

STUDY OF CADMIUM AND ZINC INTERACTION IN MAIZE

Kleckerova A.¹, Sobrova P.¹, Krystofova O.¹, Sochor J.¹, Zitka O.¹, Adam V.^{1,2}, Babula P.¹, Dočekalová H.¹, Kizek R.^{1,2}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

² Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Andrea.klr@seznam.cz

ABSTRACT

Heavy metals are classified as priority pollutants monitored in environments. Heavy metals are not biodegradable, having ability to accumulate in organisms. Cadmium is one of the most toxic heavy metal ions in the environment due to its high mobility and severe toxicity to the organisms. Zinc is an essential micronutrient for plants but can be highly toxic when present at excessive concentration. We aimed at investigation of detoxification mechanisms of maize plants (*Zea mays* L.) treated with the following combinations of zinc(II) and cadmium(II) ions 0 μM Zn^{2+} + 0 μM Cd^{2+} ; 100 μM Zn^{2+} + 0 μM Cd^{2+} ; 0 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} ; 10 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} ; 50 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} ; 75 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} and 100 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} for 10 days. In addition to growth parameters, we electrochemically determined the metal content in plants. To determine the antioxidant activity, we chose three methods FRAP, DPPH and ABTS, which differ in the spectrum of molecules with possible antioxidant activity. Pearson's correlation coefficient was found by comparison of FRAP and ABTS methods - $r_p = 0.7967$ (Bradford) and 0.7957 (Pyrogallol Red). Pearson's correlation coefficients indicates mutual correlation of both DPPH and ABTS methods - $r_p = 0.8292$ (Bradford) and 0.8737 (Pyrogallol Red). The highest correlation of Pearson's coefficients was found in comparison between DPPH and FRAP methods (0.9407 – Bradford and 0.9211 Pyrogallol Red), suggesting a very high dependence of the two methods. Thus, our attention was focused on the determination of activities of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP). We were also focused on the monitoring of the GST activity. In addition, we monitored its correlation with total content of thiol compounds (-SH) measured spectrometrically using Ellman's method. Content of thiol compounds, such as reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, and phytochelatins (PC2, PC5) was determined by HPLC–ED. The highest values were detected at all used method treated 100 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} on the 10th day of cultivation.

Key words: cadmium, zinc, maize, antioxidant activity, thiol compounds

Acknowledgement: The financial support from the following project IGA FA MENDELU TP 7/2011 is highly acknowledged.

ÚVOD

Kadmium je důležitým znečišťujícím prvkem v životním prostředí, vyskytuje se jako součást zinkových rud [1,2]. Vzhledem k mnoha průmyslovým aplikacím, zejména v elektrotechnologiích, představuje kadmium jeden z nejvíce rizikových prvků. Toxicita kadmia byla popsána v mnoha publikacích, zahrnuje zejména vznik reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou zodpovědné za poškození biomolekul a ztrátu jejich biologických funkcí [3-5]. Kadmiiem vyvolaný stres u rostlin může být charakterizován různými stresovými markery - oxidovaným/redukovaným glutathionem, fytochelatiny, nebo enzymy podlejšíchmi se na odstraňování ROS [6,7]. Oproti kadmiu je zinek pro organismy základním biogenním prvkem. V rostlinách se zinek vyskytuje jako volný ion, nebo v komplexu s různými nízkomolekulárními sloučeninami, metalloproteiny, zabudovaný v reakčním centru enzymů a slouží jako stavební ion v transkripčních faktorech [8]. Zinek je jednou ze základních mikroživin nezbytných pro optimální růst rostlin (biosyntézu sacharidů, tvorbu chlorofylu, metabolismus auxinu, vývoj kořenů) [9,13]. Kadmium má podobné chemické vlastnosti jako zinek, ale kadmium je s kyselinami méně reaktivní a nemá žádnou biologickou roli v živých organismech. Bylo také prokázáno, že kademnaté ionty mohou být v rostlinách transportovány stejnými mechanismy, které se podílejí na absorpci zinku. V enzymech tak může dojít k výměně zinečnatých iontů za ionty kadmia, což vede ke ztrátě jejich funkce. Tento proces je považován za jeden z možných mechanismů toxicity kadmia. Nicméně, další funkce a účinky jsou stále zkoumány [14,15]. Vzhledem k této skutečnosti jsme se zaměřili na společný vliv iontů kadmia (II) a zinku (II) na rostliny kukuřice (*Zea mays L.*) CE 220. V průběhu kultivace byly sledovány nejen růstové parametry (délka nadzemní a kořenové části, jejich svěží hmotnost a sušina), ale i řada stresových markerů (oxidovaný/redukovaný glutathion, fytochelatiny, celkové thiooly, antioxidační aktivita pomocí metod FRAP, ABTS, DPPH a aktivita enzymů GST, ALT, AST a ALP). Kromě toho byl také elektrochemicky stanoven celkový obsah zinku a kadmia jak v nadzemních částech rostlin, tak v kořenech, a to u všech použitých kombinací koncentrací.

