



Transformowanie roślin w celu ich wykorzystania w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi

Konrad Wasinkiewicz, Joanna Wojtera, Barbara Tomaszewska
Zakład Biochemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Plant transformation for phytoremediation of heavy metals polluted soils

Summary

Extensive contamination of the environment caused by heavy metals is one of the many consequences of fast industrial development and civilizational progress which started in the previous century and is still underway. Traditional methods of removing heavy metals from the environment are very expensive and invasive, therefore new and cheap methods are needed. High hopes are put on the possibility of using plants in the process called phytoremediation. Some plants have naturally adapted to life on soils with high heavy metal content. The use of modern methods of molecular biology can be very helpful in obtaining transgenic plants that would be able to take up and accumulate high amounts of heavy metals.

Key words:

heavy metals, transgenic plants, phytochelatins, metallotioneins.

Adres do korespondencji

Konrad Wasinkiewicz,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Fredry 10,
61-701 Poznań.

biotechnologia

1 (64) 108-126 2004

1. Wstęp

Wiek XX przyniósł nam niezwykle dynamiczny rozwój w wielu obszarach życia, szczególnie w dziedzinie nauki, co dało m.in. efekt w postaci globalnego uprzemysłowienia. Niestety, oprócz niezwyklej osiągnięć, dokonaliśmy w minionych dziesięcioleciach również „niezwykłej”, jak na dotychczasowy dorobek *Homo sapiens*, dewastacji środowiska na Ziemi. Przyczyniły się do

tęgo: szybki rozwój gospodarczy, postęp cywilizacyjny, rozwój nowych technologii i transportu samochodowego. Wiele obszarów z okolic dużych aglomeracji i ośrodków przemysłowych nie może być wykorzystanych w celach rolniczych lub rekreacyjnych ze względu na zanieczyszczenie powietrza, wód i gleb m.in. metalami ciężkimi takimi jak: Cd, Pb, Cu, Zn, Co, Ni, Hg i inne. Podczas gdy zapobieganie uwalnianiu toksycznych związków do otoczenia powinno być naszym głównym celem, zanieczyszczenie środowiska naturalnego spowodowane przez działalność człowieka wciąż postępuje. Duże nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania roślin do oczyszczania środowiska w procesie zwanym fitoremediacją. Wiele roślin naturalnie przystosowało się do wzrostu w warunkach podwyższonego stężenia metali ciężkich w środowisku. Te nazywamy metalofitami. Wytworzyły one różne mechanizmy adaptacyjne do wzrostu w środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Mechanizmy te polegają m.in. na wydzielaniu przez korzenie nadmiaru pobranych jonów, unieruchamianiu metali w ścianach komórkowych lub wakuolach, wiązaniu toksycznych jonów metali ciężkich w nietoksyczne kompleksy ze składnikami chemicznymi komórek. Najpowszechniejszą formą detoksykacji jonów metali ciężkich u roślin jest ich wiązanie z białkami i peptydami o charakterze metaloprotein, podobnych do tych, które wcześniej wykryto u zwierząt. W latach osiemdziesiątych intensywnie badano mechanizmy detoksykacji jonów metali ciężkich i dokonano wiele obiecujących odkryć.

Poza tym w środowisku naturalnym występuje dość duża liczba (opisano ok. 400 gatunków) roślin ewolucyjnie przystosowanych do wzrostu na obszarach o podwyższonym stężeniu jonów metali ciężkich, zdolnych do ich hiperakumulacji. Organizmy te wykazują wysoką tolerancję na metale, tzn. gromadzą w suchej masie organów nadziemnych ponad 1% metalu (dla Zn, Mn), co odpowiada 10-100-krotnie wyższej akumulacji w porównaniu do innych gatunków. Ponadto hiperakumulatorami są rośliny gromadzące > 0,1% Ni, Co, Cu, Cr i Pb oraz > 0,01% Cd w suchej masie (1,2). Często jednak znalezione w środowisku naturalnym rośliny o charakterze hiperakumulatorów nie są idealnymi do fitoremediacji. Rośliny te są rozetkowatego pokroju, zazwyczaj małych rozmiarów, wolno rosną i produkują niewielką biomasę. Natomiast rośliny charakteryzujące się wysokim przyrostem biomasy zazwyczaj wykazują niską tolerancję na metale ciężkie oraz słabą zdolność do ich akumulacji. Rośliny przeznaczone do użycia w procesie fitoremediacji powinny charakteryzować się odpowiednią zdolnością do akumulacji metali i zdolnością ich transportu do części nadziemnych. Rośliny, które tylko pobierają metale z gleby, ale nie transportują ich z korzeni do części nadziemnej, mogą być wykorzystane do tzw. fitostabilizacji zapobiegającej rozprzestrzenianiu się skażenia i zamiany skażonych obszarów na tereny rekreacyjne poprzez zmniejszenie biodostępności pierwiastków śladowych w środowisku. Kolejnymi cechami wymaganymi w fitoremediacji są: tolerancja roślin na wysokie stężenie metalu, szybki przyrost i wysoka biomasa. Ważną cechą jest także łatwość w zebraniu plonu stosowanych roślin (3). W przypadku oczyszczania środowiska wodnego, ścieków czy terenów podmokłych, stosuje się metodę

zwaną ryzofiltracją, w której do hodowli wodnej używa się korzeni roślin lądowych adsorbujących zanieczyszczenia. Ponadto istnieje możliwość zastosowania roślin do przekształcania toksycznych związków, takich jak organiczna forma rtęci, w mniej szkodliwe, lotne pary Hg^0 – mówimy wówczas o fitowolatilizacji, fitoewaporacji lub fitoparowaniu. Nowoczesna biotechnologia roślin wykorzystuje wymienione wyżej cechy metalofitów i hiperakumulatorów, oferując duże możliwości konstruowania i zastosowania roślin transgenicznych, zdolnych do zwiększonej akumulacji i wiązania metali ciężkich. Wydaje się, że zastosowanie zaawansowanych metod biologii molekularnej pozwoli w najbliższej przyszłości na pokonanie wielu z wymienionych ograniczeń. Modyfikacja cech u roślin tolerancyjnych na metale może pozwolić na zwiększenie biomasy, rozszerzenie tolerancji tych roślin na inne szkodliwe metale lub też poprawienie zdolności akumulacyjnych roślin już odpornych, czy też zwiększenie ich biomasy oraz akumulacji w częściach nadziemnych.

Fitoremediacja daje nadzieję na możliwość przywrócenia obszarów zanieczyszczonych metalami ciężkimi do stanu użyteczności rolniczej. Ze względu na niski koszt, technologia ta jest obiecującą alternatywą dla technologii tradycyjnych, polegających na mechanicznym usuwaniu tego typu zanieczyszczeń (odkopywanie, zdejmowanie warstw gleby, pompowanie wody, czy wreszcie budowa i instalacja kosztownych urządzeń). Dodatkowo niektóre metale związane przez rośliny mogą zostać odzyskane przez proces recyklingu (ang. *phytomining*) (1).

2. Mechanizmy detoksykacji metali ciężkich w roślinach

Metale ciężkie takie jak Cu czy Zn są niezbędne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, ponieważ stanowią składnik wielu enzymów i innych białek. Jednakże podwyższone stężenie metali ciężkich w glebie, zarówno tych niezbędnych jak niekoniecznych dla wzrostu roślin, może prowadzić do zahamowania wzrostu większości roślin i do pojawienia się symptomów toksyczności.

Rośliny posiadają pewien zakres potencjalnych mechanizmów komórkowych, które mogą być zaangażowane w detoksykację metali ciężkich i w ten sposób w tolerancję na stres przez nie wywołaną. Mechanizmy te odgrywają rolę w mikoryzie, wiązaniu w ścianie komórkowej, zewnątrzkomórkowych wydzielinach; w zredukowanym poborze lub pompowaniu jonów metalu przez błonę komórkową w celu usunięcia ich z cytoplazmy; w chelatowaniu metali w cytozolu przez takie peptydy jak fitochelatyny lub przez kwasy organiczne, aminokwasy; w naprawianiu białek zniszczonych w wyniku stresu (rola białek szoku termicznego, metalotionein); oraz w kompartmentacji metali do wakuoli przez przENOŚniki zlokalizowane w tonoplazmie (4). W pracy tej skoncentrujemy się bliżej na mechanizmach detoksykacji metali za pomocą takich związków jak bogate w cysteinę fitochelatyny i metalotioneiny, a także opisem występujących u roślin mechanizmów transportu jonów metali ciężkich do części nadziemnych oraz do przestrzeni cytoplazmatycznej czy do wakuoli.

