

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.3.327

JCCT 2018-8-41

금속전달 유전자(MTP1)의 과발현 애기장대에서 발현 위치에 따른 내성 증가 연구

Overexpression of the Metal Transport Protein1 gene (MTP1) in Arabidopsis Increased tolerance by expression site

김동균*

Donggiun Kim*

요약 현대 과학자들은 식물정화공정과 같은 새로운 기술로 중금속을 제거하려고 한다. 이런 최첨단 기술 중 하나는 토양의 특정 중금속을 제거하는 형질 전환 식물을 개발하는 것이다. 본 연구자는 *T. goingense* Metal Transport Protein 1 유전자와 TgMTP1 : GFP 유전자를 발현하는 형질 전환 벡터를 구축했다. 형질전환체 식물을 선택하여 형질 전환 된 유전자를 애기 장대 계놈에서 확인했다. 발현은 *Arabidopsis* 세포, 조직 및 기관의 여러 부분에서 확인되었다.

*Arabidopsis thaliana*에서 TgMTP1 과발현하는 식물에 중금속이온이 처리되었을 때 형질 전환 식물체는 비 형질 전환 체보다 중금속 내성이 높았다. 추가 연구를 위해 4 (Zn, Ni, Co, Cd.)가지 중금속에 대한 내성이 향상된 형질 전환 식물을 선택했다. 선택된 T3 TgMTP1 과다 발현 애기 장대 식물은 중금속에 내성이 증가된다. 이 식물은 액포 내에 중금속을 축적하고 동시에 원형질 막에 발현되는 MTP1 유전자의 발현을 특징으로 한다. 결론적으로, 이러한 식물은 식물 정화 응용 분야 및 내성이 증가 된 식물로 사용될 수 있다.

주요어 : 식물정화공정, 애기장대, 과발현, 중금속 내성, 형질전환체

Abstract Today's scientists try to remove heavy metals with many new technologies such as phytoremediation. One of the best cutting edge technologies is developing transgenic plants to remove certain heavy metal in soil. I constructed the transformation vector expressing *T. goingense* Metal Transport Protein1 gene and TgMTP1: GFP genes. The transgenic plants were selected and confirmed the transformed genes into *Arabidopsis thaliana* genome. Expression was confirmed in several parts in *Arabidopsis* cells, tissues and organs. When TgMTP1 overexpressing *Arabidopsis thaliana* were subjected, transgenic plants showed higher heavy metal tolerance than non-transgenic. For further study I selected the transgenic plant lines with enhanced tolerance against four different heavy metals; Zn, Ni, Co, Cd. The accumulation of these metals in these plants was further analyzed. The TgMTP1 overexpressing *Arabidopsis thaliana* plant of selected lines are resistant against heavy metals. This plant is characterized by the expression of the MTP1 gene accumulating heavy metal in the vacuole and being simultaneously expressed on the plasma membrane. In conclusion, these plants may be used in plant purification applications, and as a plant with increased tolerance.

Key words : phytoremediation, Overexpression, *Arabidopsis*, heavy metal tolerance, transgenic plant

*정회원, 신라대학교 생명과학과
접수일: 2019년 4월 18일, 수정완료일: 2019년 5월 20일
게재확정일: 2019년 6월 22일

Received: April 18, 2019 / Revised: May 20, 2019

Accepted: June 22, 2019

*Corresponding Author: botanist@silla.ac.kr

Dept. of Life Science, Silla Univ, Korea

I. 서 론

토양환경오염은 농업생산성과 생명체의 건강에 직접적인 영향을 주기 때문에 인류에 중요한 문제이다. 오염된 환경을 복원하여 깨끗하고 영양분이 많은 토양으로 보존하는 기술의 개발은 곧 미래의 지속 가능한 농업의 성장과 그 생산성 증가로 나타나는 결과로 인류 복지 증진에 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다 [2].

오염 토양에서 환경을 복원하는 여러 방법이 이용되고 있는 데 그 중에서 비 생물학적 방법으로 오염된 토양을 제거, 또는 다른 지역에 매립하는 방법, 그리고 오염 되지 않은 좋은 토양을 섞어서 오염물질 농도를 희석시키는 방법이 있다. 생물학적 방법으로는 유익한 산업 미생물로 오염 물질을 분해 혹은 변환 시키는 방법 그리고 식물을 사용하여 오염원을 흡수하거나 분해하는 방법을 이용해왔었다 [1].