MATERIÁL A METODIKA

Kultivace rostlin

Pro náš experiment jsme použili osivo kukuřice (*Zea mays L.*) CE 220 (hybrid). Pětidenní naklíčené rostliny byly umístěny do hydroponických kultivačních nádob, které byly po dobu sedmi dnů naplněny Richterovým živným roztokem. Po sedmi dnech byl obsah nádob vyměněn za roztok zinku a kadmia o těchto koncentracích: 0 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 0 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, 100 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 0 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, 0 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, 10 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, 50 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, 75 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ a 100 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ + 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$. Pro přípravu roztoků iontů kovů byl použit $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma-Aldrich, USA). Experiment probíhal po dobu 10 dní za konstantních podmínek

(teplota 20°C, vlhkost 65%, 12 hodin světlo). Z každé pokusné varianty bylo každý druhý den odebráno 6 rostlin, které byly opláchnuty v destilované vodě a rozděleny na část nadzemní a kořenovou. U každé části byla zjištěna svěží hmotnost (Sartorius GmbH, Goettingen, Německo), délka a sušina.

Elektrochemické stanovení celkového obsahu zinku a kadmia

Elektrochemické měření bylo provedeno na přístroji AUTOLAB (EcoChemie, Holandsko) s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v tříelektrodovém zapojení, které se skládalo z visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) s pracovním povrchem elektrody 0,4 mm², argentchloridovou elektrodou (Ag/AgCl/3 mol.l⁻¹ KCl) jako referentní a platinovou jako pomocnou elektrodou. Koncentrace kadmia a zinku byla měřena pomocí diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV).

Spektrofotometrické měření

Spektrometrické měření bylo provedeno na automatickém chemickém analyzátoru BS-200 (Mindray, Čína). Stanovení celkových proteinů metodou Bradford je podrobně popsáno v publikaci [16] s použitím reagensie Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% CH₃CH₂OH, 8,5% H₃PO₄, aq), které bylo pipetováno 190 µl ke vzorku o objemu 10 µl. Absorbance byla měřena při 595 nm. Ke stanovení proteinů metodou Pyrogallol Red bylo použito činidlo R1 (100 mM kyselina jantarová, 6,94 mM benzonan sodný, 0,12mM molybdenan sodný, 2,09 mM roztok šřavelanu) v objemu 200 µl a bylo přidáno 20 µl vzorku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 605 nm.

DPPH[•] test spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), kdy při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H. Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 µl 9,5.10⁻⁵ M roztoku DPPH, následně bylo přidáno 20 µl vzorku a vše bylo pečlivě promícháno. Po dobu 25 minut byla v 15 sekundových intervalech zaznamenávána absorbance při vlnové délce 515 nm.

