



Reakcje komórek roślinnych na metale ciężkie – aspekty biotechnologiczne*

Edward A. Gwóźdź, Małgorzata Kopyra

Zakład Ekofizjologii Roślin, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Plant cell responses to heavy metals – biotechnological aspects

Summary

Heavy metals have been increasing in the environment as a result of either natural processes or human industrial activities. Many of the heavy metals affect and damage various developmental and biochemical processes causing reduction in growth, inhibition of photosynthesis and respiration and degeneration of main cell organelles. It is mostly due to the promoting effect of heavy metals on the formation of harmful reactive oxygen species (ROS) which disturb the whole cellular machinery.

There is a requirement for a balance between the uptake of essential metal ions and the ability of plants to protect sensitive cellular structures and activities from excessive level of metals. The resistance of plants to heavy metals depends on the reduction of uptake and translocation from the root to the shoot, binding by appropriate ligands and, finally, transferring to the vacuole. The phytotoxic effect of heavy metals is effectively counteracted by the metal-binding proteins and peptides like metallothioneins, chaperones and phytochelatins as well as some organic acids. Another very important aspect of the heavy metal detoxication is the presence of an efficient ROS scavenging system consisting of low molecular antioxidants and antioxidant enzymes.

Some plants can hyperaccumulate metal ions that are toxic for other species. Such plants can serve as donors of traits that could be used to clean up the environment. Several methods can be applied to create plants able to remove the xenobiotics from the environment: sexual or somatic hybridization, mutagenesis, *in vitro* selection of metal-resistant cell lines and engineering of metal-accumulating transgenic plants. The use of specially selected and engineered metal-accumulating plants for environmental clean-up is a novel technology called phytoremediation. This rapidly emerging biotechnology consists of some branches suitable to toxic metals remediation: 1) phytoextraction – the use of plants to remove heavy metals from the soil, 2) phytostabilization –

Adres do korespondencji

Edward A. Gwóźdź,
Zakład Ekofizjologii
Roślin,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
al. Niepodległości 14,
61-713 Poznań;
e-mail:
albus@main.amu.edu.pl

biotechnologia

the use of plants to complex and eliminate the availability of toxic metals in soils, 3) rhizofiltration – the use of plant roots to remove heavy metals from polluted waters. Some new approaches concerning the use of transgenic plants as sensitive bioindicators of toxic heavy metals and soils contaminated with radionuclides are presented.

Key words:

phytochelatin, transporters, chaperones, metallothioneins, hyperaccumulators, phytoremediation, biomonitoring.

1. Wprowadzenie

Wzrastający w ostatnich dekadach poziom stężenia metali ciężkich jest jednym z najbardziej uciążliwych elementów skażenia środowiska. Metale ciężkie są wprawdzie naturalnym i wszechobecnym elementem różnych ekosystemów, jednakże znacznie większy ich poziom w środowisku jest wynikiem długotrwałej przemysłowej i rolniczej działalności człowieka. Niezwykle groźny jest zwłaszcza trwały charakter zanieczyszczeń metalami ciężkimi oraz ich włączanie się do łańcucha pokarmowego.

W związku z tym, że niedawno zagadnienia związane z odpornością roślin na metale ciężkie zostały już dość wyczerpująco omówione na tych łamach (1) oraz we wcześniejszych opracowaniach (2,3), w artykule tym skoncentrowano się na tych elementach oddziaływania metal-roślina, które mogą mieć znaczenie dla celów biotechnologicznych i będą realne, wówczas gdy zostaną lepiej poznane mechanizmy związane z transportem i akumulacją jonów metali ciężkich oraz te, które warunkują odporność roślin na nadmiar metali w środowisku.

2. Mobilizacja i pobieranie jonów metali

Proces akumulacji metali w roślinie obejmuje trzy główne etapy: mobilizacja jonów metali, ich pobieranie i transport do miejsc składowania w roślinie. W pobieraniu dużą rolę odgrywa forma w jakiej metal znajduje się w glebie oraz jej kwasowość. Najszybciej pobierane są wolne jony, zaś te, które znajdują się w formie kompleksów są uwalniane za pomocą substancji aktywnie wydzielanych przez korzenie roślin (4). Niski potencjał oksydoredukcyjny gleby, obniżenie pH, aktywność niektórych mikroorganizmów glebowych oraz możliwość dyfuzji zgodnej z gradientem stężeń to czynniki warunkujące pobieranie metali z gleby. Procesy przeciwstawne jak, podwyższone pH i zwiększony poziom jonów Ca^{2+} , sorpcja przez cząstki glebowe i mikroorganizmy zmniejszają wydajność pobierania.

Bardzo istotne są czynniki wpływające na pobieranie metali związane z systemem korzeniowym, które choć słabo dotąd poznane, mogą być obiektem manipulacji biotechnologicznej. Korzenie roślin mogą wydzielać do gleby kwasy organiczne i chelatory metali tzw. fitosiderofory zdolne do uwalniania metali z nierozpuszczalnych kompleksów glebowych (5). Podobną rolę odgrywają obecne w plazmolemie

oksydazy i ATP-zależne pompy protonowe obniżające pH gleby, a także zdolne redukować takie metale jak żelazo, miedź, mangan do form lepiej przyswajalnych (6). Wymienione właściwości korzeniowych czynników wpływających na pobieranie metali można także przypisać mikoryzowym grzybom oraz mikroorganizmom glebowym będących ważnymi składnikami ryzosfery korzeniowej.

Znaczne zakwaszenie gleb, będące m.in. efektem kwaśnych deszczy prowadzi do uwalniania wolnych jonów metali np. Al^{3+} , szkodliwie oddziałujących na rośliny i jest to poważny problem agrotechniczny, dotyczący aż 12% ogółu obszarów uprawnych. Pewne nadzieje na rozwiązanie tego problemu można było wiązać z uzyskaniem transgenicznego tytoniu, który po wprowadzeniu bakteryjnego genu dla syntazy cytrynianowej, wydzieliał znaczne ilości kwasu cytrynowego do podłoża, co zwiększyło odporność rośliny na glin (7). Jednakże wynik ten nie znalazł potwierdzenia w późniejszych doświadczeniach przeprowadzonych na tym samym materiale, podobną techniką (8).

Podstawowym procesem warunkującym homeostazę jonów metali w roślinie oraz decydującym o jej odporności jest regulacja pobierania jonów metali przez komórki korzenia. Ściana komórkowa, będąca swoistym wymienniczym jonowym, wiąże znaczną część metali ciężkich, choć odznacza się niskim stopniem powinowactwa i selektywności (9,10).

