



III KONGRES  
BIOTECHNOLOGII



PRACE PRZEGLĄDOWE

## Przydatność roślin zmodyfikowanych genetycznie dla celów fitoekstrakcji i fitowaporacji

Anna Barabasz, Sylwia Wojas, Emilia Dybek, Danuta Maria Antosiewicz  
Zakład Ekotoksykologii, Wydział Biologii, Instytut Biologii  
Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

### Suitability of genetically modified plants for phytoextraction and phytovolatilization

#### Summary

Phytoremediation is a field of science and technology that uses plants to clean-up polluted soil and water. Metal hyperaccumulator plants are naturally capable of accumulating trace elements, primarily Ni, Zn, Cd, As or Se in their above-ground tissues, without developing any toxicity symptoms. Although these plants appear to have ideal properties for phytoextraction, most of them produce little biomass and grow only in ecosystems that are characteristic for them. The introduction of novel traits into high biomass plants using a transgenic approach is a promising strategy for the development of effective phytoremediation technologies. A number of transgenic plants have been generated in an attempt to modify: (a) trace element uptake from environment, (b) transport to organelles, (c) allocation within the plants, (d) synthesis of metal complexing ligands present in the cell or exported to the apoplast and/or environment, (e) metabolism of the metal containing compound. Many experimental results demonstrate that a single-gene plant transformation rarely leads to intended phenotypes. In this paper, we present some selected results dealing with suitability of genetically modified plants for phytoremediation.

#### Key words:

heavy metals, phytoremediation, transformation.

### 1. Wstęp

Zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi (MC) stanowi poważne zagrożenie dla organizmów żywych (1). Oczyszczenie takich terenów za pomocą metod fizykochemicznych jest kosztowne,

#### Adres do korespondencji

Danuta Maria Antosiewicz,  
Zakład Ekotoksykologii,  
Wydział Biologii,  
Instytut Biologii  
Eksperymentalnej Roślin,  
Uniwersytet Warszawski,  
ul. Miecznikowa 1,  
02-096 Warszawa;  
e-mail:  
dma@biol.uw.edu.pl

**biotechnologia**

2 (81) 68–83 2008

trudne, a w niektórych przypadkach wręcz niemożliwe, stąd też rośnie zapotrzebowanie na stosowanie udoskonalonych metod biologicznych. Jedną z prężnie rozwijanych technologii jest fitoremediacja, polegająca na usuwaniu skażeń, w tym MC z gleb, osadów oraz wód przy użyciu roślin. Wyróżnia się trzy rodzaje fitoremediacji: fitoekstrakcję, fitoewaporację, i fitostabilizację (2). Fitoekstrakcja metali ciężkich polega na ich usuwaniu z podłoża za pomocą roślin hiperakumulatorów, które pobierają i akumulują duże ilości MC w organach nadziemnych, które następnie są zbierane i utylizowane. Fitoewaporacja jest procesem polegającym na usuwaniu metali przez rośliny po ich biotransformacji do formy lotnej. W procesie fitostabilizacji rośliny wydzielają do podłoża związki tworzące kompleksy z jonami MC i tym samym regulują biodostępność składników mineralnych. Słabsza rozpuszczalność powstałych kompleksów w porównaniu do postaci jonowej MC ogranicza ich przemieszczanie do wód powierzchniowych i podziemnych przyczyniając się do ich stabilizacji w obrębie strefy korzeniowej (2).

W wyniku analizy roślin naturalnie zasiedlających obszary skażone MC wykazano, że w większości przypadków rośliny te nie mogą być powszechnie stosowane do fitoremediacji. Główną przyczyną jest charakteryzujący je zbyt niski stopień akumulacji metali, a w przypadku gatunków hiperakumulujących zbyt wolny wzrost i mała biomasa. Ponadto rośliny te często zasiedlają wyłącznie bardzo specyficzne ekosystemy i ich uprawa w innych warunkach środowiskowych nie przynosi pożądanego efektu (2). W związku z tym w wielu laboratoriach prowadzone są prace nad modyfikacją genetyczną roślin, dla zwiększenia ich przydatności w procesach fitoremediacji gleb zanieczyszczonych MC (3). Na obecnym etapie badań, najczęściej transformuje się rośliny modelowe *Arabidopsis thaliana* czy *Nicotiana tabacum*, rzadziej rośliny z innych gatunków, które mogłyby być rzeczywiście wykorzystywane do fitoremediacji ze względu na swoje cechy fenotypowe (*Brassica juncea*, *Populus* spp., *Liriodendron tulipifera*, *Nicotiana glauca*).

Celem artykułu jest przedstawienie w zarysie aktualnego stanu badań nad pozyskiwaniem roślin przydatnych dla celów fitoekstrakcji i fitoewaporacji metodami inżynierii genetycznej.

## 2. Modyfikacje genetyczne dla celów fitoremediacji

### 2.1. Fitoekstrakcja

Ilość zakumulowanych metali ciężkich w tkankach roślinnych jest wypadkową wydajności takich procesów jak: a) pobieranie metali ze środowiska, b) transport do poszczególnych organelli komórkowych, c) transport do poszczególnych organów roślin, d) synteza związków tworzących kompleksy z MC, obecnych zarówno w komórce jak i wydzielanych do przestrzeni międzykomórkowych i/lub środowiska.

Każdy z tych procesów może być modyfikowany poprzez zastosowanie metod inżynierii genetycznej, a optymalnym rozwiązaniem jest uzyskanie rośliny o zwiększonej możliwości akumulowania MC i znaczącej tolerancji na wysokie stężenie jonów metali w glebie i tkankach.

### 2.1.1 Modyfikacje procesów pobierania jonów

Próby zwiększenia kumulacji metali w tkankach jako skutek nadekspresji genów kodujących białka zaangażowane w pobieranie MC nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Wzrostowi stężenia MC w roślinie często towarzyszyło obniżenie poziomu tolerancji na obecne w podłożu MC, co obserwowano w badaniach nad roślinami transformowanymi genami kodującymi białka ZIP [ZRT/IRT, ang. *related proteins; zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter*] i NRAMP (ang. *Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins*).

ZIP stanowią rodzinę białek zaangażowanych w transport m.in. jonów  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i  $Ni^{2+}$  do cytoplazmy (zależnie od lokalizacji subkomórkowej) albo w pobieranie bądź kontrolę uwalniania jonów do cytoplazmy z kompartmentów wewnątrzkomórkowych (4). W wyniku nadekspresji genu kodującego białko AtIRT1 w transformowanych roślinach *A. thaliana* wzrosła ilość zakumulowanego kadmu i cynku. Rośliny transgeniczne hodowane przez 6 dni na pożywce z niedoborem żelaza i dodanymi pozostałymi metalami w stężeniach 100  $\mu M$  i 90  $\mu M$  odpowiednio dla  $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ , akumulowały oba metale w korzeniach w większym stężeniu niż rośliny kontrolne (Zn – 779  $\mu g/g$  s.m. w stosunku do 512  $\mu g/g$  s.m. dla typu dzikiego oraz Cd – 5270  $\mu g/g$  s.m. w stosunku do 3240  $\mu g/g$  s.m. dla typu dzikiego). Stężenie badanych pierwiastków w pędach było obniżone o połowę w stosunku do typu dzikiego (5).

