

KOMÓRKOWY SYSTEM DETOKSYKACJI ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH U ROŚLIN*

PLANT CELL DETOXIFICATION SYSTEM OF ORGANIC POLLUTANTS

Agata ZEMLEDUCH, Barbara TOMASZEWSKA

Zakład Biochemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Streszczenie: Komórkowy system detoksykujący organiczne ksenobiotyki obejmuje trzy fazy. W każdej z nich uczestniczy szereg enzymów, które w zależności od charakteru degradowanego związku organicznego prowadzą do jego przekształceń. Enzymami fazy pierwszej, a więc bioaktywacji są głównie polisubstratowe monooksygenazy (ang. *PolySubstrate MonoOxygenase*), monooksygenazy flawinowe (FMO) oraz enzymy wykazujące aktywność hydrolityczną i oksydoredukcyjną. Indukcję tych enzymów pod wpływem ksenobiotyku potwierdzają badania prowadzone metodą SAGE (ang. *Serial Analysis of Gene Expression*). Produkty fazy pierwszej stają się substratami fazy drugiej, a więc fazy koniugacji z endogennym substratem. Sprzęganie z cukrowcem katalizują UDP-zależne transferazy, z aminokwasem – N-acetylo transferazy (ACT), natomiast z glutationem – najbardziej zróżnicowana podzielona na 5 klas i mająca ponad 20 form izoenzymatycznych rodzina transferaz glutationowych (GST). Transport powstałych koniugatów przez tonoplast prowadzi grupa Mg i ATP-zależnych transporterów (ang. *ATP-binding Cassette*). Ksenobiotyki zgromadzone w wakuoli podlegają dalszym modyfikacjom pod wpływem peroksydaz i karboksypeptydaz. Poza enzymami uczestniczącymi w trzech fazach detoksykacji związków organicznych w procesie ich degradacji, ważny jest enzymatyczny system obrony antyoksydacyjnej komórki warunkujący stopień tolerancji rośliny na stres związany z zanieczyszczeniem organicznym.

Słowa kluczowe: detoksykacja, zanieczyszczenia organiczne, fitoremediacja.

Summary: The cell system that detoxifies organic xenobiotics comprises three stages. Each of them involves a number of enzymes that, depending on the character of the degraded organic compound, lead to its transformations. The enzymes of the first stage – bioactivation – are generally polysubstrate monooxygenases, flavine-containing monooxygenases (FMO), and the enzymes showing hydrolytic and oxidoreductive activity. Induction of the enzymes influenced by xenobiotic has been confirmed by the SAGE studies (Serial Analysis of Gene Expression). The products of the first stage become the substrates of the second stage, that is the stage of conjugation with endogenous substrate. Couplings with glucose catalyze the UDP-dependent transferases with the aminoacid-N-acetyl transferase (ACT), while those with glutathione – the most diversified divided into 5 classes and consisting of 20 isoenzymatic forms – the

*Praca finansowana z grantu KBN 2P04G06926.

glutathione transferase family (GST). The transport of the resulting conjugates through tonoplast is led by the Mg group and ATP-dependent transporters (ATP-binding Casette). The xenobiotics accumulated in a vacuole are further modified under the influence of peroxidases and carboxypeptidases. Except for the enzymes involved in the three stages of detoxification of organic compounds, there is an enzymatic system for cell antioxidative protection, conditioning the level of plant tolerance to stress caused by organic contamination, which is also very important in the degradation process.

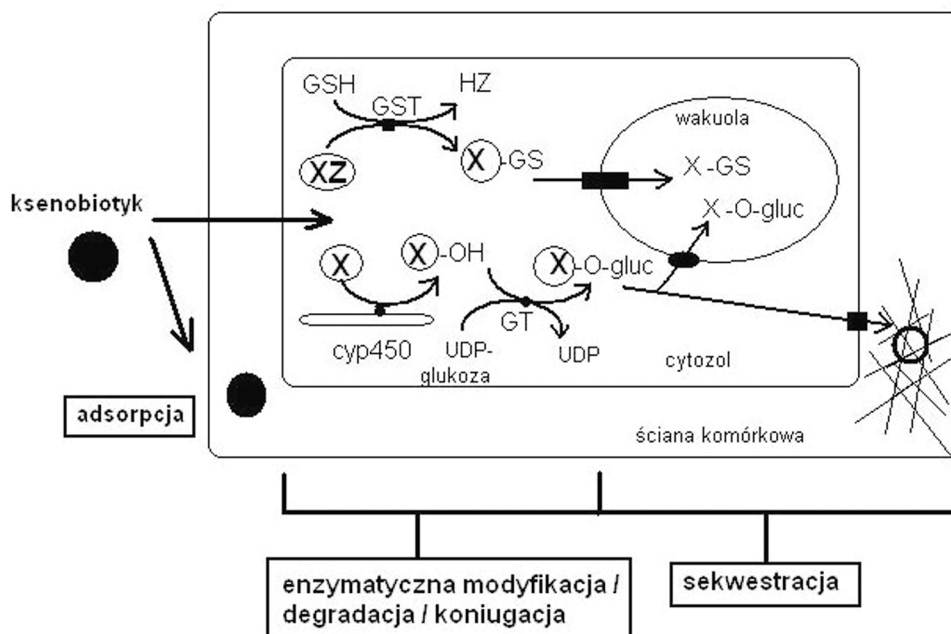
Key words: detoxification, organic pollutants, phytoremediation.

1. WSTĘP

Komórka roślinna stanowi wysoce skuteczny i wydajny system unieczynniania niebezpiecznych związków chemicznych. Ta zdolność do ochrony i obrony przed negatywnym działaniem ksenobiotyków ma znaczenie, między innymi, w kontekście zjawiska odporności na herbicydy i jest podstawą fitoremediacji [16]. Należy zauważyć, że substancje zanieczyszczające środowisko są przeważnie wytworami człowieka i pojawiły się dopiero stosunkowo niedawno w skali procesów ewolucyjnych, dając roślinom ograniczoną możliwość rozwoju mechanizmów obrony przed ich toksycznym działaniem – poza już wykształconymi. Działają one przeciwko naturalnym ksenobiotykom, tzn. związkom produkowanym przez różne gatunki lub powstającym w wyniku pożarów lasów itp. procesów zachodzących, odkąd pojawiły się rośliny wyższe. Biotransformacje, degradacje zanieczyszczeń w organizmach żywych często przebiegają w tych samych warunkach, co “normalny” metabolizm, aktywne są takie same enzymy. Detoksykację (przekształcanie toksycznych substratów w nieaktywne biologicznie pochodne) odróżnia to, że obiekty tych przemian nie stanowią dla autotroficznej komórki roślinnej źródła budulca (węglą i azotu) ani energii [15,19,32]. Kiedy zauważony został ten olbrzymi potencjał i analogie do systemu odtruwania opisanego dla organizmów zwierzęcych (na poziomie metabolitów, klas enzymów i sekwencji cDNA) – powstał tzw. model zielonej wątroby (ang. *green liver concept*), dotyczący losów ksenobiotyków w komórkach roślin [33]. Ich włączenie w pewien cykl przemian ma na celu umożliwienie bardzo restrykcyjnej dystrybucji w przedziałach organizmu. Zmniejsza się biologiczny czas półtrwania cząstek toksycznych, przez co skraca się też czas ekspozycji rośliny na ten czynnik i jego akumulacja. Osiągane jest to, między innymi, przez obniżenie zdolności zanieczyszczeń do rozmieszczenia w błonach poprzez zwiększenie ich rozpuszczalności w wodzie [5]. Całkowita degradacja związków organicznych (mineralizacja) w komórkach zachodzi rzadko, natomiast produkty biotransformacji, będące fragmentami cząsteczek macierzystych mogą być wykorzystywane np. przy syntezie aminokwasów albo sprzęgane z naturalnymi składnikami roślin [32].