W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu metod molekularnych oraz licznych mutantów drożdży, udało się zidentyfikować szereg błonowych transporterów kationowych (11). Większość z nich należy do grupy ZIP oraz Nramp, które wykazują dość szeroki zakres powinowactwa do jonów metali. Okazało się, że obok cynku i żelaza mogą przez nie wnikać do komórki kadm, podobnie jak przez właściwy dla wapnia transporter LCT1 (12,13). Z danych tych wynika, że w błonach komórek roślinnych nie ma specyficznych transporterów dla jonów metali zbędnych, jak Cd i Pb, które prawdopodobnie wnikają do wnętrza komórek poprzez mało specyficzne transportery dla kationów niezbędnych, może natomiast wskazywać zwiększone pobieranie jonów Cd^{2+} w warunkach deficytu żelaza w podłożu (14).

Specyficznym transporterem uczestniczącym w pobieraniu jonów Pb^{2+} , jak dotąd, okazało się błonowe białko wiążące kalmodulinę ($NtCBP_4$), którego nadekspresja w tytoniu bardzo silnie zwiększała akumulację jonów ołowiu w roślinie, przy równocześnie większej wrażliwości na ten metal (15). W wyniku dalszych badań, po wprowadzeniu do tytoniu i rzodkiewnika zmodyfikowanych genów dla tego białka uzyskano wynik odwrotny – zwiększonej odporności na ołów towarzyszyła mniejsza akumulacja jonów metalu (16). Szczególnie duże nadzieje wiąże się z grupą transporterów cynku ZIP, które u *Thlaspi caerulescens* (tobołków) typowych hiperakumulatorów cynku wykazują wielokrotnie większą aktywność niż w roślinach „normalnych” (17). Zwiększona ekspresja tego białka może zwiększyć akumulację, nie tylko cynku, ale także innych metali ciężkich. Tym bardziej, że można już obecnie metodami inżynierii genetycznej zmieniać specyficzność substratów transporterów metali poprzez zmutowanie ich konserwatywnych domen (18).

3. Transport wewnątrzkomórkowy i wiązanie jonów metali

Po wnikięciu do komórki jony metali nie pozostają w stanie wolnym, lecz są wiązane i otoczkowane przez specjalne substancje chelatujące i chaperonowe. Szczególnie odnosi się to do wysoce reaktywnych jonów Cu^{2+} , które mają duży potencjał oksydoredukcyjny, a jednocześnie są niezbędne jako składniki wielu enzymów mitochondrialnych i plastydowych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, oksydaza cytochromu C czy plastocyjanina. W ich wewnątrzkomórkowym transporcie uczestniczą specjalne metalochaperony, takie jak np. CCH1 (*copper chaperone*) (19). Inna grupa białek zaangażowanych w transport jonów metali z cytoplazmy do odpowiednich przedziałów komórkowych nosi nazwę CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) (20). Mogą one uczestniczyć w transporcie do wakuoli takich metali jak Zn, Cd, i Co, a jednym z ich przedstawicieli jest białko ZAT, które zwiększa akumulację cynku i tolerancję na ten metal w transgenicznym rzodkiewniku (20).

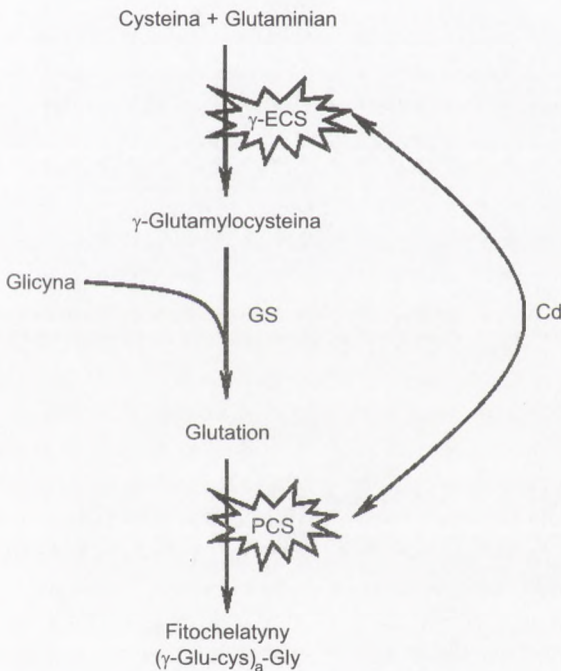
3.1. Metalotioneiny

Do najważniejszych, najlepiej zbadanych substancji uczestniczących w wiązaniu, a także wewnątrzkomórkowym transporcie metali ciężkich należą białka i peptydy zwane metalotioneinami, które podzielono na trzy klasy. Dwie pierwsze, metalotioneiny klasy I i II wiążą metale ciężkie u zwierząt i grzybów. Są to niskocząsteczkowe białka, bogate w cysteinę, kodowane przez specyficzne geny (21,22). Geny te są indukowane jonami metali ciężkich, które aktywują odpowiedni czynnik białkowy *trans*, wiążący się z wrażliwą na metal sekwencją promotorową genu MRE i w ten sposób uruchamiający jego ekspresję MT1 MT2. U roślin zidentyfikowano geny o sekwencjach bardzo podobnych do genów metalotionein zwierzęcych, jednakże do niedawna były trudności ze znalezieniem produktów tych genów i jedyną metalotioneiną roślinną było bogate w cysteinę białko E_c (*embryo cystein-rich protein*), które jest produkowane obficie w dojrzewających ziarniakach zbóż (23,24). Niezwykle ciekawe jest to, że gen dla tej klasycznej metalotioneiny roślinnej, której cząsteczka wiąże 5 atomów cynku, w części promotorowej zamiast sekwencji wrażliwej na metal (MRE) posiada sekwencję regulowaną przez ABA (ABRE). Związane jest to z odmienną funkcją tego białka, które w ziarniakach pszenicy wiąże jony cynku, niezbędne do zapewnienia funkcjonowania wielu białek zawierających ten metal. Być może w przyszłości powiodą się próby biotechnologicznego wykorzystania tej roślinnej metalotioneiny.

3.2. Fitochelatyny

Rośliny wykształciły odmienny, sprawny system reagujący na obecność metali ciężkich w komórce, który polega na syntezie fitochelatyn (PC), które są zaliczane do metalotionein III klasy.

