

Tolerancja stresu metali ciężkich u roślin uprawnych: charakterystyka *in silico* genów MTP (Metal Tolerance Protein) u jęczmienia

dr Magda Grabsztunowicz¹✉,

mgr Ewelina Stolarska¹,

dr Umesh Kumar Tanwar¹,

prof. dr hab. Magdalena Arasimowicz-Jelonek²,

prof. UAM dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka¹

¹Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

²Zakład Ekofizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_559

✉ autor korespondujący: magda.grabsztunowicz@amu.edu.pl

Słowa kluczowe: stres metali ciężkich, fitoremediacja, geny MTP, jęczmień

Stosowane skróty: IG – geny bezintronowe (ang. *intronless genes*); MTP – białka tolerancji na metale (ang. *metal tolerance proteins*); SEG – geny jednoegzonowe (ang. *single exon genes*); uiSEG – geny jednoegzonowe z intronem w regionie niepodlegającym translacji UTR (ang. *UTR intron-containing SEGs*);

STRESZCZENIE

Zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi stanowi globalny problem zagrażający organizmom żywym. Jedną ze strategii rekultywacji gleby jest fitoremediacja polegająca na wykorzystywaniu roślinnych hiperakumulatorów wykazujących zdolność pobierania z gleby i akumulowania w tkankach znacznych ilości metali ciężkich. Wśród kandydatów do powszechnego wykorzystywania w fitoremediacji gleb wymienia się zboża, nadal jednak brakuje pełnego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tolerancji tych roślin na wysokie stężenia metali ciężkich. Białka tolerancji na metale, MTP (ang. *metal tolerance proteins*), są obecnymi w błonach komórek roślinnych transporterami kationów dwuwartościowych, kluczowymi dla utrzymania homeostazy i tolerancji roślin na metale ciężkie. Analizy zsekwencjonowanego genomu jęczmienia pozwoliły na pierwszą dotąd identyfikację 12 genów *HvMTP* o zróżnicowanej strukturze, które kodują białka różniące się między sobą masą cząsteczkową, obecnością konserwowanych domen oraz prawdopodobną lokalizacją wewnątrzkomórkową. Indukcja ekspresji genów *HvMTP* w odpowiedzi na stres metali ciężkich oraz inne stresy abiotyczne sugeruje istotną rolę tych genów w odpowiedzi roślin jęczmienia na niekorzystne warunki środowiska.

WPROWADZENIE

Metale ciężkie to różnorodna grupa pierwiastków, której kryteria wyodrębnienia nie są jednoznaczne i nadal podlegają dyskusji [1]. Zazwyczaj do metali ciężkich zalicza się metale bądź półmetale o wysokiej masie atomowej lub dużej gęstości, przekraczającej 5 g/cm³ [2]. Bardziej precyzyjną definicją mówi o pierwiastkach, które w układzie okresowym zlokalizowane są w grupach od 3 do 13 i przypisane są do okresu 4 lub większego [3]. W badaniach ekologicznych terminem „metale ciężkie” określa się pierwiastki kojarzone ze szkodliwym wpływem na organizmy żywe [4]. W istocie zanieczyszczenia metalami ciężkimi wiążą się z realnym zagrożeniem dla ekosystemów. Związki metali ciężkich są toksyczne, powszechne oraz łatwo pobierane ze środowiska przez rośliny, a tym samym wprowadzane do łańcuchów pokarmowych, stąd też stanowią istotne zagrożenie dla światowej produkcji żywności [5]. Wśród niekorzystnych oddziaływań metali ciężkich na zdrowie człowieka wymienia się upośledzenie funkcji enzymów, a także niekorzystny wpływ na wzrost i funkcjonowanie centralnego układu nerwowego (rtęć – Hg, ołów – Pb i arsen – As), nerek oraz wątroby (Pb i kadm – Cd) [6].

Do grupy metali ciężkich zalicza się takie pierwiastki, które nie pełnią żadnych fizjologicznie istotnych funkcji w organizmach żywych i są dla nich toksyczne nawet w bardzo niskich stężeniach. Do takich zalicza się m.in. aluminium (Al), arsen (As), kadm (Cd), ołów (Pb), rtęć (Hg) oraz srebro (Ag). Inne metale ciężkie uznawane są za pierwiastki niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, których nadmiar wywołuje jednak szkodliwe efekty. W tej grupie wymienia się ważne kofaktory enzymów oraz pierwiastki niezbędne do formowania czerwonych krwinek, prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego oraz immunologicznego, czyli żelazo (Fe), miedź (Cu), chrom (Cr), nikiel (Ni), kobalt (Co) i cynk (Zn) [2]. Chociaż metale ciężkie występują w środowisku naturalnie, to właśnie ich nadmierna akumulacja na skutek działalności człowieka ma charakter zanieczyszczeń stanowiących poważne zagrożenie dla funkcjonowania różnych środowisk. Uważa się, że wzrost stężenia metali ciężkich prowadzi do spadku bioróżnorodności oraz produkcji roślinnej, a tym samym wpływa niekorzystnie na strukturę i funkcjonowanie ekosystemów w obrębie litosfery, hydrosfery i atmosfery [7].

METALE CIĘŻKIE W GLEBIE I METODY JEJ OCZYSZCZANIA

Szczególną kategorię zanieczyszczeń metalami ciężkimi stanowią zanieczyszczenia gleby, zwłaszcza w obszarze rolniczym. Zanieczyszczenia takie charak-

teryzują się przede wszystkim długim czasem pozostawiania w glebie, wysoką toksycznością wobec organizmów żywych oraz złożonymi właściwościami chemicznymi i wywoływaniem reakcji ekologicznych [8]. Tym samym związki metali ciężkich zagrażają nie tylko mikroorganizmom glebowym i roślinom uprawnym, lecz także pośrednio zdrowiu zwierząt i ludzi [9].

Współczesne statystyki pokazują, że na skutek aktywności człowieka każdego roku do gleby przedostaje się ok. 5 milionów ton Pb, 15 milionów ton manganu (Mn), 3,4 miliona ton Cu, a także 1 milion ton Ni [10]. Szacunki dotyczące Chin wskazują, że aż 8,3% (10⁷ ha) wszystkich gleb uprawnych w tym kraju jest zanieczyszczona metalami ciężkimi takimi jak: As, Cd, Cu, Hg, Ni i Pb [11], co skutkuje stratami ekonomicznymi na poziomie ~2,91 miliardów dolarów amerykańskich rocznie [12].

Powszechność zanieczyszczeń gleb metalami ciężkimi wymaga rozwoju nowych, skutecznych technologii pozwalających na ponowne uzdatnianie skażonych terenów. Istniejące fizykochemiczne metody rekultywacji gleb, obejmujące m.in. wyplukiwanie czy ekstrakcję zanieczyszczeń rozpuszczalnikami lub parą wodną [13] są drogie, energochłonne i często prowadzą do powstawania wtórnych zanieczyszczeń powietrza lub wód gruntowych [13]. Stąd dużo uwagi w ostatnich latach poświęca się możliwości wykorzystania organizmów żywych w procesie oczyszczania gleby, tj. bioremediacji, jako metodzie znacznie tańszej, ekologicznej i niewymagającej dużych nakładów energetycznych. Szczególnie metody pozwalające na oczyszczanie gleby *in situ*, bez konieczności pobierania jej i traktowania w odległych laboratoriach, wydają się najbardziej obiecującą perspektywą w walce z rosnącymi zanieczyszczeniami gleby [13].

FITOREMEDIACJA

Wykorzystywanie roślin do oczyszczania środowiska określane jako fitoremediacja jest jedną ze skuteczniejszych technologii używanych w rekultywacji gleby. Istnieje kilka metod fitoremediacji, w tym fitostabilizacja, fitowolatyżacja i fitodegradacja, opisanych szczegółowo w licznych pracach przeglądowych [13-15]. Największe znaczenie w procesie rekultywacji gleb skażonych nadmiarem metali ciężkich ma jednak fitoakumulacja. Metoda ta opiera się na zdolności roślin do pobierania metali ciężkich z gleby razem z wodą i solami mineralnymi, a następnie transportowaniu ich do wyżej położonych tkanek wegetatywnych, gdzie dochodzi do ich akumulacji. W roślinie stężenia tak pobranych metali ciężkich zazwyczaj układają się malejąco od korzeni przez łodygi, liście, najmniej ich wykrywa się w owocach i nasionach [13,16]. Rośliny charakteryzujące się zdolnością do pobierania i akumulowania znacznych ilości metali ciężkich z gleby, tj. w ilościach nawet 50–500 krotnie wyższych od ich średnich zawartościach w roślinach, bez negatywnego wpływu na ich wzrost, określa się mianem hiperakumulatorów [17,18]. Rośliny te stanowią pole intensywnych badań mających na celu ustalenie przyjaznego środowiska, a zarazem taniego narzędzia w rozwiązywaniu istotnego problemu zanieczyszczenia środowiska [19,20].

