

Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas

J.P. Navarro-Aviñó, I. Aguilar Alonso, J.R. López-Moya

Departamento de Biología Vegetal. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera. 46022, Valencia.

Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Durante los últimos años se ha producido un considerable avance en la Biotecnología del campo de la ciencia que se dedica a remediar lugares o medios contaminados mediante el uso de plantas y organismos relacionados, denominada Fitorremediación. Es especialmente significativo el desarrollo que se ha conseguido en la descontaminación de metales pesados. El presente trabajo trata desgranar cuales son los elementos clave que la genética molecular de plantas hace participar en la tolerancia y acumulación de metales pesados. Se repasan los avances más importantes en el campo y el intrincado equilibrio que se mantiene en el interior de las células para hacer efectivo el sistema de acumulación. Se describe además el funcionamiento del interior de la célula vegetal cuando una planta se somete a unas concentraciones elevadas de metales pesados. Es razonable pensar que si se comprende dicho funcionamiento es sólo una cuestión temporal diseñar y obtener soluciones adecuadas a todos los problemas derivados de la contaminación por metales pesados.

Palabras clave: fitorremediación, transporte, quelación, fitoquelatinas, glutatión, ROS

Biochemical and genetic aspects of the tolerance and accumulation of heavy metals in plants. In recent years a considerable advance in the biotechnology of the remediation of sites or contaminated materials by the use of plants and related organisms, denominated phytoremediation, has occurred. The development is especially significant in the decontamination of heavy metal-contaminated sites. The present work discusses the key aspects of plant molecular genetics involved in heavy metal tolerance and accumulation. The most important advances in the field and the intracellular balance needed to make the accumulation system effective are reviewed. The functioning within the cells when a plant is exposed to elevated heavy metal concentrations is described. It is reasonable to think that, if this system is understood, the achievement of solutions to all the problems derived from heavy metal contamination is only a question of time.

Key words: phytoremediation, transport, chelation, phytochelatin, glutathione, ROS

Introducción

Se definen como “metales pesados” aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g cm^{-3} cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. No obstante, en primer lugar, conviene clarificar que el término “metales pesados” es impreciso. En verdad se pretende indicar con este término aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Sin embargo en realidad cualquier elemento que *a priori* es beneficioso para la célula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico. Por tanto se seguirá manteniendo el término “metales pesados” para definir dichos elementos.

Junto a ellos hay otros elementos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por orígenes y comportamientos asociados; es este el caso de As, B, Ba y Se. Los metales pesados se clasifican en dos grupos:

- **Oligoelementos o micronutrientes.** Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- **Sin función biológica conocida.** Son altamente tóxicos, e incluyen Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi.

Los elementos pertenecientes a estos dos grupos también varían según autores. Además, cuando se habla de metales pesados tampoco se especifica el estado del elemento, es decir, si se trata del elemento puro, o de algunos o la totalidad de sus diversos estados de oxidación (compuestos), que no presentan las mismas propiedades físicas, químicas, tóxicas ni ecotóxicas. Este aspecto complica todavía más su clasificación. Por ejemplo, algunos compuestos de cromo hexavalente (Cr VI) son citados como carcinógenos humanos, pero prácticamente no se encuentra información sobre cánceres ocasionados por exposición a ese metal puro. Además, el cromo y algunas de sus aleaciones se emplean sin problemas, desde hace tiempo, en prótesis médicas y dentales.

En realidad quizás sea más apropiado hablar de elementos de tipo metálico que poseen orbitales atómicos profundos (“d” o “f”). Posiblemente esta presencia de orbitales profundos es realmente el aspecto clave que les confiere un comportamiento químico análogo en el interior de la célula, permitiendo agrupar a la mayoría de ellos bajo la denominación “metales pesados”, aunque realmente se agrupen elementos diversos.

En lo que sigue se enfocará el estudio de los procesos que convergen en la acumulación de metales pesados en plantas hacia su aplicación a la fitorremediación.

El problema de la entrada de metales pesados en la planta

Contaminación del suelo

El concepto de contaminación también merece reflexión. Se define como contaminación, según la Unión Europea, “la introducción directa o indirecta como consecuencia de la actividad humana de sustancias, vibraciones, calor o ruido en el aire, el agua o el suelo que pueden ser nocivos para la salud humana o la calidad del medio ambiente, causar daños a la propiedad material o perjudicar o entorpecer las actividades recreativas y otros usos legítimos de medio ambiente”. Por tanto, nos podemos encontrar con suelos con niveles extraordinariamente elevados de metales pesados por causas naturales (por ejemplo suelos mineros), y no estar catalogados como suelos contaminados.

Las concentraciones anómalas de metales pesados en los suelos pueden deberse básicamente a dos tipos de factores: causas naturales y causas antropogénicas. Las causas naturales pueden ser entre otras, actividad volcánica, procesos de formación de suelos, meteoros, erosión de rocas, terremotos, tsunamis, etc. Las causas antropogénicas pueden ser la minería, la combustión de carburantes fósiles, la industria a través de los vertidos, emisiones, residuos (incineración, depósito), como algunos pesticidas y fertilizantes, etc.

Dinámica de los metales pesados en el suelo

Los metales pesados presentes en los suelos no se comportan como elementos estáticamente inalterables, sino que siguen unas pautas de movilidad generales. La dinámica de los metales pesados en el suelo puede clasificarse resumidamente en cuatro vías:

- Movilización a las aguas superficiales o subterráneas.
- Transferencia a la atmósfera por volatilización.
- Absorción por las plantas e incorporación a las cadenas tróficas.
- Retención de metales pesados en el suelo de distintas maneras: disueltos o fijados, retenidos por adsorción, complejación y precipitación.

Transporte

Los iones inorgánicos y el agua (savia bruta) se transportan desde la raíz hasta las hojas mediante una serie de células tubulares que pertenecen a un tejido leñoso denominado xilema. La fuerza que mueve esta solución no radica en las células del tejido xilemático, sino en la fuerza propia del proceso de ósmosis y en otra fuerza, menos habitual, conocida como fuerza de succión. La ósmosis se produce porque existe una gran diferencia de concentración entre la parte superior de la planta (hojas, inflorescencias) donde es mayor y la parte inferior, es decir existe un potencial hídrico favorable al impulso ascendente. La fuerza de succión se produce cuando en las hojas se pierde agua por transpiración, pues las moléculas perdidas producen una succión de nuevas moléculas cercanas para reemplazar a las anteriores, de tal manera que se produce una fuerza que atrae agua desde las raíces hacia las hojas.

Toxicidad de los metales pesados

La toxicidad de los metales pesados depende, como ha quedado expuesto previamente, de la concentración, la forma química y la persistencia. Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en

concentraciones elevadas. Por otra parte, la mayoría de metales pesados se combina con otras formas químicas, antes de entrar en los organismos o cuando se encuentra en el interior de los mismos; por tanto, antes de determinar la toxicidad de un elemento es necesario determinar la forma química en la que se encuentra. La persistencia se define como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica.

