

VYUŽITÍ GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ROSTLIN PRO REMEDIACI KONTAMINOVANÝCH ZEMIN

Martina Nováková, Martina Macková, Jan Fišer, Jáchym Šuman, Veronika Kurzawová, Tomáš Macek

suram@vscht.cz



***Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Fakulta potravinářské a biochemické
technologie***

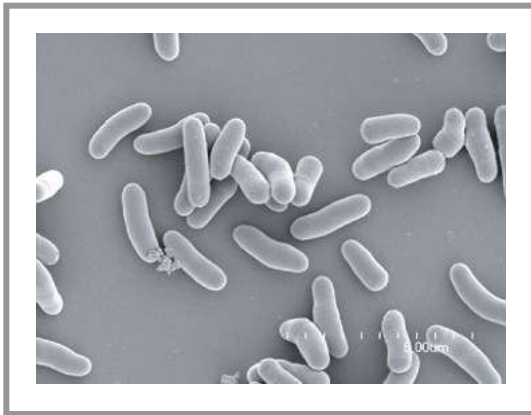


***Společná laboratoř VŠCHT Praha a ÚOCHB AVČR,
Česká akademie věd***

Biodegradace, bioremediace

- Použití živých organismů pro dekontaminaci životního prostředí
- Bioremediace je veřejností akceptována a není škodlivá životnímu prostředí
- Pro *in situ* remediaci a nízké koncentrace kontaminantů

mikroorganismy



rostliny



fytoremediace

- **Mikroorganismy** - široké spektrum enzymů vyvinuto během mnoha let
 - organické polutanty až mineralizace
 - akumulace těžkých kovů
- **Rostliny** - mohou akumulovat nebo metabolizovat organické nebo anorganické polutanty
 - organické polutanty jako lidská játra
 - 3 fáze:
 - 1) aktivace molekuly (oxidace, redukce, hydrolýza)
 - 2) konjugace (s cukry, glutathionem, aminokyselinami)
 - 3) uložení ve vakuole nebo do buněčné stěny a ligninu
 - těžké kovy - transport stejně jako u elementárních iontů kovů

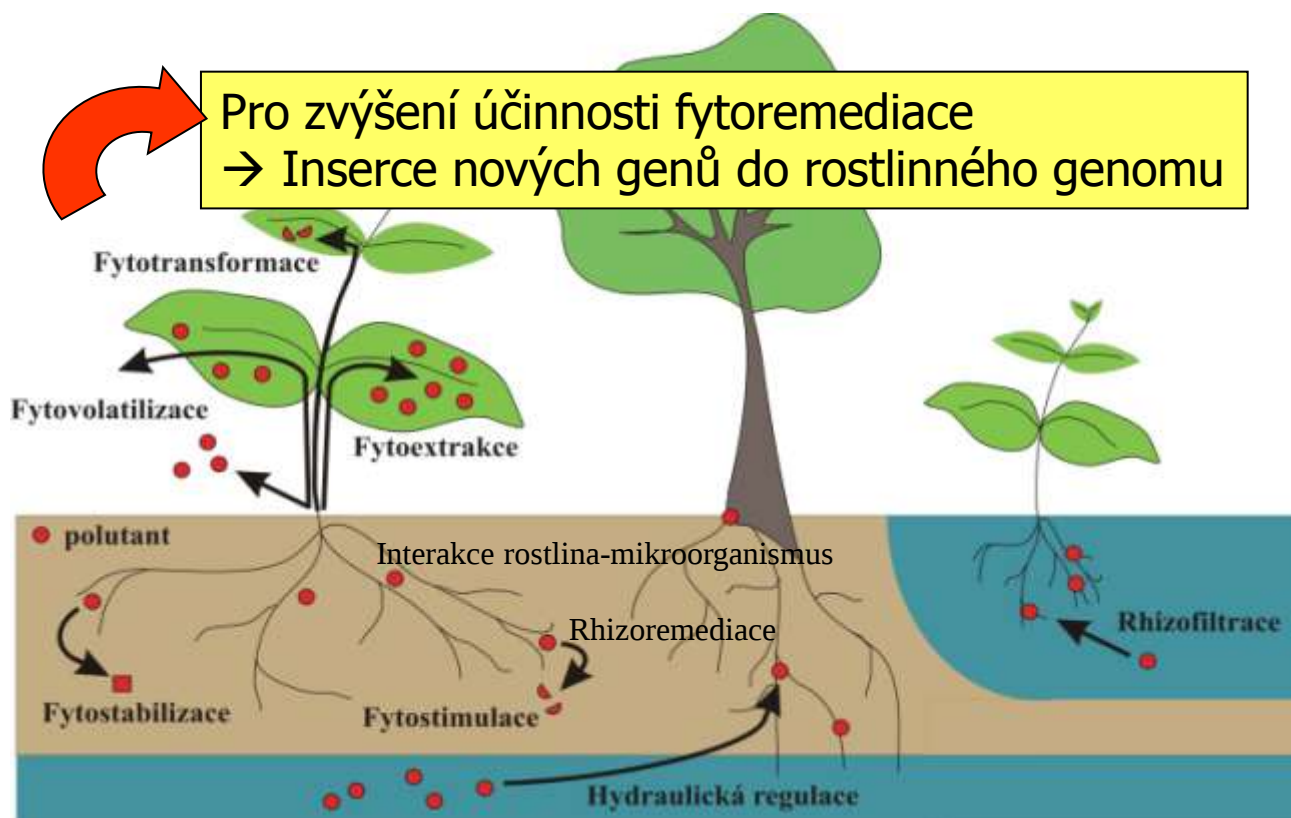
Fytoremediace + rhizoremediace

Fytoremediace

Využití zelených rostlin k akumulaci a degradaci polutantů životního prostředí

Rhizoremediace

Spolupráce mikroorganismů a rostlin v rhizosféře rostlin



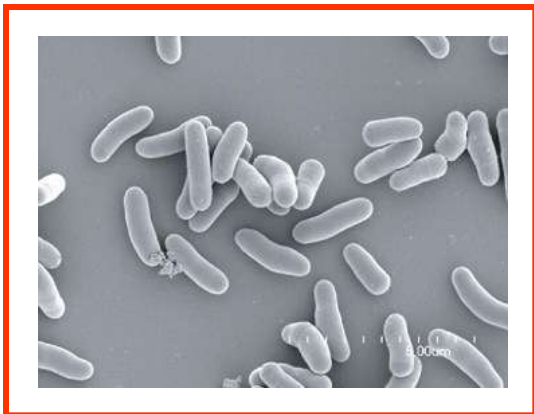
GMO - geneticky modifikované organismy

- Podle zákona je geneticky modifikovaný organismus takový organismus (kromě člověka), jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací, tj. cílenou změnou dědičného materiálu způsobem, kterého se nedosáhne přirozeně – např. křížením, šlechtěním.
- **Tato definice se vztahuje na organismy schopné rozmnožování nebo přenosu dědičného materiálu, tj. mikroorganismy, rostliny, živočichy a buněčné kultury; nevztahuje se na člověka.**



