

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijný program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Štúdijský obor: Molekulárna biológia a biochémia organizmov



Martina Jurčiková

Obrana rostlin proti toxickému působení arsenu: klíčová role
arsenátoreduktázy?

Plant defence against arsenic toxicity: a key role of arsenate reductase?

Bakalářská práce

Školitel: **RNDr. Petra Mašková, Ph.D.**

Konzultant: **doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.**

Praha, 2024

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

PodĎakovanie

V prvom rade by som rada poďakovala mojej školiteľke RNDr. Petre Maškovej, Ph.D za odborné vedenie, ochotu a trpezlivosť, ktoré mi pomohli pri písaní tejto bakalárskej práce. Veľká vďaka patrí aj mojej rodine za podporu.

V Prahe, 26.4.2024

Podpis

Abstrakt

Arzén v jeho rozličných formách je jedným z najtoxickejších environmentálnych kontaminantov, ktorý je taktiež prijímaný rastlinami a dokáže ovplyvniť ich vitalitu. Rizikovou kategóriou sú kultúrne plodiny, u ktorých As kontaminácia znižuje celkový výnos a v dôsledku toho sa As dostáva do potravinového reťazca. Jeho anorganické (arzenit a arzenát) a organické (methylované) formy sú prijímané koreňmi a rhizómami, kde sa buď môžu akumulovať, alebo sú translokované a následne hromadené v nadzemných častiach. Arzenátoreduktáza je enzým, ktorý katalyzuje redukciu arzenátu na arzenit, čím ovplyvňuje nielen celkovú toxicitu As v rastline, ale aj jeho transport medzi podzemnými a nadzemnými orgánmi a detoxifikáciu. Súčinnosť jednotlivých mechanizmov príjmu, translokácie a detoxifikácie As však nie je dopodrobna preskúmaná. Cieľom tejto bakalárskej práce bolo analyzovať a porovnať význam arzenátoreduktázy v týchto procesoch na modelovom organizme *Arabidopsis thaliana*, na kultúrnej plodiny ryži a u hyperakumulátora arzenu *Pteris vittata*. Rozličná tolerancia horeuvedených organizmov voči As a ich rozdiely v prednostnom mieste ukladania As v listoch alebo v semenách by mohli byť využité pre rozličné účely, ako napríklad pri fytoremediácii As-kontaminovaných pôd, alebo pri selekcii rastlín s cieľom obmedzenia príjmu či translokácie As do konzumovateľných častí rastliny. Práve preto má podrobnejšie identifikovanie a vzájomné prepojenie jednotlivých účastníkov príjmu, translokácie a detoxifikácie potenciál sprostredkovať viac možností pri šľachtení plodín odolných voči zvýšenej koncentrácii As v prostredí.

Kľúčové slová

Arzén, Arzenátoreduktáza, Príjem, Translokácia, Detoxifikácia, *Arabidopsis*, ryža, *Pteris*

Abstract

Arsenic in its various forms is one of the most toxic environmental contaminants, which is also taken up by plants and can affect their vitality. The risk category is crops where As contamination reduces the overall yield and through which As enters the food chain. Its inorganic (arsenite and arsenate) and organic (methylated) forms are taken up by roots and rhizomes, where they can either accumulate or be translocated and subsequently stored in shoots. Arsenate reductase is an enzyme that catalyses the reduction of arsenate to arsenite, thereby affecting not only the overall toxicity of As in the plant, but also its transport between underground and aboveground organs. However, the interplay of the different mechanisms of As uptake, translocation and detoxification has not been investigated in detail. The aim of this bachelor thesis was to analyze and compare the importance of arsenate reductase in these processes in the model organism *Arabidopsis thaliana*, in a rice crop and in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. The different tolerance of these organisms to As and their differences in the preferential site of As deposition in leaves or seeds could be used for different purposes, such as in the phytoremediation of As-contaminated soils, or in limiting the uptake or translocation of As to edible parts of plants.

This is why a more detailed identification and interconnection of the different players involved in uptake, translocation and detoxification has the potential to provide more possibilities in breeding crops resistant to elevated As concentrations in the environment.

Key words

Arsenic, Arsenate reductase, Uptake, Translocation, Detoxification, Arabidopsis, Rice, Pteris

Obsah

Zoznam skratiek.....	1
1. Úvod.....	3
2. Príjem arzénu.....	5
2.1. Príjem As ^V	6
2.2. Príjem As ^{III}	9
2.3. Príjem metylovaných foriem arzénu.....	12
3. Translokácia do nadzemných častí.....	13
3.1. Nakladanie As do xylému.....	14
3.2. Translokácia As floémom.....	17
4. Výdaj arzénu.....	18
5. Arzenátreduktáza.....	21
5.1. Arzenátreduktáza <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
5.2. Arzenátreduktáza <i>Oryza sativa</i>	24
5.3. Arzenátreduktáza <i>Pteris vittata</i>	26
6. Záver.....	30
Použitá literatúra.....	31

Zoznam skratiek

ABC transportér - ATP Binding Cassette transportér
ABCB - ATP-binding cassette transporters of the B subfamily
ABCC - ATP-binding cassette transporters of the C subfamily
ACR2 - Arsenic Compounds Resistance 2
ACR3 – Arsenic Compounds Resistance 3
ADP – adenožindifosfát
As – arzén
As^{III} – arzenit
As^V – arzenát
ATP – adenožintrifosfát
Col-0 – Columbia 0
DMA - kyselina dimetylarzínová
eGFP – enhanced green fluorescent protein
GFP - green fluorescent protein
GRX - glutaredoxin
GSH – glutation
GWA - genome-wide association mapping
HAC1/ATQ1 - High Arsenic Content 1/Arsenate Reductase QTL1
HJ2 - Hei Jing 2
INT2 – inositol transporter 2
IPS1 – induced by phosphate starvation
Kas-1 - Kashmir-1
Col *gl-1* - Columbia
LOF – loss of function
Lsi – Low Silicon
MATE - multidrug and toxic compound extrusion
MIP - major intrinsic protein
MMA - kyselina monometylarzónová
NIP – nodulin 26-like intrinsic proteins
NTR1/PTR – putative peptide transporter/nitrate transporter 1
PCs – fytochelatóny
PCS1 – Phytochelatin synthase 1

PGP/ABCB/MDR - ABC-B/multi-drug resistance/P-glycoprotein

ArsC – Arsenate reductase C

PHO2 – phosphate 2, ubiquitin-conjugating enzyme 24

PHT1 – phosphate transporter 1

Pi – anorganický fosfát

PIN2 - PIN-formed 2

PIP - plasma membrane intrinsic proteins

QTL - quantitative trait locus

ROS – reactive oxygen species

Si – kremík

SIET1 – Silicon Efflux Transporter 1

TIPs - tonoplast intrinsic proteins

TMAO - oxid trimetylarzínu

VPT1 – vacuolar phosphate transporter 1

WHO – World Health Organization

WT – wild type

1. Úvod

Arzén (As) je prirodzene sa vyskytujúci toxický polokov, ktorého koncentrácia v prostredí v priebehu rokov vykazuje signifikantný nárast. Tento znepokojivý trend sa stáva v dnešnej dobe prioritou záujmu, keďže arzén patrí medzi karcinogénne látky prvej triedy ([Neumann et al., 2010](#), [Argos et al., 2010](#); [Chen, Graziano et al., 2011](#); [Li et al., 2017](#)). Do prostredia sa uvoľňuje aj prirodzenou cestou, napríklad oxidáciou minerálov obsahujúcich As ([Zhang et al., 2017](#)). Je to však práve nekontrolované používanie As obsahujúcich pesticídov a herbicídov, zavlažovanie kontaminovanou vodou a banská činnosť, ktoré sú hlavnými dôvodmi introdukcie As v potravinovom reťazci ([Garelick et al., 2008](#)). Konzumácia potravín so zvýšeným obsahom As potom môže spôsobovať závažné ochorenia u ľudí, vrátane rakoviny ([Rahman et al., 2022](#)). Nadmerná As-kontaminácia prostredia spôsobuje ekologické problémy, najznámejší je prípad kontaminácie povodia Gangy a Brahmaputry dôsledkom banskej činnosti ([Brammer, 2009](#)). V juhozápadnom Bangladéši je koncentrácia arzenu v pitnej a zavlažovacej vode 15-násobne vyššia ako maximálna povolená hodnota pitnej vody definovaná WHO ([World Health Organization \[WHO\], 2004](#)). Zvyšujúca koncentrácia As v prostredí sa však nevyhýba ani Európe, kde najvyššie hladiny dosahujú práve okolia intenzívnej ťažby nerastných surovín ([Tarvainen et al., 2020](#)).

Arzén je z kontaminovanej pôdy a vody absorbovaný rastlinami. Anorganické (arzenit a arzenát), ale aj organické (methylované) druhy As sú prijímané predovšetkým koreňmi prostredníctvom transportérov, ktoré sú za normálnych podmienok zodpovedné za príjem a prenos esenciálnych alebo prospešných živín. Rastliny ho potom môžu uchovávať v podzemných, alebo translokovať do nadzemných častí.

Toxicita As závisí na prijatej či akumulovanej forme a na mieste hromadenia. Arzenát má schopnosť nahradzovať fosfát (Pi) v kritických biochemických reakciách a molekulách ([Orsit and Cleland, 1972](#); [Park and Agrawal, 1972](#); [Long and Ray, 1973](#); [Gresser, 1981](#)). Pravdepodobne najdôležitejšou reakciou vyžadujúcou Pi je oxidatívna fosforylácia pomocou ATP syntáz, ktoré sa nachádzajú na vnútornej membráne mitochondrií a v tylakoidnej membráne plastidov ([Gresser, 1981](#)). Po introdukcii arzenátu rastlina formuje ADP-As^V molekuly, ktoré nie je schopná spracovať ako zdroj energie. Trivalentná forma arzenit sa dokáže, vďaka svojej afinite k tiolovým skupinám proteínov, veľmi jednoducho viazať k trom sulfhydrylovým skupinám ([Kitchin and Wallace, 2006b](#)) a ovplyvňuje skladanie proteínov a enzýmov, a tým pádom aj ich správne fungovanie. ([Cline et al., 2003](#); [Ramadan et al., 2007](#)). Organické formy As sú síce menej toxické pre ľudí než anorganický As ale, čo sa rastlín týka,

niektoré formy sú pre ne viac toxické, pretože nedokážu byť detoxifikované ([Tang, Kang et al., 2016](#)).

Okrem priameho zasahovania do biochemických reakcií vyvoláva arzén aj sekundárny, oxidačný stres. Indukuje tvorbu reactive oxygen species (ROS), ktorých nadbytok má za následok oxidatívne poškodenie membrán, membránových a cytoplazmatických proteínov a stimuláciu tvorby chromozomálnych aberácií. Nadmerný príjem As vedie u väčšiny rastlín k zníženiu celkovej čerstvej hmotnosti, poprípade až k úmrtiu. U kultúrnych plodín to má neželané následky na produktivite a efektivite poľnohospodárstva a na kvalite produktov. Negatívne vplyvy As sú prehládne popísané napríklad v článku od [Finnegana a Chena \(2012\)](#) a [Geng et al. \(2023\)](#).

Na ochranu si rastliny vyvinuli mnohé detoxifikačné mechanizmy, ktorými sa snažia vzniknutý oxidačný stres eliminovať. Tieto antioxidantné mechanizmy sú buď enzymatického alebo neenzymatického typu, a rastlinami sa nimi môže zbavovať ROS (prehládne napr. v [Geng et al. \(2023\)](#)). Esenciálnu rolu v detoxifikácii prijatého As hrá enzým arzenátoreduktáza, ktorá sprostredkúva redukciu As^V na As^{III} , čo umožňuje následnú väzbu As^{III} s molekulami bohatými na cysteín, fytochelatínmi (PCs) ([Grill et al., 1989](#)). Komplex As^{III} -PCs je neskôr sekvestrovaný do vakuol cez ABC transportéry C-typu. Sekvestrácia arzenu je jedným z kľúčových a finálnych procesov, ktoré rastline zabezpečujú toleranciu voči jeho toxickým účinkom. Rastliny sú schopné vytvárať aj komplexy arzenitu s glutationom (As^{III} -GSH), ktorých produkcia, podobne ako produkcia As^{III} -PCs, predstavuje detoxifikačnú reakciu rastliny na prítomnosť As ([Song et al., 2010](#), [Song et al., 2014](#))

Všetky rastliny disponujú obecným mechanizmom príjmu, translokácie a detoxikácie rôznorodých foriem arzenu. Koordinácia a účinnosť jednotlivých krokov v ameliorácii As stresu je ale druhovo špecifická záležitosť.

Typický modelový organizmus *Arabidopsis thaliana* je extrémne senzitívny voči arzenu. Jeho krátka generačná doba, malý jadrový genóm a produkcia množstva semien ho však robí vhodným kandidátom pre štúdium procesov, ktoré sú ovplynené As alebo pre štúdium zásahov zvyšujúcich toleranciu rastlín voči As. Hlbšie pochopenie príjmu a biotransformácie As v *A. thaliana* má potenciál prispieť k vývoju metód, ktoré by mohli byť neskôr impletované v iných rastlinách prostredníctvom genetického inžinierstva ([Park et al., 2016](#)).

Ekonomicky dôležitým modelom štúdia As príjmu a akumulácie je ryža. Táto plodina reprezentuje základnú potravinu pre približne polovicu svetovej populácie, s odhadovanou

ročnou produkciou zhruba 776 miliónov ton (dáta z roku 2022 z [Food and Agricultural Organization of the United Nations](#)). Toxické účinky arzénu však znižujú jej celkovú biomasu a teda výnosy. Ryža je aj účinný akumulátor arzénu predovšetkým v zrnách, čím sa stáva hlavným rizikom As pre ľudí ([Dahal et al., 2008](#); [Sohn, 2014](#)). Často je pestovaná v zaplavených semi-anoxických pôdach, ktoré sú už prirodzene bohatšie na arzén. Ten v nich dominuje vo svojej mobilnejšej forme ([Xu et al., 2008](#)). Dokonca sa predpokladá, že prebiehajúce klimatické zmeny taktiež napomáhajú k zvyšovaniu úrovne akumulácie As v tejto kultúrnej plodine ([Muehe et al., 2019](#)). Je teda dôležité zamerať sa na podrobné preštudovanie mechanizmov As príjmu, translokácie a detoxifikácie v ryži.

Hyperakumulátor *Pteris vittata* je extrémne efektívny v absorpcii, redukcii a translokácii arzénu do svojich vejárovitých listov a dokáže prosperovať na pôdach s koncentráciou As vo výške až 1500 mg/kg ([Tu et al., 2002](#)). Jeho gametofyt, rovnako ako sporofyt, má schopnosť redukovať a následne aj ukladať arzén a tým znižovať jeho obsah v pôde ([Lombi et al., 2002](#); [Webb et al., 2003](#); [Ze-Chun et al., 2004](#)). Táto schopnosť z neho robí ideálneho kandidáta pre udržateľnú a ekonomicky výhodnú formu bioremediácie As kontaminovaných poľnohospodárskych pôd - fytofarmácie (konkrétne fytoextrakciu). Týmto spôsobom je možné výrazne znížiť kontamináciu pôd a následne i obsah As v rastlinách ryže, čím sa zvýši aj ich celkový výnos ([Mandal et al., 2012](#)).

Z vyššie uvedených dôvodov som sa preto rozhodla v tejto bakalárskej práci sústrediť na príjem, translokáciu a redukciiu As v uvedených rastlinných druhoch. Sú to procesy, ktoré sú zásadné nielen pre potlačenie toxických prejavov As a jeho hromadenie v konzumovateľných častiach rastlín, ale na druhej strane aj ich hyperakumulačnú kapacitu.

2. Príjem arzénu

Príjem As závisí nielen na podmienkach prostredia, ale aj od rastliny samotnej. Keďže najväčšia koncentrácia As sa nachádza práve v pôde ([Johnson and Hiltbold, 1969](#)) a v podzemnej vode ([Samanta et al., 1999](#)), na jeho prijímanie u väčšiny rastlín zohráva najdôležitejšiu úlohu koreňová sústava rastliny. Výnimkou sú vodné splývavé rastliny, ktoré dokážu absorbovať As aj cez ich listy ([Xue et al., 2012](#)).

V pôde sa As vyskytuje v troch formách, ktoré sú dostupné pre rastliny. Majoritnými sú pentavalentná forma (As^V , arzenát) a trivalentná forma (As^{III} , arzenit) ([Khan et al., 2010](#), [Seyffert et al., 2010](#)). V menších množstvách sa v pôde nachádzajú aj metylované formy ako

napríklad kyselina monometylarazónová (MMA), kyselina dimetylarsínová (DMA) a oxid trimetylarsínu (TMAO) ([Huang, 2014](#), [Zhao, Zhu et al., 2013](#)).

