

## Nové poznatky v genetice rostlin VI. Tolerance rostlin k těžkým kovům

Moderní metody genomiky jsou uplatnitelné nejen při komplexních studiích typu sekvenování jednotlivých chromozomů a genomů, ale i při odhalování genů, které hrají roli v důležitých životních procesech. Jedním z takových procesů je schopnost rostlin tolerovat zvýšené koncentrace těžkých kovů. Rostliny, stejně jako ostatní organismy, si vyvinuly mechanismy pro udržení optimálních koncentrací těžkých kovů v buňkách a pletivech. Rovnováha příjmu a výdeje těchto prvků v organismu má zásadní význam nejen pro regulaci důležitých enzymatických reakcí, jichž jsou těžké kovy součástí, ale hlavně pro omezení škodlivých dopadů na buněčný metabolismus při jejich zvýšené koncentraci. Jak vzniká tolerance ke zvýšenému obsahu těžkých kovů v půdě? Jaké evoluční procesy takové adaptace provázejí? A jaké geny jsou za uvedenou toleranci zodpovědné?

Jako těžké kovy se nejčastěji označují prvky s hustotou vyšší než  $5 \text{ g/cm}^3$ . Do této skupiny patří měď, zinek, kadmium, rtuť, olovo, chrom, nikl, mangan, železo atd.

Mnoho těžkých kovů je pro fungování rostlin (resp. všech živých organismů) nezbytných. Např. měď jako kofaktor některých proteinů hraje důležitou roli v přenosu elektronů během fotosyntézy a buněčného dýchání. Zinek se podílí na aktivaci řady enzymatických reakcí. Ovšem i tyto biologicky významné mikroelementy jsou

pro většinu rostlin ve vysokých koncentracích toxické. Toxicita těžkých kovů spočívá často v chemické podobnosti s jinými prvky – při záměně určitých mikroelementů za toxický prvek v proteinech (především v enzymech) dochází k narušení správné funkce těchto biomolekul. Nadbytek těžkých kovů v buňce může vést ke vzniku volných kyslíkových radikálů, a to buď přímo účastí v redoxních reakcích (zejména v případě mědi a železa), či nepřímo způsobením stresu. Tyto radikály



poškozují buněčné membrány, DNA, proteiny, lipidy i sacharidy, ale mohou hrát rovněž pozitivní roli při signalizaci stresu v rostlině.

Zdrojem těžkých kovů v životním prostředí jsou přirozené geochemické procesy, antropogenní činnost a mikrobiální aktivita. Bývají rozptýleny v půdě a sedimentech, rozpuštěny v podzemních a povrchových vodách, ale vyskytují se také v ovzduší. Tyto rizikové prvky v přírodě přetrvávají tisíce let a negativně ovlivňují biologické a fyzikálně-chemické procesy v půdě, vstupují do potravinového řetězce a ohrožují zdraví člověka. Do půdy se dostávají většinou v důsledku imisí z průmyslové činnosti a dopravy, také z odpadů průmyslové výroby, při zaplavení půdy znečištěnou vodou, používáním pesticidů







**1** Mezi první objevitele fenoménu tolerance rostlin k těžkým kovům patří rodák z moravských Hrotovic a významný rostlinný fyziolog Silvestr Prát – na snímku se svou manželkou, slavnou českou numizmatičkou Emanuelou Nohejlovou-Prátovou. Narodil se do učitelské rodiny a v těchto šlépějích pokračoval, v r. 1934 se stal profesorem kryptogamologie a fyziologie rostlin na tehdejší Karlově univerzitě. Jeho zájem o výživu rostlin přinesl některá pozorování, jež sice patřila k okrajovým ohledně jeho vlastního vědeckého směřování, ale dodnes jsou považována za klíčová. V tomto ohledu jednoznačně dominuje právě objev tolerance rostlin k těžkým kovům. Prátův popis populací silenky dvoudomé (*Silene dioica*) tolerantních k mědi pozorovaný v okolí obce Špania Dolina poblíž Banské Bystrice na Slovensku a publikovaný v r. 1934 zůstal 20 let v podstatě nepochopen a bez reakce vědecké veřejnosti. Vlastní práce není jen pozorováním rostlin a jejich schopnosti růst v různých koncentracích mědi, Prát pomocí křížení ukázal i genetickou podstatu studovaného fenoménu. V současné době jsou tyto práce hojně citovány a pokládány za revoluční. Foto z archivu Z. Opatrného