2. FAZY DETOKSYKACJI KSENOBIOTYKÓW W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

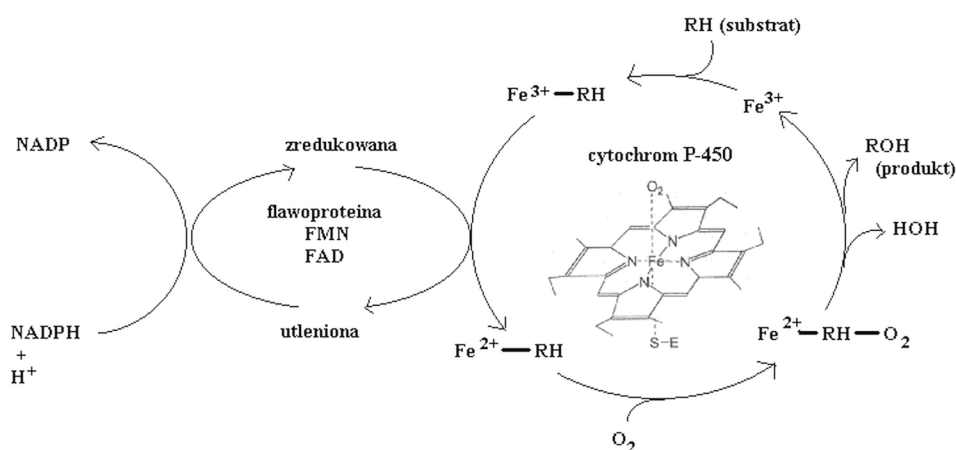
W procesie detoksykacji można wyróżnić kilka faz, charakteryzujących się udziałem różnych klas enzymów, przeznaczeniem i właściwościami produktów ich reakcji. Zazwyczaj są to trzy główne etapy: **I bioaktywacja** – odsłonięcie lub wygenerowanie w ksenobiotyku reaktywnych grup chemicznych (poprzez działanie hydrolityczne, oksydoredukcyjne lub tym podobne), co przygotowuje związek do faktycznej detoksykacji w fazie II; **II koniugacja z endogennym substratem** – co czyni związek mniej niebezpiecznym (zazwyczaj elektrofilowe związki zanieczyszczające stanowią zagrożenie dla nukleofilowych składników komórki) i bardziej hydrofilnym, następnie III faza służy usunięciu z cytozolu takich zainaktywowanych pochodnych; **III faza kompartmentacji** – zachodzi w niej przetransportowanie koniugatów do wakuoli lub apoplastycznych przedziałów komórki (nie ma wielkich możliwości wydalenia jak u zwierząt i niektórych roślin wodnych), jest to proces aktywny, katalizowany przez usytuowane w błonach komórkowych pompy ATP-zależne. Pozwala on na bezpieczne zdeponowanie pochodnych toksyn oraz ich ewentualny dalszy rozkład (ryc.1) [5,15,16].



RYCINA 1. Mechanizm tolerancji zanieczyszczeń organicznych w komórce roślinnej (zmodyfikowano wg [16])

3. KOMÓRKOWE SYSTEMY ENZYMATYCZNE I ICH UDZIAŁ W DEGRADACJI ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

Wśród enzymów I fazy detoksykacji najważniejszą rolę pełnią polisubstratowe monooksygenazy (E.C.1.14.14.1, ang. *PolySubstrate MonoOxygenase*; PMSO, inaczej oksydazy o funkcji mieszanej). Tworzą one złożone układy katalityczne, w których skład wchodzi: cząsteczki cytochromu P-450 i reduktazy NADPH-cytochrom P-450, zlokalizowane we frakcji mikrosomalnej komórki oraz występujące w postaci rozpuszczonej w cytoplazmie. Reduktaza cytochromowa (E.C.1.6.2.4) jest flawoproteina, nie ma form izoenzymatycznych [19,32,39]. W przeciwieństwie do niej cytochrom P-450 może wnosić do składu PSMO ponad 20 izoform. Jest on hemoproteina, mającą w strukturze także grupę tiolową. Drugi człon nazwy pochodzi od wartości absorpcji zredukowanej formy enzymu, a jego masa cząsteczkowa to ok. 55 kDa [16,19]. Podstawowe reakcje katalizowane przez systemy współdziałające z cytochromami P-450 wiążą się z wprowadzeniem tlenu do cząsteczki substratu. Nośnik tlenu to grupa prostetyczna – pochodna protoporfiryny IX z centralnie położonym jonem Fe^{3+} [36]. Ogólnie bilans sumaryczny przekształcenia zachodzącego z udziałem PSMO można przedstawić w postaci następującego równania: $\text{XH} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{XOH} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$ [16,19]. Jego istotą jest przeniesienie (w dwóch oddzielnych reakcjach) dwóch pojedynczych elektronów (w postaci jonu wodorkowego, z NADPH) do kompleksu substrat - cytochrom P-450 - tlen (w wyniku sprzężenia cytochromu z reduktazą) i aktywacja cząsteczki O_2 , która ulega rozpadowi, gdzie jeden atom służy do utlenienia ksenobiotyku, a drugi do utworzenia cząsteczki wody (ryc. 2) [36,41]. Z biegiem lat w każdej klasie organizmów odkrywano coraz więcej genów cytochromów