Szczególnie interesujące jest wykorzystanie wiedzy o genach których ekspresja determinuje zwiększoną tolerancję roślin. Modyfikacje genetyczne w genach odpowiedzialnych za mechanizmy komórkowej obrony roślin na działanie jonów podwyższają celowość badań i ich zastosowanie w fitoremediacji.

Odpowiedź roślin na stres wywołany metalami ciężkimi polega m.in. na syntezie specyficznych polipeptydów o dużej zawartości cysteiny, znanych jako metalotioneiny (MTs) i fitochelatyny (PCs). Metalotioneiny są bezpośrednimi produktami genów natomiast fitochelatyny i ich homologi syntetyzowane są na drodze enzymatycznej z glutationu i jego homologów.

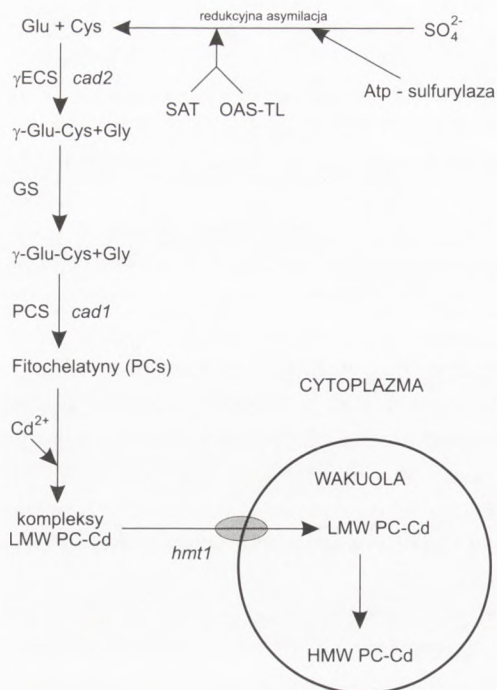
Fitochelatyny są rodziną peptydów o ogólnej strukturze: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, gdzie $n = 2$ do 11. Substratem do syntezy fitochelatyn jest glutation (GSH), tripeptyd zbudowany z kwasu L-glutaminowego, L-cysteiny i L-glicyny, gdzie kwas L-glutaminowy połączony jest z cysteiną wiązaniem γ -karboksamidowym. Enzym syntetyzujący fitochelatyny, aktywowany jonami metalu – syntaza fitochelatynowa [E.C. 2.3.2.15] (transpeptydaza dipeptydu $\gamma\text{-Glu-Cys}$) przenosi ugrupowania $\gamma\text{-Glu-Cys}$ z cząsteczki donorowej GSH na cząsteczkę akceptorową GSH tworząc w ten sposób fitochelatyny różnej długości – PC_2 , PC_3 , PC_4 itd.

Synteza fitochelatyn zależna jest zatem od dostępności glutationu w komórce jako substratu. Synteza samego glutationu natomiast zależna jest od obecności aminokwasów wchodzących w jego skład. Szczególne znaczenie odgrywa tutaj cysteina, która stanowi większą część składu aminokwasowego fitochelatyn i dzięki obecności grup $-\text{SH}$ odgrywa podstawową rolę w mechanizmie detoksykacji jonów metali ciężkich.

W badaniach nad roślinami *Brassica juncea* (gorczyca sarepska) wykazano, że akumulacji Cd towarzyszy szybka indukcja biosyntezy fitochelatyn, a zawartość PCs jest teoretycznie wystarczająca, by skompleksować cały pobrany przez rośliny Cd. Mechanizm ten chroni proces fotosyntezy, ale nie zapobiega spadkowi stopnia transpiracji (4). Natomiast mutanty *cad1 Arabidopsis thaliana* nie syntetyzowały PCs i były nadwrażliwe na działanie Cd i Cu (5).

Porównanie sekwencji aminokwasowych syntazy fitochelatynowej z różnych organizmów: roślin *Arabidopsis*, pszenicy, drożdży *S. pombe*, i nicienia *C. elegans* wskazują na duże podobieństwo tych białek. Domena N-terminalna tego białka wykazuje dość sporą konserwatywność. Około 40% sekwencji białka syntazy fitochelatynowej u tych 4 organizmów jest identyczne. Mimo braku pokrewieństwa między tymi gatunkami mechanizm obrony przed toksycznym działaniem jonów metali ciężkich jest taki sam. Budowa tego enzymu jest bardzo podobna, a mechanizm działania identyczny. Domena C-terminalna mimo braku homologii w każdym przypadku posiada liczne powtórzenia par cysteiny, które pełnią rolę czujnika wiążącego jony metali i przenosi je do miejsca katalitycznego enzymu znajdującego się w domenie N-terminalnej (6,7).

Niektóre metale takie jak cynk czy miedź są mikroelementami niezbędnymi dla metabolizmu komórkowego. Mogą one jednak być toksyczne dla komórki tak samo



Rys. Schemat syntezy fitochelatin. glu – glutaminian, cys – cysteina, gly – glicyna, GSH – glutation, γ -ECS – syntetaza γ -glutamyllocysteinowa, GS – syntetaza glutationowa, PCS – syntetaza fitochelatinowa; oraz geny związane z tolerancją na kadm; *cad1* i *cad2* – geny *Arabidopsis thaliana*; *hmt1* – gen białka transportującego kompleksy LMW PC-Cd z drożdży, (według [6], zmodyfikowane).

jak metale ciężkie (kadm, ołów) jeśli są w nadmiernym stężeniu. Dla utrzymania równowagi w stężeniu tych metali wszystkie organizmy indukują syntezę niskocząsteczkowych białek bogatych w cysteinę nazywanych metalotioneinami (8,9).

Metalotioneiny (MT) zostały wykryte po raz pierwszy ponad 40 lat temu jako niskocząsteczkowe białka wiążące jony Cd obecne w nerce końskiej (10,11). Od tego czasu białka MT i ich geny odkryto w różnych organizmach: od zwierząt poprzez rośliny aż do prokariotów, np. *Synechococcus*. Zawierają one dużą liczbę reszt cysteiny, które wiążą jony różnych metali za pomocą wiązań merkaptydowych (11). Ze względu na rozmieszczenie reszt cysteinowych w cząsteczce metalotioneiny zostały odpowiednio sklasyfikowane (12). Klasa I MT zawiera 20 reszt cysteinowych o wysokiej konserwatywności i opiera się na ssaczych metalotioneinach. Klasa II MT zawiera natomiast te MT, które nie posiadają ścisłego rozmieszczenia reszt cysteiny i zalicza się do niej metalotioneiny wykryte u roślin, grzybów oraz zwierząt bezkręgowych. Często także wymienia się fitochelatyny (PCs) jako trzecią klasę metalotionein. Późniejsze odkrycie i wyizolowanie wielu genów MT z roślin spowodowało, że klasa II roślinnych metalotionein została podzielona na typy w oparciu na sekwencjach aminokwasowych. Początkowo powstały dwa typy metalotionein Typ 1 i Typ 2 na bazie rozmieszczenia reszt cysteiny w tych białkach, natomiast po pewnym czasie w wyniku dużego wzrostu liczby poznawanych genów roślinnych MT dodano kolejne kategorie: Typ 3 i Typ 4 (13).