식물을 이용하여 오염물질들을 토양에서 제거하는 방법은 식물 정화공정이라 하며 오염된 환경을 복구하기 위한 방법으로 오래 동안 있어 왔다. 그러나 오염물질을 제거하기 위해서 널리 사용하기 위한 식물은 많지 않다. 사용 가능성 있는 식물은 부족하고, 활용할 수 있는 식물도 동일 중에서도 차이가 심하며, 동일 종의 식물도 지역적으로 생태학적 특이성을 나타낸다. 그래서 연구자들이 유용한 식물 자원을 확보하기 위해서 많은 노력을 기울이고 있다 [13]. 또 가능성 있는 식물에서 유전자를 발굴하여 유전적 자원으로 활용하기 위해 여러 나라들이 경쟁적으로 탐색 중이다. 필요한 식물은 제한적이며, 또 가능성 있는 식물 중에서도 환경정화용으로 사용하기 위해서는 여러 생리학적 특성을 아직 잘 알지 못한다. 그래서 여러 실험을 시도하여 유용성을 파악하고 적용하려는 실험이 선행된 후에 활용하려고 하고 있다 [3].

최근에는 생명과학기술의 급속한 발전으로 이런 목적에 부합하는 유전공학적인 측면에서 식물체를 만들려는 시도가 가장 첨단 기술로 활발하다 [9,10]. 이는 토양 속의 중금속을 잘 흡수하는 식물을 선별하고 특이한 유전자를 발굴하여 연구한다. 이 유전자를 사용하여 유전공학적 연구과정을 거쳐서 환경 정화용으로 사용하는 방법이다. 또한 많이 연구된 유전자(중금속전달 운반)를 여러 유전적 연구방법을 사용하여 특성을 파악하고 유전공학적으로 유용한 식물로 육종하여 정화용

으로 사용하는 방법이다. [15,16]. 중금속으로 오염된 토양에서 중금속을 제거하기 위해서는 가장 유용하게 적용되는 기술은 여러 중금속을 축적하거나 혹은 단일 중금속을 축적하는 식물을 심어야 하는데, 대표적인 식물로 냉이 종류가 잘 알려져 왔다 [11]. 우리 연구진이 선별한 탄광지역에 자생하는 냉이는 식물연구에 대표적인 애기장대와 유사한 종으로 오래 동안 중금속을 축적하는 종으로 잘 알려져 왔다. 이러한 냉이는 종들이 다양하여서 지역 특성에 따라 환경에 잘 적응하여 각종 중금속을 축적할 수 있게 변이가 일어난 종을 사용하여 유전자를 비교 연구하여왔다 [8].

그 중에서 중금속을 과다 하게 축적하는 종인(T. goesingense)은 본 연구자가 오랫동안 연구해왔는데 이 식물의 MTP(metal tolerance proteins: [12].) 유전자들은 중금속을 축적에 유용함이 밝혀졌다. 그 중에서 MTP1를 효모에 발현시켰는데 중금속에 내성을 갖는다는 것을 밝혔다 [6]. 중금속으로 Zn, Ni, Co등은 식물에 필요한 미량원소이면서 조금만 많아지면 독성을 갖는 이중적 면을 갖는다. 이런 중금속을 식물 체내에 특히 액포에 과다하게 축적 할 수 있는 유전자로 MTP1이 밝혀졌다 [4]. 본 연구는 TgMTP1 유전자를 과발현 시켜서 생체 내에서 중금속 축적 기작을 연구 할 것이며 환경 정화용 활용 유전자로 가능한지를 확인하고, 환경 정화공정에 필요한 식물체로써 가능한지를 논의 할 것이다.