GMO pro dekontaminaci životního prostředí

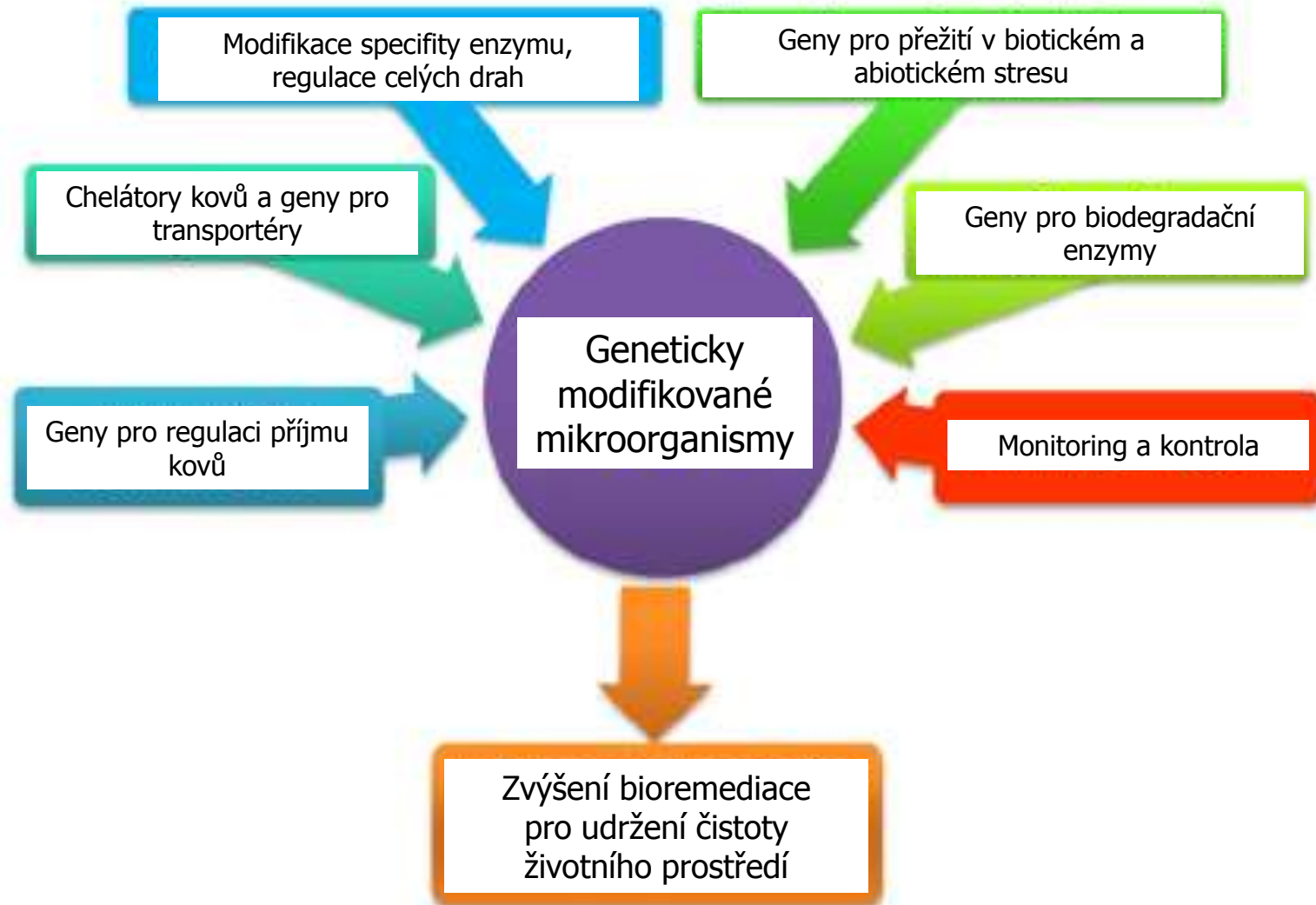
mikroorganismy



rostliny



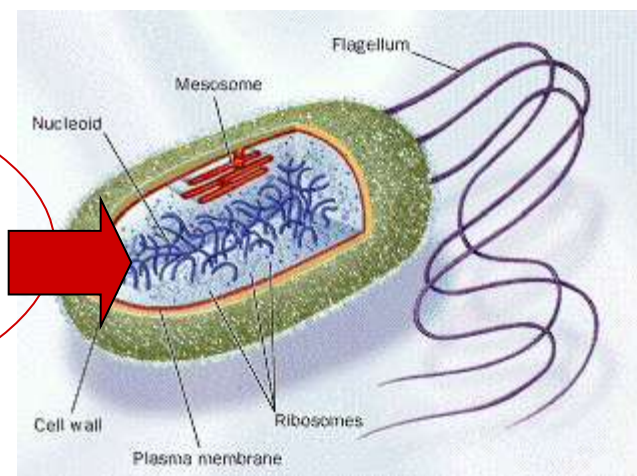
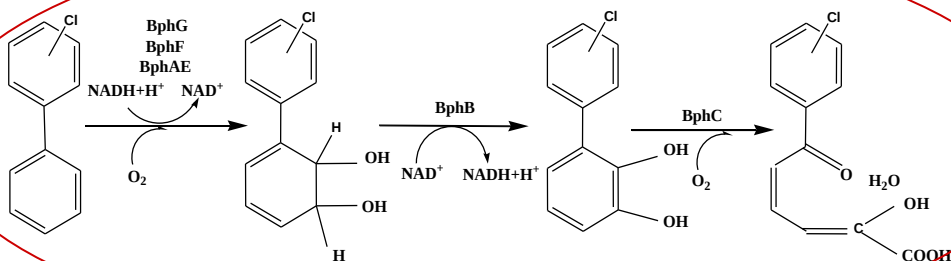
GM mikroorganismy



GM mikroorganismy

Pro degradaci polychlorovaných bifenyľů, toluenu, benzenu.....
Pro akumulaci těžkých kovů...

Populární je inserce celé degradační dráhy nebo změna substrátové specifity enzymů



Legislativní problémy

Uvolňování GM mikroorganismů do životního prostředí více problémů než u GM rostlin

GMM mohou uniknout, obtížný monitoring

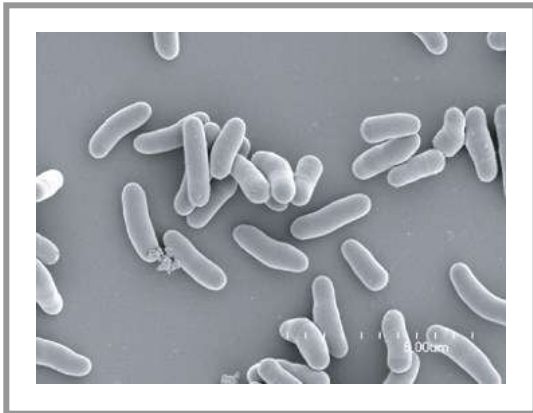
➡ Tvorba biofilmů, multibariéry MO

➡ Tvorba sebevražedných GMM

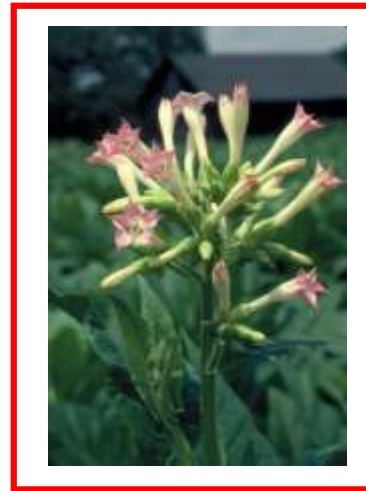


GMO pro dekontaminaci životního prostředí

mikroorganismy



rostliny



Rostliny

Přirozeně – rostliny akumulující anorganické polutanty (těžké kovy)

Thlaspi cearulescens

1800 mg Cd/kg suché biomasy, 51600 mg Zn/kg suché biomasy



Thlaspi rotundifolium

8200 mg Pb/kg suché biomasy



Ipomoea alpina

Cu - 12300mg /kg suché biom.



Nízká hmotnost biomasy

GM rostliny

Jak vybrat správnou rostlinu?



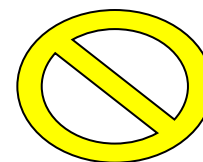
http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Tabak_P9290017.JPG

<http://www.enviweb.cz/zemedelstvi>

<http://www.mahonianursery.com/grasses-sedges/heavy-metal-blue-switch-grass.html>

GM rostliny

Pro zabránění šíření
kontaminace

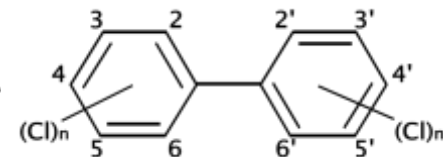


Pro fytořemediaci
anorganických polutantů

A small snippet of a periodic table focusing on the element Mercury (Hg).

