



# Organizmy zmodyfikowane genetycznie w fitoremediacji związków organicznych

Agata Zemleduch, Barbara Tomaszewska  
Zakład Biochemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

## Genetically Modified Organisms in phytoremediation of organic contamination

### Summary

In order to increase remediation potential of the plants used for recultivation of contaminated environment, attempts are being made to increase their tolerance, accumulation and degradation of particular pollutants. The plants are modified by conventional methods of reproduction, hybridization, formation of interspecies hybrids, as well as by genetic modification. Owing to the introduction of foreign genes, the produced plants show increased or decreased activity of the desired metabolic pathways, higher biomass and growth, and increased activity of the enzymes limiting phytoremediation of particular xenobiotics or the presence of relatively new biochemical properties. The paper discusses the latest results of plant modification at the level of natural metabolic pathways, transgenic plants with new properties, genetic modifications of endophytes and application of immunomodulation that increases protection against xenobiotics.

**Key words:**  
phytoremediation, transgenic plants.

### Adres do korespondencji

Barbara Tomaszewska,  
Zakład Biochemii,  
Instytut Biologii  
Molekularnej  
i Biotechnologii,  
Uniwersytet  
im. Adama Mickiewicza,  
ul. Umultowska 89,  
61-614 Poznań.

---

**biotechnologia**

4 (79) 66–81 2007

## 1. Wstęp

Praktycznie od początku swojego istnienia człowiek zmieniał otaczające go środowisko, dostosowując je do swoich potrzeb. Wraz z ich wzrostem i rozwojem cywilizacji, coraz intensywniej i bardziej zauważalnie wpływał na obraz naszej planety i panującą na niej równowagę. Jednak dopiero w ciągu ostatnich 200 lat ingerencja ta stała się gwałtowna, co pociąga za sobą negatywne

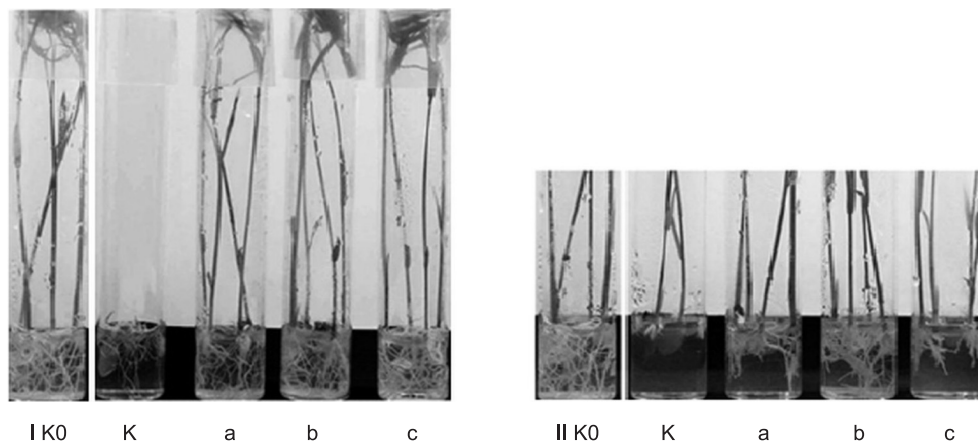
i często nie dające się do końca przewidzieć skutki. Coraz aktywniejsza działalność człowieka związana z gospodarką, przemysłem, rolnictwem itd. doprowadziła do licznych nieodwracalnych zaburzeń w środowisku. Objawiają się one jako „dziura ozonowa”, smog, „efekt cieplarniany”, zanieczyszczenie i eutrofizacja wód, erozja gleby, zmniejszająca się bioróżnorodność itp. W wielu przypadkach bezpośrednim powodem tych zmian są obce substancje chemiczne, będące wytworami człowieka. Zanieczyszczenie środowiska postępuje w wyniku jego świadomych lub mniej świadomych działań. Ścieki, odpady organiczne jak i nieorganiczne, pyły i dymy są uwalniane do otoczenia różnymi drogami, na przykład z kominów obiektów przemysłowych i elektrowni, w wyniku stosowania pestycydów, wycieków w czasie transportu i przechowywania, deponowania niebezpiecznych odpadów na dnie mórz/pod ziemią itd. Mogą one stanowić zagrożenie nie tylko w miejscach ich emisji, ale także przemieszczać się na znaczne odległości. Zarówno czynniki fizykochemiczne i biotyczne ekosystemów jak i właściwości samych substancji zanieczyszczających mogą mieć wpływ na ich rozprzestrzenianie się, dystrybucję oraz efekt wywierany na organizmy żywe. Zainteresowanie tym ostatnim, szczególnie w kontekście człowieka, stało się powszechne w ubiegłym stuleciu, kiedy równoległe z gwałtownym rozwojem przemysłu chemicznego i „zieloną rewolucją” pojawiały się liczne „sygnały ostrzegawcze”, świadczące o postępującej dewastacji środowiska. Dziś jego oczyszczanie i ochrona są jednym z najważniejszych aspektów rozwoju ludzkiej cywilizacji, gdyż staliśmy się bardziej świadomi, że jest ono niezbędne dla jej trwania.

Do tej pory technologie badawcze, dotyczące zanieczyszczenia środowiska skupiały się na wykorzystaniu roślin w biomonitoringu, indykacji czy jako markerów. Wykorzystanie podstawowych założeń procesu fitoremediacji polegało natomiast głównie na standardowych chemicznych i biochemicznych procedurach oceny fitotoksyczności, metabolizmu i trwałości związków organicznych w roślinach. Obecnie ma miejsce jakby kolejny etap w rozwoju „fitotechnologii” – kładący nacisk na optymalizację, ulepszanie aktywności i możliwości remediacyjnych poszczególnych gatunków (1). W tym celu czerpie się z wiedzy zgromadzonej w ostatnim 10-leciu na podstawie badań molekularnych roślin, a także na coraz większą skalę robi się użytek z technologii analizy transkryptomu i proteomu (1,2). Tego typu studia nad zachodzącymi podczas fitoremediacji związków organicznych procesami detoksykacji, pozwalają poznawać podstawy tego kompleksowego systemu (kontrolowanego w większości przypadków przez duże rodziny genowe) oraz mechanizmy jego regulacji. W analizach transkryptomu możliwe jest badanie wielu genów równocześnie (mikromacierze), identyfikowanie różnych grup genów, których produkty warunkują detoksykację i przemiany ksenobiotyków. Te, które w obecności zanieczyszczeń w otoczeniu rośliny wykazują znaczne różnice w ekspresji – kwalifikowane są do dalszych badań. Analiza proteomów natomiast umożliwia m.in. zlokalizowanie białek w przestrzeni subkomórkowej (1). Na podstawie danych uzyskanych tymi sposobami podejmowane są liczne próby otrzymania roślin o zwiększonym potencjale remediacyjnym. Dąży się do zwiększenia tolerancji/akumulacji/degradacji po-

szczególnych zanieczyszczeń. Można do tego doprowadzić stosując różne podejścia i metody; poprzez konwencjonalne sposoby rozmnażania, krzyżowania, tworzenie hybryd międzygatunkowych czy genetyczne modyfikowanie organizmów (1-3).