II. 2장

1. 식물 재료 및 생장 방법

애기장대 형질전환에는 *Arabidopsis thaliana* Col-0 (CS6000)와 callus 유도용으로 *mtpl* 돌연변이 종자를 *Arabidopsis* Stock Center ABRC (<http://www.arabidopsis.org>)에서 공급해주어서 사용하였다. 애기장대 종자시료에 미생물을 제거하기 위해서 멸균수로 세척하고 1차 표면소독을 70% 에탄올로 처리 후, 표면의 왁스가 어느 정도 제거된 후 1% sodium hypochlorite(락스) 용액으로 20분간 담가 2차 표면소독을 하였다. 그리고 강력 살균제 락스를 제거하기 위해 멸균수로 5회 반복하여 철저히 세척을 하였다. 세척된 종자는 MS (Murashige and Skoog) 기본배지에 발아가 잘 유도 되도록 형광 빛에서 16시간 암 8시간의 광주기의 단일식물의 조건을 맞

추어, 25°C의 조건으로 발아시키고 1주일 자란 식물체를 plate assay로 사용되었고 토양으로 이식된 후 6주 된 식물체를 형질전환 재료로 사용하였다.

2. Callus 유도실험

기내에서 배양된 식물체 뿌리에서 callus를 유도하여, 형성된 callus를 계대배양하여 중금속 처리효과를 단일 세포내 성장효과를 살펴보기 위해서 plate assay 하였다. 중금속효과와 세포내 성장 축적을 위해서 식물 내 미량원소이면서 과축적 할 경우 치명적 효과를 나타내는 Co, Zn, Ni, Cd을 농도 별로 처리하였다.

3. 형질전환 벡터 제작과 형질전환

과발현용 35S 프로모터를 이용하여 과축적종 TgMTP1(*Thlaspi goesingense*) 유전자를 식물체에 발현될 수 있도록 binary vector pCAMBIA 1302에 삽입시켰다. 3' 지역에 mGFP와 mHA를 연결시켜서 발현될 수 있도록 유도하였다[4]. 이것을 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하였으며(Fig.1A), 또한 대조구로 이용하기 위하여 vector pCAMBIA 1302 벡터만 도입된 *Agrobacterium*도 준비하였다. floral dipping 방법을 사용하여 애기장대에 형질전환을 시도하였다[14]. T0 종자는 glyphosate ammonium (Pestanal; Sigma-Aldrich)를 처리하여서 저항성 있는 T1를 종자를 선별하였다.

4. 형질 전환체 선발과 Plate Assay

5 T2 종자에서 자란 식물을 BASTA-resistant segregation 비율에 따른 Homozygous 종자를 T3 선별하였다. 일차적으로 선발된 식물체를 RT-PCR을 하였다. PCR로 형질전환이 확인된 식물체를 무작위로 선발하여 분석을 실시하였다(Fig.1B),. 시료는 배양기에서 생육중인 식물체의 잎으로부터의 RNA 분리방법에 따라 수행하였다.

중금속 처리하여 plate assay를 하기 위하여 Co, Zn, Ni, Cd을 처리하였다. 중금속 처리를 위하여 기내에서 증식시킨 식물체를 생육을 위해 기내에서 꺼내어 순화한 후 pot로 옮겼다. 생육 6주 된 식물체 처리실험은 미량원소가 첨가 된 수용액에 동일량을 부어주며 동일한 환경 조건에서 2 주간 배양하여 변화 정도를 조사하였다. 동일한 실험을 3회 이상 반복하였고 각각의 실험에

10개체 이상을 사용하였다.

5. 현미경연구

세포내 단백질 발현을 확인하기 위해서 현미경Image는 TE 2000 (Nikon, <http://www.nikon.com>) inverted microscope를 사용하여 촬영하였다. GFP촬영은 488-nm line argon laser (National Laser Company, <http://www.nationallaser.com>)가 사용되었고 형광 빛은 500 와 540 nm 였다. 광학현미경 해상도를 위해서 대물렌즈를 40배로하여 총 400배율을 사용하였다.