Arzenát je formou, ktorá je vysoko oxidovaná a stabilná. Predominantne sa nachádza v aeróbných pôdach, kde vykazuje silnú afinitu k oxyhydroxidom železa. Konkrétne pre ryžu je tento jav výhodný, keďže sa na jej koreňoch vytvárajú železné plaky, ktoré po väzbe s arzenátom neprepúšťajú As^V do koreňa a teda tvoria efektívnu bariéru voči príjmu As^V ([Chen et al., 2005](#)).

Na druhej strane, arzenit sa vyskytuje prevažne v anaeróbnom redukčnom prostredí, akým sú napríklad už spomínané zaplavené ryžové polia. Zaliatie pôd vedie k mobilizácii arzenitu do pôdneho roztoku a tým pádom k zvýšeniu úrovne jeho príjmu rastlinami ([Kumarathilaka et al., 2018](#)).

Mnoho abiotických a biotických faktorov hrá významnú úlohu v konverzii medzi týmito dvoma pôdnymi formami As . Pôvod metylovaných foriem As v pôde a enzymológia metylácie nie sú objasnené. Súčasné poznatky naznačujú biotransformáciu anorganického As rôznymi mikroorganizmami a používaním špecifických pesticídov a herbicídov ([Huang, 2014](#); [Yan et al., 2005](#); [Zhao, Zhu et al., 2013](#)).

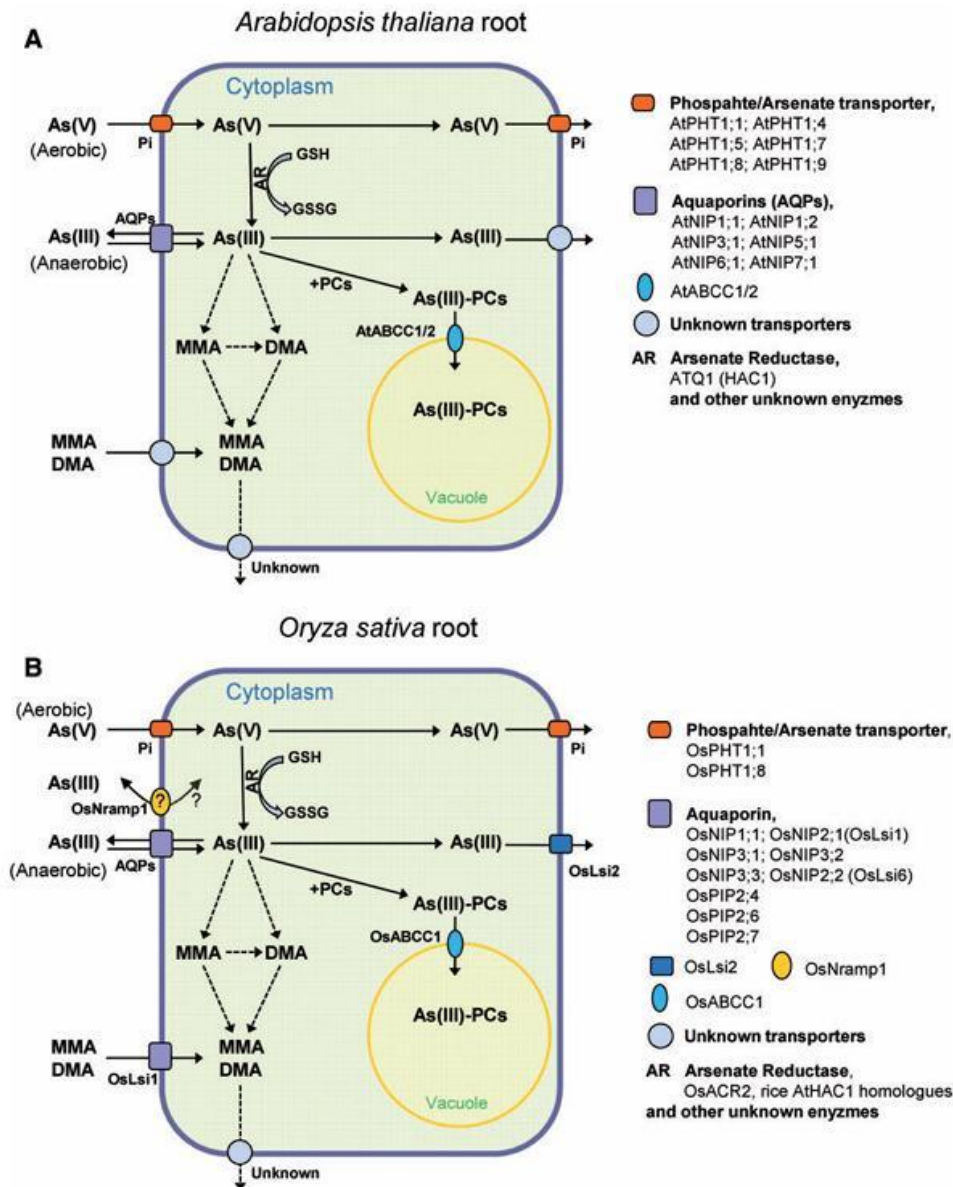
2.1. Príjem As^V

Arzenát je štruktúrnym a chemickým analógom anorganického fosfátu (Pi), ktorý sa do rastliny dostáva prostredníctvom fosfátových transportérov rodiny 1 (PHT1) ([Meharg & Macnair, 1990](#); [Zhao et al., 2009](#)). Síce je vzťah medzi prijímaním As^V a Pi kompetičný, bolo dokázané, že spomínané transportéry vykazujú vyššiu afinitu k Pi ([Asher & Reay, 1979](#); [Meharg et al., 1994](#); [Jiang et al., 2014](#)).

V *A. thaliana* bolo identifikovaných deväť AtPHT1 a z toho štyri z nich priamo zohrávajú úlohu v transporte arzenátu. Sú to AtPHT1;1, AtPHT1;4, AtPHT1;8 a AtPHT1;9 ([Ayadi et al., 2015](#), [Shin et al., 2004](#), [Remy et al., 2012](#), [LeBlanc et al., 2012](#), [Catarcha et al., 2007](#)).

Dominantú úlohu v prijímaní As^V v *A. thaliana* zohrávajú fosfátové transportéry AtPHT1;1 a AtPHT1;4. Expresia génov pre príslušné transportéry na plazmatickej membráne buniek rhizodermis, koreňových vláskov a koreňovej čapičky dosahuje najvyšších úrovní počas Pi deprivácie, čo napovedá o ich dôležitosti počas trvania tohto špecifického stresu ([Shin et al., 2004](#)). Loss of function (LOF) double mutanti *pht1;1 pht1;4* vykazovali v porovnaní s Col-0 vysokú úroveň tolerancie voči As^V , pričom aj pri veľmi vysokých koncentráciách (200 μM As^V) bol ich rast znížený len o 50%, zatiaľ čo rast Columbia-0 (Col-0) bol znížený o 94%. ([Shin et al., 2004](#)).

V koreňoch *A. thaliana* sú exprimované aj *AtPHT1;8* a *AtPHT1;9*, ktoré kódujú transportéry lokalizované na plazmatickej membráne a prispievajú k prijímu Pi pri fosfát-deficientných podmienkach, ale okrem toho hrajú rolu aj v prijíme As^V (Remy et al., 2012). Príjem arzenátu cez Pi transportéry v *A. thaliana* je schématicky zobrazený na Obr. 1A.



Obr. 1: Príjem, výdaj a sekvestrácia rozličných foriem arzenu v *A. thaliana* a ryži (Li et al., 2016)

Zaujímavú perspektívu poskytla štúdia vakuolárneho transportéra *AtVPT1*, ktorý prispieva k sekvestracii Pi do vakuol. V nej autori navrhli, že nielen expresia fosfátových transportérov, ale aj cytosolická koncentrácia Pi môže ovplyvniť celkový príjem As^V . Pri tomto tvrdení vychádzali z pozorovania LOF mutantov *vpt1*. Tí, kvôli nedostatočnej sekvestracii do vakuol, mali v porovnaní s *Col-0* vyššiu koncentráciu Pi v cytoplazme. Vďaka tejto zvýšenej

koncentracii Pi, *vpt1* mutanti down-regulovali expresiu génov z rodiny *PHT1* a tým pádom obmedzili nielen príjem Pi, ale aj As^V (Luan et al., 2018).

V ryži bolo zatiaľ identifikovaných 13 fosfátových transportérov patriacich do rodiny *PHT1*, ktoré sa účastnia prijímu a transportu Pi a zatiaľ sa u troch z nich dokázala aj úloha pri prijíme a transporte arzenátu (*OsPHT1;1*, *OsPHT1;4* a *OsPHT1;8*) (Ye et al., 2015).

Expresia *OsPHT1;1* (*OsPT1*) je, či už v nadzemných alebo podzemných častiach rastliny, konštitutívna nezávisle od koncentrácie Pi v prostredí, ale po pridaní As^V do média dochádza k miernemu stlmeniu úrovne jeho transkripcie. Knockdown *OsPHT1;1* znížil As^V akumuláciu v nadzemných častiach v porovnaní s wild type (WT), zatiaľ čo koncentrácia As v koreni bola s WT veľmi podobná. Overexprimujúce *OsPHT1;1* línie vykazovali vyšší obsah As v nadzemných častiach v porovnaní s WT. Spoločne s lokalizáciou *OsPHT1;1* na plazmatickej membráne je pravdepodobné, že *OsPHT1;1* sa podieľa na prijíme As^V a Pi z pôdy, alebo vykladaniu As^V a Pi z apoplastu do symplastu, čo môže uľahčiť prenos As^V do nadzemných častí (Kamiya et al., 2013).

Ďalším fosfátovým transportérom, ktorý sa pravdepodobne účastní prijímu As je *OsPHT1;4* (*OsPT4*). Tento transportér sa nachádza na plazmatickej membráne buniek vegetatívnych a generatívnych pletív. Jeho expresia bola detekovaná nielen v rhizodermálnych bunkách primárnych a laterálnych koreňov, ale aj v bunkách primárnej kôry, centrálného válca a dokonca aj v embryonálnych bunkách (Zhang et al., 2015). T-DNA inzerčná mutácia v *OsPHT1;4* znížila As^V príjem a translokáciu a redukovala akumuláciu anorganického As v zrnách ryže (Cao et al., 2017; Ye et al., 2017). Overexpresia *OsPHT1;4* zase signifikantne zvýšila obsah celkového As aj v koreňoch, aj v nadzemných častiach (o 22 a 47% v tomto poradí). Túto zmenu odzrkadľovala výrazná redukcia v dĺžke koreňov a výške nadzemných častí (o 50 a 30 % v tomto poradí). Obsah As v zrnách sa taktiež zvýšil, a to o 22-30%. Vplyv overexpresie *OsPHT1;4* na celkový výnos však autori neskúmali (Ye et al., 2017).

Overexpresia *OsPHT1;8* (*OsPT8*), lokalizovaného predovšetkým na cytoplazmatickej membráne rhizodermis nachádzajúcich sa v blízkosti koreňovej špičky a laterálnych koreňov, taktiež zvýšila As^V príjem v porovnaní s WT (Wu et al., 2011). Knockout mutanti zase vykazovali znížený As^V príjem a signifikantne zvýšenú koreňovú elongáciu v As -kontaminovanom prostredí (Wang et al., 2016). Vysoká expresia *OsPHT1;8* bola taktiež detekovaná na prechodovej časti medzi koreňom a nadzemnou časťou, čo by mohlo naznačovať jeho úlohu pri translokácii Pi a As^V z koreňa do nadzemných častí (Wang et al., 2016). Príjem arzenátu cez Pi transportéry v ryži a porovnanie s transportnými cestami As^V u *A. thaliana* je schématicky zobrazené na Obr. 1.

Okrem týchto fosfátových transportérov ovplyvňuje príjem As^{V} aj *IPSI*, kľúčový regulátor signalizácie indukovanej počas nedostatku Pi. Jeho expresia bola potlačená pri zvýšenom obsahu As^{V} v médiu ([Kamiya et al., 2013](#)). *OsIPSI* je nekódujúca RNA schopná indukovať tvorbu *microRNA 399 (miR399)*, ktorej zvýšená koncentrácia zase cieľi na *OsPHO2* transkript. *OsPHO2* funguje ako ubiquitin E2 konjugáza regulujúca proteíny, ktorých hladina sa zvyšuje pri nedostatku Pi. Tento proces vedie k indukcii expresie *PHT1* a teda k zvýšenej akumulácii Pi v nadzemných častiach ([Bari et al., 2006](#)).

Hyperakumulátor *Pteris vittata* rastie predovšetkým na aeróbných pôdach, kde dominuje As^{V} , a počas deplécie Pi nielen toleruje jeho nízku dostupnosť, ale po pridaní As^{V} do média dokonca zvýši svoju biomasu a príjem As ([Lessl and Ma, 2013](#)). As^{V} sa podľa všetkého dostáva z externého prostredia do rastliny skrze fosfátové transportéry rodiny PHT1, ktoré sú lokalizované v koreňoch. V súčasnosti boli v *P. vittata* popísané tri fosfátové transportéry z rodiny PvPHT1 (PvPHT1;2, PvPHT1;3 a PvPHT1;4). PvPHT1;3 a PvPHT1;4 pravdepodobne zohrávajú zásadnú úlohu pri prijíme alebo transporte As^{V} a sú lokalizované na plazmatickej membráne, pričom oba transportéry vykazujú vysokú mieru expresie aj v koreňoch, aj v listoch *P. vittata* ([Cao et al., 2019](#), [DiTusa et al., 2015](#)). Heterológnou expresiou génov kódujúcich horeuvedené proteíny v kvasinkách rastúcich v $150 \mu\text{M}$ As^{V} po dobu 3 hodín bolo pozorované, že bunky *PvPHT1;3* línie akumulovali takmer o polovicu viac As ako *PvPHT1;4* transformanty a ich tolerancia voči As^{V} bola o približne 10% nižšia než u *PvPHT1;4* línií ([Sun et al., 2020](#)). *PvPHT1;4*, exprimovaný hlavne v koreňoch a minoritne aj vo vejárovitých listoch, upreguluje svoju expresiu, narozdiel od *PvPHT1;3*, pri nedostatku Pi v prítomnosti As^{V} , a teda vyžaduje pôsobenie oboch stresorov ([Sun et al., 2020](#)). Tieto dáta naznačujú, že PvPHT1;4 má v *P. vittata* potenciál zohrávať dôležitejšiu úlohu v efektívnom prijíme As než doposiaľ popísaný PvPHT1;3.

Hoci sú PvPHT1;3 a PvPHT1;4 dobre charakterizované v kvasinkách, ich funkcia v *P. vittata*, rovnako ako úloha PvPHT1;2, nie je dobre objasnená a definitívne vyžaduje ďalšie preskúmanie ([Sun et al., 2020](#)).

2.2. Príjem As^{III}

Arzenit (As^{III}) sa do rastliny dostáva viacerými možnými transportermi, najčastejšie členmi rodiny MIP (major intrinsic protein). Tieto integrálne membránové proteíny, často nazývané aquaporíny, sprostredkujú transport malých polárnych molekúl skrz membránu ([Johansson et al. 2000](#)). U rastlín sú, v súvislosti s prijímom a transportom As^{III} , najrelevantnejší zástupcovia nodulin 26-like intrinsic proteins (NIP), plasma membrane intrinsic proteins (PIP)

a tonoplast intrinsic proteins (TIPs) ([Bienert et al.,2008](#); [Bienert & Jahn,2010](#); [Mosa et al.,2012](#))

V *A.thaliana* bolo identifikovaných 9 členov rodiny NIP, pričom 6 z nich, exprimovaných hlavne v koreni, sprostredkúva príjem As^{III} . Sú to konkrétne *NIP1;1*, *NIP1;2*, *NIP3;1*, *NIP5;1*, *NIP6;1* a *NIP7;1*.

Kľúčovým určovateľom As^{III} tolerancie v *A. thaliana* je *AtNIP1;1*, exprimovaný na plazmatickej membráne dominantne v koreni, na prechode koreňa a hypokotylu, a dokonca aj zatváracích buniek prieduchov, pričom táto lokalizácia nebola autormi vysvetlená. V laterálnych koreňoch vykazoval expresiu na koreňových špičkách a v centrálnom válci, zatiaľ čo v primárnom koreni bola expresia zaznamenaná len v centrálnom válci. LOF mutanti *nip1;1* generovali na As^{III} -obsahujúcom médiu väčšiu čerstvú hmotnosť biomasy ako Col-0 a mali o 70% nižšiu hladinu As^{III} v semenáčikoch. To by mohlo znamenať, že ostatné transportéry, odlišné od *AtNIP1;1* sprostredkujú len 30% celkového príjmu As^{III} do koreňov ([Kamiya et al., 2009](#)).

Ďalšie kandidátne gény zodpovedné za As^{III} príjem sú *AtNIP1;2* a *AtNIP1;5*. Expresný pattern *NIP5;1* je v kontraste s *NIP1;1*. *NIP5;1* sa exprimuje v epidermálnej, kortikálnej a endodermálnej vrstve buniek, ale slabo v stéle. LOF mutanti *A. thaliana nip1;2* a *nip1;5* mali o 10-15% nižšiu hladinu As v porovnaní s Col-0 ([Takano et al., 2006](#)). Štúdia od [Isayenkov and Maathuis \(2008\)](#) identifikovala *AtNIP7;1* ako gén kódujúci proteín zodpovedný za As^{III} príjem, pričom LOF mutanti *nip7;1* vykazovali o takmer 30% nižšiu koncentráciu As v semenáčikoch v porovnaní s Col-0, pričom oba druhy rástli v prítomnosti As^{III} ([Isayenkov and Maathuis, 2008](#)).