**2** Zájem o rostliny tolerující těžké kovy zažívá renesanci (oproti r. 2000 došlo v r. 2016 k téměř 10násobnému nárůstu počtu vědeckých publikací). Např. v rámci spolupráce Oddělení vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR v Brně a Centra strukturální a funkční genetiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci se věnujeme výzkumu genetické podmíněnosti tohoto typu tolerance. Rostlinné vzorky odebíráme v katastru obce Špania Dolina na haldě, která vznikla po těžbě mědi v této již tradiční lokalitě. Těžba probíhala téměř čtyři staletí a byla zastavena až v r. 1888. Na základě tohoto studia bylo v posledních letech publikováno několik prací o mechanismech tolerance k těžkým kovům u silenky nadmuté (*S. vulgaris*) a silenky dvoudomé. Foto R. Hobza

**3** Povrch haldy u obce Špania Dolina. Modré a zelené zbarvení kamenů je způsobeno minerály mědi. Foto R. Hobza

**4** Test tolerance k mědi – nahoře kontrolní půda, dole půda se zvýšenou koncentrací tohoto prvku. Rostliny silenky dvoudomé z populace Tišnov



(oba květináče vlevo), populace Špania Dolina (uprostřed) a laboratorní linie silenky širokolisté (*S. latifolia*) U15 byly pěstovány pět týdnů ve skleníku. Je patrné, že tolerantní k mědi jsou pouze rostliny z populace rostoucí na haldě v obci Špania Dolina. Foto V. Hudzieczek

nebo hnojením půdy minerálními průmyslovými hnojivy a komposty obsahujícími kontaminanty, dále haváriemi, ale i přírodními jevy, např. vulkanickou činností nebo sesuvy půdy.

Přestože se může zdát, že díky novým předpisům a normám a současně útlumu (lokálnímu) průmyslové a zemědělské výroby klesá koncentrace těžkých kovů v prostředí, není vše tak jednoduché a jednoznačné, jak to může na první pohled vypadat. Oceány v podstatě tvoří cílovou destinaci koloběhu většiny škodlivých látek v prostředí. Jak se postupně snižuje pH oceánů, dochází v nich i k dramatickému nárůstu koncentrace nevázaných těžkých kovů, což bylo dokumentováno na příkladu kadmia. Dlouhodobý efekt tohoto procesu je těžké předpovědět. Další výzvou je era lithium-iontových baterií. Tato stále se rozšiřující forma uchování energie, která vstupuje nejen do automobilového průmyslu, s sebou přináší i problémy s recyklací těžkých kovů, které tvoří součást baterií, jako je nikl, kobalt a měď.

### Obecná charakteristika tolerance rostlin k těžkým kovům

Rostliny nemají možnost pohybu, proto jediný způsob, jak se vyrovnat se stresovými podmínkami, představuje adaptace. Toleranci rostlin k těžkým kovům poprvé popsal nestor české rostlinné fyziologie Silvestr Prát (1895–1990, obr. 1), který pozoroval geneticky podmíněnou toleranci silenky dvoudomé (*Silene dioica*, obr. na 2. str. obálky) k vysokým koncentracím mědi v půdě. Toto české prvenství nezůstalo zapomenuto a původní Prátova práce z r. 1934 bývá dodnes citována v prestižních vědeckých časopisech.

Od slavného Prátova objevu uplynulo již více než 80 let a tolerance k těžkým kovům byla dodnes popsána u několika stovek druhů vyskytujících se napříč celou rostlinnou říší. Rostliny, které přirozeně kolonizují půdy s vysokým obsahem těžkých kovů, nazýváme metalofyty. Podle způsobu nakládání s ionty těžkých kovů rozeznáváme dvě základní strategie tolerance –

vyločení (exclusion) a akumulaci (accumulation). Vyloučení znamená, že rostlina těžký kov do svých pletiv vůbec nepřijímá nebo ho urychleně vrací zpět do půdy, případně kov zůstává v kořeni a jeho transport do nadzemní části je velmi omezený. Napak akumulaci charakterizuje zesílený transport kovu do nadzemní části, což vede k několikanásobně vyšší koncentraci kovu v listech než v kořenech. Hromadění kovů v listech rostliny může způsobit snížení její oblíbenosti u fytofágních organismů (býložravců), a tudíž tato strategie znamená i možnost zvýšené obrany proti (zejména hmyzím) herbivorům.