Los metales pesados están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, en parte debido a su elevada tendencia a bioacumularse. La bioacumulación es un aumento de la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, de forma que llega a ser superior a la del producto químico en el ambiente. La toxicidad está causada frecuentemente por la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios de excreción. El proceso se agrava durante el paso por las distintas cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación sufren un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se hallan los mayores niveles de contaminantes. A este proceso se le denomina biomagnificación; es decir, muchas toxinas que están diluidas en un medio, pueden alcanzar concentraciones dañinas dentro de las células, especialmente a través de la cadena trófica. Este concepto se ejemplificará más abajo cuando se hable del Hg y el caso histórico de la bahía de Minamata.

Otro aspecto importante a considerar es la presencia simultánea (mezcla) de los metales pesados, ya que sus efectos pueden ser tanto tóxicamente sinérgicos o antagónicos (la toxicidad se reduce al mezclarse), por tanto existe cierta dificultad para predecir los efectos reales de los contaminantes en el medio. Los efectos de un compuesto o de la mezcla de ellos pueden ser inocuos, letales o subletales (no matan al individuo pero producen daños a nivel genético o fisiológico). Con frecuencia, los daños subletales suelen ser más perjudiciales para la población en general, ya que afectan al desarrollo o a la reproducción.

La causa primaria del elevado nivel de toxicidad a nivel químico es que los metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. En efecto, estos efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación, y estos ligandos están, a su vez, presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones, ya sea como moléculas aisladas. En este sentido, cabe destacar la gran afinidad que muestran los metales pesados, como principales ligandos, por grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, destacando en este aspecto sobre otros fenómenos, (1) la acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas, (2) el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia, y (3) la catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un fenómeno que merece ser estudiado aisladamente, dada su complejidad e importancia en el desarrollo de los mecanismos básicos de la célula. Como resumen de dicho fenómeno baste decir que provoca daño a distintos niveles, destacando los siguientes aspectos:

- Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfidrilo, dando lugar a puentes disulfuro que causan la interrupción del funcionamiento normal de la proteína o enzima.
- Peroxidación lipídica de membranas, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas.
- Efectos de daño sobre el ADN. Estos pueden ser desperfectos genotóxicos: mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares.

El estudio de la toxicidad y, en general, del comportamiento oxidativo de los metales pesados en el interior de la célula de un organismo viene determinado en gran medida por dos tipos de reacciones químicas, causantes a su vez de dos elementos ROS clave: H_2O_2 y O_2^- . Estas dos reacciones son las siguientes:

• Reacción de Fenton

La reacción de Fenton, según la terminología de la IUPAC, consiste en la descomposición del peróxido de hidrógeno mediante la adición de sales de hierro, para formar un radical $\text{OH}^\cdot$.



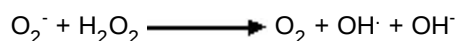
Este radical es tremendamente reactivo, y puede producir procesos de oxidación en cascada. En general lo que se produce en la célula son interacciones que causan una fuerte descompensación electrónica, principalmente por la acción de los radicales formados por el radical $\text{OH}^\cdot$, bien generando otros radicales, bien oxidando o reduciendo especies químicas presentes en el medio. En la práctica, el apelativo "reacción de Fenton" se utiliza para metales diferentes al Fe.

• Reacción de Haber - Weiss

La reacción de Haber-Weiss, según IUPAC, es en realidad un ciclo de dos reacciones. La primera reacción aprovecha el radical OH· producido por la reacción de Fenton para reaccionar con más peróxido (como en la reacción de Fenton) y originar un elemento crucial en las reacciones redox elaboradas en la célula, el radical superóxido:



El radical superóxido recién producido va a reaccionar entonces con más peróxido de hidrógeno (como en la reacción de Fenton), para volver a dar los productos no metálicos de la reacción de Fenton.



El resultado final es que el hierro se ha oxidado (en Fenton), y el aceptor final de electrones es el oxígeno (reacción de Haber-Weiss), que se libera en forma de oxígeno molecular, cerrando el proceso de cesión de los electrones por oxidación del metal. Acoplado a todo el sistema formado por las distintas reacciones, se producen radicales OH· que, como se ha mencionado anteriormente, pueden seguir desarrollando un mecanismo en cascada de consecuencias importantes para el equilibrio interno de la célula. Además, estos OH inducen daños sobre el ADN, lo que puede conducir a carcinogénesis por alguna de estas rutas:

- alteraciones producidas en oncogenes y factores de crecimiento.
- alteraciones en los genes supresores de tumores.
- alteraciones en los genes reguladores del crecimiento.

Como ha quedado descrito, en este conjunto de reacciones participan dos elementos ROS ($\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) que han demostrado jugar un papel esencial en la interacción de los metales pesados con las células de los seres vivos. Ambos son, además, elementos señalizadores relevantes. No obstante, es interesante señalar que todas estas reacciones requieren la presencia previa de H_2O_2 . ¿Qué ocurre cuando el metal está presente y no hay suficiente cantidad de H_2O_2 ? ¿o esto no ocurre nunca?.

Enfermedades y síntomas que generan

Debido al conjunto de reacciones químicas descritas hasta ahora, la toxicidad de los metales pesados se puede definir como elevada, tanto para microorganismos como para animales y plantas. Los metales pesados pasan del suelo a las plantas, y de ahí a los mamíferos. El problema esencial es que debido a la semejanza entre muchos contaminantes y los elementos traza esenciales, las células pueden incorporar elementos tóxicos que quedan dentro de ellas o incorporados en su membrana causando un daño letal. En humanos, en general, crean problemas en los tejidos reproductivos y en desarrollo, de tal manera que existe un riesgo de exposición en útero (teratógenos) y primeros años de vida (acumulación). Entre los efectos conocidos tenemos (para los metales pesados que suponen un mayor problema):

-As: bronquitis; cáncer de esófago, laringe, pulmón y vejiga; hepatotoxicidad; enfermedades vasculares; polineuritis. A nivel molecular el arseniato actúa como desacoplador tanto de la fosforilación oxidativa como de la fosforilación asociada a la glicólisis, interfiriendo, de esta forma, en la producción de energía. Esto se produce porque el arseniato es químicamente similar al fosfato, y puede reemplazarle en la mayoría de las reacciones de fosforilación. En consecuencia, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa puede utilizar arseniato en vez de fosfato, desacoplando la fosforilación asociada a la glicólisis, e impidiendo que se produzca ATP.