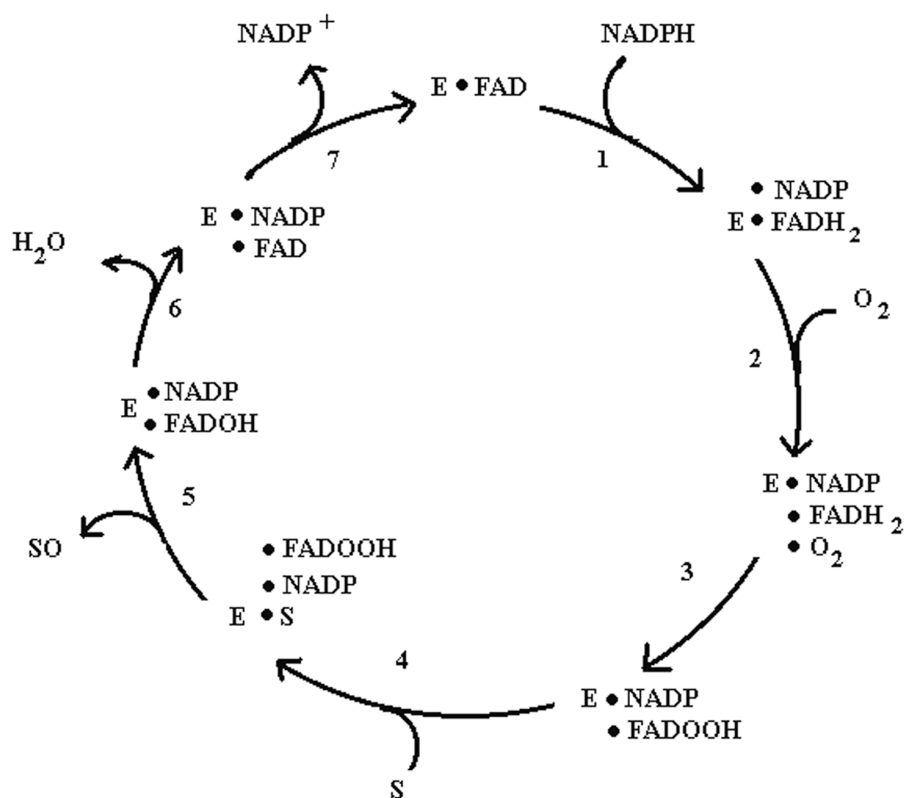


RYCINA 2. Schemat mechanizmu działania systemu PSMO (zmodyfikowano wg [19])

P-450, obecnie jest to największa rodzina białek enzymatycznych u roślin wyższych. W bazach danych jest już ponad 1052 sekwencji otrzymanych z małej części obecnie znanych roślin (poznano 356 genów u ryżu *Oryza sativa*, a 273 u rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* – co stanowi około 1% całego genomu) [14,15,39]. Ewolucja takiego tworzywa jest oczywista, jeśli wziąć pod uwagę kompleksowość i różnorodność związków chemicznych syntetyzowanych z jego udziałem przez rośliny, np. naturalnych produktów służących do komunikowania się z otoczeniem, odstraszania patogenów, roślinożerców itp. Dodatkowo wielokrotne duplikacje i inne zjawiska związane ze zmiennością na poziomie informacji genetycznej umożliwiły im wykształcenie zdolności równie efektywnej detoksykacji substancji egzogennych [28]. Wiąże się to z wyjątkowo szeroką specyficzną substratową cytochromów, ich zdolnościami do katalizy bardzo zróżnicowanych reakcji, często stereospecyficznych. Dzięki takim właściwościom cytochromów P-450, możliwe jest ich współdziałanie w PSMO w rozkładzie różnorodnych związków chemicznych. Uczestniczą one w dealkilacji ksenobiotyków (w tym O-, N-, S-demetylacji), hydroksylacji (w łańcuchu alifatycznym i pierścieniu), utlenianiu, dehydrogenacji, epoksydacji, redukcji (w deficycie tlenu), izomeryzacji, dearylacji, sulfoksydacji itd. [19,32,36]. Enzymy te zaangażowane są więc w reakcje biosyntezy, produkcję wielu metabolitów drugorzędowych, biorą udział w przemianach takich związków, jak: fenylopropanoidy, terpenoidy, kwasy tłuszczowe, hormony, a także herbicydy i inne zanieczyszczenia organiczne. Dodatkowo różne izoenzymy mogą wykazywać odmienną reaktywność względem różnych substratów, także toksycznych. Chociaż ich działanie w większości przypadków powoduje i ma służyć detoksykacji, a wbudowywane grupy ułatwiać proces sprzęgania, istnieją ważne wyjątki od tej reguły. Niekiedy ta tzw. faza bioaktywacji ksenobiotyków powoduje dosłownie ich konwersję do reaktywnych, stabilnych i groźnych trucizn (np. powstawanie epoksydów i rodników) [41]. Po wnikięciu zanieczyszczeń do komórki, obserwuje się spadek aktywności reakcji biosyntezy i przekształceń zachodzących naturalnie, na rzecz biotransformacji substancji bardziej niebezpiecznych – w takim stopniu, że nawet 80% cytochromów może być zaangażowanych w detoksykację. Takie podejście wywołane jest większym niż substratów endogennych powinowactwem ksenobiotyków do tych enzymów [39]. PMSO są katalizatorami indukowanymi, co prowadzi najczęściej do syntezy *de novo* potrzebnych białek [19]. Często induktory aktywności tego systemu są jednocześnie jego substratami – np. indole, flawony, sterole, chinony, związki N-heterocykliczne, węglowodory (w tym chlorowane pestycydy, takie jak: aldrin, heksachlorobenzen itp.). Wyjątek to np. PCB (polichlorowane bifenyle) związki o zbyt dużej cząsteczce, by mogły być metabolizowane przez PMSO, poza tym kompleks nie działa skutecznie na wiązania C-C i C-fluorowiec [19,36,41]. Okresowa indukcja jest korzystna ze względu na oszczędną gospodarkę energetyczną oraz zapobieganie nagromadzeniu ewentualnych toksycznych produktów utlenienia [19]. Poszczególne izoenzymy cytochromu P-450 mogą być indukowane selektywnie przez określone związki chemiczne, co stwarza możliwości wykorzystania tego mechanizmu w fitoremediacji [15]. Badania modulacji ekspresji genów w komórce roślinnej po ekspozycji na zanieczyszczenia wykazują np. 14-krotne w porównaniu z kontrolą podwyższenie częstości wykrywania

znacznika przypisanego różnym cytochromom, tak jak w przypadku korzeni *A.thaliana* stymulowanej 24-godziną obecnością TNT (2,4,6-trinitrotoluen), w stężeniu 15 mg/l pożywki [10]. Wyniki innego eksperymentu ukazują też głębsze różnice w indukcji poszczególnych genów CYP-450 w korzeniach sadzonek. Spośród dziewięciu analizowanych sekwencji, sześć (przypisanych CYP81D11, CYP706A2, CYP71A12, CYP71B6, CYP89A6, CYP708A3) ulegało wzmożonej ekspresji tylko pod wpływem TNT, dwie (CYP79F2 i CYP705A30) tylko przy RDX (1,3,5-trinitro-2-oxo-1,3,5-triazacykloheksan), a transkrypcja jednej (CYP71A20) była indukowana przez oba związki [11]. Znane są również sprzeczne, z wymienionymi, obserwacje niewielkiej lub żadnej indukcji cytochromów przez tego typu zanieczyszczenia [25]. Te rozbieżne wyniki przypisano dłuższemu okresowi trwania tego eksperymentu (poziom ekspresji genów mógł wrócić do normalnego stanu) oraz temu, że badaniu poddana została cała roślina rzodkiewnika, a nie tylko jego korzenie.