Drugą rodzinę białek wpływających na zmiany wrażliwości roślin na MC stanowią białka NRAMP (6). Rośliny *A. thaliana* z nadekspresją genu *AtNramp3*, hodowane na pożywce minimalnej bez mikroelementów, charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na obecny w podłożu kadm zarówno w stężeniu 10  $\mu M$  jak i 1  $\mu M$ , przy braku zmian w stopniu akumulacji tego pierwiastka (6). Okazało się jednak, że białko AtNramp3 zlokalizowane jest tylko w tonoplaście i obserwowaną nadwrażliwość przypisano wzmożonemu uwalnianiu jonów kadmu z wakuoli do cytozolu (6,7). Wprowadzenie do genomu roślin *A. thaliana* dodatkowej kopii genu *AtNramp1* powodowało natomiast zwiększenie tolerancji na wysokie stężenie  $Fe^{3+}$  (tj. 600  $\mu M$ ) w płynnej pożywce  $\frac{1}{2}$  MS (8).

Obniżenie tolerancji na obecność jonów metali ciężkich w podłożu obserwowano także u tytoniu z nadekspresją genu *NtCBP4* (ang. *Calmodulin binding protein*), odpowiedzialnego za funkcjonowanie niskoselektywnego kanału kationowego, związanego z pobieraniem jonów  $Pb^{2+}$  (9). Transgeniczne rośliny *A. thaliana* rosnące na pożywce płynnej uzupełnionej azotanem ołowiu w stężeniu 1 mM były bardziej wra-

żliwe na ten pierwiastek balastowy niż rośliny kontrolne. Równocześnie pobierały one więcej metalu (  $\sim 8,6 \mu\text{g/g}$  s.m. w stosunku do  $\sim 4,1 \mu\text{g/g}$  s.m. dla roślin kontrolnych) (9).

Zmianę wrażliwości roślin na obecne w podłożu jony  $\text{Hg}^{2+}$  ( $3 \mu\text{M}$ ) spowodowała w roślinach *A. thaliana* ekspresja bakteryjnego genu *merC* i odpowiedzialnego za pobieranie jonów  $\text{Hg}^{2+}$  do komórki (10). Rośliny transgeniczne rosnąc na pożywce  $\frac{1}{2}$  MS zestalonej agarem zawierającej  $\text{Hg}^{2+}$  w stężeniu  $3 \mu\text{M}$  miały zwiększone objawy toksyczności niż rośliny kontrolne. Po 6-godzinnej inkubacji liści pochodzących z roślin transgenicznych w pożywce zawierającej jony rtęci w stężeniu  $100 \mu\text{M}$ , stężenie metalu w materiale kontrolnym było na poziomie  $26 \mu\text{g/g}$  s.m., zaś w tkance transgenicznej około  $2\times$  wyższe.

Nadekspresja w tytoniu genu *TaLCT1*, który koduje transporter o niskim powinowactwie m.in. do jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  czy  $\text{Pb}^{2+}$ , spowodowała obniżenie poziomu akumulacji kadmu w korzeniach oraz zwiększenie poziomu tolerancji na  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  w obecności podwyższonego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w podłożu (11-14).

### 2.1.2. Modyfikacje zwiększające wydajność usuwania metali ciężkich z cytoplazmy

Usuwanie jonów metali poza cytoplazmę jest ważnym elementem detoksykacji, determinującym poziom tolerancji rośliny na MC. Jednym z głównych kompartmentów, w którym gromadzone są metale jest wakuola, stąd też kolejna strategia mająca na celu uzyskanie roślin o podwyższonej tolerancji i akumulacji MC była związana z wykorzystaniem genów kodujących białka zaangażowane w transport metali ciężkich do tego organellum.

Źródła takich transgenów poszukiwano nie tylko w roślinach *A. thaliana*, ale także w topoli (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*), która ze względu na zdolność do intensywnego pobierania jonów metali z podłoża (głównie cynku), wykorzystywana jest do oczyszczania wód odpadowych, gruntowych czy fitoremediacji terenów poprzemysłowych (15). Przykładem tego typu badań była transformacja roślin genem *PtMTP1* (ang. *Metal Tolerance Protein 1*) kodującym białko z rodziny CDF (ang. *Cation Diffusion Facilitator*, białka usuwające kationy poza cytoplazmę) (16). Na podstawie wyników badań prowadzonych na drożdżach wykazano, że białko *PtMTP1* obecne w tonopląście jest zaangażowane w transport  $\text{Zn}^{2+}$ , nie bierze natomiast udziału w transporcie takich jonów jak  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  (specyficzność substratowa). Rośliny *A. thaliana* transformowane genem tego białka wykazywały zwiększony poziom tolerancji na cynk, co sugeruje bardziej efektywną detoksykację metalu w wakuolach (16). Podobnie nadekspresja genu *ShMTP1* ze *Stylosanthes hamata* (tropikalna roślina motylkowa, tolerancyjna na podwyższony poziom manganu w glebie) doprowadziła do wzrostu tolerancji na mangan w roślinach *A. thaliana* (17). W obecności  $2,5 \text{ mM}$   $\text{Mn}^{2+}$  wzrost roślin kontrolnych był prawie całkowicie zahamowany, podczas gdy transformanty rosły bez objawów toksyczności, co wskazy-

wało na zwiększoną sekwestrację jonów manganu w wewnątrzkomórkowych organelach takich jak wakuole. Po wprowadzeniu do genomu *A. thaliana* dodatkowej kopii *AtMTP1* wzrósł poziom tolerancji na cynk. Wzrost korzeni transformantów był zahamowany w bardzo niewielkim stopniu przy stężeniu 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , podczas gdy rośliny typu dzikiego zamierały. Testy przeprowadzone w kulturach hydroponicznych wykazały ponad 2-krotny wzrost stężenia cynku w korzeniu, podczas gdy nie stwierdzono wzrostu akumulacji metalu w pędzie (18).

Innym rodzajem białek odpowiedzialnych za eksport kationów poza cytoplazmę są przenośniki antyportowe (cation/ $H^+$ -antiporter) (19). Do grupy tej należą białka CAX (ang. *calcium exchanger*, wymienniki  $Ca^{2+}/H^+$ ). W badaniach Hirschi i wsp. wykazano, że CAX2 pochodzący z *A. thaliana* jest zaangażowany w transport jonów  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  do wakuoli (20). Wprowadzenie genu *AtCAX2* do genomu tytoniu pozwoliło na otrzymanie roślin charakteryzujących się zwiększoną akumulacją wapnia, kadmu i manganu w korzeniach. W przypadku kadmu wzrost był około 4-krotny, zaś w przypadku manganu 2-krotny. Obserwowano także zwiększony poziom tolerancji na obecność manganu w podłożu, przejawiający się lepszym wzrostem na pożywce płynnej zawierającej 0,5 mM  $Mn^{2+}$  (20). Transformacja spowodowała zatem zmianę tylko jednego z parametrów – pobierania, zwiększając jednocześnie pojemność detoksykacyjną korzenia, nie doprowadziła jednak do bardziej intensywnego transportu metali do pędu.