-Cd: bronquitis; enfisema; nefrotoxicidad; infertilidad; cáncer de próstata; alteraciones neurológicas; hipertensión; enfermedades vasculares y óseas. El cadmio es considerado uno de los elementos más peligrosos para la alimentación humana, particularmente por su carácter acumulativo. En el ambiente, el cadmio es peligroso porque muchas plantas y algunos animales lo absorben eficazmente y lo concentran dentro de sus tejidos. Una vez absorbido, se combina en animales con las metalotioneínas (proteína que se describe más abajo) y se acumula en los riñones, el hígado y los órganos reproductores. Entre los casos de envenenamiento por cadmio mejor conocidos y documentados se encuentra el producido en Japón y denominado como enfermedad de Itai-Itai. A nivel molecular el cadmio es un conocido bloqueador del calcio en la membrana plasmática. En general, se sabe que desplaza al calcio y al cinc en determinadas proteínas además de causar estrés oxidativo. El resultado de todo ello suele ser un daño severo en el ADN y en los lípidos.

-Hg: alteraciones neurológicas y sistema respiratorio. En realidad todas las formas de mercurio son potencialmente tóxicas, pero el rango de toxicidad varía considerablemente, siendo el vapor de mercurio la forma más peligrosa, dado que puede

difundir a través de los pulmones hasta la sangre y luego hasta el cerebro, donde puede causar daños importantes. En el año 1956 se detectó una enfermedad cuya causa no pudo ser demostrada hasta 1959, achacándose a la ingestión de peces contaminados por mercurio procedente de una planta de tratamiento químico. Este mercurio resulta metilado en los sedimentos por acción bacteriana, siendo el metil-mercurio el que finalmente origina el síndrome tóxico conocido como enfermedad de Minamata. En esta bahía de Japón una fábrica de plásticos vertía aguas residuales que contenían 0.1 ppb (partes por billón) de mercurio. Las aguas de la bahía contenían 2 ppb, concentración apta para beber. El plancton tomaba el agua con mercurio pero no lo excretaba. Los peces pequeños que se acumulaban de plancton, tampoco lo excretaban, y tenían una concentración de mercurio de 200 ppb. En los grandes peces el nivel de mercurio estaba entre 4.000 y 20.000 ppb. Las familias que se alimentaron de estos peces desarrollaron la "enfermedad de Minamata", y muchos resultaron lisiados, paralizados, perdieron su visión, capacidades mentales o murieron. El Hg promueve también la pérdida de Ca y Mg.

-Pb: es el metal con propiedades tóxicas que más se ha propagado en el ambiente en las últimas décadas. Alteraciones neurológicas, nefrotoxicidad, anemia, cáncer de riñón. Los animales pueden absorber plomo por inhalación o ingestión. Si la absorción es lenta, la excreción lo es más aún, de manera que el plomo tiende a acumularse. La anemia es el primer síntoma de envenenamiento crónico producido por el plomo en los animales, dado que interfiere en la síntesis del grupo hemo, reflejándose en síntomas tales como náuseas, vómitos y dolores abdominales. Más grave es la degeneración del tejido en el sistema nervioso central. El Pb suele aprovechar la metabolización del Ca para sustituirlo y dañar la célula.

Sin embargo hay un denominador común en la toxicidad de ciertos metales. En efecto, aunque las proteínas específicas que se ven principalmente afectadas por mercurio, plomo, cadmio y arsénico pueden diferir de un metal a otro, se produce una interacción bioquímica similar que es la responsable de la toxicidad de estos cuatro metales.

Un aspecto importante a considerar, concerniente a la toxicidad es que el tiempo de residencia de los metales pesados en el suelo ronda los miles de años. Por tanto, representan un riesgo permanente para la salud ambiental. No ocurre así con otros productos tóxicos como plaguicidas, insecticidas, derivados del petróleo etc, que son, hoy día, factores comunes de contaminación mundial. En consecuencia, surge la necesidad de tratar, descontaminar, y remediar suelos contaminados por metales pesados.

Mecanismos celulares para tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas

Para poder comprender la genética molecular de la acumulación de los metales pesados es necesario un conocimiento profundo de la interacción de los mismos con el entorno tanto en el interior de la planta como en el exterior de la misma. Conseguir este conocimiento requiere el estudio de diferentes aspectos bien delimitados (**Fig. 1**).

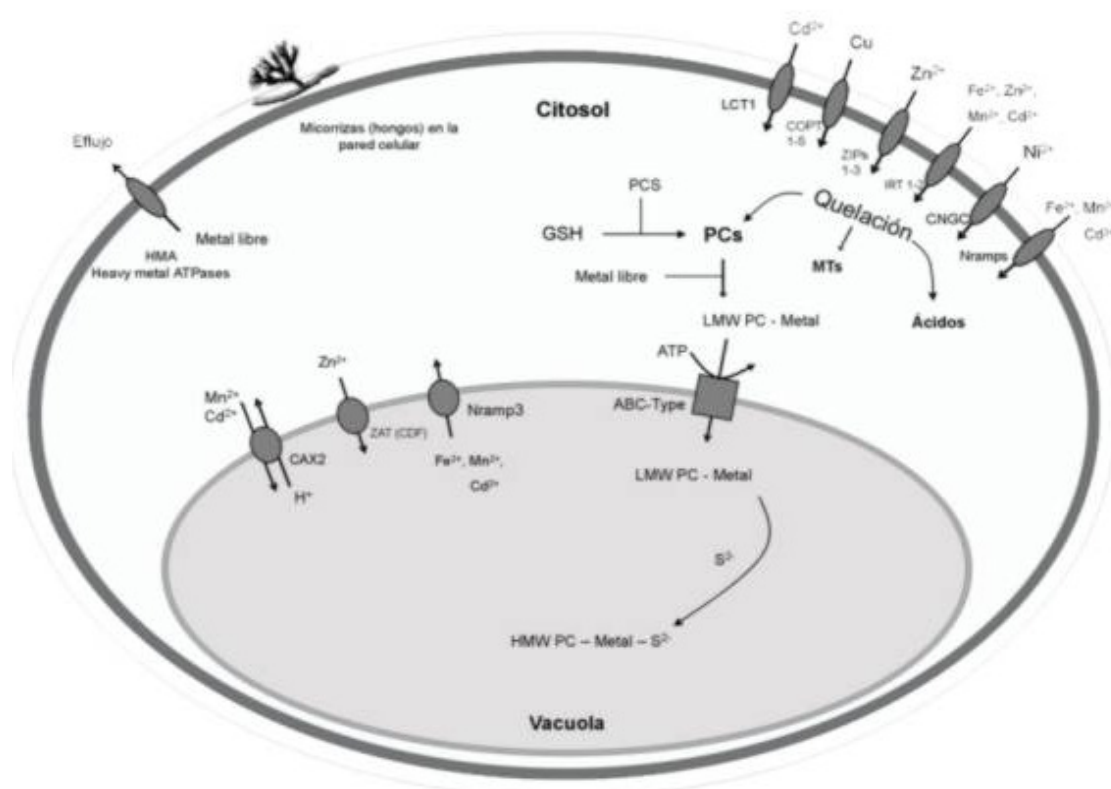


Figura 1. Interacción de los metales pesados con plantas. Aspectos clave que determinan su acumulación.