79 Au	Mercury 80 Hg	81 Tl
197.0	200.59	204.38
2.4	1.9	1
	Ununh	

Pro fytořemediaci
organických polutantů

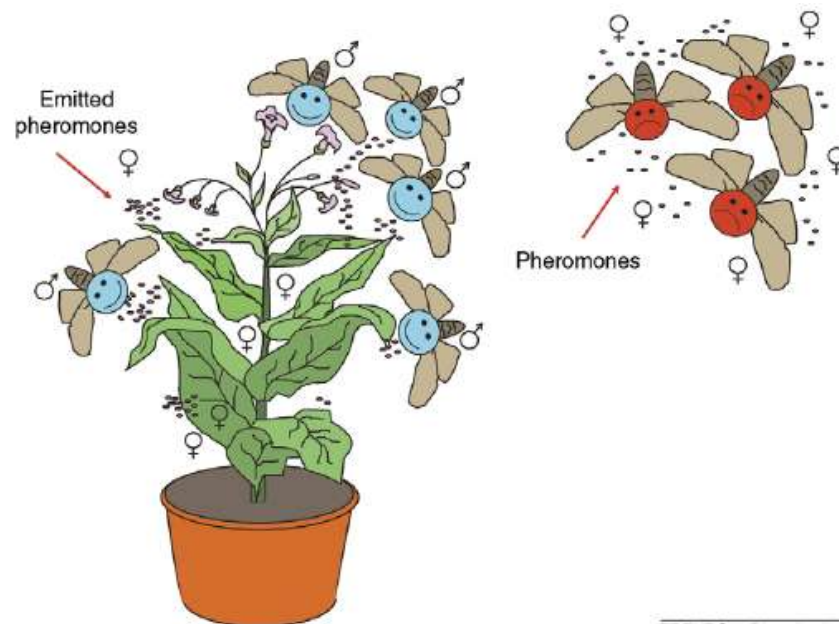


Snížení množství agrochemikálií

- GM plodiny s δ -endotoxinem – nižší množství pesticidů



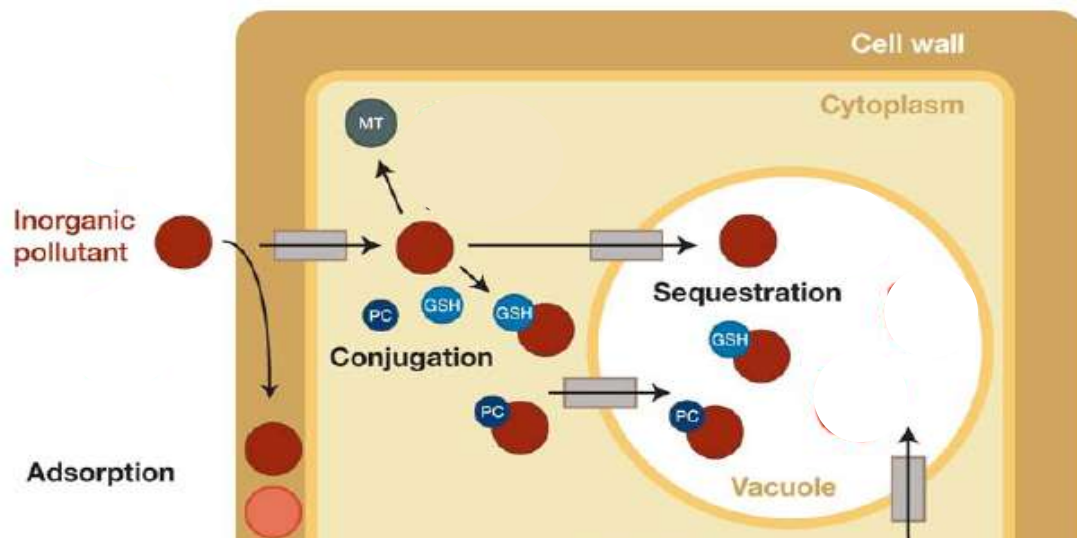
- tabák emitující hmyzí feromon
- nižší reprodukce nechtěného hmyzu
– nižší množství pesticidu



TRENDS in Biotechnology

Macek T., Kotrba P., Novakova M., Demnerova K. and Mackova M.: Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. Trends Biotechnol 26 (3), 146-152, 2008.

Tolerance a akumulace těžkých kovů



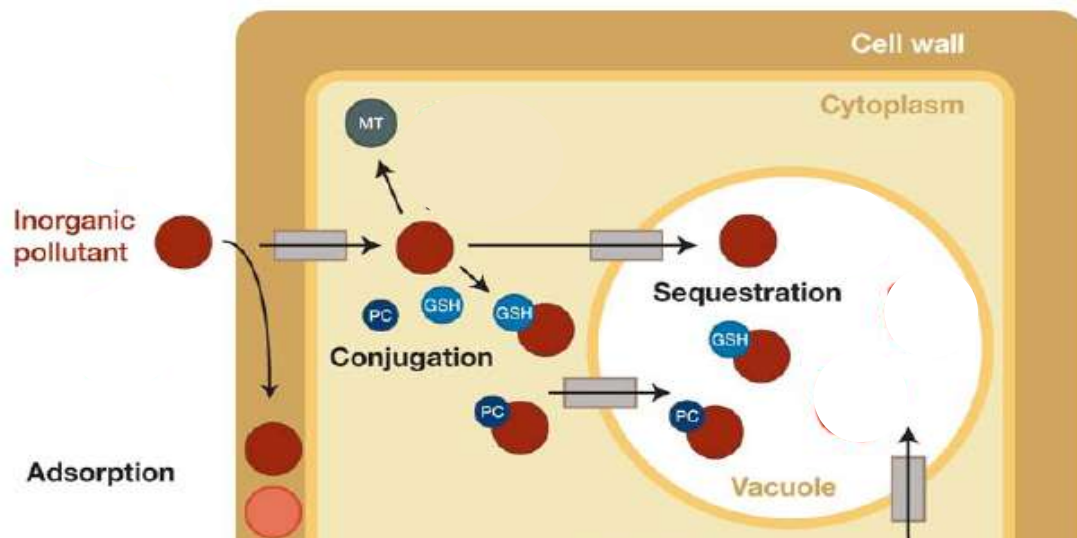
Pilon-Smits E. (2005) Phytoremediation, Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15-39

MT – metalothioneiny

PC – fytochelatiny

GSH - glutathion

Tolerance a akumulace těžkých kovů



Pilon-Smits E. (2005) Phytoremediation, Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15-39

