



Vysoká škola
chemicko-technologická
v Praze

Transgenní rostliny využitelné ve fytořemediacích

Ing. Jitka Viktorová, Ph.D.

Ing. Martina Nováková, Ph.D.

Prof. Ing. Tomáš Macek, CSc.

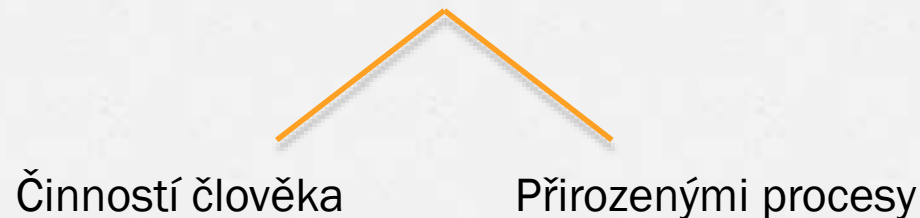
Ing. Neumannová, Ing. Bečvářová,
Bc. Madleňáková, Ing. Hatáková, Ing. Fišer

Znečištění životního prostředí



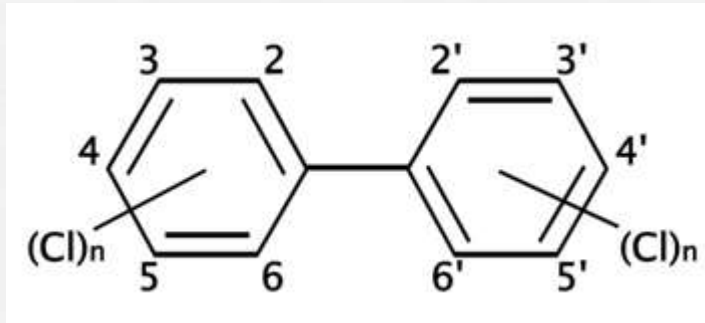
- o Anorganické látky – těžké kovy (Pb, Cd, Hg), kyanidy, radioaktivní izotopy, zasolení
- o Organické látky – polychlorované bifenyly (PCB), benzen, toluen, xylen, trichlorethylen, ropné uhlovodíky, nitrosloučeniny, chlorovaná rozpouštědla, pesticidy, výbušniny

Znečištění životního prostředí



- o Anorganické látky – **těžké kovy** (Pb, Cd, Hg), kyanidy, radioaktivní izotopy, **zasolení**
- o Organické látky – **polychlorované bifenyly** (PCB), benzen, toluen, xylen, trichlorethylen, ropné uhlovodíky, nitrosloučeniny, chlorovaná rozpouštědla, pesticidy, výbušniny

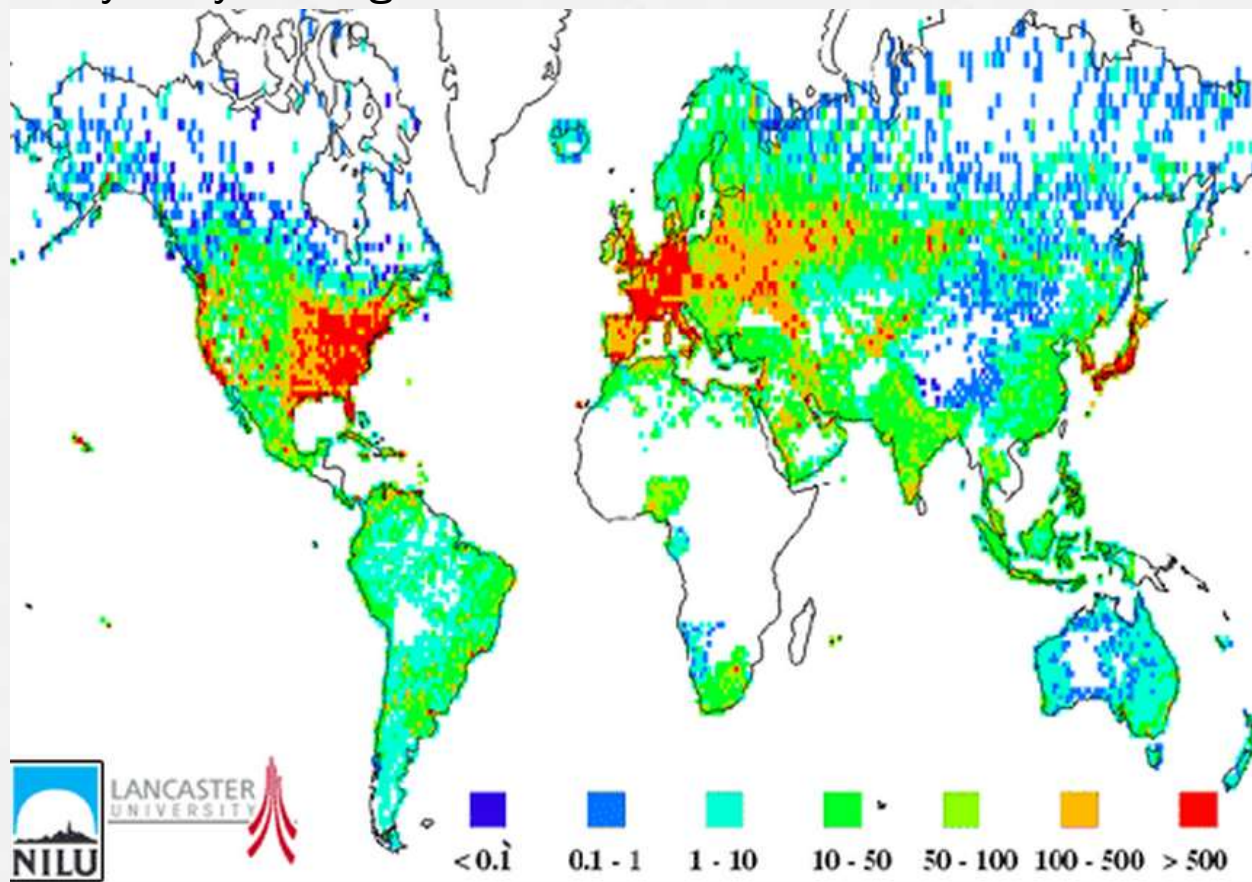
Polychlorované bifenyly (PCB)