W utlenianiu ksenobiotyków uczestniczą także monooksygenazy flawinowe (ang. FMO, E.C.1.14.13.18). Ich aktywność jest związana z koenzymem FAD, wymagają też NADPH i tlenu (ryc. 3). Enzymy te utleniają przede wszystkim nukleofilowe związki azotu i siarki. Mogą katalizować również sulfoksydację sulfidów, sulfoksydów, tioli czy karbaminianów. Występują one w postaci związanej z błonami [4,19].



RYCINA 3. Schemat mechanizmu reakcji monooksygenaz (zmodyfikowano wg [19])

Fenolooksydaza – białko zlokalizowane w chloroplastach lub wydzielane na zewnątrz komórki – ma w swojej cząsteczce atom miedzi. Jej aktywność monooksygenazy i oksygenazy powoduje powstawanie fenoksyrodników, które mogą następnie polimeryzować [1,2,23,39].

Poza enzymami utleniającymi, w I fazie detoksykacji ksenobiotyków u roślin uczestniczą również enzymy wykazujące aktywność hydrolityczną. Są to między innymi amidazy (E.C.3.5.1.4), proteazy (E.C.3.4._._), hydrolazy epoksydowe (E.C.3.3.2.3.), a także karboksyloesterazy (E.C.3.11.1.). Charakteryzują się one specyficnością substratową uwarunkowaną konfiguracją przestrzenną [15,19,32].

Za redukcję natomiast odpowiadają nitroreduktazy, enzymy występujące w cytozolu, wymagające do działania NAD(P)H. Dzieli się je na dwa typy, ze względu na aktywność w obecności tlenu molekularnego (typ II jest na niego wrażliwy, typ I nie), liczbę przenoszonych elektronów (typ I – $2e^-$, typ II – $1e^-$) i powstające produkty. Roślinne nitroreduktazy typu II to np. reduktaza chinonu (QR, E.C.1.6.99.2), reduktaza glutationu (GR, E.C.1.6.4.2), reduktaza cytochromu c (E.C.1.6.2.4), dehydrogenaza ksantyny (E.C.1.1.1.204), oksydaza aldehydu (E.C.1.6.2.4) itd. [1,7,25,26,29,32]. Redukcja estrów i innych związków nitrowych może zachodzić z udziałem NADPH-zależnych flawoenzymów, tzw. OPR (ang. *12-oxophyto-dienoate reductase*) [25]. Enzymy te występują w trzech izoformach, z których ekspresja form 1. i 2. może być indukowana czynnikami stresowymi, np. obecnością ksenobiotyków. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych metodą SAGE (ang. *Serial Analysis of Gene Expression*), ukazujące 10-krotną indukcję pod wpływem TNT obecnego w pożywce *A. thaliana*. Analiza ich mRNA metodą RT-PCR pozwoliła dokładniej scharakteryzować różnice w ekspresji obu izoenzymów, OPR1 i 2 [10,27]. W eksperymencie tym czynnikami stresowymi (działającymi przez 48 godzin na 2-tygodniowe rośliny *A. thaliana*) były herbicydy, 0,6 mM acetochlor i 2 mM metolachlor i substancje wybuchowe: 0,6 mM TNT i 0,3 mM RDX. Obserwowano maksymalnie 11-krotną indukcję OPR2 przez TNT, po 6 godzinach ekspozycji. Natomiast ekspresja OPR1 wykazywała mniejszą zależność od obecności TNT i RDX, największy był 3–4-krotny wzrost ilości transkryptów notowany po 3 godzinach. Efekt podania herbicydów, następujący dopiero po 24 godzinach, przypisuje się raczej stresowi oksydacyjnemu [27].

Produkty reakcji przekształceń obejmujących I fazę detoksykacji mogą stać się substratami w kolejnych transformacjach. Związki lipofilne, które przeszły przez ten wstępny etap konwersji, mają odtąd w swojej strukturze takie grupy, jak: hydroksylowa, karboksylowa i aminowa. Poprzez te grupy może nastąpić ich sprzężenie z endogennymi metabolitami o małej aktywności biologicznej [19,39]. W zależności od właściwości ksenobiotyku, substratami wykorzystywanymi w tym celu są węglowodany (głównie glukoza, ale też inne cukry proste, takie jak: galaktoza, mannoza, arabinoza, ryboza i celobioza, a także 2- i 3-cukry, np. ksylozyloglukoza), aminokwasy (glutaminian, glicyna, alanina, leucyna i cysteina), kwasy karboksylowe (np. malonowy) czy peptydy (jak glutation) [5,18,32,39]. Takie koniugaty pochodnych zanieczyszczeń z naturalnymi komórkowymi nukleo- i elektrofilami charakteryzują

się jeszcze większą hydrofilowością, a to warunkuje ich mobilność i ułatwia dalsze rozdysponowanie.

Za przyłączenie reszty węglowodanowej do ksenobiotyków, zawierających grupy: -OH, aminowe, -COOH i -SH, odpowiadają enzymy spośród UDP-zależnych transferaz cukrowców (E.C.2.4.1.). Większość z nich jest rozpuszczona w cytozolu, ale mogą być też związane z błonami. Składają się z dwóch polipeptydów, a ich masa cząsteczkowa wynosi 40–61 kDa [5,24,32,39]. Badania genetyczne (analizy sekwencji oraz substratów) pozwoliły wyróżnić do tej pory 77 rodzin glikozylotransferaz. Na podstawie porównań filogenetycznych utworzono 14 grup (A-N) spośród około 118 prawdopodobnych sekwencji UGT opisanych u *A. thaliana* [3,20,24]. Grupy A, D, E, H i L mają powyżej 10 członków, podczas gdy inne nie mają nawet trzech. Różnice między nimi polegają między innymi na charakterze katalizowanej reakcji, np. izozymy z grupy L są zaangażowane głównie w formowanie estrów glukozowych, a z grupy E produkują O-glikozydy. Zróżnicowana jest również specyficzność substratowa, regio- i enancjoselektywność. Donorami węglowodanów są UDP-glukoza, UDP-ramnoza i UDP-ksyloza itp. Badania potwierdzają, że ten sam enzym może czasem rozpoznawać zarówno endogenne, jak i egzogenne związki chemiczne (może zachodzić kompetycja o to samo miejsce aktywne) i z różną aktywnością brać udział w detoksykacji, jak i I- i II-rzędowym metabolizmie. Glikozylotransferazy odgrywają rolę w biosyntezie wielu kluczowych produktów roślinnych, takich jak: flawonoidy, glikoalkaloidy, glikozydy kwasu salicylowego i hormony. Odpowiadają one za powstawanie koloru kwiatów, stabilizację lotnych fenoli i terpenoidów – związaną z okresem owocowania (np. warunkowanie smaku owoców) itp. [3,5,12,24]. Proste koniugaty ksenobiotyk-reszta cukrowcowa często są poddawane kolejnemu procesowi sprzęgania, powstają wtedy np. glikozyloglukozydy lub inne pochodne, np. 6-O-malonyloglukozydy. Ten drugi metabolit tworzy się w wyniku działania malonylotransferazy, używającej malonylo-CoA jako donora grupy acylowej [5]. Glikozylacja to ważny sposób utrzymywania ładunku wewnątrz komórki, buforowania wpływu biotycznych i abiotycznych czynników działających na roślinę z zewnątrz (np. warunkuje odporność na infekcje wirusowe) [3]. Wytworzenie odpowiedniego połączenia kowalencyjnego wpływa nie tylko na detoksykację związku chemicznego, jego stabilność, właściwości chemiczne i bioaktywność, umożliwia też jego transport, a nawet bywa sygnałem kierującym do określonego przedziału komórki. Znany jest efekt modyfikowania w ten sposób naturalnych metabolitów, takich jak np. O-malonyloglikozydy antocyjanów, które są składowane w wakuoli. Proponowana rola grupy malonowej to w tym przypadku ochrona wiązania β -glikozydowego. Generalnie, uważa się, że takie połączenie może być odwracalne (malonyloesterazy, zlokalizowane w cytoplazmie i wakuoli), natomiast N-malonylacja jest bardziej trwała [18,32]. Innym przykładem mogą być rośliny *A. thaliana* i soja (*Glycine max*), które wykazują różne drogi metabolizmu DCA (3,4-dichloroanilina).

