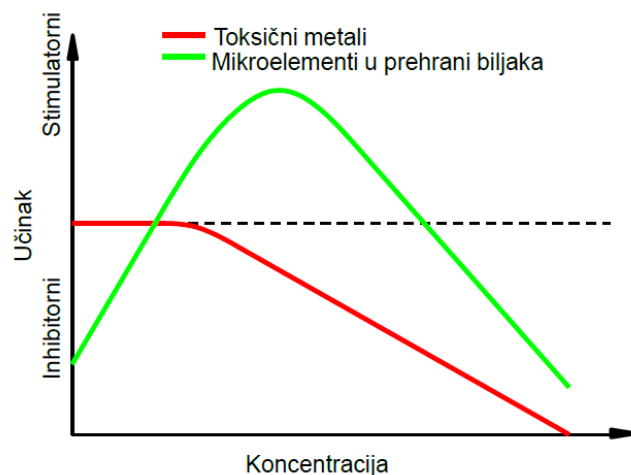
1.	UVOD	1
1.1.	Toksičnost teških metala u biljkama	3
1.2.	Tolerancija na stres uzrokovan teškim metalima.....	4
2.	FITOHELATINI I NJIHOVA ULOGA U BILJKAMA	5
2.1.	Osnovna uloga fitohelatina.....	6
2.2.	Molekularni mehanizam djelovanja fitohelatina	7
2.3.	Manipulacija genima uključenim u biosintezu fitohelatina i utjecaj na toleranciju na teške metale	9
3.	ZAKLJUČAK	10
4.	LITERATURA.....	11
5.	SAŽETAK.....	13
6.	SUMMARY	13

1. UVOD

U užem smislu, pojam teški metali (HM, prema "heavy metals") uključuje samo elemente specifične gustoće iznad 5 g/cm^3 , ali biolozi često koriste ovaj izraz za širok spektar metala i polumetala koji su otrovni za biljke, kao što su npr. bakar (Cu), željezo (Fe), mangan (Mn), cink (Zn), nikal (Ni), kobalt (Co), kadmij (Cd), arsen (As). Nekoliko teških i drugih metala kao što su kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), Fe, Cu, Zn, Co, ili Ni su, u određenim koncentracijama, esencijalni mikroelementi koji su uključeni u funkcionalne aktivnosti velikog broja enzima i potrebni su za normalan rast i razvoj biljke (Slika 1). Tako su npr. bakar i cink potrebni za razne fiziološke procese. Ioni cinka, primjerice, služe kao kofaktori mnogih enzima, te veliki broj proteinskih sekvenci sadrži Zn^{2+} -vezujuće strukturne domene. Bakar je važna komponenta u reakcijama prijenosa elektrona posredovanih proteinima, kao što su plastocijanin, superoksid dismutaza, citokrom c oksidaze. Manjak esencijalnih metala može negativno utjecati na rast i razvoj biljaka, ali i ako su prisutni u supraoptimalnim koncentracijama, ti isti metali mogu biti štetni po organizam (Slika 1). Reaktivnost bakra, na primjer, može dovesti do stvaranja štetnih reaktivnih oblika kisika (ROS, prema "reactive oxygen species"). Nadalje, biljke se susreću s metalima kao što su kadmij, živa ili olovo, koji se obično smatraju neesencijalnim i potencijalno su vrlo toksični zbog reaktivnosti sa sumporom i dušikom u aminokiselinama. Stoga spomenuti metali i u vrlo niskim koncentracijama narušavaju rast i razvoj biljaka (Slika 1).

Kako bi se zadržala koncentracija esencijalnih metala u fiziološkim granicama, a također smanjili štetni utjecaji neesencijalnih metala, biljke su, poput svih ostalih organizama, razvile kompleksnu mrežu mehanizama koji služe za kontrolu unosa, akumulacije, prometa i detoksikacije metala.