U ďalšieho skúmaného transportéra *AtNIP3;1* bolo pozorované, že jeho deleční mutanti *nip3;1* vykazovali miernu toleranciu voči arzenitu v porovnaní s Col-0, rozumejúc, že obsah As v nadzemných častiach mutantných rastlín klesol o takmer 45%. Obsah As v koreňoch *nip3;1* a Col-0 rastlín bol však veľmi totožný. Double deleční mutanti *nip3;1 nip1;1* rastúci v tých istých podmienkach (s prítomnosťou As^{III}) ako single mutanti *nip3;1* dokonca prejavili signifikantne vyššiu úroveň rastu koreňovej sústavy a celkovo vyššiu čerstvú hmotnosť nadzemných častí v porovnaní s *nip3;1* a Col-0. Tieto výsledky naznačujú, že *AtNIP3;1*, podobne ako *AtNIP1;1*, funguje v *A. thaliana* ako transportér As^{III} , hoci dôležitejšiu funkciu v prijíme As^{III} zohráva už spomínaný *AtNIP1;1*. Podľa autorov *AtNIP* transportéry v *A. thaliana* pravdepodobne tvoria komplexnú sieť nielen pre príjem, ale i výdaj a distribúciu arzenitu ([Bienert et al., 2008](#); [Xu et al., 2015](#)). Schematické znázornenie príjmu arzenitu v *A. thaliana* a jeho sekvestrácie je znázornené na Obr. 1A.

Oryza sativa prijíma arzenit viacerými spôsobmi. Podobnosť As^{III} s kyselinou kremičitou umožňuje v ryži jeho transport prostredníctvom kremíkového transportéra s vysokou mierou expresie - *OsNIP2;1 (OsLsi1)*, lokalizovaného striktne na distálnej strane cytoplazmatickej membrány buniek exodermis a endodermis. Knockout mutácia *Lsi1* spôsobuje zníženie príjmu Si^{IV} a As^{III} a ich translokáciu v rastline. Ďalším dôležitým transportérom Si je *OsLsi2 (OsSIET1)*, ktorý sa zas striktne nachádza iba na proximálnej strane cytoplazmatickej membrány buniek exodermis a endodermis. Táto polarizovaná lokalizácia *OsLsi1* a *OsLsi2* zabezpečuje, že Si je prijímaný a transportovaný dostredivo do stéle prostredníctvom *OsLsi1*, a následne je nakladný do xylému vďaka *OsLsi2*. Týmto spôsobom sa zvyšuje efektívnosť celého procesu, čo vysvetľuje, prečo má ryža vyššiu kapacitu pre príjem a translokáciu As^{III} v porovnaní s inými poľnohospodárskymi plodinami (pšenica, jačmeň) ([Su et al., 2010](#), [Ma et al., 2008](#)).

Ďalšie dva transportéry z tejto rodiny, *OsNIP1;1* a *OsNIP3;3*, vykazujú vysokú efektívnosť pri transporte As^{III} , pričom *OsNIP1;1* netransportuje Si. Oba gény majú nízku úroveň expresie v koreni, a práve preto knockout mutácia buď *OsNIP3;3* alebo *OsNIP1;1* neznížila príjem As^{III} alebo jeho akumuláciu v nadzemných častiach ryže. Overexpresia buď *OsNIP3;3* alebo *OsNIP1;1* v rastline avšak výrazne znížila As akumuláciu v nadzemných častiach, pričom obsah As v koreňoch sa nezmenil. To naznačuje, že absorpcia As^{III} koreňmi nebola ovplyvnená. Obsah As^{III} v xylémovej štrave v overexprimujúcich líniiach bol však približne polovičný v porovnaní s WT čo napovedá o redukcii nakladania As^{III} do ciev xylému ([Sun et al., 2018](#)).

OsNIP3;1 a *OsNIP3;2* reprezentujú ďalšie transportéry As^{III} , ale narozdiel od ostatných spomínaných dokážu sprostredkovať aj transport peroxidu vodíka, čo je aktivita, ktorá doteraz nebola u väčšiny NIPs dostatočne preskúmaná ([Katsuhara et al., 2014](#)). V štúdií [Ma et al. \(2008\)](#) výskumníci exprimovali ďalší ryžový NIP *OsNIP2;2 (OsLsi6)* v oocytoch *Xenopus laevis* a demonštrovali arzenit-transportnú aktivitu. Avšak krátkodobé experimenty s T-DNA inzerčnými líniami ryže neodhalili žiadnu významnú rolu v prijímaní As^{III} . Autori pripisujú tento výsledok veľmi nízkej úrovni expresie tohto génu v koreni ([Ma et al., 2008](#)). Niektoré z vykonaných štúdií taktiež navrhujú funkciu *OsPIP2;4*, *OsPIP2;6* a *OsPIP2;7* v prijímaní As^{III} v ryži, avšak tieto tvrdenia definitívne vyžadujú ďalší výskum ([Mosa et al., 2012](#)). Schématické znázornenie príjmu arzenitu v ryži pomocou NIP a PIP transportérov a sekvestrácia arzenitu sú znázornené na Obr. 1B.

P. vittata je narozdiel od *A. thaliana* a ryže menej efektívna pri prijímaní As^{III} ([Wang et al., 2011](#)) a tento mechanizmus ešte nie je dostatočne objasnený. Predpokladá sa, že podobne ako u horespomínaných rastlín, v ňom hrajú významnú úlohu aquaporíny, konkrétne rodiny MIP a

TIP ([He et al., 2015](#)). Hlavným kandidátom je momentálne PvTIP4;1, lokalizovaný najmä v koreňoch sporofytu, s nízkou úrovňou expície v stonku a vo vejárovitých listoch. Štúdia, prostredníctvom práce s protoplastmi *P. vittata*, pozorovala PvTIP4;1 hlavne na periférii protoplastov, čo naznačuje, že subcelulárne by sa proteín mohol vyskytovať na cytoplazmatickej membráne ([He et al., 2015](#)).

2.3. Príjem metylovaných foriem arzénu

Nižšie pK_a MMA a DMA v porovnaní s anorganickým As znamená, že príjem týchto metylovaných foriem bude oveľa efektívnejší pri nižšom pH prostredia (rozumej 4,5 – 5,5). Taktiež je dôležité pripomenúť, že v porovnaní s arzenitom a arzenátom je ich transport do rastliny pomalší ([Tang, Kang et al., 2016](#), [Zheng et al., 2012](#), [Li, Ago et al., 2009](#), [Raab et al., 2007](#)).

V súčasnosti nenachádzame veľa informácií o prijíme MMA a DMA u *A. thaliana*. Štúdia od [Tang et al. \(2017\)](#) identifikovala putatívny peptidový transportér patriaci do rodiny nitrátových transportérov 1/peptidových transportérov (NTR1/PTR), a to konkrétne AtPTR1 a AtPTR5, ktoré oboje vykazovali transportnú aktivitu pre DMA pri heterológnej expresii odpovedajúcich génov v oocytoch *Xenopus laevis*. Oba proteíny boli lokalizované na plazmatickej membráne, avšak ich úloha v transporte DMA v rastlinnom modeli zatiaľ nebola testovaná ([Tang et al., 2017](#)).

Čo sa ryže týka, MMA do nej preniká majoritne skrz NIP transportér z rodiny akvaporínov, OsLsi1, pričom knockout mutanti *lsi1* mali o 80% nižší obsah MMA v porovnaní s WT ([Li, Ago et al., 2009](#)). Tento dramatický efekt však nebol zopakovaný pri prijíme DMA, čo by mohlo naznačovať vyššiu afinitu OsLsi1 práve k MMA ([Li, Ago et al., 2009](#)). Je to práve OsLsi1, ktorý je zobrazený na Obr. 1B ako sprostredkovateľ prijímu metylovaných foriem As v ryži.

Blízky homológ AtPTR1, OsPTR7 z ryže taktiež vykazoval transportnú aktivitu pre DMA v oocytoch *Xenopus laevis*. Po exprimovaní *OsPTR7* v protoplastoch *Nicotiana benthamiana*, bol tento putatívny peptidový transportér lokalizovaný hlavne na plazmatickej membráne. Expícia v rastlinách ryže bola detekovaná v bunkách nadzemných pletív, ale určitá miera expície bola zaznamenaná aj v koreňoch ([Tang et al., 2017](#)).

Napriek tomu, že Obr. 1 zobrazuje možnú konverziu metylovaných foriem arzénu z MMA na DMA, schopnosť metylácie vo vyšších terestrických rastlinách nebola dokázaná ([Lomax et al., 2011](#), [Chen et al., 2019](#)).

U hyperakumulátora *Pteris vittata* rastúcim v médiu s pridanými 10 mg MMA alebo DMA na liter média bolo dokázané, že tieto rastliny mali rovnomerne rozložený obsah celkového As medzi koreňmi a vejárovitými listami. Pri rastlinách rastúcich v As^V alebo As^{III} prostredí neboli detekované žiadne metylované formy v xylémovej šŕave ([Kertulis et al., 2005](#)).

V tých papradiach, ktorým bol As dodaný len vo forme DMA, sa aj prenášal najmä ako DMA. Na druhej strane, rastliny zásobované čisto MMA obsahovali v xylémovej šŕave aj DMA, čo by mohlo naznačovať schopnosť metylácie As *in planta* ([Chen et al., 2003](#)).

Celkovo sa zdá, že papraď transportuje arzén vo forme, ktorá je pre ňu najmenej škodlivá, bez ohľadu na dodávanú formu. Štúdia od [Tu et al. \(2003\)](#) detekovala v listoch *P. vittata* pri dodávaní DMA alebo MMA len málo metylovaných foriem alebo žiadne, čo naznačuje, že v listoch môže byť dochádzať k demetylácii, alebo je rastlina neochotná translokovať metylované formy do nadzemných častí ([Kertulis et al., 2005](#)).

U všetkých troch organizmoch nepochybne hrajú významnú rolu pri prijíme As^V z prostredia transportéry rodiny PHT1. U *A. thaliana*, rozdielna afinita k Pi u zatiaľ identifikovaných PHT ovplyvňuje toleranciu rastlín voči As^V a intracelulárna koncentrácia Pi má pravdepodobne efekt na celkovú toxicitu As^V. Prijem As^{III} z prostredia je predovšetkým sprostredkovaný NIP transportérmi z rodiny akvaporínov, pričom v *A. thaliana* je väčšina exprimovaná v koreňoch a niektoré aj v nadzemných častiach a predpokladá sa, že medzi sebou pri prenose As^{III} interagujú. V ryži sa pravdepodobne PHT1 transportéry podieľajú nielen na prijíme As^V, ale aj na jeho translokácii do nadzemných častí. As^{III} využíva k vstupu do ryže kremíkové transportéry exprimované v koreni, a preto má ryža vysokú kapacitu pre príjem As^{III}. V *Pteris vittata* bola funkcia PHT transportérov doteraz dobre popísaná len v kvasinkách a ich charakterizácia definitívne vyžaduje ďalší výskum. Čo sa príjmu As^{III} týka, *Pteris vittata* vykazuje omnoho menšiu efektívnosť v porovnaní s *A. thaliana* a ryžou. O prijíme metylovaných foriem u všetkých zmienovaných druhov existujú len nekompletné informácie, ktoré nie sú dobre overené *in situ* a potrebujú ďalší výskum.

3. Translokácia arzénu do nadzemných častí

Koncentrácia a akumulácia As v nadzemných častiach rastlín nezávisí len od prijímu As z externého prostredia, ale aj od jeho translokácie z koreňov do nadzemných častí. Tento proces sa líši v rámci druhu rastlín a koncentrácie a špeciácie As v prostredí.

Arzén sa z koreňa do nadzemných častí transportuje buď xylémom, alebo, medzi jednotlivými nadzemnými časťami, floémom. Je dôležité pripomenúť, že u väčšiny rastlín je iba menšia časť celkového As translokovaná, práve z dôvodu rozšírených tolerančných mechanizmov, ktorých jednotliví hráči participujú aj pri obrane voči iným toxickým prvkom.

V prípade hyperakumulátorov je to však opačne: väčšina potenciálne škodlivých kovov/metaloidov sa ukladá vo výhonkoch. Príkladom je *P. vittata*, kde sa približne 80% arzenu ukladá v nadzemných častiach. Naopak, len približne 5-10% celkového arzenu končí v nadzemných častiach neakumulujúcich druhov, ako je napríklad *A. thaliana* ([Quaghebeur and Zed, 2004](#), [Isayenkov and Maathuis, 2008](#)) a ryža ([Ma et al., 2008](#)). Z týchto 5-10% celkového As, arzenit reprezentuje majoritnú časť (zhruba 60-100%) ([Zhao et al., 2008](#), [Ma et al., 2008](#)).

3.1. Nakladanie As do xylému

Predpokladá sa, že transport As xylémom je hlavným sprostredkovateľom pohybu As z koreňov do nadzemných častí u ryže, *Arabidopsis thaliana* a *Pteris vittata* ([Zhao et al., 2011](#), [Indriolo et al., 2010](#)).

V koreni sa môže arzenit nachádzať z viacerých dôvodov. Buď je prijatý priamo zo substrátu, alebo vznikol redukciou prijatého arzenátu prostredníctvom enzýmu arzenátoreduktáza (viac informácií v kapitole Arzenátoreduktáza).

V *A. thaliana* sa As^{III} dostáva do cievic xylému najmä pomocou transportérov AtNIP1;1 a AtNIP3;1 ([Kamiya et al., 2009](#), [Xu et al., 2015](#)). AtNIP3;1 sa dominantne nachádza v rhizodermálnych bunkách a v prechodových endodermálnych bunkách v blízkosti pericyklu. Tieto bunky sú tenkostenné a umožňujú efektívny prechod rozpustených látok do stéle ([Peterson and Enstone, 1996](#)). V koreňových špičkách nebola expresia *AtNIP3;1* zaznamenaná ([Xu et al., 2015](#)).

V porovnaní s Col-0 vykazovali LOF mutanti *nip3;1* zjavné zlepšenie tolerancie voči arzenitu na základe väčšej biomasy nadzemných častí a nižšiemu obsahu As v nadzemných častiach. Double LOF mutanti *nip3;1 nip1;1* zas preukázali zvýšený rast koreňov v As^{III}-obsahujúcich podmienkach v porovnaní s Col-0 ([Xu et al., 2015](#)).

V xyléme ryže má arzenit vysokú mobilitu ([Zhao et al., 2011](#)) a do cievic sa dostáva predovšetkým cez kremíkové transportéry ([Ma et al., 2008](#)). Kremíkový transportér z rodiny akvaporínov OsNIP2;1 (OsLsi1), lokalizovaný výhradne na vonkajšej strane cytoplazmatickej membrány buniek exodermis a endodermis, je zodpovedný za horizontálnu translokáciu As^{III} a môže sprostredkovať transport As^{III} v oboch smeroch v závislosti od koncentračného gradientu. Na proximálnej strane exodermálnych a endodermálnych buniek koreňa sa nachádza OsLsi2,

ktorý zohráva taktiež dôležitú úlohu pri radiálnom transporte As^{III} smerom k stéle, kde je nakladaný do xylému. Po vystavení LOF mutanta *lsi2-2* As^{III} -obsahujúcim podmienkam sa zistilo, že *lsi2-2* mal o 66% nižší obsah As v nadzemných častiach v porovnaní s WT. Obsah As v xylémovej štrave sa taktiež znížil, a to o 73% v porovnaní s WT ([Ma et al., 2008](#)). Polohová polarizácia OsLsi1 a OsLsi2 zabezpečuje absorpciu a transport kremíka do stéle prostredníctvom OsLsi1, po ktorom nasleduje jeho nakladanie do xylému prostredníctvom OsLsi2. Tým sa zvyšuje celková účinnosť procesu, čo je vysvetlením toho, prečo má ryža vyššiu schopnosť absorpcie a translokácie As^{III} v porovnaní s inými plodinami. ([Su et al., 2010](#), [Ma et al., 2008](#)).

Ďalšie transportéry zúčastňujúce sa translokácie As^{III} v ryži sú OsNIP1;1 a OsNIP3;3, lokalizované na plazmatickej membráne, pričom OsNIP1;1 bol detekovaný v bunkách exodermis, endodermis a v parenchýme xylému. Oba sú zobrazené na Obr. 2. Úroveň expresie oboch transportérov v koreni je však veľmi nízka v porovnaní s hladinou expresie OsLsi1. LOF mutácia buď *OsNIP1;1* alebo *OsNIP3;3* nemala vplyv na As akumuláciu v nadzemných častiach, avšak overexpresia buď *OsNIP1;1* alebo *OsNIP3;3* signifikantne znížila obsah As v nadzemných častiach ryže rastúcej v As^{III} -obsahujúcich podmienkach. Obsah As v koreňoch overexprimujúcich mutantov sa však nezmenil, a teda absorpcia As^{III} koreňmi ovplyvnená nebola. Obsah As^{III} v xylémovej štrave z overexprimujúcich línií bol približne polovičný v porovnaní s WT, čo naznačuje, že nakladanie As^{III} do ciev xylému bolo redukované ([Sun et al., 2018](#)).