Generalnie uważa się, że idealne hiperakumulatory powinny charakteryzować się rozwiniętym systemem korzeniowym, szybkim wzrostem, produkcją znacznej ilości biomasy oraz akumulacją i tolerancją wysokich stężeń metali ciężkich w swoich tkankach [13]. Ponadto w odróżnieniu od roślin niebędących hiperakumulatorami, które zatrzymują większość pobranych z gleby metali ciężkich w komórkach korzenia, hiperakumulatory wydajnie transportują metale ciężkie do nadziemnych tkanek. Tak efektywne przenoszenie metali ciężkich odbywa się zarówno ścieżką apoplastyczną, jak i symplastyczną i realizowane jest w dużej mierze poprzez nadekspresję genów odpowiedzialnych za wychwyt i transport metali ciężkich [21]. Oprócz wydajnego pobierania metali ciężkich z gleby i ich transportu z korzenia do pędu, hiperakumulatory charakteryzują się szeregiem innych mechanizmów umożliwiających tolerancję podwyższonego stężenia metali ciężkich w tkankach, m.in. zwiększenie wydzielania związków chelatujących lub sekwestrację metali ciężkich do wakuoli lub ściany komórkowej, często połączoną ze zwiększoną aktywnością niektórych enzymów redukujących metale ciężkie (np. reduktazy arsenianowej) [22]. Naturalne hiperakumulatory od dłuższego czasu przyciągają uwagę naukowców. Ostatnie doniesienia literaturowe mówią o ponad 700 gatunkach roślin należących do ponad 52 rodzin mających cechy hiperakumulatorów, z czego część gatunków wykazuje te cechy wobec więcej niż jednego metalu ciężkiego [23]. Pomimo tak dużej liczby zidentyfikowanych gatunków hiperakumulatorów zdecydowana większość opisywanych roślin ogranicza swoje występowanie do regionu śródziemnomorskiego oraz regionów tropikalnych, ubogich gleb serpentynowych na Kubie, Nowej Kaledonii i w Malezji [23]. Stąd też coraz częściej zwraca się uwagę na rośliny uprawne, m.in. bawełnę [9], tytoń [24], jęczmień [25,26], rzepak [27], kukurydzę [13], czy wierzbę [28], jako potencjalne naturalne hiperakumulatory o stosunkowo dużej biomacie, które można by stosować powszechnie jako efektywne narzędzie do oczyszczania gleby.

Ponieważ obecnie żaden z naturalnie występujących hiperakumulatorów nie jest w pełni wydajny, sugeruje się uzyskanie odpowiednich odmian roślin transgenicznych nadających się do usuwania metali ciężkich z terenów zanieczyszczonych. Do tego jednak potrzebne jest lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw naturalnej fitoremediacji. Jak dotąd porównanie mechanizmów detoksykacji metali ciężkich u roślin tolerancyjnych i roślin wrażliwych na metale ciężkie zwróciło uwagę na geny, które mogą być użyteczne w projektowaniu rośliny transgenicznej skutecznej w fitoremediacji.

U podstaw naturalnej fitoremediacji leży zdolność roślin do utrzymania odpowiedniego stężenia metali ciężkich w komórkach oraz ich poszczególnych kompartmentach. Wśród metali ciężkich znajdują się bowiem pierwiastki kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania procesów fizjologicznych w komórce, których nadmiar jest jednak dla komórki toksyczny. Fotosynteza, synteza białek, replikacja DNA, a także transport elektronów w mitochondriach oraz chloroplastach są uzależnione od prawidłowego poziomu pierwiastków śladowych, stąd też rośliny rozwinięte

kompleksowe mechanizmy pozwalające na ścisłą regulację poziomu metali ciężkich na etapie poboru, transportu, przechowywania, mobilizacji i przemieszczania [29]. Elementem tej kontroli są liczne transportery metali obecne w komórkach roślinnych, wśród których wymienia się białka typu NRAMP (ang. *natural resistance-associated macrophage proteins*), HMA (ang. *heavy metal associated*), VIT (ang. *vacuolar iron transporter*), białka z rodziny ZIP (ang. *zinc-regulated transporter/iron regulated transporter-like proteins*), rodzinę wymienników kationowych (CAX, ang. *cation exchangers*) oraz białka typu CDF (ang. *cation diffusion facilitator*) [30]. Te ostatnie zaangażowane są w utrzymywanie homeostazy kationów dwuwartościowych: Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} i Mn^{2+} i działają na zasadzie antyportu, wymieniając kationy dwuwartościowe na jony wodoru H^+ [31]. Transportery CDF u roślin określane są jako białka tolerancji na metale (MTP, ang. *metal tolerance proteins*) [32] i to z nimi wiąże się szczególne nadzieje w kontekście projektowania roślin

transgenicznych skutecznych w fitoremediacji. Choć białka MTP odgrywają kluczową rolę w tolerancji roślin na metale ciężkie i w homeostazie jonowej roślin, wciąż brakuje kompleksowych badań nad MTP u roślin uprawnych. Identyfikacja i kompleksowa analiza tych genów może dostarczyć ważnych informacji pod kątem upraw roślin tolerujących wysokie stężenia metali oraz wspierać strategię upraw opartych na biofortyfikacji, czyli wzbogacaniu roślin uprawnych korzystnymi dla konsumenta związkami żywieniowymi.

BIĄŁKA MTP - OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Po raz pierwszy białka CDF zidentyfikowane zostały u bakterii w roku 1995 [33], od tego czasu geny kodujące ich homologii opisywane były w genomach różnych organizmów, w tym u wielu gatunków roślin (Tab. 1).

Tabela 1. Charakterystyka roślinnych białek MTP.

Białko	Klaster	Substrat	Gatunek	Lokalizacja wewnątrzkomórkowa	Referencje
AhMTP1-A1	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>	Tonoplast	[41, 42]
AhMTP1-A2	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brak danych	[42]
AhMTP1-B1	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brak danych	[42]
AhMTP1-C	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brak danych	[42]
AhMTP1-D	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brak danych	[42]
AIMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Brak danych	[43]
AtMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tonoplast	[36,44-46]
AtMTP11	Mn-CDF	Mn, Cu	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Przedział przedwakuolarny, aparat Golgiego	[47-49]
AtMTP12	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aparat Golgiego	[37]
AtMTP3	Zn-CDF	Zn, Co	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tonoplast	[35]
AtMTP5	Zn-CDF	Zn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aparat Golgiego	[37]
AtMTP8	Mn-CDF	Mn	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tonoplast	[39]
BvMTP10	Mn-CDF	Mn	<i>Beta vulgaris</i>	Aparat Golgiego	[50]
BvMTP11	Mn-CDF	Mn	<i>Beta vulgaris</i>	Aparat Golgiego	[50]
CsMTP8	Mn-CDF	Mn	<i>Camellia sinensis</i>	Błona komórkowa	[51]
HvMTP1	Zn-CDF	Zn, Co	<i>Hordeum vulgare</i>	Tonoplast	[52]
HvMTP8.1	Mn-CDF	Mn	<i>Hordeum vulgare</i>	Aparat Golgiego	[53]
HvMTP8.2	Mn-CDF	Mn	<i>Hordeum vulgare</i>	Aparat Golgiego	[53]
MtMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Medicago truncatula</i>	Tonoplast	[54]
NcMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Noccea caerulea</i>	Brak danych	[55,43]
NglauMTP1	Zn-CDF	Zn, Co	<i>Nicotiana glauca</i>	Tonoplast	[56]
NgoesMTP1	Zn-CDF	Zn, Cd, Co, Ni	<i>Noccea goesingense</i>	Tonoplast	[57,58,43]
NtMTP1.2	Zn-CDF	Zn, Co	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brak danych	[59]
NtMTP11.1	Mn-CDF	Mn	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brak danych	[59]
NtMTP1-A	Zn-CDF	Zn, Co	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tonoplast	[56]
NtMTP1-B1	Zn-CDF	Zn, Co	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tonoplast	[56]
NtMTP2	Zn-CDF	Co and Ni	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tonoplast	[60]
NtMTP8.1	Mn-CDF	Mn	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brak danych	[59]
NtMTP8.4	Mn-CDF	Mn	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brak danych	[59]