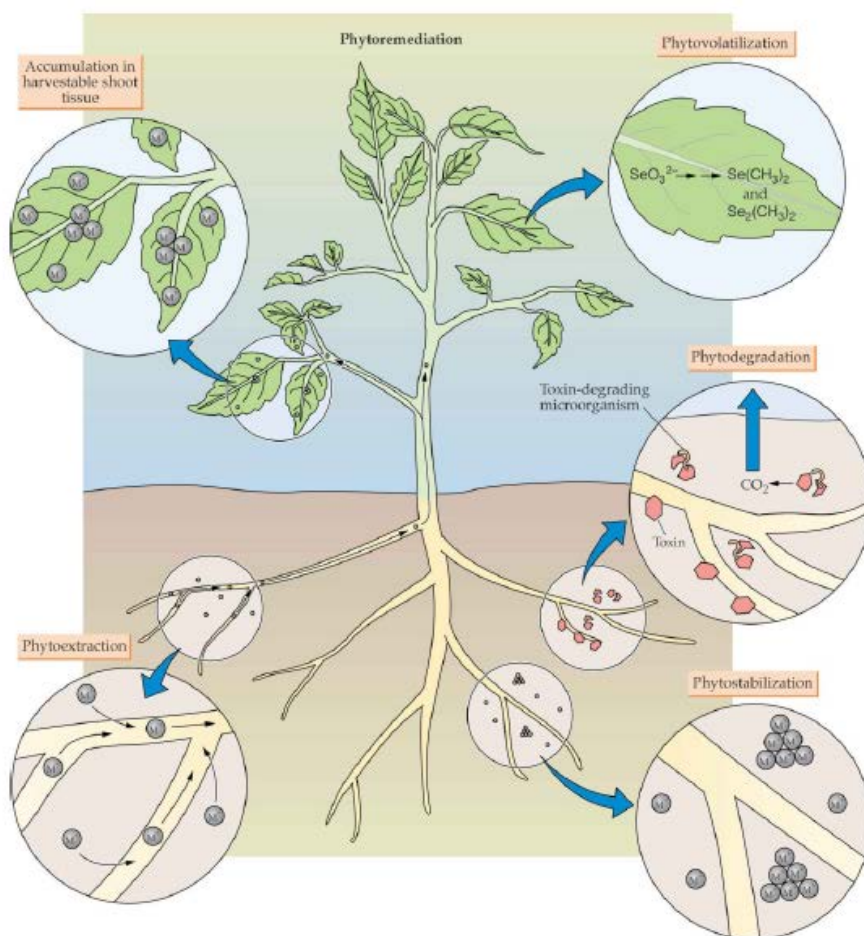
Homeostaza metala u biljnom organizmu ostvaruje se transportom, kelacijom i procesima uklanjanja. Regulirani mehanizmi osiguravaju pravilno primanje i distribuciju metalnih iona u stanicama kao i na razini organizma, što je rezultiralo osnovnom razinom tolerancije metala. Poremećaj jednog od tih kritičnih procesa dovodi do preosjetljivosti biljaka na teške metale (Howden i sur. 1995).



Slika 1. Prikaz djelovanja različitih koncentracija toksičnih i esencijalnih metala na razvoj biljke.

Osnovna razina tolerancije metala je sveprisutna u biljnim vrstama. Trenutni dokazi upućuju da biljke dijele nekoliko zajedničkih mehanizama tolerancije na metale. Neke biljne vrste i genotipovi, međutim, mogu rasti na tlu koje prirodno ili zbog ljudske aktivnosti sadrži metale u visokim koncentracijama pri kojima se većina biljaka ne može razvijati. Ove biljke pripadaju specijaliziranoj flori koja je kolonizirala tlo bogato niklom ili nekim drugim HM, ili područja zagađena, primjerice, zbog rudarske aktivnosti. Takve biljke posjeduju određene razine tolerancije koje su posljedica prirodne selekcije (hipertolerancija) (Chaney i sur. 1997). Uglavnom, ta tolerancija je specifična za određene metale (Schat i Vooijs 1997).

Neke biljke ne samo da toleriraju višu razinu metala, nego ih mogu akumulirati u povećanoj koncentraciji. Upravo zbog toga svojstva u današnje vrijeme se mogu koristiti za pročišćavanje tla od HM u procesu koji se naziva fitoremedijacija (Slika 2). U fitoremedijaciju se ubrajaju tri procesa: fitoekstrakcija odnosno uklanjanje toksina apsorpcijom, fitostabilizacija koja smanjuje mobilnost toksina vezanjem u području korijena te fitodegradacija kojom se toksični spojevi pretvaraju u spojeve koji su manje opasni po stanicu (Buchanan i sur. 2002).



Slika 2. Shematski prikaz fitoremedijacije. Preuzeto iz Buchanan i sur. (2002).