## 2.1. Modyfikacje na poziomie naturalnych roślinnych szlaków przemian

Szczególnie korzystne, jak się wydaje, jest ulepszanie roślin, u których potwierdzono już pewne zdolności i użyteczność w fitoremediacji oraz skoncentrowanie się na modulowaniu aktywności biocząsteczek mających wpływ na unieczynnianie/degradację zanieczyszczeń organicznych. Podejmowane próby otrzymania roślin o zwiększonym potencjale detoksykacji wiążą się często ze wzbogacaniem ich systemu cytochromów P450. Z szerokiej, często nakładającej się specyficzności substratowej, charakteryzującej enzymy występujące u różnych organizmów oraz z podobieństw w przebiegu metabolizmu określonych związków – wiadomo, że białka te mogą uczestniczyć w utlenianiu m.in. benzenu, trichloroetylen, chlorku winylu itd. (3,4). Wiele gatunków roślin (kukurydza, sorgo, bawełna i inne) ma zdolność przetwarzania licznych herbicydów, np. triazynowych. Wśród wyizolowanych i scharakteryzowanych cząsteczek cDNA cytochromów ulegających ekspresji, gdy roślina wystawiona jest na działanie ksenobiotyków, jest m.in. **CYP76B1** (5). Po wprowadzeniu tej sekwencji, izolowanej ze słonecznika *Helianthus tuberosus*, do tytoniu *Nicotiana tabacum* i rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* uzyskano 3-20 razy większą tolerancję na herbicydy takie jak chlortoluron, linuron i izoproturon (5). Natomiast transgeniczny tytoń z cytochromem **CYP71A10**, pochodzącym z soi *Glycine max*, był zdolny do przekształcania chlortoluronu do nietoksycznych hydroksymetylopo pochodnych (6). W przeciwieństwie do wciąż jeszcze skromnych danych molekularnych o cytochromach roślin, więcej wiadomo o ich odpowiednikach u ssaków. Na przykład ustalono, że spośród znanych ludzkich CYP450 11 z nich ma zdolność do metabolizowania około 27 różnych herbicydów, w tym dwóch grup o istotnym znaczeniu gospodarczym – chloroacetanilidów i 2,6-dinitroaniliny oraz 4 insektycydów (7). Naukowcom udało się nadać roślinom większą odporność na tego typu związki chemiczne poprzez uzupełnienie ich puli cytochromów w monooksygenazy pochodzące np. od człowieka. W przypadku transgenicznego ryżu *Oryza sativa* czy ziemniaka *Solanum tuberosum*, zawierających geny szczurzego/ludzkiego cytochromu **CYP1A1**, wielokrotnie uzyskiwano tolerancję na herbicydy takie jak: chlortoluron, mefemacet, norflurazon, atrazynę i diuron (4). Przeprowadzono doświadczenie, gdzie modyfikowany ryż okazał się zdolny do wzrostu w obecności dawek atrazyny i symazyny 1,5 razy większych niż normalnie stosowane na polu uprawnym. Po 7 dniach inkubacji z zanieczyszczeniami obserwowano zmniejszenie się ich ilości do ~36% tego, co pozostało u roślin typu dzikiego (czyli rośliny te usuwały z podłoża do 2 razy więcej herbicydów niż ryż nietransgeniczny). Akumulacja obu związków w tkankach także była na niższym poziomie niż u roślin kontrolnych. Ogólnie rzecz



Fot. 1. Tolerancja ryżu zawierającego CYP2B6 na herbicydy; zdjęcia zrobiono po 14 dniach inkubacji roślin I – z metolachlorem ( $5 \mu\text{M}$ ), II – z trifluralinem ( $15 \mu\text{M}$ ); K – rośliny kontrolne (nietransformowane), K0 – kontrola bez dodatku herbicydu, a, b, c – różne transformanty (7).

biorąc transgeneza pozwoliła na uzyskanie zwiększonego metabolizmu tych herbicydów (4). Wprowadzenie do genomu *O. sativa* innej, pochodzącej od człowieka sekwencji genowej cytochromu **CYP2B6**, umożliwiło uzyskanym roślinom tolerowanie obecności 15 z 17 analizowanych herbicydów (fot. 1). Ten jeden transgen spowodował wzrost odporności ryżu na grupę ksenobiotyków bardzo różniących się zarówno strukturalnie jak i w sposobie działania. Następował np. bardzo szybki metabolizm metolachloru i już po 3 dniach wzrostu transformowane rośliny pozostawiały w medium tylko 2% z jego ilości wyjściowej (u roślin kontrolnych zostało 26%). Każda z uzyskanych transgenicznych linii wykazywała tolerancję w zakresach  $2,5\text{-}32 \mu\text{M}$  i  $5\text{-}24 \mu\text{M}$  stężeń odpowiednio alachloru i metolachloru (gdzie drugie wartości to 4 razy tyle, ile aplikuje się w uprawach), podczas gdy rośliny bez CYP2B6 nie były zdolne do wzrostu już w warunkach podwójnych stężeń (7,8). Starsze od 2-tygodniowych do 2-miesięcznych) rośliny, przeniesione do szklarni, także wydajniej usuwały zanieczyszczenia z gleby (około 1,73 razy lepiej niż kontrolne) (8). Różne herbicydy wykazują odmienne aktywności wobec organizmu roślinnego. Przykładowo, wymieniony tu już metolachlor, będąc związkiem chloroacetanilidowym, hamuje syntezę długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych, związki takie jak atrazyna upośledzają transport elektronów w czasie fotosyntezy, norflurazon hamuje biosyntezę karotenoidów, natomiast quizalofop-etyl jest inhibitorem karboksylazy acetyloCoA (4,8,9). Idealnym rozwiązaniem problemów stwarzanych przez różnorodność i szerokie spektrum negatywnego działania herbicydów występujących w środowisku byłoby skonstruowanie rośliny posiadającej tolerancję krzyżową i zdolnej tym samym do równoczesnej i wydajnej remediacji wielu z nich. Próbę zapewnienia odporności na takie właśnie zróżnicowane ksenobiotyki podjęto w przypadku *O. sativa*. Uzyskano koekspresję 3 genów na ludzkie cytochromy **CYP1A1**, **2B6** i **2C19** (wpro-

wadzonych na jednym konstrukcie plazmidowym) (9). Wcześniej potwierdzono aktywność każdego z nich w stosunku do różnych herbicydów (CYP1A1-quizalofop-etyl i norflurazon, CYP2B6- metolachlor, CYP2C19 -norflurazon). Na podstawie wyników badań wzrostu poszczególnych transformantów w obecności różnych mieszanin tych związków wykazano, że rośliny, u których zachodziła ekspresja wszystkich 3 genów wykazywały normalny wzrost w każdych warunkach, natomiast te z pojedynczymi transgenami oraz kontrolne ginęły (9). Kolejnym ludzkim cytochromem, na który zwrócono uwagę w kontekście użycia w celu usprawnienia fitoremediacji, jest **CYP2E1** – utleniający, m.in. trichloroetylen (TCE), dibromek etylenu (EDB), tetrachlorek węgla, chloroform, chlorek winylu (25). Transgeniczny tytoń wytwarzający ten enzym miał 640 razy większy niż normalnie metabolizm TCE. Był również zdolny do bardzo wydajnej, niemal 100% detoksykacji EDB (rośliny kontrolne przekształcały tylko 63% podanego związku) (10). W przypadku cytochromów warto wspomnieć, że u transgenicznych roślin białka te, jako pochodzące z obcego źródła, efektywnie współpracują w systemach monooksygenaz z endogennymi oksydoreduktazami NADPH, które dostarczają elektrony zarówno dla sztucznie wprowadzonych jak i dla „swoich” enzymów (7,10).