Typ 1 metalotionein zawiera powtarzający się sześciokrotnie motyw Cys-Xaa-Cys (gdzie Xaa jest aminokwasem innym niż cysteina) rozdzielony jednakowo na dwie domeny. U większości MT1 domeny te oddzielone są 40-aminokwasowym odcinkiem zawierającym także aminokwasy aromatyczne. Duża przerwa pomiędzy domenami jest charakterystyczna dla roślinnych MT, a domeny bogate w cysteinę u pozostałych MT są oddzielone odcinkiem krótszym niż 10 aminokwasów i nie zawierają aminokwasów aromatycznych. Typ 2 MT również zawiera dwie domeny bogate w cysteinę, oddzielone około 40-aminokwasowym odcinkiem, jednak pierwsza para cystein występuje jako motyw Cys-Cys w pozycji 3 i 4 białka. Na końcu domeny N-terminalnej bogatej w cysteinę występuje ponadto motyw Cys-Gly-Gly-Cys. Typ 3 MT zawiera tylko 4 reszty cysteiny w N-terminalnej domenie, natomiast typ 4 MT jest inny od pozostałych roślinnych metalotionein i posiada trzy domeny bogate w cysteinę, z których każda posiada 5 lub 6 konserwatywnych reszt cysteiny oddzielonych przez 10 do 15 innych aminokwasów (11). Wyizolowana z pszenicy metalotioneina Ec typu 4 została oczyszczona jako białko związane z cynkiem i był to pierwszy dowód na to, że rośliny zawierają oprócz fitochelatyn także metalotioneiny jako ligandy bogate w cysteinę wiążące metale (14). Wielu odkryciom dotyczącym genów roślinnych MT i cDNA kodujących MT nie towarzyszy równoczesne poznanie mechanizmów ekspresji tych genów i rozmieszczenia MT dlatego też często mówi się o genach podobnych do genów metalotionein (ang. *metallothionein-like genes*). Wynika to z trudności jakie nastroją badania nad metalotioneinami *in planta* spowodowane ich łatwością utleniania się w obecności tlenu. Często właściwości metalotionein bada się poddając roślinne metalotioneiny ekspresji w komórkach bakteryjnych. Ekspresja metalotioneiny PsMTa typu I z grochu w komórkach *E. coli* prowadziła do syntezy białka wiążącego Cu, Cd i Zn z największym powinowactwem do Cu. Badania te dostarczają informacji o biologicznej funkcji MT jaką jest wiązanie metali, mimo że zostały zsyntetyzowane poza organizmem roślinnym. Ekspresję genów MT u roślin wykazano podczas kiełkowania nasion. Geny metalotionein typu 4 zawierają promotor z sekwencją homologiczną do elementu odpowiedzi na ABA (*ABA-response element*) i ich ekspresja jest regulowana przez ABA (15). Kawashima i inni (16) zaproponowali, że takie specyficzne dla embriogenezy metalotioneiny stanowią rezerwuar cynku, niezbędnego podczas kiełkowania.

Poziom ekspresji genów metalotionein zmienia się wraz z rozwojem rośliny. Stwierdzono na przykład u *Brassica napus* silny wzrost poziomu RNA dla metalotioneiny typu I w starzejących się liściach (17), co potwierdzono również u *Arabidopsis* i ryżu (18,19).

Metalotioneiny chronią organizmy zwierząt przed toksycznym działaniem metali (20), natomiast u roślin funkcję tę spełniają głównie fitochelatyny. Trudno jest stworzyć jednolity model dla funkcji roślinnych metalotionein na podstawie dostępnych danych jednak wyniki doświadczeń potwierdzają hipotezę, że metalotioneiny są zaangażowane w tolerancję na miedź i utrzymanie homeostazy tego pierwiastka u roślin. Niektóre roślinne MT są funkcjonalnymi białkami wiążącymi Cu, u których

ma miejsce indukowana przez Cu ekspresja genów metalotionein. Geny MT typu I są indukowane przez jony miedzi u *Arabidopsis*, ryżu, pszenicy i tytoniu (19,21-23). Ekspresja genów Typu I metalotionein jest także indukowana przez szereg innych czynników stresowych, jak np. aluminium, kadm, głódzenie oraz szok termiczny (19). Snowden i inni (22) stwierdzili u pszenicy i ryżu, że geny metalotioneiny mogą ulegać ekspresji stanowiąc część ogólnej odpowiedzi roślin na stres.

Poznanie funkcji MT u roślin wymaga jeszcze wielu badań. Nie otrzymano dotąd mutantów *Arabidopsis* pozbawionych MT, tak jak to wykonano dla genów syntazy fitochelatynowej, co pozwoliłoby na określenie bliżej ich funkcji.

Bardzo ważnym mechanizmem regulującym odporność roślin na metale ciężkie jest ich transport przez błony do komórki. Błona komórkowa może być uważana za pierwszą „żywą” strukturę będącą celem dla toksycznych jonów metali ciężkich. W obecności jonów metalu w wysokim stężeniu, szczególnie Cu, może dojść do zwiększonego wycieku z komórek, co powoduje zniszczenie błony. Wynika to z różnorodnych mechanizmów, takich jak utlenianie i sieciowanie tioli białek, inhibicja podstawowego białka błonowego H^+ -ATPazy, czy zmian w składzie i płynności lipidów błonowych. W badaniach przeprowadzonych na korzeniach słonecznika i pszenicy wykazano, że bezpośredni wpływ na błonę plazmatyczną mają jony Cu i Cd, które poprzez inhibicję pompy H^+ -ATPazowej prowadzą do jej zwiększonej przepuszczalności (4).

Tolerancja rośliny na metale ciężkie może zatem polegać również na ochronie integralności błony poprzez zwiększony wypływ substancji rozpuszczonych z komórek. Jednak, jak dotąd, jest zbyt mało dowodów potwierdzających ten fakt. Innym czynnikiem zaangażowanym w utrzymanie integralności błony w obecności metali może być wzmocnienie mechanizmu naprawczego po zniszczeniu błony. Dużą rolę odgrywają tu białka szoku cieplnego lub metalotioneiny (4).

Alternatywną strategią kontrolowania wewnątrzkomórkowego poziomu metali jest ich aktywny wypływ. Istnieje wprawdzie mało dowodów na funkcjonowanie tego procesu w roślinach (większość badań przeprowadza się na drożdżach, które są homologiczne pod względem pewnych struktur w stosunku do ssaków i roślin). W komórkach bakterii i zwierząt to „wypompowywanie” jonów uważa się za podstawę systemu obronnego. Zaangażowane są w nim ATPazy typu P i przenośniki typu kation/ H^+ (na zasadzie antyportu), a dotąd zidentyfikowano systemy pompujące jony Cu, Cd, Zn, Co i Ni (4). Brak dotąd bezpośrednich dowodów na istnienie przenośników błonowych metali ciężkich w roślinach, ale w badaniach wykazano, że posiadają one kilka klas transporterów metali, które są zaangażowane w pobór jonów i homeostazę metali, odgrywających podstawową rolę w tolerancji roślin na metale. Zidentyfikowano CPx-ATPazy, rodzinę przenośników Nramp, rodzinę CDF (ang. *cation diffusion facilitator*), rodzinę ZIP i inne (4).

Rodzinę Nramp (ang. *Natural resistance associated macrophage proteins* – białka naturalnej odporności zasocjowane z makrofagami, TC 2.A.55) podzielono na dwie grupy. Do pierwszej należą: AtNramp1 (odgrywające rolę w homeostazie jonów

żelaza) i OsNramp1 (24). Drugą grupę reprezentują przenośniki AtNramp2-5 oraz OsNramp2. W przypadku AtNramp3 i AtNramp4 również stwierdzono związek z pobieraniem jonów żelaza (25), ponadto nadekspresja genu AtNramp3 doprowadziła u *Arabidopsis thaliana* do nadwrażliwości na Cd^{2+} , związanej ze zwiększonym poborem jonów kadmu (4).

Wywołując ekspresję genu pochodzącego z genomu pszenicy kodującego przenośnik LCT1 (TC 9.A.20) w komórkach drożdży Clemens i in. (26) wykazali, że LCT1 odpowiada prawdopodobnie za wzmożony pobór Cd^{2+} oraz Ca^{2+} .

Kampfenkel i in. (27) sklonowali w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* cDNA kodujący transporter jonów miedzi COPT1, pochodzący z *Arabidopsis thaliana*. W tkance korzeni rzodkiewnika nie zidentyfikowano jednak mRNA dla tego genu.

Wymieniona rodzina przenośników ZIP (ang. ZRT, IRT *Related Proteins* – białka spokrewnione z produktami genów ZRT, IRT; TC 2.A.5 zgodnie z systemem klasyfikacji transporterów błonowych (28)), spełnia rolę w transporcie Fe^{2+} i Zn^{2+} u licznych eukariontów. Pierwszym wyizolowanym przedstawicielem był gen IRT1 z *Arabidopsis thaliana* (29), którego transkrypcja indukowana jest w warunkach deficytu Fe, a hamowana w komórkach zaopatrzonych w Fe. Stwierdzenie to potwierdza fakt, że pobieranie Cd ulega podwyższeniu w siewkach grochu w warunkach deficytu Fe (30). IRT1 wykazuje również aktywność transportu jonów Mn^{2+} , Zn^{2+} oraz prawdopodobnie Cd^{2+} (29,31).