1.1. Toksičnost teških metala u biljkama

Prisutnost HM je jedan od glavnih abiotičkih stresnih čimbenika koji dovode do štetnih učinaka u biljaka. Česta posljedica prisutnosti tzv. redoks-aktivnih HM (Fe, Cu, Cr i Co) je prekomjerna akumulacija ROS i citotoksičnog metilglioksala (MG) koji mogu uzrokovati peroksidaciju lipida, proteina, oksidaciju i inaktivaciju enzima, oštećenje nukleinskih kiselina i interakciju s drugim sastojcima biljnih stanica. Biljke su razvile sofisticirani antioksidacijski obrambeni sustav i sustav gliksalaze za uklanjanje ROS i MG. I redoks inaktivni metali (npr. Cd) također mogu uzrokovati oksidacijski stres indirektnim mehanizmima, kao što je interakcija s antioksidacijskim sustavom. HM koji ulaze u stanicu mogu se vezati s aminokiselinama, organskim kiselinama, glutationom (GSH) ili sa specifičnim ligandima za vezanje metala. Vezanjem na tiolne skupine proteina, mogu utjecati na aktivnost enzima u citosolu i staničnim organelima.

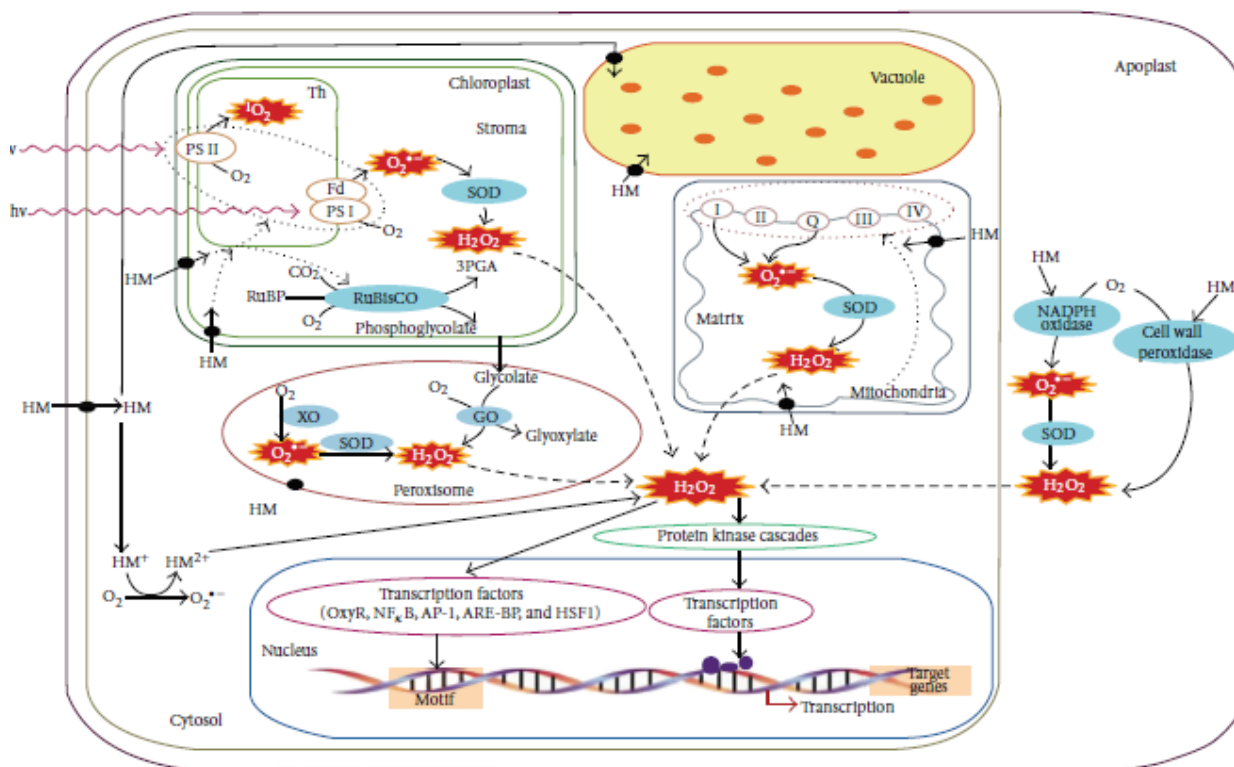
Biljke reagiraju na toksičnost HM na različite načine. Takve reakcije uključuju imobilizaciju, isključivanje i kelirajuću kompartmentalizaciju metalnih iona kao i nespecifične reakcije na stres poput indukcije biosinteze etilena i stresnih proteina te neutralizaciju ROS. Pregledni prikaz ovih mehanizama dali su Sanita di Toppi i Gabbrielli (1999) za biljke izložene kadmiju, teškom metalu čiji je učinak posljednjih desetljeća bio tema velikog broja istraživanja.