Metoda pomocí ABTS[•] radikálu (v literatuře označovaná Trolox Equivalent Antioxidant Capacity – TEAC) je založena na neutralizaci radikalkationtu vzniklého jedno elektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS[•] (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS[•] - e- ABTS^{•+}. Do kyvety bylo pipetováno 245 µl roztoku 7 mM ABTS[•] s 4,95 mM roztokem peroxosíranu draselného, poté bylo přidáno 5 µl vzorku či standardu (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena při 670 nm vlnové délky.

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na redukci železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazinu) a hexahydrátu chloridu železitého (FeCl₃.6H₂O). Do plastové kyvety bylo pipetováno 245 µl činidla a následně bylo přidáno 5 µl vzorku či standardu (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena při 578 nm a 630 nm.

Pro stanovení enzymů ALT (AST) byl použit substrát složený z 0,2 M DL- α -alaninu (L-aspartatu) a 2 mM 2-oxoglutaratu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7.4), který byl přidán k 50 µl vzorku. Dále

bylo ke směsi přidáno 250 μ l 2,4-dinitrophenylhydrazinu v 1 M kyselině chlorovodíkové. Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 510 nm.

Stanovení aktivity ALP (alkalické fosfatázy) bylo provedeno smícháním 100 μ l činidla R1 (0,9 M 2-amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,4; 1,6 mM síran hořečnatý, síran zinečnatý 0,4 mM, 2 mM HEDTA) se 2 μ l vzorku. Následně bylo přidáno 20 μ l činidla R2 (16 mM p-nitrofenylfosfát). Absorbance byla měřena při 405 nm.

Stanovení GST (glutathion-S-transferázy) je založeno na katalyzované reakci mezi GSH a GST substrátem (1-chlor-2,4dinitrobenzen – CDNB). Ke vzorku bylo přidáno 180 μ l reaktantů (2mM CDNB a PSB (1:19, v/v, 37°C)) a 30 μ l 12,5 mM GSH v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4). Měření absorbance bylo provedeno při 340 nm.

Pro stanovení SH skupin byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Do kyvety bylo napipetováno 277 μ l Ellmanovo činidlo (reagencie R1) (2mM 5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina-DTNB v 50mM Na₂(CH₃COO)₂), následně bylo přidáno 45 μ l vzorku a následně do této směsi bylo přidáno 33 μ l reagensu R2 (1 M tris CH₃COOH). Podstatou stanovení je reakce Ellmanova činidla s SH skupinami stanovené látky za vzniku ekvivalentního množství 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB²⁻). Směs byla inkubována 10 minut při 37 °C, absorbance byla měřena při $\lambda = 405$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagensie R1 a hodnoty absorbance po 10 minutové inkubaci se vzorkem.