Następnym zidentyfikowanym przedstawicielem tej rodziny jest przenośnik ZIP1 – 3 oraz ZIP4 wykazane w *Arabidopsis thaliana*. W stosunku do transporterów w komórkach drożdży (ZRT1 – 2) roślinne ZIP1 – 3 wykazują podobną aktywność pobierania Zn^{2+} (zbliżone wartości K_m w zakresie nanomolarnym). Ulegają one ponadto ekspresji głównie w komórkach korzenia w warunkach niedoboru Zn, co potwierdza ich rolę w pobieraniu jonów tego metalu. ZIP4 ulega podwyższonej ekspresji zarówno w tkankach korzenia, jak i pędu rośliny hodowanej z niedoborem Zn (2). Dzięki tym odkryciom znaleziono inne roślinne homologi transporterów ZIP, takie jak ZNT1 z hiperakumulatora Zn/Cd *Thlaspi caerulescens*, o podobnej sekwencji genu do ZIP4. Podwyższona ekspresja ZNT1 w tym hiperakumulatorze prowadziła do preferencyjnego pobierania jonów Zn i obniżenia powinowactwa pobierania jonów Cd (4).

Arazi i in. (32) zidentyfikowali w roślinach *Nicotiana tabacum* związane z błoną cytoplazmatyczną białko NtCBP4, (ang. *Nicotiana tabacum calmodulin binding protein*) – białko wiążące kalmodulinę, o charakterze nieselektywnego kanału kationowego regulowanego przyłączaniem kalmoduliny i prawdopodobnie cyklicznych monofosforanów nukleotydów (cNMP). Białko to uczestniczyło w regulacji tolerancji roślin na metale ciężkie. Nadekspresja genu tego białka powodowała podwyższenie tolerancji na Ni^{2+} i jednocześnie wzrost wrażliwości na Pb^{2+} . Tolerancja na jony Ni była powiązana ze zredukowaną ich akumulacją w roślinie, a wzrost wrażliwości na Pb z podwyższoną akumulacją Pb w pędzie rośliny transformowanej genem białka NtCBP4.

Oprócz przenośników w błonie cytoplazmatycznej, dużą rolę w mechanizmie tolerancji odgrywa również transport, np. kompleksów fitochelatyn i Cd do wakuoli.

W drożdżach *S. pombe* zidentyfikowano białko o charakterze przenośnika typu ABC (TC 3.A.1) o nazwie HMT1. Zlokalizowane jest ono w błonie wakuolarnej i jest odpowiedzialne za zależny od ATP i jonów magnezu, a hamowany wanadem transport kompleksów PC-Cd i apo-PCs (33). Nie znaleziono dotąd homologów białka HMT1 w roślinach, jednak udało się wykazać podobną aktywność transportu w komórkach korzeni owsa (34). W prowadzonych innych badaniach na drożdżach *S. cerevisiae* zidentyfikowano w *Arabidopsis* sekwencje podobne do ludzkiego białka MRP (ang. *multi – drug resistance – associated protein*), będącego homologiem przenośnika typu ABC o nazwie YCF1 pochodzącego z drożdży. Prawdopodobnie te roślinne przenośniki AtMRPs pełnią rolę w transporcie kompleksów PC-Cd przez tonoplast (35). Same kompleksy fitochelatyn występują w dwóch formach w komórkach roślin: LMW (o niskim ciężarze cząsteczkowym) i HMW (o wysokim ciężarze cząsteczkowym); te ostatnie stanowią główną formę jonów kadmu deponowanych w obrębie wakuoli. Alternatywną drogą składowania Cd^{2+} , jest najprawdopodobniej wykazany w komórkach korzenia owsa transport antyportowy Cd^{2+}/H^{+} (36). Odpowiada być może za niego to samo białko, które reguluje antyport Ca^{2+}/H^{+} do wakuoli, na co wskazują podobne wartości $K_m = 5,5 \mu M$ (2). Aktywność zależnego od pH transportu Ca^{2+}/H^{+} przypisuje się wakuolarnym przenośnikom CAX1 i CAX2 z *Arabidopsis* (TC 2.A.19). CAX1 i CAX2 różnią się powinowactwem do jonów Ca^{2+} , CAX1 wykazuje wysokie powinowactwo ($K_m = 13,1 \mu M$), natomiast CAX2 niskie powinowactwo ($K_m > 100 \mu M$). Ponieważ K_m dla CAX2 jest zbyt wysokie nie może on utrzymywać stężenia jonów Ca^{2+} na odpowiednim poziomie. Autorzy zaproponowali dla CAX2 funkcję antyportera o wysokim powinowactwie i wysokiej wydajności w stosunku H^{+} /kationy metali ciężkich, co potwierdza jego rolę w antyporcie Cd^{2+}/H^{+} (37).

Również u *Arabidopsis*, zidentyfikowano inny, przypuszczalnie tonoplastowy przenośnik – ZAT, należący do rodziny CDF (TC 2.A.4), homologiczny do ssaczych transporterów ZnTs. W samym genomie roślinnym znaleziono jeszcze dwie dodatkowe sekwencje o podobnym znaczeniu. Na podstawie badań przypuszcza się, że białko ZAT pełni rolę w regulowaniu stężenia Zn^{2+} (2).

3. Rośliny transgeniczne z nadekspresją genów metalotionein

Poznanie genów metalotionein roślinnych pozwoliło na uzyskanie roślin transgenicznych o podwyższonej tolerancji na działanie metali.

Liu i wsp. (38) wprowadzili gen metalotioneiny (MT) uzyskany z *Nicotiana glutinosa* za pomocą wektora pMBP1 do *Agrobacterium tumefaciens* i transformowali nim rośliny tytoniu. Uzyskano rośliny transgeniczne zawierające gen MT trwale zintegrowany z genomem jądrowym. Rośliny tytoniu poddano stresowi wywołanemu przez jony kadmu. Rośliny kontrolne (nietransgeniczne) rosnące na pożywce zawierającej

tylko 10 μM CdSO_4 wykazywały chlorozę liści, a ich wzrost był znacząco ograniczony przy stężeniu CdSO_4 100 μM . Przy stężeniach powyżej 200 μM CdSO_4 rośliny kontrolne bardzo szybko robiły się blade i ostatecznie zamierały. W przypadku roślin transgenicznych około 60% z 90 testowanych, rosnących na pożywce zawierającej 50 μM CdSO_4 rozwijało się normalnie. Tylko u dwóch roślin stwierdzono zahamowanie wzrostu. Na pożywce zawierającej 100 μM CdSO_4 liczba nie uszkodzonych roślin transgenicznych spadła do około 20%, a liczba roślin o silnie zahamowanym wzroście wzrosła do około 20%. Przy stężeniu 200 μM około 30% zmodyfikowanych roślin tytoniu nie było uszkodzonych, wszystkie z nich wykazywały normalny wzrost. Transformanty wykazały zwiększoną tolerancję na kadm na pożywce zawierającej aż 200 μM CdSO_4 , podczas gdy rośliny kontrolne wykazały chlorozę na pożywce z 10 μM CdSO_4 i ich wzrost był znacząco zahamowany przy stężeniu 100 μM CdSO_4 .

Hasegawa i in. (39) otrzymali transgeniczne rośliny *Brassica oleracea*, w których ekspresji ulegał gen drożdżowy *CUP1*, kodujący metalotioneinę drożdżową. Rośliny te tolerowały 400 μM stężenie Cd, podczas gdy rośliny dzikiego typu nie były w stanie rozwijać się w środowisku hydroponicznym w stężeniu Cd wyższym od 25 μM . Osobniki transgeniczne akumulowały o 10-70% więcej Cd w górnych liściach (przy 50 μM Cd) niż rośliny nietransformowane, rosnące przy 25 μM Cd. Wyniki te wskazują, że jest mało prawdopodobne, aby podwyższona tolerancja na Cd u transformantów była konsekwencją wykluczania Cd z liści. Zatem nadekspresja MT może doprowadzić do wzrostu tolerancji rośliny na specyficzne metale, np. Cd czy Cu (5).

4. Modyfikacje genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy fitochelatyn

Dostępność poszczególnych substratów na kolejnych poziomach warunkuje syntezę fitochelatyn i determinuje w ostateczności odpowiedź rośliny i jej odporność na działanie jonów metali ciężkich. Fitochelatyny jako ostatni produkt na drodze odpowiedzi roślin na toksyczne działanie metali ciężkich są syntetyzowane z glutationu. GSH jest natomiast syntetyzowany w dwustopniowej reakcji przez ATP-zależne enzymy, syntetazę γ -glutamylcysteinową i syntetazę glutationową. Reakcja ta, jak się wydaje, jest wysoce regulowana na poziomie transkrypcji i translacji jak i przez sprzężenia zwrotne kontrolujące działanie syntetazy γ -EC przez GSH. Jednym z czynników regulujących biosyntezę GSH jest dostępność cysteiny, a w dalszej konsekwencji z redukcyjną asymilacją siarczanów w roślinach. Wykazano, że egzogenne dodanie cysteiny powoduje wzrost stężenia GSH (40). Ostatnim etapem syntezy cysteiny jest katalizowana przez O-acetyloseryno(thiol)liazę (OASTL) reakcja włączenia siarki do cząsteczki O-acetylo-L-seryny. Ta z kolei jest produkowana przez acetylację L-seryny katalizowaną przez acetylotransferazę seryny (SAT). Oba enzymy wykazują aktywność w trzech kompartmentach komórkowych zaangażowanych w syntezę białek: cytoplazmie, chloroplastach i mitochondriach (41). Ostatnio

wykazano, że gen *Atcys-3A* kodujący cytoplazmatyczną izoformę OASTL z *Arabidopsis* jest regulowany przez stres solny i hormon roślinny – kwas abscysynowy.