Innym przykładem białek, które często stają się celem modyfikacji genetycznych są ogniwa szlaków przemian glutationu w komórkach. Mieszańcowy gatunek topoli *Populus tremula x alba* wykazujący nadekspresję bakteryjnej **syntetazy- $\gamma$ -glutamylcysteinowej ( $\gamma$ -ECS)**, okazał się bardziej odporny na herbicydy acetochlor i metolachlor niż kontrolne rośliny nietransformowane. Koniugacja z glutationem jest tutaj drogą metabolizmu tych związków, a ich obecność stymulowała ekspresję transgenu, prowadzącą do zwiększenia produkcji jego prekursorów (11). Zwiększenie biosyntezy GSH, poskutkowało też pozytywnie w przypadku gorczyca *Brassica juncea*. Tutaj badano wpływ nadekspresji genów *gshI* ( $\gamma$ -ECS) i *gshII* (**syntetazy glutationu GS**) na tolerancję roślin wobec organicznych zanieczyszczeń takich jak fenantren, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) oraz atrazyna i metolachlor (12). U transformantów zaobserwowano większą odporność na te ksenobiotyki, miały one również więcej tiolu niebiałkowego w komórkach. Większa ilość enzymów tego typu w komórkach oznacza dla roślin także lepszą obronę antyoksydacyjną. W innym eksperymencie, transformując hybrydę topoli *Populus sieboldi x grandidentata* genem **reduktazy glutationu (GR)** z *E. coli* poprawiono jej tolerancję na stresy abiotyczne (13). Katalizatorem, którego aktywność też jest związana z GSH, jest **dehydrogenaza formaldehydu (FALDH)** (14). W genomie *A. thaliana* koduje go pojedynczy gen, ulegający ekspresji konstytutywnej. Lokalizacja jego produktu jest komórkowo-specyficzna i kojarzona z tubuliną, fragmoplastem, co sugeruje rolę w podziale komórki. Potwierdzono, że zwiększona ekspresja tego genu pozwala na uzyskanie o 25% większej aktywności w eliminowaniu egzogenego formaldehydu, natomiast negatywna regulacja, np. za pomocą sekwencji antysensowych, skutkuje spowolnioną detoksykacją tego związku (14). Możliwe jest manipulowanie odpornością roślin na herbicydy poprzez modyfikację aktywności **glutationoS-transferaz**. Znany jest przykład

wprowadzenia (metodą wstrzeliwania) do *N. tabacum* genu *gstI*, izolowanego z kukurydzy *Zea mays* (15). Jego nadekspresja pozwoliła zwiększyć tolerancję tytoniu na herbicyd alachlor. Wiadomo, że GST z niektórych roślin wykazują większą niż inne specyficzność wobec określonych ksenobiotyków. Na przykład sojowa transferaza klasy tau z *Glycine max*, ma zdolność detoksykacji herbicydów typu eterów difenylowych, takich jak fomesafen czy acifluoren, w przeciwieństwie do enzymów pochodzących z *N. tabacum* (16). Jednak aby z jej pomocą uodpornić tytoń na te herbicydy nie wystarczy wprowadzenie pojedynczego transgenu pochodzącego z soi. Jest to spowodowane faktem, że GST z soi, jako rośliny strączkowej preferuje jako kosubstrat homoglutation, z którym z kolei nie oddziałują enzymy tytoniu. W tym przypadku próba nadania *N. tabacum* tolerancji na fomesafen udała się tylko po transformacji konstruktem dwugenowym – z *GmGSTU21* i *hGSH* (16).

Techniki inżynierii genetycznej mogą być także użyte w celu zmiany specyficzności substratowej enzymów odgrywających rolę w obronie roślin przed zanieczyszczeniami. W przypadku wielu z nich poznano ich molekularną budowę i określono w strukturze białka te aminokwasy, które formują domeny wiążące substraty, uczestnicząc w katalizie. Analizy konserwatywności takich reszt pozwalają wytypować te, które poprzez zamianę mogłyby się przyczynić do bardziej specyficznego oddziaływania z określonymi ksenobiotykami lub umożliwić lepszą dysocjację produktu przemiany. Przykładem takiej modyfikacji właściwości katalitycznych mogą być eksperymenty z wytworzeniem glutationoS-transferaz (typu I, klasy fi, pochodzących z kukurydzy) zmutowanych indywidualnie w 3 pozycjach aminokwasów (zamiana Trp12 na Pro/Ile, Phe35 na Leu, Ile118 na Phe), będących składnikami miejsca H, czyli miejsca wiązania ksenobiotyku (17). Otrzymane izoenzymy różniły się od enzymu typu „dzikiego” parametrami reakcji katalitycznej ( $k_{cat}$  i  $K_m$ ) w stosunku do różnych substratów. Uzyskano m.in. wyższe powinowactwo do CDNB, dzięki podstawieniu leucyny w pozycji 35 łańcucha polipeptydowego. Kolejnym przykładem enzymów, których nadekspresja mogłaby się przyczynić do zwiększenia efektywności fitoremediacji są **peroksydazy**. Ich aktywność powoduje połączenie hydroksylowanych ksenobiotyków z polimerami ścian komórkowych roślin. Pomysł enzymatycznej „utylicacji” z ich udziałem zanieczyszczeń przemysłowych opornych na degradację (jak np. fenol) napotyka jednak na ograniczenia w stosowaniu na wielką skalę ze względu na potrzebę użycia bardzo dużych ilości aktywnego białka. Rozwiązaniem może być w tym przypadku zastosowanie całych komórek/tkanek roślin, zawierających wewnątrz odpowiednią ilość enzymu (18). Inżynieria genetyczna umożliwia zarówno nadekspresję pożądanego białka i uzyskanie wystarczającej masy korzeni, gdzie będzie ono działać. Rośliną wytypowaną do eksperymentu był pomidor *Lycopersicon esculentum* ze względu na naturalnie dużą zawartość peroksydazy w korzeniach. Dokonano jego podwójnej modyfikacji; najpierw za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* wprowadzono gen *tpx1*, kodujący izoenzym peroksydazy zasadowej pomidora, po czym w celu indukowania tworzenia się korzeni włósnikowych dodatkowo transformowano go *A. rizogenes*. Z przeprowadzonych analiz wyni-



kało, że nadekspresja tego genu w opisanym systemie spowodowała 15% wzrost efektywności usuwania fenolu z roztworów wodnych (w porównaniu do korzeni pomidora typu dzikiego). Symulacje komputerowe i dalsze badania pozwolą na ewaluację uzyskanych wyników i ewentualne zastosowanie takiego modelu na skalę przemysłową do oczyszczania dużych objętości ścieków (18).

Fitoremediację *ex planta* może także stymulować nadekspresja enzymów naturalnie wydzielanych przez korzenie roślin do otoczenia. Transgeniczna *A. thaliana*, do której wprowadzono cDNA genu sekrecyjnej **lakkazy** z bawełny *Gossypium arboreum* wykazywała odporność na polichlorowane fenole i tym podobne związki (19). W porównaniu z roślinami typu dzikiego aktywność enzymu wzrosła po tym zabiegu 7-15 razy, w znacznych ilościach wykrywana była też w medium. Analiza transformacji trichlorofenolu (TCP) przez rzodkiewnik z nadekspresją genu *LAC1* pokazała 70% ubytku podanego ksenobiotyku w ciągu 12 godzin inkubacji (19).