Nielen OsLsi2, ale aj ABC transportér C-typu OsABCC7 má podiel na translokácii arzenitu z koreňa do nadzemných častí. Tento transportér je intenzívne exprimovaný v xylémových parenchymatických bunkách vo vnútri stéle koreňov ryže a vykazuje afinitu pre komplexy As^{III} -PC aj As^{III} -GSH ([Tang et al., 2019](#)). Podiel OsABCC7 na naloženie As^{III} komplexov do xylému je však len mierny, keďže väčšina As v xylémovej štrave ryže je skôr vo forme voľného As^{III} alebo As^V než vo forme As^{III} -tiolových komplexov ([Shi et al., 2016](#); [Xu et al., 2007](#); [Zhao et al., 2009](#)).

U nedávno objaveného transportéra OsMATE2 patriaceho k proteínom rodiny MATE (multidrug and toxic compound extrusion) bola predložená domnienka, že tento transportér by mohol zohrávať úlohu pri translokácii As do zrn ryže, keďže špecifické umlčanie *OsMATE2* v bunkách endospermu znížilo akumuláciu As v zrnách ryže ([Das et al., 2018](#)). Priamo transportnú aktivitu OsMATE2 je však ešte potrebné potvrdiť.

Hyperakumulátor *Pteris vittata* translokuje koreňmi prijatý As^V cez xylém do rhizómov, kde prebieha majoritný podiel redukcie na As^{III} . Cesta As sa zakončuje vo vejárovitých listoch, kde

sa nachádza hlavne vo forme As^{III} ([Wang et al., 2002](#), [Poynton et al., 2004](#), [Mathews et al., 2010](#), [Li et al., 2020](#)). Okrem ABCC1 a NIP transportérov identifikovaných v *A. thaliana* a ryži, bol v kvasinkách nájdený ďalší As^{III} transportér, ACR3 (Arsenic Compounds Resistance 3), ktorý v nich plní funkciu výdaja As^{III} z buniek ([Wysocki et al., 1997](#)). Napriek tomu, že u kvitnúcich rastlín ACR3 gény chýbajú ([Indriolo et al., 2010](#)), u hyperakumulátora *Pteris vittata* boli identifikované transportéry patriace do tejto rodiny, nazvané PvACR3 a PvACR3;1. Oba boli detekované na tonoplaste gametofytov a PvACR3 knockdown gametofyty rastúce 6 dní na médiu s 0,5mM As^{III} vykazovali o 43% silnejšiu redukciu úrovně rastu v porovnaní s WT gametofytmi. PvACR3;1 knockdown mutanti mali úroveň rastu za rovnakých podmienok veľmi podobnú s WT, čo znamená, že ich funkcia v As tolerancii v *P. vittata* ostáva neobjasnená. Na základe tohto pozorovania a lokalizácie transportéra PvACR3 autori predpokladajú, že funkcia PvACR3 tkvie v rýchlym transporte arzenitu z cytoplazmy do vakuol. Táto hypotéza je v súlade s výsledkami publikovanými [Pickering et al. \(2006\)](#), ktoré preukázali, že dominantnou formou arzenu v gametofytoch (skladovanou pravdepodobne vo vakuolách) *P. vittata* je arzenit ([Pickering et al., 2006](#), [Indriolo et al., 2010](#)). Funkcia PvACR3 a PvACR3;1 v gametofyte však definitívne vyžaduje ďalšie preskúmanie. U sporofytov *P. vittata* bola expresia PvACR3 silne upregulovaná prítomnosťou arzenitu v koreni, ale lokalizácia a úloha PvACR3 a PvACR3;1 v sporofytoch *P. vittata* sú v čase písania tejto práce, neobjasnené. Výskum komplikuje práve transport As v sporofyte, ktorý vyžaduje naloženie As do xylému pre translokáciu do nadzemných častí, kde je pravdepodobne sekvestrovaný vo vakuolách ([Zhao et al., 2003](#), [Chen et al., 2017](#)).

Nemalú časť translokovaného arzenu v *P. vittata* tvorí arzenát, ktorého transport z koreňov do rhizómov sprostredkujú PHT1 transportéry ([DiTusa et al., 2015](#), [Li et al., 2020](#), [Han et al., 2017](#)). Je dôležité pripomenúť, že u *P. vittata* sa v koreňoch a vejárovitých listoch nachádza veľmi malé množstvo As^{III}-GSH/As^{III}-PCs komplexov a dominantnou formou arzenu, uloženého pravdepodobne vo vakuolách, je voľný As^{III}. Líši sa tým od *A. thaliana* a ryže, pretože v týchto rastlinách sa do vakuol sekvestruje As^{III} v komplexe s glutationom (GSH) alebo fytochelatínmi (PCs) ([Song et al., 2014](#), [Song et al., 2010](#)).

Po vytvorení transgénnych línií *A. thaliana* sa PvACR3 vyskytoval na plazmatickej membráne a jeho heterologická expresia zvyšovala As^{III} koreňový výdaj, čo by mohlo znamenať funkciu PvACR3 pri výdaji As^{III} z cytoplazmy v *A. thaliana*. Na druhej strane, heterologická expresia PvACR3;1 v *A. thaliana* bola detekovaná na tonoplaste buniek koreňa, čo naznačuje zachovanie pôvodnej predpokladanej funkcie PvACR3;1, a teda sekvestrovanie As^{III} do vakuol koreňových

buniek. Vysvetlenie odlišnej subcelulárnej lokalizácie však autori vo svojej štúdií neobjasnili ([Zhao et al., 2003](#), [Chen et al., 2017](#)).

Ochota transportovať As do nadzemných častí nakladaním do xylému sa líši v závislosti od rastlinného druhu. *A. thaliana* je vo všeobecnosti veľmi senzitívny na prítomnosť As a nevykazuje takú efektivitu nakladania As^{III} do xylému ako ryža. Tá transportuje arzenit veľmi účinne prostredníctvom kremíkových transportérov, vďaka jeho štruktúrnej podobnosti s kremíkom. V nadzemných častiach a semenách oboch spomínaných rastlín je potom transportovaný voľný arzenit sekvestrovaný vo vakuolách vo forme thiolových komplexov. *P. vittata* naopak minimalizuje výskyt komplexov As^{III} -PCs/GSH a pravdepodobne využíva PvACR3 a PvACR3;1 na rýchle nakladanie arzenitu do xylému. Hypotetizuje sa, že PvACR3 a PvACR3;1 funguje aj pri sekvestracii voľného arzenitu do vakuol, avšak je dôležité pripomenúť, že funkcia oboch transportérov ostáva neobjasnená.

3.2. Translokácia arzenu floémom

Arzén sa do semien pravdepodobne dostáva cez floémový transportný systém, ktorý transportuje materiály zo zdrojových pletív (listy) do zásobných pletív (zrno) ([Marschner, 1995](#)). Momentálne však existuje len zopár štúdií, ktoré sa zaoberajú jednotlivými transportérmi zapojenými do nakladania As do floému. Je dôležité pripomenúť, že As^{III} sa do nadzemných častí *A. thaliana* a ryže dostáva hlavne vo voľnej forme, keďže horespomínaná komplexácia As^{III} s PCs v koreňoch znižuje úroveň As translokácie do nadzemných častí a v koreňoch zvyšuje sekvestráciu As^{III} do vakuol. Dominantnú formu As vo floéme *A. thaliana* a ryže reprezentuje práve voľný arzenit a túto hypotézu podporuje fakt, že majoritnou formou As v nadzemných častiach *A. thaliana* je voľný arzenit ([Liu et al., 2010](#)). V *A. thaliana* sú dva inozitolové transportéry AtINT2 a AtINT4, lokalizované na plazmatickej membráne sprievodných buniek, zodpovedné za nakladanie As^{III} do floému. Narušenie expresie buď *AtINT2* alebo *AtINT4* viedlo k zníženému obsahu As vo floémovom exudáte a v semenách *A. thaliana* ([Duan et al., 2016](#)).

As transport do zrn ryže je vykonaný taktiež najmä skrz floém ([Carey et al., 2010](#)). Či existujú, podobne ako u *A. thaliana*, inozitolové transportéry zodpovedné za nakladanie As^{III} do floému aj v ryži, nie je známe. Ak sa však tieto nálezy preukážu uplatniteľné aj pre ryžu, potom môžu byť inozitolové transportéry kandidátmi na budúcu genetickú modifikáciu s cieľom znížiť obsah arzenu v zrnách ryže.

Ovplyvnenie As translokácie do zŕn ryže by taktiež mohlo byť vykonané genetickou modifikáciou fytochelatínsyntázy OsPCS1 v súčinnosti s OsABCC1 transportérom. Modulácia ich funkcie by mohla obmedziť As transport do zŕn tým, že oba hráči podporujú jeho sekvestráciu vo forme PC konjugátov do vakuol ([Zhang et al., 2023](#)). OsABCC1 sa nachádza predovšetkým na tonoplaste floémových sprievodných buniek nódov, internódií a koreňa. Knockout mutanti *Osabcc1* vykazovali zvýšenú alokáciu As do zŕn, čo naznačuje, že OsABCC1 hrá určitú úlohu pri obmedzovaní As transportu do zŕn ryže ([Song et al., 2014](#)). Schématické zobrazenie funkcie a lokalizácie OsABCC1 v ryži je znázornené na Obr. 3.

Distribúcia organického a anorganického arzénu v zrnách ryže je výrazne odlišná od *A. thaliana*. Anorganický arzén je väčšinou prítomný v bunkách pokožky zrna, zatiaľ čo DMA sa s väčšou pravdepodobnosťou dostáva do endospermu ([Carey et al., 2010](#)). Medzi organické formy As taktiež radíme TMAO, ktorý, spoločne s DMA a MMA, reprezentuje 10-90% celkového As v ryžových zrnách ([Zhao et al., 2008](#), [Arao et al., 2011](#), [Zheng et al., 2010](#)). Mobilita organického arzénu vo floéme je vyššia, než mobilita anorganického arzénu. MMA/DMA sa môže v zrnách ryže akumulovať v dvojnásobne vyšších koncentráciách v porovnaní s As^{III}/As^V ([Zheng et al., 2012](#)).

DMA transportnú aktivitu objavili [Tang et al. \(2017\)](#) v putatívnom peptidovom transportéri OsPTR7 (OsNPF8.1), lokalizovanom predovšetkým na plazmatickej membráne buniek nadzemných orgánov ryže, s nižšou úrovňou expzie aj v koreňoch. T-DNA inzerčná mutácia *OsPTR7* spôsobila takmer 70% redukciu As akumulácie v nadzemných častiach rastlín rastúcich v médiu s obsahom DMA. Tieto mutanti vykazovali taktiež signifikantnú redukciu celkového As obsahu v zrnách. Tieto zistenia podporujú tvrdenie, že OsPTR7 sa zúčastňuje nakladania DMA do floému ([Tang et al., 2017](#)). Lokalizácia a funkcia OsPTR7 je znázornená na Obr. 2.

Transport As floémom v *P. vittata* doposiaľ preskúmaný nebol.

Arzenit sa v *A. thaliana* prenáša floémom do zŕn, pričom inozitolové transportéry AtINT2 a AtINT4 pravdepodobne zohrávajú kľúčovú úlohu pri nakladaní As^{III} . Do zŕn ryže je As^{III} taktiež transportovaný primárne cez floém, kde je podľa všetkého nakladaný prostredníctvom OsABCC1. DMA sa do zŕn ryže dostáva pravdepodobne skrz OsPTR7, pričom organické formy As sa v ryži preferenčne hromadia v odlišnej lokalite, ako formy anorganické.

4. Výdaj arzénu

Na zníženie toxickej záťaže buniek môže byť As^{III} z koreňov (alebo z rhizómov, v prípade *Pteris vittata*) rastlín extrudovaný do vonkajšieho prostredia. Na rozdiel od príjmu arzénu v rastlinách, ktorý je do veľkej miery preskúmaný, mechanizmy výdaja As ostávajú stále záhadou.

V *A. thaliana* je väčšina As v podobe komplexov s PCs. Zníženie As^{III} komplexácie (pozorované v *cad1-3* PC-deficientných mutantoch) vedie k zvýšenému As^{III} výdaju do vonkajšieho prostredia a k zvýšenej As translokácii do nadzemných častí. Bolo zaznamenané, že výdaj As^{III} koreňmi ryže a *A. thaliana* bol pomalší, pokiaľ rastliny boli zásobované As^V ([Liu et al., 2010](#); [Xu et al., 2007](#); [Zhao, Ago et al., 2010](#)).

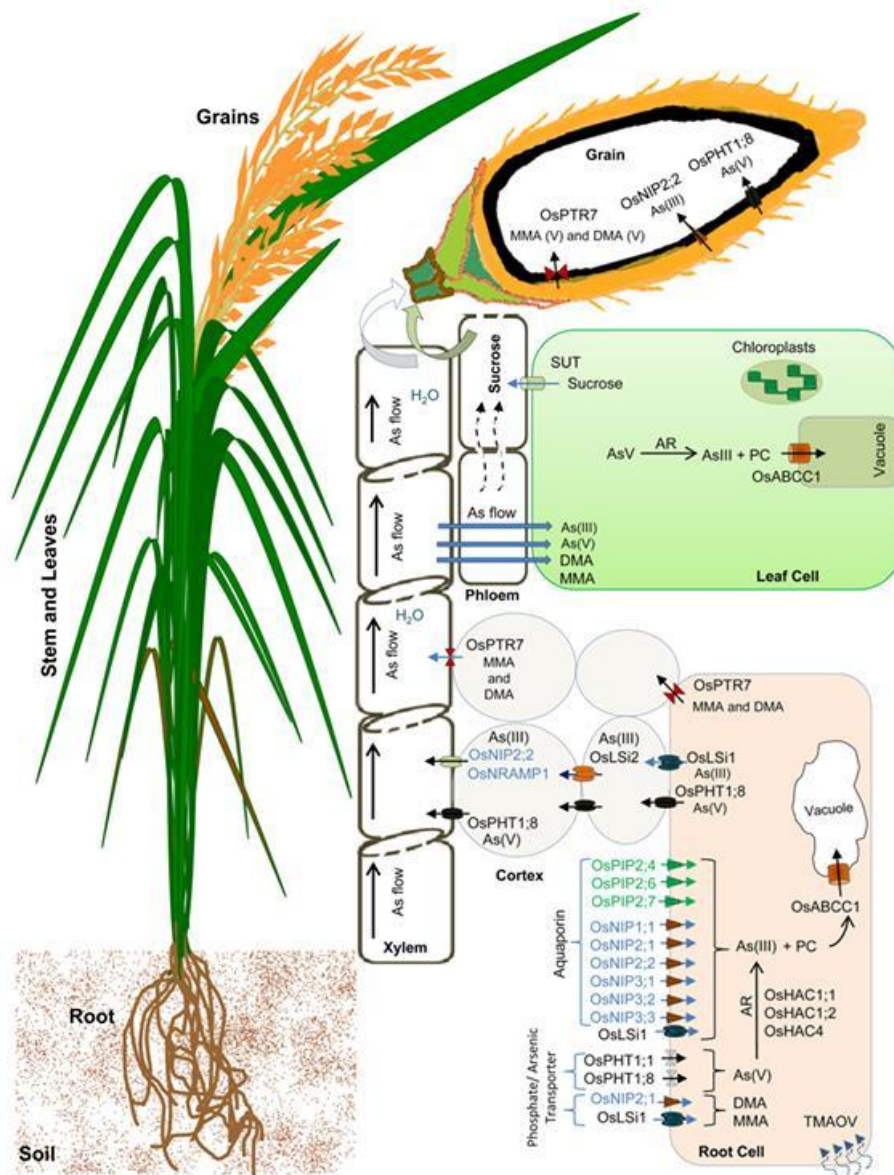
AtPIN2 sprostredkúva výdaj auxínu v laterálnej koreňovej čiapočke, rhizodermálnych bunkách a v bunkách kortexu ([Abas et al., 2006](#); [Rahman et al., 2010](#)). [Ashraf et al. \(2019\)](#) vo svojej štúdií naznačujú, že AtPIN2 sa môže podieľať aj na výdaji As^{III} . V porovnaní s Col-0 bol knockdown mutant *pin2/eir1-1* viac náchylný na inhibíciu rastu koreňov vyvolanou As^{III} a akumuloval 2-3-krát vyšší obsah arzénu vo vrcholových častiach koreňov, teda na miestach, kde by bol AtPIN2 exprimovaný v Col-0 ([Ashraf et al., 2019](#)). V štúdiách od [Geisler et al. \(2017\)](#) či [Cho et al. \(2012\)](#) bolo preukázané, že PIN interagujú so skupinou membránových proteínov rodiny PGP/ABCB (ATP-binding cassette transporters of the B subfamily), ktoré sa podieľajú na transporte auxínu. V mnohých organizmoch sa proteíny zo skupiny PGP/ABCB/MDR podieľajú na aktívnom efluxe rôznych xenobiotík vrátane kovov z buniek. Autori predpokladajú, že rastlinné ABCB by mohli interagovať s PIN2 pri výdaji arzénu z koreňov ([Ashraf et al., 2019](#)).