Dominguez-Solis i in. (42) prowadząc doświadczenia na roślinach *Arabidopsis* rosnących na pożywce zawierającej sole kadmu dowiedli, że rośliny te wykazywały 7-krotnie wyższy poziom transkrypcji genu *Atcys-3A* w liściach w porównaniu do roślin nie traktowanych kadmem. Maksymalny poziom indukcji obserwowano po 18 godzinach od dodania kadmu, a znaczący wzrost akumulacji RNA obserwowano już po 1 godzinie.

Rośliny *Arabidopsis* poddano transformacji w celu uzyskania nadekspresji genu *Atcys-3A* używając do tego celu *Agrobacterium*. Pełnej długości cDNA dla *Atcys-3A* połączono w orientacji sensownej z promotorem 35 S wirusa mozaiki tytoniowej w celu uzyskania konstytutywnej ekspresji genu. Analiza northern roślin transformowanych pokazała, że nastąpił 9-krotny wzrost akumulacji mRNA dla *Atcys-3A* w jednej z linii w stosunku do roślin kontrolnych. Rośliny transformowane wykazywały również wzrost aktywności OASTL w ekstraktach z liści. Transformowane linie roślin rosnące na 250 μM CdCl_2 wykazały wyższy poziom ekspresji genu *Atcys-3A* i były zdolne do kiełkowania i wzrostu na takiej pożywce. Rośliny kontrolne transformowane plazmidem pBI121 kiełkowały słabo w obecności metalu, a te rośliny, które zdołały wytworzyć liścienie zginęły po 5-7 dniach. Rośliny z nadekspresją *Atcys-3A* akumulowały 72% więcej kadmu w stosunku do roślin kontrolnych.

Harada i in. (43) uzyskali transgeniczne rośliny tytoniu wprowadzając do nich gen syntazy cysteinowej *RCS1* z ryżu (*Oriza sativa*). Badali oni aktywność enzymu syntazy cysteinowej (CS) u roślin kontrolnych i transformowanych zarówno przed jak i po traktowaniu kadmem. Aktywność CS w warunkach bezstresowych była od 1,8 do 3-krotnie wyższa u badanych linii transgenicznych niż u roślin kontrolnych. Po traktowaniu kadmem przez tydzień aktywność CS wzrosła 2-krotnie u roślin kontrolnych natomiast u jednej z linii transgenicznych 1,5-krotnie. Badano również poziom fitochelatyn, GSH i cysteiny. Poziom GSH i cysteiny u roślin transgenicznych był znacząco wyższy niż u roślin kontrolnych rosnących w warunkach bezstresowych. Nie wykryto natomiast u żadnych roślin w tych samych warunkach niskocząsteczkowych fitochelatyn (PC_2 i PC_3). Po traktowaniu Cd w stężeniu 0,1 mmol/L zawartość cysteiny wzrosła w obu typach roślin. Poziom GSH nie zmieniał się znacząco w badanych roślinach nawet po 3 tygodniach traktowania kadmem, lecz mimo to u jednej z linii transgenicznych początkowy poziom GSH był 2-krotnie wyższy niż u pozostałych roślin. Niskocząsteczkowe fitochelatyny pojawiły się po traktowaniu roślin kadmem u obu typów roślin i po pierwszym tygodniu ich poziom był taki sam zarówno u roślin kontrolnych jak i u roślin transgenicznych, natomiast po 3 tygodniach był znacznie wyższy u roślin transgenicznych. Zawartość kadmu w roślinach transgenicznych na gram świeżej masy była około 20% niższa niż u roślin kontrolnych, lecz całkowita zawartość była 1,8-krotnie wyższa co wynika z większej objętości biomasy spowodowanym szybszym tempem wzrostu.

Etapy biosyntezy cysteiny, czyli substratu limitującego poziom GSH w komórce, są bardzo podobne u bakterii i roślin. Dzięki temu możliwe jest zwiększenie pozio-

mu cysteiny u roślin przez zwiększenie aktywności SAT (acetylotransferaza seryny), enzymu biorącego udział w syntezie tego aminokwasu poprzez wprowadzenie bakteryjnego genu kodującego ten enzym. Błaszczyk i in. (44) wprowadzili bakteryjny gen *cysE* z *E. coli* kodujący SAT do roślin tytoniu. Uzyskali oni grupę transgenicznych roślin posiadających bakteryjny gen SAT w chloroplastach oraz grupę roślin z genem SAT w cytoplazmie. Bakteryjny SAT jest hamowany przez cysteinę przez sprzężenie zwrotne (45). Aby zminimalizować ten efekt użyto oprócz dzikiego szczepu także mutantu niewrażliwego na tę inhibicję (46). Aktywność SAT u badanych grup roślin transgenicznych średnio była wyższa 2 do 3-krotnie w porównaniu do roślin kontrolnych. Znalaziono również jedną roślinę, u której aktywność SAT była 15-krotnie wyższa od kontroli. Również poziom cysteiny i GSH u tych roślin był do 3-krotnie wyższy w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Doświadczenia te pokazują, że nadekspresja genu (*cysE*) kodującego enzym SAT uczestniczącego w syntezie cysteiny powoduje w rezultacie podwyższenie zawartości zarówno cysteiny jak i GSH.

Bardzo użyteczną i popularną rośliną używaną w fitoremediacji jest topola (*Populus* sp.). Drzewo to charakteryzuje się szybkim przyrostem, dużą biomasą i wysoką tolerancją na zanieczyszczenia środowiska. Roślina ta jest też często obiektem badań stanowiąc potencjalne narzędzie do oczyszczania środowiska. Rennenberg i Will (47) prowadzili badania na hybrydowej topoli (*Populus tremula* × *Populus alba*), INRA klon 717 1-B4. Rośliny typu dzikiego i rośliny transgeniczne z nadekspresją bakteryjnych genów γ -ECS i GS w cytoplazmie poddane były stresowi wywołanemu przez bardzo wysokie (5 mM) stężenie jonów kadmu (w postaci CdCl₂). Zaobserwowano wcześniej, że u innych gatunków zawartość glutationu w korzeniach spadała w odpowiedzi na obecność Cd (48). Początkowy poziom GSH w korzeniach roślin transgenicznych topoli z nadekspresją γ -ECS był ponad dwukrotnie wyższy w porównaniu do roślin typu dzikiego lub roślin z nadekspresją GS. Po 5 dniach ekspozycji roślin na kadm obserwowano podobny, relatywnie niski poziom GSH zarówno u roślin transgenicznych jak i u roślin kontrolnych. Niski poziom fitochelatin, głównie PC₂, obserwowano u wszystkich linii topoli przed traktowaniem roślin kadmem. Poziom fitochelatin po pięciu dniach ekspozycji na kadm był ponad dwukrotnie wyższy w korzeniach roślin z nadekspresją γ -ECS niż u roślin kontrolnych i z nadekspresją GS. Rosnący poziom PC był skorelowany ze zwiększającym się poziomem kadmu w korzeniach. Po pięciu dniach silnego działania kadmu na rośliny obserwowano uszkodzenie roślin zarówno transgenicznych jak i kontrolnych. Po siedmiu dniach różnice we wrażliwości na kadm nie były już zauważalne. Rośliny topoli z nadekspresją GS użyte w tym eksperymencie nie wykazywały zwiększonego poziomu GSH i PC pod wpływem działania kadmu. W przeciwieństwie do tych rezultatów Zhu i in. (49) wykazali u roślin gorzycy sarepskiej (*Brassica juncea*) poddanych działaniu jonów Cd, że ekspresja bakteryjnego genu kodującego GS prowadzi do wzrostu poziomu glutationu i fitochelatin w cytoplazmie. U roślin gorzycy, rosnących w obecności 0,1 mM Cd, w których nadekspresji ulegał bakteryjny gen *gsh2* z *E. coli* obser-

42x82

183

wowano 5-krotnie wyższy poziom GSH w korzeniach w porównaniu do roślin kontrolnych (nietransgenicznych). Poziom niskocząsteczkowych fitochelatyn (PC_2) był 1,7-krotnie wyższy w korzeniach roślin transgenicznych w porównaniu do roślin kontrolnych. Autorzy zaobserwowali również 25% wzrost zawartości kadmu w pędach roślin z ekspresją *gsh2*.