Stres związany z ekspozycją rośliny na zanieczyszczenia organiczne bardzo często przejawia się zaburzeniami fotosyntezy. W przypadku niektórych herbicydów, np. oxyfluorfenu jest to bezpośrednim następstwem zahamowania biosyntezy chlorofilu (20). Związek ten działa na **oksydazę protoporfirynogenu (Protox, E.C.1.3.3.4.)**, która w szlaku przekształceń prowadzących do syntezy tetrapiroli jest przedostatnim enzymem przed rozgałęzieniem na wytwarzanie chlorofilu/hemu. Białka te naturalnie znajdują się w plastydach i mitochondriach. Kiedy zablokowana jest, katalizowana przez nie, konwersja protoporfirynogenu IX w protoporfirynę IX następuje „wyciekaniem” i akumulacja tego pierwszego związku w cytoplazmie. Wywołuje to powstawanie reaktywnych form tlenu i stres oksydacyjny. Dobrym sposobem na zapobieganie tym negatywnym efektem działania oxyfluorfenu okazała się nadprodukcja Protoxu w chloroplastach i mitochondriach. Dawcą genu, który miał ulegać nadekspresji, był mikroorganizm *Myxococcus xanthus*. Transformowane skrawki liści *O. sativa* były odporne nawet przy 100  $\mu\text{M}$  stężeniu herbicydu i nie wykazywały nekrozy ani produkcji wolnych rodników. Po 48 godzinach od aplikacji oxyfluorfenu na transgeniczne liście obserwowano tylko lekką chlorozę, natomiast w próbkach kontrolnych już po 18 godzinach zdolność do fotosyntezy była poważnie obniżona (20).

## 2.2. Transgeniczne rośliny o nowych właściwościach

Poza modyfikacjami prowadzącymi do zwiększenia skuteczności roślinnych sposobów detoksykacji zanieczyszczeń, znane są również raporty na temat wykorzystania zasobów genowych innych, specyficznych organizmów. Dotyczą one głównie przenoszenia do roślin genów, a co za tym idzie – aktywności katalitycznych, spotykanych dotąd jedynie u mikroorganizmów (gdyż to one wykazują największe możliwości degradacji wszelkiego rodzaju związków chemicznych, w tym także zanieczyszczeń organicznych). To podejście pozwala na efektywne połączenie zalet tych

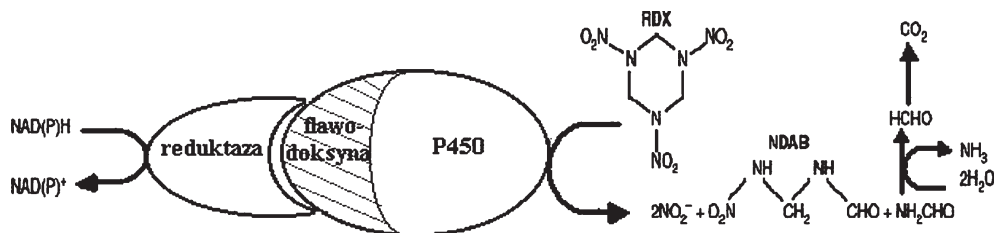
dwóch systemów remediacji biologicznej – użycie roślin, które z łatwością osiągną odpowiednią biomasę i wyposażenie ich w enzymy bakteryjne, umożliwiające metabolizm związków, z których rozkładem do tej pory sobie nie radziły.

Z myślą o oczyszczaniu gruntów z substancji wybuchowych, stworzono m.in. *N. tabacum* zawierający gen **reduktazy PETN**, pochodzącym z glebowej bakterii *Enterobacter cloace*. Ten NADPH-zależny enzym pozwala mikroorganizmowi wykorzystywać jako źródło azotu związki takie jak estry nitrowe, tetraazotan pentaerytrytu (PETN), triazotan glicerolu (GTN) (21). Po transformacji tytoniu genem *onr* uzyskano ekspresję aktywnego enzymu, który stanowił około 0,2% wszystkich rozpuszczalnych białek komórki. Nasiona otrzymane z transgenicznych roślin normalnie kiełkowały w obecności 1 mM GTN czy 0,05 mM TNT (2,4,6-trinitrotoluen), natomiast bez transgeny nie były zdolne do rozwoju w takich warunkach. U siewek wykazujących aktywność reduktazy PETN obserwowano również bardziej gwałtowny metabolizm GTN oraz powstawanie mniejszej ilości toksycznych dla wzrostu roślin produktów przemian trinitrotolenu (21). Inną konstrukcją potencjalnie użyteczną w fitoremediacji TNT jest roślina zawierająca bakteryjną **nitroreduktazę** (22). Enzym ten katalizuje jego NAD(P)H-zależną, 2-elektronową redukcję do hydroksyaminodinitrotolenu (HADNT).

W przypadku *N. tabacum* transformacja genem *nfsI* (z *Enterobacter cloace*) pozwoliła na tolerancję i osiągnięcie lepszego wzrostu nawet przy stężeniach dochodzących do granicy rozpuszczalności TNT w wodzie (~0,25 mM). Oba typy roślin i dzikie, i transgeniczne były zdolne do usuwania TNT z podłoża, jednak o wiele szybciej robiły to formy zawierające bakteryjny enzym. Na przykład z 0,1 mM stężenia TNT: w ciągu 6 godzin ubyło 71% podanego związku, podczas gdy próby kontrolne zdołały usunąć 78% w ciągu 168 godzin trwania całego eksperymentu (22). Konkurencyjną w stosunku do wspomnianej próby przeprowadzono, wprowadzając do *A. thaliana* gen nitroreduktazy (*nfsA*) z *E. coli* (23). Otrzymane rośliny pobierały TNT w ilości 20 µM/dzień/g świeżej masy, czyli z szybkością 16-krotnie większą niż transgeniczny tytoń z genem *E. cloace*.

Substancją wybuchową współwystępującą najczęściej z TNT i HMX (1,3,5,7-tetra-1,3,5,7-tetraazacyklooktan), a której rozkład stanowi dla roślin największy problem, jest RDX (1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacykloheksan). Nie ustają starania znalezienia lub skonstruowania organizmu, który byłby zdolny do efektywnej remediacji tego związku. Ostatnim odkryciem naukowców w tej kwestii jest niezwykle białko, izolowane z wielu mikroorganizmów – zasiedlających glebę skażoną RDX w różnych miejscach na świecie (Australia, Izrael) (24). Enzym ten pozwala bakteriom, takim jak np. *Rhodococcus rhodochrous* na beztlenową, NADPH-zależną, związaną z rozzerwaniem pierścienia degradację RDX do 4-nitro-2,4-diazabutanalu, formaldehydu i azotynu (rys. 1). Zdiagnozowano go jako **cytochrom**, jednak charakteryzuje się on strukturą, jakiej nigdy wcześniej nie opisano. Produkt genu *xplA*, wyizolowanego z tego mikroorganizmu to białko fuzyjne; C-terminalny koniec sekwencji aminokwasowej to CYP450, a na N-końcu znajduje się flawodoksyna (połączona z kofaktorem