Podobne ako u *A. thaliana*, kľúčové membránové transportéry zodpovedné za As^{III} výdaj v epidermálnych bunkách koreňa ryže doteraz neboli charakterizované. Transportéry z rodiny akvaporínov, ako napríklad OsLsi1, môžu sprostredkovať transport As^{III} v oboch smeroch v závislosti od koncentračného gradientu. Štúdiá s použitím mutantov *OsLsi1* ukázala, že výdaj skrze OsLsi1 predstavoval len 15-20% celkového výdaju As^{III} do vonkajšieho prostredia, čo naznačuje existenciu ďalších výtokových transportérov ([Zhao, Ago et al., 2010](#)).

V *P. vittata* výdaj As^{III} koreňmi pravdepodobne nezohráva dôležitú úlohu a úroveň tohto procesu si rastlina udržiava na minimálnej hladine. Síce niektoré štúdie ukázali, že pri vysokej hladine As v prostredí dochádza v koreňoch *P. vittata* k významnému vylučovaniu As^{III} z koreňov, ale to by mohla byť stratégia detoxifikácie As , ktorá sa uplatňuje len pri nadmernom zaťažení As^V (200-500 μM) ([Chen et al., 2016](#), [Han et al., 2016](#)). Štúdiá od [Huang et al. \(2011\)](#) preukázala, že *P. vittata* v menšej miere vyplavuje do média aj As^{III} aj As^V , pričom úroveň

výdaja As^{V} je väčšia. Celkový As výdaj je však omnoho menší ako ten u ryži a pravdepodobne nebude významne zasahovať do detoxifikácie As ([Xu et al, 2007](#)).

Celkovo sa mechanizmy výdaja As medzi jednotlivými druhmi líšia, čo odráža ich adaptáciu na kontamináciu As. V *A. thaliana* ovplyvňuje vylučovanie As^{III} jeho komplexácia s PCs a GSH. Je možné, že AtPIN2 sprostredkúva výdaj As^{III} z koreňov, ale heterologická expresia v kvasinkách nepreukázala žiadnu transportnú aktivitu As^{III} . U ryži bolo dokázané, že transportér z rodiny akvaporínov OsLsi1 sprostredkováva obojsmerný transport As^{III} v závislosti od koncentračného gradientu. Podiel tohto transportéra na výdaji je však malý. Ďalšie objasnenie mechanizmov vyplavovania As^{III} z ryže má zásadný význam pre pochopenie a zmiernenie toxicity arzénu v plodinách ryže. Hyperakumulátor *P. vittata* účinne nakladá As^{III} do xylému pre transport do nadzemných častí a preto limituje jeho výdaj do vonkajšieho prostredia, pokiaľ nie je silne zaťažený.



Obr. 2: Schématický návrh As príjmu, transportu a detoxifikácie v ryži ([Kumar et al., 2022](#))

5. Arzenátreduktáza

Arzenátreduktáza reprezentuje výrazný spájací faktor medzi prijatým arzénom a jeho výdajom či translokáciou. Detoxifikácia As v rastline vyžaduje redukcii arzenu z As^V formy na As^{III} formu a tento kľúčový krok je katalyzovaný enzymaticky práve prostredníctvom arzenátreduktázy. Mechanizmus tohto procesu je obecný naprieč eukaryotickými organizmami ([Mukhopadhyay and Rosen, 2002](#)).

5.1. Arzenátreduktáza *Arabidopsis thaliana*

Proces redukcie As^V na As^{III} je najlepšie preštudovaný u *Arabidopsis thaliana*, v ktorom hrá esenciálnu rolu enzým arzenátoreduktáza. Jedným z prvých kandidátov na kódovanie arzenátoreduktázy bol proteín AtACR2. Tento proteín vykazuje sekvenčnú homológiu ku kvasinkovej arzenátoreduktáze (ScACR2), čo mohlo naznačovať podobnú funkciu aj v *A. thaliana*. Vloženie AtACR2 do mutantného kmeňa *E.coli*, ktorému chýbala endogénna arzenátoreduktáza ArsC ([Oden et al., 1994](#)) malo za výsledok komplementáciu tejto arzenátoreduktázy. To umožnilo tomuto As^V hypersenzitívnemu kmeňu opäť nadobnúť pôvodnú As^V toleranciu ([Dhanker et al., 2006](#)).

[Liu et al. \(2012\)](#) ale dokázali, že napriek As^V reduktázovej aktivite tohto homológa v heterologických systémoch *in vitro* ([Bleeker et al., 2006](#); [Dhanker et al., 2006](#)), nemá AtACR2 žiaden vplyv na As^V redukciu v *in vivo* podmienkach. Podobne, použitím root growth recovery (RGR) systému [Sanchez-Bermejo et al. \(2014\)](#) nedetekovali žiadne významné odlišnosti v As^V senzitivite v ACR2 knockout alebo overexprimujúcich mutantoch v porovnaní s Col-0 (Columbia 0). Knockout mutanti nevykazovali žiadnu zmenu v arzenátoreduktázovej aktivite a ani zmeny v As akumulácii a distribúcii v *A. thaliana* ([Sanchez-Bermejo et al., 2014](#)).

Autori pri svojom výskume porovnávali genotyp Kashmir-1 (Kas-1), ktorý bol arzenát-senzitívny a genotyp Col *gl-1* (Columbia), ktorý bol arzenát-tolerantný a prostredníctvom mapovania QTL (quantitative trait locus) identifikovali QTL ATQ1, ktorý je zodpovedný za senzitivitu k arzénu. V tomto lokuse autori určili gén *At2g21045*, ktorý kóduje rodanáze-podobný proteín, ktorý je fylogeneticky veľmi odlišný od AtACR2. Táto doména je u eukaryotických organizmov charakteristická pre As^V reduktázy a na základe tohto tvrdenia si výskumníci dovolili určiť *At2g21045* ako gén zodpovedný za kódovanie arzenátoreduktázy a teda za prirodzené zvýšenie As^V tolerancie rastliny ([Sanchez-Bermejo et al., 2014](#)). Narozdiel od AtACR2, arzenátoreduktázová aktivita ATQ1 bola dokázaná aj v *in vivo*, aj v *in vitro* podmienkach ([Chao et al., 2014](#)).

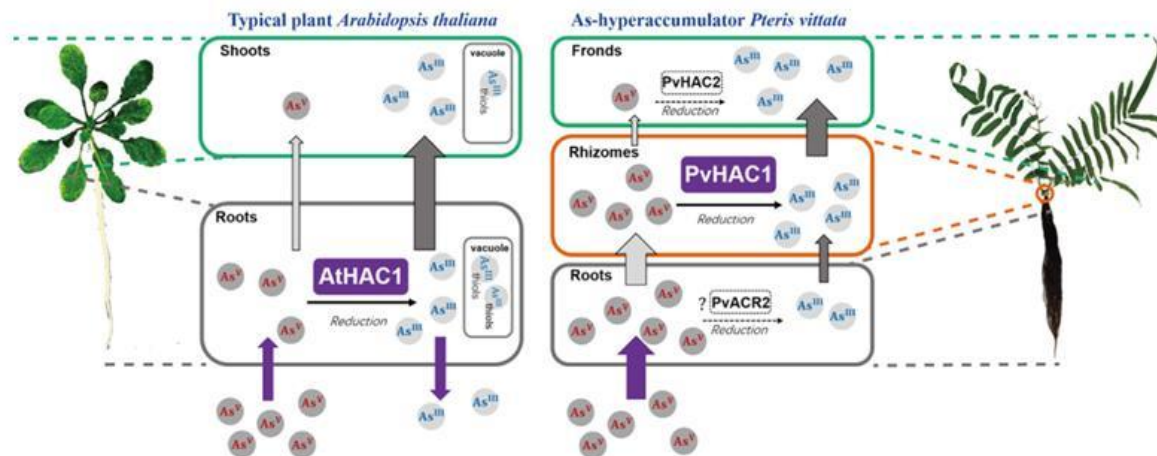
Nápodobne, genome-wide association mapping (GWA) analýza identifikovala na chromozóme 2 ďalší QTL, *HAC1/ATQ1* (*High Arsenic Content 1*), zodpovedný za As toleranciu. Použitím mutantov *A. thaliana hac1-1* a *hac1-2* sa zistilo, že práve inzercia v géne *At2g21045* je zodpovedná za spomínaný fenotyp a v dôsledku toho bol gén *At2g21045* pomenovaný *HAC1/ATQ1* ([Chao et al., 2014](#)). Predikovaná aminokyselinová sekvencia kódovaná *HAC1* (*HAC1;1*) obsahuje rodanáze-podobnú doménu, ktorá sa predovšetkým vyskytuje v rastlinných enzýmoch a funguje ako arzenátoreduktáza ([Bordo and Bork, 2002](#)). Na otestovanie tejto hypotézy využili výskumníci *hac1-1* a *hac1-2* LOF mutantov. Títo mutanti vykazovali zvýšenú akumuláciu arzenátu v nadzemných častiach a koreňoch v porovnaní s Col-0. Taktiež z celkovej

koncentrácie As v koreňoch Col-0 reprezentoval arzenit až 98%, zatiaľ čo u koreňov LOF single mutantov len 79-83%. Redukovaná kapacita konvertovať arzenát na arzenit v koreňoch je spájaná so zvýšením koncentrácie arzenátu v nadzemných častiach rastlín. Výskumníci navrhujú, že arzenát je v nich pravdepodobne redukovaný vďaka druhej, funkčnej alele *HAC1* (*HAC1;1*) alebo prostredníctvom *HAC1*-nezávislých mechanizmov, ako napríklad cez glutation alebo glutaredoxin ([Sundaram et al., 2008](#)). Táto konverzia by však bola veľmi pomalá a z tohto dôvodu zvažujú aj možný príspevok enzýmov (napr. fosforyláza purínových nukleotidov, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, glykogénfosforyláza a ornitínkarbamoyltransferáza) tvoriacich fosforylované produkty. Tie by mohli podporovať chemickú redukciu arzenátu vďaka nesprávnemu použitiu arzenátu namiesto fosfátu, generujúc arzenylované produkty. Tie potom glutation redukuje ľahšie ako samostatne sa nachádzajúci As^V ([Gregus et al., 2009](#), [Chao et al., 2014](#)).

AtHAC1 je primárne exprimovaný v koreňoch. Využitím fúzneho proteínu HAC1-GFP (green fluorescent protein) [Chao et al. \(2014\)](#) lokalizovali tento proteín v koreňových vláskoch, v rhizodermálnych bunkách na povrchu koreňa pokračujúc až po pericykel (tento výskyt však nebol reprodukovaný štúdiou od [Fischer et al. \(2020\)](#)). Vystavenie Col-0 rastúceho v prostredí obsahujúcom arzenát o koncentrácii 100 μM výrazne zvýšilo úroveň *HAC1* mRNA v koreňoch, zatiaľ čo vystavenie rovnakou dávkou arzenitu malo za následok jej pokles ([Chao et al., 2014](#)). HAC1 dosahuje najvyššiu efektivitu As^V redukcie vtedy, keď sa tento proteín nachádza v epidermis, kortexe a v endodermis a naopak najmenej účinnú až nulovú v bunkách stéle. Výnimkou sú bunky protoxylému, kde je HAC1 schopný limitovať As translokáciu do nadzemných častí. Expresia *HAC1* z *pS4* promotéra v bunkách protoxylému mutantov *hac1-1* je dokonca schopná zvrátiť As overakumuláciu, ktorá je pre tohto mutantu v nadzemných častiach typická. As tolerancia pre mutantu *hac1-1* však znovunadobudnutá nebola ([Fischer et al., 2020](#)). Výsledky taktiež poukazujú na možnú skutočnosť, že endodermis, konkrétne Caspariho pásik, sa správa ako hraničná vrstva buniek, ktorá rozčleňuje funkciu AtHAC1 ako arzenátoreduktázy vo vonkajších štruktúrach, kde je potrebná pre sprostredkovanie As tolerancie, a vo vnútroných štruktúrach stéle, kde sa AtHAC1 na As tolerancii nepodieľa ([Fischer et al., 2020](#)). Zjednodušený proces redukcie prostredníctvom AtHAC1 je znázornený na Obr. 3.

Výskumníci taktiež vystavili *hac1-1* a *hac1-2* LOF mutantov zvyšujúcim sa koncentráciám arzenátu a arzenitu. Oba typy toxických podmienok spôsobili významnú redukciu v raste koreňov a celkovej hodnoty čerstvej váhy rastliny. *hac1-1* a *hac1-2* LOF mutanti boli hypersenzitívni voči arzenátu v porovnaní s Col-0, avšak odlišnosť v senzitivite voči arzenitu

nebola detekovaná. Tento fakt potvrdzuje hypotézu, že HAC1 sa chová ako arzenátoreduktáza v koreňoch a tým reguluje As akumuláciu v koreňoch a nadzemných častiach rastlín vystavených As^V -obsahujúcim podmienkam. Autori, bohužiaľ, rozdielne správanie mutantov nediskutujú (Chao et al.2014).



Obr. 3: Schématické porovnanie procesu redukcie As^V v *A. thaliana* a *P. vittata* (Li et al., 2020)

5.2. Arzenátoreduktáza *Oryza sativa*

V genóme *Oryza sativa* bolo identifikovaných viac ako 10 *AtHAC1* podobných génov, ale ich funkcie stále nie sú charakterizované. Shi et al. (2016) sa vo svojej štúdií sústredili na *OsHAC1;1* a *OsHAC1;2*, blízke homológy *AtHAC1*. Tieto gény fungujú ako arzenátoreduktázy a hrajú dôležitú úlohu v regulácii As akumulácie v nadzemných častiach ryže, vrátane jej zŕn. Na základe tvorby chimerických proteínových konštruktov *OsHAC1;1-GFP* a *OsHAC1;2-GFP* zistili, že tieto gény sú najviac exprimované vo vonkajšej bunkovej vrstve koreňa, nezabúdajú na silnú expresiu *OsHAC1;1* v koreňových vláskoch maturačnej zóny koreňa. Na rozdiel od *OsHAC1;1*, ktorý sa akumuluje hlavne v koreňovej epidermis, koreňových vláskoch a v stéle, má *OsHAC1;2* vyššiu úroveň akumulácie v exodermis, vo vonkajšej vrstve kortexu a v stéle. Tým, že oba proteíny regulujú As^V redukciu vo vonkajších bunkových vrstvách koreňa, *OsHAC1;1* a *OsHAC1;2* by mohli umožňovať aj As^{III} výdaj z buniek do externého média (Shi et al., 2016). Nanešťastie, kvôli súčasnému nedostatku poznatkov o výdaji As^{III} do externého média, nie je vedecká komunita schopná formulovať relevantné hypotézy. Čo sa subcelulárnej lokalizácie týka, oba GFP signály pochádzali z cytoplazmy a z jadra. Tieto proteíny sú však relatívne malé a autori nevyklúčujú ich jednoduchú difúziu z cytoplazmy do jadra, pričom ich vlastná aktivita sa odohráva v cytoplazme. *OsHAC1;1-GFP* signál bol detekovaný aj v nadzemných častiach, konkrétne v stonkách a nódoch (Shi et al., 2016).

Overexpresia *OsHAC1;1* alebo *OsHAC1;2* cez ubiquitin promotér signifikantne zvýšila redukciu As^V na As^{III} , čím sa následne znížilo celkové množstvo As uloženého v koreňoch a v nadzemných častiach v porovnaní s WT, pričom efekt tejto mutácie bol výraznejší v nadzemných častiach. [Shi et al. \(2016\)](#) naznačujú, že tento fenotyp by mohol byť dosiahnutý posilneným výdajom As^{III} do externého média. Oba typy rastlín rástli 48 hod v $10 \mu M As^V$. V ďalších experimentoch boli tie isté rastliny vystavené celej škále As^V koncentrácií v externom médiu, počínajúc od 2 a končiac po $20 \mu M$ počas 48 hod. Vo všetkých týchto prostrediach mala overexpresia *OsHAC1;1* alebo *OsHAC1;2* za následok výrazné zníženie obsahu As v koreňoch a aj nadzemných častiach ([Shi et al., 2016](#)). Neskôr sa v štúdiu zamerali aj na efekt overexpresie *OsHAC1;1* a *OsHAC1;2* na ryžu rastúcu priamo v As kontaminovanej pôde v aerobných podmienkach. *OsHAC1;1* a *OsHAC1;2* overexprimujúci mutanti mali o 20% nižší obsah As v porovnaní s WT, pričom poľnohospodársky výnos a biomasa rastlín mutantných línií a WT nepreukázali signifikantné rozdiely ([Shi et al., 2016](#)).