III. 3장 결과 및 고찰

1.유전자 도입 형질전환 애기장대식물 제작

식물의 binary vector 인 pCAMBIA 1302 vector에 BamHI/XbaI의 제한 효소를 이용하여 TgMTP1 유전자를 재조합 하였다 [4]. 이렇게 재조합 된 vector를 애기장대 식물에 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 사용하여 형질 전환시켰다(Fig. 1A). 형질 전환된 식물의 잎을 따서 RNA를 추출하고 RT-PCR 분석을 통하여 발현 정도를 분석하였고 형질전환 식물체에서는 항상 발현되어 있다는 사실을 확인하였다(Fig.1B),

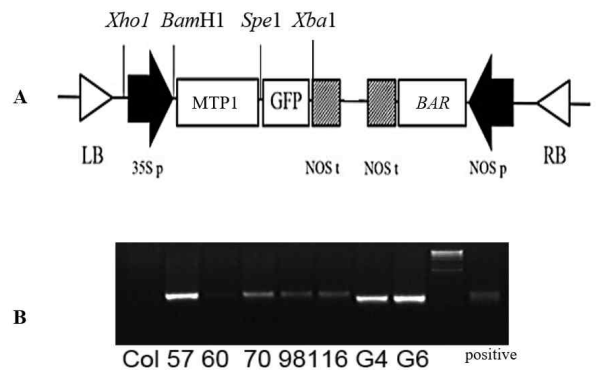


그림 1. 유전자 재조합 vector 지도와 발현 분석
 Figure 1. Linear map of binary vector (pCambia1302-TgMTP1 or pCambia1302-TgMTP1- GFP) and the expression with RT-PCR. A, 35S:CaMV 35S, TgMTP1, GFP: Green Fluorescent Protein gene, NOS : Nopaline Synthase terminator, Bar gene: Phosphothiothricine acetyltransferase, LB: T-DNA left border, RB: T-DNA right border. Vector construction and transformation with TgMTP1:GFP) overexpressing transgenic plants. B, The expression of TgMTP1 in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants with RT-PCR.

GFP의 발현양상이 현미경으로 조사되었다. 효과적 인 중금속 내성의 원인을 탐구하기 위하여 원형질막에 위치하거나, tonoplast(액포)막에 위치 하거나, 이 두 가지 발현 위치를 알아보았다. 그 결과 잎 뒷면, 꽃잎, 특별히 root에서 유도된 Callus 세포에도 발현 되었다. 잎 뒷면, 꽃잎은 원형질막과 액포막에 발현되는 것으로 보여진다. 꽃잎의 경우 세포벽이 얇고 세포가 원형질체로 유지되고, 액포가 잘 발달하지 않아 작지만 강하게 발현되고 원형질막은 발현 정도가 약하다(Fig. 2A) 잎 뒷면에 발현 모습은 전형적인 쌍떡잎식물의 공변세포를 둘러싸고 있는 부세포의 형태로 사료되며, 이곳은 원형질막에 강하게 발현된다[5]. Callus에서 현미경 연구 결과에서는 두 곳의 막 내면에 동시에 발현되는 결과를 보였다 (Fig. 2B).

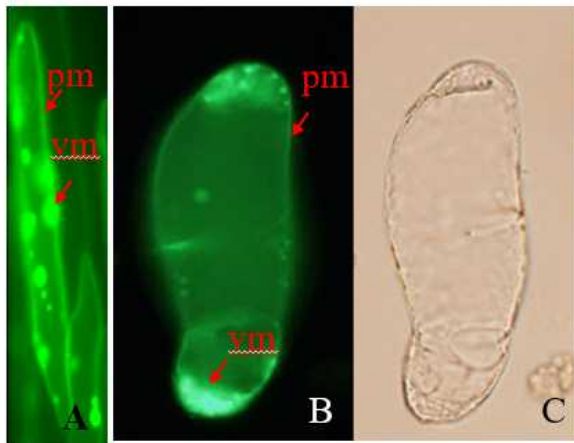


그림 2. 발현 지역의 현미경 연구

Figure 2. Localization studies with TgMTP1:GFP overexpressing transgenic plants. Vacuolar membrane(vm), plasma membrane(pm) A sepal cell, B and C callus cell . A - C (500nm fluorescence light), D (600nm bright field), x 400 .