Biosynteza fitochelatyn ma przebieg etapowy (rys. 1) i w ostatniej fazie jest katalizowana przez syntazę fitochelatynową, konstytutywny enzym, którego aktywatorami są wolne jony metali ciężkich, szczególnie Cd^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Au^{2+} (25), a substratami glutation lub fitochelatyny o różnej długości łańcucha peptydowego. Fitochelatyny są funkcjonalnymi analogami metalotionein zwierzęcych, choć w przeciwieństwie do nich nie są syntetyzowane *de novo*; na drodze translacji. Ich rola polega na detoksykacji nadmiaru wolnych jonów metali w komórkach roślinnych, w czym istotną rolę odgrywają grupy $-\text{SH}$ reszt cysteinowych. Zasadnicza funkcja, jaką przypisuje się fitochelatynom, polega na wahadłowym transporcie metali dwuwartościowych z cytoplazmy do wakuoli, gdzie w warunkach niskiego pH kompleks ulega dysocjacji, a jony metali łączą się z kwasami organicznymi. Fitochelatynom przypisuje się także udział w utrzymywaniu w komórce homeostazy jonów dwuwartościowych, które w zależności od zapotrzebowania mogą być uwalniane z kompleksów i wykorzystane, np. do tworzenia metaloenzymów. Warto podkreślić, że fitochelatyny wykryto po raz pierwszy w traktowanej jonami kadmu zawieszynie komórkowej *Rauvolfia serpentina* (26). Odkrycie w ostatnich latach genów kodujących syntazę fitochelatynową u drożdży i nicieni o dużej homologii sekwencyjnej w obrębie domeny katalitycznej, wskazuje na bardziej uniwersalną rolę tych peptydów (27).



Rys. 1. Główne etapy biosyntezy fitochelatyn w roślinach. γ -ECS – syntetaza γ -glutamylcysteino-wa, GS – syntetaza glutationowa, PCS – syntetaza fitochelatynowa, PC – fitochelatyny.

Detoksykacyjna funkcja fitochelatyn została wykazana m.in. dzięki mutantom rzodkiewnika i drożdży, które pozbawione syntazy PC, wykazywały dużą wrażliwość na kadm, arsen i selen (28). Interesujące jest to, że mutanty te były stosunkowo mało wrażliwe na miedź, co wskazuje na inny mechanizm detoksykacji jonów tego metalu w roślinach (29). Potwierdzeniem detoksykacyjnej roli PC było niejako otrzymanie odpornych na metale ciężkie roślin transgenicznych, do których wprowadzono dodatkowe kopie genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy fitochelatyn (tab. 1).

Jednakże w kilku przypadkach stosując rośliny (30) lub zawiesiny komórkowe (31) o zróżnicowanej odporności na kadm nie udało się wykazać zależności między tolerancją na ten metal a poziomem fitochelatyn. W prowadzonych w naszym zespole badaniach wykazano, że w tolerancyjnej na $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ linii komórkowej ogórka poziom fitochelatyn był nawet niższy niż w komórkach linii wrażliwej (32). Podobne wyniki otrzymano w odniesieniu do selenu (27).

4. Otrzymywanie roślin odpornych na metale

4.1. Rośliny transgeniczne

W celu otrzymania roślin akumulujących i tolerujących wysokie stężenia toksycznych metali podjęto próby wprowadzenia do roślin genów kodujących zarówno metalotioneiny pochodzenia zwierzęcego i ludzkiego jak i genów dla enzymów uczestniczących w syntezie fitochelatyn (33). W zależności od planowanego wykorzystania roślin transgenicznych można wyróżnić dwa podejścia. Pierwsze, w odniesieniu do roślin uprawnych, polega na uzyskaniu obniżonej akumulacji metali w organach roślin, np. w liściach. W drugim, chodzi o otrzymanie roślin odpornych na metale ciężkie i posiadających zdolność do ich zwiększonej akumulacji w organach zbieralnych, np. pędach. Wyniki zastosowania obu strategii przedstawione są w tabeli. Pierwsze próby transformacji zostały podjęte już w 1989 r. (34,35) i polegały na wprowadzeniu do roślin konstruktów zawierających, obok odpowiedniego promotora (35S CaMV, rbcS), gen kodujący metalotioneinę (MT) mysią lub ludzką (36,37). Transgeniczny tytoń z genem mysiej MT odznaczał się zwiększoną tolerancją na $100\text{-}200 \mu\text{M CdCl}_2$ oraz zmniejszoną o 20% w stosunku do kontroli akumulację kadmu w liściach. Dzięki obecności sekwencji liderowej dla białka transportowego uzyskano regulowaną światłem tkankowospecyficzną ekspresję genu dla MT w liściach *N. tabacum*. W wyniku wprowadzenia – do tytoniu i rzepaku – genu ludzkiej metalotioneiny (MTII) obserwowano podobny zakres tolerancji na kadm, z tym, że udało się już uzyskać aż 70% zmniejszenie akumulacji tego metalu w liściach tytoniu, i to w uprawie polowej. Wyniki przedstawionych badań mogą mieć znaczenie praktyczne jedynie wówczas, jeśli chodzi o zmniejszenie zawartości metali ciężkich

w roślinach przemysłowych takich jak tytoń. Wprowadzenie natomiast MT do innych roślin może co najwyżej pozwolić na ich zastosowanie w rekultywacji i fitostabilizacji terenów skażonych metalami ciężkimi.

Tabela

Rośliny transgeniczne o zwiększonej odporności na metale

Pochodzenie transgenu	Produkt transgenu	Roślina transgeniczna	Metal	Literatura
Mt (<i>M. musculus</i>)	metalotioneina I	tytoń	↓Cd ²⁺	(34)
hMt II (<i>H. sapiens</i>)	metalotioneina II	tytoń	↓Cd ²⁺	(36)
gsh I (<i>E. coli</i>)	syntetaza γ-glutamylcysteinowa	gorczyca sarepska	↑Cd ²⁺	(39)
gsh II (<i>E. coli</i>)	syntetaza glutationowa	gorczyca sarepska	↑Cd ²⁺	(38)
ZAT (<i>A. thaliana</i>)	białko transportujące Zn ²⁺	rzodkiewnik	↑Zn ²⁺	(20)
mer Ape9 (<i>E. coli</i>)	reduktaza rtęciowa	rzodkiewnik tulipanowiec	Hg ²⁺ , Au ³⁺	(52,60)
mer Bpe (<i>S. typhimurium</i>)	liaza organortęciowa	rzodkiewnik	CH ₃ -Hg ⁺	(51)
RCS1 (<i>Oryza sativa</i>)	syntaza cysteinowa	tytoń	↑Cd ²⁺	(40)
APS1 (<i>A. thaliana</i>)	sulfurylaza ATP	gorczyca sarepska	↑Se ⁶⁺	(61)
ArsC + γ-ECS (<i>E. coli</i>)	reduktaza arsenianowa + syntetaza γ-glutamylcysteinowa	rzodkiewnik	↑As ³⁺	(41)

Kierunek strzałki wskazuje na obniżoną (↓) lub zwiększoną (↑) akumulację metalu.