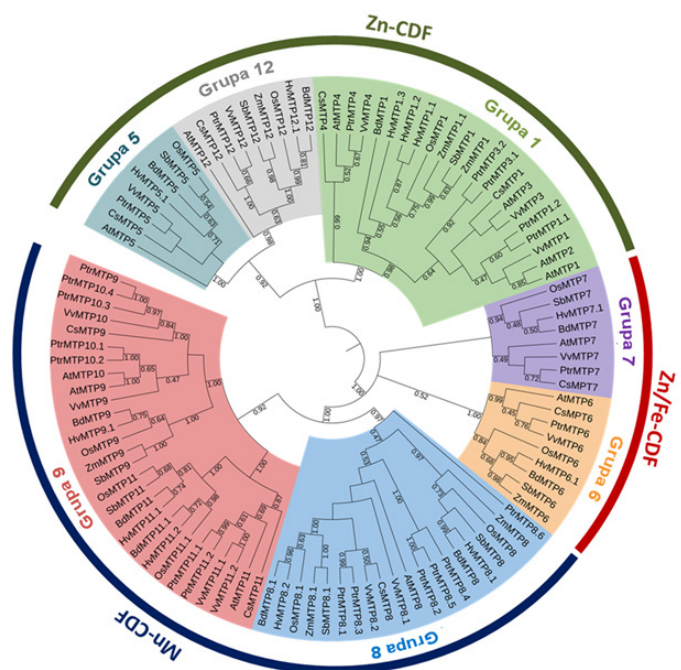
OsMTP1	Zn-CDF	Zn, Co, Ni, Cd, Fe, As	<i>Oryza sativa</i>	Tonoplast	[61-64]
OsMTP11	Mn-CDF	Mn, Co, Ni	<i>Oryza sativa</i>	System błon wewnątrzkomórkowych	[65]
OsMTP8.1	Mn-CDF	Mn	<i>Oryza sativa</i>	Tonoplast	[38]
OsMTP9	Mn-CDF	Mn	<i>Oryza sativa</i>	Błona komórkowa	[66]
PtdMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Populus trichocarpa x Populus deltoides</i>	Tonoplast	[67,68]
PtMTP11.1	Mn-CDF	Mn, Cu	<i>Populus trichocarpa</i>	Aparat Golgiego	[49]
PtMTP11.2	Mn-CDF	Mn	<i>Populus trichocarpa</i>	Aparat Golgiego	[49]
PtrMTP10.4	Mn-CDF	Mn	<i>Populus trichocarpa</i>	Brak danych	[69]
PtrMTP6	Mn-CDF	Co, Fe, Mn	<i>Populus trichocarpa</i>	Brak danych	[69]
PtrMTP8.1	Mn-CDF	Mn	<i>Populus trichocarpa</i>	Brak danych	[69]
PtrMTP9	Mn-CDF	Mn	<i>Populus trichocarpa</i>	Brak danych	[69]
SaMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Sedum alfredii</i>	Tonoplast	[70]
ShMTP8	Mn-CDF	Mn, Cu	<i>Stylosanthes hamata</i>	Tonoplast, retikulum endoplazmatyczne	[47,48]
TaMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Thlaspi arvense</i>	Brak danych	[43]
TmMTP1	Zn-CDF	Zn	<i>Thlaspi montanum</i>	Brak danych	[43]
TuMTP8	Mn-CDF	Mn, Fe	<i>Triticum urartu</i>	Tonoplast	[71]
ZmMTP11	Mn-CDF	Pb	<i>Zea mays</i>	Błona komórkowa	[72]
ZmMTP6	Mn-CDF	Cd	<i>Zea mays</i>	Błona komórkowa	[73]

U roślin modelowych, tj., jednoliściennego ryżu (*Oryza sativa*) zidentyfikowano 10 genów MTP, natomiast dwuliścienny rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*, At) ma ich 12. W przypadku wyżej wymienionych roślin modelowych geny MTP zostały częściowo scharakteryzowane, m.in. potwierdzono zdolność kodowanych przez nie białek do transportu metali [34]. Ponadto wykazano, że u rzodkiewnika zlokalizowane w tonoplaście białka AtMTP1 i AtMTP3 zaangażowane są w nabywanie tolerancji roślin na Zn i Co poprzez transportowanie nadmiaru jonów Zn oraz Co z cytoplazmy do wakuoli [35,36], podczas gdy białko AtMTP12 oddziałuje bezpośrednio z AtMTP5, tworząc funkcjonalny kompleks transportujący jony Zn z cytozolu do aparatu Golgiego [37]. Ponadto MTP8 jest jednym z najlepiej zbadanych jak dotąd białek z rodziny CDF zaangażowanych w detoksykację jonów Mn u rzodkiewnika i ryżu poprzez odkładanie ich w wakuoli [38-40]. Tabela 1 przedstawia podsumowanie aktualnego stanu wiedzy o zidentyfikowanych białkach MTP w różnych gatunkach roślin.

Pomimo częściowego rozpoznania roli i lokalizacji poszczególnych białek MTP w komórkach roślin modelowych niewiele wiadomo o ich obecności oraz funkcjach w innych gatunkach; szczególnie brakuje wiedzy dotyczącej roślin uprawnych innych niż ryż, w tym jęczmienia.

GENY MTP U JĘCZMIENIA

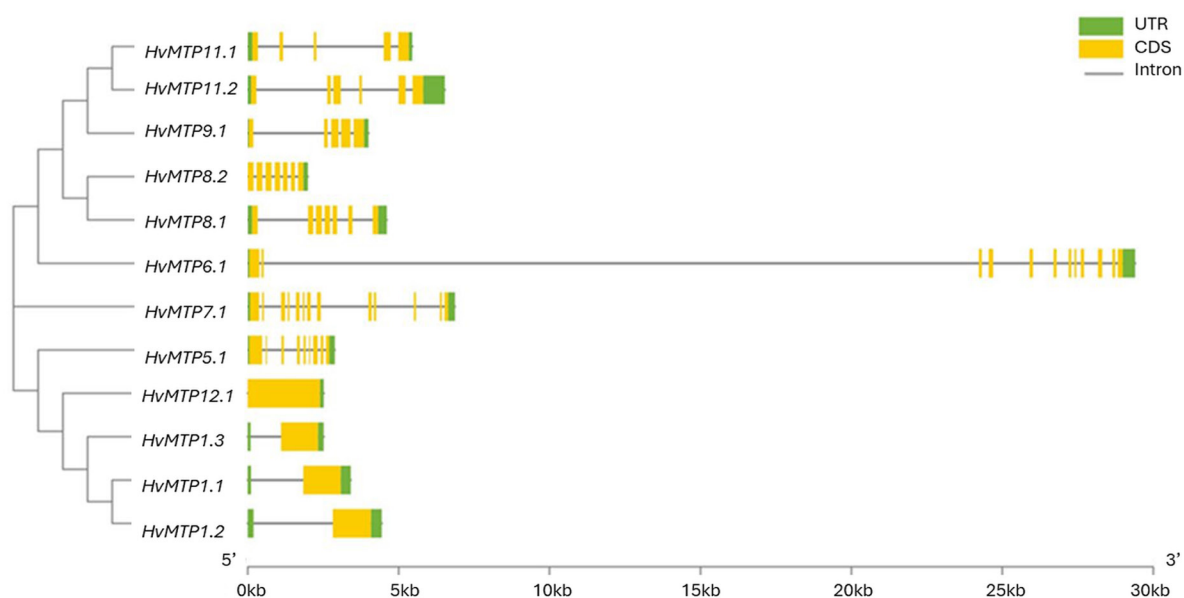
Kompleksowe studia nad genami MTP w jęczmieniu stanowią podstawę do lepszego poznania roli białek transportowych zarówno w kontekście ich struktury, jak i pełnionych funkcji fizjologicznych. Przedstawione tutaj analizy nie tylko są punktem startowym dla takich badań, ale



Rycina 1. Filogenetyczne powiązanie białek CDF (MTP) obecnych u jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*) oraz innych roślin: rzodkiewnika *A. thaliana* (At), kłosownicy *B. distachyon* (Bd), ryżu *O. sativa* (Os), topoli *P. trichocarpa* (Ptr), kukurydzy *Z. mays* (Zm), winorośli *V. vinifera* (Vv), sorga *S. bicolor* (Sb) i ogórka *C. sativus*, (Cs). Relacje ewolucyjne zostały ustalone z wykorzystaniem programu MEGA-11 z użyciem metody NJ (neighbor-joining) przy wartości samopróbki (bootstrap) równej 1000. Wszystkie 104 białka MTP zostały zgrupowane w trzy główne klastry różniące się specyficnością substratów (Zn-CDF, Zn/Fe-CDF, Mn-CDF); w obrębie tych klastrów wydzielono siedem mniejszych grup wyróżnionych innymi kolorami. Sekwencje aminokwasowe wyszczególnione w tabeli 3 porównywane były w programie ClustalW, drzewo filogenetyczne zostało wygenerowane przez program MEGA-11, do wizualizacji wykorzystano narzędzie internetowe iTOLv6. CDF – ang. *cation diffusion facilitator*, białka transportujące kationy metali; MTP – ang. *metal tolerance proteins*, białka tolerancji na metale. Za [77], zmienione.

Tabela 2. Szczegółowe informacje o genach *MTP* i kodowanych przez nie białkach zidentyfikowanych u jęczmienia. Identyfikację genów wykonano poprzez porównanie sekwencji znanych genów *MTP* rzodkiewnika do genomu jęczmienia z wykorzystaniem narzędzi BLAST, InterProScan oraz bazy Phytozome. Fizykochemiczne właściwości białek *MTP* oceniono *in silico* wykorzystując narzędzie ProtoParam w portalu ExPASy; narzędzia Plant-mPLoc użyto go ustalenia lokalizacji wewnątrzkomórkowej; narzędzia TMHMM ServerV.2.0 i HMMTOP pozwoliły przewidzieć prawdopodobne regiony transbłonowe. Za [77] zmodyfikowane. aa – aminokwasy; CDS – rejon kodujący; GRAVY – współczynnik hydropatyczności; Hv – jęczmień zwyczajny; *MTP* – białka tolerancji na metale ciężkie; MW – masa cząsteczkowa; pI – punkt izoelektryczny; pz – pary zasad; TMD – domena transbłonowa.