- Připravovány chlorinací bifenyly, různé množství chloru
- Teoreticky 209 kongenerů
- Perzistentní, nehořlavé
- Endokrinní disruptory, podezřelé karcinogeny
- Součást transformátorů, hydraulických tekutin, lubrikantů apod.
- Komerční směs PCB: **Aroclor 1260** a **Delor 106**:
 - Většinou hexa- a heptachlorbifenyly
 - Používány v transformátorech a v barvách v Československu

Polychlorované bifenyly (PCB)

Spotřeba vybraných kongenerů PCB ve světě v letech 1930 – 2000 (tuny)



Kovy

1. esenciální se známou biologickou funkcí

- o Na, K, Mg, Ca – vyžadovány všemi organismy
- o V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo – vyžadovány některými organismy
- o W – esenciální pouze pro hypertermofilní bakterie
- o Toxické ve vysokých koncentracích: Fe, Cr, K, Cu, Zn

2. toxické kovy

- o Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Tl, Pb, Al, Ge, As, Sb, Se

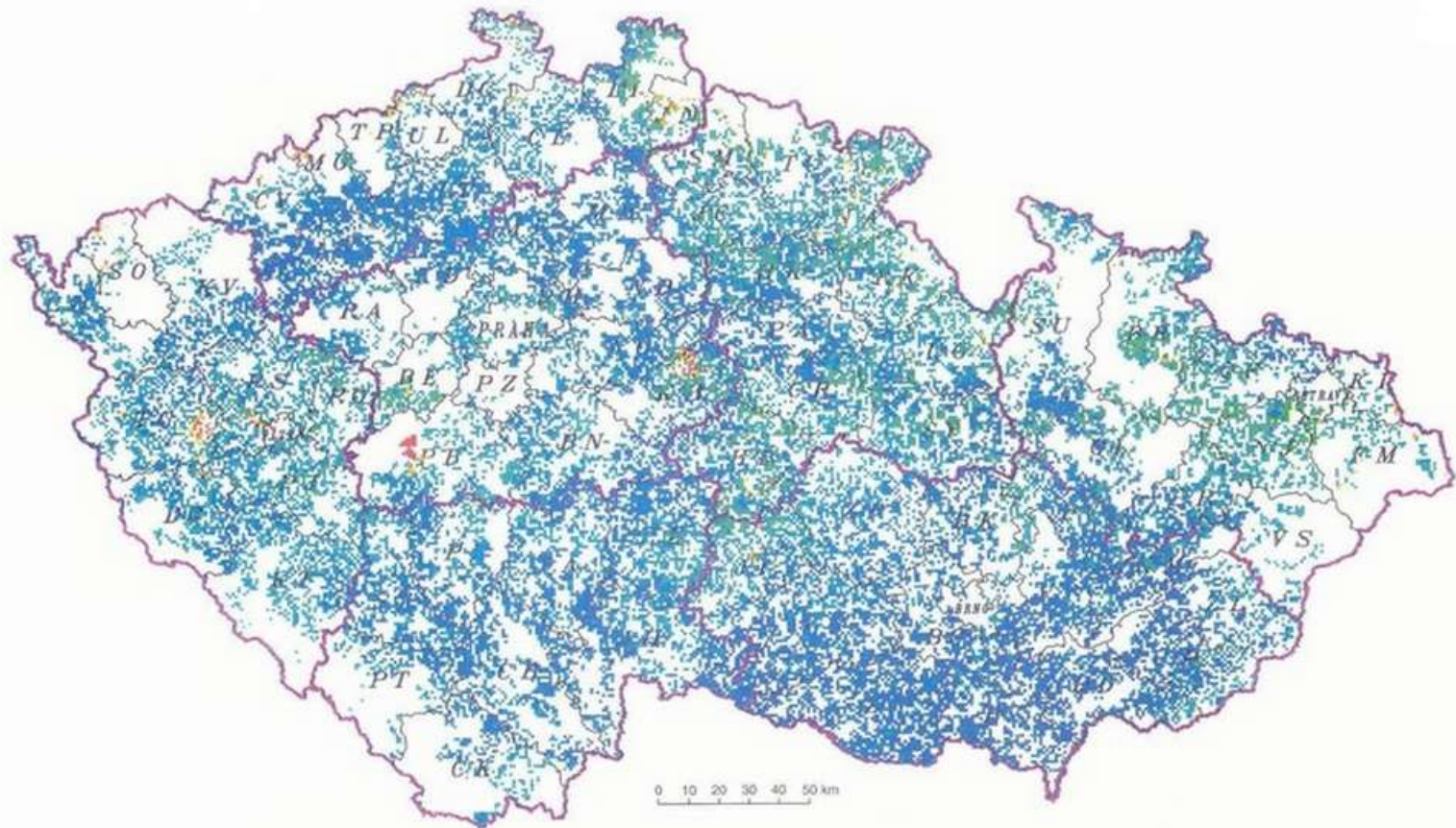
3. netoxické, neesenciální

- o Rb, Cs, Sr, Ti
- o Aktivita člověka vede k narušení normální biogeochemické rovnováhy koncentrováním kovů činnostmi jako např.:
 - Těžba, zpracování a tavení rudy
 - Jaderný a automobilový průmysl
 - Výroba baterií, elektronických součástí atd.



