

TRANSGENNÍ ROSTLINY – POTENCIÁLNÍ NÁSTROJ PRO DEKONTAMINACI POLUTANTŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEŘINA FRANČOVÁ^a, TOMÁŠ MACEK^b,
KATEŘINA DEMNEROVÁ^a
a MARTINA MACKOVÁ^a

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6, ^bÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 1. VIII.2001

Klíčová slova: transgenní rostliny, fytoremediace, *Agrobacterium*, těžké kovy, PCB

Obsah

1. Co jsou transgenní rostliny a jakým způsobem je lze připravit
 - 1.1. Metody přípravy transgenních rostlin
 - 1.1.1. Transformace rostlinných buněk pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*
 - 1.1.2. Další metody využívané v rostlinné genetice
 2. Směry využití transgenních rostlin
 - 2.1. Zemědělství a potravinářství
 - 2.2. Produkce farmaceuticky významných látek
 - 2.3. Příprava transgenních rostlin pro účely fytoremediace
 - 2.3.1. Fytoremediace prostředí znečištěného rtuť
 - 2.3.2. Zvýšená akumulace těžkých kovů
 - 2.3.3. Biodegradace výbušnin
 - 2.3.4. Využití cytochromu P450 pro bioremediace
 3. Výhody a nevýhody použití GMO
 4. Závěr

1. Co jsou transgenní rostliny a jakým způsobem je lze připravit

Transgenní rostliny využívané v praxi jsou v dnešní době především zemědělské plodiny se zvýšenou rezistencí k hmyzím škůdcům, virovým infekcím, nebo herbicidům¹. Dále jsou to takové rostliny, které jsou zdrojem potravin s vyšší nutriční hodnotou (složení a obsah nenasycených mastných kyselin, vitaminů), rostliny odolnější vůči extrémním povětrnostním podmínkám, nebo s upravenou schopností dozrávání. Kromě těchto výhod, uplatňovaných hlavně v zemědělské produkci (pšenice, kukuřice, sója, řepka olejná, bavlna atd.), byly připraveny také geneticky modifikované (GM) rostliny, které jsou schopné produkovat farmaceuticky významné látky (protilátky), enzymy atd.². Na začátku 90. let se technologie transgenních rostlin posunula k novému odvětví. Je to využití rost-

lin jako heterologních expresních systémů, mj. pro antigeny savčích patogenů. Od té doby byly různé lékařsky významné antigeny exprimovány v transgenních rostlinách, jako např. povrchový antigen hepatitidy B (cit.²), králičí virový glykoprotein³.

Jak je patrné z předchozího odstavce, jsou genové manipulace v rostlinné biotechnologii stále více využívány. Různé transgeny mají vliv na kvalitu úrody, geny regulují dozrávání, složení tuků a kvalitu proteinů v semenech. Výzkum tkáňové specifických promotorů dovoluje genovému inženýrství vytvořit nové kategorie transgenních rostlin tvořících žádané produkty⁴.

Neméně důležité a v literatuře stále častěji diskutované je využití transgenních rostlin k odstraňování kontaminantů ze životního prostředí a využití transgenních rostlin se zvýšenou schopností akumulace nebo přeměny látek znečišťujících životní prostředí⁵.

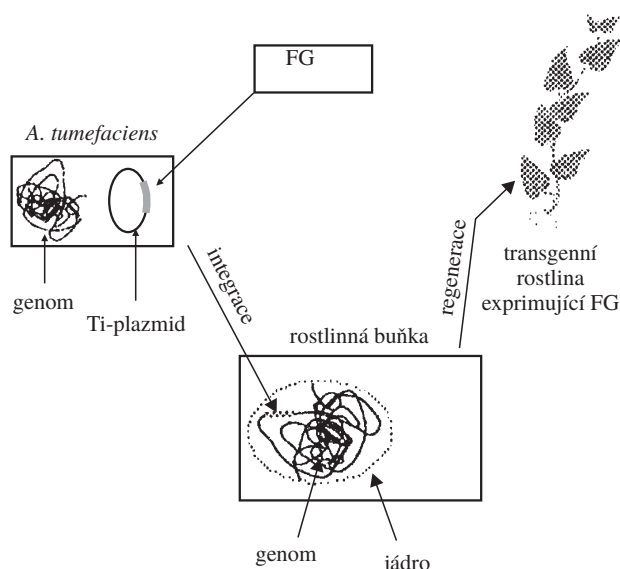
V nedávné době vyvolalo stále se rozšiřující využití transgenních rostlin velké diskuse. Jde hlavně o zemědělské plodiny, kultivované ve velkém měřítku jako suroviny pro lidskou výživu. Tyto obavy způsobily i větší pozornost politiků a např. v naší republice iniciovaly přípravu a schválení zákona O nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty, který platí od 1.1.2001.