Gromadzenie MC w wakuolach jest możliwe dzięki ich przenoszeniu przez tonoplast nie tylko w formie jonowej, ale także w postaci kompleksów. Ten sposób transportu metali u roślin jest bardzo słabo poznany, podczas gdy u grzybów *Saccharomyces cerevisiae*, przykładem białka o takiej funkcji jest tonoplastowy transporter YCF1 odpowiedzialny za MgATP-zależne przenoszenie kompleksów glutationu z metalami ciężkimi. Wykazano, że bierze on udział w transporcie kompleksów  $Cd-GS_2$  (21),  $As-GS_3$  (22) oraz  $Hg-GS_2$  (23). W wyniku transformacji tym genem roślin *A. thaliana* wykazano, że białko YCF1 zlokalizowane jest nie tylko w tonoplaście, ale także w plazmolemie komórek roślinnych. Transformanty charakteryzowały się zarówno zwiększoną tolerancją na kadm i wyższym niż rośliny kontrolne poziomem akumulacji tego pierwiastka w pędach, jak też 4-krotnie wyższym pobieraniem  $Cd-GS_2$  przez wakuole. Obserwowano także wzrost poziomu tolerancji na ołów oraz jego akumulacji, co sugerowało, że substratem dla YCF1 były także kompleksy GSH-Pb.

Jony MC zbyteczne w cytoplazmie są usuwane nie tylko do wakuoli, ale również do ściany komórkowej i przestrzeni międzykomórkowych, gdzie mogą być magazynowane w bardzo różnych formach. Nadekspresja genów kodujących białka transportujące jony metali do apoplastu to kolejna strategia, mająca na celu pozyskanie roślin o podwyższonym poziomie akumulacji metali i zwiększenie transportu MC do pędów. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych na białkach HMA2 i HMA4 (ang. *Heavy Metal-transporting P-type ATPase*), z subkomórkową lokalizacją w plazmolemie, wykazano, że są one odpowiedzialne za usuwanie poza komórkę takich jo-

nów jak  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  i  $Co^{2+}$ , zaś ich ekspresja w komórkach otaczających ksyłem wskazywała na udział w załadunku naczyń (24-28). W wyniku analizy mutantu *A. thaliana hma4* wykazano, że białko kodowane przez zmutowany gen bierze udział w transporcie cynku i kadmu z korzeni do pędów (29), a także w utrzymaniu konstytutywnej tolerancji na te metale (28). Transgeniczne rośliny *A. thaliana* z wprowadzoną dodatkową kopią genu *AtHMA4* pod konstytutywnym promotorem 35S CaMV charakteryzowały się odpowiednio 2-krotnie i 1,4-krotnie zwiększonym w stosunku do roślin kontrolnych poziomem akumulacji cynku i kadmu w pędach. Otrzymane rośliny wykazywały wyższy stopień tolerancji na obecne w podłożu jony obu tych pierwiastków (29).

### 2.1.3. Zwiększenie stężenia związków kompleksujących metale ciężkie

Pobrane przez komórki MC występują na ogół w postaci kompleksów z różnymi związkami, zawierającymi grupy -SH takie jak glutation, peptydy, fitochelatyny czy białka metalotioneiny. Związkami tworzącymi kompleksy z MC są również aminokwasy (jak nikotianamina, histydyna czy prolina) oraz kwasy organiczne (np. kwas jabłkowy czy cytrynowy). Wiązanie MC zachodzi zarówno na terenie cytoplazmy jak i wakuoli czy apoplastu, a tworzenie takich połączeń jest jednym z mechanizmów detoksykacji pobranych jonów, zapewniającym ochronę struktur komórkowych i miejsc metabolicznie aktywnych przed niekorzystnym oddziaływaniem metali ciężkich. Kompleksy, które powstają w cytoplazmie są zwykle transportowane przez błony biologiczne do miejsc magazynowania przy udziale specyficznych transporterów (np. białek z rodziny ABC czy YSL) (30-31). Usprawnienie systemu detoksykacji MC poprzez modyfikacje genetyczne prowadzące do podniesienia w komórce poziomu związków kompleksujących, było kolejną strategią w fitoremediacji. Na podstawie efektu nadekspresji genów ze szlaków biosyntezy fitochelatyn sugerowano, że mogą one znaleźć zastosowanie w modyfikacji genetycznej roślin dla celów fitoremediacji (32-34). Fitochelaty (PCs) są peptydami tiolowymi o ogólnej strukturze  $[(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}]$ ,  $n = 2-11$  (35), syntetyzowanymi z glutationu w obecności jonów metali ciężkich przez enzym syntazę fitochelatyn [PCS, EC 2.3.2.15] (36). Zidentyfikowano je również w komórkach grzybów i bezkręgowców (37). Ze względu na dużą zawartość reszt cysteiny, posiadającej grupę sulfhydrylową, oddziałującą z dużym powinowactwem z jonami metali ciężkich, wykazują zdolność ich wiązania, po czym powstałe kompleksy transportowane są do wakuoli. W doświadczeniach przeprowadzanych na mutantach roślin, grzybów i nicieni z zahamowaną syntezą PCs wykazano, że zdolność do produkcji tych peptydów jest warunkiem utrzymania konstytutywnego poziomu tolerancji organizmu na kadm, arsen oraz jak wynika z niektórych prac, także na rtęć (38). Okazało się jednak, że ekspresja różnych genów *PCS* powodowała skrajne reakcje transformowanych roślin: wzrost tolerancji lub wzrost wrażliwości na jony kadmu oraz wzrost/spadek lub brak zmian w pozio-

mie akumulacji tego metalu w tkankach. Nadekspresja genu syntazy fitochelatyn *AtPCS1* w *A. thaliana* prowadziła do spadku tolerancji na kadm, pomimo wzrostu poziomu fitochelatyn (39-41). W doświadczeniach Lee i wsp. (39) wykazano, że nieliczne linie z nadekspresją *AtPCS1* posiadały podwyższoną tolerancję na kadm. Wśród 50 linii *A. thaliana* z nadekspresją tego genu, jedynie 6 wykazywało dwukrotny wzrost tolerancji na kadm (przy 85  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , na pożywce  $\frac{1}{2}$  MS zestalonej agarem) i podwyższenie stężenia zgromadzonego w pędzie metalu o 30%. W roślinach z linii o najwyższym poziomie tych peptydów (30% wzrost poziomu fitochelatyn) stwierdzono nadwrażliwość na stres spowodowany obecnością metali ciężkich i zbliżoną do typu dzikiego akumulację kadmu (39). W pracy innych autorów (41) wszystkie badane linie *A. thaliana* z nadekspresją genu *AtPCS1* były nadwrażliwe na kadm (co stwierdzono przy 75  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , na pożywce  $\frac{1}{2}$  MS zestalonej agarem) i znacznie bardziej odporne na arsen (V) (41). Rośliny te przeżywały przy stężeniach tego pierwiastka 250 i 300  $\mu\text{M}$ . Natomiast ekspresja genu *AtPCS1* w gorczycy sarepskiej (*B. juncea*) powodowała wzrost tolerancji na kadm i cynk, przy jednocześnie obniżonej akumulacji tych pierwiastków w tkankach roślin (42).