많이 발현되는 식물체의 T3 line을 사용하여 여러 실험을 진행하였다. Tg MTP₁ 과발현 line에서 표현형이 확정된 T₃ line으로 Tg MTP₁ 과발현의 종자를 선별하여서 여러 중금속 저항성 실험을 실시하였다. MS media에 Cd(카드미움), Co(코발트), Zn(아연), Ni(니켈) 이온들을 여러 농도에서 plate assay를 수행하였다 (Figs. 3, 4). Tg MTP₁ 과발현 식물체는 4종류의 중금속에서 저항성을 나타내었으며, 뿌리 성장과 측근의 수에서(Fig. 4) 더 잘 자랐다. 크기성장을 비교하면 작은 차이를 보이며 Ni plate에서는 형질 전환체가 크기가 작

아지는 경향이다. 그러나, 식물의 실제건강상태는 반대로 더욱 건강하다(Fig. 3). 측근의 발생을 관찰하여보면 비교 할 수 없을 정도 형질 전환체가 건강함이 차이가 난다. 중금속농도가 증가할수록 차이가 커져서 Ni100 μM농도에서 3배정도 차이를 보인다(Fig. 4). 이 결과들은 중금속의 스트레스로 잘 자라지 못하는 야생형 Col-0 애기장대 식물에 비해서 저항성이 있음을 입증한다.

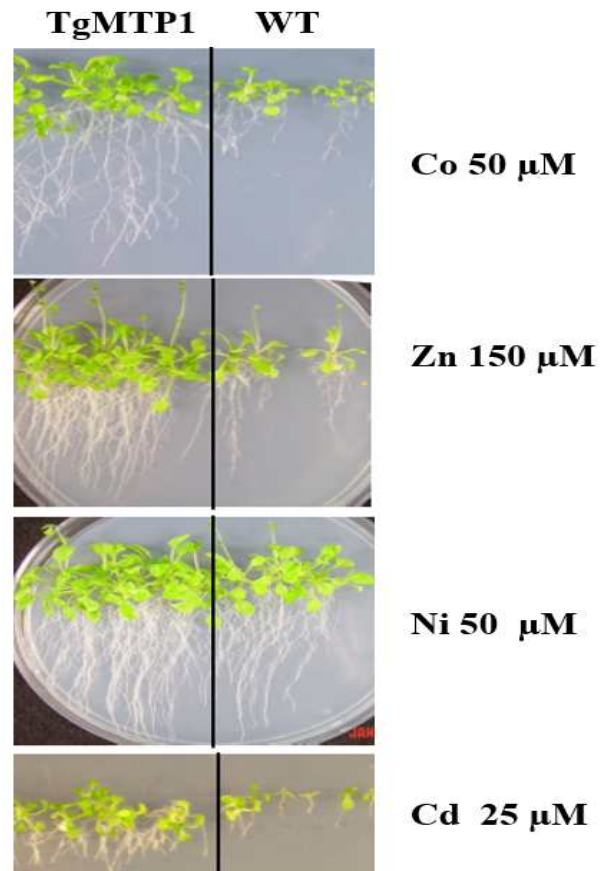


그림 3. Plate 위에 4 종류 중금속 이온 처리 후 차이가보이는 농도에서식물들의 성장을 분석 비교

Figure 3. Plate assay for comparison between 4 different metals with overexpressing plant (TgMTP1) and WT, wild-type Arabidopsis plant (Col-0). MS media treated with cobalt 100 μM Concentration, zinc 150 μM Concentration, Nickle 50 μM Concentration, 25 μM Concentration.

토양에서 자란 6주 된 식물에 Tg MTP₁ 과발현 식물은 중금속을 처리하지 않을 때 15cm 정도로써, 25cm 야생형 Col-0에 비해 작았다. 하지만 bolt의 수가 2배나 많았다[5]. 길이성장은 감소하는 전형적인 생산성 증가형으로 씨앗생성과 열매생산 증가형으로 변하는 표

현형이다[5]. 세포 수준에서 발현과 중금속 내성을 확인하기 위해서 Col-0야생종, Atmtp1 돌연변이종, 그리고 Tg MTP₁ 과발현 형질전환체 뿌리에서 callus를 유도하여 성장을 비교하였다. 50 μ M Ni 농도배지에서 Tg MTP₁ 과발현 식물 callus가 가장 잘 자랐다. 이것은 뿌리에서 유도된 callus에서 중금속 내성을 보이며 돌연변이체에서는 민감성을 보여서 금속전달유전자의 존재유무가 내성을 결정짓는다고 사료된다(Fig. 5).