Identyfikator w Ensembl Plants	Nazwa genu	Długość CDS (pz)	Wielkość białka (aa)	MW (kDa)	Teoretyczna wartość pI	GRAVY	Lokalizacja wewnątrzkomórkowa	TMD
HORVU.MOREX.r3.2HG0174930.1	<i>HvMTP1.1</i>	1242	413	45,08	5,83	0,09	Tonoplast	6
HORVU.MOREX.r3.1HG0016110.1	<i>HvMTP1.2</i>	1266	421	45,83	5,95	0,053	Tonoplast	6
HORVU.MOREX.r3.4HG0409880.1	<i>HvMTP1.3</i>	1227	408	44,66	5,89	0,035	Tonoplast	6
HORVU.MOREX.r3.6HG0634070.1	<i>HvMTP5.1</i>	1089	362	39,65	8,54	0,231	Tonoplast	6
HORVU.MOREX.r3.4HG0376610.1	<i>HvMTP6.1</i>	1509	502	53,71	7,84	-0,007	Tonoplast	5
HORVU.MOREX.r3.2HG0158870.1	<i>HvMTP7.1</i>	1386	461	50,02	7,28	0,044	Tonoplast	4
HORVU.MOREX.r3.6HG0617950.1	<i>HvMTP8.1</i>	1233	410	45,68	5,35	-0,058	Tonoplast	4
HORVU.MOREX.r3.4HG0393950.1	<i>HvMTP8.2</i>	1203	400	44,88	5,27	0,069	Tonoplast	5
HORVU.MOREX.r3.3HG0222000.2	<i>HvMTP9.1</i>	1170	389	44,04	6,2	-0,017	Błona komórkowa, tonoplast	6
HORVU.MOREX.r3.1HG0073140.1	<i>HvMTP11.2</i>	969	322	36,24	4,92	0,004	Tonoplast	3
HORVU.MOREX.r3.3HG0303160.1	<i>HvMTP11.1</i>	1200	399	44,69	5,34	0,057	Tonoplast	4
HORVU.MOREX.r3.2HG0119060.1	<i>HvMTP12.1</i>	2394	797	86,56	7,06	0,108	Jądro, tonoplast	11



Rycina 2. Struktura genów *HvMTP*. Egzony czyli sekwencje kodujące CDS przedstawione są w postaci żółtych prostokątów; introny przedstawione są w formie szarych linii; UTR – region nie ulegający translacji. Skala u dołu ryciny wyraża długość genów w liczbie par zasad. Hv – *Hordeum vulgare*; *MTP* – ang. *metal tolerance proteins*, białko tolerancji na metale. Strukturę genów ustalono używając programu Structure Display Serve2.0, wizualizacji danych wykonano używając narzędzia TBtools [77], zmienione.

Tabela 3. Numery akcesyjne sekwencji aminokwasowych białek MTP wykorzystanych w analizie filogenetycznej pokazanej w rycinie 1. Sekwencje pochodzą z ogólnodostępnych baz danych TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), RGAP (<http://rice.uga.edu/>) i Phytozyme

Rzodkiewnik		Klosownica		Ogórek		Ryż	
Symbol	TAIR	Symbol	GeneBank	Symbol	GeneBank	Symbol	RGAP
AtMTP1	At2g46800	BdMTP1	XP_003569059.1	CsMTP1	NP_001295856.1	OsMTP1	LOC_Os05g03780.1
AtMTP2	At3g61940	brak danych		brak danych		brak danych	
AtMTP3	At3g58810	brak danych		brak danych		brak danych	
AtMTP4	At2g29410	brak danych		CsMTP4	AFJ24701.1	brak danych	
AtMTP5	At3g12100	BdMTP5	XP_003570736.1	CsMTP5	APM86800.1	OsMTP5	LOC_Os02g58580.1
AtMTP6	At2g47830	BdMTP6	XP_003557927.1	CsMTP6	APM86801.1	OsMTP6	LOC_Os03g22550.1
AtMTP7	At1g51610	BdMTP7	XP_003581101.1	CsMTP7	APM86799.1	OsMTP7	LOC_Os04g23180.1
AtMTP8	At3g58060	BdMTP8	XP_003570531.1	CsMTP8	AFJ24703.1	OsMTP8	LOC_Os02g53490.1
		BdMTP8.1	XP_003558420.1			OsMTP8.1	LOC_Os03g12530.1
AtMTP9	At1g79520	BdMTP9	XP_003565291.1	CsMTP9	AFJ24702.1	OsMTP9	LOC_Os01g03914.1 B
AtMTP10	At1g16310	brak danych		brak danych		brak danych	
AtMTP11	At2g39450 P	BdMTP11	XP_003564566.1	CsMTP11	XP_004147705.1	OsMTP11	LOC_Os01g62070.1
		BdMTP11.1	XP_003568286.1			OsMTP11.1	LOC_Os05g38670.1
AtMTP12	At2g04620	BdMTP12	XP_003572199.1	CsMTP12	APM86802.1	OsMTP12	LOC_Os08g32650.1

pozwalają również na głębsze rozpoznanie i zrozumienie genomu jęczmienia.

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare*, Hv) jest opisywany jako zboże tolerujące podwyższone stężenia Mn [74], Cu i Cd [75,76] oraz As [25,26]. Jęczmień należy do rodziny wiechlinowatych i jest jednym z najważniejszych zbóż uprawnych, czwartym pod względem wielkości upraw na świecie po kukurydzy, pszenicy i ryżu [77], z produkcją w latach 2022–2023 szacowaną na 151,62 miliona ton [78]. Jęczmień jest istotną rośliną w rolnictwie, coraz częściej wykorzystywany jest również w badaniach naukowych jako nowa roślina modelowa w różnych typach analiz, w tym wieloskalowych analizach genetycznych.

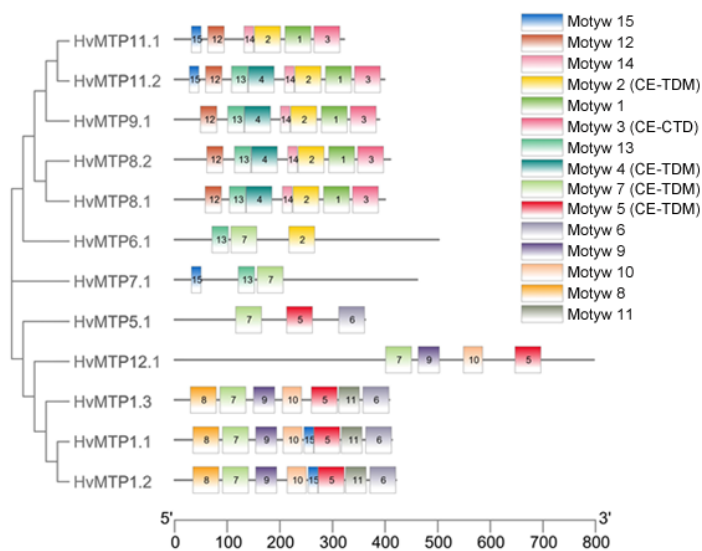
Dwanaście genów *HvMTP* zidentyfikowanych po raz pierwszy u jęczmienia (*Hv*) zostało zaklasyfikowanych do trzech podstawowych grup, tj. Zn-CDF, Zn/Fe-CDF i Mn-CDFs (Tab. 2, Ryc. 1) [77]. Podobnie dużą liczbę genów

MTP obserwowano wcześniej dla innych gatunków roślin, m.in. rzodkiewnika, ryżu oraz topoli [68,69,79], co sugerować może zbieżne funkcje fizjologiczne poszczególnych ortologów tych genów u różnych organizmów roślinnych (Ryc. 1, Tab. 3).

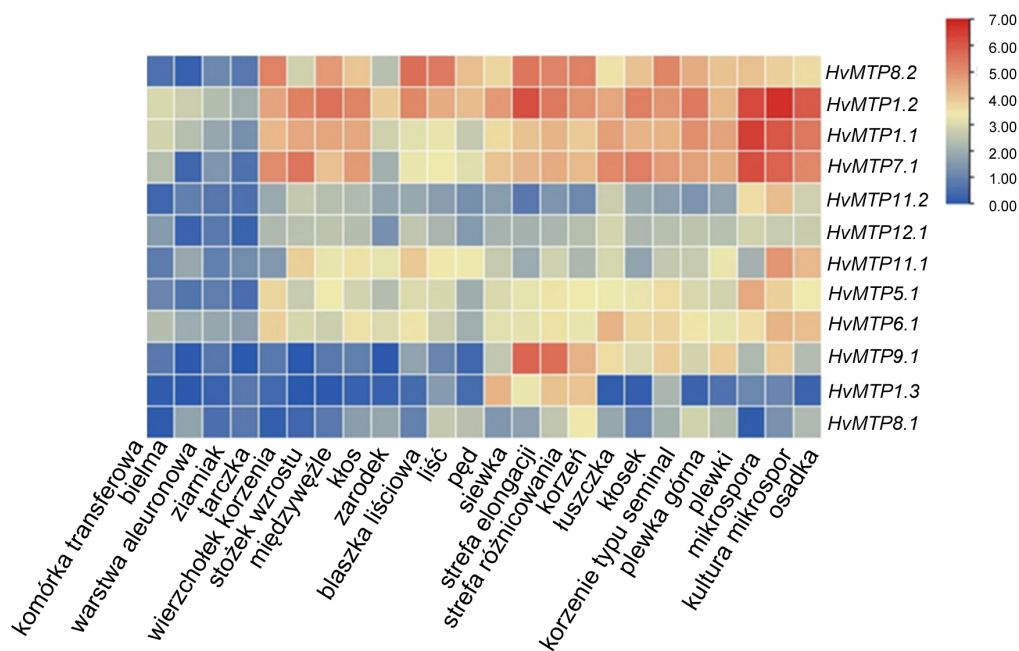
Wśród charakteryzowanych genów szczególnie interesujący jest *HvMTP12.1* kodujący białko o długości i masie cząsteczkowej (797 aminokwasy i 86,55 kDa) znacznie przekraczających typowe parametry białek kodowanych przez pozostałe geny z rodziny *HvMTP* (Tab. 2), co sugeruje, że białko to może pełnić specyficzne funkcje, a także podlegało innym procesom ewolucyjnym. Analogicznie kiedy większość białek kodowanych przez *HvMTP* zawiera 4–6 domen transbłonowych (Tab. 2), co jest częstą cechą obserwowaną u różnych gatunków roślin [32,80,81], białko *HvMTP12.1* charakteryzuje się 11 domenami transbłonowymi, podobnie jak białko *VvMTP12* u winorośli (*Vv*) [82] oraz *CitMTP12* u pomarańczy (*Cit*) [31].