1.2. Tolerancija na stres uzrokovan teškim metalima

Biljni mehanizmi tolerancije zahtijevaju koordinaciju složenih fizioloških i biokemijskih procesa, uključujući i promjene ekspresije gena. Biljke koriste različite strategije za borbu s toksičnim učincima metala ili polumetala. Otpornost na stres uzrokovana HM može se postići "izbjegavanjem", kada biljke mogu ograničiti unos metala, ili "tolerancijom" kad biljke prežive u prisutnosti povišene unutarnje koncentracije metala. Izbjegavanje uključuje smanjenje količine metala koji ulaze u stanicu taloženjem u izvanstaničnom prostoru, biosorpcijom na elemente stanične stijenke, smanjenim uzimanjem ili povećanim oslobađanjem. Kod tolerancije se HM unutar stanice keliraju aminokiselinama, organskim kiselinama ili vezanjem HM na spojeve kao što su metalotioneini (MT) i fitohelatini (PC, prema "phytochelatins") te pohranjuju u vakuoli.

Nadalje, kao što je ranije spomenuto, stres uzrokovan HM može narušiti ravnotežu ROS u stanici. ROS, kao što su O_2^- , H_2O_2 i $\bullet OH$ su neizbježni nusprodukti aerobnog metabolizma i treba spomenuti da nisu uvijek nepoželjni toksični spojevi. Ponekad imaju ulogu važnih regulatora za mnoge biološke procese u biljkama, kao što su stanični ciklus, programirana stanična smrt, signalizacija i stanični odgovor na biotičke i abiotičke podražaje (Laloi i sur. 2004). ROS su u posljednjih nekoliko godina procijenjeni kao ključne signalne molekule za reguliranje funkcija i razvoja stanica (Rhee 2006). Na primjer, kao odgovor na stres od suše, ABA-om inducirani H_2O_2 regulira zatvaranje puči preko aktivacije kalcijevih kanala u plazmatskoj membrani (Pei i sur. 2000). Međutim, budući da se u različitim stresnim uvjetima, uključujući i u prisustvu HM, ROS generiraju u povećanoj količini, mogu uzrokovati opsežna stanična oštećenja. Dakle, antioksidacijski sustav treba učinkovito kontrolirati citotoksične učinke ROS. Sastoji se od antioksidacijskih enzima, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i askorbat peroksidaza (APX), te od antioksidansa niske molekularne mase, kao što su glutation, askorbat, karotenoidi, tokoferol, i dr. (Slika 3). Analiza transgene biljke s povećanom ekspresijom gena uključenih u biosintezu

antioksidansa pokazala je da je održavanje visokog antioksidacijskog kapaciteta u stanicama povezano s povećanom tolerancijom različitih stresnih uvjeta (Jayaraj i Punja, 2008; Tseng i sur. 2007).

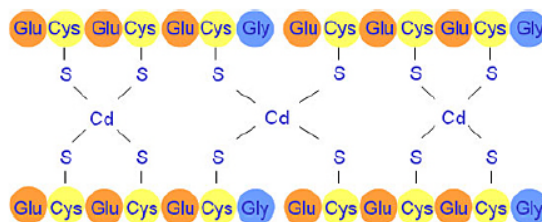


Slika 3. Indukcija odgovora na oksidacijski stres izazvan teškim metalima. Preuzeto iz Hossain i sur. (2012).

2. FITOHELATINI I NJIHOVA ULOGA U BILJKAMA

Jedan opći mehanizam za detoksikaciju HM u biljkama je kelacija metala pomoću liganada i, u nekim slučajevima, nakon toga slijedi uklanjanje tog kompleksa, najčešće unosom u vakuolu (kompartimentalizacija). Uloge nekih liganada pregledno su prikazane u radu Rausera (1999). Izvanstanična kelacija organskih kiselina, kao što su citrat i malat, važna je u mehanizmima tolerancije aluminija koji se inače ne ubraja u teške metale. Npr, oslobađanje malata iz korijena stimulira se izlaganjem aluminiju i korelira s tolerancijom aluminija u pšenici (Delhaize i Ryan 1995). Neke mutante vrste *Arabidopsis thaliana* (uročnjak) otporne na aluminij također oslobađaju iz korijena povećanu količinu organskih kiselina. Organske kiseline i neke aminokiseline, osobito histidin, također imaju ulogu u

keliranju metalnih iona unutar stanice i u ksilemu (Kramer i sur. 1996). Peptidni liganadi uključuju metalotioneine (MT), male polipeptide bogate cisteinom, koji su kodirani genima. Za razliku od njih, fitohelatini (PC) su enzimski sintetizirani peptidi bogati cisteinom, opće strukture $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{Gly}$ ($n = 2\text{-}11$) koji mogu vezati metale (Slika 4). Sintetizira ih enzim fitohelatin sintaza u prisutnosti HM kao što su Hg, Cu, Zn, Pb i Ni. PC se nalaze se u biljkama, gljivama i algama.