Innym przykładem skutecznego zastosowania genów kodujących syntazę fitochelatyn dla potrzeb fitoremediacji była transformacja roślin *N. glauca* genem *TaPCS1* z pszenicy (*Triticum aestivum*). Uzyskane transformanty charakteryzowały się zwiększoną tolerancją na kadm i ołów oraz podwyższoną akumulacją tych pierwiastków w pędzie (43-44). Testy na skażonej glebie wykazały wyższe stężenie ołowiu w korzeniu i pędzie w stosunku do tych danych uzyskanych dla roślin kontrolnych (odpowiednio:  $2\times$  i  $1,5\times$ ) (43), co było szczególnie ważne ze względu na trudne do przełamania bariery w transporcie ołowiu (45-47).

Do modyfikacji genetycznych stosowano także geny z wcześniejszych etapów szlaku biosyntezy PCs – *gshI* (syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej) i *gshII* (syntetazy glutationowej). Ich nadekspresja w roślinach prowadziła do wzrostu stężenia fitochelatyn, czemu towarzyszył wzrost poziomu tolerancji na kadm oraz wzrost jego akumulacji w tkankach (48-49).

Rośliny transformowane genami kodującymi metalotioneiny (MT), białka wiążące jony metali ciężkich, nie wykazywały cech fenotypowych charakterystycznych dla hiperakumulatorów. Wprowadzenie genu *HsMT11* pochodzącego z genomu człowieka do roślin *N. tabacum* spowodowało wzrost tolerancji na kadm oraz zmianę wzoru dystrybucji metalu. Transport kadmu do pędu roślin transgenicznych był ograniczony (zmniejszenia jego ilości w pędach o 60-70%) (50). Inne próby wykorzystania zjawiska nadekspresji genów MT również nie zakończyły się otrzymaniem roślin-hiperakumulatorów MC (tab.).

Nikotianamina (NA), należąca do grupy aminokwasów niebiałkowych jest kolejnym związkiem posiadającym zdolność do tworzenia chelatów z metalami (51) Występuje zarówno w pędzie jak i w korzeniu (52), a na poziomie tkankowym stwierdzono jej obecność w ksylemie (53) i floemie (54). Ekspresja genu syntazy nikotianaminowej *TcNAS1* (z *Thlaspi caerulescens*) w *A. thaliana* spowodowała wzrost stężenia

NA w liściach nawet 100-krotnie w porównaniu z typem dzikim, a w konsekwencji wzrost tolerancji na nikiel. Linie transgeniczne rosły na pożywce  $\frac{1}{2}$  MS zawierającej 100  $\mu\text{M}$   $\text{NiSO}_4$ , stanowiącej dawkę toksyczną dla typu dzikiego. W roślinach transgenicznych uprawianych na glebie skażonej nikiem (700 ppm) zaobserwowano wzrost akumulacji tego pierwiastka o 69% częściach nadziemnych (2,5  $\text{mg g}^{-1}$  sm) (55). Podobne wyniki otrzymano testując rośliny *A. thaliana* transformowane genem *HvNAS1* z *Hordeum vulgare*. Wzrostowi poziomu NA w liściach tych roślin towarzyszył wzrost tolerancji na  $\text{Ni}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ), a także na  $\text{Cd}^{2+}$  (80  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  (200  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  (500  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  (250  $\mu\text{M}$ ) (56). Siewki roślin transgenicznych rosnące na pożywce MS w kombinacjach z tymi metalami były w lepszej kondycji w porównaniu z typem dzikim. Gen *HvNAS1* został również wprowadzony do roślin tytoniu (56). Transformanty rosnące na pożywce MS wykazywały tolerancję na  $\text{Ni}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) i produkowały więcej świeżej masy niż rośliny kontrolne. Ponadto, w porównaniu do roślin kontrolnych rośliny transgeniczne kumulowały w pędach większe ilości niklu ( $1,3 \times 4 \mu\text{g/roślinę}$ ), cynku ( $2 \times 2 \mu\text{g/roślinę}$ ), manganu ( $4 \times 3,5 \mu\text{g/roślinę}$ ) i żelaza ( $4 \times 0,7 \mu\text{g/roślinę}$ ). W przypadku roślin hodowanych w glebie skażonej nikiem, największe różnice pomiędzy roślinami transgenicznymi i roślinami kontrolnymi były obserwowane dla nasion, podczas gdy w liściach nie zanotowano istotnych statystycznie różnic. Koncentracja żelaza, cynku, miedzi i manganu w nasionach była znacząco większa dla materiału pochodzącego z roślin transgenicznych (odpowiednio:  $6,6 \times$ ;  $3,2 \times$ ;  $2,0 \times$ ;  $1,8 \times$ ). W przypadku niklu, którym była skażona gleba, nie zaobserwowano zwiększonej akumulacji tego pierwiastka w nasionach, co sugerowało, że preferowany jest transport do nasion kompleksów NA-Fe i NA-Zn (57).

Ważnym związkiem dla inaktywacji pobranych jonów metali jest histydyna, aminokwas o wysokim powinowactwie szczególnie do jonów niklu (58). Zwiększenie poziomu wolnej histydyny było możliwe poprzez wykorzystanie zjawiska nadekspresji genu kodującego transferazę ATP fosforybozylową, uczestniczącą w biosyntezie tego aminokwasu. Transgeniczne rośliny *A. thaliana* transformowane genem kodującym wspomniany enzym i wyizolowanym z *Salmonella typhimurium*, charakteryzowały się wzrostem tolerancji na obecny w podłożu  $\text{Ni}^{2+}$  w stężeniu 120  $\mu\text{M}$  (59). Wzrost tolerancji na nikiel przy stałym poziomie akumulacji tego pierwiastka był również obserwowany w transgenicznych roślinach *A. thaliana* wykazujących nadekspresję genu pochodzącego z *Allyssum lesbiacum*, rośliny będącej naturalnym hiperakumulatorem niklu (60).