En lo que sigue se tratará de forma sintética diferentes aspectos de interacción planta-metal relacionados con tolerancia y detoxificación. Estos son los siguientes:

Micorrizas

Las micorrizas son ciertos hongos del suelo que se encuentran en asociación simbiótica con las raíces de (la mayoría) de las plantas. La propia palabra define la simbiosis entre un hongo (*mycos*) y las raíces (*rhizos*) de una planta. La asociación física se produce porque las raíces de las plantas se unen con las hifas de determinados hongos (**Fig. 2**). La planta obtiene del hongo la parte que viene del suelo mientras el hongo obtiene la parte que viene del aire, así la simbiosis proporciona por parte del hongo nutrientes minerales y agua (suelo), y por parte de la planta, sustratos energéticos y carbohidratos (fotosíntesis).



Figura 2. Detalle de la morfología de raíces colonizadas por ectomicorrizas.

Las plantas micorrizadas presentan una mayor tolerancia a los metales pesados gracias, en parte, a la capacidad para inmovilizar los metales en la raíz, impidiendo que éstos pasen a la parte aérea de la planta. Una primera barrera a la entrada de metales pesados la constituirá

a la pared celular del hongo, que tiene una gran capacidad de adsorber cationes sobre su superficie, puesto que está se encuentra cargada negativamente. Además, el hongo restringe el movimiento del metal a las raíces de la planta. Para ello se sirve de diversos mecanismos que varían según la especie de hongo y planta, y del metal. Sin embargo, se ha observado también una intensa actividad de translocación y absorción de metales pesados en algunas especies por efecto de las micorrizas, evidenciando que funcionan en ambos sentidos, impidiendo la entrada de metales pesados y favoreciendo su acumulación y, por tanto, procurando una alternativa de utilización en fitorremediación. En cualquier caso, los procesos esquematizados, en que participan las micorrizas son:

- absorción/adsorción de metales pesados en el hongo.
- reducción del acceso de los metales pesados al apoplasto por hidrofobia.
- quelación de los metales pesados con exudados del hongo.

Pared celular y exudados de raíz

La raíz constituye el tejido de entrada principal de metales pesados en la planta. Hasta allí los metales pesados pueden llegar, fundamentalmente, por un proceso de difusión en el medio, mediante un flujo masivo y por intercambio catiónico. La

raíz posee cargas negativas en sus células, debido en gran medida a la presencia de grupos carboxilo del ácido péctico. Las cargas negativas de estas células de la rizodermis interaccionan con las positivas de los metales pesados presentes en el suelo, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular. De esta forma, los cationes entran por la pared celular, que además es hidrofílica, lo que facilita el transporte iónico. Una vez unidas las cargas positivas a las negativas de la pared celular, los metales pesados se transportan, en parte por la vía apoplástica, y en parte por la simplástica. No obstante, se ha demostrado recientemente que parte del flujo de metales pesados, al menos en el caso del Pb puede quedar retenido en la pared celular por la estructura de lignina y celulosa (Marmioli et al. 2005).

Los exudados son compuestos orgánicos liberados por la raíces de la planta. Existen dos tipos: de bajo peso molecular y de alto peso molecular. Los primeros se liberan a favor de gradiente de concentración, y los segundos se liberan por mecanismos de transporte activo o por lisis celular. Entre los de bajo peso molecular encontramos ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, aminoácidos, y gases como el etileno. Los exudados de alto peso molecular, por el contrario, son productos de lisados (como la autólisis de células epidérmicas y corticales), secreciones (que implican un proceso metabólico de liberación) y mucílagos. Los exudados facilitan la disponibilidad de los metales. Por ejemplo, se ha observado que los exudados favorecen la absorción de Fe en suelos deficientes en el mismo. La exudación de mucílagos que forman una capa externa a la raíz (mucigel), también favorece la complejación de metales pesados como el Cd, Cu y Pb.

Membrana plasmática

La célula necesita tener los siguientes caminos metabólicos en buen estado: la producción de ATP mitocondrial, el metabolismo de calcio, la síntesis de proteínas, la regulación del ADN, la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. Estos dos últimos proporcionan los precursores para síntesis de aminoácidos y los equivalentes reducidos, cuya oxidación genera la mayoría del ATP. Los daños a la membrana plasmática, a la producción de ATP mitocondrial y al control de los niveles de calcio intracelular son rutas comunes para la destrucción final de la célula y merecen especial atención.

La membrana plasmática es un sistema complejo y de un funcionamiento altamente sofisticado, siendo como es la puerta de entrada de cualquier elemento (señal, nutriente, tóxico, etc) al lugar donde se realiza la química que mantiene la vida de la célula. La membrana plasmática es utilizada por la célula para mantener los gradientes iónicos, que a su vez regulan el volumen celular. Si se daña la membrana, entran iones Ca^{2+} y salen iones K^+ (responsables de los fenómenos de polarización y despolarización de la membrana y, en definitiva, de la transmisión eléctrica). La salida de K^+ favorece la entrada de agua. El aumento de agua incrementa el volumen celular. Hay varios mecanismos que pueden inducir estos cambios, algunos ejemplos son fluidización de la membrana, peroxidación de lípidos, daño al citoesqueleto, bloqueo de canales etc. Independiente de la agresión tóxica, la membrana plasmática es uno de los componentes que primero responde al daño, siendo el resultado final del mismo la pérdida de la integridad de la membrana. Por tanto, conviene tener en cuenta que el daño al citoesqueleto causará daños también a la membrana plasmática.

La membrana plasmática, por tanto, se ve rápidamente afectada por metales pesados. Sobre ella se producen efectos específicos según el metal, promoviendo daños mediante varios mecanismos. De manera resumida:

- Oxidación y entrecruzamiento de proteínas (conteniendo grupos tiol).
- Inhibición de proteínas de membrana que son esenciales (como por ejemplo la H^+ -ATPasa).
- Cambios en composición y fluidez de los lípidos de membrana, y cambios en la permeabilidad. Por ejemplo, se sabe que el Cu y el Cd alteran la composición de los lípidos de membrana y provocan la fuga de solutos de la célula.

En cualquier caso todos estos mecanismos esencialmente acaban alterando las propiedades eléctricas de la membrana plasmática. Sin embargo la membrana plasmática puede estar involucrada en la tolerancia a metales pesados reduciendo la captación o estimulando las bombas de flujo de metales que promueven la entrada al citosol. Se sabe que las plantas tolerantes protegen la membrana. ¿Cómo?. Básicamente:

- Mediante mecanismos de reparación que mantienen la integridad de la membrana plasmática
- Utilizando mecanismos de protección como proteínas de choque térmico, metalotioneinas, etc.
- Mejorando los mecanismos de homeostasis de metal
- Promoviendo un influjo reducido a través de la membrana plasmática
- Promoviendo un eflujo selectivo (metabólicamente, es decir energéticamente, más conveniente que los mecanismos específicos de influjo y restricción).