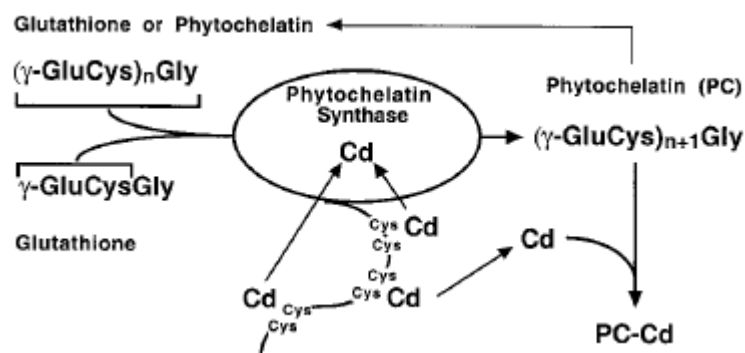


Slika 4. Shematski prikaz fitohelatina

2.1. Osnovna uloga fitohelatina

Kao što je ranije spomenuto, da bi smanjile štetne učinke izloženosti HM i njihove akumulacije, biljke su razvile mehanizme detoksikacije. Takvi mehanizmi uglavnom se temelje na kelaciji i substancičnoj kompartmentalizaciji HM. Kelacija HM je sveprisutna strategija detoksikacije istražena i opisana u raznim biljkama. Glavna skupina kelatora HM poznata u biljkama su fitohelatini (PC), obitelj peptida bogatih cisteinom. Oni se sintetiziraju iz reduciranog glutationa (GSH) u reakciji kataliziranoj enzimom fitohelatin sintazom (PCS) (Slika 5). Dakle, dostupnost glutationa je vrlo bitna za sintezu fitohelatina u biljkama, barem tijekom izloženosti HM.

Fitohelatini tvore komplekse s toksičnim metalnim ionima u citosolu, a zatim ih transportiraju u vakuole (Salt i Rauser 1995) i na taj način štite biljke od štetnog učinka HM. Najprije su bili izolirani iz suspenzije biljnih stanica nakon izloženosti Cd (Grill i sur. 1985).



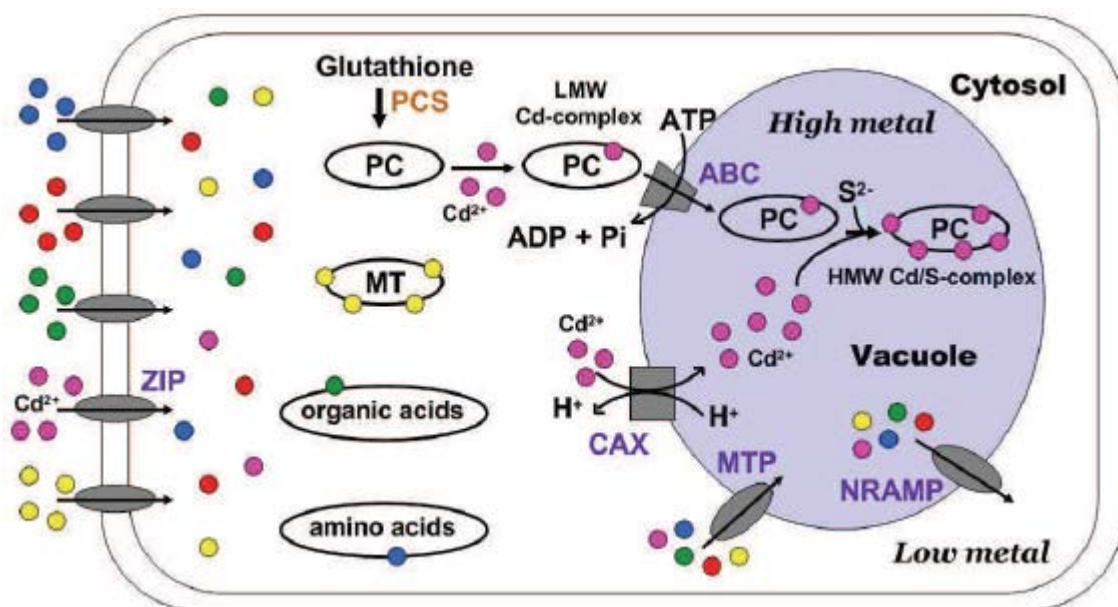
Slika 5. Prikaz sinteze fitohelatina uz pomoć enzima fitohelatin sintaze. Preuzeto iz Cobbett (2000).