Kovy

Obsah kadmia v zemědělských půdách ČR



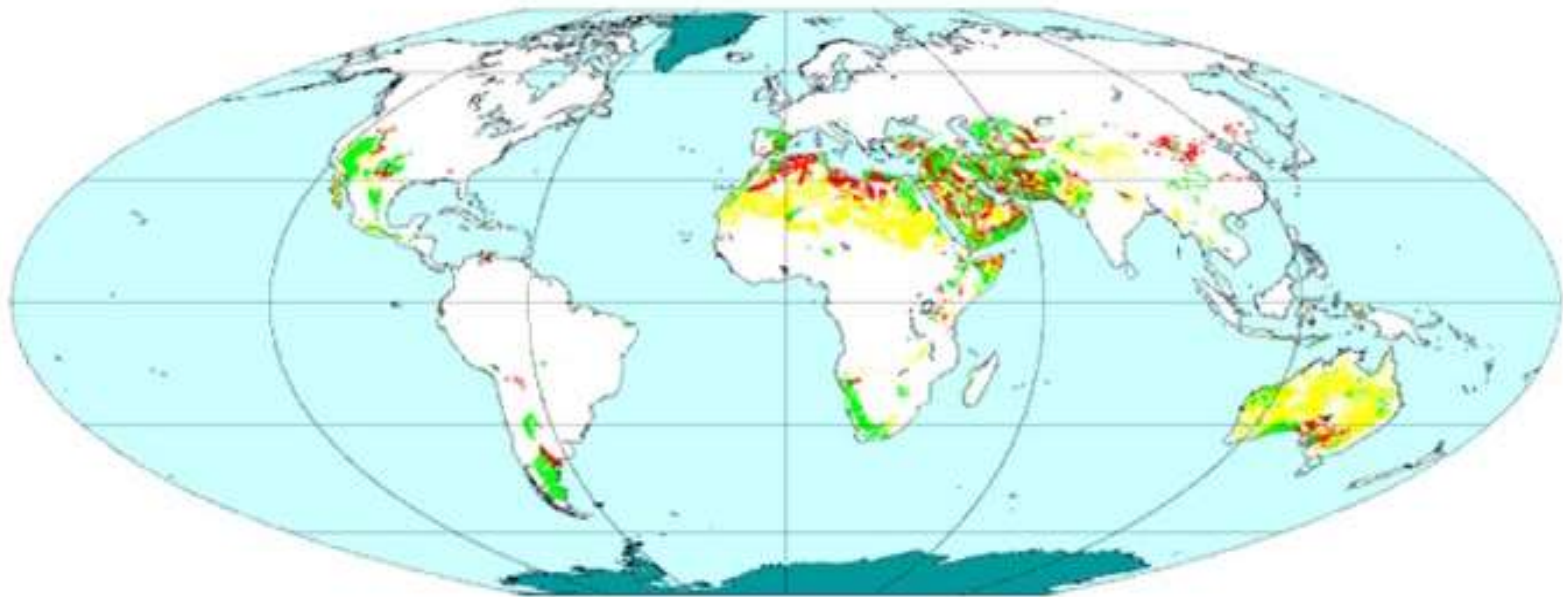
Zasolení zemědělských půd

- o Negativní proces zhoršování půdních vlastností
- o Problém zasolování je často spojován s nadměrným užíváním minerálních hnojiv a agrotechnikou
- o Akumulace rozpustných solí v půdě či podzemní vodě
- o Při zdvihu podzemních vod a následném vypařování dojde ke krystalizaci solí v půdě a nebo na povrchu v podobě tzv. *výkvětu*
- o Za sucha se půda často rozpadá
- o Zasolování půd se v Evropě týká asi 4 milionu hektarů, přičemž nejvíce je ohrožena Kampánie, údolí řeky Ebro a Uherská nížina
- o Škody způsobené zasolováním se odhadují na 150 až 300 miliard euro ročně



Zasolení zemědělských půd


Distribution of CALCISOLS
Based on WRB and the FAO/Unesco Soil Map of the World



 Dominant

 Associated

 Inclusions

 Miscelanneous lands
(Inland waterbodies, Glaciers, No data)

Flat Polar Quartic Projection

FAO-GIS, February 1998

Metody odstraňování polutantů (remediace)

Fyzikálně-chemické

Bioremediace

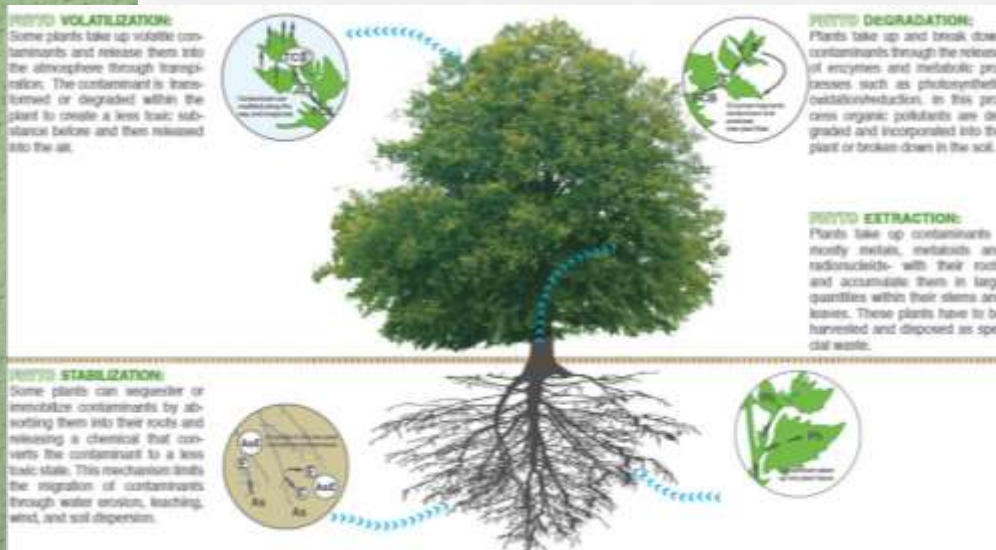
- o Využití živých organismů
- o **Fytoremediace** (užití rostlin)

Metody odstraňování polutantů (remediace)



Photo 2: Experimental phytoremediation crops in Canada (Photo: Environment Canada)

Hyperakumulující a hypertolerantní rostliny



- o Fytoremediace poprvé aplikována v roce 1976 (Jaffre et al., New Caledonian tree *Sebertia acuminata* – Ni)
- o V současnosti známo 450 hyperakumulujících rostlin
 - o Ni: *Brassicaceae* (*Allysum*, *Thlaspi*), *Ephorbiaceae* (*Phyllantus*, *Leucocroton*), *Asteraceae* (*Senecio*, *Pentacalia*)
 - o Zn: *Brassicaceae* (*Thlaspi*)
 - o Cu, Co: *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae*

Geneticky modifikované rostliny

ze stránek Ministerstva životního prostředí ČR

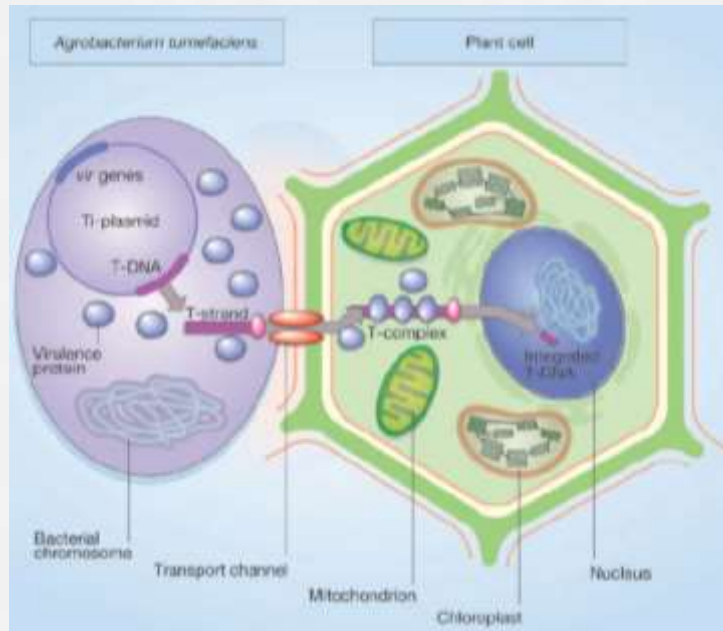
- o GM plodiny
 - I. generace (odolnost - k herbicidům, škůdcům i virovým chorobám)
 - II. generace (změna složení koncového produktu – lepší složení proteinů, olejů, vitamínů)
 - III. generace (uplatnění ve zdravotnictví - jedlé vakcíny, výroba některých kofaktorů, enzymů)