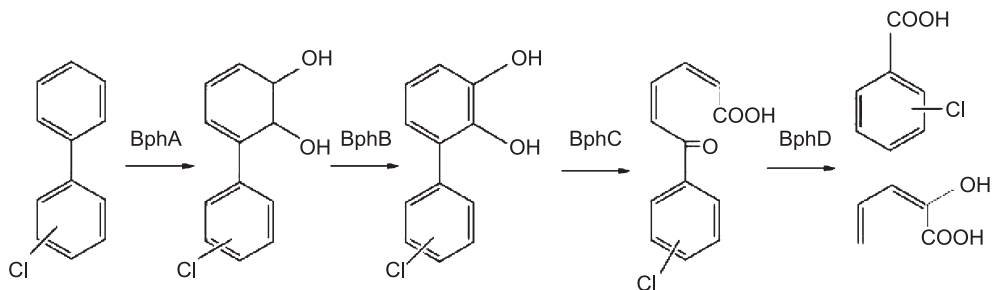




Rys. 1. Schemat proponowanej drogi rozkładu RDX (25).

flawinowym) (rys. 1) (25). Obie domeny współdziałają ze sobą w procesie katalitycznym. Zbędna jest oddzielna cząsteczka ferredoksyny, gdyż odpowiadająca jej część białka jest aktywna i zdolna do przekazywania elektronów z reduktazy ferredoksynowej na hem (24). Odmienny od znanego modelu sposób działania tego cytochromu przejawia się również wyraźnie w tym, że zbędny, a nawet szkodliwy jest tutaj tlen. Pozycję tlenu w 6. pozycji koordynacyjnej hemu, w czasie reakcji zajmuje RDX. Potencjał wykorzystania tego intrygującego odkrycia w fitoremediacji analizowano wprowadzając gen *xplA* do *A. thaliana*. Transgeniczne rośliny nie wykazywały oznak toksyczności nawet w obecności 2 mg RDX/kg ziemi, co więcej – uzyskiwały w tych warunkach do 3 razy większą biomasę niż wzrastające na nie zanieczyszczonej glebie rośliny kontrolne (nietransformowane). Przypisano to możliwości przyswajania azotu z pobieranego i rozkładanego związku. Najlepszy wynik w badaniu wydajności usuwania zanieczyszczeń z roztworów przez transgeniczny rzodkiewnik to zniknięcie 100% ze 180 μM RDX po 5 dniach hodowli. Nie wykryto przy tym w roślinach żadnych produktów jego przemian. Postuluje się zatem, że stały się one substratami naturalnie występujących enzymów: dehydrogenazy formaldehydu i reduktazy azotynu (24).

Inżynieria genetyczna umożliwi również postęp i stwarza nowe możliwości w remediacji bifenyli. Związki te są wyjątkowo odporne na degradację przez rośliny. Możliwe jest jedynie utlenianie polichlorowanych bifenyli (PCB) (np. przez systemy monoooksygenaz) do hydroksybifenyli/chlorohydroksybifenyli itp., podstawionych w pozycji *orto*-hydroksy-metabolitów. Z kolei u bakterii obecnych w ryzosferze obserwuje się zdolność do tlenowej degradacji tego typu zanieczyszczeń, łącznie z zerwaniem połączenia grup fenylowych i wytworzeniem jako produktu końcowego między innymi kwasu chlorobenzoesowego (rys. 2) (26). Potwierdzono, że organizmy te, współwystępując w środowisku, udostępniają sobie wzajemnie metabolity przez siebie wytwarzane. Udowodniono eksperymentalnie, że enzymy izolowane np. ze szczepów *Comamonas testosteroni* i *Burkholderia* sp. mogą katalizować dalsze przemiany pochodnych PCB wyprodukowanych przez rośliny. Powstawały przy tym wyłącznie związki hydroksylowane przy nie podstawionym pierścieniu (taki model reakcji określa się jako *orto-meta*-oksygenacja). Stwierdzenie możliwości takiego współdziałania jest bardzo ważne w kontekście konstruowania roślin transgenicz-



Rys. 2. Szlak metabolizmu PCB u bakterii; BphA – 2,3-bifenylodihydroksygenaza (bphAEFG), BphB – bifenylodihydrodioldehydrogenaza, BphC – 2,3-dihydroksybifenilo-1,2-dioxygenaza, BphD – hydrolaza (27).

nych, zawierających enzymy bakteryjnego szlaku katabolizmu PCB. Białka uczestniczące w tym procesie zostały scharakteryzowane i opisane jako kompleks bifenylodihydroksygenazy (BPDO), którego produkty reakcji są następnie przetwarzane przez odpowiednią dehydrogenazę, dioxygenazę i hydrolazę. Poznano również kodujące je geny są to odpowiednio *bph A, E, F, G* oraz *B, C i D* (rys. 2) (26). Za enzym, w który szczególnie warto wzbogacić rośliny w celu fitoremediacji PCB, uznano **2,3-dihydroksybifenilo-1,2-dioxygenazę** (produkt genu *bphC*), która katalizuje rozerwanie dwóch pierścieni fenylowych (27). Transformacja *N. tabacum* genem, pochodzącym z *Pseudomonas testosteroni* umożliwiła zregenerowanym roślinom lepszy wzrost i kiełkowanie otrzymanych z nich nasion w obecności 150-250 ppm PCB (28).

Innym bakteryjnym enzymem, przydatnym w fitoremediacji jest **dioxygenaza chlorokatecholu** (29). Jest to produkt jednego z genów, znajdujących się na plazmidzie *Ralstonia eutropha* umożliwiających temu mikroorganizmowi używanie różnych związków chloroaromatycznych jako źródeł węgla. *O. sativa* zawierający odpowiedni za to transgen *cbnA*, zdegradował całość podanego mu do pożywki 3-chlorokatecholu. Rośliny wykazujące aktywność dezintegracji pierścienia aromatycznego mogą być stosowane przy usuwaniu różnych pestycydów czy rozpuszczalników (29).

Interesującym rozwiązaniem, jak się wydaje, są transgeniczne rośliny wydzielające do apoplastu enzymy pochodzenia bakteryjnego (30,31). Do sprawdzenia działania takiego systemu wybrano *A. thaliana* i *N. tabacum*, do których wprowadzono odpowiednio geny *DbfB* i *DhaA*. Pierwszy z nich koduje **dioxygenazę**, która odpowiada za rozerwanie pierścienia w drugim etapie degradacji dibenzofuranu u *Terrabacter* sp. Enzym odpowiadający genowi *DhaA*, izolowanemu z *Rhodococcus* sp., to **dehalogenaza**, biorąca udział w przekształcaniu krótkich halogenoalkanów do alkoholi (31). Użycie roślinnego sygnału kierującego białka do sekrecji poza komórkę pozwoliło uzyskać odpowiednie umiejscowienie obu wprowadzanych enzymów. W przypadku dehalogenazy wykryto większą aktywność tego ulokowanego (dla porównania) w cytoplazmie. Obserwowano przemieszczanie się jej substratu – 1-chlorobutanu i produktu – 1-butanolu, między komórkami korzeni *A. thaliana* i medium. Z kolei diok-

sygenaza skierowana do apoplastu powodowała 11,9 razy szybsze przemiany 2,3-DHB niż ta cytoplasmatyczna. Otrzymane wyniki wskazują na to, że system z aktywnością zewnątrzkomórkową jest najbardziej odpowiedni w przypadku degradacji hydrofobowych zanieczyszczeń, które są słabo pobierane przez rośliny (31). Dodatkowym argumentem przemawiającym na korzyść takiego rozwiązania jest niwelowanie wpływu ewentualnych toksycznych metabolitów pośrednich, produkowanych w czasie detoksykacji wewnątrz komórek. Chcąc w ten sposób zwiększyć odporność roślin na zanieczyszczenia należy wziąć pod uwagę możliwość obniżenia aktywności katalitycznej enzymów w medium, do którego są wydzielane, a gdzie warunki (pH itd.) mogą odbiegać od optimum ich działania. Trzeba również rozważyć budowę białka, tj. obecność podjednostek oraz niezbędnych kofaktorów itp. (31).