Ďalšia štúdia od [Xu et al. \(2017\)](#) sa sústredila na *OsHAC4* a jeho úlohu v regulácii akumulácie As v rastline. *OsHAC4* obsahuje, podobne ako ostatné *OsHAC*, rodanáže-podobnú doménu a jeho aminokyselinová sekvencia je veľmi podobná As^V reduktázam *OsHAC1;1* a *OsHAC1;2*. Preskúmaním As^V -hypersenzitívneho mutanta *Oshac4/Osphf1-7* výskumníci určili ako kauzálny gén za tento mutantný fenotyp práve *OsHAC4*. Po raste single LOF mutanta *Oshac4* v médiu s $10-20 \mu M As^V$ bola dĺžka jeho koreňa redukovaná výrazne viac ako u kontrolného kultivaru ryže “Hei Jing 2” (HJ2) ([Shi et al., 2016](#)). Na dokázanie As^V reduktázovej aktivity boli *OsHAC1;1* a *OsHAC4* vložené do mutantného kmeňa *E.coli*, ktorému chýbala endogénna arzenátoreduktáza *ArsC* ([Oden et al., 1994](#)). Expresia buď *OsHAC1;1* alebo *OsHAC4* v tomto mutantnom kmeni znovu obnovila rast tejto línie na As^V -obsahujúcom médiu. Tieto výsledky potvrdili schopnosť *OsHAC4* a *OsHAC1;1* redukovať As^V na As^{III} ([Xu et al., 2017](#)).

Najvyššia úroveň expresie *OsHAC4* bola identifikovaná v koreni, a to dokonca aj v porovnaní s ostatnými *OsHAC* génmi. *OsHAC4-GFP* signál bol detekovaný v cytoplazme a v jadre rhizodermálnych a exodermálnych buniek a expresia *OsHAC4* bola upregulovaná po vystavení rastliny As^V podmienkam. Autori sa domnievajú, že táto lokácia je ideálna pri sprostredkovaní výdaju As^{III} do externého média ([Xu et al. 2017](#)). *Oshac4* mutanti vystavení $10 \mu M As^V$ a absencii fosfátu po 48 hod akumulovali v koreňoch takmer dvojnásobne viac As^V než As^{III} v porovnaní s WT. Percentuálny podiel As^{III} z celkového As v koreňoch sa výrazne znížil, z 82% u WT na 72% u mutanta, čo odráža redukčnú aktivitu *OsHAC4* v koreňoch. V nadzemných častiach *Oshac4* sa nahromadila trojnásobne vyššia koncentrácia As^{III} ako u WT, zatiaľ čo v koncentrácii akumulovaného As^V medzi *Oshac4* a WT nebol žiaden rozdiel. Je

možné, že tento fenotyp by mohol byť vyvolaný navýšením aktivity ostatných HAC1 reduktáz ([Xu et al. 2017](#)). Overexpresia *OsHAC4* v HJ2 rastlinách spôsobila, že korene týchto rastlín v As^V-obsahujúcom médiu boli výrazne dlhšie než tie patriace HJ2 WT rastlinám. Overexprimujúce *OsHAC4* línie mali taktiež nižší obsah celkového As v koreni a nadzemných častiach než bol pozorovaný u WT. Podobný fenotyp vykazovali aj *Oshac1,1* overexprimujúce línie ([Shi et al., 2016](#), [Xu et al. 2017](#)). Silnejšia úroveň expresie (v porovnaní so single mutantmi *Oshac1;1* a *Oshac1;2*) a jej výhodný výskyt priamo v epidermálnych a exodermálnych koreňových bunkách pravdepodobne vysvetľujú As^V hypersenzitívny fenotyp mutantu *Oshac4*. Tento fakt naznačuje, že OsHAC4 by mohol hrať omnoho dôležitejšiu rolu v As^V detoxifikácii než separátne fungujúce arzenátreduktázy OsHAC1;1 a OsHAC1;2 ([Xu et al. 2017](#), [Shi et al., 2016](#)). Celkový prehľad prijímu, transportu a detoxifikácie As v ryži je zobrazený na Obr. 2. Na záver je dôležité zmieniť, že síce väčšina týchto štúdií pracovala hlavne s As^V-obsahujúcim prostredím, dominantnou formou arzenu vyskytujúcim sa v zaplavených ryžových poliach v Bangladéši ostáva stále As^{III}. Tieto pôdy však bývajú mimo sezóny periodicky odvodnené a teda zažívajú suché obdobia. V súčasnosti sa dokonca začína vyskytovať trend, pri ktorom sa ryža pestuje v aeróbnom prostredí, čím sa následne šetrí spotreba vody a predchádza sa vzniku plyných emisií zodpovedných za skleníkový efekt. To naznačuje, že štúdium funkcie As^V reduktáz v ryži je, a ešte len bude, v budúcnosti veľmi dôležité ([Shelley et al., 2016](#)).

5.3. Arzenátreduktáza *Pteris vittata*

Nanešťastie, rovnako ako u horespomínaných prípadoch, molekulárny mechanizmus a bunková lokalizácia redukcie As^V u hyperakumulátora arzenu *Pteris vittata* ostávajú stále nedostatočne objasnené.

Podobne ako u *Arabidopsis thaliana*, bola u ACR2 homologického proteínu PvACR2 identifikovaná arzenátreduktázová aktivita v *in vitro* podmienkach ([Ellis et al., 2006](#)). Zaujímavé ale bolo, že arzenátreduktázová aktivita bola detekovaná aj v koreňovom extrakte vystavenom 2 mM As^V po dobu 9 dní ([Duan et al., 2005](#)). Táto arzenátreduktáza, v kontraste s AtACR2 a OsACR2, nedisponuje fosfatázovou aktivitou, pravdepodobne kvôli zámene Arg za Ser v inak konzervovanom aminokyselinovom motíve v aktívnom mieste enzýmu ([Danielle et al., 2006](#)). Čo sa mechanizmu As^V redukcie týka, tento enzým využíva glutation (GSH) a glutaredoxin (GRX) ako zdroje elektrónov, čo môže naznačovať existenciu katalytického cyklu zahŕňajúcu tvorbu disulfidových väzieb medzi GSH a ACR2 za pomoci GRX ([Cesaro et al., 2015](#)). Porovnanie aktivity arzenátreduktázy ACR2 zo *S. cerevisiae*, arcS z *E. coli* a ACR2 z *P.vittata* potvrdilo využitie rovnakého mechanizmu redukcie As^V, čo by mohlo naznačovať jeho

utilizáciu aj v rastlinách ([Mukhopadhyay et al., 2000](#), [Mukhopadhyay and Rosen, 2002](#)). Úloha enzýmu PvACR2 v As hyperakumulácii a tolerancii ostáva však stále nejasná.

Štúdia od [Wei et al. \(2020\)](#) poukazuje na to, že transkripcia *PvACR2* prebieha v koreni aj bez prítomnosti As^V, ale pri vyšších koncentráciách As v médiu sa jej transkripčná úroveň zvýši. Najvyššia úroveň expresie *PvACR2* bola identifikovaná práve v koreni a jej hodnoty boli veľmi podobné nezávisle od rastu buď v As^{III} alebo v As^V-obsahujúcom médiu. ([Li et al., 2020](#)).

Keďže *Pteris vittata* disponuje aj rhizómami, štúdia od [Mathews et al. \(2010\)](#) sa zamerala aj na ne. Po separácii rhizómov od koreňov bolo zistené, že väčšina As^V redukcie prebieha práve v rhizómoch a neskôr vo vejárovitých listoch, kde je po redukcii As^V hromadený As^{III}. Slabá úroveň redukcie arzenátu po vystavení *P. vittata* podmienkam s prítomnosťou As však bola zaznamenaná aj v koreňoch ([Cesaro et al., 2015](#)). Je dôležité pripomenúť, že v štúdiu od [Mathews et al. \(2010\)](#) bola meraná celková úroveň redukcie v rastline a štúdia sa teda nesústreďovala na aktivity konkrétnych arzenátoreduktáz ([Mathews et al., 2010](#)).

Počiatkom roku 2020 [Li et al. \(2020\)](#) ako prví identifikovali dva nové gény pre arzenátoreduktázu u *Pteris vittata*, *PvHAC1* a *PvHAC2*. Pri fylogentickej analýze vykazovali produkty týchto génov similaritu aminokyselínovej sekvencie iba 29-49%, čo môže naznačovať určité odlišnosti vo funkcii produktov génov patriacich do génovej rodiny *HAC1*. Na porovnanie, *PvHAC1* a *PvACR2* sú voči sebe heterologické ([Li et al., 2020](#)).

Použitím protoplastov ryže a listových epidermálnych buniek tabaku autori pozorovali subcelulárny výskyt týchto proteínov. *PvHAC1*-eGFP a *PvHAC2*-eGFP fúzne proteíny boli nájdené v cytoplazme a jadre. Čo sa pletivovej lokalizácie týka, bez vystavenia *P. vittata* As podmienkam bol *PvHAC1* dominantne exprimovaný v rhizómoch a vejárovitých listoch, s nízkou úrovňou expresie aj v koreňoch. Po pridaní As^V do média bola expresia *PvHAC1* v rhizómoch silne indukovaná, dosahujúc 2-11-násobne vyššiu hladinu než tá v koreňoch a vejárovitých listoch. Takáto reakcia nebola pozorovaná počas vystaveniu rastlín podmienkam s prítomnosťou As^{III} ([Li et al., 2020](#)). Narozdiel od *PvHAC1*, expresia *PvHAC2* nebola indukovaná ani As^V, ani As^{III}. Najvyššiu expresiu dosahoval *PvHAC2* vo vejárovitých listoch ([Li et al., 2020](#)). Lokalizácia procesu redukcie prostredníctvom *PvHAC2* je zobrazená na Obr. 3.

Vloženie génov *PvHAC1* a *PvHAC2* do *E.coli* línie WC3100, ktorej chýbala endogénna arzenátoreduktáza *ArsC* obnovilo rast tejto špecifickej línie v As^V-obsahujúcich podmienkach, pravdepodobne prostredníctvom navrátenia schopnosti výtaja As^{III} ([Li et al., 2020](#)). Na dokázanie arzenátoreduktázovej aktivity v rastlinnom organizme boli *PvHAC1* a *PvHAC2* vložené do *A. thaliana* a po 2hod raste v prostredí obsahujúcom 10 μ M As^V obsahovali

transformanty takmer o 30% viac As^{III} než Col-0. Tento výsledok naznačuje zvýšenú arzenátoreduktázovú aktivitu v transgénných *A. thaliana* a teda schopnosť PvHAC1 a PvHAC2 redukovať As^{V} *in planta* (Li et al., 2020). Tie isté línie *A. thaliana* boli vystavené $300 \mu\text{M}$ As^{V} po dobu 3 týždňov na overenie, či heterologická expresia PvHAC1 a PvHAC2 dokáže znížiť As akumuláciu v nadzemných častiach *A. thaliana*. PvHAC1 línie nevykazovali žiadne zmeny akumulácie As alebo biomasy, ktoré by boli odlišné s Col-0. Na druhej strane, u PvHAC2 transgénných línií bola detekovaná, v porovnaní s Col-0, 20-30% vyššia biomasa nadzemných častí, s 27-37% nižšou koncentráciou akumulovaného As. Obsah As v koreni, v porovnaní s Col-0, ostal relatívne nezmenený, čo by mohlo znamenať zníženú úroveň As translokácie (Li et al., 2020).

PvHAC1 pravdepodobne hrá dôležitú úlohu v redukcii arzenátu práve v rhizómoch, keďže po vystavení *P. vittata* voči As^{V} prostrediu, bola expresia tejto arzenátoreduktázy silno indukovaná na tejto lokalite. Narozdiel od PvHAC1, úroveň expresie PvHAC2 a PvACR2 v rhizómoch nebola prítomnosťou As^{V} ovplyvnená.

Pri skombinovaní horespomínaných pletivovo-špecifických expresií PvHAC génov, autori Li et al., 2020 navrhli možný schématický vzorec As^{V} redukcie v *P. vittata*. Väčšina As^{V} vstupujúca do koreňov cez fosfátové transportéry je pravdepodobne translokovaná do rhizómov, zatiaľ čo zbytok As^{V} je redukovaný priamo v koreňoch. Do rhizómov sa As^{V} podľa všetkého dostáva skrze fosfátového transportéra PvPht1;3, ktorý je špecificky exprimovaný v bunkách stéle. V rhizómoch je majoritná časť As^{V} redukovaná pomocou PvHAC1 na As^{III} , ktorý je potom, spolu so zvyšným As^{V} , translokovaný cez xylém do listov, kde prebehne redukcia ešte neredukovaného As^{V} pomocou PvHAC2 (Li et al., 2020). Tento proces, spolu s možnou spolupracou PvACR2, je zobrazený na Obr. 3. Táto hypotéza je podložená prirodzenou distribúciou As v koreňoch (prevláda As^{V}), rhizómoch (prevláda As^{III} nad As^{V}) a v listoch (prevláda As^{III}) v *P. vittata* (Mathews et al., 2010).

Štúdium detoxifikácie arzenu v *Arabidopsis thaliana* odhaľuje, že narozdiel od AtACR2, HAC1/ATQ1 prejavuje významnú redukčnú aktivitu arzenátu v koreňoch, čím sa podieľa na regulácii akumulácie a citlivosti rastliny voči arzenu. HAC1/ATQ1, exprimovaný v rhizodermis, kortexe a endodermis, zohráva kľúčovú úlohu pri obmedzovaní translokácie arzenu do nadzemných pletív a LOF mutanti vykazujú hypersenzitivitu k arzenu. Štúdie vykonané na ryži ukázali, že *OsHAC1;1*, *OsHAC1;2* a *OsHAC4* sú dôležité v regulácii akumulácie arzenu. Overexpresia týchto génov viedla k zníženej celkovej hladine arzenu v nadzemných častiach a koreňoch. *OsHAC1;1* a *OsHAC1;2* sú exprimované v koreňovej epidermis a exodermis, zatiaľ

čo *OsHAC4* sa exprimuje najmä v koreni a pravdepodobne predstavuje kľúčového hráča pri As^{V} detoxifikácii. Keďže sa As z ryže vydáva najmä vo forme As^{III} , overexpresia mnohých arzenátoreduktáz zvyšuje výdaj As^{III} z koreňov.

Hyperakumulátor *Pteris vittata* využíva na redukciiu As^{V} viaceré arzenátoreduktázy (*PvACR2*, *PvHAC1*, *PvHAC2*). Narozdiel od ostatných známych HAC homológov (*AtHAC1*, *OsHAC1;1*, *OsHAC1;2* a *OsHAC4*) nebola expresia *PvHAC1* a *PvHAC2* v koreňoch indukovaná vystavením *P. vittata* As^{V} podmienkam a jej úroveň bola, v porovnaní s koreňmi, omnoho vyššia v rhizómoch a listoch ([Li et al., 2020](#)). *PvHAC1* funguje prevažne v rhizómoch, zatiaľ čo *PvHAC2* pôsobí v listoch, pričom obe prispievajú k redukcii As^{V} . Pletivovo špecifické expresie *PvACR2*, *PvHAC1* a *PvHAC2* naznačujú, že účinná redukcia As^{V} a rapidná translokácia As^{III} v *P. vittata* je dôsledkom odlišnej lokalizácie a následnej koordinácie funkcií jednotlivých arzenátoreduktáz vrámci celej rastliny. Znalosť odlišného expresného vzorca *PvACR2*, *PvHAC1* a *PvHAC2* by teda mohla byť užitočná pri hľadaní ďalších vhodných hyperakumulátorov/fitoremediátorov.

6. Záver

Okrem množstva a formy prijatého a translokovaného arzenu, ktoré sú ovplyvnené distribúciou a aktivitou príslušných transportérov, predstavuje v rastline kľúčový regulačný krok aktivita enzýmu arzenátoreduktázy. Identifikácia miesta majoritnej aktivity tohto enzýmu a následná modulácia jeho aktivity by mohli mať význam pri redukcii obsahu As v zrnách ryže. U *P. vittata* by odlišná modulácia aktivity arzenátoreduktáz zas mohla sprostredkovať navýšenie obsahu As vo vejárovitých listoch, čo má potenciál vo fytoremediácii As kontaminovaných pôd. Majoritná redukcia As^V na As^{III} v ryži prebieha v koreni, z kadiaľ sa As translokuje do nadzemných častí a do zrn. Keďže však existuje viac ako 10 *OsHAC*-podobných génov, je veľmi pravdepodobné, že odlišné arzenátoreduktázy katalyzujú As^V redukciiu v odlišných pletivách alebo bunčných typoch v závislosti na ich lokalizácii. Zo súčasných dát je zrejmé, že overexpresia známych arzenátoreduktáz *OsHAC1;1*, *OsHAC1;2* a *OsHAC4* v rastlinách ryže rastúcich v prostredí s obsahom As má za výsledok zníženú akumuláciu As^{III} aj v nadzemných častiach, aj v koreňoch. Takýto prejav by mohol byť zapríčinený posilneným koreňovým výdajom.