## 2.2. Fitoewaporacja

Metodą, która na obecnym etapie rozwoju przynosi większe sukcesy niż fitoekstrakcja jest fitoewaporacja, stosowana do usuwania z gleb dwóch pierwiastków – rtęci i selenu (61,62). Założeniem tej technologii jest usuwanie szkodliwych metali w postaci lotnej do atmosfery po uprzedniej metabolicznej biotransformacji pobra-

nych form w tkankach. Biotransformacja do formy lotnej zachodzi dzięki aktywności enzymów obecnych w roślinach, tempo takich przemian w roślinach jest zbyt wolne, by mogły one znaleźć zastosowanie w praktycznym usuwaniu skażeń. Zwiększenie wydajności procesu można osiągnąć wprowadzając do genomu roślin geny bakteryjne, np. geny *E. coli*, należące do operonu *mer* (63). Bakterie posiadające wspomniany operon pobierają zarówno nieorganiczne jak i organiczne związki rtęci, a po transformacji uwalniają metal w postaci lotnej (rtęć metaliczną,  $Hg^{\circ}$ ). Białka kodowane przez geny *merA* i *merB* są enzymami bezpośrednio katalizującymi przemiany związków rtęci. Białko *MerB* jest liazą, która odłącza jony metalu od szkieletu węglowego, po czym reduktaza rtęciowa, kodowana przez gen *merA*, redukuje  $Hg^{2+}$  do rtęci metalicznej. Wspomniane geny w różnych kombinacjach, z wprowadzonymi różnymi modyfikacjami i pod różnymi promotorami, zostały wprowadzone do roślin takich gatunków jak: *A. thaliana* (64,65), *N. tabacum* (66), *Liriodendron tulipifera* (67), *Populus deltoides* (68,69), *Spartita alterniflora* (70) czy *Oryza sativa* (71). Rośliny *A. thaliana* z ekspresją bakteryjnego genu *merA* kontynuowały wzrost na pożywce zawierającej jony rtęci ( $Hg^{2+}$ ) w stężeniu śmiertelnym dla roślin kontrolnych (50  $\mu M$  i 100  $\mu M$ ) (64). Rośliny te na pożywce bez rtęci były mniejsze niż rośliny kontrolne, co wskazywało na powinowactwo reduktazy rtęciowej również do innych jonów. Rugh i wsp. (67) transformując tkankę embriogeniczną tulipanowca amerykańskiego (*L. tulipifera*) trzema różnymi konstruktami kodującymi białko *MerA* otrzymali kilkanaście linii rosnących na pożywce z  $Hg^{2+}$  w stężeniu 25  $\mu M$ . Część z tych linii rosła również na pożywce zawierającej rtęć w stężeniu 50  $\mu M$ . W przypadku jednej linii udało się otrzymać zarodki somatyczne w obecności jonów  $Hg^{2+}$  w wymienionych stężeniach. Otrzymywano z nich siewki na pożywce do kiełkowania, w której były obecne jony rtęci w stężeniu do 50  $\mu M$ . Zarodki kontrolne nie rozwijały się i szybko obumierały w obecności rtęci w stężeniu 25  $\mu M$ . Rośliny otrzymane *in vitro* rosły na pożywce zestalonej agarowo w obecności rtęci w stężeniu 10  $\mu M$  w ciągu 6 dni wydzieliły ok. 6,8  $\mu g$   $Hg^{\circ}/g$  tkanki (masa początkowa), prawie czterynastokrotnie więcej niż rośliny kontrolne (0,5  $g$   $Hg^{\circ}/g$  tkanki) (67). Transgeniczne rośliny topoli (*P. deltoides*) wyrażające gen *merA* były również bardziej tolerancyjne na obecne w podłożu agarowym  $Hg^{2+}$  w stężeniu 25 i 50  $\mu M$  i wydzielały prawie czterokrotnie więcej rtęci niż rośliny kontrolne poddane inkubacji w roztworze zawierającym 25  $\mu M$   $HgCl_2$  (68). Podczas 3-miesięcznego wzrostu na ziemi skażonej jonami rtęci w stężeniu 40 ppm rośliny transgeniczne produkowały dwukrotnie więcej biomasy w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Z kolei rośliny *A. thaliana* z ekspresją genu *merB* charakteryzowały się podwyższoną tolerancją na obecne w podłożu agarowym organiczne związki rtęci, takie jak chlorek metylortęci ( $CH_3HgCl$ ), czy octan fenylortęci (PMA) (65). Jednak najwyższą tolerancję na rtęć organiczną (50 razy wyższą niż genotypy kontrolne) obserwowano, wówczas gdy rośliny zawierały obydwa wspomniane geny (69,72,73).

Bizily i wsp. (73) wykazali, że etapem ograniczającym tempo przemiany PMA do  $Hg^{\circ}$  jest aktywność białka *MerB* (liazy ograniczających związków rtęci), gdyż ilość

uwalnianej rtęci jest skorelowana ze stężeniem białka MerB w tkankach. Uzyskano dwa typy transgeniczných roślin *A. thaliana*, w których białko MerB było zlokalizowane w ścianie komórkowej lub retikulum endoplazmatycznym (74), oczekując wzrostu efektywności reakcji. Otrzymane rośliny nie uwalniały jednak większych ilości Hg<sup>0</sup> niż rośliny, w których białko MerB było zlokalizowane w cytoplazmie. Ruiz i wsp. (72) otrzymali transgeniczne rośliny tytoniu, w których geny *merA/merB* były wprowadzone do genomu chloroplastowego (organellum będące głównym celem toksycznego działania rtęci). Podobnie jak inne rośliny z wprowadzonym genem *merB* charakteryzowały się one zwiększoną tolerancją na PMA (2-krotnie wyższą niż rośliny kontrolne), ale brak jest informacji na temat wydajności uwalniania przez badane rośliny rtęci do atmosfery.

### 3. Perspektywy fitoremediacji

Z badań przeprowadzonych do tej pory wynika, że istnieje możliwość sterowania procesami związanymi z utrzymaniem homeostazy metali w komórce lub organizmie poprzez zastosowanie metod inżynierii genetycznej i w efekcie uzyskanie roślin ze zmienionym poziomem tolerancji na metale, akumulacji i/lub zdolności do biotransformacji niektórych form. Sukces jest jednak tylko połowiczny. Dotychczas uzyskiwane rośliny wykazujące zwiększoną zdolność do akumulacji metali ciężkich były równocześnie bardziej wrażliwe na obecne w podłożu MC, co wynika prawdopodobnie z intensywnego pobierania jonów, wymuszonego przez nadekspresję białek transportujących i niedostosowania do takich zmian systemu detoksykacji. Inne próby transformacji kończyły się podniesieniem poziomu tolerancji transgenicznej rośliny, czemu jednak nie towarzyszyło zwiększenie ilości metalu w tkankach. Opisano również zwiększenie zarówno tolerancji jak też akumulacji MC, ale wzrost ten nie był wystarczający dla szybkiego usunięcia metali z gleby za pomocą roślin.

Wprowadzenie obcego genu czy dodatkowej kopii genu w układzie homologicznym jest ingerencją w konstytutywny system kontroli homeostazy metali. Wiedza na temat jego regulacji jest obecnie bardzo niewielka, a stosowane modyfikacje są działaniami „metodą prób i błędów”, które prowadzą do zmian w bardzo złożonym systemie zależnych od siebie procesów. W przytaczanych wynikach wskazuje się, że transformacja roślin pojedynczymi genami nie przynosi w pełni pożądaných efektów i zasadne jest, jak się wydaje, przeprowadzenie prób transformacji dwoma lub większą liczbą genów jednocześnie, zaangażowanymi w kontrolę kilku procesów (pobierania, kompleksowania, sekwestracji czy załadunku ksylemu), jak również uwzględnienie specyficznych tkankowo promotorów.