Problemy te mają mniejsze znaczenie gdy naturalnym przeznaczeniem produkowanego przez roślinę, heterologicznego enzymu jest jego wydzielenie na zewnątrz komórki. Tak jest w przypadku **lakkazyIII**, wytwarzanej przez grzyb *Coriolus versicolor* (30). Gdy cDNA genu *cvL3* wprowadzono do *N. tabacum*, uzyskane transgeniczne rośliny mogły, podczas kultury hydroponicznej, efektywniej usuwać takie związki jak PCB i bisfenola (30).

Mikroorganizmy są także źródłem genów warunkujących zdolność do degradacji pestycydów. Znane są liczne transgeniczne rośliny z odpornością na herbicydy, jednak tylko niektóre wykorzystuje się w celu oczyszczania środowiska (32). Szczepy różnych bakterii glebowych, np. *Pseudomonas* sp., zawierają na plazmidach gen *atzA*, którego produktem jest **chlorohydrolaza**. Może ona katalizować rozkład takich związków jak atrazyna, aimazyna, terbutylazyna, do nietoksycznych, nie będących herbicydami i łatwiej biodegradowalnych pochodnych. Lucerna *Medicago sativa*, *A. thaliana* i *N. tabacum*, transformowane zmodyfikowanym genem *atzA* były zdolne do wzrostu przy stężeniach atrazyny 50-krotnie przekraczających dawki śmiertelne dla roślin kontrolnych (32).

Inne geny warunkujące odporność na herbicydy i badane pod kątem przydatności w fitoremediacji poprzez wprowadzenie do genomów różnych gatunków topoli, to np. *aroA* (z *Salmonella typhimurium*, zwiększa tolerancję na glifosat) i *bar* – kodujący **acetylotransferazę fosfinotricyny** (ze *Streptomyces hygroscopus*, na herbicyd Basta) (13).

Tabela

Przykłady wykonanych dotąd modyfikacji roślin w celu ich wykorzystania do fitoremediacji zanieczyszczeń organicznych

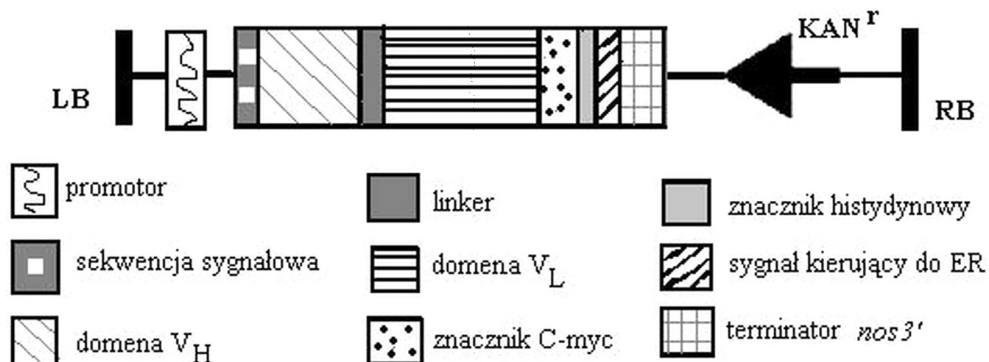
Gen / produkt	Źródło genu	Roślina docelowa	Uzyskana tolerancja	Literatura
1	2	3	4	5
<b>CYP1A1</b>	człowiek/szczur	<i>Oryza sativa</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	chlortoluron, mefenacet, norflurazon, atrazyna itd.	(4)
<b>CYP76B1</b>	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	chlortoluron, linuron, izo- proturon	(5)

1	2	3	4	5
<b>CYP2B6</b>	człowiek	<i>O. sativa</i>	metolachlor, alachlor, trifluralin, pyributikarb	(7)
<b>CYP71A10</b>	<i>Glycine max</i>	<i>N. tabacum</i>	chlortoluron	(6)
<b>CYP2E1</b>	człowiek	<i>N. tabacum</i>	TCE, EDB	(10)
<b>gsbI</b> ( $\gamma$ -ECS), <b>gsbII</b> (syntetaza glutationu)	<i>E. coli</i>	<i>Brassica juncea</i>	fenantren, CDNB, atrazyna, metolachlor	(12)
<b>GR</b> (reduktaza glutationu)	<i>E. coli</i>	<i>P. sieboldii</i> x <i>grandidentata</i>	tolerancja na stres abiotyczny, oksydacyjny	(13)
<b>gstI</b>	<i>Zea mays</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	alachlor	(15)
<b>GmGSTU21, hGSH</b>	<i>Glycine max</i>	<i>N. tabacum</i>	fomesafen	(16)
<b>tpx1</b> (peroksydaza)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>L. esculentum</i>	fenol	(18)
<b>LAC1</b> (lakkaza)	<i>Gossypium arboreum</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TCP	(19)
<b>xplA</b> (CYP450)	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>A. thaliana</i>	RDX	(24)
<b>pbbC</b> (dioksygenaza dihydroksybifenylu)	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	<i>N. tabacum</i>	PCB	(26-28)
<b>DbfB</b> (dioksygenaza)	<i>Terrabacter</i> sp.	<i>A. thaliana</i>	dihydroksybifenyle	(31)
<b>DbaA</b> (dehalogenaza)	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>N. tabacum</i>	halogenoalkany	(31)
<b>atzA</b> (chlorohydrolaza)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Medicago sativa</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	atrazyna	(32)
<b>bar</b> (acetylotransferaza fosfinotricyny)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>P. tremula</i> x <i>alba</i> , <i>P. trichocarpa</i> x <i>deltoids</i>	herbicyd Basta	(13)
<b>aroA</b> (syntaza EPSP)	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>P. alba</i> x <i>grandidentata</i>	glifosat	(13)
<b>cvL3</b> (lakkaza)	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	PCP, bifenyliA	(30)

Przykłady uzupełniające cytowane w pracy Wójcika i Tomaszewskiej z 2005 r. (3).