Ci sami autorzy transformowali rośliny *B. juncea* genem *gsh1* z *E. coli* kodującym γ -ECS uzyskując 3-krotny wzrost poziomu GSH w stosunku do roślin nietransgenicznych. Podczas ekspozycji tych roślin na Cd poziom PC w korzeniach i pędach wzrósł o około 30%, natomiast stężenie jonów Cd w pędach wzrosło o około 40-90% w stosunku do roślin kontrolnych (50).

5. Modyfikacje aktywności transporterów błonowych

Nadekspresja genu *NtCBP4* w roślinach tytoniu doprowadziła do zwiększenia odporności tych roślin na nikiel, ale jednocześnie do zwiększenia wrażliwości na jony ołowiu. Zwiększoną tolerancję na jony niklu roślin z nadekspresją *NtCBP4* tłumaczy się zredukowanym tempem transportu tego metalu i mniejszą akumulacją niklu. Przy 100 μ M stężeniu $NiCl_2$ pędy roślin transgenicznych i kontrolnych akumulowały jony niklu w takim samym tempie, natomiast przy wyższych stężeniach $NiCl_2$ (150 i 200 μ M) nikiel szybciej był akumulowany w roślinach typu dzikiego. W przypadku ołowiu rośliny transgeniczne wykazywały nadwrażliwość w stosunku do roślin kontrolnych. Spowodowane to było zwiększoną i szybszą akumulacją jonów ołowiu w roślinach transformowanych. Nikiel jest mikroelementem niezbędnym roślinie do wzrostu i rozwoju (51), ale w wyższych stężeniach staje się toksyczny powodując poważne uszkodzenia w komórce. Rośliny stosują dwa typy obrony przed metalami ciężkimi: pierwszy polega na unikaniu lub wykluczeniu metalu co chroni roślinę przed pobieraniem go z zewnątrz, drugi typ polega na zwiększeniu tolerancji na metal pobrany przez symplast. Nikiel dzięki temu, że w niskich stężeniach jest niezbędny roślinie do prawidłowego funkcjonowania nie może być całkowicie wykluczony. Białko *NtCBP4* zlokalizowane w błonie plazmatycznej oddziałuje z jonami Ni^{2+} i jego nadekspresja może osłabiać transport niklu, co pozwala roślinie uniknąć efektu toksyczności. Ołów natomiast nie jest niezbędnym mikroelementem dla rośliny i w każdym stężeniu jest toksyczny, ponieważ roślinne komórki nie posiadają najprawdopodobniej specyficznych transporterów dla ołowiu. Rośliny pobierają jednak zarówno metale toksyczne jak i te będące mikroelementami, a to dzięki temu, że istnieją dla nich nieselektywne kanały transportujące. Autorzy wykazali, że białko *NtCBP* może zwiększyć akumulację Pb w roślinach tytoniu. Wiadomo, że u zwierząt kanały wapniowe są przepuszczalne dla jonów ołowiu (52,53). Możliwe zatem, że u roślin ołów także przenika przez kanały wapniowe (54).

Hirschi i in. (55) wykazali, że ekspresja genu *CAX2* w roślinach tytoniu zmienia zawartość jonów Ca, Cd, i Mn w tych roślinach i czyni je bardziej tolerancyjnymi na

stres wywołany jonami Mn^{2+} . CAX2 pełni rolę transmembranowego antyportera Ca^{2+}/H^{+} transportującego dwuwartościowe kationy do wakuoli. Mn jest mikroelementem, niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania wielu enzymów (56). Toksyczność kadmu jest także ważnym czynnikiem ograniczającym wzrost roślin szczególnie na zakwaszonych, ubogich i wysuszonych glebach (57). Ekspresja CAX2 w transgenicznym uprawach może potencjalnie łagodzić problemy związane z toksycznością Mn^{2+} i pomóc w fitoremediacji Cd^{2+} poprzez unieczynnianie tych jonów w wakuolach.

Rośliny tytoniu z nadekspresją genu CAX2 wykazywały większą tolerancję na jony Mn^{2+} niż rośliny kontrolne. Podwyższoną tolerancję na Mn^{2+} zaobserwowano u 30% transgenicznych roślin (z nadekspresją CAX2). Stężenie jonów Cd^{2+} w korzeniach i pędach roślin transgenicznych różniły się znacznie w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Rośliny z ekspresją CAX2 akumulowały w korzeniach 3-krotnie więcej Cd^{2+} niż rośliny kontrolne. Pędy roślin z ekspresją CAX2 zawierały około 15% więcej Cd^{2+} od roślin kontrolnych. Rośliny z ekspresją CAX2 charakteryzował zwiększony transport Cd^{2+} i Mn^{2+} przez tonoplast. Dla dwóch badanych linii transport jonów Cd^{2+} w korzeniach był 2,1 i 1,6-krotnie wyższy niż u roślin kontrolnych, natomiast w przypadku jonów Mn^{2+} wzrost ten był 3,0 i 2,2-krotny.

Inni autorzy (58) izolowali z *Arabidopsis thaliana* gen ZAT (ang. Zn transporter of *Arabidopsis thaliana*), blisko spokrewniony z ssaczymi genami rodziny ZnT (ang. Zn transporter), szczególnie z ZnT-2, ZnT-3 i ZnT-4 występujące tylko u ssaków i nicienia *C. elegans*. Identyfikacja genu ZAT dowiodła, że także rośliny zawierają geny tego typu. Przeprowadzono transformację *Arabidopsis* przez wprowadzenie genu ZAT w orientacji sensownej pod promotorem 35S wirusa mozaiki kalafiora (CaMV). Ekspresja tego genu zwiększała się pod wpływem wzrastającego stężenia Zn. Uzyskano rośliny transgeniczne o zwiększonej odporności na Zn i podwyższonej jego akumulacji w korzeniach. Gen ZAT może być zaangażowany w sekwestrację jonów Zn, a tym samym może podwyższać odporność transformanta. Zn jest transportowany do wakuoli; stwierdzono 2,5 razy większy stopień transportu Zn przez tonoplast u roślin transgenicznych niż u wrażliwych tego samego gatunku. Zawartość Zn w korzeniach była 2 razy wyższa u roślin transgenicznych, przy podobnym stopniu zahamowania wzrostu korzenia u wszystkich linii. Jednocześnie stwierdzono, że odporność transformantów wzrosła ok. 2-krotnie. Obecność genu ZAT u „normalnych” roślin nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Być może jest on odpowiedzialny za sekwestrację pęcherzykowo/wakuolarną jonów Zn i tym samym za wspomaganie tolerancji u roślin. Dalsze badania pomogą lepiej zrozumieć homeostazę Zn i mechanizmy tolerancji u roślin, co jest niezwykle istotne w fitoremediacji.

Tabela

Geny wprowadzane do roślin oraz efekty ich ekspresji na tolerancję i akumulację pierwiastków śladowych

Gen	Produkt	Źródło genu	Cel wprowadzenia genu	Efekt
<i>mt</i>	metalotioneina	<i>N. glutinosa</i>	<i>N. tabacum</i>	wzrost tolerancji na Cd (0,2 mM)
<i>CUP1</i>	MT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>B. oleracea</i>	około 16-krotny wzrost tolerancji na kadm (400 μ M CdCl ₂).
<i>NtCBP4</i>	kanał kationowy	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	2,5-krotnie wyższa tolerancja na Ni (250 μ M NiCl ₂) Pb-wrażliwe akumulacja Pb – wzrost do 200%
<i>Zat1</i>	Zn transporter	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	2-krotny wzrost odporności na Zn
<i>Atcys-3A</i>	cytoplazmatyczna izoforma OASTL	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	wzrost akumulacji Cd o 72% tolerancja przy 250 μ M CdCl ₂
<i>RCS1</i>	syntaza cysteinowa (CS)	<i>Oriza sativa</i>	<i>N. tabacum</i>	3-krotny wzrost aktywności CS wzrost tolerancji na Cd, niższa akumulacja Cd
<i>CysE</i>	SAT	<i>E. coli</i>	<i>N. tabacum</i>	wzrost aktywności SAT 2-3 krotny wzrost poziomu cysteiny i GSH
<i>gsb1</i>	γ -ECS	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	wzrost akumulacji Cd do 90%
<i>gsb2</i>	GS	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	wzrost akumulacji Cd o 40%
<i>CAX2</i>	CAX2	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	zwiększenie tolerancji na Mn; 3-krotny wzrost akumulacji Cd