Međutim, biosinteza fitohelatina je inducirana izlaganjem ne samo Cd, nego i drugim HM kao što Hg, Cu, Zn, Pb i Ni. Brojna fiziološka istraživanja su pokazala ulogu fitohelatina u detoksikaciji HM kao i u održavanju homeostaze u stanici (Zenk 1996).

2.2. Molekularni mehanizam djelovanja fitohelatina

Nedavni napredak u razumijevanju aspekata biosinteze i funkcija PC izveden je uglavnom iz molekularnog pristupa pomoću modelnih organizama. Pokusi *in vitro* su pokazali da kompleksi PC-Cu i PC-Zn mogu aktivirati enzim diamino-oksidadu ovisnu o bakru i enzim karboanhidrazu ovisnu o cinku. Ovi eksperimenti pokazuju da su kompleksi PC i metala sposobni donirati metalne ione enzimu koji zahtijeva metale (Zenk 1996). Međutim, trenutno ne postoji izravan dokaz da u uvjetima *in vivo* fitohelatini imaju i jednu drugu funkciju osim u metalnoj detoksikaciji. Dokazano je da fitohelatini imaju ulogu u detoksikaciji kadmija. Dok većina eksperimentalnih studija koristi koncentracije Cd iznad 1 μM (Sanita di Toppi i Gabbrielli 1999), procijenjeno je da je u otopinama nezagađenog tla koncentracija Cd do 0,3 μM Cd (Wagner 1993). U biljaka koje rastu na tlima s niskim sadržajem Cd, taj će metal biti vezan u kompleksu sa citratom i u tom obliku pohranjen u vakuoli, dok kod biljaka koje rastu na tlima s visokim sadržajem Cd, bit će vezan u kompleksu s fitohelatinom. Suprotno tom argumentu je opažanje da je mutanta vrste uročnjaka koja ne sintetizira fitohelatin vrlo osjetljiva na koncentracije Cd koje su vrlo niske. Čak i na koncentraciji Cd na koju mutanta očito nije osjetljiva, divlji tip ipak ima selektivnu prednost, što sugerira da fitohelatini ipak mogu imati određenu ulogu i u okruženju u kojem su HM prisutni u neznatnoj koncentraciji. Nepostojanje mutanata drugih vrsta koje ne sintetiziraju fitohelatin otežava rješavanje ovog problema.

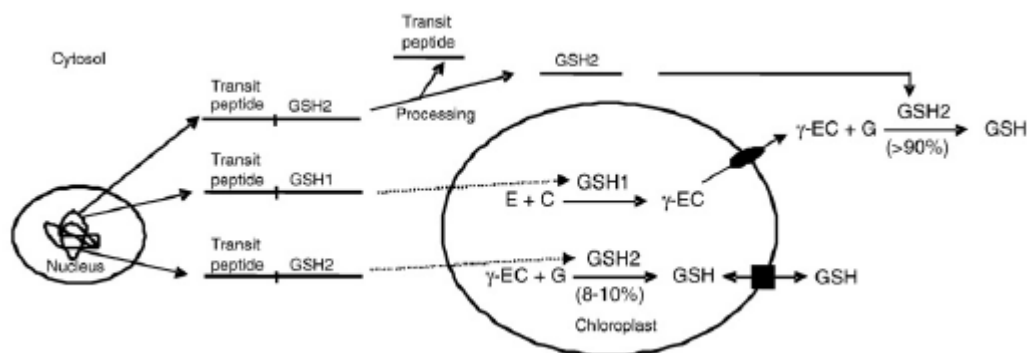
U procesu biosinteze PC, metalni ion mora aktivirati fitohelatin sintazu, formirati kelat sa sintetiziranim fitohelatinom, te se zatim transportirati u vakuole (Slika 6) i eventualno formirati složeniju agregaciju u vakuolama, na primjer, sulfidom ili organskim kiselinama (Rauser 1999). Za Cd, nesposobnost organizma za obavljanje bilo kojeg od ovih koraka smanjuje sposobnost organizma za detoksikaciju i time daje osjetljiv fenotip. Fitohelatini, čini se, imaju manje značajnu ulogu u detoksikaciji metalnih iona kao što su Cu, Zn, Ni i SeO_3^{2-} u vrsti *Arabidopsis*. Fitohelatin sintaza se učinkovito aktivira sa Cu *in vitro*, te fitohelatini mogu kelirati Cu *in vitro*, ali nepoznato je mogu li fitohelatini učinkovito kelirati Cu *in vivo* i mogu li se PC-Cu kompleksi, ako se formiraju, izdvojiti u vakuole. Zn i Ni su relativno neučinkoviti aktivatori fitohelatin sintaze *in vitro*. Moguće je da za to postoje alternativni, učinkovitiji mehanizmi detoksikacije, poput MT ili histidina. Histidin je aminokiselina koja sudjeluje u održavanju homeostaze iona nikla, dok MT sudjeluje u detoksikaciji esencijalnih metala kao što su cink i bakar te također i nekih neesencijalnih kao kadmij i arsen (Cobbett 2000).