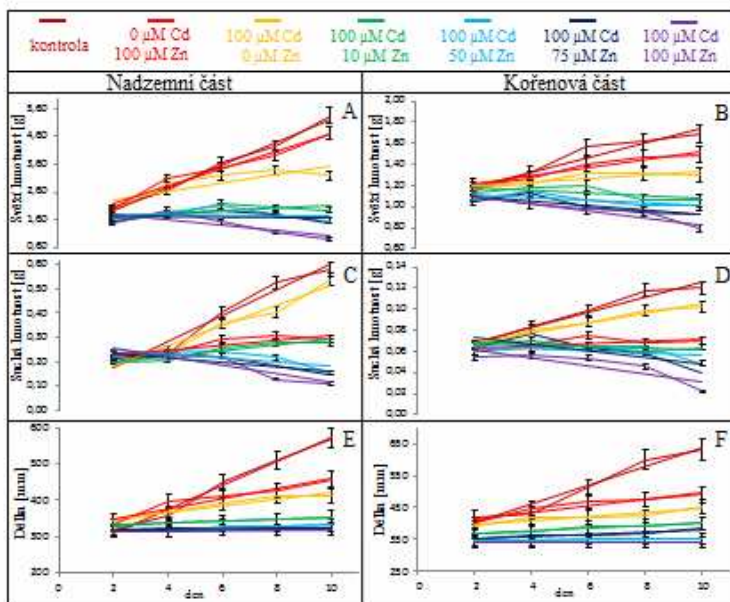
Stanovení obsahu thiolových sloučenin

Stanovení oxidovaného (GSH) a redukováného (GSSG) glutathionu a phytochelatini (PC2-5) probíhalo pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0.001-9.999 ml min⁻¹) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150 \times 4,6; 3,5 μ m velikost částic, Agilent Technologies, USA) a dvanácti-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen ze tří průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA). Každá komůrka obsahuje čtyři analytické cely. Jedna analytická cela obsahuje dvě referenční (hydrogen paladiové), dvě pomocné a jednu porézní grafitovou pracovní elektrodu. Elektrochemický detektor je uložen v řídicím modulu, jehož celý prostor je termostatován. Vzorek (20 μ l) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8°C. Kolona byla termostatována na 32°C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z A: kyseliny trifluoroctové (80 mM) a B: 100% Met-OH. Látky byly eluovány následujícím lineárně vzestupným gradientem: 0-1 min (3%B), 1->2 min (10%B), 2->5 min (30%B), 5-6 min (98 %B). Detekce separovaných látek probíhala při aplikovaném potenciálu 900mV. Doba jedné analýzy byla 20 minut.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V naší studii jsme se zaměřili na společné účinky kadmia (II) a zinku (II) na rostliny kukuřice v následujících koncentracích: $0 \mu\text{M Zn}^{2+} + 0 \mu\text{M Cd}^{2+}$; $100 \mu\text{M Zn}^{2+} + 0 \mu\text{M Cd}^{2+}$; $0 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$; $10 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$; $50 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$; $75 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ a $100 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$. V první řadě jsme studovali vliv iontů kovů na růstové parametry – svěží/suchá hmotnost a délka nadzemních částí a kořenů. Nejvýznamnější inhibice růstu byla pozorována u rostlin vystavených kombinací nejvyšší koncentrace Zn^{2+} a Cd^{2+} iontů ($100 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$). Nejvyšší sklon regresní přímky byl pozorován u kontrolní skupiny jak u nadzemních částí, tak i u kořene (Obr. 1A,B). Podobná tendence byla zaznamenána i u stanovení suché hmotnosti a délky nadzemních částí a kořenů (Obr. 1C-F).

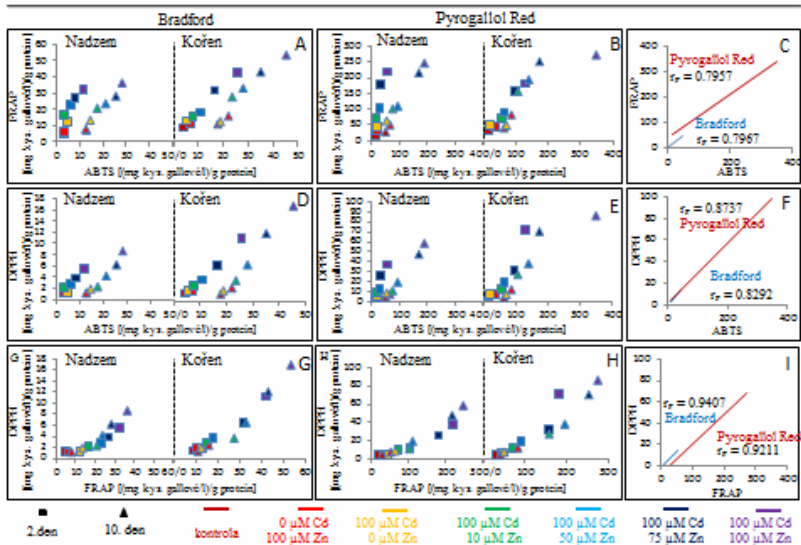
Kromě růstových parametrů, jsme elektrochemicky stanovili obsah kovů v rostlinách. Analýzou bylo zjištěno, že v průběhu experimentu docházelo u rostlin k akumulaci kovů jak do nadzemních částí, tak do kořenů. Dále bylo zjištěno, že rostliny kumulovaly více Zn^{2+} než Cd^{2+} , které jsou pro ně přijatelnější, díky svým biogenním vlastnostem. Dále byly stanoveny vyšší koncentrace iontů kovů v kořenových částech rostlin, na což má do jisté míry vliv i způsob jakým byly kovy přijímány. V našem experimentu se jednalo o hydroponický příjem kořeny. Srovnáním výsledků získaných z druhého a desátého dne experimentu můžeme říci, i přes růstovou inhibici, kterou kovy způsobují, dochází v nadzemních částech i v kořenech až k dvojnásobnému nárůstu akumulace Zn a Cd.