U rzodkiewnika dominują pochodne N-glikozydowe oraz ich składowanie w wakuoli, natomiast soja wykazuje większą aktywność enzymów tworzących połączenie N-malonylo-DCA, które jest odporne na hydrolizę i prowadzi do

efektywniejszej detoksykacji poprzez depozycję zewnątrzkomórkową [18]. Wzór ekspresji genów UGT może być modyfikowany obecnością w otoczeniu rośliny związków chemicznych, stanowiących potencjalne substraty tych enzymów. Przykładem niech będzie zbadana przy użyciu mikromacierzy indukcja ekspresji (1,7-krotna w odniesieniu do kontroli), pod wpływem TNT w warunkach długiego, 10-dniowego okresu ekspozycji na wysokie, bo 10 μ M stężenie ksenobiotyku. Ta pozytywna regulacja była szczególnie trwała w pędach roślin [25].

Reakcje sprzęgania ksenobiotyków z aminokwasami są katalizowane przez N-acylotransferazy (ATC). Są to enzymy mitochondrialne działające na kwasy karboksylowe, szczególnie aromatyczne. Z badań na enzymach ssaczych wiadomo, że substraty te wymagają jednak uprzedniej aktywacji, przy udziale ATP, koenzymu A i syntetazy acyloCoA. Dopiero po tym następuje koniugacja z aminokwasem, katalizowana przez odpowiednią ACT, np. w przypadku glicyny, byłaby to acylo-CoA-glicyno-N-acylotransferaza (E.C.2.3.1.13). Jednym z pierwszych dowodów na koniugację aminokwasu z herbicydem była reakcja 2,4-D (kwas dichloro-fenoksy-octowy) z asparaginianem. Inne aminokwasy sprzęgane z ksenobiotykami to glutaminian, walina, leucyna, tryptofan, fenyloalanina. Takie koniugaty mogą być wciąż aktywne biologicznie, jednak są mniej mobilne. Możliwe jest ich wydzielenie do ściany komórkowej [19,32,41,42].

Kolejnym endogennym substratem, niezwykle ważnym w reakcjach sprzęgania z detoksykowanymi ksenobiotykami, jest glutation (GSH). Jest to tripeptyd, składający się z reszt kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny, w którym 2 pierwsze aminokwasy połączone są wiązaniem poprzez grupę γ -karboksylową glutaminianu [39]. U niektórych roślin spotykane są naturalne analogi glutationu, mające zamiast glicyny resztę β -alaniny (rośliny strączkowe) lub seryny (zboża). Tzw. homoglutation i hydroksymetyloglutation mogą występować w komórce dodatkowo lub zamiast GSH [9,30]. Dzięki grupie tiolowej cysteiny, peptydy te stanowią źródło niebiałkowej siarki. Synteza GSH przebiega w dwóch etapach i wymaga ATP. Enzymy za nią odpowiedzialne znajdują się zarówno w chloroplastach, jak i cytozolu. Są to syntetaza- γ -glutamylcysteiny (γ -ECS) i syntetaza glutationu (GSHS) [31]. Ich aktywność zależy między innymi od dostępności składowych aminokwasów. Formy glutationu ulegają wzajemnym przejściom ze zredukowanej do utlenionej (zawierającej wiązanie dwusiarczkowe, GSSG) i odwrotnie, dzięki aktywności reduktazy glutationu. Ważne jest, aby stosunek ilościowy był na korzyść tej pierwszej, gdyż stanowi ona część systemu ochrony antyoksydacyjnej komórki. GSH pełni też rolę buforu hydrosulfidowego, a jako prekursor fitochelatyn jest zaangażowany w detoksykację metali [30,35,39]. Glutation jest cząsteczką silnie hydrofilową, dzięki czemu może brać udział w nieenzymatycznym tworzeniu koniugatów z lipofilowymi ksenobiotykami. Takie wychwytywanie tego typu związków zależy od koncentracji obu partnerów i struktury przestrzennej substratu, zawierającego silnie elektrofilowe miejsce, na które oddziałuje spontanicznie anion tiolowy GSH. Koniugacja obejmuje reakcję substytucji: $RX + GSH \rightarrow R-GS + HX$ [8,16,31,39]. Zanieczyszczenia organiczne charakteryzujące się opisaną wyżej budową, zazwyczaj nie potrzebują wstępnego etapu tzw.