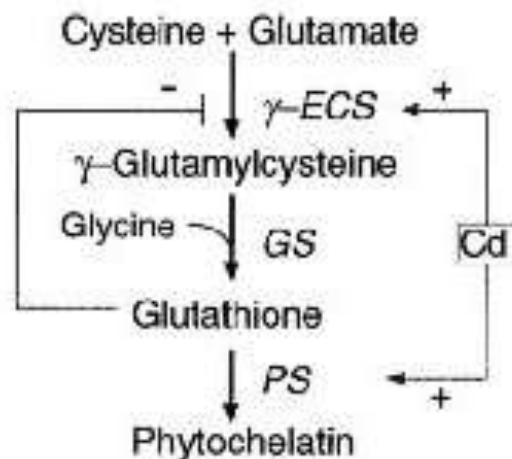
MT – metalothioneiny

PC – fytochelatiny

GSH - glutathion

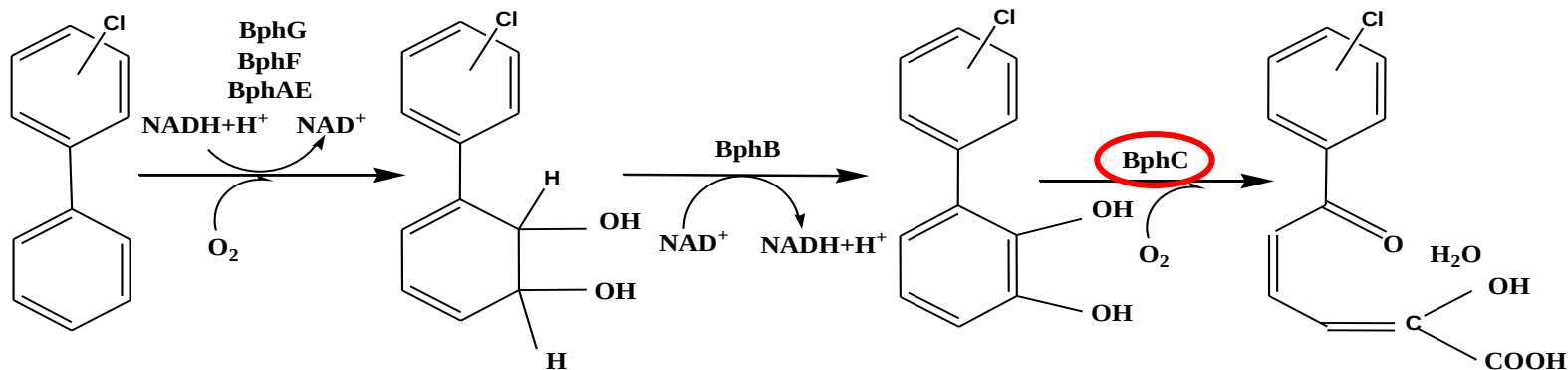
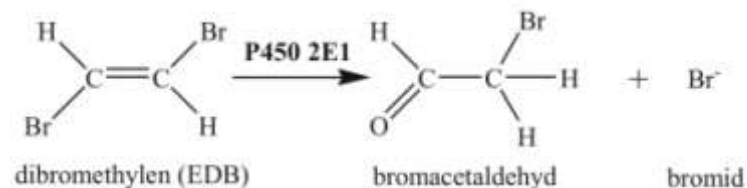
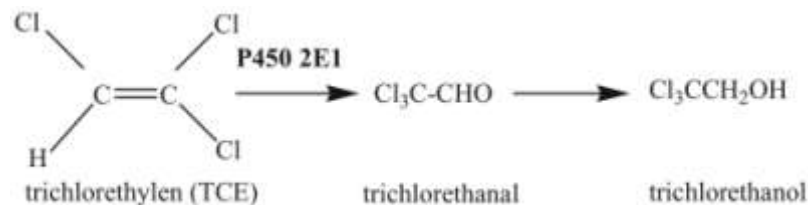
+ transportní proteiny

+ enzymy z metabolismu



Pro oxygenaci, dechloraci, degradaci.....

- Enzymy z bakteri ln ch degrada n ch drah
- sav   geny pro cytochromy
-



Transgenic plants for enhanced phytoremediation of xenobiotics.

Target plant	Gene (s)	Enzymes	Source	Transgene effects	Reference
<i>Oryza sativa</i>	<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Enhanced metabolism of chlorotoluron, norflurazon	Kawahigashi et al., 2007, 2008
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>onr</i>	Pentaerythritol tetranitrate reductase (PETN)	<i>Enterobacter cloacae</i>	Enhanced denitration of glycerol trinitrate (GTN) and TNT	French et al., 1999
<i>N. tabacum</i>	<i>NfsI</i>	Nitroreductase	<i>E. cloacae</i>	The transgenic plants removed high amount of TNT from the test solution and reduction of TNT to 4-hydroxylamino-2, 6-dinitrotoluene.	Hannink et al., 2001, 2007
<i>A. thaliana</i>	<i>NfsA</i>	Nitroreductase	<i>E. coli</i>	The plants showed higher nitroreductase activity and 7-8 times higher uptake compared with wild plants.	Kurumata et al., 2005.
<i>A. thaliana</i>	<i>XplA and XplB</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Rhodococcus rhodochorus</i>	Enhanced degradation of RDX	Jackson et al., 2007
Hybrid aspen (<i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>)	<i>pnrA</i>	Nitroreductase	<i>Pseudomonas putida</i>	The transgenic aspen (hybrid) was shown to tolerate and take up greater amounts of TNT from contaminated water and soil.	Van Dillewijn et al., 2008
Hybrid poplar (<i>Populus tremula</i> x <i>populous alba</i>)	<i>CYP450 2E1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Rabbit	Increased removal of TCE, vinyl chloride, carbon tetrachloride, benzene and chloroform from hydroponic solution and air	Doty et al., 2007
<i>O. sativa</i>	<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Remediation of atrazine and simazine	Kawahigashi et al., 2005b
<i>O. sativa</i>	<i>CYP1A1, CYP2B6 and CYP2C19</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Phytoremediation of atrazine and metolachlor	Kawahigashi et al., 2006a
<i>Solanum tuberosum</i> , <i>O. sativa</i>	<i>CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Resistance to sulfonylurea and other herbicides	Inui and Ohkawa, 2005.
<i>N. tabacum</i>	<i>CYP105A1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Streptomyces griseolus</i>	Resistance to sulfonylurea	O'keefe et al., 1994.
<i>O. sativa</i>	<i>CYP2C9</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Tolerance to sulfonylurea	Hirose et al., 2005.
<i>N. tabacum</i>	<i>CYP450 2E1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Oxidation of TCE and ethylene dibromide	Doty et al., 2000
<i>O. sativa</i>	<i>CYP2B6</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Metabolism of ethofumesate and benfuresate	Kawahigashi et al., 2005c
<i>O. sativa</i>	<i>CYP2B6</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Remediation of metachlor	Kawahigashi et al., 2005a
<i>O. sativa</i>	<i>CYP2B22, CYP2C49</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Sus scrofa</i>	Tolerance to several herbicides	Kawahigashi et al., 2005c
<i>N. tabacum</i> , <i>A. thaliana</i>	<i>CYP71A10</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Glycine max</i>	Tolerance to phenyl urea herbicide	Siminszky et al., 1999
<i>N. tabacum</i>	<i>tpx1 and tpx2</i>	Peroxidases (Px)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hairy cultures of transgenic tobacco showed enhance removal of phenol	Alderete et al., 2009
<i>N. tabacum</i>	<i>CYP76B1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Helianthus tuberosus</i>	Tolerance to herbicide	Didierjean et al., 2002.