Duże znaczenie w badaniach nad zwiększeniem tolerancji roślin na metale ciężkie miało zidentyfikowanie genów szlaku biosyntezy fitochelatyn, w tym syntazy fitochelatynowej (PCS) u *A. thaliana*, pszenicy i w komórkach drożdży, co pozwoliło na otrzymanie odpornej na kadm i gromadzącej znaczne jego ilości w pędach gorczycy sarepskiej, do której wprowadzono bakteryjny gen dla syntetazy glutationowej (38). Podobnym sukcesem zakończyło się wprowadzenie do tej samej rośliny genu kodującego syntetazę γ-glutamylcysteinową (39). W obu przypadkach w roślinach transgenicznych stwierdzono znacznie większy poziom glutationu i fitochelatyn. Jednakże często w tego typu podejściach, czynnikiem limitującym wydajność wprowadzonego genu jest niedobór wyjściowego substratu danego enzymu, w tym przypadku cysteiny. Z reguły w roślinach poziom tego aminokwasu nie jest wysoki, stąd jest ona typowym czynnikiem ograniczającym. Wprowadzenie do tytoniu genu dla syntazy cysteinowej z ryżu, znacznie podniosło w roślinach transgenicznych poziom zarówno cysteiny, glutationu i fitochelatyn, co w efekcie zwiększyło tolerancję roślin na normalnie toksyczne stężenia kadmu (40). Ostatnio, w wyniku wprowadzenia do rzodkiewnika dwu genów, z których jeden dla reduktazy arsenianowej, drugi kodujący γ-ECS uzyskano roślinę akumulującą duże ilości arsenu (41).

4.2. Hybrydyzacja somatyczna

W przedstawionych przykładach roślin transgenicznych dowodzi się, że metodą inżynierii genetycznej w niewielkim, jak dotąd, stopniu udało się otrzymać rośliny, które po wprowadzeniu jednego genu mogły akumulować i tolerować duże ilości metali ciężkich. Ponadto, rośliny te były testowane najczęściej w warunkach szklarniowych, a nie w uprawie polowej i były to na ogół rośliny modelowe, jak tytoń czy rzodkiewnik. Naturalna odporność roślin hiperakumulatorów metali ciężkich jest cechą uwarunkowaną wieloma genami, często całymi rodzinami wielogenowymi. Z tego względu alternatywnymi w stosunku do inżynierii genetycznej mogą być inne metody takie jak: krzyżowanie płciowe roślin, hybrydyzacja somatyczna, otrzymywanie mutantów oraz selekcja w kulturach *in vitro*.

Hybrydyzacja somatyczna daje szansę przeniesienia zestawu genów odpowiedzialnych za odporność na metale ciężkie z hiperakumulatora, do rośliny uprawnej, dającej dużą biomasę. Największe szanse na powodzenie takiej metody istnieją w obrębie rodziny *Brassicaceae*, obfitującej zarówno w liczne hiperakumulatory metali ciężkich jak w rodzajach *Thlaspi* i *Alyssum* oraz w rośliny uprawne takie jak rzepak i gorczyce. Jedną z takich prób zakończyła się sukcesem, a mianowicie na drodze hybrydyzacji somatycznej otrzymano płodnego mieszańca *Thlaspi caerulescens* x *Brassica napus*, który łączył w sobie morfologiczne i fizjologiczne cechy roślin wyjściowych (42). W przeciwieństwie do rozetowego pokroju *Thlaspi* rośliny dość drobnej, mieszańiec odznaczał się pokrojem zbliżonym do rzepaku o wzniesionym pędzie, co znacznie ułatwia zbiór tej rośliny. Najważniejszą jednak zaletą tego mieszańca była jego odporność na cynk i kadm oraz zdolność do akumulacji takiej ilości tych metali, która była toksyczna dla rzepaku.

Rozwinięciem i uzupełnieniem takiej strategii może być otrzymywanie roślin transgenicznych na drodze hybrydyzacji somatycznej asymetrycznej, polegającej na integracji z kompletnym genomem biorcy jednego lub kilku chromosomów dawcy, co znacznie zwiększa szansę na integrację genomową oraz regenerację płodnych mieszańców (43).

4.3. Mutacje

Powszechnie wykorzystywana jest łatwość z jaką można uzyskać mutanty rzodkiewnika drogą indukowanej mutagenyzy i selekcji. Fakt, że roślina ta należy do *Brassicaceae* stwarza możliwość transferu genów oraz krzyżowania mutantów z innymi roślinami tej rodziny (20). Odmianą metodę otrzymywania mutantów o zwiększonej zdolności do gromadzenia ołowiu zastosowano w odniesieniu do gorczycy sarepskiej (44). Siewki po podaniu izotopu Pb^{210} poddawano przyżyciowej autoradiografii, a następnie rośliny najsilniej wyznakowane doprowadzono do zakwitania i owocowania. W ten sposób na drodze powtarzanej selekcji z 50 000 przebadanych

roślin udało się uzyskać kilkanaście osobników o dużej zdolności do gromadzenia ołowiu. Nie jest wykluczone, że metody podobne do opisanych są stosowane przez liczne firmy biotechnologiczne specjalizujące się w fitoremediacji, w których udziałowcami są często autorzy podobnych protokółów. Firmy te dostarczają *know how* oraz kompletną technologię pozwalającą na oczyszczanie środowiska skażonego metalami ciężkimi.