### 2.3. Immunomodulacja

Podejście, w którym zmiana tolerancji rośliny na ksenobiotyk wymaga zidentyfikowania miejsca jego działania, a następnie modyfikacji tego miejsca lub drogi detoksykacji danego związku, jest pracochłonne i długotrwałe. Alternatywą może być immunomodulacja (33). Zastosowanie specyficznych przeciwciał, których sekwencje genowe znajdują się w bibliotekach, pozwala uodpornić roślinę na nieograniczoną ilość różnorodnych antygenów. Ich ekspresja w komórkach mogłaby wspomóc fitoremediację, zapewniając pobieranie z otoczenia i sekwestrację małych (<1000 Da) ksenobiotyków. Znany jest przykład produkcji fragmentu zmodyfikowanego przeciwciała scFv w tytoniu. Charakteryzuje się ono specyficznym powinowactwem do auksynopodobnego herbicydu-picloramu. W eksperymencie potwierdzono, że fragment ten nie wiąże się do związków chemicznych o podobnej strukturze ani do endogennych auksyn (rośliny transgeniczne i kontrolne w nieobecności picloramu były identyczne fenotypowo) (33). Po transformacji *N. tabacum* konstruktem zawiera-



Rys. 3. Schemat T-DNA kodującego przeciwciało scFv – specyficzne dla picloramu; wyróżniono poszczególne części konstrukt (33).

jącym sekwencje genowe fragmentów zmiennych długiego i krótkiego łańcucha tego przeciwciała (rys. 3), uzyskano nawet 2,5 razy większą niż u roślin dzikich, zależną od dawki, ochronę przed herbicydem. Ten typ transgeniczny osiągnął wzrost lepszy również od kontroli zawierającej przeciwciało niespecyficzne w stosunku do picloramu. Sugeruje się zastosowanie takiego podejścia przy usuwaniu odpornych na degradację związków; PCB, PCP (polichlorowane fenole) itp., zwłaszcza w kontekście przewidywanego rozwoju w dziedzinie przeciwciał katalitycznych (33).

### 3. Modyfikacje genetyczne endofitów

Inżynieria genetyczna może służyć fitoremediacji również poprzez poszerzenie możliwości współpracy roślin i ich wewnętrznych symbiontów. Wyposażenie endofitów w systemy enzymatycznej degradacji ksenobiotyków pozwoliłyby zmniejszyć stres rośliny oraz zwiększyć efektywność detoksykacji. W przypadku eksperymentu z łubinem *Lupinus luteus* i związanymi z nim szczepów *Burkholderia cepacia* wykorzystano fakt, że bakterie glebowe, występujące na powierzchni korzeni, mają geny odpowiedzialne za zdolność do degradacji toluenu, zlokalizowane na plazmidzie (pTOM) (34,35). Koniugacja tych mikroorganizmów z ich krewniakami żyjącymi wewnątrz tkanek roślinnych, a nie zdolnymi do metabolizmu tego związku, pozwoliła na przekazanie im tej podstawowej cząsteczki DNA. Inokulacja łubinu tak zmienionym szczepem endofitycznym, zapewniła mu tolerowanie nawet 1000 mg toluenu/l pożywki, podczas gdy fitotoksyczność w stosunku do roślin kontrolnych objawiała się już przy stężeniu 100 mg/l. Dzięki tej kooperacji w rozkładzie zanieczyszczenia mniejsze jego ilości są uwalniane do atmosfery z górnych części roślin (w porównaniu z *L. luteus* współpracującym z glebowym szczepem *B. cepacia* degradującym toluen – ewapotranspiracja była o 50-70% mniejsza) (34).

To podejście ma duże zalety, m.in. ze względu na to, że w wielu krajach transkoniugaty uzyskane za pomocą naturalnie występujących dawców, biorców i plazmidów, nie są uważane za organizmy zmodyfikowane genetycznie i nie powinny wzbudzać zastrzeżeń i protestów opinii publicznej. Poza tym manipulowanie genetyczne bakterii jest łatwiejsze niż roślin. Przy odpowiednim podejściu/wyborze szczepu można uniemożliwić zmienionemu mikroorganizmowi przeżycie poza gospodarzem (co dodatkowo zapobiegnie rozprzestrzenieniu się transgenu w środowisku) (36). Jednocześnie jest kilka aspektów, które wymagają dokładnej analizy przed zastosowaniem tej obiecującej metody w inżynierii środowiska (37). Pierwszy z nich to stabilność i trwałość w czasie zdolności degradowania w populacji endofitów i ich utrzymanie, mimo ewentualnej przeciwnej presji selekcyjnej, na przykład w czasie wzrostu rośliny gospodarza (choćby topoli, której korzenie wrastają w glebę, docierając dopiero po pewnym czasie do poziomu wody gruntowej, zawierającej zanieczyszczenia). Nie ma gwarancji, że inokulowana bakteria stanie się integralną częścią populacji endofitów, m.in. horyzontalny transfer genów pozwoli na rozprzestrzenienie się pożądanej cechy, ani że wprowadzony mikroorganizm nie zostanie wyparty przez inny, lepiej przystosowany do lokalnych warunków. Kolejnym problemem jest efekt jaki może wywierać na gospodarza aktywność zmodyfikowanego symbionta. Zmiana czy uzupełnienie metabolizmu jest tu celem, jednak powinno się unikać wytwarzania i akumulacji toksycznych produktów pośrednich. Ich uwalnianie do środowiska nie byłoby także pożądane (37).

#### 4. Podsumowanie

W nadchodzących latach rozwoju nowoczesnych technologii i poznawania całych sekwencji genomów coraz większej liczby gatunków roślin prawdopodobnie będziemy zdolni identyfikować kolejne, nowe geny, ważne przy usuwaniu zanieczyszczeń, łącznie z białkami regulatorowymi (np. czynnikami transkrypcyjnymi) itp. Manipulowanie ekspresją takich genów w gatunkach o dużej biomasie mogłoby być bardzo użyteczne i korzystnie wpłynąć na fitoremediację (2). Na obecnym etapie konieczne jest skupienie się na problemach dotyczących samego procesu modyfikacji genetycznych oraz stabilności transgenów w środowisku. Wiadomo np., że ze względu na różnice pomiędzy roślinami jedno- i dwuliściennymi (np. w zawartości par GC w sekwencjach) nie wszystkie geny można przenieść do każdej z nich (29). Często trudno jest również uzyskać odpowiednią liczbę insertów w genomie docelowym, stabilną ekspresję czy aktywne produkty białkowe. Trzeba brać pod uwagę przypadkowe wyciszenie lub wycięcie itp. innych genów i w związku z tym zmiany w rozwoju organizmu modyfikowanego. Z kolei fakt dziedziczenia transgenów stwarza potrzebę kontroli zachowania się transformantów wprowadzanych do ekosystemów (13). Obecność obcego konstruktów określa się różnymi metodami, badając geny markerowe. Główne obawy w przypadku fitoremediacji budzi rozmna-