Target plant	Gene (s)	Enzymes	Source	Transgene effects	Reference
<i>N. tabaccum</i>	<i>GstI-6His</i>	Glutathione S-transferases (GST I)	Maize	Higher tolerance to alachlor	Karavangeli et al., 2005.
<i>N. tabaccum</i>	<i>bphc</i>	2,3, dihydroxybiphenyl-1, 2-dioxygenase	PCB degrading bacteria	Enhanced degradation of PCBs	Chrastilova et al., 2007
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>tpxI</i>	Peroxidases (Px)	Roots of <i>L. esculentum</i>	The overexpression of <i>tpxI</i> gene in transgenic tomato hairy roots resulted in the enhanced removal of phenol.	Oller et al., 2005
Alfalfa <i>N. tabaccum</i>	<i>atzA</i>	Atrazine chlorohydrolase	Bacteria	Enhanced metabolic activity against atrazine	Wang et al., 2005
<i>A. thaliana</i>	<i>Mn</i> peroxidase gene	Peroxidases	<i>Coriolus versicolor</i>	Enhanced removal of pentachlorophenol (PCP)	Imura et al., 2002
<i>N. tabaccum</i>	<i>Protox</i>	Protoporphyrinogen IX oxidase	<i>Bacillus subtilis</i>	Tolerance to diphenyl ether herbicide oxyflufen	Jung et al., 2008
<i>O. sativa</i>					
<i>A. thaliana</i>	<i>743B4, 73C1</i>	Glycosyltransferases (UGTs)	<i>A. thaliana</i>	Overexpression of UGTs genes resulted in the enhanced detoxification of TNT and enhanced root growth.	Gandia-Herrero et al., 2008
<i>N. tabaccum</i>	<i>ophc2</i>	Organophosphorus hydrolase (OPH)	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Enhanced degradation of organophosphorus (methyl parathion).	Wang et al., 2008
<i>Brassica juncea</i>	γ -ECS, GS	γ -Glutamylcysteine synthetase; Glutathione synthetase	<i>Brassica juncea</i>	Overexpression of ECS and GS resulted in enhanced tolerance to atrazine, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, phenanthrene, metolachlor.	Flocco et al., 2004
<i>Populus trichocarpa</i>	γ -ECS	γ -Glutamylcysteine synthetase	Poplar	Overexpression of γ -ECS resulted in increased tolerance to chloroacetanilide herbicides.	Gullner et al., 2001
<i>N. tabaccum</i>	<i>CYP450E1</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Enhanced degradation of anthracene and chloropyriphos	Dixit et al., 2008
	<i>GST</i>	Glutathione-S-transferase	<i>Trichoderma virens</i>		
Transgenic plants for enhanced rhizodegradation					
<i>A. thaliana</i>	<i>LACI</i>	Root specific laccase	Cotton	Secretes laccase to the rhizosphere and have shown enhanced resistance to phenolic allelochemicals and enhanced tolerance to 2, 4, 6,-trichlorophenol.	Wang et al., 2004
<i>N. tabaccum</i>	<i>LAC</i>	Fungal laccase	<i>Coriolus versicolor</i>	Secretion of laccase into the rhizosphere and remove the pollutants bisphenol A and PCP.	Sonoki et al., 2005
<i>N. tabaccum</i>	Biphenyl dioxygenase gene	Biphenyl dioxygenase	<i>Burkholderia xenovorans</i>	Catalyse the oxygenation of 4-chlorobiphenyls.	Mohammadi et al., 2007
<i>A. thaliana</i>	<i>DbjB</i>	Aromatic-cleaving extradiol dioxygenase	<i>Terrabacter</i> sp.	Enhanced detoxification of 2, 3-dihydroxybiphenyl (2, 3-DHB)	Uchida et al., 2005
<i>N. tabaccum</i>	<i>DhaA</i>	Haloalkane dehydrogenase	<i>Terrabacter</i> sp.	Enhanced detoxification of 1-chlorobutane in rhizosphere	Uchida et al., 2005
<i>N. tabaccum</i>	<i>bphC</i>	Biphenyl catabolic enzymes	<i>Pandora</i> sp.	Enhanced degradation of PCBs	Francova et al., 2003; Novakova et al., 2009