### Tolerance k těžkým kovům jako fenomén v evoluční biologii

Drtivou většinu druhů, u nichž byla tolerance k těžkým kovům pozorována, označujeme jako fakultativní metalofyty. Takové rostliny snášejí vysoké koncentrace kovů v půdě, ale nejsou na tyto půdy vázané (na rozdíl od metalofytů obligátních, které jinde než v kontaminovaném prostředí nerostou). Důvodem je vznik lokálně přizpůsobených jedinců/populací/ekotypů se zvýšenou odolností. Z hlediska evoluční biologie jde o velmi zajímavou skutečnost, zejména proto, že velké množství lokalit kontaminovaných těžkými kovy vzniklo teprve nedávno působením člověka a můžeme tedy sledovat vznik adaptací na tyto podmínky takřka v reálném čase. Fenomén tolerance rostlin k těžkým kovům se tak pro evoluční a populační biologie stal jakýmsi botanickým ekvivalentem průmyslového melanismu (tento jev byl popsán během nástupu průmyslové revoluce v Anglii – jde o výskyt tmavě zbarvených, tedy melanických forem motýlů, které byly v prostředí znečištěném emisemi méně nápadné než původně rozšířené světlé formy téhož druhu).

V okolí těžce kontaminovaných substrátů (např. hald vytvořených těžbou – obr. 2 a 3) se nachází velké množství rostlinných druhů, nicméně kolonizovat tyto znečištěné lokality dokážou pouze některé z nich. Proč tedy metalofytní populace existují jen u určitých druhů? Vysvětlení zřejmě spočívá v rozdílné základní toleranci mezi jednotlivými druhy. U druhů s vyšší tolerancí se mohou odolní jedinci vyskytovat s větší pravděpodobností. Rovněž vlastnosti některých druhů (např. růst v kamenitěm terénu haldy nebo malé nároky na půdní živiny) mohou zvyšovat jejich šanci pro vznik



tolerantních populací. Genetické analýzy však naznačují, že lokální populace metalofytů se vyvinuly nezávisle na sobě a za toleranci k těžkým kovům u různých populací jednoho druhu zodpovídají různé geny.

Tolerance (obr. 4) se objeví zpravidla u jednoho či několika jedinců v populaci přilehlé kontaminované lokalitě (např. haldě). Tito jedinci ale dokážou kontaminované prostředí rychle kolonizovat, protože se v něm nevyskytují jejich běžní konkurenti. Tvrdá selekce na toleranci spolu s absencí kompetice má za následek postupné odlišení se od populace původní. U tolerantních populací byl navíc pozorován vznik reprodukčních bariér, které jsou charakteristické pro vznik nových druhů (termínem reprodukční bariéra, jejíž vytvoření je důležité kritérium pro speciaci, označujeme vlivy znemožňující křížení – genový tok – dvou jedinců různých populací nebo druhů). Jmenujme např. zvýšení podílu samosprášení, mezipopulační rozdíly v délce anebo době kvetení či hybridní sterilitu (kdy potomci křížení rodičů z různých populací jsou neplodní – jde o specifickou formu postzygotické reprodukční bariéry, která se často vyskytuje mezi dvěma divergujícími populacemi). Přestože ke vzniku nového druhu v důsledku odštěpení tolerantní populace dojít nemusí, prostá přítomnost environmentální bariéry (kterou jedinci původní populace nejsou schopni překonat), umožňuje studium raných jevů spojených se speciací.

### Molekulární mechanismy tolerance

Z fyziologického hlediska rostliny bojují proti negativním účinkům těžkých kovů zejména aktivním vyloučením kovů z organismu, snížením příjmu pomocí regulace membránových transportérů, tvorbou chelátů nebo např. uložením kovů do organel či orgánů, kde nepůsobí škody. Existuje mnoho dalších pomocných mechanismů detoxifikace, tvořících součást komplexní reakce na vysokou koncentraci těžkých kovů v organismu. Metalofyty jsou typické zesílením alespoň jedné z těchto drah, nicméně o molekulární podstatě vzniku a fungování tolerance k těžkým kovům toho donedávna nebylo příliš známo.

Moderní metody molekulární a buněčné biologie přispěly k objasnění, jaký je osud těžkých kovů v rostlinných tkáních a čím se odlišují metalofyty od svých netolerantních příbuzných. Nápomocny byly především dva druhy z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) – penízek modravý (*Noccaea caerulescens*, dříve *Thlaspi caerulescens*, obr. 5) a řeřišničník Hallerův (*Arabidopsis halleri*, dříve *Cardaminopsis halleri*), oba blízce příbuzné huseníčku rolnímu (*A. thaliana*), pro který vytvořila vědecká komunita nespočetné množství nástrojů potřebných k detailnímu studiu. Oba druhy snášejí přítomnost kadmia a zinku, přičemž akumulují velmi vysoké koncentrace těchto prvků v nadzemních orgánech (např. řeřišničník Hallerův hromadí v listech až 10 mg/g zinku v sušině, tedy přibližně 100× více, než je běžné).