5. Fitoremediacja

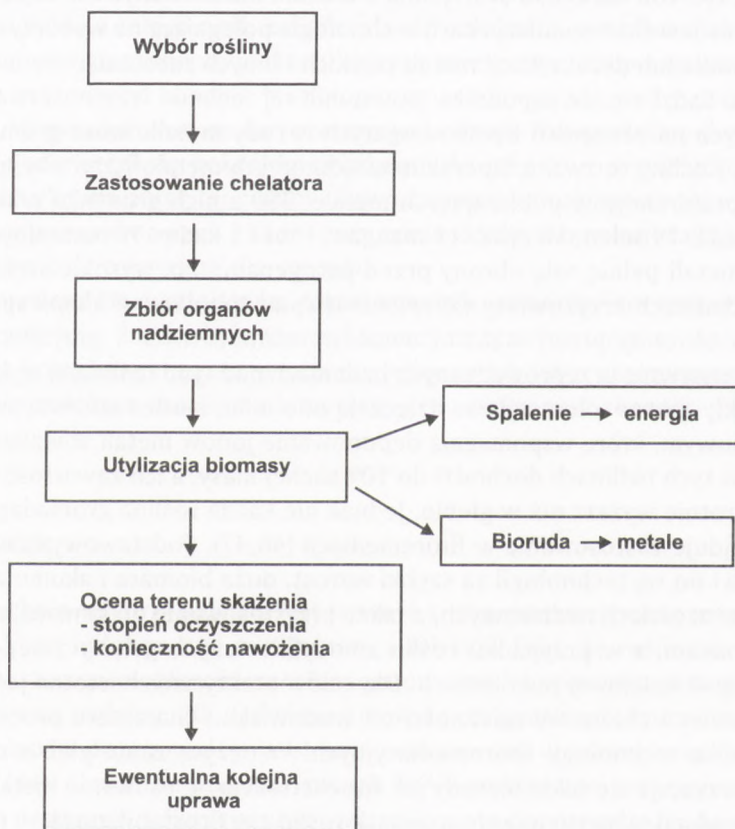
Działalność człowieka powodująca degradację środowiska naturalnego stwarza konieczność podejmowania działań zapobiegających dalszemu zanieczyszczeniu środowiska i oczyszczaniu ekosystemów już skażonych. Szczególnie uciążliwe dla środowiska są zanieczyszczenia trwałe, do jakich zalicza się metale ciężkie. Przez kilka ostatnich dziesięcioleci emisja metali ciężkich do środowiska drastycznie wzrosła i osiągnęła 22 tys. ton dla kadmu, 954 tys. ton dla miedzi, 796 tys. ton dla ołowiu i 1 mln 372 tys. ton dla cynku (45). Jedną z technik opracowanych w odpowiedzi na te zagrożenia jest fitoremediacja czyli technologia polegająca na wykorzystaniu roślin do usuwania lub detoksykacji metali ciężkich i innych substancji chemicznych ze środowiska. Sądzi się, że u podstaw powstania tej techniki leży obserwacja roślin występujących na obszarach bardzo bogatych w rudy metali, które gromadziły ich duże ilości. Rośliny te zwane hiperakumulatorami lub metalofitami obejmują wiele gatunków preferencyjnie pobierających metale: 360 z nich gromadzi nikiel, 26 kobalt, 24 miedź, 19 selen, 16 cynk, 11 mangan, 1 tal i 1 kadm. W naturalnych warunkach jony metali pełnią rolę obrony przed patogenami, np. wysokie stężenie niklu i cynku w tkankach krzyżownicy (*Streptanthus* sp.) i tobołków (*Thlaspii* sp.) stanowi mechanizm obronny przed atakami owadów roślinożernych i grzybów patogennych. W intensywnie przeprowadzanych badaniach nad tymi roślinami wykazano, że tak niezwykle zakres tolerancji zawdzięczają one m.in. bardzo sprawnym transporterom błonowym, które wspomagają deponowanie jonów metali w wakuoli. Stężenie metali w tych roślinach dochodzi do 10% suchej masy, a ich zawartość w roślinie jest wielokrotnie wyższa niż w glebie. Jednak nie każda roślina gromadząca metale ciężkie znajduje zastosowanie w fitoremediacji (46,47). Podstawowymi warunkami przydatności do tej technologii są szybki wzrost, duża biomasa i akumulacja zanieczyszczeń w częściach nadziemnych, a także przystosowanie do klimatu, możliwość uprawy z nasion, a w przypadku roślin zmodyfikowanych genetycznie, stabilność nowej cechy w kolejnych pokoleniach. Dla celów praktycznych istotna jest również łatwość uprawy i zbioru. W zależności od środowiska i charakteru procesu można wyróżnić kilka technologii fitoremedyacyjnych. W oczyszczaniu gleb z metali ciężkich wykorzystuje się takie metody jak **fitoekstrakcja** – usuwanie metali ciężkich dzięki akumulacji w nadziemnych częściach roślin czy **fitostabilizacja** – unieruchomienie metali w glebie i zmniejszenie ich dostępności w środowisku. Do metod

oczyszczania wód należy **rizofiltracja** – usuwanie metali ze ścieków i środowisk wodnych dzięki absorpcji na korzeniach roślin oraz tworzenie terenów zalewowych (*wetlands*) – biologicznych oczyszczalni ścieków.

Fitoremediacja uważana jest za najtańszą – z obecnych na rynku – metod oczyszczania gleb i najbardziej przyjazną dla środowiska. Na przykład koszt oczyszczenia 1 m³ gleby metodami fizycznymi, jak np. wiązanie *in situ* i zdejmowanie wierzchniej warstwy gleby wynosi od 100 do 500 USD, podczas gdy fitoekstrakcji 1 m³ gleby wynosi ok. 50 USD.

5.1. Fitoekstrakcja

Najbardziej rozpowszechnioną i opłacalną techniką jest **fitoekstrakcja**, stosowana głównie do usuwania metali ciężkich i pierwiastków radioaktywnych (rys. 2). Sukces tej metody zależy przede wszystkim od wyboru odpowiedniego gatunku rośliny.



Rys. 2. Schemat zastosowania fitoekstrakcji w praktyce.

Do najbardziej wydajnych należą różne gatunki gorczyc, np. gorczyca sarepska (*Brassica juncea*), rekordzista pod względem ilości i rodzajów gromadzonych metali. Daje ona plon 18 ton/ha w ciągu ok. 2,5 miesiąca i łatwo adaptuje się do uprawy w różnych warunkach klimatycznych i przy użyciu tradycyjnych zabiegów agrotechnicznych. Gatunek ten jest dobrym akumulatorem ołowiu, kadmu, chromu, niklu, cynku i charakteryzuje go wysoka zdolność do transportowania metali do organów nadziemnych. System korzeniowy gorczycy sarepskiej jest dobrze wykształcony i rozróżniony w glebie na głębokość 50 cm, co nie tylko umożliwia efektywne pobieranie metali, ale zapobiega też przedostawaniu się ich do wód gruntowych. Bardzo wysokim potencjałem remediacyjnym odznaczają się tobołki (*Thlaspii* sp.) oraz wiele gatunków traw i roślin motylkowatych, przy czym wymienione rośliny cechuje też duża tolerancja w stosunku do warunków klimatycznych, co umożliwia ich wykorzystanie w rodzimych warunkach. Bardzo ważnym warunkiem skutecznej fitoekstrakcji jest odpowiednia dostępność metali dla roślin. Szybkość z jaką korzenie są w stanie pobierać metale zależy od formy w jakiej występują one w glebie, najłatwiej wnikają do rośliny wolne jony, natomiast metale związane w kompleksach organicznych lub nieorganicznych pobierane są wolniej. W celu zwiększenia potencjału akumulacyjnego roślin stosuje się substancje chelatujące, znacznie zwiększające pobieranie i translokację metali w roślinach poprzez uwalnianie metali z cząsteczek gleby i tworzenie z nimi rozpuszczalnego kompleksu, który jest następnie transportowany przez ksylen i deponowany w liściach. Wydajność pobierania metalu zależy ściśle od jego powinowactwa do chelatora, np. EDTA jest specyficznym chelatorem ołowiu, EGTA kadmu, glin i uran są najskuteczniej związane przez kwasy organiczne, np. cytrynowy i bursztynowy, a nikiel przez reszty histydyny (48). Technikę fitoekstrakcji stosuje się również do usuwania ze środowiska pierwiastków radioaktywnych. W doświadczeniach na gorczycy sarepskiej prowadzonych m.in. w Czernobylu wykazano, że oprócz ołowiu, chromu, kadmu i niklu roślina ta pobiera duże ilości radioaktywnego strontu (^{90}Sr) tak, że końcowe stężenie tego pierwiastka w pędach jest 12 razy większe niż w glebie (49). Ta nadzwyczajna roślina wydajnie gromadzi również selen i bor. W badaniach nad możliwością usuwania ze środowiska radioaktywnego cezu ^{137}Cs wykazano, że szarłat szorstki (*Amaranthus retroflexus*) gromadził ponad 40 razy więcej cezu niż inne rośliny, co było wynikiem jego wysokiej koncentracji w pędach oraz dużą biomasą rośliny. Za pomocą szarlatu usunięto ok. 3% ^{137}Cs z powierzchniowej warstwy gleby i szacuje się, że dzięki dwukrotnemu ścinaniu pędów w ciągu roku oraz utrzymywaniu stałego tempa ekstrakcji, usunięcie z gleby całego cezu dostępnego dla korzeni byłoby możliwe w czasie krótszym niż 15 lat (49).