- o „Rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií.“

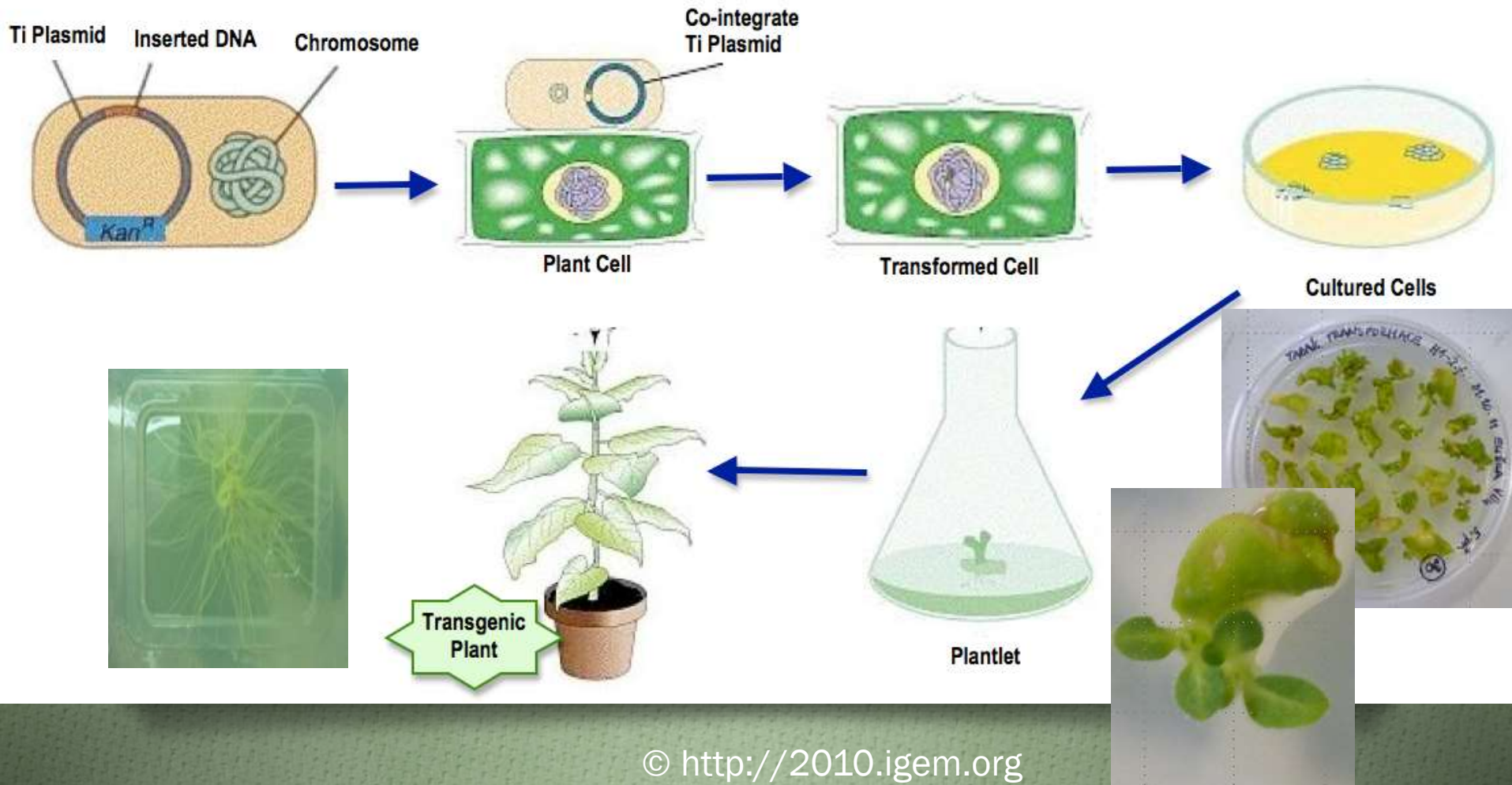
- o „Jedná se o moderní šlechtitelské metody (genové inženýrství) z oblasti biotechnologií, které používají v přírodě probíhající procesy.“

Příprava GM rostlin pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

- Přirozený proces, který probíhá v přírodě
- Bakterie napadá poraněnou rostlinu a vnáší do ní úsek své DNA, podle které rostlina syntetizuje:
 - hormony, které vedou k tvorbě nádoru
 - opiny, které slouží bakterii jako zdroj energie