Las plantas poseen varias clases de transportadores de metal que deben estar involucrados en la homeostasis y la tolerancia. Hay, sin embargo, pocas evidencias directas al respecto, sobretodo para el sistema de eflujo. Como ejemplo de influjo reducido, en *Nicotiana tabacum* se ha descrito la tolerancia conferida por un transportador (NtCBP4) regulado por calmodulina para el caso del Ni. También se han descrito transportadores que facilitan el eflujo a través de la membrana plasmática (CPx-ATPases, Nramps, familia CDF, familia ZIP, **Tabla 1**).

Tabla 1. Principales transportadores de membrana plasmática de metales pesados.

Proteínas	Donante	Receptor	Aspectos relevantes	Referencia
FRO2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Actividad quelatos férricos, acumulación Fe, Cu, Mn, Zn y Mg.	Delhaize, 1996
FRE1, FRE2 Promotor 35S	Levadura	Tabaco	Fe(III) reductasas, involucradas en toma y acumulación de Fe.	Samuelsen <i>et al.</i> , 1998
NtCBP4 Promotor 35S	Tabaco	Tabaco	Proteína ligante de calmodulina. Estructura similar a transportadores de iones AtCNGC1 (<i>Arabidopsis</i>) y HvCBT1 (<i>Hordeum vulgare</i>). Tolerancia y acumulación de Ni y Pb. Tolerancia a metales pesados.	Arazi <i>et al.</i> , 1999
NtCBP4? C Promotor 35S	Tabaco	Tabaco	Expresión truncada tolerancia y acumulación atenuada de Pb.	Sunkar <i>et al.</i> , 2000
AtNramp1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nramp codifica familia de proteínas, varias funciones. Algunas transportan metales. Tolerancia a Fe, homeostasis Fe.	Curie <i>et al.</i> , 2000
AtNramp3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia a Cd, acumulación Fe Disrupción: tolerancia a Cd Transportador de Fe y Cd	Thomine <i>et al.</i> , 2000
IRT1 ZNT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína toma de Fe, Zn, Mn y Cd La sustitución de un aminoácido resulta en pérdida de capacidad de transporte de Fe y Mn o de Zn.	Rogers <i>et al.</i> , 2000
ZntA Bomba Pb(II)/Cd(II)/Zn (II)	<i>Escherichia coli</i>	Levadura y <i>Arabidopsis thaliana</i>	Células de levadura transformadas con el gen mejoraron la resistencia a Pb(II) y Cd(II). En plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas con ZntA, se mejora su resistencia a Pb(II) y Cd(II).	Lee <i>et al.</i> , 2003
HMA2 and HMA4 (Heavy Metal- transporting subfamily of the P-type ATPases).	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Papel importante de HMA2 y HMA4 en Homeostasis de Zn.	Hussain <i>et al.</i> , 2004
AtBOR1 Transloca Boro desde las raíces hasta los tallos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	La acumulación de mRNA de BOR1 no está fuertemente afectada por la presencia de Boro. Los mecanismos post-transcripcionales juegan un importante papel en la regulación de la acumulación de BOR1.	Takano <i>et al.</i> , 2005

Quelación

Uno de los aspectos más importantes de la acumulación de metales pesados es el que se refiere al proceso de complejación. Un complejo o compuesto de coordinación es el resultado de la interacción de un átomo central, esto es, un ion metálico con orbitales de valencia vacíos que puede actuar como ácido de Lewis (aceptor de electrones), y una o varias bases de Lewis (dador de electrones) con pares de electrones libres. Estas bases se conocen como agentes complejantes o ligandos. Esta interacción lleva a la formación de un enlace covalente coordinado o dativo. El átomo central debe disponer de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones. En consecuencia, los cationes de los grupos I y II del sistema periódico tienen poca tendencia a formar complejos, al disponer de orbitales poco profundos y, por tanto, con poca disposición a captar electrones. Por el contrario, los metales de transición sí que presentan una elevada tendencia al proceso de quelación, puesto que poseen orbitales profundos (tipo d o f).

El metal se rodea de los ligandos formando un complejo. Los ligandos simples, como el agua, sólo forman un enlace con el átomo central, y se llaman monodentados o monocoordinados. Algunos ligandos son capaces de formar múltiples enlaces de coordinación, y se describen como bidentados (bicoordinados), tridentados (tricoordinados), lo cual va incrementando la estabilidad de los complejos. Generalmente tienen mucha mayor tendencia a formar complejos que sus homólogos monocoordinantes.

La planta utiliza este mecanismo de complejación en el interior de la célula para detoxificar (amortiguar) los metales pesados, uniendo a ellos ligandos para formar complejos. De esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que le mantiene en equilibrio electrónico (acomplejado), pero que no lo deja fuera del metabolismo, no se ha eliminado del citoplasma de la célula y, por ello, sigue siendo potencialmente tóxico. Como se ha mencionado anteriormente, los metales pesados muestran gran afinidad por determinados grupos funcionales como principales ligandos, como grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Los ligandos que utiliza son básicamente aminoácidos y ácidos orgánicos, y más específicamente, dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneinas. Entre los aminoácidos y los ácidos orgánicos se encuentran los ácidos cítrico y málico, la histidina, la cisteína etc. (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principal metabolito que actúa de ligando para la formación de complejos de citrato y metales pesados.

Proteínas	Donante	Receptor	Aspectos relevantes	Referencia
Citrato sintasa	Tabaco	Tabaco, Papaya	Tolerancia a Al	De la Fuente <i>et al.</i> , 1997.

- Metalotioneinas (MTs)

Fueron las primeras proteínas identificadas (en mamíferos) como transportadoras de Cd. Son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrilo que posee como radical. Son pues proteínas de transporte de metales, ricas en cisteína y de bajo peso molecular. Se cree que son las responsables esenciales de la quelación de metales pesados en el citoplasma de las células de mamíferos y bacterias, pero se piensa también que no son proteínas tan decisivas en el proceso de quelación de metales pesados en plantas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Principales metalotioneinas implicadas en la tolerancia y/o acumulación de metales pesados.

Proteínas	Donante	Receptor	Aspectos relevantes	Referencia
MT2	Humano	Tabaco	Tolerancia Cd en germinación	Misra y Gedamu, 1989
MT1	Ratón	Tabaco	Tolerancia Cd en germinación	Pan <i>et al.</i> , 1994
MT	Guisante	Arabidopsis	Acumulación de Cu	Evans <i>et al.</i> , 1992
CUP1	Levadura	Coliflor	16 veces la tolerancia a Cd y acumulación de Cd	Hasegawa <i>et al.</i> , 1997

- Fitoquelatinas (PCs)

Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados. Se identificaron después que las MTs. Se piensa que las fitoquelatinas pueden desempeñar en plantas el papel equivalente al que las metalotioneínas desempeñan en mamíferos y bacterias. Las fitoquelatinas se inducen rápidamente en plantas por tratamiento con metales pesados. Su disminución provoca una mayor sensibilidad a metales pesados, por tanto su papel en la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas es crítico (**Tabla 4**).