Většina argumentů proti použití GMO, především některých aktivistů hnutí Greenpeace, Děti Země atd., je nepodložená a lze je i vědecky vyvrátit. Avšak na druhé straně je bezesporu nutná obezřetnost při manipulaci, kultivaci a využívání geneticky modifikovaných organismů a je nezbytné dokonalé ověřování rizika spojeného s uváděním těchto surovin do životního prostředí či přímo na trh. Výroba potravin je předmětem novely zákona o potravinách schválené v roce 2000 a novelizované vyhlášky 24/2001 čl. 7 Sb., která platí od 1.6.2001 s výjimkou paragrafu týkajícího se povinnosti značit geneticky modifikované potraviny s obsahem transgenní DNA 1 % a výše (bude platit od 1.1.2002). Kontrolu zajišťují stále se rozvíjející a zdokonalující detekční metody pro přítomnost transgenů.

1.1. Metody přípravy transgenních rostlin

Revoluci v rostlinné biotechnologii způsobily především dva významné objevy. Nejprve to bylo objevení unikátní schopnosti jednotlivých rostlinných buněk regenerovat a vytvořit celou rostlinu. Neméně důležitý byl objev zatím nejvhodnějšího vektoru pro přenos genů, což je Ti plazmid, který se vyskytuje v půdních bakteriích *Agrobacterium tumefaciens*, resp. Ri plazmid v *A. rhizogenes*.

Využití agrobakteriálního přenosu je jednou z hlavních technik využívaných v současnosti pro vnesení požadovaných genů do rostlinného genomu⁶. Tato technika je poměrně široce rozšířená, má však několik limitujících faktorů, které omezují v některých případech její použití. Agrobakteriálních plazmidů jako vektoru se používá především pro dvouděložné rostliny, ale jsou již známé i případy jejich aplikace na jednoděložné rostliny (chřest, kukuřice, rýže, pšenice)⁷. Další tech-



Obr. 1. Schéma přenosu cizorodého genu (FG) pomocí *A. tumefaciens* do rostlinné buňky

nikou využívající „přirozený“ přenos je využití virálních vektorů, které však vede k přechodné, nikoli stabilní transformaci.

V případech, kdy nelze použít výše zmíněné techniky, nastupují další metody přenosu. Některé se rozvinuly až po objevu technik, které umožňují regeneraci celých rostlin z kalusu nebo z jediného protoplastu. Jsou to techniky, které využívají přímý přenos DNA⁸, elektroporaci, vakuovou infiltraci DNA, různé chemické úpravy, mikroinjekci, nebo balistické metody⁹.

1.1.1. Transformace rostlinných buněk pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*

Tato metoda přenosu genetické informace do rostlinných buněk je založena na přirozené vlastnosti bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a *A. rhizogenes* napadat vyšší rostliny, vnášet do nich své specifické geny, lokalizované do části velkého plazmidu, označovaného Ti (tumour inducing) nebo Ri (root inducing)⁷, a indukovat morfologické změny těchto napadených rostlin. Přenášená část Ti a Ri plazmidů se nazývá T-DNA (transferred DNA). Plazmid Ti má obvykle délku v rozmezí 150 000–200 000 párů bází, což je asi 3 % délky chromosomu *A. tumefaciens*. Ti plazmid obsahuje dva hlavní úseky:

- T-DNA, která do rostlinných buněk vstupuje, ale sama nemá žádné geny pro vlastní integraci,
- úsek virulence, který obsahuje geny nutné pro funkce podmiňující přenos T-DNA do rostlinných buněk a jejich integraci do rostlinného genomu.

Pro funkci plazmidu v bakteriálních buňkách a pro interakci mezi bakteriemi a rostlinnými buňkami jsou nutné i další úseky genomu, částečně lokalizované též v bakteriálním chromosomu.

T-DNA obohacuje rostlinný genom o dvě základní skupiny genů⁷:

- Geny pro biosyntézu rostlinných hormonů, auxinů a cy-

tokininů. Ty způsobují dediferenciaci rostlinných buněk a jejich růst jako nediferencované nádory, případně kořinky typu „hairy root“.

- Geny pro syntézu nádorově specifických látek, tzv. opinů. Opiny slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie pro typ bakterie, který transformaci indukoval. Přenos T-DNA z plazmidu Ti do jednoho z chromosomů rostlinného buňčného jádra je zachycen na obr. 1.