5.2. Górnictwo roślinne (*phytomining*)

W przypadku pewnych roślin ich organy gromadzące duże ilości metali mogą być traktowane jako bioruda. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów w tej

dziedzinie doprowadzono do powstania wydajnego i przyjaznego środowisku sposobu wydobywania metali, zastępującego kopalnie odkrywkowe. **Roślinne górnictwo** (*phytomining*) jest realną, alternatywną metodą pozyskiwania wielu metali, szczególnie ze złóż, na których konwencjonalne techniki eksploatacji okazały się ekonomicznie nieopłacalne. Dowodzą tego m.in. próby polowe prowadzone w Nevadzie z krzyżownicą (*Streptanthus polygaloides*), naturalnie tam występującym hiperakumulatorem niklu, gdzie gleba zawiera 0,35% Ni, zbyt mało na tradycyjną metodę eksploatacji. Po zastosowaniu tej rośliny uzyskano w postaci biomasy do 150 kg Ni/ha, a zyski ze sprzedaży takiej biorudy były porównywalne z zyskami z innych upraw np. zbóż. Podobnie zachęcające wyniki dały doświadczenia z wykorzystaniem smagliczki (*Alyssum bertolonii*) i *Berkheya coddii*, roślin gromadzących duże ilości niklu i cynku. Za pomocą roślin można również eksploatować złoża metali szlachetnych, o koncentracji zbyt niskiej dla tradycyjnych kopalni. Szczególnie wydajne okazały się wyselekcjonowane szczepy gorczycy sarepskiej akumulujące duże ilości złota.

5.3. Fitostabilizacja

Istotą tej metody jest zasiedlanie skażonych terenów roślinami tolerującymi wysokie stężenia metali ciężkich. Ogranicza to w znacznym stopniu podatność gleby na erozję i zapobiega przemieszczaniu się metali do atmosfery, wód i głębszych warstw gleby. Rolą pokrywy roślinnej jest unieruchomienie metali w glebie poprzez adsorpcję na korzeniach, wytrącanie w postaci osadów lub zamianę w formę mniej dostępną. Fitostabilizacja ma największe zastosowanie na mocno zakwaszonych hałdach pokopalnianych, zawierających duże ilości ołowiu, cynku czy miedzi. Do odtworzenia i utrzymania zwartej pokrywy roślinnej najczęściej stosuje się naturalnie występujące na danym terenie gatunki tolerujące wysokie stężenia metali, a także specjalnie uzyskane odmiany traw (mietlica, kostrzewa) czy roślin przemysłowych (len, konopie, wiklina).

Na terenach skażonych selenem, arsenem i rtęcią próbuje się wprowadzać technikę **fitowolatyżacji**, mającą na celu uwolnienie tych pierwiastków z gleby do atmosfery (47). Rośliny przekształcają nieorganiczne związki selenu do lotnego dwuselenku dwumetylu lub selenometioniny, natomiast wolatyżacja arsenu uważana jest za mechanizm obronny u glonów morskich, zaś u roślin lądowych zachodzi głównie w korzeniach. Istotne zagrożenie dla środowiska stanowią skażenia rtęcią. Jony rtęci bardzo łatwo ulegają metylacji z udziałem bakterii i w tej postaci szybko rozprzestrzeniają się w łańcuchu pokarmowym, wywołując bardzo ciężkie zatrucia. Z dużym zainteresowaniem przyjęto zatem biotechnologiczną metodę fitoremediacji gleb skażonych rtęcią z wykorzystaniem roślin transgenicznych (50-52). W wyniku transformacji dwoma genami *MerA* z *E. coli* oraz *MerB* z *Salmonella typhimurium* uzyskano rośliny rzodkiewnika odporne na toksyczne stężenia rtęci. Obecność ko-

dowanych przez te geny enzymów liazy metylortęciowej oraz reduktazy rtęciowej umożliwia roślinom rozkład metylortęci do Hg^{2+} , a następnie jej przekształcenie do rtęci elementarnej Hg^0 (tab.). Fitoremediacja rtęci, polegająca na jej przeniesieniu z gleby do atmosfery, może się wydawać metodą kontrowersyjną, chociaż według jej autorów, w stosunku do całkowitej emisji rtęci do atmosfery ilości wydzielane przez rośliny są bardzo niewielkie, a ponadto metoda ta zapobiega tworzeniu się bardzo toksycznej metylortęci.

5.4. Ryzofiltracja

W roztworach wodnych o niewielkich stężeniach metali oraz skażonych radionuklidami dobrze sprawdza się metoda **ryzofiltracji**. Na terenach skażonych strontem i cezem wokół elektrowni atomowej w Czernobylu wyjątkowo skuteczne okazało się zastosowanie hydroponicznych kultur słonecznika (53). Do utylizacji ścieków komunalnych produkowanych przez gospodarstwa wiejskie coraz częściej zakładane są niewielkie oczyszczalnie przydomowe oparte na wybranych gatunkach wierzby, topoli, trzciny, pałki wodnej, situ oraz innych roślin typowych dla terenów podmokłych (*wetlands*).

6. Biomonitorowanie

Rośliny mogą służyć do określania stężenia metali ciężkich w glebie, powietrzu i wodzie – i to zarówno metali pochodzących ze źródeł naturalnych jak i będących wynikiem działalności człowieka. Testy oparte są najczęściej na odpowiednio dobranych roślinach, których procesy fizjologiczne są dobrze poznane w warunkach naturalnych oraz w odpowiedzi na metale ciężkie. Chodzi tutaj zarówno o takie cechy jak wzrost pędu, powierzchnia liści czy wzrost korzenia, które ulegają zmianom pod wpływem metalu, a zakres tych zmian zależy od jego stężenia w środowisku. Obok morfologicznych, dużą rolę odgrywają także zmiany fizjologiczne w aktywności niektórych enzymów, w tym głównie antyoksydacyjnych, takich jak dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydazy itp. za pomocą których można wyróżnić kilka klas fitotoksyczności gleb skażonych metalami ciężkimi (54,55).