Slika 6. Prikaz aktivacije fitohelatin sintaze pomoću kadmija te njegov daljnji transport u vakuolu. Preuzeto iz Yang i Chu (2011).

2.3. Manipulacija genima uključenim u biosintezu fitohelatina i utjecaj na toleranciju na teške metale

Tolerancija HM dugo se istražuje manipulacijom genima povezanim s biosintezom glutationa (Slika 7) i genima za fitohelatin sintazu u biljaka. Geni koji kodiraju enzime poput γ -glutamylcystein sintetaze (GSH1), glutation-sintetaze (GSH2), cistationin sintaze (CTS), ATP sulfurylase (APS), serin acetiltransferaze (SAT), glutation reduktaze (GR), fitohelatin sintaze (PCS) i glioksalaza (glioksalaza I i II) su potencijalni kandidati za ostvarivanje tolerancije HM reguliranjem razine GSH i fitohelatina. Povećana ekspresija gena za te enzime pridonijela je većoj toleranciji i akumulaciji HM u različitim biljkama.



Slika 7. Model biosinteze glutationa u biljnim stanicama. Preuzeto iz Yadav (2010).

Transgenične linije duhana (*N. tabacum* cv. LA Burley 21) koje eksprimiraju tri gena koji kodiraju enzime kao što je SAT, koji su uključeni u proizvodnju prekursora cistein O-acetilserina, zatim GSH1 koji je uključen u proizvodnju GSH prekursora γ -glutamylcisteina (γ -EC) te na kraju PCS, utvrđeno je da su nužni za učinkovitu proizvodnju fitohelatina. U tim transgenim linijama autori su analizirali sadržaj neproteinskih tiola i akumulaciju kadmija. Biljke koje su eksprimirale navedene transgene imale su povećanu koncentraciju kadmija u korijenu, ali ne i u stabljici, te povećanu količinu neproteinskih tiola u usporedbi s biljkama divljeg tipa (Wawrzyński i sur. 2006) što upućuje na njihovu ulogu u toleranciji HM u biljkama.

Ekspresija gena za GSH1 poboljšava toleranciju na As znatno iznad razine tolerancije u divljeg tipa. Naime, provedeno je istraživanje u kojem su uročnjaku osjetljivom na teške metale zbog nedostatka gena za GSH1, dodali modificirani bakterijski gen za GSH1 (S1ptECS) u izdanak. Takve transgene biljke imale su snažnu indukciju gena za GSH1 te

povišene koncentracije γ -EC i PC što je na kraju rezultiralo potpunim povratkom tolerancije na As. Također, u izdancima i korijenu tih transgenih biljaka razine GSH su bile dva do pet puta veće nego kod divljeg tipa. Dakle, γ -EC i GSH učinkovito se prenose od izdanka do korijena (Li i sur. 2006).

Mogući mehanizam fitoremedijacije opisan je za As. As se u biljkama transportira kao oksianonski arsenat. Tijekom prijenosa u nadzemne dijelove biljke, oksianion prelazi u arsenit koji zatim formira komplekse s tiolnim skupinama GSH i fitohelatina. *Arabidopsis thaliana* s prekomjernom ekspresijom gena za GSH1 i bakterijskog gena *arsC* koji kodira za arsenat-reduktazu posjeduje značajno veću toleranciju na arsenove spojeve u usporedbi s transgeničnom biljkom koja prekomjerno eksprimira jedino gen GSH1 ili divljim tipom. Dakle, pojačana ekspresija gena *arsC* i gena za GSH1 potencijalno pridonose toleranciji i akumulaciji As. Ova strategija remedijacije arsena potencijalno se može koristiti za razne biljke (Dhankher i sur. 2002).