Příprava transgenních rostlin

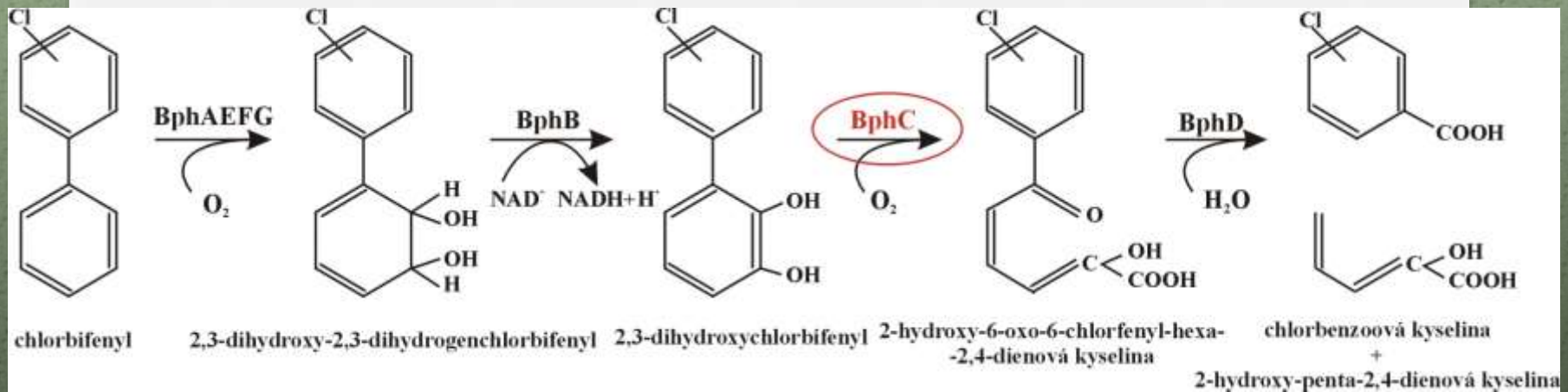


Transgenní rostliny v naší laboratoři určené pro fytoremediace

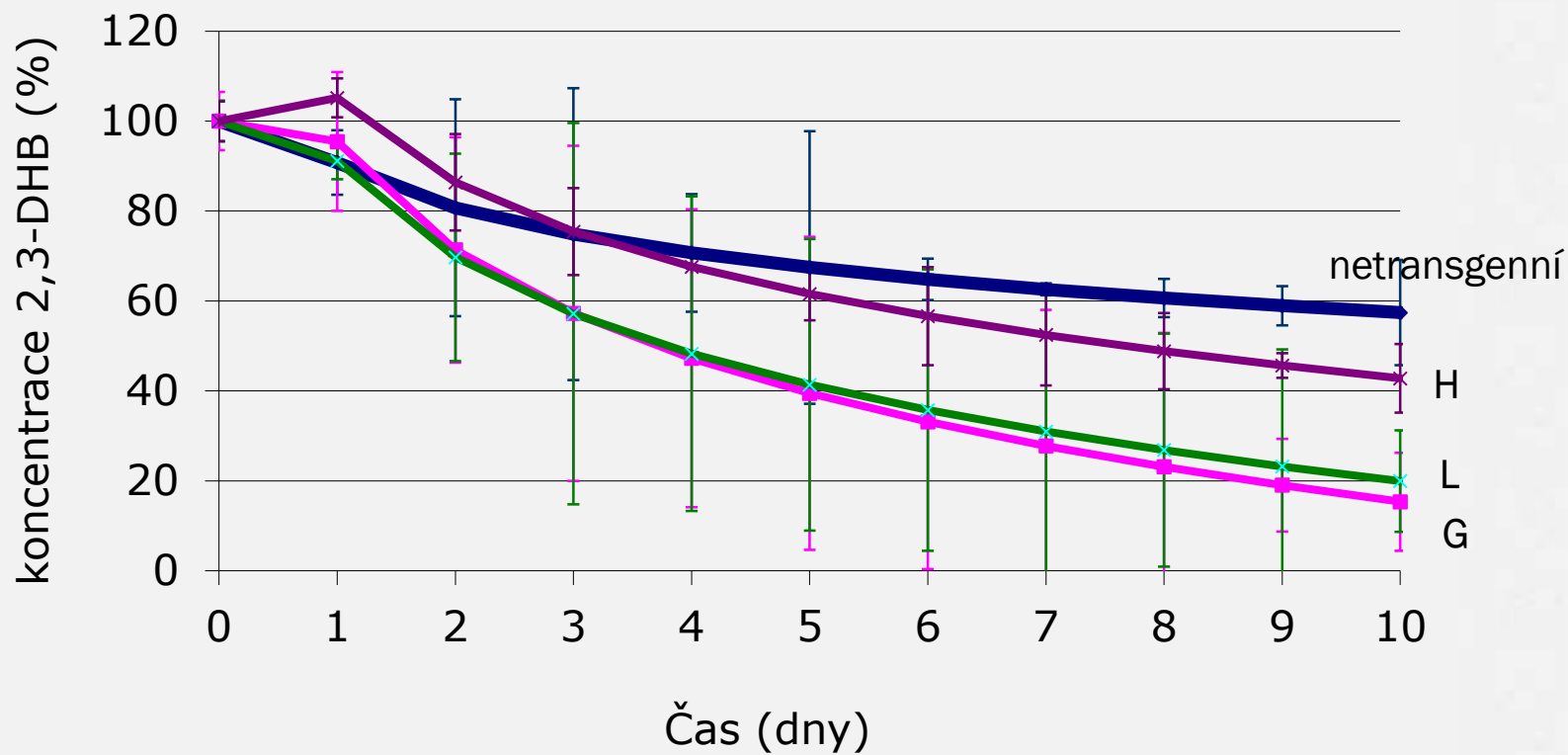
- o Tabák virginský
 - o *N. tabacum/bphC*
 - o *N. tabacum/bphC/HIS-CUP*
 - o *N. tabacum/OSM*
 - o *N. tabacum/.....*
- o Kopřiva dvoudomá
 - o *U. dioica*
- o Len setý

N. tabacum/bphC

- o Gen *bphC* pochází z bakterie *Pandoraea pnomenus* B-356
- o Gen je součástí bifenylového operonu
- o Pro rostliny je z degradační dráhy PCB klíčový krok 1 a 3, přičemž produkt kroku 2 byl v rostlinách již dříve identifikován



N. tabacum/bphC



N. tabacum/bphC/HIS-CUP

- o Gen *CUP* kóduje peptid metalothionein
- o 5-10 kDa, bohaté na cystein
- o Vysoká afinita k Zn, Cd, Cu, Ag a Hg
- o Zdrojový organizmus – kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