Biotesty są bardzo przydatne i w porównaniu z metodami fizycznymi i chemicznymi stosunkowo tanie, jednakże ich dokładność nie jest zbyt duża. Niedawno opisano dwie czułe metody określania poziomu metali ciężkich oraz promieniowania radioaktywnego w środowisku. W pierwszej metodzie polega to na zastosowaniu transgenicznego rzodkiewnika, do którego wprowadzono niefunkcjonalny gen dla β -glukuronidazy (GUS), który stanowił swego rodzaju „substrat” rekombinacyjny, pozwalający wykazać rearanżacje w DNA, będące wynikiem uszkodzenia spowodowanego przez promieniowanie jonizujące (56) lub metale ciężkie (45). W drugiej

metodzie rzodkiewnik zawierał transgen dla GUS z mutacją punktową, która również czyniła go niefunkcyjnym. W obu układach nieaktywny gen pod wpływem metali ciężkich lub radioaktywności podlegał odpowiednio homologicznej rekombinacji i mutacji punktowej, co prowadziło do jego aktywacji. Stopień skażenia określano na podstawie częstości mutacji obu genów, co przejawiało się liczbą występujących barwnych plam na liściach rośliny. Zakres stężeń metali wykrywanych tą metodą był bardzo niski, gdyż już przy stężeniach kadmu od 0,001 do 0,1 mg/l obserwowano 3-5-krotny wzrost częstości mutacji, zaś w odniesieniu do promieniowania radioaktywnego w rejonie Czernobyla stwierdzono 8-krotny wzrost częstości mutacji przy dawce promieniowania 0-300 Ci/km², a powtarzalna zależność częstości mutacji występowała w zakresie 0,1-900 Ci/km².

Metoda ta okazała się niezwykle czuła zarówno w badaniach laboratoryjnych, na zdefiniowanych pożywkach, jak i w warunkach polowych na glebach zawierających mieszaninę różnych metali ciężkich. Przewyższa ona zdecydowanie dotychczas stosowane metody określania genotoksyczności metali oparte na częstotliwości aberracji chromosomowych w merystemach korzeni cebuli (57) lub tworzenia się mikrojąder (58). Wyjątkowa wartość tej metody – w porównaniu z innymi – polega również na możliwości wykazania bezpośredniego oddziaływania czynnika stresowego na DNA.

7. Uwagi końcowe

Dzięki intensywnie rozwijającym w ostatniej dekadzie badaniom coraz więcej wiadomo zarówno o skutkach oddziaływania metali ciężkich na rośliny jak i o mechanizmach, które leżą u podstaw tolerancji na te szkodliwe czynniki środowiskowe. Przyczyniły się do tego w znacznej mierze badania nad hiperakumulatorami – roślinami mającymi zdolność do akumulacji znacznej ilości metali ciężkich. Postęp był możliwy również dzięki rozwojowi badań z użyciem metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, które pozwoliły na zbadanie funkcjonowania wielu genów warunkujących odporność na metale ciężkie po ich ekspresji w roślinach transgenicznym.

Z kolei zastosowanie kultur *in vitro* umożliwiło badanie mechanizmów odporności na metale w wyselekcjonowanych liniach komórkowych z perspektywą regeneracji roślin tolerancyjnych.

Odkrycie fitochelatyn, białek i peptydów uczestniczących w wiązaniu i transporcie wewnątrz- i międzykomórkowym metali oraz wykazanie podstawowej roli systemu antyoksydacyjnego wniosło nowe impulsy do badań nad funkcjonowaniem procesów homeostazy i detoksykacji metali w roślinach.

Wprowadzie wiele już wiadomo o reakcji roślin na metale ciężkie i procesach ich detoksykacji, jednakże bardzo dużo jest niewiadomych odnośnie do podstawowych procesów, takich jak daleki transport metali w roślinie, ich organospecyficzna loka-

lizacja i utylizacja oraz komunikacja między korzeniem i pędem w przekazywaniu sygnałów stresowych.

Przyszłościowe podejścia badawcze, jak się wydaje, będą zmierzały do: a) wprowadzenia do roślin większej liczby transgenów dla odpowiednich transporterów metali oraz czynników chelatujących; b) dla metali słabo chelatowanych, a będących silnymi prooksydantami (np. Cu^{2+}) wprowadzenia do roślin genów dla białek chaperonowych oraz enzymów antyoksydacyjnych.

Wielogenowy charakter odporności roślin na metale rodzi potrzebę zastosowania metod alternatywnych takich jak krzyżowanie płciowe lub hybrydyzacja somatyczna blisko spokrewnionych hiperakumulatorów metali i roślin uprawnych.

W kraju niezbędna jest większa niż dotąd współpraca między kilkoma ośrodkami, które zajmują się badaniami nad oddziaływaniem metali ciężkich na rośliny zarówno na poziomie badań podstawowych jak i stosowanych. Istnieje pilna potrzeba uruchomienia na szerszą niż dotąd skalę, być może we współpracy z partnerami zagranicznymi, badań nad rekultywacją i fitoremediacją znacznych obszarów o dużym stopniu skażenia metalami ciężkimi. W samym tylko województwie śląskim ponad 100 000 hektarów jest silnie zanieczyszczonych i zawiera takie ilości metali, że nie nadaje się do uprawy roślin konsumpcyjnych, a nawet przemysłowych. W tym rejonie od 1996 r. we współpracy z Departamentem Energetyki USA prowadzone są intensywne badania nad fitoremediacją terenów rolniczych zanieczyszczonych metalami ciężkimi głównie ołowiem, kadmem i cynkiem (59).

Zanieczyszczenia metalami ciężkimi są szczególnie uciążliwe i groźne, gdyż mają charakter trwały, stąd nawet znaczne w ostatnim czasie ograniczenie emisji metali nie powoduje zmniejszenia ich ilości nagromadzonej w glebie przez wiele dziesięcioleci. W tej sytuacji zasadne byłoby zgłoszenie przez kilka ośrodków wspólnego projektu badawczego, finansowanego z budżetu oraz funduszy pomocowych Unii Europejskiej, przeznaczonych na ochronę środowiska, które jak dotąd wykorzystywane są w niewielkim stopniu. Istotnym etapem tego projektu byłoby zastosowanie fitoremediacji na obszarze Górnego Śląska oraz Zagłębia Miedziowego przy użyciu szybko rosnących drzew jak wierzba i topola z przeznaczeniem na tzw. zieloną energię oraz roślin oleistych takich jak rzepak, słonecznik i len z przeznaczeniem na biopaliwa.

Wstępnym warunkiem powodzenia tych projektów jest jednak koncentracja środków i ich przeznaczenie na badania podstawowe w celu określenia fizjologicznych i molekularnych podstaw odporności roślin na metale ciężkie oraz wykorzystanie tej wiedzy dla potrzeb biotechnologii środowiskowej.

Opracowanie w ramach realizacji projektu badawczego KBN nr 3PO6A01823.