3. ZAKLJUČAK

Mehanizmi tolerancije na HM omogućuju biljkama rast i razvoj u okolišu u kojem su zbog prirodnih procesa ili djelovanja čovjeka metali prisutni u povišenim koncentracijama. Tolerancija biljaka na HM je multigena osobina i kontrolira se na više razina. Biljke su razvile kompleksnu mrežu mehanizama koji služe za kontrolu unosa, akumulacije, prometa i detoksikacije metala. Glavni procesi održavanja homeostaze metala su transport, kelacija i procesi izdvajanja te će poremećaj bilo kojeg od tih procesa dovesti do preosjetljivosti na HM. Fitohelatini su mali, cisteinom bogati peptidi koji se sintetiziraju iz reduciranog glutaciona uz prisutnost iona metala. Mogu se naći u biljkama, gljivama i algama. Oni sa ionima metala tvore komplekse u citosolu te ih prenose u vakuole i tako štite biljku od negativnog utjecaja HM. Iako još uvijek postoji niz neodgovorenih pitanja o načinu djelovanja fitohelatina te o ostalim mehanizmima koji održavaju homeostazu HM, daljnja istraživanja rezultirat će boljim uvidom u same procese što bi na kraju moglo dovesti do široke upotrebe biljaka u pročišćavanju tla od HM procesom fitoremedijacije .

4. LITERATURA

1. Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2002). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. First Edition, American Society of Plant Biologists.
2. Chaney, R., Malik, M., Li, Y., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S. & Baker, A. J. M. (1997). Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology 8: 279-284.
3. Cobbett, C. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiology 123: 825-832.
4. Delhaize, E. P. & Ryan, R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiology 107: 315-321.
5. Dhankher, O. P., Li, Y., Rosen, B. P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J. F., Sashti, N. A. & Meagher, R. B. (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and -glutamylcysteine synthetase expression. Nature Biotechnology 20: 1140–1145.
6. Grill, E., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of plants. Science 230: 674–676.
7. Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T. & Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. Journal of Botany 2012: 37 pages, Article ID 872875, doi:10.1155/2012/872875
8. Howden, R., Goldsbrough, P. B., Anderson, C. R. & Cobbett, C. S. (1995). Cadmium sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. Plant Physiology 107: 1059–1066.
9. Jayaraj, J. & Punja, Z. K. (2008). Transgenic carrot plants accumulating ketocarotenoids show tolerance to UV and oxidative stresses. Plant Physiology Biochemistry 46: 875-883.
10. Kramer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J. M. & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature 379: 635–638.
11. Laloi, C., Apel, K. & Danon, A. (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. Current Opinion in Biotechnology 7: 323-328.

12. Li, Y., Dankher, O. P., Carreira, L., Smith, A. P. & Meagher, R. B. (2006). The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the longdistance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology* 141: 288–298.
13. Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. & Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734.
14. Rauser, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31: 19-48.
15. Rhee, S. G. (2006). H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312, 1882-1883
16. Salt, D. E. & Rauser, W. E. (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* 107: 1293–1301.
17. Sanita di Toppi, L. & Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
18. Schat, H. & Vooijs, R. (1997). Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*, a co-segregation analysis. *New Phytology* 136: 489-496.
19. Tseng, M. J., Liu, C. W. & Yiu, J. C. (2007). Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiol Biochemistry* 45: 822-833.
20. Wagner, G. J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* 51: 173-212.
21. Wawrzyński, A., Kopera, E., Wawrzyńska, A., Kamińska, J., Bal, W. & Sirko, A. (2006). Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 2173–2182.
22. Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76: 167–179.
23. Yang, Z. & Chu, C. (2011). Towards understanding plant response to heavy metal stress. U: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, Ur. A. Shanker i B. Venkateswarlu, InTech, DOI: 10.5772/24204. Available from:
<http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/towards-understanding-plant-response-to-heavy-metal-stress>

24. Zenk, M. H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants: a review. *Gene* 179: 21–30.

5. SAŽETAK

Biljke izložene teškim metalima primaju određenu količinu metalnih iona koji ometaju staničnu homeostazu. Da bi smanjile štetne učinke teških metala biljke su razvile mehanizme izbjegavanja, detoksikacije i tolerancije. Takvi mehanizmi uglavnom se temelje na kelaciji, substaničnoj kompartmentalizaciji te neutralizaciji ROS. Fitohelatini su vrsta kelatora koji se sintetiziraju samo u prisustvu teških metala te s njima stvaraju komplekse koji se transportiraju u vakuolu i na taj način pomažu pri stvaranju tolerancije na teške metale u biljkama.

6. SUMMARY

Plants exposed to heavy metals uptake a certain amount of metal ions which interfere with cell homeostasis. Plants have developed mechanisms of avoidance, detoxification and tolerance of heavy metals in order to reduce their harmful effects. Such mechanisms are generally based on chelation, subcellular compartmentalization and neutralization of ROS. Phytochelatins are a type of chelators which are only synthesised in the presence of heavy metals. They form complexes with them and transport them to the vacuole and thus assist in the creation of heavy metal tolerance in plants.