(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Oznaczenia: rzodkiewnik *A. thaliana* (At), kłosownica *B. distachyon* (Bd), ryż *O. sativa* (Os), topola *P. trichocarpa* (Ptr), kukurydza *Z. mays* (Zm), winorośl *V. vinifera* (Vv), sorgo *S. bicolor* (Sb), ogórek *C. sativus* (Cs).

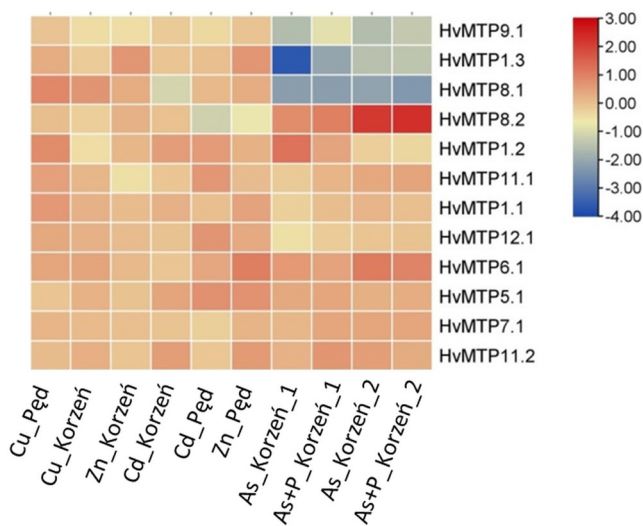
Topola		Sorgo		Winorośl		Kukurydza	
Symbol	GeneBank	Symbol	Phytozyme	Symbol	GeneBank	Symbol	GeneBank
PtrMTP1.1	Potri.014G106200	SbMTP1	Sb09g002460	VvMTP1	XP_002266346.1	ZmMTP1	ACL53182.1
PtrMTP1.2	Potri.002G180100					ZmMTP1.1	ACR35635.1
brak danych		brak danych		brak danych		brak danych	
PtrMTP3.1	Potri.011G150600			VvMTP3	XP_002278303.1	brak danych	
PtrMTP3.2	Potri.001G450900	brak danych				brak danych	
PtrMTP4	Potri.001G245800	brak danych		VvMTP4	XM_002280347.2	brak danych	
PtrMTP5	Potri.016G045200	SbMTP5	Sb04g038530	VvMTP5	XP_002279787.1	brak danych	
PtrMTP6	Potri.T034500	SbMTP6	Sb01g035530	VvMTP6	XP_002269478.2	ZmMTP6	ACF86507.1
PtrMTP7	Potri.010G251300	SbMTP7	Sb06g007330	VvMTP7	XP_002262765.1	brak danych	
PtrMTP8.1	Potri.003G215600	SbMTP8	Sb04g034705	VvMTP8.1	XP_002275885.1	ZmMTP8	NP_001141097.1
PtrMTP8.2	Potri.001G010200	SbMTP8.1	Sb01g041820	VvMTP8.2	XP_002285662.1	ZmMTP8.1	NP_001167840.1
PtrMTP8.3	Potri.001G010300						
PtrMTP8.4	Potri.001G010100						
PtrMTP8.5	Potri.001G010000						
PtrMTP8.6	Potri.001G009900						
PtrMTP9	Potri.008G083600	SbMTP9	Sb03g007250	VvMTP9	XP_003634572.1	ZmMTP9	ACN36717.1
PtrMTP10.1	Potri.010G172800			VvMTP10	XP_002263815.1 N		
PtrMTP10.2	Potri.010G172900	brak danych				brak danych	
PtrMTP10.3	Potri.010G172700						
PtrMTP10.4	Potri.010G172600						
PtrMTP11.1	Potri.010G211300	SbMTP11	Sb03g039220	VvMTP11.1	XP_002282508.1	brak danych	
PtrMTP11.2	Potri.008G049600			VvMTP11.2	XP_002282522.2	brak danych	
PtrMTP12	Potri.005G110300	SbMTP12	Sb07g020630	VvMTP12	XP_002280912.1	ZmMTP12	NP_001167737.1



Rycina 3. Rozmieszczenie konserwowanych motywów w obrębie białek kodowanych przez geny *HvMTP*. Skala u dołu figury wskazuje długość białek wyrażoną w liczbie aminokwasów. CE-CTD – C-końcowa domena odpowiedzialna za odpływ kationów z cytoplazmy; CE-TDM – transbłonowa domena odpowiedzialna za odpływ kationów z cytoplazmy. Motywy zidentyfikowano używając narzędzia NCBI-Conserved Domains Database (CDD), wyniki zwizualizowano narzędziem TBtools. Hv – *Hordeum vulgare*; jęczmień zwyczajny; MTP – ang. *metal tolerance proteins*, białko tolerancji na metale [77], zmienione.



Rycina 4. Profile ekspresji genów *HvMTP* w różnych częściach jęczmienia. Wyniki ekspresji pobrano z baz danych Affymetrix Barley Genome Array i GENEVESTIGATOR v3, zwizualizowano je przy pomocy programu TTools. Skala kolorystyczna wyraża wartość ekspresji (\log_2). Hv – *Hordeum vulgare*, jęczmień zwyczajny; MTP – ang. *metal-tolerance proteins*, białka tolerancji na metale [77], zmienione.