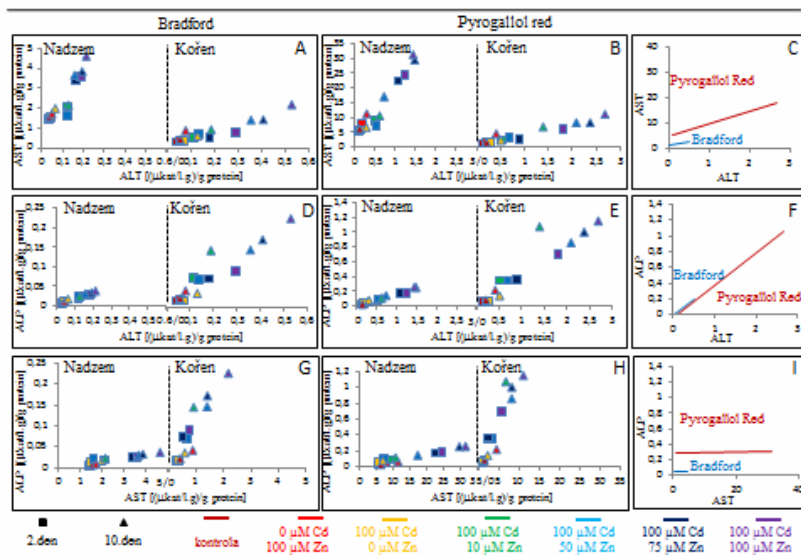
Obr. 1. Stanovení svěží hmotnosti nadzemní části (A) a kořenové části (B), suché hmotnosti nadzemní části (C) a kořenové části (D) a stanovení délky nadzemní části (E) a kořene (F).

Pro stanovení antioxidantní aktivity jsme vybrali metody FRAP, DPPH a ABTS. Získané výsledky byly přepočteny na ekvivalentní množství kyseliny gallové a na 1g proteinu, které byly zjištěny metodou Bradford a Pyrogallol Red. V první řadě byly porovnány hodnoty získané pomocí FRAP a ABTS. Vyšší koncentrace kadmia a zinku vedly ke zvýšení antioxidantní aktivity. Nejvyšší hodnota aktivity byla zjištěna u rostlin vystavených koncentrací $100 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ v 10. dni experimentu u nadzemních částí i kořenů, a to jak při přepočtu na metodu Bradford, tak Pyrogallol Red. Pearsonův korelační koeficient při srovnání metod FRAP a ABTS je $r_p=0,7967$ (Bradford) a $0,7957$ (Pyrogallol Red) (Obr. 2A-C). Podobné výsledky byly zjištěny i při srovnání metod DPPH a ABTS, kde Pearsonův korelační koeficient byl $r_p=0,8292$ (Bradford) a $0,7957$ (Pyrogallol Red) (Obr. 2D-F). Nejvyšší korelační koeficient byl zjištěn při porovnání metod DPPH a FRAP – $r_p=0,9407$ (Bradford) a $0,8737$ (Pyrogallol Red) (Obr. 2G-I).

Náš experiment byl také zaměřen na stanovení aktivity alanin transaminázy (ALT), aspartát transaminázy (AST) a alkalické fosfatázy (ALP). Při srovnání aktivit AST a ALT jsme zjistili nejvyšší hodnoty ALT/AST při srovnání s kontrolními rostlinami u rostlin vystavených účinku $100 \mu\text{M Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ v 10. dni experimentu u nadzemních částí i kořenů, a to i při přepočtu na Bradford i na Pyrogallol Red. Tento růst koresponduje s vyšší metabolickou aktivitou. Podobné výsledky byly zjištěny i při srovnání aktivit ALP s ALT a ALP s AST (Obr. 3).