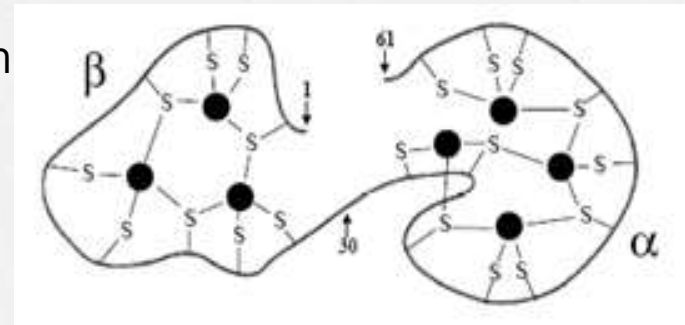
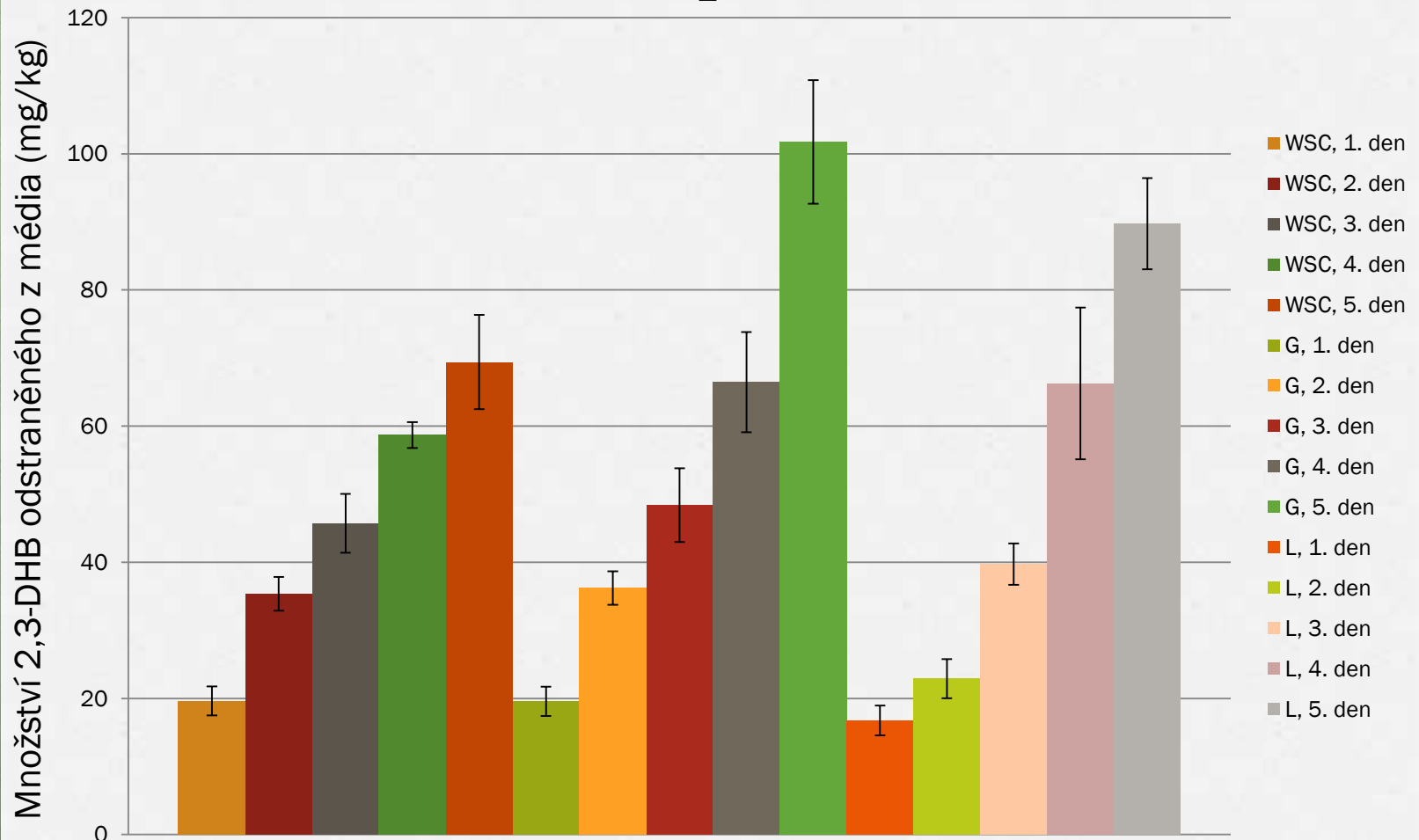
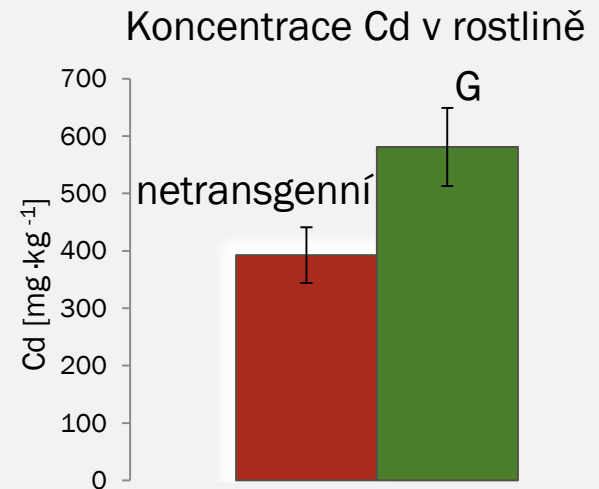
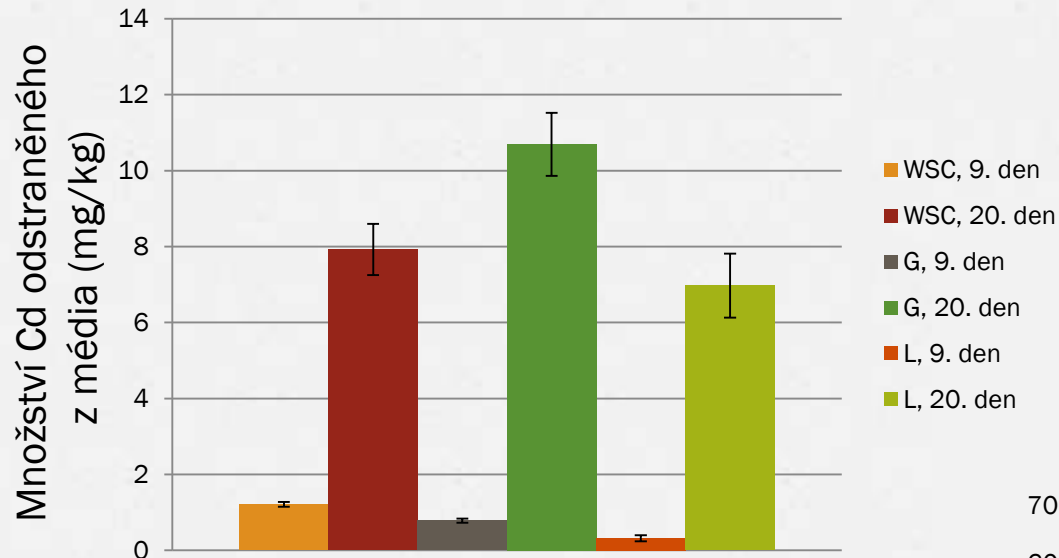