Tabla 4. Principales fitoquelatinas implicadas en la tolerancia y/o acumulación de metales pesados.

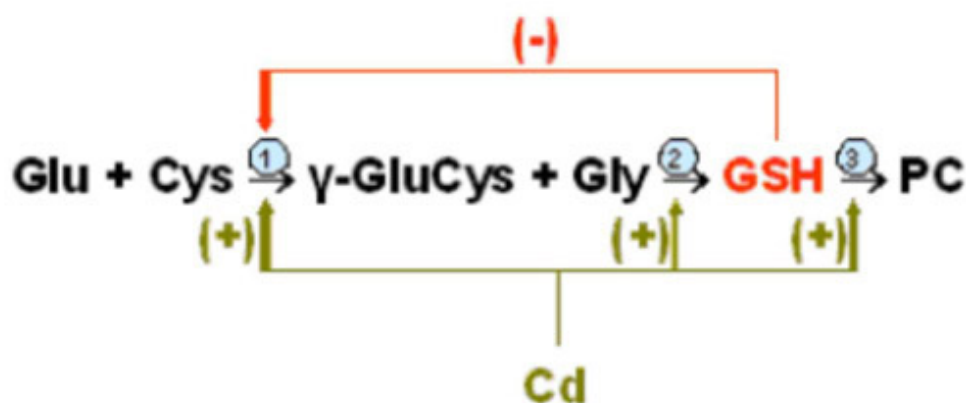
Proteínas	Donante	Receptor	Aspectos relevantes	Referencia
gshII (GS) gshI (γECS)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Brassica juncea</i>	Tolerancia y acumulación de Cd. Acumulación de Zn, Cd, Cr, Cu y Pb.	Zhu <i>et al.</i> , 1999
parB (glutathion S transferasa)	Tabaco	<i>Arabidopsis</i>	Tolerancia a Cu, Al y Na.	Ezaki <i>et al.</i> , 2000
γECS Antisentido Silenciado Sobreexpresión	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	GSH PCs tolerancia a Cd. GSH pero no la tolerancia a Cd, GSH no limitante.	Xiang <i>et al.</i> , 2001
RCS1 (cisteína sintasa)	Arroz	Tabaco	PCs tolerancia a Cd, pero baja acumulación (excreción, dilución...).	Harada <i>et al.</i> , 2001
TaPCS1 (fitoquelatina sintasa)	Trigo	<i>Nicotiana glauca</i>	Tolerancia a Pb y Cd. Acumulación (doble) Pb. Mayor acumulación que <i>Thlaspi</i> en plantas crecidas en suelos mineros (mezclas reales de distintos metales)	Gisbert <i>et al.</i> , 2003 Martínez <i>et al.</i> , 2006
AtPCS1 (fitoquelatin sintasa)	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	mRNA PCs pero hipersensibilidad a Cd y Zn que desaparecía al suplementar el medio con GSH. Hipersensibilidad debida a la toxicidad de PCs cuando hay más del nivel óptimo en relación al GSH	Lee <i>et al.</i> , 2003

Las fitoquelatinas tienen como sustrato el glutatión. El glutatión está considerado el péptido más abundante de la Tierra. Además, o quizás esto explique su abundancia, es una molécula clave en el balance del estado oxidativo de la célula. También participa en procesos de detoxificación de diversas sustancias lesivas, y es capaz de quelar metales pesados por sí misma. En realidad el glutatión participa en una gran variedad de procesos de los cuales se han señalado sólo los más esenciales.

La estructura del glutatión (GSH) está constituida por 3 aminoácidos: Glutámico (Glu), Cisteína (Cys) y Glicina (Gly), unidos por enlaces peptídicos. Sin embargo, de forma inusual, el primer aminoácido, Glu, se une al segundo por el grupo carboxilo, no cercano al amino en α, como sería habitual, sino por el grupo carboxílico residual. Es en ese sentido, el glutatión un péptido inusual, cuya estructura primaria es: γ-GluCysGly.

Numerosos estudios indican, como se ha mencionado previamente, que el GSH es el sustrato para la biosíntesis de las PCs. Este proceso de síntesis se acomete a través de los enzimas que se indican en el esquema (**Fig. 3**). Se ha demostrado que estructuralmente la síntesis de PCs se produce por unión de GSH, con residuos de Glu y Cys ligados a través de repeticiones

de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ donde $n = 2-5 \dots 11$. En cuanto al consumo energético, los dos primeros pasos (es decir la síntesis completa de glutatión) requiere consumo de ATP. No así la síntesis de PCs.



- 1: γ ECS (gamma-glutamylcisteína sintetasa)
- 2: GS (glutatión/GSH sintetasa)
- 3: PCS (fitoquelatina sintetasa)

Figura 3. Esquema del proceso de síntesis de PCs.

Es importante señalar que el Cd es un efector positivo de la síntesis de PCs, actuando sobre los pasos 1, 2 y 3, es decir, sobre todos los enzimas que intervienen en la síntesis. Sin embargo, aún es quizás más relevante señalar que el paso de inicio de síntesis de glutatión, y por tanto de PCs, está inhibido por el mismo glutatión obtenido en el paso 2. En consecuencia una sobreexpresión o incremento de los enzimas que intervienen en la síntesis de glutatión, sin un incremento de la producción o actividad de la PCs, llevará a una producción limitada de los mismos, o al menos más limitada que si se incrementa la actividad PCS. Esto es importante a la hora de diseñar una estrategia biotecnológica de mejora en la acumulación de metales pesados.

Modo de acción de las PCs

Las PCs se sintetizan en el citosol, donde se unen a compuestos metálicos formando complejos. Sin embargo, técnicas de HPLC y rayos X detectan mayores concentraciones de metal y PCs en el interior de la vacuola, por lo que se deduce que el transporte y acumulación en su interior están implicados en tolerancia y detoxificación. En consecuencia, parece ser que el paso final en el proceso de detoxificación, esto es, desde la movilización del metal del suelo a las raíces hasta llegar al interior de las células tanto de la raíz como de las hojas, es la compartimentalización vacuolar.

Compartimentalización vacuolar

El eflujo de iones y el transporte al interior de la vacuola constituyen dos maneras diferentes de conseguir el mismo objetivo: reducir la concentración de metales tóxicos en el citoplasma. La diferencia importante entre ambos, es que mientras en el primer caso no es una garantía de que el problema de la toxicidad esté resuelto, en el segundo caso sí lo es. Además del bien documentado proceso de acumulación, de los complejos PCs-Cd en vacuola, hay evidencias de acumulación de otros metales, involucrando diferentes sistemas de transporte desde el tonoplasto como Zn, Ni, etc. (**Tabla 5**). Dentro de la vacuola se forman complejos PCs-Cd de alto y bajo peso molecular (LMW: low molecular weight y HMW: high molecular weight) lo que parece indicar que el mecanismo de procesamiento en citoplasma y almacenamiento es un proceso sofisticado y complejo que requiere un mejor conocimiento (**Fig. 1**).