Literatura

1. Stroiński A., (2002), *Biotechnologia*, 3, 124-134.
2. Woźny A., Stroiński A, Gwóźdź E. A., (1990), *Plant cell responses to cadmium*, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.

3. Gwóźdź E. A., (1996), *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*, red. Barciszewski J., Łastowski K., Twardowski T., 469-492, Wyd. Sorus, Poznań.
4. Clemens S., (2001), *Planta*, 212, 475-486.
5. Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S., Briat J. F., Walker E., (2001), *Nature*, 409, 346-349.
6. Palmgren M. G., (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 213, 534-542.
7. de la Fuente J. M., Ramírez-Rodríguez V., Cabrera-Ponce J. L., Herrera-Estrella L., (1997), *Science*, 276, 1566-1568.
8. Delhaize E., Hebb D. M., Ryan P. R., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 2059-2067.
9. Przymusiński R., Woźny A., (1985), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 180, 309-318.
10. Wierzbicka M., (1998), *Plant Sci.*, 133, 105-119.
11. Fox T. C., Guerinot M. L., (1998), *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 49, 669-696.
12. Clemens S., Antosiewicz D. M., Ward J. M., Schachtman D. P., Schroeder J. I., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12043-12048.
13. Curie C., Alonso J. M., Le Jean M., Ecker J. R., Briat J. F., (2000), *Biochem. J.*, 347, 749-755.
14. Cohen C. K., Fox T. C., Garvin D. F., Kochian L. V., (1998), *Plant Physiol.*, 116, 1063-1072.
15. Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H., (1999), *Plant J.*, 20, 171-182.
16. Sunkar R., Kaplan B., Bouché N., Arazi T., Dolev D., Talke I. N., Maathuis F. J. M., Sanders D., Bouché D., Fromm H., (2000), *Plant J.*, 24, 533-542.
17. Pence N. S., Larsen P. B., Ebbs S. D., Latham D. L., Lasat M. M., Garvin D. F., Eide D., Kochian L. V., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4956-4960.
18. Rogers E. E., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12356-12360.
19. Himelblau E., Amasino R. M., (2000), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 205-210.
20. van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E., Chardonnens A. N., Schat H., Verkleij J. A., Hooykaas P. J., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 1047-1056.
21. Fordham-Skelton A. P., Robinson N. J., Goldsbrough P. B., (1997), *Metal ions in gene regulation*, Ed. Silver, Walden, 398-430, World Composition Services, Sterling, VA.
22. Cobbett C., Goldsbrough P., (2002), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 159-182.
23. Lane B., Kajioka R., Kennedy T., (1987), *Biochem. Cell Biol.*, 65, 1001-1005.
24. Kawashima I., Kennedy T. D., Chino M., Lane B. G., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 209, 971-976.
25. Tukendorf A., (1993), *Post. Biol.*, 39, 60-67.
26. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H., (1985), *Science*, 230, 674-676.
27. Cobbett C., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 335-336.
28. Ha S-B., Smith A. P., Howden R., Dietrich W. M., Bugg S., O'Connell M. J., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S., (1999), *Plant Cell*, 11, 1153-1164.
29. Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y-P., Rea P. A., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7110-7115.
30. de Knecht J. A., Koevoets P. L. M., Verkleij J. A. C., Ernst W. H. O., (1992), *New Phytol.*, 122, 681-688.
31. Huang B., Hatch E., Goldsbrough P. B., (1987), *Plant Sci.*, 52, 211-221.
32. Gzyl J., Tukendorf A., Gwóźdź E. A., (1996), *Materiały pokonferencyjne „Ekologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych”*, red. Grzesiak S., Miszański Z., 278-286, ZFR PAN Kraków.
33. Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C., Jackson P. J., (1993), *Biochem. J.*, 295, 1-10.
34. Maiti I. B., Wagner G. J., Yeargan R., Hunt A. G., (1989), *Plant Physiol.*, 91, 1020-1024.
35. Misra S., Gedamu L., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 161-168.
36. de Borne F. D., Elmayer T., de Roton C., de Hys L., Tepfer M., (1998), *Mol. Breeding*, 4, 83-90.
37. Pan A., Yang M., Tie F., Li L., Chen Z., Ru B., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 24, 341-351.
38. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 73-79.
39. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A. S., Weber S. U., Jouanin L., Terry N., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 1169-1177.
40. Harada E., Choi Y-E., Tsuchisaka A., Obata H., Sano H., (2001), *J. Plant Physiol.*, 158, 655-661.
41. Dhankher O. P., Li Y., Rosen B. P., Shi J., Salt D., Senecoff J. F., Sashti N. A., Meagher R. B., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 1140-1145.

42. Brewer E. P., Saunders J. A., Angle J. S., Chaney R. L., McIntosh M. S., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 761-771.
43. Binsfeld P. C., Wingender R., Schnabl H., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 101, 1250-1258.
44. Schulman R. N., Salt D. E., Raskin I., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 398-404.
45. Kovalchuk O., Titov V., Hohn B., Kovalchuk I., (2001), *Nat. Biotechnol.*, 19, 568-572.
46. Wójcik M., (2000), *Kosmos*, 49, 135-147.
47. Kopyra M., (2002), *Wszechświat*, 103, 280-283.
48. Persans M. W., Yan X., Patnoe J.-M. M. L., Krämer U., Salt D. E., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 1117-1126.
49. Salt D. E., Blaylock M., Kumar N. P. B. A., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I., Raskin I., (1995), *Biotechnology*, 13, 468-474.
50. Meagher R. B., (2000), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 153-162.
51. Bizily S. P., Rugh C. L., Summers A. O., Meagher R. B., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6808-6813.
52. Bizily S. P., Rugh C. L., Meagher R. B., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 213-217.
53. Salt D. E., Smith R. D., Raskin I., (1998), *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 49, 643-668.
54. Kovács M., Podani J., (1986), *Acta Biol. Hung.*, 37, 19-29.
55. Vangronsveld J., Clijsters H., (1992), *Metal Compound in Environment and Life. Interrelation Between Chemistry and Biology*, Ed. Merian E., Haerdi W., Science and Technology Letters, Northood, UK, 117-125.
56. Kovalchuk I., Kovalchuk O., Arkhipov A., Hohn B., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 1054-1059.
57. Grant W. F., (1999), *Mutat. Res.*, 426, 107-112.
58. Rank J., Nielsen M. N., (1994), *Mutat. Res.*, 386, 263-277.
59. Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Pogrzeba M., Kryński K., Małkowski E., (1999), *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 18, 469-475.
60. Rugh C. L., Senecoff J. F., Meagher R. B., Merkle S. A., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 925-928.
61. Pilon-Smits E. A. H., Hwang S., Lytle C. M., Zhu Y., Tai J. C., Bravo R. C., Chen Y., Leustek T., Terry N., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 123-132.