PvHAC1 a PvHAC2 sú dvaja kandidáti pre redukciiu As^V v *Pteris vittata*, pričom PvHAC1 má vyššiu aktivitu v rhizómoch a PvHAC2 vo vejárovitých listoch. Je možné, že kritická úloha *PvHAC* génov netkvie len v separátnych funkciách produktov daných génov, ale skôr v ich vzájomnej spolupráci a komunikácii v rámci rozličných pletív. Hoci sa zameranie na homológy kvasinkovej arzenátoreduktázy ACR2 (fylogeneticky nepríbuzná s HAC) u *A. thaliana* a ryže preukázalo ako slepá ulička, u *P. vittata* by mohol výskum PvACR2 ako aktívnej arzenátoreduktázy priniesť pozitívne výsledky.

Z mojej práce je jasné, že identifikácia genetického pozadia redukciiu arzenátu má potenciál využitia pri šľachtení plodín schopných tolerovať zvýšenú koncentraciiu As v prostredí. Prepojenie informácií získaných zo štúdia daných druhov je taktiež veľmi dôležité, pretože by mohlo vylepšiť zacielenie ďalšieho výskumu zameraného na zníženie As toxicity v rastlinách. Na základe dostupných štúdií si teda dovoľím konštatovať, že aktivita arzenátoreduktázy zohráva kľúčovú úlohu pri určovaní osudu As v rastline.

Použitá literatúra

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N. et al. Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* **8**, 249–256 (2006) <https://doi.org/10.1038/ncb1369>
- Arao, T., Kawasaki, A., Baba, K., et al. Effects of Arsenic Compound Amendment on arsenic speciation in rice grain. *Environmental Science & Technology*, *45*(4), 1291–1297 (2011) <https://doi.org/10.1021/es1033316>
- Argos, M., Kalra, T., Rathouz, P. J., et al. . Arsenic exposure from drinking water, and all-cause and chronic-disease mortalities in Bangladesh (HEALS): a prospective cohort study. *The Lancet*, *376*(9737), 252–258. (2010) [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60481-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60481-3)
- Asher, C. J., & Reay, P.. Arsenic uptake by Barley Seedlings. *Functional Plant Biology*, *6*(4), 459. (1979) <https://doi.org/10.1071/pp9790459>
- Ashraf, M. A., Umetsu, K., Ponomarenko, O., et al. PIN FORMED 2 facilitates the transport of Arsenite in *Arabidopsis thaliana*. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. (2019) <https://doi.org/10.1101/710160>
- Ayadi, A., David, P., Arrighi, j.-F. et al. Reducing the Genetic Redundancy of *Arabidopsis* PHOSPHATE TRANSPORTER1 Transporters to Study Phosphate Uptake and Signaling. *Plant Physiology*, *167*, 4, 1511–1526 (2015) <https://doi.org/10.1104/pp.114.252338>
- Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M., et al. PHO2, MicroRNA399, and PHR1 define a Phosphate-Signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, *141*(3), 988–999. (2006) <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707>
- Bienert, G.P., Jahn, T.P. Major Intrinsic Proteins and Arsenic Transport in Plants: New Players and Their Potential Role. In: Jahn, T.P., Bienert, G.P. (eds) MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 679. Springer, New York, NY. (2010) https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6315-4_9
- Bienert, G.P., Thorsen, M., Schüssler, M.D. et al. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes . *BMC Biol* **6**, 26 (2008) <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-26>
- Bleeker, P., Hakvoort, H. W. J., Blik, et al. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal*, *45*(6), 917–929. (2006) <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02651.x>
- Bordo, D., & Bork, P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *EMBO Reports*, *3*(8), 741–746. (2002). <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf150>
- Brammer, H. Mitigation of arsenic contamination in irrigated paddy soils in South and South-east Asia. *Environment International*, *35*(6), 856–863. (2009) <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.008>
- Cao, Y., Feng, H., Sun, D., et al. Heterologous Expression of *Pteris vittata* Phosphate Transporter PvPht1;3 Enhances Arsenic Translocation to and Accumulation in Tobacco Shoots. *Environmental Science & Technology*, *53*(18), 10636–10644. (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02082>
- Cao, Y., Sun, D., Ai, H., et al. Knocking out OSPT4 gene decreases arsenate uptake by rice plants and inorganic arsenic accumulation in rice grains. *Environmental Science & Technology*, *51*(21), 12131–12138. (2017) <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03028>

- Carey, A., Norton, G. J., Deacon, C., et al. Phloem transport of arsenic species from flag leaf to grain during grain filling. *New Phytologist*, 192(1), 87–98. (2011) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03789.x>
- Carey, A., Scheckel, K. G., Lombi, E., et al. Grain unloading of arsenic species in rice. *Plant Physiology*, 152(1), 309–319. (2009) <https://doi.org/10.1104/pp.109.146126>
- Catarecha, P., Ma, D. S., José, M. F. et al. A Mutant of the *Arabidopsis* Phosphate Transporter PHT1;1 Displays Enhanced Arsenic Accumulation, *The Plant Cell*, Volume 19, Issue 3, March, Pages 1123–1133, (2007) <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041871>
- Catarecha, P., Segura, M. D., Franco-Zorrilla, et al. A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *the Plant Cell*, 19(3), 1123–1133. (2007) <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041871>
- Cesaro, P., Cattaneo, C., Bona, E., et al. The arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* expresses two arsenate reductases. *Scientific Reports*, 5(1). (2015) <https://doi.org/10.1038/srep14525>
- Chao, D., Chen, Y., Chen, J., et al. Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants. *PLOS Biology*, 12(12), e1002009. (2014) <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002009>
- Chen, C., Li, L., Huang, K., et al. Sulfate-reducing bacteria and methanogens are involved in arsenic methylation and demethylation in paddy soils, *The ISME Journal*, Volume 13, Issue 10, Pages 2523–2535, (2019) <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0451-7>
- Chen, Q., Mu, X., Chen, F., et al. Dynamic change of mineral nutrient content in different plant organs during the grain filling stage in maize grown under contrasting nitrogen supply. *European Journal of Agronomy*, 80, 137–153. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.08.002>
- Chen, R., Smith, B. W., Winefordner, J. D., et al. Arsenic speciation in Chinese brake fern by ion-pair high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 504(2), 199–207. (2004) <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.042>
- Chen, Y., Fu, J., Han, Y., et al. High As exposure induced substantial arsenite efflux in As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere*, 144, 2189–2194. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.001>
- Chen, Y., Graziano, J. H., Parvez, F., et al. Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: prospective cohort study. *The BMJ*, 342(may05 2), d2431. (2011) <https://doi.org/10.1136/bmj.d2431>
- Chen, Y., Hua, C., Jia, M., et al. Heterologous Expression of *Pteris vittata* Arsenite Antiporter PvACR3;1 Reduces Arsenic Accumulation in Plant Shoots. *Environmental Science & Technology*, 51(18), 10387–10395. (2017) <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03369>
- Chen, Z., Zhu, Y., Liu, W., et al. Direct evidence showing the effect of root surface iron plaque on arsenite and arsenate uptake into rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*, 165(1), 91–97. (2004) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01241.x>
- Cho, M., Lee, Z., & Cho, H. ATP-Binding Cassette B4, an Auxin-Efflux Transporter, Stably Associates with the Plasma Membrane and Shows Distinctive Intracellular Trafficking from That of PIN-FORMED Proteins. *Plant Physiology*, 159(2), 642–654. (2012) <https://doi.org/10.1104/pp.112.196139>

- Dahal, B. M., Fuerhacker, M., Mentler, A., et al. Arsenic contamination of soils and agricultural plants through irrigation water in Nepal. *Environmental Pollution*, 155(1), 157–163. (2008) <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.024>
- Das, N., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, S. et al. Expression of rice MATE family transporter OsMATE2 modulates arsenic accumulation in tobacco and rice. *Plant Mol Biol* **98**, 101–120 (2018) <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0766-1>
- Deng, F., Yamaji, N., Feng, J., et al. Engineering rice with lower grain arsenic. *Plant Biotechnology Journal*, 16(10), 1691–1699. (2018) <https://doi.org/10.1111/pbi.12905>
- Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C., et al. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of Arabidopsis silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5413–5418. (2006) <https://doi.org/10.1073/pnas.0509770102>
- DiTusa, S. F., Fontenot, E. B., Wallace, R. W., et al. A member of the Phosphate transporter 1 (Pht1) family from the arsenic-hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is a high-affinity arsenate transporter. *New Phytologist*, 209(2), 762–772. (2015) <https://doi.org/10.1111/nph.13472>
- Duan, G., Zhu, Y., Tong, Y., et al. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiology*, 138(1), 461–469. (2005) <https://doi.org/10.1104/pp.104.057422>
- Duan, GL., Hu, Y., Schneider, S. et al. Inositol transporters AtINT2 and AtINT4 regulate arsenic accumulation in *Arabidopsis* seeds. *Nature Plants* **2**, 15202 (2016) <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.202>
- FAOSTAT. (n.d.). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Feng, J., Yamaji, N., Mitani, N., et al. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 9931–9935. (2008c) <https://doi.org/10.1073/pnas.0802361105>
- * Finnegan, P. M., & Chen, W. Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3. (2012) <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>
- Fischer, S., Sánchez-Bermejo, E., Xu, X., et al. Targeted expression of the arsenate reductase HAC1 identifies cell type specificity of arsenic metabolism and transport in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 415–425. (2020) <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa465>
- Garbinski, L. D., Rosen, B. P., & Chen, J. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environment International*, 126, 585–597. (2019) <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- * Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A., et al. Arsenic Pollution Sources. In: Reviews of Environmental Contamination Volume 197. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol 197. Springer, New York, NY. (2009) https://doi.org/10.1007/978-0-387-79284-2_2
- Geisler, M., Aryal, B., Di Donato, M., et al. A critical view on ABC Transporters and their interacting partners in Auxin Transport. *Plant & Cell Physiology/Plant and Cell Physiology*, 58(10), 1601–1614. (2017) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx104>
- * Geng, A., Lian, W., Wang, X., & Chen, G. Regulatory mechanisms underlying arsenic uptake, transport, and detoxification in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11031. (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms241311031>

- Gregus, Z., Roos, G., Geerlings, P., et al. Mechanism of Thiol-Supported arsenate reduction mediated by Phosphorolytic-Arsenolytic enzymes. *Toxicological Sciences*, 110(2), 282–292. (2009) <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp113>
- Han, Y., Fu, J., Chen, Y., et al. Arsenic uptake, arsenite efflux and plant growth in hyperaccumulator *Pteris vittata*: Role of arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere*, 144, 1937–1942. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.096>
- Han, Y., Li, X., Rathinasabapathi, B., et al. Mechanisms of efficient As solubilization in soils and As accumulation by As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Pollution*, 227, 569–577. (2017) <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.001>
- Han, Y., Li, X., Rathinasabapathi, B., et al. Mechanisms of efficient As solubilization in soils and As accumulation by As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Pollution*, 227, 569–577. (2017b) <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.001>
- He, Z., Yan, H., Chen, Y., et al. An aquaporin PvTIP4;1 from *Pteris vittata* may mediate arsenite uptake. *New Phytologist*, 209(2), 746–761. (2015) <https://doi.org/10.1111/nph.13637>
- Huang, Y., Hatayama, M., & Inoue, C. Characterization of As efflux from the roots of As hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Planta*, 234(6), 1275–1284. (2011) <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1480-2>
- * Huang, J.H. Impact of Microorganisms on Arsenic Biogeochemistry: A Review. *Water Air Soil Pollut* **225**, 1848 (2014) <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1848-y>
- Huang, Z., Chen, T., Lei, Met al. Direct determination of arsenic species in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* by EXAFS. *Journal of Integrative Plant Biology*, 46(1), 46–50. (2004) <http://ir.ihep.ac.cn/handle/311005/225717>
- Indriolo, E., Na, G., Ellis, D. R., et al. A Vacuolar Arsenite Transporter Necessary for Arsenic Tolerance in the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata* Is Missing in Flowering Plants. *the Plant Cell*, 22(6), 2045–2057. (2010) <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069773>
- Indriolo, E., Na, G., Ellis, D. R., et al. A Vacuolar Arsenite Transporter Necessary for Arsenic Tolerance in the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata* Is Missing in Flowering Plants. *the Plant Cell*, 22(6), 2045–2057. (2010b) <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069773>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. The Arabidopsis thaliana aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Letters*, 582(11), 1625–1628. (2008) <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.022>
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., et al. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1–2), 324–342. (2000) [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00147-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00147-4)
- Johnson, L., & Hiltbold, A. E. Arsenic content of soil and crops following use of methanearsonate herbicides. *Soil Science Society of America Journal*, 33(2), 279–282. (1969) <https://doi.org/10.2136/sssaj1969.03615995003300020032x>
- Kamiya, T., Islam, M. R., Duan, G., et al. Phosphate deficiency signaling pathway is a target of arsenate and phosphate transporter OsPT1 is involved in As accumulation in shoots of rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(4), 580–590. (2013) <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.804390>

- Kamiya, T., Tanaka, M., Mitani, N., et al. NIP1;1, an Aquaporin Homolog, Determines the Arsenite Sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(4), 2114–2120. (2009) <https://doi.org/10.1074/jbc.m806881200>
- Katsuhara, M., Sasano, S., Horie, T., et al. Functional and molecular characteristics of rice and barley NIP aquaporins transporting water, hydrogen peroxide and arsenite. *Plant Biotechnology*, 31(3), 213–219. (2014) <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0421a>
- Kertulis, G., Lena, Q., MacDonald, G. E., et al. Arsenic speciation and transport in *Pteris vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap. *Environmental and Experimental Botany*, 54(3), 239–247. (2005) <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.09.001>
- Khan, M. A., Stroud, J. L., Zhu, Y., et al. Arsenic bioavailability to rice is elevated in Bangladeshi Paddy Soils. *Environmental Science & Technology*, 44(22), 8515–8521. (2010) <https://doi.org/10.1021/es101952f>
- Khan, M. A., Stroud, J. L., Zhu, Y., et al. Arsenic bioavailability to rice is elevated in Bangladeshi Paddy Soils. *Environmental Science & Technology*, 44(22), 8515–8521. (2010b) <https://doi.org/10.1021/es101952f>
- Kumar, A., Basu, S., Rishu, A. K., et al. Revisiting the mechanisms of arsenic uptake, transport and detoxification in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104730. (2022) <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104730>
- Kumarathilaka, P., Seneweera, S., Meharg, A. A., et al. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) is influenced by environment and genetic factors. *Science of the Total Environment*, 642, 485–496. (2018) <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.030>
- Kumari, P., Rastogi, A., Shukla, A., et al. Prospects of genetic engineering utilizing potential genes for regulating arsenic accumulation in plants. *Chemosphere*, 211, 397–406. (2018) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.152>
- LeBlanc, M. S., McKinney, E. C., Meagher, R. B., et al. Hijacking membrane transporters for arsenic phytoextraction. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 1–9. (2013) <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.013>
- Lessl, J. T., & Lena, Q. Sparingly-Soluble Phosphate Rock Induced Significant Plant Growth and Arsenic Uptake by *Pteris vittata* from Three Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*, 47(10), 5311–5318. (2013) <https://doi.org/10.1021/es400892a>
- Lessl, J. T., & Lena, Q. Sparingly-Soluble Phosphate Rock Induced Significant Plant Growth and Arsenic Uptake by *Pteris vittata* from Three Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*, 47(10), 5311–5318. (2013b) <https://doi.org/10.1021/es400892a>
- Li, H., Li, J., Zhao, D., et al. Arsenic relative bioavailability in rice using a mouse arsenic urinary excretion bioassay and its application to assess human health risk. *Environmental Science & Technology*, 51(8), 4689–4696. (2017) <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00495>
- Li, N., Wang, J., & Song, W. Arsenic uptake and translocation in plants. *Plant & Cell Physiology/Plant and Cell Physiology*, 57(1), 4–13. (2015) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv143>
- Li, R. Y., Ago, Y., Liu, W. J., et al. The rice aquaporin LSI1 mediates uptake of methylated arsenic species. *Plant Physiology*, 150(4), 2071–2080. (2009) <https://doi.org/10.1104/pp.109.140350>