Tabla 5. Principales transportadores vacuolares de metales pesados.

Proteínas	Donante	Receptor	Aspectos relevantes	Referencia
AtMTP1 o ZAT (transportador vacuolar de Zn) 35S	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	Tolerancia y acumulación de Zn.	Van der Zaal <i>et al.</i> , 1999
CAX2 (transportador vacuolar de Ca)	<i>Arabidopsis</i>	Tabaco	Acumulación de Ca, Cd, Mn y tolerancia a Mn	Hirschi <i>et al.</i> , 2000
YCF1 (transportador vacuolar de Cd)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis</i>	Tolerancia y acumulación de Cd y Pb.	Song <i>et al.</i> , 2003
ZRC1, miembro de la familia CDF de transportadores de metales. Transportador vacuolar de cinc.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Actúa como antiportador con H ⁺ para almacenar Zn ⁺² en la vacuola.	MacDiarmid <i>et al.</i> , 2002
PtdMTP1 (cation diffusion facilitator (CDF) family)	Chopo híbrido <i>Populus trichocarpa</i> × <i>Populus deltoides</i>	Levadura y <i>Arabidopsis thaliana</i>	Su expresión en levadura complementa la hipersensibilidad de cepas mutantes de transportadores de cinc pero no para otros metales Cd, Co, Mn y Ni. En <i>Arabidopsis</i> confiere tolerancia a Zn.	Blaudez <i>et al.</i> , 2003
ShMTP1 (cation diffusion facilitator (CDF) family)	<i>Stylosanthes hamata</i> (legumbre tropical)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confiere tolerancia a Mn ⁺² por secuestro y eflujo de Mn ⁺² .	Delhaize <i>et al.</i> , 2003
CAX1 (Cation Exchanger1) transportador Ca ⁺² /H ⁺ .	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mutantes <i>cax1</i> presentan un 50% de reducción en la actividad antiporte Ca ⁺² /H ⁺ del tonoplasto, un 40 % de reducción en la actividad tipo V H ⁺ -ATPasa del tonoplasto, un 36% de aumento en la actividad Ca ⁺² -ATPasa del tonoplasto, y un incremento de la expresión de los antiportadores vacuolares Ca ⁺² /H ⁺ . CAX3 y CAX4. Aumento del crecimiento en líneas mutantes <i>cax1</i> con Mn ⁺² .	Cheng <i>et al.</i> , 2003
AtPDR12 (ATP-binding cassette).	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPDR12 es un transportador tipo ABC que contribuye a la resistencia a Pb(II) en <i>Arabidopsis</i> .	Lee <i>et al.</i> , 2005
AtATM3 (ATP-binding cassette transporter). Localizado en la membrana	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtATM3 contribuye a la resistencia a Cd y sugiere que puede mediar el transporte de conjugados de Cd (II) a través de la membrana mitocondrial.	Kim <i>et al.</i> , 2006

mitocondrial.				
---------------	--	--	--	--

Biotransformación

Al conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico, o a la transformación química de un compuesto en el organismo, se le denomina biotransformación. Para reducir la respuesta tóxica de una sustancia en un organismo hay que disminuir la cantidad de sustancia en forma activa (tóxica) y el tiempo de permanencia de la misma en el sitio de acción. ¿Cómo? Incrementando la polaridad ya que ello aumenta la difusibilidad del tóxico y por tanto puede incrementar la velocidad de excreción. Además, muchas sustancias tóxicas que ven incrementada su polaridad se convierten en sustratos accesibles para posteriores reacciones de detoxificación, reacciones que, por otra parte, no serían posibles de no incrementar la polaridad. Con frecuencia pues, se trata de convertir un xenobiótico (compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio) no polar en un compuesto soluble en agua. Estas reacciones se agrupan en dos conjuntos denominados Biotransformación Fase I y Biotransformación Fase II:

- **Fase I.** Biotransforma los xenobióticos convirtiéndolos en sustratos de los enzimas de la Fase II, al mismo tiempo que los hace más hidrófilos.
- **Fase II.** Agrega un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de las reacciones de la Fase I, o a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación (**Fig. 4**).