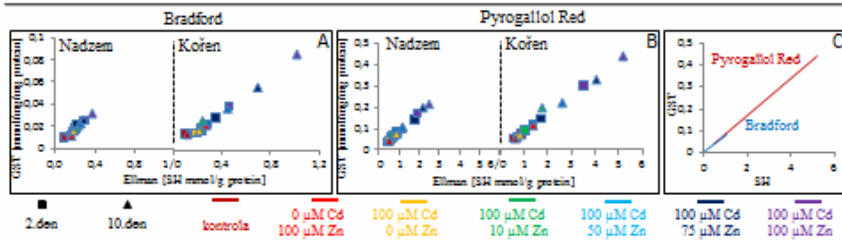


Obr. 2. A-C srovnání metod FRAP a ABTS, D-F srovnání metod DPPH a ABTS, G-I srovnání metod DPPH a FRAP.



Obr. 3. A-C srovnání aktivit AST/ALT, D-F srovnání aktivit ALP/ALT, G-I srovnání aktivit ALP/AST.

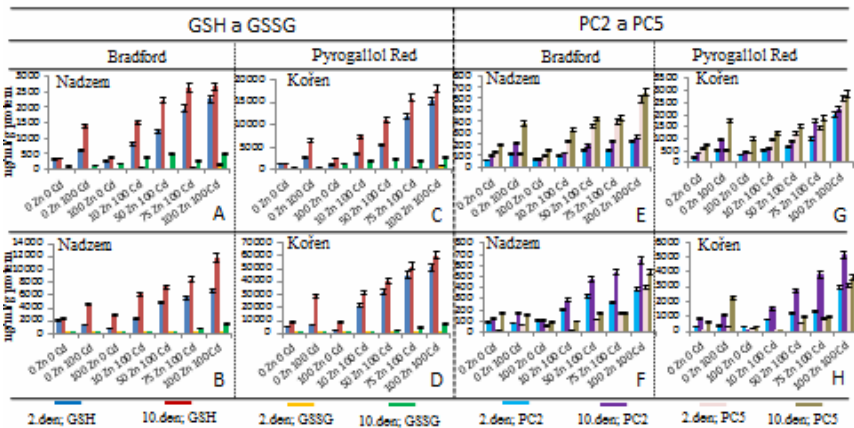
Také jsme se zaměřili na sledování aktivity enzymu GST (glutathion-S-transferáza), který hraje důležitou roli při detoxikaci xenobiotik a těžkých kovů katalyzující jejich vazbu na tripeptid glutathion [17]. Kromě toho jsme také sledovali jeho korelaci s celkovým obsahem thiolových sloučenin (-SH), zjištěných metodou dle Ellmana. Byl zde pozorován mírný nárůst hodnot aktivity GST v 10. dni experimentu. Nejvyšší hodnoty GST/SH byly pozorovány u rostlin vystavených koncentraci 100 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} u nadzemních částí i kořenů, a to i při přepočtu na Bradford i na Pyrogallol Red (Obr. 4A-C).



Obr. 4. A-C srovnání aktivity enzymu GST s celkovým obsahem thiolů dle Ellmana

Obsah thiolových sloučenin – redukováného glutathionu (GSH), oxidovaného glutathionu (GSSG) a fitochelatinů (PC2,PC5) byl stanoven pomocí HPLC-ED. Významný nárůst obsahu GSH i GSSG byl pozorován mezi 2. a 10. dnem experimentu. Nejvýznamnější změny byly zjištěny u rostlin vystavených 100 μM Zn^{2+} + 100 μM Cd^{2+} (Obr. 5A-D).