żanie się roślin GM i ich krzyżowanie z innymi gatunkami. Zastępuje ono w jakimś stopniu obawy społeczeństwa o zdrowie, związane ze spożywaniem genetycznie zmodyfikowanych produktów. W przypadku fitoremediacji, stosowane tu rośliny nie są przecież wykorzystywane do produkcji żywności (38). Zagrożenie niekontrolowanego rozprzestrzenienia się roślin GM w środowisku można ponadto zminimalizować różnymi sposobami. Niektóre podejścia polegają np. po 1: na wykorzystywaniu w oczyszczaniu środowiska roślin GM bezpłodnych (po zredukowaniu rozwoju kwiatów poprzez tkankowospecyficzną ekspresję genu *barnazy* z *Bacillus amiloliquefaciens*, na zewnątrzkomórkową rybonukleazę lub wytwarzanie innych substancji cytotoksycznych uszkadzających komórki generatywne, takich jak podjednostka A zewnątrzkomórkowej toksyny DTA, czy wyciszenie lub mutowanie odpowiednich genów itp.), po 2: na stosowaniu w fitoremediacji tylko osobników żeńskich, które nie produkują i nie rozprzestrzeniają pyłku, po 3: na regulowaniu okresu kwitnienia (np. hormonami) roślin GM w stosunku do dzikich, mogących być potencjalnymi biorcami transgenów, po 4: na wprowadzaniu modyfikacji w genomie chloroplastowym, co również wyklucza ryzyko przeniesienia genów wraz z pyłkiem, itd. (2,13, 38). Przedostawaniu się zanieczyszczeń zakumulowanych w organach roślin dalej do łańcucha troficznego można z kolei zapobiegać wykorzystując naturalnie produkowane w przyrodzie substancje odstrasżające roślinożerców (39). Transgeniczne rośliny stosowane w remediacji oznaczają możliwość wielkiego postępu i przyspieszenia oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń, nie tylko organicznych. Wszystkie enzymy niezbędne do ich degradacji mogłyby być zgrupowane w jednej roślinie, w wyniku transformacji multigenowej, co umożliwiłoby efektywną remediację, nawet obszarów skażonych wieloma różnymi związkami chemicznymi. Dla badaczy próbujących jak dotąd wprowadzić rośliny zmodyfikowane genetycznie do powszechnego zastosowania w fitoremediacji, w większości przypadków jedyną przeszkodą nie do pokonania, jak się okazuje, jest polityka i ustawodawstwo (25,38).

Praca finansowana z grantu KBN 2P04G06926.

## Literatura

1. Coleman J. O. D., Haslam R. P., Downie A. L., (2005), Zeitschrift für Naturforschung, 60C, 544-548.
2. Pilon-Smits E., (2005), Annual Reviews of Plant Biology, 56,15-39.
3. Wójcik P., Tomaszewska B., (2005), Biotechnologia, 4, 71, 158-173.
4. Kawahigashi H., Hirose S., Ohkawa H., Ohkawa Y., (2005), J. Agric. Food Chem., 53, 8557-8564.
5. Didierjean L., Gondet L., Perkins R., Lau S-M. C., Schaller H., O'Keefe D. P., Werck-Reichhart D., (2002), Plant Physiology, 130, 179-189.
6. Komives T., Gullner G., (2005), Z. Naturforsch., 60C, 179-185.
7. Hirose S., Kawahigashi H., Ozawa K., Shiota N., Inui H., Ohkawa H., Ohkawa Y., (2005), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 3461-3467.
8. Kawahigashi H., Hirose S., Ohkawa H., Ohkawa Y., (2005), J. Agric. Food Chem., 53, 9155-9160.
9. Kawahigashi H., Hirose S., Inui H., Ohkawa H., Ohkawa Y., (2005), Plant Science, 168, 773-781.

10. Doty S. L., Shang T. Q., Wilson A. M., Tangen J., Westergreen A. D., Newman L. A., Strand S. E., Gordon M. P., (2000), *PNAS*, 97, 12, 6287-6291.
11. Gullner G., Kömives T., Rennenberg H., (2001), *Journal of Experimental Botany*, 52, 971-979.
12. Flocco C. G., Lindblom S. D., Pilon Smits E. A. H., (2004), *International Journal of Phytoremediation*, 6, 4, 289-304.
13. Confalonieri M., Balestrazzi A., Bisoffi S., Carbonera D., (2003), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 109-138.
14. [www.biomedcentral.com/1471-2229/5/S1/S22](http://www.biomedcentral.com/1471-2229/5/S1/S22)
15. Karavangeli M., Labrou N. E., Clonis Y. D., Tsaftaris A., (2005), *Biomolecular Engineering*, 22, 4, 121-128.
16. Skipsey M., Cummins I., Andrews C. J., Jepson I., Edwards R., (2005), *Plant Biotechnology Journal*, 3, 409-420.
17. Labrou N. E., Kotzia G. A., Clonis Y. D., (2004), *Protein Engineering, Design & Selection*, 17, 10, 741-748.
18. Wevar Oller A. L., Agostini E., Talano M. A., Capozucca C., Milrad S. R., Tigier H. A., Medina M. I., (2005), *Plant Science*, 169, 1102-1111.
19. Wang G-D., Li Q-J., Luo B., Chen X-Y., (2004), *Nature Biotechnology*, 22, 893-897.
20. Jung S., Back K., (2005), *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 423-430.
21. French C. E., Rosser S. J., Davies G. J., Nicklin S., Bruce N. C., (1999), *Nature Biotechnology*, 17, 491-428.
22. Hannink N., Rosser S. J., French C. E., Basran A., Murray J. A. H., Nicklin S., Bruce N. C., (2001), *Nature Biotech.*, 19, 1168-1172.
23. Kurumata M., Takahashi M., Sakamoto A., Ramos J. L., Nepovim A., Vanek T., Hirata T., Morikawa H., (2005), *Z. Naturforsch.*, 60C, 272-278.
24. Rylott E. L., Jackson R. G., Edwards J., Womack G. L., Seth-Smith H. M. B., Rathbone D. A., Strand S. E., Bruce N. C., (2006), *Nature Biotechnology*, 24, 2, 216-219.
25. Meagher R. B., (2006), *Nature Biotechnology*, 24, 2, 161-163.
26. Francova K., Mackova M., Macek T., Sylvestre M., (2004), *Environmental Pollution*, 127, 41-48.
27. [www.prague2003.fsu.edu/content/pdf/319.pdf](http://www.prague2003.fsu.edu/content/pdf/319.pdf)
28. [www.bratislava2005.lsu.edu/docs/presentations/Macek\\_Mackova\\_NATO%20Blava%](http://www.bratislava2005.lsu.edu/docs/presentations/Macek_Mackova_NATO%20Blava%20)
29. Shimizu M., Kimura T., Koyama T., Suzuki K., Ogawa N., Miyashita K., Sakka K., Ohmiya K., (2002), *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8, 4061-4066.
30. Sonoki T., Kajita S., Ikeda S., Uesugi M., Tatsumi K., Katayama Y., Iimura Y., (2005), *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 138-142.
31. Uchida E., Ouchi T., Suzuki Y., Yoshida T., Habe H., Yamaguchi I., Omori T., Nojiri H., (2005), *Environ. Sci. & Technol.*, 39, 7671-7677.
32. Wang L., Samac D. A., Shapir N., Wackett L. P., Vance C. P., Olszewski N. E., Sadowsky M. J., (2005), *Plant Biotechnology Journal*, 3, 475-486.
33. Almquist K. C., Niu Y., McLean M. D., Mena F. L., Yau K. Y. F., Brown K., Brandle J. E., Christopher Hall J. C., (2004), *Plant Biotechnology Journal*, 2, 189-197.
34. Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J. V., Vangronsveld J., van der Lelie D., (2004), *Nature Biotechnology*, 22, 583-588.
35. Glick B. R., (2004), *Nature Biotechnology*, 22, 5, 526-527.
36. Newman L. A., Reynolds C. R., (2005), *Trends in Biotechnology*, 23, 1, 6-8.
37. van der Lelie D., Barac T., Taghavi S., Vangronsveld J., (2005), *Trends in biotechnology*, 23, 8-9.
38. Peuke A. D., Rennenberg H., (2005), *EMBO Reports*, 6, 6, 497-501.
39. Cherian S., Oliveira M. M., (2005), *Environ. Sci. & Technol.*, 39, 9377-9390.