Schéma vazebných domén MT

N. tabacum/bphC/HIS-CUP

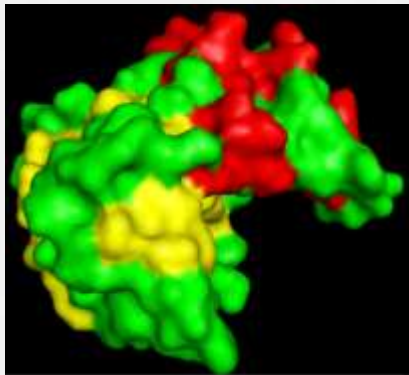


N. tabacum/bphC/HIS-CUP



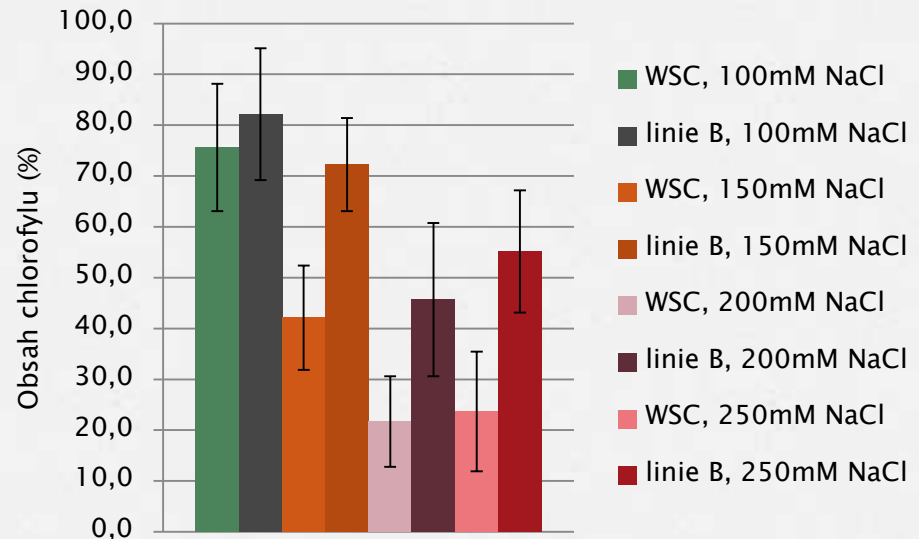
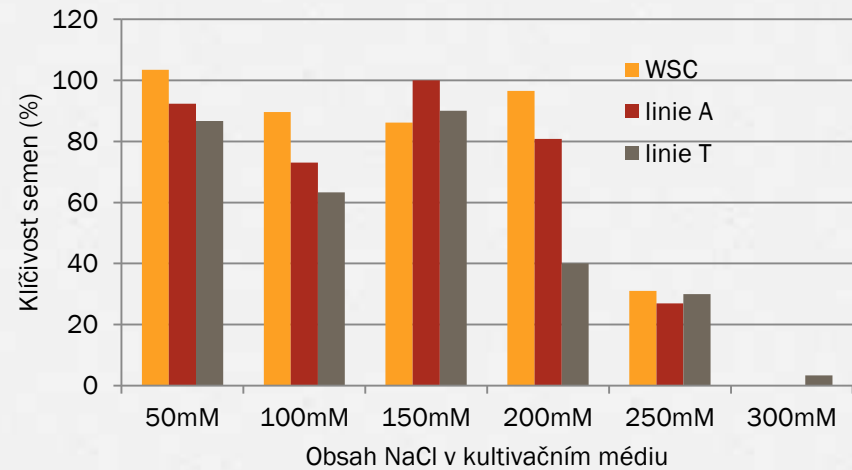
N. tabacum/OSM

- o Objeven a popsán v buňkách *Nicotiana tabacum* adaptovaných na 200mM NaCl
- o Později nalezen i v ostatních rostlinných druzích
- o Kationický protein, 205 aminokyselin, 24 kDa, 8 disulfidových můstků



3D struktura osmotinu
červená – helix, zelená – smyčka, žlutá – β -list

N. tabacum/OSM





U. dioica

- Problémy:

- Obtížný růst ve sterilních podmínkách
- Nízká klíčivost semen
- Pro transformace zcela nový druh