bioaktywacji (w I fazie detoksykacji) i mogą podlegać bezpośredniej koniugacji z glutationem (są to niektóre związki fluorowcowe, fenole, insektycydy fosforoorganiczne, różne herbicydy) [16,35,41]. Nieenzymatyczne sprzęganie nukleofilowe zachodzi jednak powoli – przyspieszenie reakcji następuje przy udziale odpowiedniej transferazy, która wpływa na zbliżenie substratów i osiągnięcie przez nie właściwej konfiguracji przestrzennej. S-transferaza glutationowa (GST, E.C.2.5.1.18) jest szeroko rozpowszechniona u organizmów tlenowych, znajduje się we frakcji mikrosomalnej komórki, cytozolu, mitochondriach, jądrze (w liściach kukurydzy *Zea mays* stanowi ponad 1% rozpuszczalnych białek) i występuje w różnych formach izoenzymatycznych [9,16,39,41]. W genomie rośliny może wystąpić nawet ponad 20 form spośród starej i zróżnicowanej rodziny genów GST. Enzymy, na podstawie ich sekwencji aminokwasowych, zgrupowane są w 5 klasach, nazwanych: teta, zeta, fi, tau i omega. Niektóre z nich znajdowane są także u zwierząt, jednak fi i tau są unikatowymi klasami roślinnych GST [8,9]. Enzymy te są izolowane w postaci dimerów, o identycznych lub różnych podjednostkach (z tej samej klasy), każda o masie 24–30 kDa [9,16,17,39]. Oba polipeptydy zawierają niezależne miejsca katalityczne, w których skład wchodzi specjalne miejsce wiążące glutation (tzw. miejsce G, w domenie N-terminalnej) oraz hydrofobowy substrat (miejsce H, uformowane przez aminokwasy z C-końca łańcucha). Domeny wiążące ksenobiotyki wykazują większe zróżnicowanie, co warunkuje szerokie, ale często nakładające się specyficzności substratowe między izoenzymami GST [8,17]. Naturalnymi reagentami przemian katalizowanych przez te transferazy (a mają one również aktywności utleniania GSH, izomeryzacji, redukcji) są między innymi kwas cynamonowy, kumarynowy, terpenoidy, chinony, alkaloidy itp. Uważa się, że utworzenie koniugatu z glutationem stanowi „oznakowanie” cząsteczki przeznaczonej do depozycji w wakuoli [9,16,19,34,39]. Ekspresja określonych izoenzymów zależy od etapu rozwoju rośliny i warunków środowiska. Do czynników wpływających na nią zalicza się poziom fitohormonów, stres tlenowy, obecność GSH, zanieczyszczeń (stanowiących substraty, np. herbicydów) [9,39]. Geny GST zazwyczaj (choć nie zawsze) należą do tych, do których, w badaniach zmian profilu ekspresji pod wpływem ksenobiotyków, odnoszą się najwyższe wartości indukcji [6,10,27]. Tak było w przypadku 24-, jak również 48-godzinnej ekspozycji *A. thaliana* na TNT oraz inne substancje wybuchowe i herbicydy [10,27]. W pierwszym ze wspomnianych eksperymentów (metodą SAGE) notowano 28-krotne zwiększenie ilości mRNA dla S-transferaz glutationowych [10]. W drugim natomiast, analizując (metodą RT-PCR) ekspresję 3 różnych genów: *AtGSTF2*, *AtGSTU1* i *U24*, należących do dwóch różnych klas enzymów GST (fi i tau), badacze uwidocznili zróżnicowany wpływ określonych związków na każdy z nich [27]. Produkty wszystkich tych genów okazały się mobilizowane przez komórkę roślinną w danych warunkach. Przy czym najwyższą indukcję notowano dla *AtGSTU24* (aż 40-krotną po 6 godzinach z 0,6 mM TNT i 18–23-krotną z 0,6 mM acetochlorem i 2 mM metolachlorem). Wpływ obecności RDX w pożywce na ekspresję GST w roślinie jest mniejszy, co obserwowano w przypadku krótkiego, jak i dłuższego czasu ekspozycji [11,27].

Zbyt długie przetrzymywanie zanieczyszczeń w komórkach nie jest dla rośliny korzystne. Skrócenie czasu ich oddziaływania oraz okresu półrozpadu osiągane jest, między innymi poprzez ciągłe eksportowanie ich zinaaktywowanych pochodnych z cytoplazmy. Stężenie koniugatów w tym przedziale musi być utrzymywane na niskim poziomie, gdyż mogą one hamować aktywność enzymów detoksykacyjnych, np. S-transferazę glutationową czy reduktazę GSH [5,16,39]. Dlatego produkty te są składowane w wakuoli w postaci rozpuszczalnych w wodzie metabolitów lub stają się tzw. pozostałościami związanymi w matriks pozakomórkowej.

Wakuole są najprawdopodobniej najbardziej multifunkcjonalnymi organellami. Nie stanowią jednorodnej grupy, mogą się różnić rozmiarami (centralna wakuola może zajmować nawet 80% objętości komórki), kształtem, przeznaczeniem, składem itd. Odpowiadają między innymi za turgor i wzrost komórek roślinnych, stanowią kompartment hydrolityczny, rezerwuár jonów, metabolitów, barwników, substancji obronnych itp. Pełnią kluczową rolę w homeostazie komórki oraz w procesach detoksykacji [21,22,38]. Wakuole można rozróżniać np. na podstawie zawartych w nich białkach rozpuszczalnych oraz po klasach akwaporyn, tworzących kanały wodne w tonoplaście (przyjęto, że α -TIP, ang. *Tonoplast Intrinsic Protein* – występuje w spichrzowych, γ -TIP w litycznych, σ -TIP obecna jest w obu tych typach wakuoli) [21]. Błona otaczająca wakuolę zawiera również pompy protonowe (H^+ ATP'aza, PP'aza), odpowiedzialne za wytwarzanie gradientu elektrochemicznego, co napędza import substancji rozpuszczonych do jej wnętrza. Produkty metabolizmu i ksenobiotyki w postaci koniugatów pobierane są w inny sposób. Proces ten zachodzi głównie dzięki odpowiednim Mg i ATP-zależnym transporterom. Tzw. ABC transportery (ang. *ATP Binding Cassette*) znajdujące się w komórkach wszystkich organizmów i służą do przenoszenia glukozydów oraz tym podobnych związków przez błonę tonoplastu [40]. Jak wynika z badań genomu, u *A. thaliana* może występować 50 białek z tej rodziny, z czego trzy: AtMRP1, AtMRP2 i AtMRP3, należące do podrodziny MRPs (ang. *Multidrug Resistance-associated Proteins*) znane są ze zdolności do transportu koniugatów glutationu do wnętrza wakuoli [21]. Ekspresja genów, których produktami są transportery błonowe odpowiedzialne za usuwanie zanieczyszczeń (i ich pochodnych) z cytozolu, może być stymulowana przez ich obecność w otoczeniu rośliny. Na przykład w próbach komórek korzeni roślin *A. thaliana* eksponowanych na TNT wykazano (metodą SAGE) 5-krotnie więcej transkryptów dla białek podobnych do ABC transporterów niż w próbach kontrolnych [10]. Zróżnicowany wpływ na tego typu geny obserwowano także w podobnych badaniach z użyciem mikromacierzy [25]. Ksenobiotyki zgromadzone w wakuoli mogą ulegać dalszym modyfikacjom, w wyniku działania różnych enzymów, np. peroksydaz czy karboksypeptydaz [38]. Pod wpływem drugiego ze wspomnianych katalizatorów, metabolity sprzężone z GSH mogą być pozbawione cząsteczki glicyny, a następnie dzięki peptydazie także reszty kwasu glutaminowego. Tego typu reakcje odgrywają rolę w obiegu aminokwasów składowych glutationu, w jego degradacji i w degradacji fitochelatyn, aktywacji barwników, usuwaniu znacznika glutationowego, kierującego do wakuoli oraz oczywiście w metabolizmie ksenobiotyków. Tak zmniejsz-

szony koniugat połączony jedynie z cysteiną może ewentualnie opuścić wakuolę, utworzyć koniugaty drugiego rzędu (pod wpływem liazy cysteinowej, glukozylotransferazy), a jego ostatecznym losem może być depozycja w ścianie komórkowej lub całkowite wydzielenie do otoczenia [39].