Tabela

**Geny wykorzystane do modyfikacji roślin różnych gatunków oraz wpływ transformacji na poziom tolerancji na jony metali ciężkich, akumulację oraz na stopień uwalniania rtęci do atmosfery w postaci lotnej**

Gen	Produkt	Pochodzenie genu	Transformowana roślina	Zmiany tolerancji i akumulacji metali	Literatura
1	2	3	4	5	6
<b>FITOEKSTRAKcja – modyfikacja pobierania</b>					
<i>CBP4</i>	kanał jonowy	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	T – Pb – obniżenie T-Ni – wzrost AP-Pb – wzrost 2× AP-Ni – obniżenie do poz. 0,5	(9)
<i>IRT1</i>	transporter	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Cd – obniżenie; AK-Zn – wzrost 1,5×-(w warunkach niedoboru Fe) AK-Cd – wzrost 1,6× (jw.) AP-Mn – wzrost	(5)
<i>Nramp1</i>	transporter	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Fe – wzrost	(8)
<i>Nramp3</i>	transporter	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Cd – obniżenie A – bz	(6)
<i>merC</i>	transporter	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Hg – obniżenie A (ogonki liściowe moczone w pożywce uzupełnionej Hg) – Hg – 2× wzrost	(10)
<i>LCT1</i>	transporter	<i>T. aestivum</i>	<i>N. tabacum</i>	T-Cd, Pb – wzrost (przy podwyższonym stężeniu Ca) AK – obniżenie	(13,14)
<b>FITOEKSTRAKcja – modyfikacja eksportu jonów metali poza cytoplazmę</b>					
<i>YCF1</i>	ABC transporter	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Pb, Cd – wzrost A(siewki)-Pb i Cd – 2× wzrost	(75)
<i>MPT1 (ZAT1)</i>	transporter	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Zn – wzrost AK-Zn – wzrost	(18)
<i>MPT1</i>	transporter	<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Zn – wzrost	(16)
<i>MTP1</i>	transporter	<i>Stylosanthe hamata</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Mn – wzrost AP-Mg – wzrost 1,9× (przy wyższych stężeniach)	(17)
<i>CAX2</i>	przenośnik antyportowy	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	T-Mn – wzrost AK-Ca – wzrost 1,7× AK-Cd – wzrost 4,7× AK-Mn – wzrost 1,9×	(20)
<i>HMA4</i>	ATPaza	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Zn, Cd – wzrost A-Zn – wzrost 2× A-Cd – wzrost 1,4×	(29)

1	2	3	4	5	6
FITOEKSTRAKcja – modyfikacja biosyntezy związków kompleksujących jony metali					
<i>PCS1</i>	syntaza fitochelatyn	<i>T. aestivum</i>	<i>N. glauca</i>	T-Pb i Cd – wzrost AP – wzrost Pb (do 9×), Cd (do 3×), Zn (do 4,5×), Cu (do 12×) i Ni (do 3,7×) AK – wzrost Pb (do 3×), Cd (do 24×), Zn (do 4,5×), Cu (do 2,5×)	(43,44)
<i>PCS1</i>	syntaza fitochelatyn	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T- Cd – spadek lub dla niewielkich linii transformantów wzrost, As – wzrost AP-Cd – bez zmian lub dla bardziej tolerancyjnych linii niewielki wzrost, As bez zmian AK-Cd – bez zmian PC – wzrost do 10 ×	(21,39, 40)
<i>PCS1</i>	syntaza fitochelatyn	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	T-Cd – wzrost AP-Cd – wzrost ~2× AK-Cd – wzrost ~2× PC – wzrost do 10×	(76)
<i>gsb1</i> <i>gsbII</i> / <i>PCS1</i>	syntetaza $\gamma$ Glu-Cys/ syntaza GSH/ syntaza fitochelatyn	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>N. tabacum</i>	T-Cd – bez zmian AP-Cd – niewielki spadek AK-Cd – niewielki wzrost do 1,7× PC – wzrost do 8×	(77)
<i>PCS1</i>	syntaza fitochelatyn	<i>A. thaliana</i>	<i>B. juncea</i>	T-As, Cd i Zn – wzrost AP-Cd – spadek, Zn i As – bez zmian AK-Cd – bez zmian lub niewielki spadek, As – bez zmian, Zn – niewielki spadek PC – wzrost ~ 1,3×	(42,78)
<i>gsb1</i>	syntetaza $\gamma$ Glu-Cys	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	T-Cd – wzrost AP – wzrost Cd do 1,9× AK – bez zmian PC – wzrost do 2×	(49)
<i>gsb2</i>	syntetaza GSH	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	T-Cd – wzrost AP – wzrost Cd do 1,25× PC – wzrost do 1,3×	(48)
<i>Rcs1</i>	syntaza cysteiny	<i>O. sativa</i>	<i>N. tabacum</i>	T-Cd – wzrost A (całe rośliny)-cd – obniżona do 0,8	(79)
<i>Csase</i>	syntaza cysteiny	<i>szpinak</i>	<i>N. tabacum</i>	T-Cd, Se, Ni – wzrost T-Pb, Cu – bz; AK-Cd – 1,7× (w przeliczeniu na roślinę) AP-Cd – 2,75× (jw.)	(80)
<i>MT-1</i>	metalotioneina	mysz	<i>N. tabacum</i>	T-20× – wzrost AP – bz	(81)
<i>MT1</i>	metalotioneina	mysz	<i>N. tabacum</i>	T – wzrost ~2× AP – niższa (76% typu dzikiego) A całkowita – niższa (ok. 80% typu dzikiego)	(82)

1	2	3	4	5	6
<i>bMT2</i>	metalotioneina	człowiek	<i>N. tabacum</i> ; <i>B. napus</i>	T-Cd – wzrost	(83)
<i>PsMT</i>	metalotioneina	<i>P. sativum</i>	<i>A. thaliana</i>	T – nie badano A-Cu 5× – wzrost Cd, Fr – bz	(84)
<i>CUP1</i>	metalotioneina	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. oleracea</i>	T-Cd 16× – wzrost AP-Cd – wzrost 2× A całkowita – bz	(84)
<i>MTbis</i>	metalotioneina	<i>Silene vulgaris</i>	<i>N. tabacum</i>	T – obniżona AP-Cd – wzrost do 1,5× AK-Cd – wzrost do 2,3×	(85)
<i>PRT</i>	ATP-fosforybozylotransferaza	<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Ni – wzrost A-Ni – bz	(59)
<i>PRT1</i>	ATP-fosforybozylotransferaza	<i>A. lesbiacum</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Ni – wzrost A-Ni – bz	(60)
<i>APSI</i>	sulfurylaza ATP	<i>A. thaliana</i>	<i>B. juncea</i>	T – bz AP-Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Zn – bz	(86)
<i>Nas1</i>	syntaza nikotianaminy	<i>H. vulgare</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Cd, Cu, Fe, Mn, Zn – nieznaczny wzrost T-Ni – wzrost	(56)
			<i>N. tabacum</i>	T-Ni – wzrost T-Ni – wzrost A(liście) – Ni, Zn, Fe, Cu – bz A(lodyga) – Ni – wzrost 1,4×, Zn – wzrost 2×, Fe – wzrost 2× Mn, Cu – bz	
<i>Nas1</i>	syntaza nikotianaminy	<i>T. caeruleus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	A-Ni – wzrost 1,7×	(55)