Rostliny používané pro transformace v naší laboratoři

tabák

Nicotiana tabacum



len

Linum usitatissimum



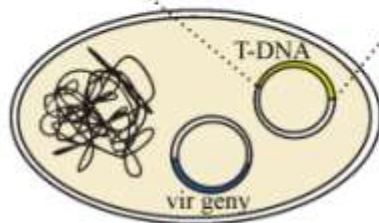
Používané metody

Transientní exprese – pro studium exprese

Trvalá transformace – pro získání transgenní rostliny

Transientní exprese

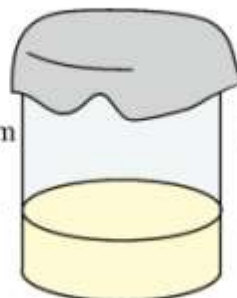
Agrobacterium tumefaciens



příprava
inokula

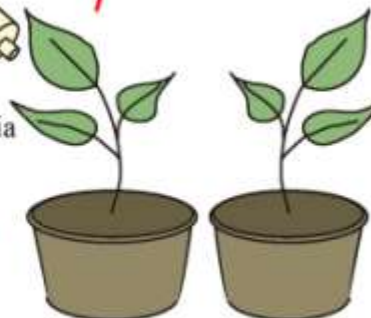


buňky se
resuspendují
v roztoku
s acetosyringonem



inkubace 3 hodiny
při pokojové teplotě

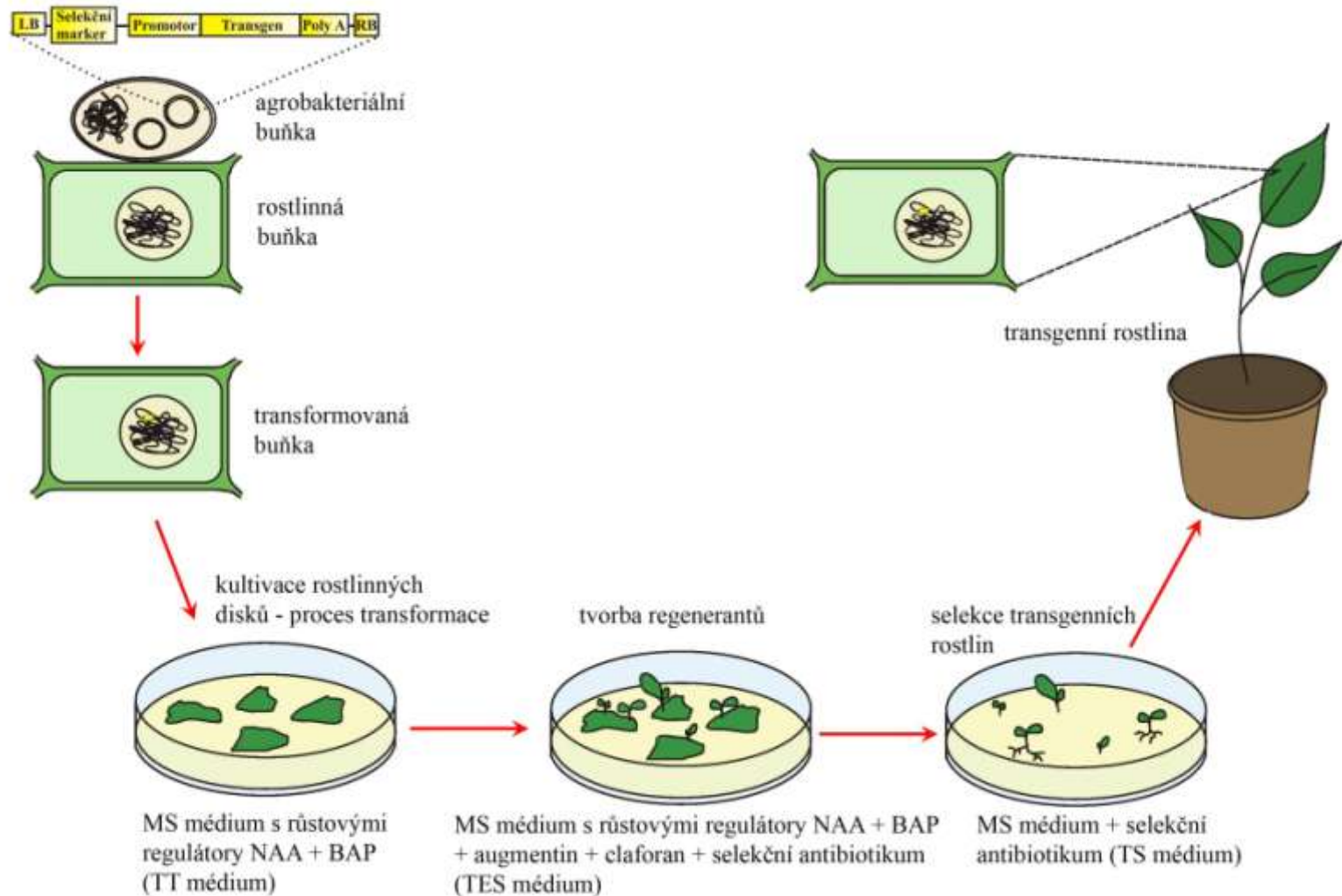
infiltrace agrobakteria
do listů

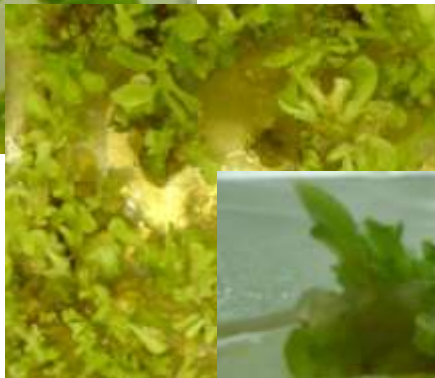
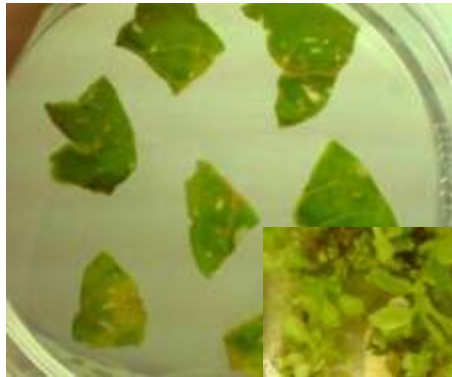


po 2-3 dnech detekce
exprese transgenu



Transformace rostlin





Naše laboratoř

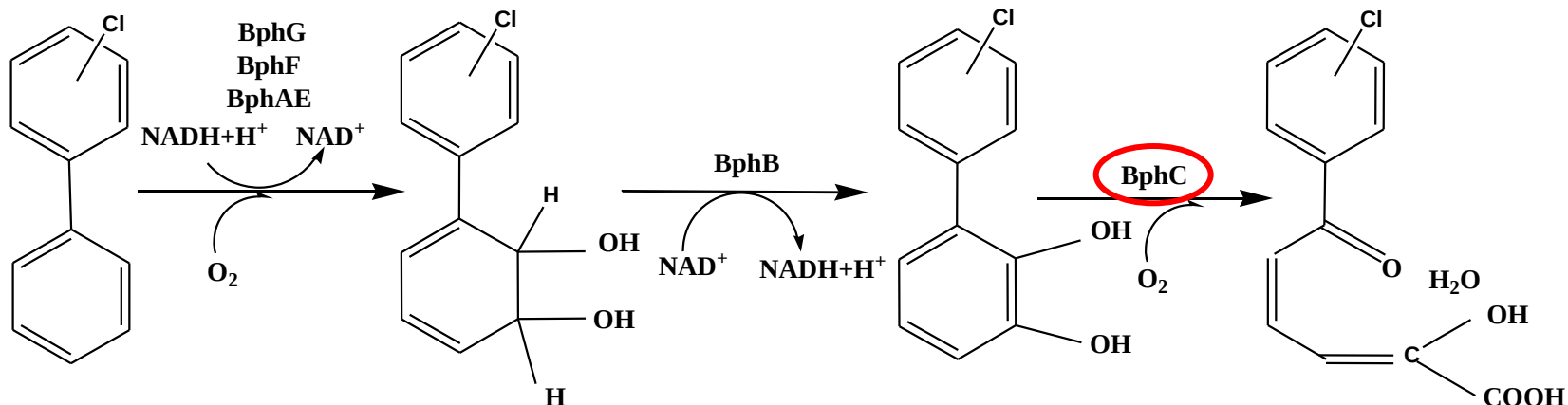
Které geny? – fytořemediace organických polutantů

– fytořemediace anorganických polutantů

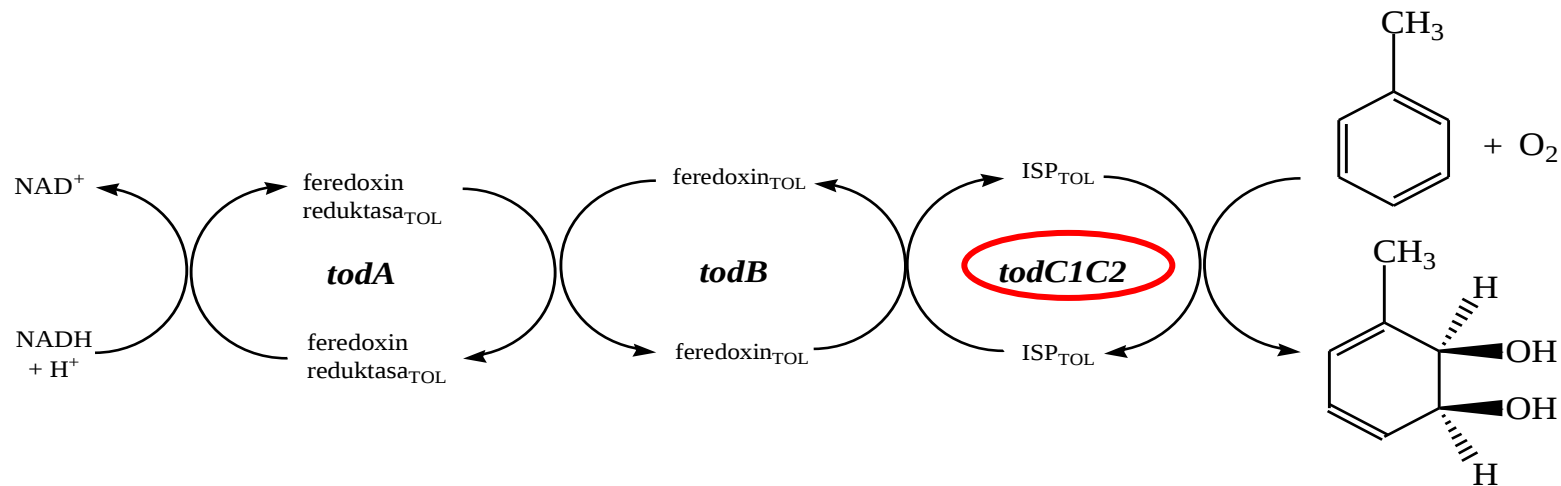
Které geny?

– fytoremediace organických polutantů

bakteriální gen *bphC* (2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasa)



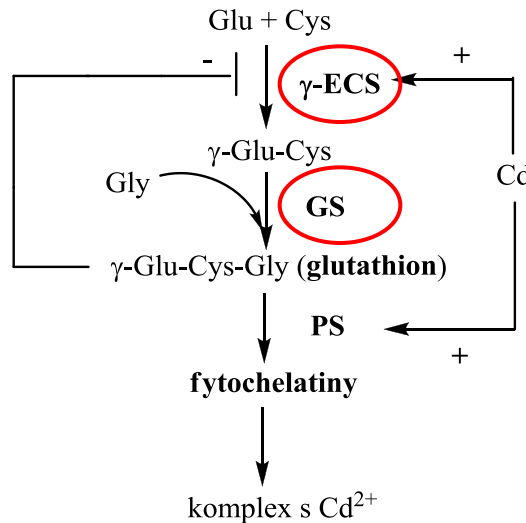
bakteriální gen *todC1C2* (terminální dioxygenasa toluen-2,3-dioxygenasy)



Které geny? – fytoremediace anorganických polutantů

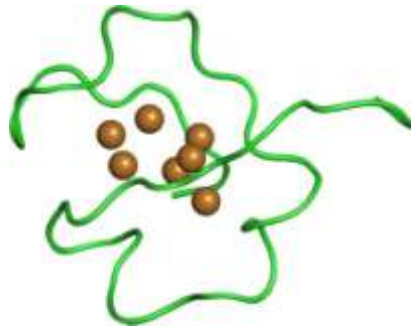
Kvasničné geny *gsh1* a *gsh2* (γ -glutamylcysteinsynthetasa a glutathionsynthetasa)