Skład i organizacja roślinnych ścian komórkowych pozwala na wiązanie wielu zanieczyszczeń w ich strukturze, np. poprzez grupy chemiczne lignin, celulozy itp. [38]. Zjawisku temu sprzyja, między innymi, obecność apoplastycznych enzymów, takich jak np. peroksydazy, polifenolooksydazy, które naturalnie pełnią rolę w formowaniu składników ściany (np. niespecyficzna oksydacyjna polimeryzacja jednostek fenolowych prowadzi do tworzenia lignin), depozycji suberyny itp. [13,37]. Rośliny mają wiele izoenzymów peroksydaz, u *A.thaliana* znane są 73 geny kodujące te enzymy. Ich produkty to glikoproteiny z grupą hemową, współdziałające z H_2O_2 jako akceptorem elektronów. Różnią się one zarówno specyficznością substratową, lokalizacją w komórce lub tkance, jak i funkcją fizjologiczną [13]. Niektóre odgrywają rolę w regulowaniu wzrostu komórek i rozwoju rośliny, odpowiedzi na atak patogenów i inne rodzaje stresu, czy właśnie w formowaniu połączeń w ścianach komórkowych. Peroksydazy fenolowe klasy III (E.C.1.11.1.7) są zlokalizowane w wakuoli lub wydzielane na zewnątrz komórek, zwłaszcza korzeniowych. Ich aktywność szczególnie wobec hydroksylowanych toksycznych substratów warunkuje ich kowalencyjne łączenie z polimerami ściany (tworzenie tzw. nieekstrahowalnych pozostałości), jak i oksydacyjną dechlorynację takich zanieczyszczeń, jak: DCP (2,6-dichlorofenol), TCP (2,4,6-trichlorofenol), TNP (2,4,6-trinitrofenol). Ważna jest tu obecność grupy -OH w pozycji 1. pierścienia arylowego, gdyż takie związki jak TNT, z grupą metylową w tym miejscu, nie były degradowane przez peroksydazę [13,37,39].

Poza enzymami, mającymi bezpośredni udział w poszczególnych fazach detoksykacji ksenobiotyków, ważny jest także system obrony antyoksydacyjnej komórek roślinnych, gdyż to on warunkuje stopień tolerancji organizmu na stres związany z ekspozycją na zanieczyszczenia. Spowodowany jest on powstawaniem toksycznych, wysoce reaktywnych pochodnych tlenu, w czasie utleniania endo- i egzogennych substratów [19]. Niekompletna redukcja tlenu cząsteczkowego, mniej niż czterema elektronami, pochodzącymi z różnych związków chemicznych, prowadzi do tworzenia wzbudzonych i niebezpiecznych, dla makrocząsteczkowych składników komórki, wolnych rodników. Takie reaktywne formy tlenu (RFT) to np. tlen singletowy, tripletowy, nadtlenki, rodniki hydroksylowe, aroksylowe, alkoksylowe, epoksydy itd. Do ich najniebezpieczniejszych oddziaływań należą: peroksydacja lipidów, powodująca między innymi zmiany w przepuszczalności błon, modyfikację i upośledzenie aktywności katalizatorów białkowych, zakłócanie funkcjonowania kwasów nukleinowych itd. Czynniki zabezpieczające komórkę roślinną przed negatywnym wpływem RFT są antyoksydanty w postaci cząsteczek nieenzymatycznych rozpuszczalnych w tłuszczach, takich jak: tokoferole, karoteny i w wodzie: ubichinony, katechole, kw. askorbinowy, glutation oraz jony cynku, miedzi, seleniu, magnezu, a także katalizatory tworzące układy unieczynniające wolne rodniki. Do tych ostatnich należą takie enzymy, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, E.C.1.15.1.1, metaloproteina występująca w formach izoenzyma-

tycznych, katalizującą konwersję ponadtlenkowych wolnych anionów O_2^- do O_2 i H_2O_2), katalaza (CAT, E.C.1.11.1.6, hemoproteina peroksysosomalna, oksydoreduktaza $H_2O_2 : H_2O_2$), peroksydaza glutationowa (GPx, E.C.1.11.1.9, katalizuje reakcję redukcji wodoronadtlenków, jej kosubstratem jest GSH), reduktaza glutationu, reduktaza chinonu, peroksydaza askorbinianu i inne peroksydazy itd. [15,19]. Związek aktywności roślinnych systemów antyoksydacyjnych ze stresem wywołanym obecnością zanieczyszczeń organicznych w ich otoczeniu potwierdzają wyniki badań zmian ekspresji genów. Na przykład, we wspomianej już wcześniej, analizie biblioteki SAGE, stworzonej z próbek z korzeni *A. thaliana* krótko ekspozowanych na TNT, największą indukcję wykazano dla tych genów, których produkty zaangażowane są właśnie w reakcje na stres oksydacyjny. Były to między innymi, indukowane 5–9-krotnie reduktazy glutationu, chinonu i peroksydaza L-askorbinianu. Na uwagę zasługują też reduktaza monodehydroaskorbinianu i GSH-zależna reduktaza dehydroaskorbinianu, z odpowiednio 17- i 10-krotnym zwiększeniem ilości transkryptu (w porównaniu z kontrolą) [10]. Czynnikiem inaczej wpływającym na ich ekspresję jest RDX, w przypadku którego takiej indukcji nie obserwowano [11]. Notowano natomiast 12-krotnie częstsze pojawianie się mRNA dla peroksydazy, podobnie jak po ekspozycji *Spirodela punctata* (gatunek z podrodziny rzęsowatych) na TCP [11,13].