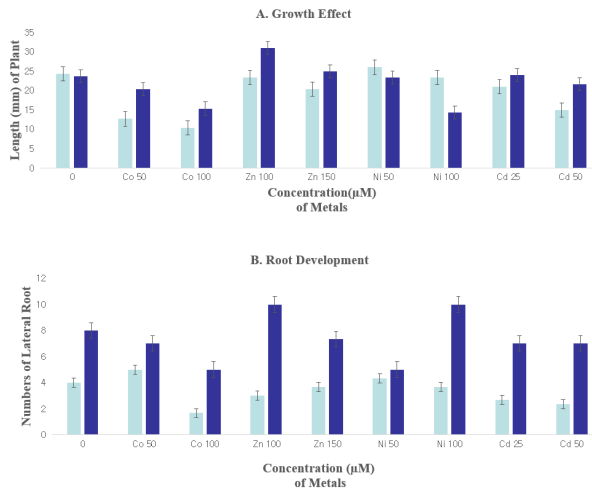


그림 4. Plate 위에 4 종류 중금속 이온 처리 후 여러 농도에서 식물들의 성장을 분석 비교

Figure 4. Plate assay treated with different metals : Overexpressing plant (TgMTP1, blue) and WT, wild-type Arabidopsis plant (Col-0, white) for growth effect (A) and root development (B). 0: No metal contained MS media as control, Co 50 and 100: MS media treated with cobalt 50 and 100 μ M Concentration, Zn 100 and 150: MS media treated with zinc 100 and 150 μ M Concentration, Ni 50 and 100: MS media treated with Nickle 50 and 100 μ M Concentration, Cd 25 and 50: MS media treated with cadmium 25 and 50 μ M Concentration.

TgMTP1을 효모와 식물 원형질체에서 발현시키는 연구에서는 원형질막에 위치해서 축적보다는 배출을 효과적으로 하는 것을 알게 되었다[6]. 애기장대 MTP1의 발현실험에서는 줄기의 액포막에 위치하여 액포에 중금속을 축적하는 결과를 보고하였으며[7], TgMTP1을 애기장대에 과발현 연구에서도 액포에 발현되며 중금속을 축적하는 결과를 보고하였다[4]. 본 연구에서는 꽃잎과 Callus는 액포와 원형질 막에 동시에 발현 되는 현상을 보인다. 꽃잎 세포의 액포막에 강하게 발현되지만(Fig. 2A), 잎의 부세포 연구에서는 액

포에는 약하게 원형질막에 강하게 발현된다[5]. 뿌리에서 유도된 Callus는 중금속 내성을 보이며(Fig. 5), Callus에서 발현양상이 원형질막과 액포막에 동시에 보인다 (Fig. 2B). 이것은 형질 전환체에서 양쪽 발현이 가능하여 중금속의 배출과 축적이 가능하게 되어 내성이 증가하는 것으로 사료된다. 유사유전자를 다른 종에 발현시켜서 잘못 된 위치에 발현되었거나 조직의 특수성에 의해서 발현양상이 달라진 것인지, 또는 중금속의 환경에 달라지는 것인지는 확실하지 않다. 하지만 앞으로 원형질막과 액포막을 분리한 후 막 생리적 실험을 통하여 적절한 생리적 현상을 규명할 예정이다. 그리고 Callus를 이용한 여러 중금속 배출과 축적연구를 수행한 후 구체적으로 논의할 것이다.

본 연구에서는 부가적으로 종이 다른 식물에 유전자 과발현 형질 전환체는 유전자 기능을 연구하는 목적과 다르게 다른 용도로 사용할 수 있는 효과가 발생할 수 있다는 것을 보여준다. 즉, MTP family 유전자의 특성에 따른 형질 전환체를 만들어 식물정화공정을 효율화시켜 토양오염을 방지할 가능성이 있다. 이 유전자들을 활용하는 식물정화공정 기술은 토양환경을 정화하여 건강한 환경을 보존하기 위한 유용한 유전자원과 식물형질전환 식물체가 미래에 중요한 관련 기술로써 그리고 향후 분석 노하우로 축적 되어 다양한 방식으로 활용이 가능하여 실제 오염 정화에 활용가치가 있다고 사료 된다. 그리고 부가적으로 발생하는 유전자 효과로 유용한 미량원소를 효율적으로 흡수하는 식물을 만들어 필수 원소 결핍을 해결하는 방법으로 활용하면 인류 건강증진에 기여 할 수도 있을 것이다.