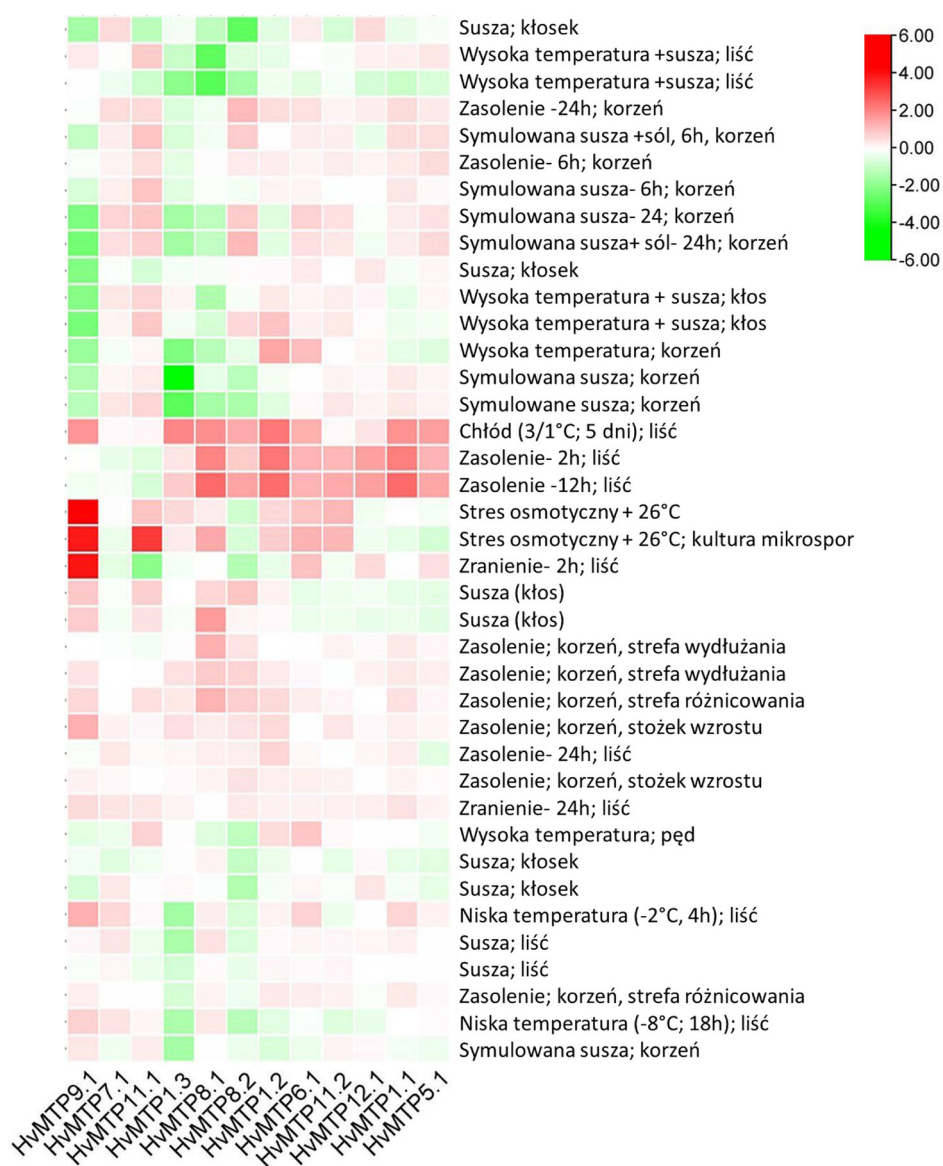


Rycina 5. Profil ekspresji genów *HvMTP* w odpowiedzi na stres metali ciężkich u jęczmienia. Poziom ekspresji analizowano w korzeniach lub pędach eksponowanych na działanie Cu, Zn, Cd, a także As i As razem z fosforem (P) w dwóch niezależnych eksperymentach (odróżnionych gwiazdką). Wyniki pobrano z baz danych Affymetrix Barley Genome Array i GENEVESTIGATOR v3, zwizualizowano je przy pomocy programu TTools. Skala kolorystyczna wyraża krotność ekspresji (\log_2FC). Hv – *Hordeum vulgare*; MTP – ang. *metal-tolerance proteins*, białka tolerancji na metale [77], zmienione.

Budowa genów, tj. obecność i liczba egzonów i intronów w ich obrębie, może stanowić wartościową informację dla analiz filogenetycznych rodzin genowych [83]. Badane geny *HvMTP* pochodzące z tych samych grup ewolucyjnych charakteryzują się podobną budową (Ryc. 2). Co godne uwagi, cztery geny Zn-CDF z grupy 1 (*HvMTP1.1*, *HvMTP1.2*, *HvMTP1.3*) oraz 12 (*HvMTP12.1*) zbudowane są z jednego egzonu pozbawionego intronów w sekwencji kodującej, co pozwala zaliczyć je do genów jednoegzonowych (SEG, ang. *single exon genes*) typowych dla organizmów prokario-

tycznych i rzadko obserwowanych w genomach wielokomórkowych eukariontów [84]. Ponadto geny *HvMTP1.1*, *HvMTP1.2*, *HvMTP1.3* mają intron w regionie niepodlegającym translacji UTR, przez co zaliczane są do grupy genów uiSEGs (ang. *UTR intron-containing SEGs*), podczas gdy *HvMTP12.1* jest klasyfikowany jako IG (ang. *intronless gene*), tj. gen pozbawiony intronów [77].

Oprócz różnic w strukturze genów *HvMTP* widoczne są również różnice w budowie kodowanych przez nie białek (Ryc. 3, Tab. 2). Różnice te dotyczą zarówno długości białek



Rycina 6. Profil ekspresji genów *HvMTP* jęczmienia w odpowiedzi na różne czynniki stresowe. Wyniki pobrano z baz danych Affymetrix Barley Genome Array i GENEVESTIGATOR v3, zwizualizowano je przy pomocy programu TBtools. Skala kolorystyczna wyraża krotność ekspresji (\log_2FC). *Hv* - *Hordeum vulgare*; *MTP* - ang. *metal-tolerance proteins*, białka tolerancji na metale ciężkie [77], zmienione.

HvMTP, która waha się od 322 aminokwasów w przypadku białka *HvMTP11.2* do 797 aminokwasów *HvMTP12.1*, jak i obecności różnych konserwowanych ewolucyjnie domen. W sekwencjach aminokwasowych dwunastu *HvMTP* wyróżniono 15 konserwowanych motywów. Pięć z nich zostało zidentyfikowanych jako należące do nadrodziny domen transbłonowych odpowiedzialnych za odpływ kationów z cytoplazmy (Cation efflux-TDM-, motywy 2, 4, 5, 7) oraz nadrodziny C-końcowych domen odpowiedzialnych za odpływ kationów z cytoplazmy (Cation efflux-CTD-, motyw 3) (Ryc. 3).

Organowo-, tkankowo- i komórkowo-specyficzne analizy ekspresji zidentyfikowanych genów *HvMTP* wykazały, że jedynie cztery z nich, mianowicie *HvMTP1.1*, *HvMTP1.2*, *HvMTP7* i *HvMTP8.2* wykazują wysoki poziom ekspresji w większości badanych organów jęczmienia (Ryc. 4). Obserwacja taka sugeruje ich istotną rolę w regulowaniu wzrostu

i rozwoju roślin, m.in. poprzez umożliwianie transportu kationów dwuwartościowych wewnątrz rośliny oraz utrzymywanie homeostazy metali w poszczególnych organach [77]. Ponadto wysoki poziom ekspresji genów *HvMTP1.2*, *HvMTP8.2* i *HvMTP9.1* w korzeniu może być związany z postulowaną już wcześniej w literaturze rolą tych genów w regulacji transportu kationów metali z korzeni do pędu rośliny [66, 85]. Pozostałe ze zidentyfikowanych genów kodujących transportery jonowe w jęczmieniu ulegają ekspresji na niewysokim poziomie w różnorodnych organach w trakcie rozwoju rośliny, z wyjątkiem genu *HvMTP8.1*, którego ekspresji nie wykryto w ogóle bądź wykryto ją na bardzo niskim poziomie [77].

Zaangażowanie badanych transporterów MTP w kształtowaniu tolerancji roślin jęczmienia na stres metali ciężkich przejawia się dodatkowo we wzroście ekspresji kodujących je genów na skutek ekspozycji na podwyższone stężenie jo-

nów Cd, Cu i Zn w pędzie oraz As zarówno w pędzie jak i korzeniu [77] (Ryc. 5), mimo że Cu i As nie są wskazywane jako bezpośrednio oddziaływujące z transporterami MTP. Ponadto geny *HvMTP* ulegają nadekspresji w odpowiedzi na krótkotrwały i przedłużony stres solny (Ryc. 6), zarówno w korzeniu, jak i pędzie rośliny, co nie jest zaskakujące w świetle obserwacji, że oba rodzaje stresów, tj. stres solny i stres metali ciężkich, powodują podobne efekty fizjologiczne skutkujące zachwianiem równowagi jonowej oraz ograniczeniem produkcji roślinnej [86,87]. Transportery MTP wydają się także zaangażowane w odpowiedź na stres chłodu oraz stres osmotyczny, jednakże ekspresja kodujących je genów nie zmienia się w trakcie ekspozycji na suszę ani stres wysokiej temperatury (Ryc. 6).

PODSUMOWANIE

Fitoremediacja, określana jako „zielona technika”, jest rozwijającą się metodą rekultywacji gleb, która powszechnie uważana jest za przyjazną dla środowiska, ekonomiczną i mało ingerującą w ekosystemy. Sukces tego podejścia opiera się na wykorzystaniu odpowiednich gatunków roślin, których efektywny wybór nie jest możliwy bez pełnego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tolerancji roślin na wysokie stężenie metali ciężkich. Bioforyfikacja zbóż koncentrująca się na wydajniejszym wchłanianiu określonych pierwiastków z gleby przez rośliny i ich translokacji do ziarniaków jest techniką walki z ukrytym głodem, tj. niedoborem mikroelementów i niedożywieniem ludzi, dla których żywność pochodzenia roślinnego jest głównym źródłem składników mineralnych w diecie. Rozpoznanie genów *HvMTP* kodujących białkowe transportery metali ciężkich u jęczmienia oraz analiza profilów ekspresji tych genów stanowi punkt startowy do dalszych szczegółowych badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za tolerancję roślin na wysokie stężenia metali ciężkich i ich homeostazę. Ponadto wiedza ta jest ważnym zasobem w pracach nad ulepszaniem upraw jęczmienia, poprzez stosowanie zarówno metod inżynierii genetycznej, jak i tradycyjnych technik produkcji zbóż.