- Li, X., Sun, D., Feng, H., et al. Efficient arsenate reduction in As-hyperaccumulator *Pteris vittata* are mediated by novel arsenate reductases PvHAC1 and PvHAC2. *Journal of Hazardous Materials (Print)*, 399, 122895. (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122895>
- Linquist, B. A., Anders, M. M., Adviento-Borbe, M. A., et al. Reducing greenhouse gas emissions, water use, and grain arsenic levels in rice systems. *Global Change Biology*, 21(1), 407–417. (2014) <https://doi.org/10.1111/gcb.12701>
- Liu, W., Schat, H., Blik, M., et al. Knocking Out ACR2 Does Not Affect Arsenic Redox Status in *Arabidopsis thaliana*: Implications for As Detoxification and Accumulation in Plants. *PLOS ONE*, 7(8), e42408. (2012) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042408>
- Liu, W., Wood, B. A., Raab, A., et al. Complexation of Arsenite with Phytochelatin Reduces Arsenite Efflux and Translocation from Roots to Shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology (Bethesda)*, 152(4), 2211–2221. (2010) <https://doi.org/10.1104/pp.109.150862>
- Liu, W., Wood, B. A., Raab, A., et al. Complexation of Arsenite with Phytochelatin Reduces Arsenite Efflux and Translocation from Roots to Shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152(4), 2211–2221. (2010b) <https://doi.org/10.1104/pp.109.150862>
- Lomax, C., Liu, W., Wu, L., et al. Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytologist*, 193(3), 665–672. (2011) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03956.x>
- Lombi, E., Zhao, F., Fuhrmann, M., et al. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*, 156(2), 195–203. (2002) <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00512.x>
- Luan, M., Liu, J., Liu, Y., et al. Vacuolar phosphate transporter 1 (VPT1) affects arsenate tolerance by regulating phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology/Plant and Cell Physiology*. (2018) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy025>
- Mandal, A., Purakayastha, T. J., Patra, A. K., et al. Phytoremediation of arsenic contaminated soil by *Pteris vittata* L. II. Effect on arsenic uptake and rice yield. *International Journal of Phytoremediation*, 14(6), 621–628. (2012) <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.619228>
- Marschner, H., & Marschner, P. Marschner's mineral nutrition of higher plants. In *Elsevier eBooks*. (2012) <https://doi.org/10.1016/c2009-0-63043-9>
- Mathews, S., Lena, Q., Rathinasabapathi, B., et al. Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology*, 101(21), 8024–8030. (2010) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.042>
- Mathews, S., Lena, Q., Rathinasabapathi, B., et al. Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology*, 101(21), 8024–8030. (2010b) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.042>
- Meharg, A. A., & Macnair, M. R. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytologist*, 116(1), 29–35. (1990) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00507.x>
- Meharg, A. A., & Macnair, M. R. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytologist*, 116(1), 29–35. (1990b) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00507.x>
- Meharg, A. A., Naylor, J., & Macnair, M. R. Phosphorus nutrition of Arsenate-Tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *Journal of Environmental Quality*, 23(2), 234–238. (1994) <https://doi.org/10.2134/jeq1994.00472425002300020003x>

- Mishra, S., Mattusch, J. & Wennrich, R. Accumulation and transformation of inorganic and organic arsenic in rice and role of thiol-complexation to restrict their translocation to shoot. *Sci Rep* **7**, 40522 (2017) <https://doi.org/10.1038/srep40522>
- Mosa, K.A., Kumar, K., Chhikara, S. et al. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants. *Transgenic Res* **21**, 1265–1277 (2012) <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9600-8>
- Muehe, E.M., Wang, T., Kerl, C.F. et al. Rice production threatened by coupled stresses of climate and soil arsenic. *Nat Commun* **10**, 4985 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12946-4>
- Mukhopadhyay, R., & Rosen, B. P. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environmental Health Perspectives*, *110*(suppl 5), 745–748. (2002) <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5745>
- Mukhopadhyay, R., Shi, J., & Rosen, B. P. Purification and Characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* Arsenate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21149–21157. (2000) <https://doi.org/10.1074/jbc.m910401199>
- Neumann, R., Ashfaq, K., Badruzzaman, A. et al. Anthropogenic influences on groundwater arsenic concentrations in Bangladesh. *Nature Geosci* **3**, 46–52 (2010) <https://doi.org/10.1038/ngeo685>
- Oden, K. L., Gladysheva, T., & Rosen, B. P. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Molecular Microbiology*, *12*(2), 301–306. (1994) <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01018.x>
- Organization, W. H., & Who. (2004). *Guidelines for drinking-water quality*. [World Health Organization](http://www.who.int).
- Park, J. H., Han, Y. S., Seong, et al. Arsenic uptake and speciation in *Arabidopsis thaliana* under hydroponic conditions. *Chemosphere*, *154*, 283–288. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.126>
- Peterson, C. A., & Enstone, D. E. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum*, *97*(3), 592–598. (1996) <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00520.x>
- Pickering, I. J., Gumaelius, L., Harris, H. H., et al. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environmental Science & Technology*, *40*(16), 5010–5014. (2006) <https://doi.org/10.1021/es052559a>
- Poynton, C. Y., Huang, J., Blaylock, M. J., et al. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris* species: root As influx and translocation. *Planta*, *219*(6), 1080–1088. (2004) <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1304-8>
- Quaghebeur, M., & Rengel, Z. Arsenic uptake, translocation and speciation in *pho1* and *pho2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, *120*(2), 280–286. (2004) <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0240.x>
- R. Ellis, D.R., Gumaelius, L., Indriolo, E., et al. A Novel Arsenate Reductase from the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata*, *Plant Physiology*, Volume 141, Issue 4, Pages 1544–1554, (2006) <https://doi.org/10.1104/pp.106.084079>
- Raab, A., Williams, P., Meharg, A. A., et al. Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. *Environmental Chemistry*, *4*(3), 197. (2007) <https://doi.org/10.1071/en06079>
- Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., et al. Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* Roots Requires the Polarization of PIN2 toward the Root Tip in Meristematic Cortical Cells. *The Plant Cell*, *22*(6), 1762–1776. (2010) <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075317>

- Rahman, M. M., Reza, A., Ahsan, M. A., et al. Arsenic in groundwater from Southwest Bangladesh: Sources, water quality, and potential health concern. *HydroResearch*, 6, 1–15. (2023) <https://doi.org/10.1016/j.hydres.2022.12.001>
- Remy, E., Cabrito, T. R., Batista, R. A., et al. The Pht1;9 and Pht1;8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the Arabidopsis thaliana root during phosphorus starvation. *New Phytologist*, 195(2), 356–371. (2012) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04167.x>
- Remy, E., Cabrito, T. R., Batista, R. A., et al. The Pht1;9 and Pht1;8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the Arabidopsis thaliana root during phosphorus starvation. *New Phytologist*, 195(2), 356–371. (2012b) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04167.x>
- Samanta, G., Chowdhury, T., Mandal, B. K., et al. Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry for Determination of Arsenic in Water and Biological Samples from Arsenic-Affected Districts of West Bengal, India, and Bangladesh. *Microchemical Journal*, 62(1), 174–191. (1999) <https://doi.org/10.1006/mchj.1999.1713>
- Sánchez-Bermejo, E., Castrillo, G., Del Llano, B., et al. Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, 5(1). (2014) <https://doi.org/10.1038/ncomms5617>
- Seyfferth, A. L., Webb, S. M., Andrews, J. C., et al. Arsenic Localization, Speciation, and Co-Occurrence with Iron on Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Having Variable Fe Coatings. *Environmental Science & Technology*, 44(21), 8108–8113. (2010) <https://doi.org/10.1021/es101139z>
- * Shelley, I. J., Takahashi-Nosaka, M., Kano-Nakata, M., et al. Rice cultivation in Bangladesh: Present scenario, problems, and Prospects. *Journal of International Cooperation for Agricultural Development*, 14, 20–29. (2016) <https://doi.org/10.18999/jouica.14.20>
- Shi, S., Wang, T., Chen, Z., et al. OSHAC1;1 and OSHAC1;2 function as arsenate reductases and regulate arsenic accumulation. *Plant Physiology*, 172(3), 1708–1719. (2016) <https://doi.org/10.1104/pp.16.01332>
- Shin, H., Shin, H., Dewbre, G. R., et al. Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *The Plant Journal*, 39(4), 629–642. (2004) <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02161.x>
- Shin, H., Shin, H., Dewbre, G. R., et al. Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *The Plant Journal*, 39(4), 629–642. (2004b) <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02161.x>
- Sohn, E. Contamination: The toxic side of rice. *Nature* 514, S62–S63 (2014) <https://doi.org/10.1038/514S62a>
- Song, W. Y., Yamaki, T., Yamaji, N., et al. A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(44), 15699–15704. (2014) <https://doi.org/10.1073/pnas.1414968111>
- Song, W., Park, J., Mendoza-Cózatl, D. G., et al. Arsenic tolerance in Arabidopsis is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21187–21192. (2010) <https://doi.org/10.1073/pnas.1013964107>
- Su, YH., McGrath, S.P. & Zhao, FJ. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant Soil* 328, 27–34 (2010) <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0074-2>

- Sun, D., Feng, H., Li, X., et al. Expression of New *Pteris vittata* Phosphate Transporter PvPht1;4 Reduces Arsenic Translocation from the Roots to Shoots in Tobacco Plants. *Environmental Science & Technology*, 54(2), 1045–1053. (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05486>
- Sun, S., Chen, Y., Che, J., et al. Decreasing arsenic accumulation in rice by overexpressing OsNIP1;1 and OsNIP3;3 through disrupting arsenite radial transport in roots. *New Phytologist*, 219(2), 641–653. (2018) <https://doi.org/10.1111/nph.15190>
- Sundaram, S., Rathinasabapathi, B., Lena, Q., et al. An Arsenate-activated Glutaredoxin from the Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. Regulates Intracellular Arsenite. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6095–6101. (2008) <https://doi.org/10.1074/jbc.m704149200>
- Takano, J., Wada, M., Ludwig, U., et al. The Arabidopsis Major Intrinsic Protein NIP5;1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation. *The Plant Cell*, 18(6), 1498–1509. (2006) <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041640>
- * Tamaki, S., & Frankenberger, W. T. Environmental biochemistry of Arsenic. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 79–110). (1992) https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2864-6_4
- Tang, Z., Chen, Y., Chen, F., et al. OsPTR7 (OsNPF8.1), a Putative Peptide Transporter in Rice, is Involved in Dimethylarsenate Accumulation in Rice Grain. *Plant & Cell Physiology/Plant and Cell Physiology*, 58(5), 904–913. (2017b) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx029>
- Tang, Z., Chen, Y., Chen, F., et al. OsPTR7 (OsNPF8.1), a Putative Peptide Transporter in Rice, is Involved in Dimethylarsenate Accumulation in Rice Grain. *Plant & Cell Physiology/Plant and Cell Physiology*, 58(5), 904–913. (2017) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx029>
- Tang, Z., Chen, Y., Miller, A. J., et al. The C-type ATP-Binding cassette Transporter OSABCC7 is involved in the Root-to-Shoot translocation of arsenic in rice. *Plant & Cell Physiology/Plant and Cell Physiology*, 60(7), 1525–1535. (2019) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz054>
- Tang, Z., Lv, Y., Chen, F., et al. Arsenic Methylation in Arabidopsis thaliana Expressing an Algal Arsenite Methyltransferase Gene Increases Arsenic Phytotoxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(13), 2674–2681. (2016) <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00462>
- Tarvainen, T., Reichel, S., Müller, I., et al. Arsenic in agro-ecosystems under anthropogenic pressure in Germany and France compared to a geogenic As region in Finland. *Journal of Geochemical Exploration*, 217, 106606. (2020) <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2020.106606>
- Tu, C., Lena, Q., & Bondada, B. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, 31(5), 1671–1675. (2002) <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1671>
- Tu, C., Lena, Q., Zhang, W., et al. Arsenic species and leachability in the fronds of the hyperaccumulator Chinese brake (*Pteris vittata* L.) *Environmental Pollution*, 124(2), 223–230. (2003). [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00470-0](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00470-0)
- Wang, J., Zhao, F., Meharg, A. A., et al. Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. *Plant Physiology*, 130(3), 1552–1561. (2002) <https://doi.org/10.1104/pp.008185>

- Wang, P., Zhang, W., Mao, C., et al. The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 6051–6059. (2016) <https://doi.org/10.1093/jxb/erw362>
- Wang, X., Lena, Q., Rathinasabapathi, B., et al. Mechanisms of Efficient Arsenite Uptake by Arsenic Hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Science & Technology*, 45(22), 9719–9725. (2011) <https://doi.org/10.1021/es2018048>
- Wang, Y., Dilday, R. H., Tai, T. H., et al. Differential response of rice germplasm to straighthead induced by arsenic. *Crop Science*, 45(4), 1223–1228. (2005) <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0348>
- Webb, S. M., Gaillard, J. F., Lena, Q., et al. XAS speciation of arsenic in a Hyper-Accumulating Fern. *Environmental Science & Technology*, 37(4), 754–760. (2003) <https://doi.org/10.1021/es0258475>
- Wei, S., Kohda, Y. H. T., Inoue, C., et al. Expression of PvPht1;3, PvACR2 and PvACR3 during arsenic processing in root of *Pteris vittata*. *Environmental and Experimental Botany*, 182, 104312. (2021) <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104312>
- Wu, Z., Ren, H., McGrath, S. P., et al. Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice. *Plant Physiology*, 157(1), 498–508. (2011) <https://doi.org/10.1104/pp.111.178921>
- Wysocki, R., Bobrowicz, P., & Ułaszewski, S. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 Gene Encodes a Putative Membrane Protein Involved in Arsenite Transport. *Journal of Biological Chemistry/ the Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30061–30066. (1997) <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30061>
- Xu, J., Shi, S., Wang, L., et al. OsHAC4 is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice. *New Phytologist*, 215(3), 1090–1101. (2017) <https://doi.org/10.1111/nph.14572>
- Xu, W., Dai, W., Yan, H., et al. Arabidopsis NIP3;1 Plays an Important Role in Arsenic Uptake and Root-to-Shoot Translocation under Arsenite Stress Conditions. *Molecular Plant*, 8(5), 722–733. (2015) <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.005>
- Xu, X., McGrath, S. P., & Zhao, F. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist (Print)*, 176(3), 590–599. (2007) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02195.x>
- Xu, X., McGrath, S. P., & Zhao, F. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist (Print)*, 176(3), 590–599. (2007b) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02195.x>
- Xu, X., McGrath, S. P., Meharg, A. A., et al. Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5574–5579. (2008) <https://doi.org/10.1021/es800324u>
- Xue, P., Yan, C., Sun, G. et al. Arsenic accumulation and speciation in the submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* L.. *Environ Sci Pollut Res* **19**, 3969–3976 (2012) <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0856-6>
- Ye, Y., Li, P., Xu, T., et al. OSPT4 contributes to arsenate uptake and transport in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8. (2017) <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02197>
- Ye, Y., Yuan, J., Chang, X., et al. The phosphate transporter gene OSPHT1;4 is involved in phosphate homeostasis in rice. *PLOS ONE*, 10(5), e0126186. (2015) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126186>
- Zhang, J., Wysocki, R., Li, F., et al. Role of ubiquitination in arsenic tolerance in plants. *Trends in Plant Science*, 28(8), 880–892. (2023) <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.03.008>

- Zhang, J., Zhao, S., Xu, Y., et al. Nitrate stimulates anaerobic microbial arsenite oxidation in paddy soils. *Environmental Science & Technology*, 51(8), 4377–4386. (2017) <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06255>
- Zhang, Z., Sun, Y., Pei, W., et al. Involvement of OsPht1;4 in phosphate acquisition and mobilization facilitates embryo development in rice. *The Plant Journal*, 82(4), 556–569. (2015) <https://doi.org/10.1111/tpj.12804>
- Zhao, F., Ago, Y., Mitani, N., et al. The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *New Phytologist (Print)*, 186(2), 392–399. (2010) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03192.x>
- Zhao, F., F. J., Meharg, A. A., & McGrath, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181(4), 777–794. (2008) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x>
- Zhao, F., F. J., Meharg, A. A., & McGrath, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181(4), 777–794. (2008b) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x>
- Zhao, F., Stroud, J. L., Khan, M. A., et al. Arsenic translocation in rice investigated using radioactive ⁷³As tracer. *Plant and Soil (Print)*, 350(1–2), 413–420. (2011) <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0926-4>
- Zhao, F., Wang, J. R., Barker, J. H. A., et al. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*, 159(2), 403–410. (2003) <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00784.x>
- Zhao, F., Zhu, Y., & Meharg, A. A. Methylated arsenic species in rice: geographical variation, origin, and uptake mechanisms. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 3957–3966. (2013) <https://doi.org/10.1021/es304295n>
- Zhao, F., Zhu, Y., & Meharg, A. A. Methylated arsenic species in rice: geographical variation, origin, and uptake mechanisms. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 3957–3966. (2013b) <https://doi.org/10.1021/es304295n>
- Zhao, F., Zhu, Y., & Meharg, A. A. Methylated arsenic species in rice: geographical variation, origin, and uptake mechanisms. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 3957–3966. (2013c) <https://doi.org/10.1021/es304295n>
- Zheng, M., Cai, C., Hu, Y., et al. Spatial distribution of arsenic and temporal variation of its concentration in rice. *New Phytologist*, 189(1), 200–209. (2010) <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03456.x>
- Zheng, M.Z., Li, G., Sun, G.X. et al. Differential toxicity and accumulation of inorganic and methylated arsenic in rice. *Plant Soil* 365, 227–238 (2013) <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1376-3>

Review články sú označené hviezdíčkou (*)