Analýza genové exprese u řeřišničníku Hallerova odhalila výrazně vyšší hladinu transkriptu pro gen *Heavy Metal ATPase 4*



5 Penízek modravý (*Noccaea caerulescens*, dříve *Thlaspi caerulescens*).

Foto P. Symon

6 Mezi hlavní objekty zájmu studia tolerance k těžkým kovům patří silenka nadmutá. Na snímku rostlina na haldě poblíž lokality Piesky u obce Špania Dolina na Slovensku. Foto R. Hobza

(*HMA4*), který umožňuje rostlinám transportovat ionty kadmia a zinku do vodivých a zpevňovacích (vaskulárních) pletiv kořene. Následně bylo zjištěno, že *HMA4* je v genomu tohoto druhu přítomna ve třech kopiích (běžně se u rostlin vyskytuje jen jedna kopie genu *HMA4*), což zaručuje stabilní a vysokou expresi proteinového transportéru. Podobná situace se ukázala také u penízku modravého, kde tento gen najdeme v genomu dokonce čtyřikrát. (Pozn.: v genomech eukaryotních organismů, rostliny nevyjímaje, je velké množství genů duplikováno. Drtivou většinu těchto případů charakterizuje zvýšená hladina mediátorové RNA, mRNA, duplikovaného genu – jde o tzv. efekt dávky genů.) Další součástí navazující na pro-



tein *HMA4* je neesenciální aminokyselina nikotianamin, působící jako chelatační činidlo – váže ionty kovů, které mohou být vaskulárním pletivem (xylémem) transportovány do nadzemní části. Syntézu nikotianaminu katalyzují enzymy z rodiny NAS (Nicotianamine Synthase), jejichž exprese je v řeřišničníku Hallerově rovněž mnohem vyšší než u netolerantního huseníčku rolního. K dalším potenciálním kandidátům řadíme proteinové transportéry, přenášející zinek a kadmium z cytosolu do vakuoly. Právě přenos kovů do vakuoly může být logickým finálním krokem, jenž završí detoxikaci v nadzemních orgánech rostliny. Nicméně stále není úplně jasné, jak velkou měrou tyto transportéry k toleranci přispívají.

Jiným případem je ale silenka nadmutá (*S. vulgaris*, obr. 6), mimo jiné blízce příbuzná výše zmíněné silenice dvoudomé, u které vznikly populace s tolerancí vůči jednomu nebo i více kovům (měď, zinek, kadmium, nikl a kobalt). U populací tolerantních k mědi byla pozorována zvýšená exprese genu kódujícího tzv. metalothionein. Metalothioneiny jsou krátké proteiny s četným zastoupením aminokyseliny cysteinu, který váže ionty těžkých kovů. Větší množství metalothioneinů tak umožňuje ochránit rostlinné buňky. Naše laboratoř se v současné době zabývá popisem regulačních mechanismů zodpovědných za toleranci k těžkým kovům, a to jak u silenky nadmuté, tak u silenky dvoudomé. Vytvořili jsme první transkripční databáze těchto rostlin rostoucích v různých koncentracích vybraných těžkých kovů. Naším cílem je identifikovat geny hrající klíčovou úlohu v metabolismu těžkých kovů u rodu *Silene*. Do jaké míry budou výsledky uplatnitelné v širších souvislostech, ukážou vytvořené transgenické rostliny vzdálených druhů obsahující geny tolerance izolované ze silenek.

Výzkum řeřišničníku Hallerova, penízku modravého a silenky nadmuté ukazuje, jak mechanisticky funguje tolerance k těžkým kovům a jejich akumulace u těchto druhů, ale zároveň dává nahlédnout, jakými evolučními procesy mohou v přírodě vznikat adaptace k extrémním podmínkám. Výsledky získané studiem těchto modelových organismů naznačují, že za toleranci k těžkým kovům stojí odlišná regulace genů, které se běžně v rostlinách vyskytují, a to i u netolerantních druhů. Např. zvýšenou produkci proteinu *HMA4* u řeřišničníku Hallerova způsobují nejen změny v sekvenci promotoru genu *HMA4*, nýbrž i znásobení počtu kopií tohoto genu v genomu. Jaké další evoluční důsledky může takové zvýšení počtu genových kopií přinést, je předmětem právě probíhajících výzkumných programů.

Výzkum studia tolerance k těžkým kovům u silenky dvoudomé je finančně podpořen projektem Grantové agentury České republiky 13-34962P.

**Kolektiv spoluautorů: Martina Kintlová, Roman Hobza a Radim Čegan**

Seznam doporučené literatury najdete na webové stránce Živý.