Akumulace těžkých kovů



Kvasničný gen *CUP* (pro metalothionein)

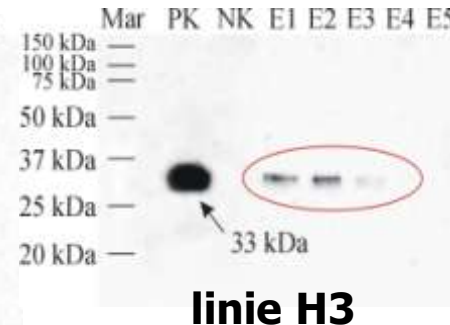
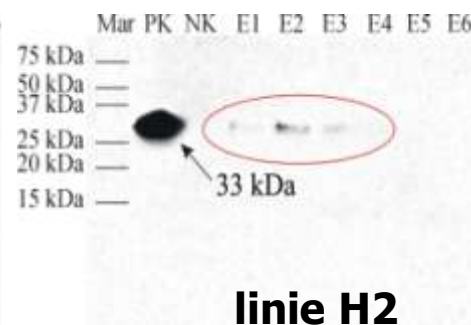
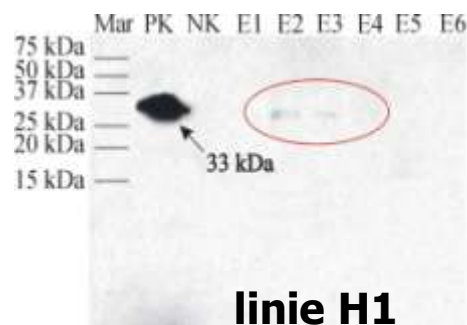
Akumulace těžkých kovů



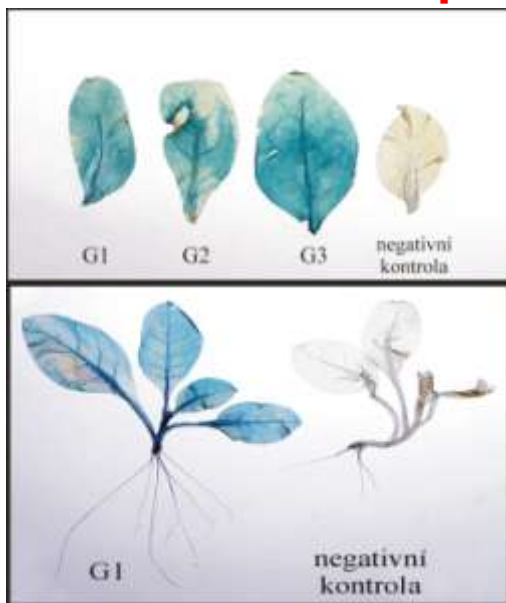
Detekce transgenních rostlin

protein

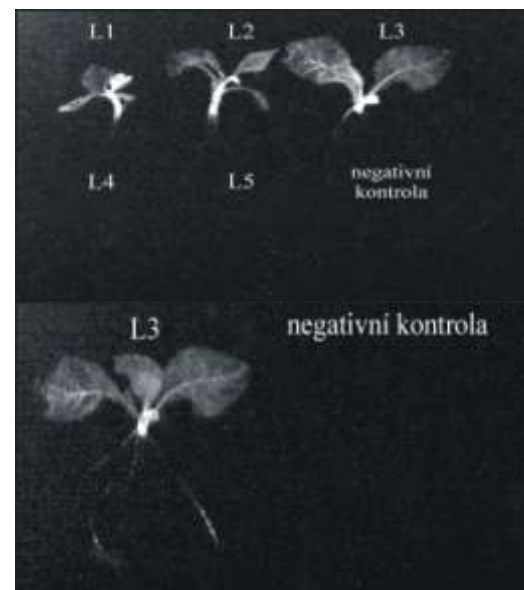
Imunochemická detekce **BphC/His** izolovaného afinitní chromatografií



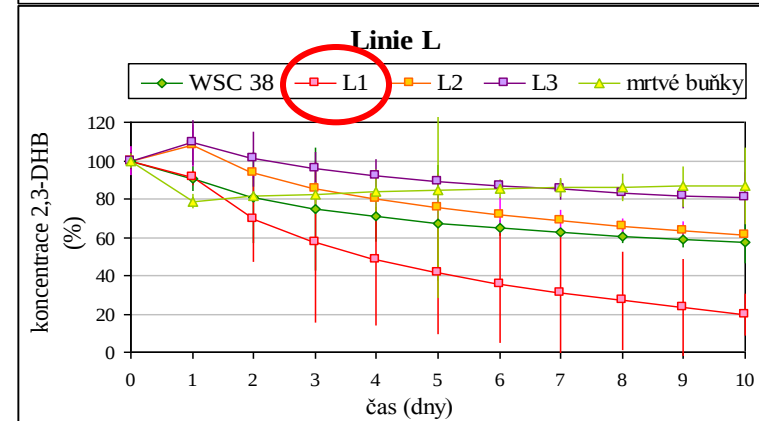
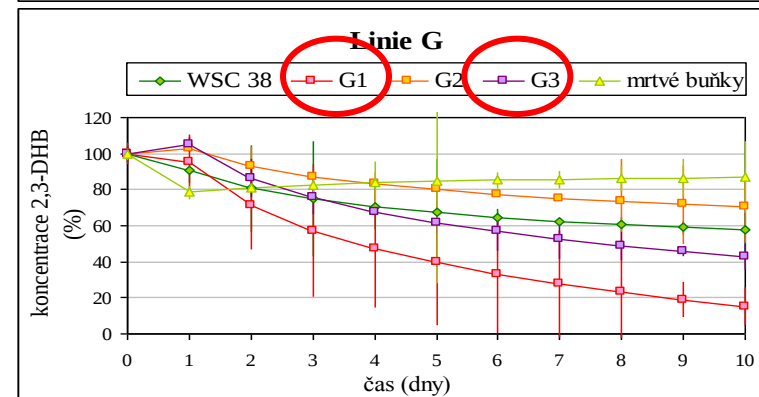
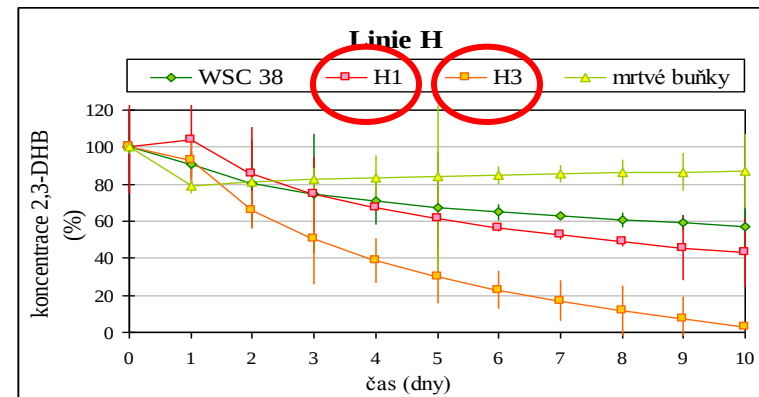
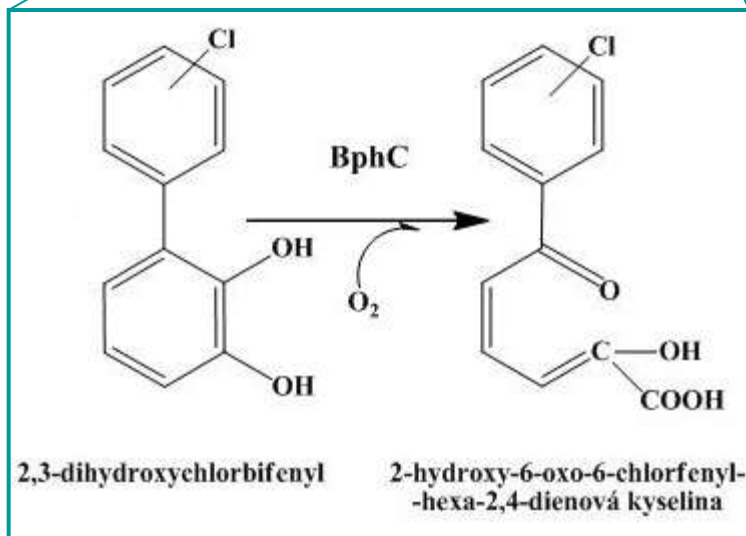
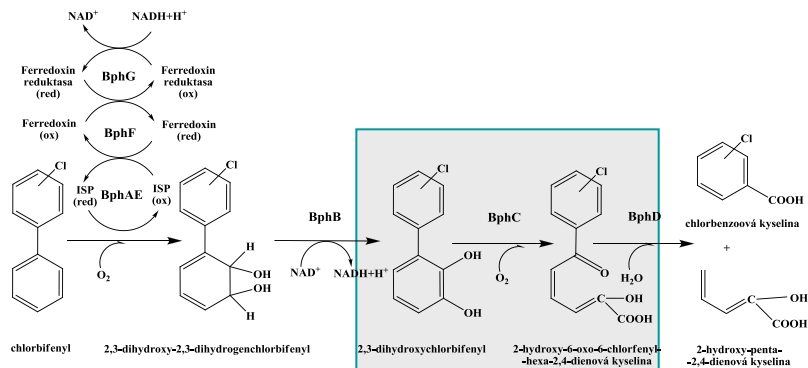
Histochemická detekce **BphC/GUS**