## FITOEWAPORACJA – modyfikacja przemian związków rtęci

<i>merA</i>	reduktaza Hg(II)	<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i>	T-Hg <sup>2+</sup> – wzrost E-Hg <sup>0</sup> – wzrost 3×	(64)
			<i>L. tulipifera</i>	T-Hg <sup>2+</sup> – wzrost E-Hg <sup>0</sup> – wzrost 10×	(67)
			<i>P. deltooides</i>	E-Hg <sup>0</sup> – wzrost 3× T – wzrost	(68)
			<i>O. sativa</i>	E-Hg <sup>0</sup> – wzrost T-Hg – wzrost	(66)
			<i>A. thaliana</i>	T – octan fenylortęci, chlorek metylo-rtęci – wzrost	(65)
<i>merB</i>	liaza organortęci	<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i>	T-metylo-rtęci – wzrost E-Hg <sup>0</sup> – wzrost	(73)
<i>merA/merB</i>	reduktaza Hg(II)/liaza organortęci	<i>E. coli</i>	<i>N. tabacum</i> ,	T-octan fenylortęci – wzrost	(72)
			<i>P. deltooides</i>	E-Hg <sup>0</sup> – wzrost 3× T-octan metylo-rtęci – wzrost	(69)
			<i>S. alterniflora</i>	T-octan fenylortęci, Hg <sup>2+</sup> – wzrost	(70)

Stosowane skróty: AP – akumulacja w pędzie; AK – akumulacja w korzeniu; A – akumulacja w całej roślinie, T – tolerancja; E – ewaporacja; bz – brak zmian; PC – fitochelatyny.

## Literatura

1. Nriagu J. O., Pacyna J. M., (1988), *Nature*, 333, 134-139.
2. Salt D. E., Blaylock M., Kumar N., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I. Raskin I., (1995), *Biotechnol.*, 13, 468-474.
3. Chaney R., Li Y. M., Brown S. L., Homer F. A., Malik M., Angle J. S., Baker A. J. M., Reeves R. D., Chin M., (2000), in: Terry N., Banuoclos G., *Phytoremediation of contaminated soil and water*, CRC Press, Boca Raton, Fla., 129-158.
4. Guerinot M. L., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1465, 190-198.
5. Connolly E. L., Fett J. P., Guerinot M. L., (2002), *Plant Cell*, 14, 1347-1457.
6. Thomine S., Wang R., Ward J. M., Crawford N. M., Schroeder J. I., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4991-4996.
7. Thomine S., Lelièvre F., Debarbieux E., Schroeder J. I., Barbier-Brygoo H., (2003), *Plant J.*, 34, 685-695.
8. Curie C., Alonso J. M., Le Jean M., Ecker J. R., Briat J. F., (2000), *Biochem. J.*, 347, 749-755.
9. Arrazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H., (1999), *Plant J*, 20, 171-182.
10. Sasaki Y., Hayakawa T., Inoue C., Miyazaki A., Silver S., Kusano T., (2006), *Transgenic Res*, 15, 615-625.
11. Schachtman D. P., Kumar R., Schroeder J. I., Marsh E. L., (1997), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 11079-11084.
12. Clemens S., Antosiewicz D. M., Ward J. M., Schachtman D. P., Schroeder J. I., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12043-1248.
13. Antosiewicz D. M., Hennig J., (2004), *Env. Pollut*, 129, 237-245.
14. Wojas S., Ruszczynska A., Bulska E., Wojsiechowski M., Antosiewicz, D. M., (2007), *Env. Pollut.*, 147, 584-592.
15. Stanton B., Eaton J., Johnson J., Rice D., Schuette B., Moser B., (2002), *J. For.*, 100, 28-33.
16. Blaudez D., Kohler A., Martin F., Sanders D., Chalot M., (2003), *Plant Cell*, 15, 2911-2928.
17. Delhaize E., Kataoka T., Hebb D. M., White R. G., Ryan P. R., (2003), *Plant Cell*, 15, 1131-1142.
18. van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E., Chardonnens A. N., Schat H., Verkleij J. A. C., Hooykaas P. J. J., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 1047-1055.
19. Cai X., Lyttton J., (2004), *Mol. Biol. Evol.*, 21, 1692-1703.
20. Hirschi K. D., Korenkov V. D., Wilganowski N. L., Wagner G. J., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 125-133.
21. Li Z-S., Lu Y-P., Zhen R-G., Szczypka M., Thiele D. J., Rea P. A., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 42-47.
22. Ghosh M., Shen J., Rosen B. P., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5001-5006.
23. Gueldry O., Lazard M., Delort F., Dauplais M., Grigoras I., Blamquet S., Plateau P., (2003), *Eur. J. Biochem.*, 270, 2486-2496.
24. Eren A., Argiuello J. M., (2004), *Plant Physiol.*, 136, 3712-3723.
25. Hussain D., Haydon M. J., Wang J., Wong E., Sherson S. M., Young J., Camakaris J., Harper J. F., Cobbett C. S., (2004), *Plant Cell*, 16, 1227-1339.
26. Verre7 F., Gravot A., Auroy P., Preveral S., Forestier C., Vavasseur A., Richaud P., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 1515-1522.
27. Mills R. F., Krigen G. C., Baccarini P. J., Hall J. L., Williams L. E., (2003), *Plant J.*, 35, 164-176.
28. Mills R. F., Francini A., Ferreira da Rocha P. S., Baccarini P. J., Aylett M., Krijger G. C., Williams L. E., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 783-791.
29. Verret F., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., David P., Nussaume L., Vavasseur A., Richaud P., (2004), *FEBS Lett.*, 576, 306-312.