PIŚMIENNICTWO

- Briffa J, Sinagra E, and Blundell R (2020) Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 6(9)
- Waqas W, Yuan Y, Ali S, Zhang M, Shafiq M, Ali W, Chen Y, Xiang Z, Chen R, Ikhwanuddin M, and Ma H (2024) Toxic effects of heavy metals on crustaceans and associated health risks in humans: a review. *Environ Chem Lett* 22(3): 1391-1411
- Hawkes SJ (1997) What Is a “Heavy Metal”? *J Chem Educ* 74(11): 1374
- Ali H and Khan E (2018) What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’ – proposal of a comprehensive definition. *Toxicol Environ Chem* 100(1): 6-19
- Hou D, O'Connor D, Igalavithana AD, Alessi DS, Luo J, Tsang DC, Sparks DL, Yamauchi Y, Rinklebe J, and Ok YS (2020) Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment* 1(7): 366-381
- Quarshie SD-G, Xiao X, and Zhang L (2021) Enhanced phytoremediation of soil heavy metal pollution and commercial utilization of harvested plant biomass: a review. *Water, Air, Soil Pollut* 232: 1-28
- Shi L, Li J, Palansooriya KN, Chen Y, Hou D, Meers E, Tsang DCW, Wang X, and Ok YS (2023) Modeling phytoremediation of heavy metal contaminated soils through machine learning. *J Hazard Mater* 441: 129904
- Zhang Q and Wang C (2020) Natural and human factors affect the distribution of soil heavy metal pollution: a review. *Water, Air, Soil Pollut* 231: 1-13
- Yang L, Wang J, Yang Y, Li S, Wang T, Oleksak P, Chrienova Z, Wu Q, Nepovimova E, and Zhang X (2022) Phytoremediation of heavy metal pollution: Hotspots and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf* 234: 113403
- Budianta W (2021) Heavy metal pollution and mobility of sediment in Tajum River caused by artisanal gold mining in Banyumas, Central Java, Indonesia. *Environmental Science and Pollution Research* 28(7): 8585-8593
- MEPC (Ministry of Environmental Protection of China). MMoLa and Resources). National Soil Pollution Survey Communiqué (in Chinese). 2014; Available from: http://www.gov.cn/foot/2014-04/17/content_2661768.htm
- Wang P, Li Z, Liu J, Bi X, Ning Y, Yang S, and Yang X (2019) Apportionment of sources of heavy metals to agricultural soils using isotope fingerprints and multivariate statistical analyses. *Environ Pollut* 249: 208-216
- Muthusarayanan S, Sivarajasekar N, Vivek JS, Paramasivan T, Nushad M, Prakashmaran J, Gayathri V, and Al-Duaij OK (2018) Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environ Chem Lett* 16(4): 1339-1359
- Kumar Yadav K, Gupta N, Kumar A, Reece LM, Singh N, Rezaia S, and Ahmad Khan S (2018) Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecol Eng* 120: 274-298
- Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Wang Q, Li R, and Zhang Z (2016) Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 126: 111-121
- Gambus F (1997) Pobieranie metali ciężkich przez różne gatunki roślin uprawnych. Część I. Wrażliwość roślin na metale ciężkie. *Acta Agraria et Silviculturae*. Series Agraria (35): 21-29
- He B, He J, and Wu M (2007) Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mine land in Guangxi, South China. *Environ Pollut* 147(1): 168-175
- Guo Y, Huang C, Pang J, Zha X, Li X, and Zhang Y (2014) Concentration of heavy metals in the modern flood slackwater deposits along the upper Hanjiang River valley, China. *CATENA* 116: 123-131
- Cao Q, Fang S, and Cao P (2019) Research on garden plant restoration of heavy metal contaminated soil. *North Horticult*: 145-152
- Deng-biao L, ZHENG J-y, and Tao Z (2015) Effect of different P levels on the growth and heavy metal uptake for four hyperaccumulators. *Acta Scientiae Circumstantiae* 35(4): 1198-1204
- Pasricha S, Mathur V, Garg A, Lenka S, Verma K, and Agarwal S (2021) Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators-an analysis: Heavy metal tolerance in hyperaccumulators. *Environ Chall* 4: 100197
- Sytar O, Ghosh S, Malinska H, Zivcak M, and Brestic M (2021) Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants. *Physiol Plant* 173(1): 148-166
- Manara A, Fasani E, Furini A, and Dal Corso G (2020) Evolution of the metal hyperaccumulation and hypertolerance traits. *Plant Cell Environ* 43(12): 2969-2986
- Martin F, Bovet L, Cordier A, Stanke M, Gunduz I, Peitsch MC, and Ivanov NV (2012) Design of a tobacco exon array with application to investigate the differential cadmium accumulation property in two tobacco varieties. *BMC Genomics* 13(1): 674
- Mains D, Craw D, Rufaut CG, and Smith CMS (2006) Phytostabilization of gold mine tailings from New Zealand. Part 2: Experimental evaluation of arsenic mobilization during revegetation. *Int J Phytoremediation* 8(2): 163-183
- Mains D, Craw D, Rufaut CG, and Smith CMS (2006) Phytostabilization of gold mine tailings, New Zealand. Part 1: Plant establishment in alkaline saline substrate. *Int J Phytoremediation* 8(2): 131-147

27. Guan C, Fu W, Zhang X, Li Z, Zhu Y, Chen F, Ji J, Wang G, and Gao X (2023) Enhanced phytoremediation efficiency of PHE-contaminated soil by rape (*Brassica napus* L.) assisted with PHE-degradable PGPR through modulating rhizobacterial communities. *Industrial Crops and Products* 202: 117057
28. Salam MMA, Kaipainen E, Mohsin M, Villa A, Kuittinen S, Pulkkinen P, Pelkonen P, Mehtätalo L, and Pappinen A (2016) Effects of contaminated soil on the growth performance of young *Salix* (*Salix schwerinii* E. L. Wolf) and the potential for phytoremediation of heavy metals. *J Environ Manage* 183: 467-477
29. Feki K, Tounsi S, Mrabet M, Mhadhbi H, and Brini F (2021) Recent advances in physiological and molecular mechanisms of heavy metal accumulation in plants. *Environmental Science and Pollution Research* 28(46): 64967-64986
30. Chen X, Zhao Y, Zhong Y, Chen J, and Qi X (2023) Deciphering the functional roles of transporter proteins in subcellular metal transportation of plants. *Planta* 258(1): 17
31. Fu X-Z, Tong Y-H, Zhou X, Ling L-L, Chun C-P, Cao L, Zeng M, and Peng L-Z (2017) Genome-wide identification of sweet orange (*Citrus sinensis*) metal tolerance proteins and analysis of their expression patterns under zinc, manganese, copper, and cadmium toxicity. *Gene* 629: 1-8
32. Ricachenevsky FK, Menguer PK, Sperotto RA, Williams LE, and Fett JP (2013) Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Front Plant Sci* 4
33. Nies DH and Silver S (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* 14(2): 186-199
34. Das U, Haque AM, Bari MA, Mandal A, and Kabir AH (2021) Computational characterization and expression profile of *MTP1* gene associated with zinc homeostasis across dicot plant species. *Gene Reports* 23: 101073
35. Arrivault S, Senger T, and Krämer U (2006) The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *TPJ* 46(5): 861-879
36. Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, and Maeshima M (2004) Zinc transporter of Arabidopsis thaliana AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol* 45(12): 1749-1758
37. Fujiwara T, Kawachi M, Sato Y, Mori H, Kutsuna N, Hasezawa S, and Maeshima M (2015) A high molecular mass zinc transporter MTP 12 forms a functional heteromeric complex with MTP 5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS J* 282(10): 1965-1979
38. Chen Z, Fujii Y, Yamaji N, Masuda S, Takemoto Y, Kamiya T, Yusuyin Y, Iwasaki K, Kato S-i, and Maeshima M (2013) Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family. *J Exp Bot* 64(14): 4375-4387
39. Eroglu S, Meier B, von Wirén N, and Peiter E (2016) The vacuolar manganese transporter MTP8 determines tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 170(2): 1030-1045
40. Takemoto Y, Tsunemitsu Y, Fujii-Kashino M, Mitani-Ueno N, Yamaji N, Ma JF, Kato S-i, Iwasaki K, and Ueno D (2017) The tonoplast-localized transporter MTP8. 2 contributes to manganese detoxification in the shoots and roots of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol* 58(9): 1573-1582
41. Dräger DB, Desbrosses-Fonrouge A-G, Krach C, Chardonnens AN, Meyer RC, Saumitou-Laprade P, and Krämer U (2004) Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *TPJ* 39(3): 425-439
42. Shahzad Z, Gosti F, Frérot H, Lacombe E, Roosens N, Saumitou-Laprade P, and Berthomieu P (2010) The Five AhMTP1 Zinc Transporters Undergo Different Evolutionary Fates towards Adaptive Evolution to Zinc Tolerance in *Arabidopsis halleri*. *PLoS Genet* 6(4): e1000911
43. Kim D, Gustin JL, Lahner B, Persans MW, Baek D, Yun D-J, and Salt DE (2004) The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Proceedings of the National Academy of Sciences* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *TPJ* 39(2): 237-251
44. Bloß T, Clemens S, and Nies DH (2002) Characterization of the ZAT1p zinc transporter from Arabidopsis thaliana in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* 214(5): 783-791
45. Desbrosses-Fonrouge A-G, Voigt K, Schröder A, Arrivault S, Thomine S, and Krämer U (2005) Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Lett* 579(19): 4165-4174
46. Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, and Maeshima M (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of Arabidopsis thaliana, stimulates the transport activity. *J Biol Chem* 283(13): 8374-8383
47. Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, and Ryan PR (2003) Genes Encoding Proteins of the Cation Diffusion Facilitator Family That Confer Manganese Tolerance. *Plant Cell* 15(5): 1131-1142
48. Delhaize E, Gruber BD, Pittman JK, White RG, Leung H, Miao Y, Jiang L, Ryan PR, and Richardson AE (2007) A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance. *TPJ* 51(2): 198-210
49. Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pedas P, Husted S, Maathuis FJM, Blaudez D, Chalot M, and Sanders D (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(20): 8532-8537
50. Erbasol I, Bozdogan GO, Koc A, Pedas P, and Karakaya HC (2013) Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from *Beta vulgaris* subspecies *maritima* that confers manganese tolerance in yeast. *BioMetals* 26(5): 795-804
51. Li Q, Li Y, Wu X, Zhou L, Zhu X, and Fang W (2017) Metal transport protein 8 in *Camellia sinensis* confers superior manganese tolerance when expressed in yeast and Arabidopsis thaliana. *Sci Rep* 7(1): 39915
52. Podar D, Scherer J, Noordally Z, Herzyk P, Nies D, and Sanders D (2012) Metal Selectivity Determinants in a Family of Transition Metal Transporters*. *J Biol Chem* 287(5): 3185-3196
53. Pedas P, Schiller Stockholm M, Hegelund JN, Ladegård AH, Schjoerring JK, and Husted S (2014) Golgi Localized Barley MTP8 Proteins Facilitate Mn Transport. *PLoS One* 9(12): e113759
54. Chen M, Shen X, Li D, Ma L, Dong J, and Wang T (2009) Identification and characterization of MtMTP1, a Zn transporter of CDF family, in the Medicago truncatula. *Plant Physiol Biochem* 47(11): 1089-1094
55. Assunção AGL, Martins PDC, De Folter S, Vooijs R, Schat H, and Aarts MGM (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* 24(2): 217-226
56. Shingu Y, Kudo T, Ohsato S, Kimura M, Ono Y, Yamaguchi I, and Hamamoto H (2005) Characterization of genes encoding metal tolerance proteins isolated from *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum*. *Biochem Biophys Res Commun* 331(2): 675-680
57. Persans MW, Nieman K, and Salt DE (2001) Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9995-10000
58. Gustin JL, Loureiro ME, Kim D, Na G, Tikhonova M, and Salt DE (2009) MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *TPJ* 57(6): 1116-1127
59. Liu J, Gao Y, Tang Y, Wang D, Chen X, Yao Y, and Guo Y (2019) Genome-wide identification, comprehensive gene feature, evolution, and expression analysis of plant metal tolerance proteins in tobacco under heavy metal toxicity. *Front genet* 10: 345
60. Papierniak-Wygladala A, Kozak K, Barabasz A, Palusińska M, Calka M, Maślińska K, and Antosiewicz DM (2020) Identification and characterization of a tobacco metal tolerance protein, NtMTP2†. *Metallomics* 12(12): 2049-2064
61. Lan H-X, Wang Z-F, Wang Q-H, Wang M-M, Bao Y-M, Huang J, and Zhang H-S (2013) Characterization of a vacuolar zinc transporter OZT1 in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Rep* 40(2): 1201-1210