K současným genetickým manipulacím se ovšem nevyužívá přírodní divoký kmen agrobakteria, nýbrž kmeny s modifikovanými Ti plazmidy. Byly odstraněny geny pro rostlinné hormony, jež byly příčinou vzniku tumoru, a geny pro tvorbu opinů, které jsou v těchto případech zbytečné. Současně byly do původní T-DNA vneseny geny, sloužící jako selekční markery. Mezi nejvíce využívané markerové geny patří bakteriální β -glukuronidasový (GUS), luciferasový a v poslední době též gen kódující „green fluorescent protein“ (GFP). Vzhledem k tomu, že přírodní Ti plazmid je příliš veliký, což způsobovalo problémy při práci, byla T-DNA s hraničními sekvencemi vnesena do menších plazmidů odvozených od *pBR 322*, nyní již běžně komerčně dostupných. V oblasti T-DNA těchto nově připravených plazmidů existují unikátní restrikční místa, do kterých můžeme vložit připravený konstrukt určený k přenosu do rostlinného genomu.

Genetický konstrukt, který chceme vnést, musí obsahovat promotor (např. nejčastěji používaný konstitutivní promotor z viru kvěťákové mozaiky CaMV 35S, promotor řídicí expresi ubiquinonu u kukuřice, či jiné orgánově a pletivově specifické promotory fungující v rostlině), sekvenci kódující požadovaný gen a terminační signál. V současné době se výzkum soustřeďuje na nalezení dalších promotorů indukovaných např. vlivy životního prostředí (těžké kovy apod.).

1.1.2. Další metody využívané v rostlinné genetice

Protoplasty jsou vhodné pro genové manipulace, neboť u nich může za specifických podmínek dojít k fúzi buněk blízkých, ale i zcela odlišných rostlinných druhů za vzniku somatických hybridů. Protoplasty můžeme získat z rostlinných pletiv nebo z kalusových a suspenzních kultur¹⁰. Po fúzi a přenesení protoplastů na živné médium, které musí obsahovat cytokininy a auxiny ve vhodném poměru pro tvorbu a vývoj kalusového pletiva, k němuž dochází zhruba po pěti až deseti dnech po tvorbě nové buněčné stěny a začátku buněčného dělení, dochází k diferenciaci buněk a vzniku embrya. Toto embryo se může vyvinout v plně funkční rostlinu se změněným genetickým vybavením.

Další vhodné metody jsou tzv. balistické metody, které umožňují přenášet geny do buněk i do celých neporušených rostlin. Tyto metody jsou založeny na využití urychlených částic těžkých kovů (zlatých nebo wolframových) pokrytých genetickým materiálem⁹. Jsou to poměrně nové metody a nacházejí uplatnění především u těch rostlinných druhů, u nichž selhaly metody využívající agrobakteria. S úspěchem lze tyto metody využít i pro další aplikace, včetně přímé transformace genomu organel či rychlého vpravení genetické informace do buněk bez porušení tkání a pletiv, např. do růstového meristému.

Další známou metodou přenosu DNA je mikroinjekce, při níž je DNA vpravována do buněk pod mikroskopickou kontrolou¹¹. DNA může být umístěna do konkrétních subcelulár-

ních částí jednotlivých protoplastů, do izolovaných buněk nebo také do jednotlivých buněk ve vícebuněčných strukturních. Tato metoda je neúčinnější (účinnost až v desítkách procent) a je použitelná i s rostlinnými pletivy⁷. Během jednoho pokusu lze však ovlivnit jen malé množství buněk.

Většina pracovišť dává z výše uvedených postupů přednost agrobakteriální transformaci (vysoká efektivita, nízký počet kopií, intaktní transgeny) a balistickým metodám (možnost transformace bez ohledu na rostlinný druh).

2. Směry využití transgenních rostlin

2.1. Zemědělství a potravinářství

Jak bylo již výše uvedeno, zatím nejširší využití i přes rozporuplné názory laické veřejnosti našly transgenní rostliny v zemědělství a následně i v potravinářství.

Jako největší problém, jenž by mohl být širším využitím transgenních rostlin vyřešen, se jeví stále se zvyšující potřeba množství potravin. Nedávný průzkum časopisu *The Economist* (březen 2000) ukazuje, že světová populace vzrostla za posledních 40 let o 90 %, zatímco produkce potravin vzrostla jen o 25 %. Dalším problémem jsou každoroční ztráty po napadení hmyzem nebo jinými škůdci (ztráty až 40 % úrody), přičemž množství používaných chemikálií, ať už pesticidů, insekticidů nebo herbicidů, není z ekologického hlediska možné neustále zvyšovat.