Histochemická detekce **BphC/LUC**

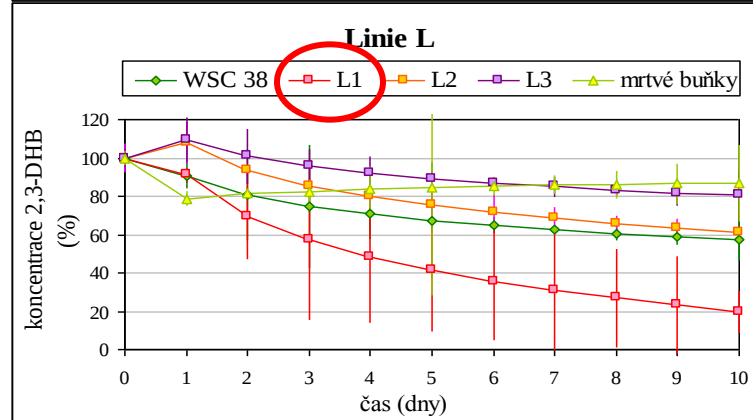
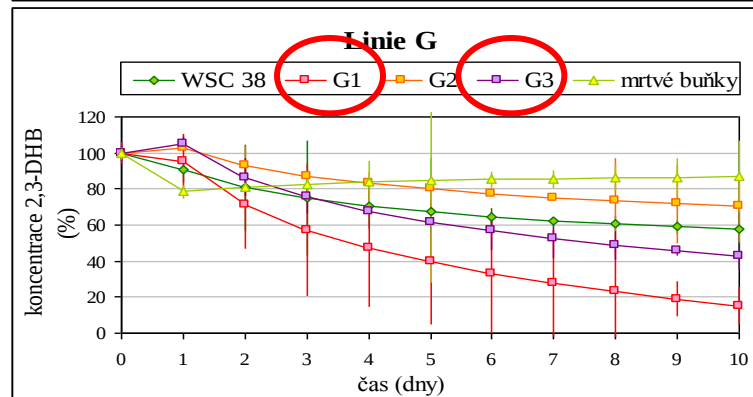
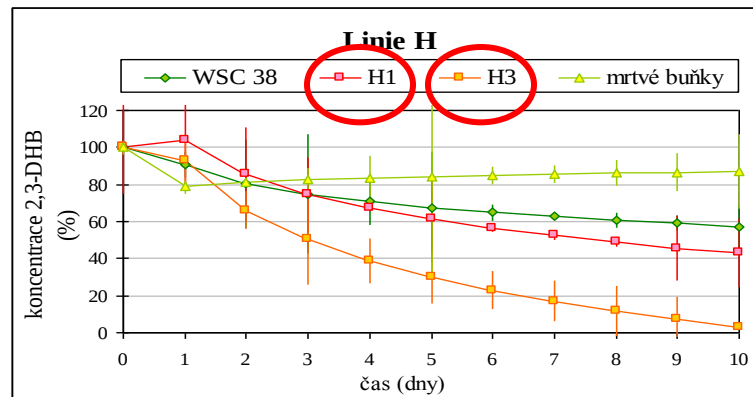
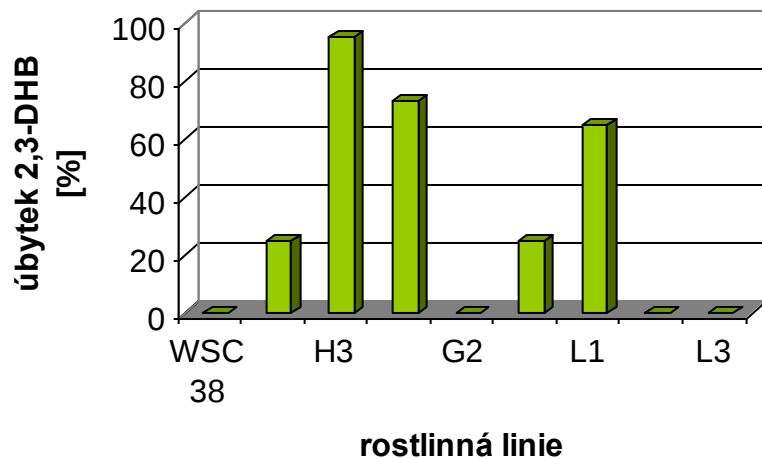


Jak jsou účinné?



Jak jsou účinné?

úbytek 2,3-DHB v médiu s transgenními rostlinami v porovnání s WSC 38



Podpora GM potravín v EU

Bulharsko

Česká republika

Estonsko

Finsko

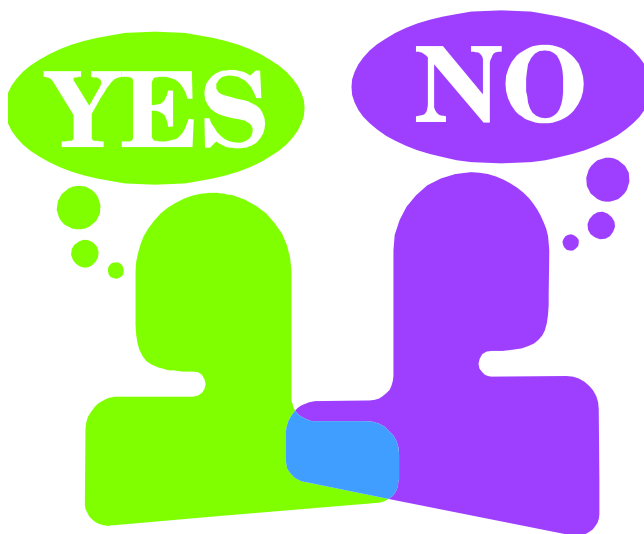
Nizozemí

Slovensko

Velká Británie

Španělsko

Švédsko



Kypr

Lucembursko

Maďarsko

Polsko

Rakousko

Řecko

Malta

Slovinsko

Děkuji za vaši pozornost

Tato práce byla podporována granty:

- MSMT 1M06030
- ME-09024-BIOAROM
- MSM 6046137305
- EU grantem Minotaurus FP7 KBBE-2010-4-265946

Doporučené přednášky a postery:

Ing. Šuman (přednáška)

Ing. Fišer (poster)

Ing. Kurzawová (poster)