30. Klein M., Burla B., Martinoia E., (2006), *FEBS Lett.*, 580, 1112-1122.
31. Colangelo E. P., Guerinot M. L., (2006), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 322-330.
32. Clemens S., Kim E., Neumann D., Schroeder J., (1999), *The EMBO Journal*, 18, 3325-3333.
33. Ha S., Smith A., Howden R., Dietrich W., Bugg S., O'Connell M., Goldsbrough P., Cobbett C., (1999), *Plant Cell*, 11, 1153-1163.
34. Vatamaniuk O., Mari S., Lu Y. P., Rea P., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7110-7115.
35. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H., (1985), *Science*, 230, 674-676.
36. Grill E., Löffler S., Winnacker E., Zenk M., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6838-6842.
37. Vatamaniuk O., Bucher E., Ward J., Rea P., (2002), *Trends in Biotechnology*, 20, 61-64.
38. Howden R., Goldsbrough P., Andersen C., Cobbett C., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 1059-1066.
39. Lee S., Petros D., Moon J., Ko T., Goldsbrough P., Korban S., (2003a), *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 903-910.
40. Lee S., Moon J. S., Ko T. S., Petros D., Goldsbrough P. B., Korban S. S., (2003b), *Plant Physiol.*, 131, 656-663.
41. Li Y., Dhankher O., Carreira L., Lee D., Chen A., Schroeder J., Balish R., Meagher R., (2004), *Plant Cell Physiol.*, 45, 1787-1797.
42. Gasic K., Korban S. S., (2007), *Planta*, 225, 1277-1285.
43. Gisbert C., Ros R., de Haro A., Walker D., Bernal M., Serrano R., Navarro-Aviñó J., (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 440-445.
44. Martínez M., Bernal P., Almela C., Vélez D., García-Augustín P., Serrano R., Navarro-Aviñó J., (2006), *Chemosphere*, 64, 478-485.
45. Antosiewicz D. M., (1993), *Env. Exp. Bot.*, 33, 575-589.
46. Antosiewicz D. M., (1995), *Env. Exp. Bot.*, 35, 55-69.
47. Antosiewicz, D. M., (2005), *Env. Pollut.*, 134, 23-34.
48. Zhu Y. L., Pilon-Smits E., Jouanin L., Terry N., (1999a), *Plant Physiol.*, 119, 73-79.
49. Zhu Y. L., Pilon-Smits E., Tarun A., Weber S., Jouanin L., Terry N., (1999b), *Plant Physiol.*, 121, 1169-1177.
50. Elmayan T., Tepfer M., (1994), *Plant J.*, 6, 433-440.
51. DiDonato R. J. Jr., Roberts L. A., Sanderson T., Easley R. B., Walker E. L., (2004), *Plant J.*, 39, 403-414.
52. Stephan U. W., Scholz G., Rudolph A., (1990), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 186, 81-88.
53. Pich A., Scholz G., (1996), *J. Exp. Bot.*, 47, 41-47.
54. Schmidke I., Stephan U. W., (1995), *Physiol. Plant.*, 95, 147-153.
55. Pianelli K., Mari S., Marqués L., Lebrun M., Czernic P., (2005), *Transgenic Res.*, 14, 739-748.
56. Kim S., Takahashi M., Higuchi K., Tsunoda K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa N. K., (2005), *Plant Cell Physiol.*, 46, 1809-1818.
57. Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa K., (2003), *Plant Cell.*, 15, 1263-1280.
58. Haydon M. J., Cobbett C. S., (2007), *New Phytol.*, 174, 499-506.
59. Wycisk K., Kim E. J., Schroeder J. I., Krämer U., (2004), *FEBS Lett.*, 578, 128-134.
60. Ingle R. A., Mugford S. T., Rees J. D., Campbell M. M., Smith J. A. C., (2005), *Plant Cell*, 17, 2089-2106.
61. Meagher R. B., Heaton A. C. P., (2005), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 502-513.
62. Kubachka K. M., Meija J., Leduc D. L., Terry N., Caruso J. A., (2007), *Environ. Sci. Technol.*, 41, 1863-1869.
63. Misra T. K., (1992), *Plasmid*, 27, 4-16.
64. Rugh C. L., Wilde H. D., Stack N. M., Thompson D. M., Summers A. O., Meagher R. B., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3182-3187.
65. Bizily S. P., Rugh C. L., Summers A. O., Meagher R. B., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6808-6813.
66. Heaton A. C. P., Rugh C. L., Wang N. L., Meagher R. B., (1998), *J. Soil Contam.*, 7, 497-509.
67. Rugh C. L., Senecoff J. F., Meagher R. B., Merkle S. A., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 925-928.
68. Che D., Meagher R. B., Heaton A. C. P., Lima A., Rugh C. L., Merkle S. A., (2003), *Plant Biotech. J.*, 1, 311-319.

69. Lyra S., Meagher R. B., Kim T., Heaton A. C. P., Montello P., Balish R. S., Merkle S. A., (2007), *Plant Biotechnol. J.*, 5, 254-262.
70. Czakó M., Feng X., He Y., Liang D., Marton L., (2006), *Environ Geochem Health*, 28, 103-110.
71. Heaton A. C. P., Rugh C. L., Kim T., Wang N. J., Meagher R. B., (2003), *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 2940-2947.
72. Ruiz O. N., Hussein H. S., Terry N., Daniell H., (2003), *Plant Physiol.*, 132, 1344-1352.
73. Bizily S. P., Rugh C. L., Meagher R. B., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 213-217.
74. Bizily S. P., Kim T., Kandasamy K., Meagher R. B., (2003), *Plant Physiol.*, 131, 463-471.
75. Song W. Y., Sohn E. J., Martinoia E., Lee Y. J., Yang Y. Y., Jasinski M., Forestier C., Hwang I., Lee Y., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 914-919.
76. Pomponi M., Censi V., di Girolamo V., de Paolis A., di Toppi L. S., Aromolo R., Costantino P., Cardarelli M., (2006), *Planta*, 223, 180-190.
77. Wawrzyński A., Kopera E., Wawrzyńska A., Kamińska J., Bal W., Sirko A., (2006), *J. Exp. Bot.*, 57, 2173-82.
78. Gasic K., Korban S. S., (2007b), *Plant. Mol. Biol.*, 64, 361-369.
79. Harada E., Choi Y-E., Tsuchisaka A., Obota H., Sano H., (2001), *J. Plant Physiol.*, 158, 655-661.
80. Kawashima C. G., Noji M., Nakamura M., Ogra Y., Suzuki K. T., Saito K., (2004), *Biotech. Lett.*, 26, 153-157.
81. Yeargan R., Maiti I. B., Nielsen M. T., Hunt A. G., Wagner G. J., (1992), *Trans. Res.*, 1, 261-267.
82. Maiti I. B., Wagner G. J., Yeargan R., Hunt A. G., (1989), *Plant Physiol.*, 91, 1020-1024.
83. Misra S., Gedamu L., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 161-168.
84. Evans K. M., Gatehouse J. A., Lindsay W. P., Shi J., Tommay A. M., Robinson N. J., (1992), *Pl. Mol. Biol.*, 20, 1019-1028.
85. Hasegawa I., Terada E., Sunairi M., Wakita H., Shinmachi F., Noguchi A., Nakajima M., Yazaki J., (1997), *Plant Soil*, 196, 277-281.
86. Bennette L. E., Burkhead J. L., Hale K. L., Terry N., Pilon M., Pilon-Smith E., (2003), *J. Environ. Qual.*, 32, 432-440.