62. Yuan L, Yang S, Liu B, Zhang M, and Wu K (2012) Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. *Plant Cell Reports* 31(1): 67-79
63. Menguer PK, Farthing E, Peaston KA, Ricachenevsky FK, Fett JP, and Williams LE (2013) Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *J Exp Bot* 64(10): 2871-2883
64. Das N, Bhattacharya S, and Maiti MK (2016) Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene OsMTP1 is promising for phytoremediation. *Plant Physiol Biochem* 105: 297-309
65. Zhang M and Liu B (2017) Identification of a rice metal tolerance protein OsMTP11 as a manganese transporter. *PLoS One* 12(4): e0174987
66. Ueno D, Sasaki A, Yamaji N, Miyaji T, Fujii Y, Takemoto Y, Moriyama S, Che J, Moriyama Y, and Iwasaki K (2015) A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice. *Nat Plants* 1(12): 1-8
67. Blaudez D, Kohler A, Martin F, Sanders D, and Chalot M (2003) Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and Is an Oligomeric Vacuolar Zinc Transporter with an Essential Leucine Zipper Motif. *Plant Cell* 15(12): 2911-2928
68. Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, and Chalot M (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8(1): 1-16
69. Gao Y, Yang F, Liu J, Xie W, Zhang L, Chen Z, Peng Z, Ou Y, and Yao Y (2020) Genome-wide identification of metal tolerance protein genes in *Populus trichocarpa* and their roles in response to various heavy metal stresses. *Int J Mol Sci* 21(5): 1680
70. Zhang M, Senoura T, Yang X, and Nishizawa NK (2011) Functional analysis of metal tolerance proteins isolated from Zn/Cd hyperaccumulating ecotype and non-hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* Hance. *FEBS Lett* 585(16): 2604-2609
71. Wang F, Qiao K, Wang H, Wang H, and Chai T (2022) MTP8 from *Triticum urartu* Is Primarily Responsible for Manganese Tolerance. *Int J Mol Sci* 23(10): 5683
72. Liu P, An L, Ma L, Zou L, Du S, and Shen Y (2024) MTP family analysis and association study reveal the role of ZmMTP11 in lead (Pb) accumulation. *Plant Physiol Biochem* 212: 108740
73. Zhao C, Cui X, Yu X, Ning X, Yu H, Li J, Yang B, Pan Y, and Jiang L (2024) Molecular evolution and functional diversification of metal tolerance protein families in cereals plants and function of maize MTP protein. *Int J Biol Macromol* 274: 133071
74. Foy C, Scott B, and Fisher J (1988) Genetic differences in plant tolerance to manganese toxicity. W: Graham RD, Hannam RJ, and Uren NC (red) *Manganese in soils and plants*. Springer, Dordrecht. str. 293-307
75. González Á, del Mar Gil-Díaz M, and del Carmen Lobo M (2017) Metal tolerance in barley and wheat cultivars: physiological screening methods and application in phytoremediation. *J Soils Sed* 17(5): 1403-1412
76. Gvozdenac S, Inđić D, Vuković S, and Bursić V Cu and Cd tolerance of barley and white mustard: potential indicators of water contamination with these heavy metals. *Res J Agric Sci* 45(2): 118-126
77. Tanwar UK, Stolarska E, Rudy E, Paluch-Lubawa E, Grabsztunowicz M, Arasimowicz-Jelonek M, and Sobieszczuk-Nowicka E (2023) Metal tolerance gene family in barley: an in silico comprehensive analysis. *J Appl Genet* 64(2): 197-215
78. Statista-Search-Department. World barley production from 2008/2009 to 2023/2024. 2024 [cited 2024 13.03.2024]; Available from: <https://www.statista.com/statistics/271973/worldbarley-production-since-2008>
79. Gustin JL, Zanis MJ, and Salt DE (2011) Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC Evol Biol* 11(1): 1-13
80. Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, and Soulimane T (2015) Cation diffusion facilitator family: structure and function. *FEBS Lett* 589(12): 1283-1295
81. Lu M and Fu D (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* 317(5845): 1746-1748
82. Shirazi Z, Abedi A, Kordrostami M, Burritt DJ, and Hossain MA (2019) Genome-wide identification and characterization of the metal tolerance protein (MTP) family in grape (*Vitis vinifera* L.). *3 Biotech* 9(5): 199
83. Zhang Y, Gao M, Singer SD, Fei Z, Wang H, and Wang X (2012) Genome-wide identification and analysis of the *TIFY* gene family in grape. *PLoS One* (8(12))
84. Sakharkar MK, Chow VTK, Chaturvedi I, Mathura VS, Shapshak P, and Kanguane P (2004) A report on single exon genes (SEG) in eukaryotes. *Front Biosci Landmark* 9(6): 3262-3267
85. Chang J-D, Huang S, Konishi N, Wang P, Chen J, Huang X-Y, Ma JF, and Zhao F-J (2020) Overexpression of the manganese/cadmium transporter OsNRAMP5 reduces cadmium accumulation in rice grain. *J Exp Bot* 71(18): 5705-5715
86. Chinnusamy V, Jagendorf A, and Zhu J-K (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci* 45(2): 437-448
87. Li Q, Cai S, Mo C, Chu B, Peng L, and Yang F (2010) Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in a saline soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 73(1): 84-88

Heavy metal tolerance in crop plants: an *in silico* comprehensive analysis of Metal-tolerance gene family in barley

Magda Grabsztunowicz¹✉, Ewelina Stolarska¹, Umesh Kumar Tanwar¹,
Magdalena Arasimowicz-Jelonek², Ewa Sobieszczuk-Nowicka¹

¹Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 6 Str., 61-614 Poznań, Poland

²Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 6 Str., 61-614 Poznań, Poland

✉corresponding author: magda.grabsztunowicz@amu.edu.pl

Key words: metal tolerance proteins, barley, metal stress, phytoremediation

ABSTRACT

Heavy metal contamination in soil is a global concern due to its harmful effect to all living organisms. Phytoremediation is an emerging cost-effective technology, which utilizes different types of hyperaccumulator plants for the removal of heavy metal pollutants. Crop plants have been suggested as a good candidate for recultivation of agricultural soil in phytoremediation process, however the molecular mechanisms responsible for the crop tolerance to heavy metals is still unknown. Metal-tolerance proteins (MTPs) are divalent cation transporters that play critical roles in metal tolerance and ion homeostasis in plants. The current study identified 12 HvMTPs in the barley (*Hordeum vulgare*, Hv) genome; the majority of MTPs were hydrophobic proteins found in the vacuolar membrane. Gene expression profiling suggests that HvMTPs play an active role in maintaining barley nutrient homeostasis throughout its life cycle. The expression of barley HvMTP genes in the presence of heavy metals revealed that these MTPs were induced by at least one metal ion, implying their involvement in metal tolerance.