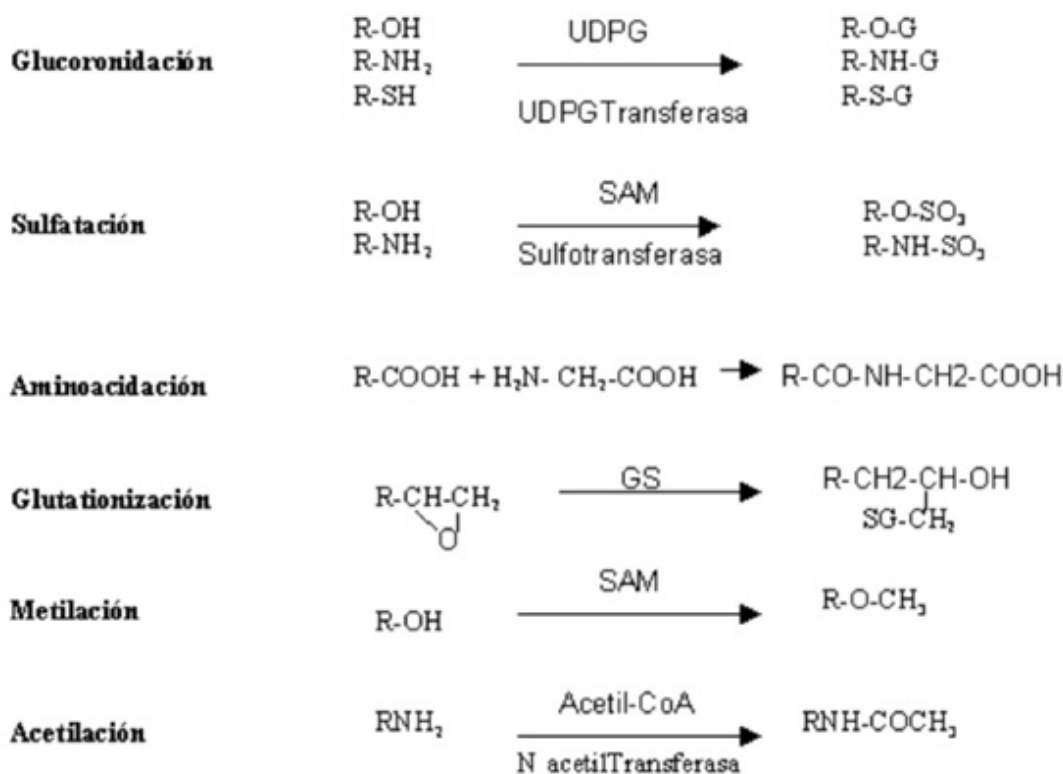


Figura 4. Reacciones de conjugación

Mecanismo de reparación celular

Se denomina mecanismos de reparación celular al conjunto de procesos que se activan como respuesta a los fenómenos de deterioro celular (como estrés oxidativo). Estos mecanismos se activan para restablecer las características iniciales de la célula. Los mecanismos mejor conocidos son los que participan en la síntesis de componentes de pared, y aquellos mecanismos que participan en la activación de procesos de reparación de errores rutinarios en la copia de ADN. Este es un tema complejo y bien estudiado, en el caso, sobretudo, de daños al DNA. Se sabe que en la reparación de la membrana plasmática después del daño causado por la presencia de metales pesados están involucradas las metalotioneinas y, sobre todo, las proteínas de choque térmico. Estas últimas incrementan su expresión en gran variedad de organismos en respuesta

a la subida de temperaturas por encima de la óptima. También se expresan en respuesta a otros estreses como metales pesados, de forma que actúan como protección y reparación de proteínas. Se ha comprobado que un corto estrés por calor antes de estrés por metales pesados induce un efecto de tolerancia, previniendo el daño en la membrana.

Mejora de la entrada y acumulación de metales pesados en plantas

El conocimiento de todos los procesos descritos hasta ahora nos podría permitir mejorar la entrada y acumulación de metales pesados, sin grave perjuicio para la célula. ¿Cómo se consigue que una planta acumule más metales? Para abordar este problema se sugiere recapitular la secuencia de acontecimientos que se mencionan por orden temporal de precedencia: Se ha hablado de:

- Transporte: entrada y salida de metales pesados al interior de la planta primero y al interior de la célula después.
- Quelación: secuestro de los metales contaminantes mediante la unión a ligandos específicos (principalmente peptídicos) producidos por la propia planta.
- Compartimentalización: proceso por el que el complejo ligando-metal queda retenido en una vacuola.
- Biotransformación: conjunto de reacciones de descomposición, conjugación o síntesis implicadas en el correcto procesamiento de los contaminantes.
- Mecanismos de reparación celular: mecanismos que en respuesta al deterioro sufrido, reestablecen las características iniciales de la planta.

Se ha hablado de todos estos procesos. El modo de abordar el problema con éxito, consiste en ponderar los pasos a realizar. En primer lugar hay que asegurar que el metal no produce un efecto tóxico importante. En efecto, para poder mejorar la acumulación se debe, ante todo, evitar que el metal pesado provoque daño en su transporte. El daño no se producirá, en buena medida, si el metal fluye de una manera rápida por la raíz y los tejidos, de tal manera que llegue cuanto antes a un destino final donde sea convenientemente amortiguado y empaquetado en forma no tóxica. Para ello, habrá que conseguir que el metal no sea lesivo en el citoplasma, procurando suficiente cantidad de ligando para que inmediatamente se amortigüe el efecto tóxico (quelación). En segundo lugar, hay que disponer el complejo metal-ligando en vacuola, porque el metal sigue siendo potencialmente tóxico mientras no se deposite en este reservorio, donde queda convenientemente almacenado (compartimentalización). Y en tercer lugar, se puede incrementar el transporte, puesto que el metal será adecuadamente dispuesto. En un segundo orden de importancia quedan los procesos de Biotransformación y los Mecanismos de reparación celular, que serán, en todo caso, procesos que perfeccionarán lo conseguido con la mejora de los procesos anteriores.

Referencias

- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H. 1999. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* 20: 171–182.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., 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: 2911–2928.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Barkla, B.J., Shigaki, T., Hirschi, K.D. 2003. The *Arabidopsis* *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses, and reveals interplay among vacuolar transporters. *Plant Cell* 15: 347–364.
- Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R., Briat, J.F. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347: 749–755.
- De la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566–1568.
- Delhaize, E. 1996. A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 111:849–855.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., Ryan, P.R. 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* 15: 1131–1142.
- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M., Robinson, N.J. 1992. Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMT_A* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMT_A* function. *Plant Mol. Biol.* 20: 1019–1028.

- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. 2000. Expression of Aluminum-Induced Genes in Transgenic Arabidopsis Plants Can Ameliorate Aluminum Stress and/or Oxidative Stress. *Plant Physiol.* 122: 657-666.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walter, D.J., Bernal, M.P., Serrano, R., Navarro-Aviñó, J. 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *BBRC* 303: 440-445.
- Harada, E., Choi, Y.E., Tsuchisaka, A., Obata, H., Sano, H. 2001. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *Journal of Plant Physiol.* 158: 655-661.
- Hasegawa, I., Terada, E., Sunairi, M., Wakita, H., Shinmachi, F., Noguchi, A., Nakajima, M., Yakazi, J. 1997. Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUP1*). *Plant Soil* 196: 277-281.
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L., Wagner, G.J. 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco: altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124: 125-133.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Camakaris, J., Harper, J.F., Cobbett, C.S. 2004. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1327-1339.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E., Lee, Y. 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140: 922-932.
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., Eide, D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19(12): 2845-55.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., Marmioli, N. 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Pollut.* 134: 217-227.
- Martínez, M., Bernal, P., Almela, C., Vélez, D., García-Agustín, P., Serrano, R., Navarro-Aviñó, J. 2006. An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens* with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere* 64: 478-485.
- Misra, S., Gedamu, L. 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 161-168.
- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J., Yang, Y., Hwang, I., Martinoia, E., Lee, Y. 2003. Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. *Plant Physiol.* 133: 589-596.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B., Korban, S.S. 2003. Overexpression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiol.* 131(2): 656-663.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., Lee, Y. 2005. AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 827-836.
- Pan, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z., Ru, B. 1994. Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 24: 341-351.
- Rogers, E.E., Eide, D.J., Guerinot, M.L. 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12356-12360.
- Samuelsen, A.I., Martin, R.C., Mok, D.W., Mok, M.C. 1998. Expression of the yeast *FRE* genes in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 118: 51-58.
- Song, W.Y., Sohn, E.J., Martinoia, E., Lee, Y.J., Yang, Y.Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., Lee, Y. 2003. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotech.* 21: 914-919.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J., Sanders, D., Bouchez, D., Fromm, H. 2000. Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J.* 24: 533-542.

Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., Von Wirén, N., Fujiwara, T. 2005. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of Arabidopsis thaliana, regulated by boron availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12276–12281.

Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4991-4996.

Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Hooykaas, P.J.J. 1999. Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1047–1056.

Xiang, C., Werner, B.L., Christensen, E.M., Oliver, D.J. 2001. The biological functions of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* 126:5 64–574.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., Terry, N. 1999. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119:7 3-79.