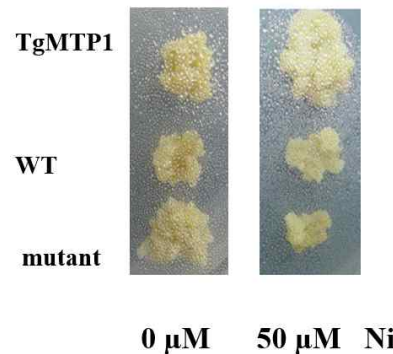


그림 5 Plate 위에 니케 이온 처리 후 뿌리 켈루스 성장분석 비교

Figure 5. Plate assay for root callus growth treated with Ni: mtp1, mutant of MTP1 Arabidopsis from seed stock center ABRC)

IV. 결론

연구자들은 유용한 유전자를 발현하여 새로운 육종을 시도하고, 오염된 토양을 정화하는 식물정화 공정도를 발견할 목적으로 금속 전달 유전자를 발현시켜왔다. 본 연구에서 냉이 금속전달유전자인 *Tg MTP₁* 유전자를 발현시키는 벡터를 구성하여 형질전환 된 애기장대 식물체를 만들었으며 과발현 연구를 시도하였다. 유전자를 과발현 시키는 line 을 선별하여서 유전자를 test하는 여러 실험을 하였다. 특히 *Tg MTP₁* 과발현 선별 line 은 저항성이 증가하였다. 애기장대 세포, 조직, 기관에서 여러 부분에 발현을 확인하였다. 또한 이 식물에 여러 중금속을 처리하여서 저항성을 확인하였다. 이 식물체는 액포에 중금속을 축적하는 *MTP₁* 유전자가 발현되고 원형질막에 동시에 발현되는 양상이어서 미래에 활용할 수 있는 식물정화공정 식물체일수 있고 내성이 증가하는 식물체로도 사용 가능성을 보여준다.

References

- Baker, A.J. 1981. Accumulators and excluders—strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3:643–654
- Clemens, S., Ma, J.F. 2016. Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annu Rev Plant Biol.* 2016 Apr 29; 67:489–512
- Etim, E.E. 2012. Phytoremediation and Its Mechanisms: *Int. J. Env. Bio.* 2(3):120–136
- Gustin, J.L., Loureiro, M.E., Kim, D., Na, G., Tikhonova, M., Salt, D.E. 2009. MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyper-accumulating plants. *Plant J.* 57:1116–1127
- Kim, D. 2015. Studies on nickel uptake in transgenic *Arabidopsis thaliana* introduced with *TgMTP1* gene encoding metal tolerance protein. *J. Plant Biotechnol* (2015) 42:409–413
- Kim, D., Gustin, J.L., Lahner, B., Persans, M.W., Baek, D., Yun, D.J., Salt, D.E. 2004. The plant CDF family member *TgMTP1* from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* 39:237–251
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T., Maeshima, T.M. 2004. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Phys.* 45:1749–1758
- Kramer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:133–141
- Kupper, H., Zhao, F.J., McGrath, S.P. 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 119:305–311
- Kupper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212:75–84
- Kupper, H., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Kroneck, P.M.H. 2004. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol.* 134:748–757
- Persans, M.W., Nieman, K., Salt, D.E. 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98:9995–10000
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643–668
- Weigel, D., Glazebrook, J. 2002. *Arabidopsis A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zhang, J., Martinoia, E., Lee, Y. 2018. Vacuolar Transporters for Cadmium and Arsenic in Plants and their Applications in Phytoremediation and Crop Development. *Plant Cell Physiol.* 59(7):1317–1325.
- Bae, S.D. Study on maximization and demonstration of biogas production in an anaerobic digester using a microbial agent, *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol.4(2), pp.179–183, 2018