6. Podsumowanie

Metale ciężkie są tylko jednym z wielu rodzajów zanieczyszczeń spowodowanych przez działalność człowieka na naszej planecie. Wiele gałęzi przemysłu produkuje szeroki zakres toksycznych związków – od radioaktywnych zanieczyszczeń powstałych w wyniku działalności wojskowej, jak i katastrof nuklearnych, poprzez codzienne zanieczyszczenia produkowane przez miliony samochodów, kotłowni i innych źródeł pochodzących ze spalania paliw kopalnych, aż po odpady organiczne, tj. pestycydy, ropopochodne, materiały wybuchowe (TNT) oraz używane przez nas i wywożone codziennie na wysypiska śmieci tworzywa sztuczne. Bioremediacja, a szczególnie fitoremediacja dostarcza tanich i szybkich metod oczyszczania terenów skażonych. Amerykańska Agencja ds. Ochrony Środowiska (EPA – *Environmental Protection Agency*) szacuje, że dzięki fitoremediacji można zaoszczędzić od 50 do 80% w stosunku do kosztów konwencjonalnych metod przywracania terenów ska-

zonych do środowiska naturalnego. Na ich oczyszczanie na całym świecie w roku 1998 wydano 15-18 miliardów USD (59). Wydatki te wciąż rosną. W Europie Zachodniej jest około 400 000 oficjalnych zanieczyszczonych obszarów, w Stanach Zjednoczonych około 12 000. Specjaliści z dziedziny bioremediacji szacują, że użycie samych tylko traw do fitoremediacji gleb kosztuje 10-35 USD/tonę, podczas gdy spielanie kosztuje aż 200-1500 USD/tonę. Rośliny akumulują i metabolizują organiczne zanieczyszczenia przekształcając je do CO₂ i wody. Rozległe systemy korzeniowe roślin pozwalają pobierać ogromną ilość wody ze składnikami pokarmowymi, mogą także hiperakumulować różne zanieczyszczenia. Wiele roślin posiada naturalne zdolności do hiperakumulacji metali, inne potrafią pobierać duże ilości wody wraz z zanieczyszczeniami. Na nich skupiają się badania i przy użyciu nowoczesnych narzędzi biologii molekularnej próbuje się je ulepszać. Powstają na świecie firmy stosujące fitoremediację w praktyce. Mimo że od przeprowadzenia doświadczeń z roślinami transgenicznymi do wprowadzenia ich do środowiska, naukowców dzieli wiele przeszkód, istnieją już firmy stosujące rośliny zmodyfikowane genetycznie. Badania nad praktycznym zastosowaniem roślin transgenicznych do usuwania metali ciężkich z gleby (59) prowadzone są np. w firmie Applied PhytoGenetics.

Zanim jakakolwiek nowa metoda, także z użyciem organizmów transformowanych, zostanie zastosowana w praktyce, pojawia się wiele pytań: czy jest ona bezpieczna?, czy jest tańsza od dotychczasowych?, czy jest skuteczniejsza? Aby udzielić na nie odpowiedzi, niezbędne są zaawansowane badania w zakresie biochemii, biologii molekularnej, genetyki i innych nauk interdyscyplinarnych.

Fitoremediacja to długotrwały proces, trwający od kilku do kilkunastu lat, podczas gdy metody tradycyjne *ex situ*, trwają kilka dni lub tygodni, poza tym fitoremediacja jest ograniczona do okresu wegetacyjnego roślin (kilka miesięcy w roku), a zatem zależy również od warunków atmosferycznych. Proces oczyszczania środowiska musi zostać uzupełniony o inne metody, w tym konwencjonalne, które, jak wiadomo, nie są korzystne dla równowagi ekologicznej. Gleby oczyszczane za pomocą roślin muszą być równocześnie użyteczne rolniczo, a zatem cechować się odpowiednią strukturą, odpowiednim pH, zasoleniem, wilgotnością, natlenieniem, zawartością związków mineralnych i organicznych (1).

Inną wadą wprowadzania tej metody jest fakt, że rośliny przeznaczone do niej nie są dostatecznie przetestowane w warunkach polowych (1). W przypadku roślin transgenicznych hodowanych hydroponicznie lub szklarniowo, przeniesienie ich na podłoże glebowe (na pole), gdzie biodostępność zanieczyszczeń jest dużo mniejsza niż w warunkach laboratoryjnych, może pokazać, że efektywność metody jest daleka od przewidywanej (5).

Istnieje zagrożenie, że w wyniku rozprzestrzenienia się roślin zawierających metale ciężkie lub toksyczne związki organiczne, może dojść do zatrucia u zwierząt i ludzi (1,59).

Kolejnym problemem jest deponowanie i usuwanie roślin będących toksycznymi odpadami ze względu na zawartość metali ciężkich czy innych substancji toksycz-

nych (59). Ryzyko wiąże się także z rozprzestrzenieniem się roślin transgenicznych efektywnych w fitoremediacji, mogą się one krzyżować z innymi osobnikami tego samego gatunku, co może spowodować poważne konsekwencje; również ekspresja transgenu jest trudna do przewidzenia w 100% (1,5,59).

Ważnym aspektem jest niska akceptacja społeczeństwa dla stosowania roślin transgenicznych, a z tym wiąże się rozwój rynku fitoremediacyjnego (59).

Wspomniana ekonomiczna opłacalność przechyła jednakże szalę na korzyść czystego środowiska (59). Nie jest potrzebny kosztowny, wyszukany sprzęt, czy drogie czynniki ekstrakcyjne do metod chemicznych. W fitoremediacji do uprawy roślin na terenach skażonych stosuje się tradycyjne agrotechniki. Ponadto dużą rolę odgrywa skuteczna ekstrakcja szerokiego zakresu zanieczyszczeń – korzenie są zdolne do usuwania toksycznych związków nawet z mikroporów gleby, stanowiących do 70% jej objętości, dzięki dużemu zapotrzebowaniu rośliny na wodę. Razem z wodą przenoszone są nie tylko substancje odżywcze, ale również zanieczyszczenia.

Fitoremediacja jest metodą nieinwazyjną, tzn. że zanieczyszczenia usuwane są *in situ*, bez konieczności mechanicznego niszczenia środowiska, co wiąże się zawsze z metodami konwencjonalnymi. W dużym stopniu zapobiega ona także erozji gleby oraz dyspersji zanieczyszczeń do środowiska – atmosfery, wód i gleby. Tradycyjne metody wymagają najpierw usunięcia roślinności, co prowadzi do wymienionych procesów zwiększających zniszczenie naturalnych ekosystemów, ale może być stosowana jednocześnie z metodami konwencjonalnymi, które stosowane są jako pierwsze, po czym tereny wstępnie oczyszczone zasiedlane są roślinami w celu fitoremediacji i zmniejszenia zniszczeń poczynionych przez fizyczne i mechaniczne metody oczyszczania. Takie jednoczesne wykorzystywanie metod prowadzi do redukcji kosztów związanych z tradycyjnymi technikami i do skrócenia czasu fitoremediacji. Ponadto sadzenie odpowiednich gatunków roślin na terenach zagrożonych skażeniem mogłoby zmniejszyć niebezpieczeństwo degradacji środowiska naturalnego (1).