LITERATURA

- [1] ADAMIA G, GHOGHOBERIDZE M, GRAVES D, KHATISASHVILI G, KVESITADZE G, LOMIDZE E, UGREKHELIDZE D, ZAALISHVILI G. Absorption, distribution, and transformation of TNT in higher plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; **64**: 136–145.
- [2] BEST EPH, KVESITADZE G, KHATISASHVILI G, SADUNISHVILI T. Plant processes important for the transformation and degradation of explosives contaminants. *Z Naturforsch [C]* 2005; **60**: 340–348.
- [3] BOWLES D, ISAYENKOVA J, LIM E-K, POPPENBERGER B. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 254–263.
- [4] CASHMAN JR. Human and plant flavin containing monooxygenase N-oxygenation of amines: detoxication vs. bioactivation. *Drug Metab Rev* 2002; **34**, 3: 513–521.
- [5] COLEMAN JOD, BLAKE-KALFF MMA, DAVIES TGE. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* 1997; **2**, 4: 144–151.
- [6] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, BISOFFI S, CARBONERA D. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2003; **72**: 109–138.
- [7] CRUZ-URIBE O, RORRER GL. Uptake and biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by micro-plantlet suspension culture of the marine red macroalga *Portieria hornemannii*. *Biotechnol Bioeng* 2006; **93**, 3: 401–412.
- [8] DIXON DP, CUMMINS I, COLE DJ, EDWARDS R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 258–266.
- [9] EDWARDS R, DIXON DP, WALBOT V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 2000; **5**, 5: 193–198.
- [10] EKMAN DR, LORENZ WW, PRZYBYLA AE, WOLFE NL, DEAN JFD. SAGE analysis of transcriptome responses in *Arabidopsis* roots exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1397–1406.
- [11] EKMAN DR, WOLFE NL, DEAN JFD. Gene expression changes in *Arabidopsis thaliana* seedling roots exposed to the munition hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine. *Environ Sci Technol* 2005; **39**: 6313–6320.

- [12] GACHON CMM, LANGLOIS-MEURINNE M, SAINDRENAN P. Plant secondary metabolism glycosyl-transferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 11: 542–549.
- [13] JANSEN MAK, HILL LM, THORNELEY RNF. A novel stress-acclimation response in *Spirodela punctata* (Lemnaceae): 2,4,6 trichlorophenol triggers an increase in the level of an extracellular peroxidase, capable of the oxidative dechlorination of this xenobiotic pollutant. *Plant Cell Environ* 2004; **27**: 603–613.
- [14] KAWAHIGASHI H, HIROSE S, OHKAWA H, OHKAWA Y. Transgenic rice plants expressing human CYP1A1 remediate the triazine herbicides atrazine and simazine. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 8557–8564.
- [15] KOMIVES T, GULLNER G. Phase I Xenobiotic Metabolic Systems in Plants. *Z Naturforsch [C]* 2005; **60**: 179–185.
- [16] KREUZ K, TOMMASINI R, MARTINOIA E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol* 1996; **111**: 349–353.
- [17] LABROU NE, KOTZIA GA, CLONIS YD. Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Eng Des Sel* 2004; **17**: 10: 741–748.
- [18] LAO S-H, LOUTRE C, BRAZIER M, COLEMAN JOD, COLE DJ, EDWARDS R, THEODOULOU FL. 3,4-Dichloroaniline is detoxified and exported via different pathways in *Arabidopsis* and soybean. *Phytochemistry* 2003; **63**: 653–661.
- [19] LESZCZYŃSKI B. Wybrane zagadnienia z biochemii i toksykologii środowiska. Wydawn. Akademii Podlaskiej, Siedlce 2001.
- [20] LIM E-K, BOWLES DJ. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J* 2004; **23**: 2915–2922.
- [21] MARTINOIA E, MASSONNEAU A, FRANGNE N. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 11: 1175–1186.
- [22] MARTY F. Plant vacuoles. *Plant Cell* 1999; **11**: 587–599.
- [23] MEADE T, D'ANGELO EM. [¹⁴C]Pentachlorophenol mineralization in the rice rhizosphere with established oxidized and reduced soil layers. *Chemosphere* 2005; **61**: 48–55.
- [24] MEÄNER B, THULKE O, SCHÄFFNER AR. *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* 2003; **217**: 138–146.
- [25] MENTEWAB A, CARDOZA V, STEWART Jr. CN. Genomic analysis of the response of *Arabidopsis thaliana* to trinitrotoluene as revealed by cDNA microarrays. *Plant Sci* 2005; **168**: 1409–1424.
- [26] MEZZARI MP, VAN AKEN B, YOON JM, JUST CL, SCHNOOR JL. Mathematical modeling of RDX and HMX metabolism in poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*, DN34) tissue culture. *Int J Phytoremediation* 2004; **6**: 4: 323–345.
- [27] MEZZARI MP, WALTERS K, JELIŃKOVA M, SHIH M-C, JUST CL, SCHNOOR JL. Gene expression and microscopic analysis of *Arabidopsis* exposed to chloroacetanilide herbicides and explosive compounds. A phytoremediation approach. *Plant Physiol* 2005; **138**: 858–869.
- [28] MORANT M, BAK S, MÖLLER BL, WERCK-REICHHART D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr Opin Biotechnol* 2003; **14**: 151–162.
- [29] MORIKAWA H, ERKIN OC. Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control. *Chemosphere* 2003; **52**: 1553–1558.
- [30] NOCTOR G, ARISI A-CM, JOUANIN L, KUNERT KJ, RENNENBERG H, FOYER CH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 1998; **49**, 321: 623–647.
- [31] PEUKE AD, RENNENBERG H. Phytoremediation with transgenic trees. *Z Naturforsch [C]* 2005; **60**: 199–207.
- [32] RÓŻAŃSKI L. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. Wyd. AGRA-ENVIROLAB, Poznań 1998.
- [33] SANDERMANN Jr. H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the «green liver» concept. *Pharmacogenetics* 1994; **4**, 5: 225–241.
- [34] SKIPSEY M, CUMMINS I, ANDREWS CJ, JEPSON I, EDWARDS R. Manipulation of plant tolerance to herbicides through coordinated metabolic engineering of a detoxifying glutathione transferase and thiol cosubstrate. *Plant Biotechnol J* 2005; **3**: 409–420.
- [35] URBANEK H, MAJOROWICZ H, ZALEWSKI M, SANIEWSKI M. Induction of glutathione S transferase and glutathione by toxic compounds and elicitors in reed canary grass. *Biotechnol Lett* 2005; **27**: 911–914.

- [36] WALKER CH, HOPKIN SP, SIBLY RM, PEAKALL DB. Podstawy ekotoksykologii. PWN, Warszawa 2002.
- [37] WEVAR OLLER AL, AGOSTINI E, TALANO MA, CAPOZUCCA C, MILRAD SR, TIGIER HA, MEDINA MI. Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Sci* 2005; **169**: 1102–1111.
- [38] WOJTASZEK P, WOŹNY A, RATAJCZAK L [red.]. Podstawy biologii komórki roślinnej. PWN, Warszawa 2006.
- [39] WÓJCIK P, TOMASZEWSKA B. Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych. *Biotechnologia* 2005; **4**: 71: 158–173.
- [40] YAZAKI K. Transporters of secondary metabolites. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 301–307.
- [41] ZAKRZEWSKI SF. Podstawy toksykologii środowiska. PWN, Warszawa 2000.
- [42] <http://plantandsoil.unl.edu>

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.07. 2007 r.

Przyjęto: 10.10. 2007 r.

Barbara Tomaszewska

Uniwersytet im. A. Mickiewicza,

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

e-mail: btomas@amu.edu.pl