→ Optimalizace složení růstového média

→ Přirozený fytořediační potenciál

→ Transientní exprese

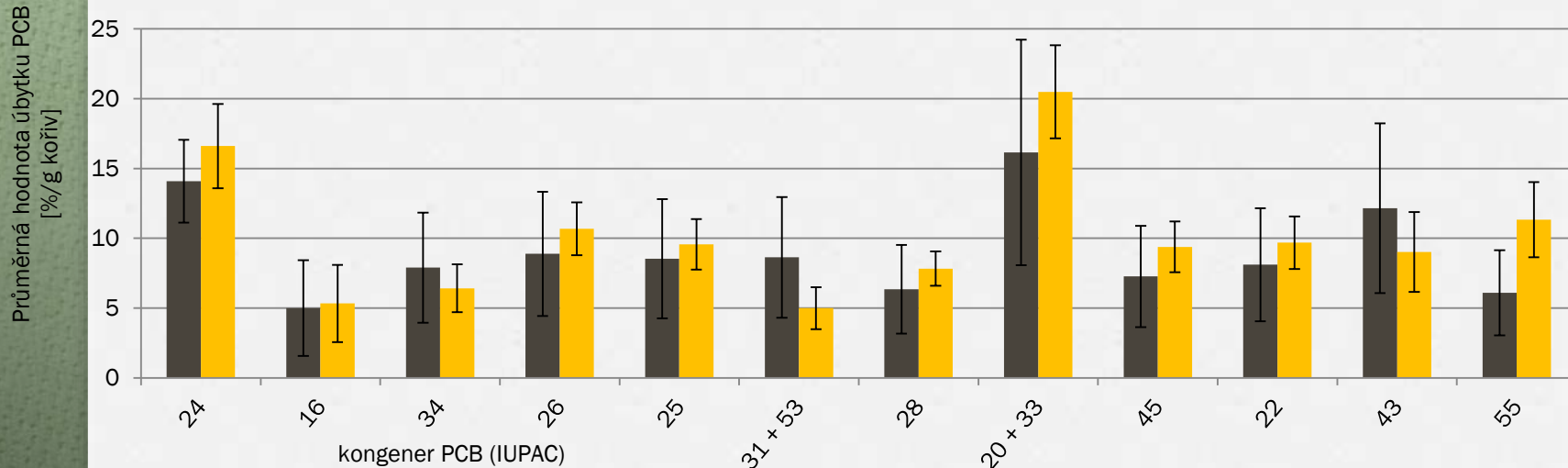
→ Trvalá transformace

U. dioica

Množství kovu v rostlině
Kultivované v Příbramské zemině

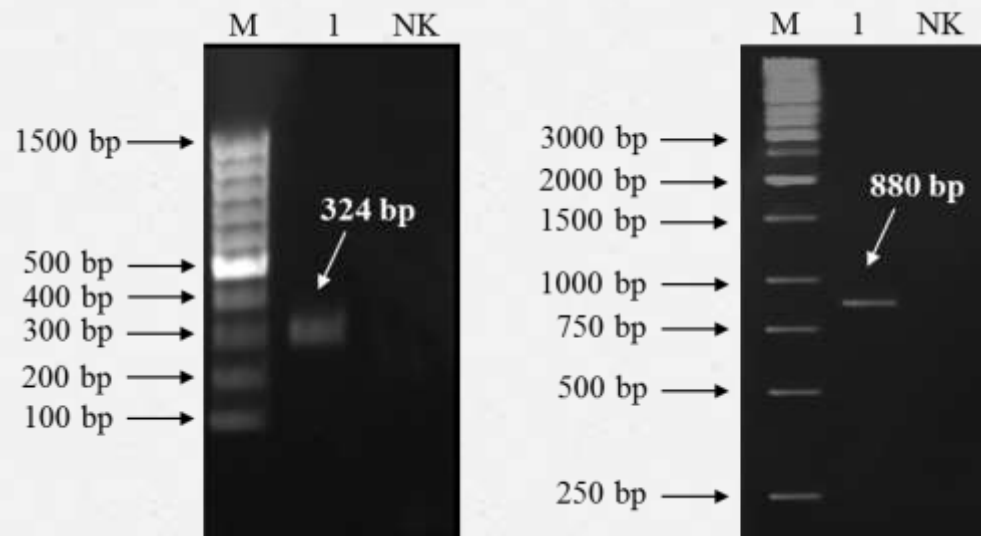
Pb	Stonek	46,2 ± 6,3 mg/kg
	List	13,5 ± 6,1 mg/kg
Zn	Stonek	154,3 ± 18,6 mg/kg
	List	43,8 ± 7,2 mg/kg
Cd	Stonek	0,2 mg/kg

Úbytek PCB způsobený osázením samotné a obohacené Lhenické zeminy



U. dioica/bphC a *His-CUP*

- Dočasná exprese, agrobakteriální infiltrace
- Transgeny *bphC* a *His-CUP* (exprese prokázána na úrovni mRNA)
- Konstitutivní promotor CaMV 35S



Vlevo: amplifikovaná cDNA odpovídající genu *His-CUP* v rostlinách *U. dioica* po transienční expresi

Vpravo: amplifikovaná cDNA odpovídající genu *bphC* v rostlinách *U. dioica* po transienční expresi

Závěry

- Tabák virginský
 - *N. tabacum/bphC* úbytek 2,3-DHB vyšší až o 40 % po 10 dnech kultivace
 - *N. tabacum/bphC/HIS-CUP* úbytek 2,3-DHB vyšší až o 30 mg/kg po 5 dnech kultivace
úbytek Cd vyšší až o 3 mg/kg po 20 dnech kultivace
 - *N. tabacum/OSM* pozorována zvýšená tolerance ke stresu, rostliny klíčí i na 300mM soli
- Kopřiva dvoudomá
 - *U. dioica/bphC* probíhá transformace rostlin

Results: 52,599

(from All Databases)

(Number of results is approximate)

You searched for:

TOPIC: ("transgenic plants") ...[More](#)

Results: 18,928

(from All Databases)

(Number of results is approximate)

You searched for:

TOPIC: (phytoremediation) ...[More](#)

Results: 52,599

(from All Databases)

(Number of results is approximate)

You searched for:

TOPIC: ("transgenic plants") ...[More](#)

Results: 18,928

(from All Databases)

(Number of results is approximate)

You searched for:

TOPIC: (phytoremediation) ...[More](#)

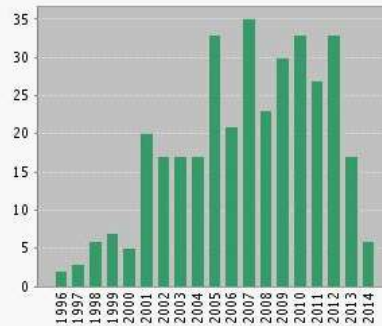
Citation Report: 352

(from All Databases)

You searched for: **TOPIC: ("transgenic plants") AND TOPIC: (phytoremediation)**

This report reflects citations to source items indexed within All Databases.

Published Items in Each Year



The latest 20 years are displayed.

Results: 52,599

(from All Databases)

(Number of results is approximate)

You searched for:

TOPIC: ("transgenic plants") ...[More](#)

Results: 18,928

(from All Databases)

(Number of results is approximate)

You searched for:

TOPIC: (phytoremediation) ...[More](#)

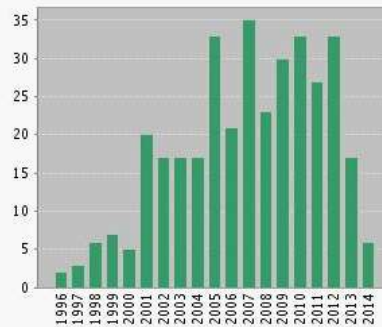
Citation Report: 352

(from All Databases)

You searched for: **TOPIC: ("transgenic plants") AND TOPIC: (phytoremediation)**

This report reflects citations to source items indexed within All Databases.

Published Items in Each Year



The latest 20 years are displayed.

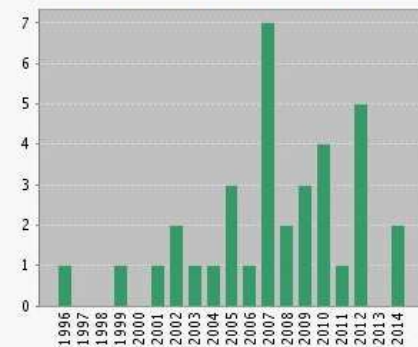
Citation Report: 35

(from All Databases)

You searched for: **TOPIC: ("transgenic plants") AND TOPIC: (phytoremediation)**

This report reflects citations to source items indexed within All Databases.

Published Items in Each Year



Děkuji za pozornost