Ogromną zaletą tej przyszłościowej metody jest jednoczesne utworzenie nowego rynku pracy dla badaczy zajmujących się różnymi dziedzinami – biochemików, gleboznawców, leśników, botaników, biologów molekularnych czy hydrogeologów, których wiedza jest z pewnością niezbędna dla rozwoju fitoremediacji (60). Korzystne są także zmiany ekonomiczne na rynku powstających firm, zajmujących się fitoremediacją. Rynek podwoił swoje dochody w roku 1999 w porównaniu z rokiem 1998. Według szacunkowych danych wynika, że z ok. 16,5-29,5 mln USD w 1998 r. do ok. 30-49 mln USD w 1999 r. Raport Glassa przewidywał w 1999 r., że obroty w 2000 r. sięgną sumy 50-86 mln USD, 100-170 mln USD w 2002 r., a w 2005 r. wzrosną do 235-400 mln USD. W tym samym raporcie wykazano jednak, że wzrost obrotów na rynku fitoremediacyjnym w roku 1999 nie był tak wysoki jak przewidywano. Spowodowane było to prawdopodobnie tym, że zastosowanie fitoremediacji w oczyszczaniu obszarów skażonych metalami ciężkimi i radionuklidami nie znalazło spodziewanego, komercyjnego zainteresowania. Stany Zjednoczone są obecnie największym rynkiem w dziedzinie ochrony środowiska. Mniejsze, choć równie prężne centrum dla fitoremediacji stanowi Eu-

ropa Zachodnia, a szczególnie kraje Unii Europejskiej, ale także Kanada oraz w niewielkim, ale widocznym stopniu, część Azji. Kraje czekające na wejście do UE, np. Polska, są również znaczącym potencjalnym rynkiem dla zastosowania fitoremediacji, ponieważ będą musiały dostosować prawo dotyczące ochrony środowiska do wymogów Unii. Prawo to sprzyja rozwojowi firm zajmujących się remediacją zanieczyszczeń (61,62). Oczywiście zastosowanie roślin transgenicznych w warunkach polowych jest obwarowane pewnymi określonymi regulacjami prawnymi. Na przykład w USA, wprowadzenie rośliny transformowanej na pole wymaga zawiadomienia Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA) z 30-dniowym wyprzedzeniem. Z kolei w UE wprowadzenie GMO do środowiska naturalnego musi być zatwierdzone zgodnie z dyrektywą 2001/18/EC, a wcześniej należy przygotować badania oceny ryzyka związanego z tym przedsięwzięciem. Są to dane z grudnia 2001 r. (59).

Jedną z najważniejszych kwestii jest akceptacja społeczeństwa dla tak estetycznej, naturalnej i mało inwazyjnej metody jaką jest fitoremediacja oraz, co najważniejsze, dla uprawiania roślin transgenicznych. Jeśli staną się one powszechnym narzędziem w rękach naukowców i firm fitoremediacyjnych, to uzyskamy możliwość naprawy tego, co w tak wielkim stopniu zniszczyliśmy, a to co jest najważniejsze dla naszego zdrowia to przecież czyste, naturalne środowisko.

Praca finansowana z grantu KBN nr 2PO4G 069 26.

Literatura

1. Wójcik M., (2000), *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych*, 49, 1-2, 135-147.
2. Clemens S., (2001), *Planta*, 212, 475-486.
3. Kaerenlampi S., Schat H., Vagrosfeld J., Verkleij J. A. C., van der Lelie D., Mergeay M., Tervahauta A. I., (2000), *Environmental Pollution*, 107, 225-231.
4. Hall J. L., (2002), *Journal of Experimental Botany*, 53, 366, 1-11.
5. Creamer U., Chardonnens A. N., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 661-672.
6. Cobbett S. C., (2000), *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 211-216.
7. Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y-P., Rea P. A., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7110-7115.
8. Hammer D. H., (1985), *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 913-951.
9. Steffens J. C., (1990), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 41, 553-575.
10. Margoshes M., Vallee B. L., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4813-4814.
11. Cobbett C., Goldsbrough P., (2002), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 159-182.
12. Eds. Suzuki K.T., Imura N., Kimura M., (1993), *Metallothionein in III*, Birkhauser Verlag, Basel.
13. Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C., Jackson P. J., (1993), *Biochem. J.*, 295, 1-10.
14. Lane B. G., Kajioka R., Kennedy T. D., (1987), *Biochem. Cell. Biol.*, 65, 1001-1005.
15. White C. N., Rivin C. J., (1995), *Plant Physiol.*, 108, 831-832.
16. Kawashima I., Kennedy T. D., Chino M., Lane B. G., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 209, 971-976.
17. Buchanan-Wollaston V., (1994), *Plant Physiol.*, 105, 839-846.
18. Garcia-Hernandez M., Murphy A., Taiz L., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 387-397.
19. Hsieh H. M., Liu W. K., Huang P. C., (1995), *Plant Mol. Biol.*, 28, 381-389.
20. Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S., (1999), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39, 267-294.
21. Choi J.-J., Kim H. M., Yun H. K., Park J. A., Kim W. T. Bok S. H., (1996), *Plant Physiol.*, 112, 353-359.
22. Snowden K. C., Richards K. D., Gardner T. C., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 341-348.
23. Zhou J., Goldsbrough P. B., (1994), *Plant Cell*, 6, 875-884.

24. Curie C., Alonso J. M., Le Jean M., Ecker J. R., Briat J. F., (2000), *Biochem. J.*, 347, 749-755.
25. Thomine S., Wang R., Ward J. M., Crawford N. M., Schroeder J. I., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4991-4996.
26. Clemens S., Antosiewicz D. M., Ward J. M., Schachtman D. P., Schroeder J. I., (1998), *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12043-12048.
27. Kampfenkel K., Kushnir S., Babiychuk E., Inze D., van Montagu M., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 28479-28486.
28. Saier M. H. Jr., (2000), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 354-411.
29. Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M. L., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5624-5628.
30. Cohen C. K., Fox T. C., Garvin D. F., Kochian L. V., (1998), *Plant Physiol.*, 116, 1063-1072.
31. Korshunova Y. O., Eide D., Clark W. G., Guerinot M. L., Pakrasi H. B., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 40, 37-44.
32. Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H., (1999), *The Plant J.*, 20, 171-182.
33. Ortiz D. F., Ruscitti T., McCue K. F., Ow D. W., (1995), *J. Biol. Chem.*, 27, 4721-4728.
34. Salt D. E., Rauser W. E., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 1293-1301.
35. Rea P. A., Li Z-S., Lu Y-P., Drozdowicz Y. M., Martinoia E., (1998), *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 727-760.
36. Salt D. E., Wagner G. J., (1993), *J. Biol. Chem.*, 269, 12287-12302.
37. Hirschi K. D., Zhen R. G., Cunningham K. W., Rea P. A., Fink G. R., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8782-8786.
38. Liu J. R., Suh M. Ch., Choi D., (2000), *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 43, 126-130.
39. Hasegawa I., Terada E., Sunairi M., Akita H., Shinmachi F., Noguchi A., Nakajima M., Yakazi J., (1997), *Plant. Soil.*, 196, 277-281.
40. Farago, S., Brunold C., (1994), *J. Plant Physiol.*, 144, 433-437.
41. Lunn J. E., Droux M., Marti J., Douce R., (1990), *Plant Physiol.*, 94, 1345-1352.
42. Dominguez-Solis J. R., Gutierrez-Alcala G., Romero L. C., Gotor C., (2001), *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 9297-9302.
43. Harada E., Choi Y. E., Tsuchisaka A., Obata H., Sano H., (2001), *J. Plant Physiol.*, 158, 655-661.
44. Błaszczyk A., Brodzik R., Sirko A., (1999), *The Plant J.*, 20, 237-243.
45. Kredich N. M., Becker M. A., Tomkins G. M., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 2428-2439.
46. Denk D., Boeck A., (1987), *J. Gen. Microbiol.*, 133, 515-525.
47. Rennenberg H., Will B., (2000), *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, Eds. C. Brunold et al., Paul Haupt, Bern, Switzerland, 393-398.
48. Bergmann L., Rennenberg H., (1993), *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants*, Eds. L. J. de Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold, W. E. Rauser, SBP Acad. Publ., The Hague, 109-123.
49. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 73-79.
50. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A. S., Weber S. U., Jouanin L., Terry N., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 1169-1177.
51. Welch R. M., (1995), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14, 49-82.
52. Simons T. J. B., Pocock G., (1987), *J. Neurochem.*, 48, 383-389.
53. Tomsing J. L., Suszkiw J. B., (1991), *Biochim. Biophys. Acta*, 1069, 197-200.
54. Huang J. W., Cunningham S. D., (1996), *New Phytol.*, 134, 75-84.
55. Hirschi K. D., Korenkov V. D., Wilganowski N. L., Wagner G. J., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 125-133.
56. Marschner H., (1995), *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, San Diego.
57. Horst W. J., (1988), *Manganese in Soils and Plants*, Eds. R. D. Graham, R. J. Hannam, N. C. Uven, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 175-188.
58. van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E., Chardonnens A. N., Schat H., Verkleij A. C., Hooykas P. J. J., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 1047-1056.
59. Watanabe M. E., (2001), *Nature Biotechnology*, 19, 1111-1115.
60. Black H., (1999), *The Scientist*, 13(5), 1.
61. Glass D., (1998), *The United States Market for Phytoremediation*, D. Glass Associates, Inc. <http://www.chanel1.com/users/dglass/INFO/phytexec.htm>
62. Glass D., (1999), *U.S. and International Markets for Phytoremediation, 1999-2000*. D. Glass Associates, Inc. <http://www.chanel1.com/users/dglass/INFO/phy99exc.htm>