Fytochelatinu PC2 a PC5 jsou zapojeny především v transportu těžkých kovů [18]. Jejich biosyntézou dochází k akumulaci těžkých kovů v cytoplazmě. Působení iontů kadmia (II) a zinku (II) vedlo ke zvýšení produkce PC2 i PC5, které bylo nejvíce patrné v 10. dni experimentu (Obr. 5E-H).



Obr. 5 A-D stanovení obsahu GSH a GSSG, E-H stanovení obsahu PC2 a PC5.

ZÁVĚR

Zvyšující se množství znečišťujících látek různého druhu a původu v životním prostředí vede organismy k aktivaci detoxikačních mechanismů. Celková inhibice růstu rostlin kukuřice, vystavených účinkům zinečnatých a kadmennatých iontů, byla pravděpodobně důsledkem aktivace obranných reakcí, především díky syntéze látek na ochranu rostlin místo biosyntézy látek nezbytných pro růst. Dále je možné konstatovat, že inhibice kořenové části je pravděpodobně spojena s transportem kadmia do kořenového systému. Obsah iontů kovů v rostlině se zvyšoval s přibývajícím dobou kultivace. Zajímavým zjištěním v experimentu bylo, že v přítomnosti zinečnatých iontů docházelo ke zvýšenému příjmu kadmia do rostlin kukuřice.

LITERATURA

1. Fasset, D.W., *CADMIUM - BIOLOGICAL EFFECTS AND OCCURRENCE IN ENVIRONMENT*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1975. 15: p. 425-435.
2. Yost, K.J., *CADMIUM, THE ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH - AN OVERVIEW*. Experientia, 1984. 40(2): p. 157-164.
3. Klaassen, C.D., J. Liu, and B.A. Diwan, *Metallothionein protection of cadmium toxicity*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009. 238(3): p. 215-220.
4. Liu, J., W. Qu, and M.B. Kadiiska, *Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009. 238(3): p. 209-214.
5. Huska, D., et al., *Effects of Cadmium(II) Ions on Early Somatic Embryos of Norway spruce Studied by Using Electrochemical Techniques and Nuclear Magnetic Resonance*. International Journal of Electrochemical Science, 2010. 5(11): p. 1535-1549.
6. Hasan, S.A., et al., *Cadmium: Toxicity and tolerance in plants*. Journal of Environmental Biology, 2009. 30(2): p. 165-174.
7. Won, E.J., et al., *Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, Perinereis nuntia*. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, 2011. 154(2): p. 82-92.
8. Babula, P., et al., *Pharmaceutical importance of zinc and metallothionein in cell signalling*. Chimica Oggi-Chemistry Today, 2010. 28(6): p. 18-21.
9. Takatsuji, H., *Zinc-finger transcription factors in plants*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998. 54(6): p. 582-596.
10. Ghandilyan, A., D. Vreugdenhil, and M.G.M. Aarts, *Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition*. Physiologia Plantarum, 2006. 126(3): p. 407-417.
11. Broadley, M.R., et al., *Zinc in plants*. New Phytologist, 2007. 173(4): p. 677-702.
12. Ciftci-Yilmaz, S. and R. Mittler, *The zinc finger network of plants*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. 65(7-8): p. 1150-1160.

13. Blindauer, C.A. and R. Schmid, *Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins*. Metallomics, 2010. 2(8): p. 510-529.
14. Xu, Y., et al., *Zinc, cadmium, and cobalt interreplacement and relative use efficiencies in the coccolithophore *Emiliania huxleyi**. Limnology and Oceanography, 2007. 52(5): p. 2294-2305.
15. Strmecki, S., et al., *Characterization of phytoplankton exudates and carbohydrates in relation to their complexation of copper, cadmium and iron*. Marine Ecology-Progress Series, 2010. 408: p. 33-46.
16. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
17. Hu, T.Z., et al., *Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase*. Molecular Breeding, 2009. 24(4): p. 409-418.
18. Seregin, I., et al., *Effects of cadmium and lead on phytochelatin accumulation in maize shoots and different root parts*. Doklady Biological Sciences, 2007. 415(1): p. 304-306.