Hlavním cílem genetické modifikace je zasáhnout do rostlinného genomu tak, aby došlo k vytvoření organismů rezistentních k herbicidům, odolných vůči škůdcům, bakteriálním, plísňovým a virovým infekcím, extrémním podmínkám, nebo ke zvýšení nutriční hodnoty potravin.

V praxi zatím nejvýznamnější aplikaci představuje vnášení odolnosti vůči herbicidům a hmyzím škůdcům. V USA byly uvedeny na trh sója (*Roundup Ready*), bavlník a řepka olejná rezistentní k herbicidu glyfosatu a od roku 1996 jejich podíl na celkové výměře výrazně vzrostl. Velkou část rostlinných geneticky modifikovaných organismů (GMO) tvoří odrůdy odolné vůči hmyzu. Tyto rostliny obsahují ve svém genomu geny pro toxiny pocházející z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Dříve byly extrakty této bakterie používány ve formě postřiků, což mnohdy nemělo předpokládaný efekt. Získané zkušenosti vedly ke konstrukci GMO obsahujících geny kódující vznik toxinu, tzv. bt toxinu, schopných odolávat napadení hmyzími škůdci (např. kukuřice, tabák).

V současnosti jsou schválené, kultivované a distribuované na trh některé GM rostliny, viz tab. I.

Zajímavým příkladem GMO jsou transgenní rajčata. Genom rajčat byl upraven tak, že dochází k opožděnému zrání a delší trvanlivosti.

Existují dva typy těchto transgenních rajčat. První typ jsou tzv. rajčata „flavr savr“^{7,12}. Ta obsahují transgen, který inhibuje nebo alespoň tlumí (ko-supresorem) funkci genu pro tvorbu enzymu polygalakturonasy (PG), který katalyzuje hydrolyzu α -1,4 vazby polygalakturonové kyseliny, vyskytující se jako složka buněčných stěn v oplodí rajčat¹³. PG je syntetizována během zrání a svým rozkladem pektinu ve střední lamelle buněčné stěny plodu způsobuje měknutí rajčat. U plodů transgenních rostlin se silně redukovanou aktivitou PG (pod 10 %) došlo k několika změnám vlastností. Plody byly podstatně

větší, méně napadány bakteriálními a houbovými chorobami, šťáva měla hustší konzistenci, větší viskozitu a více sušiny. Jinak se ale, proti původnímu předpokladu, příliš nezměnila jejich tendence k měknutí.

Druhým typem jsou rajčata, do jejichž genomu byl vnesen transgen, který zamezuje expresi rostlinného genu pro syntézu ethylenu, plyného rostlinného hormonu, jenž spouští kromě jiného kaskádu procesů vedoucí ke zrání plodů.

Modifikovaná kukuřice, rezistentní k herbicidu fosfinothricinu a hmyzu, obsahuje oproti klasickým odrůdám navíc tři geny. Transformací přímou metodou s využitím protoplastů byly vneseny do rostlinného chromosomu:

- geny pro rezistenci k herbicidu fosfinothricinu (obchodní názvy: Basta, Liberty, Finale, Radicale). Je to nový typ herbicidu, který způsobuje blokaci enzymu glutaminsynthetasy, klíčového enzymu metabolismu dusíku,
- gen pro δ -endotoxin z *Bacillus thuringiensis*, čímž je zajištěna odolnost proti hmyzím škůdcům,
- gen pro β -laktamasu, podmiňující rezistenci k ampicilinu. Tento gen umožňuje selektovat modifikované rostliny.

Tabulka I

Příklady geneticky modifikovaných rostlin již používaných v zemědělské velkovýrobě a jejich vlastnosti

GM rostlina	Vlastnost
Sója	zvýšená produkce olejové kyseliny, rezistentní vůči hmyzím škůdcům a herbicidům
Kukuřice	rezistentní vůči hmyzím škůdcům a herbicidům
Papaya	rezistentní vůči virům
Brambory	rezistentní vůči hmyzím škůdcům
Bavlna	rezistentní vůči hmyzím škůdcům
Řepka	rezistentní vůči herbicidům, zvýšené množství laurové kyseliny
Rajče	opožděné dozrávání

2.2. Produkce farmaceuticky významných látek

Oblast přípravy farmaceuticky významných látek zatím nevyvolává zdaleka takovou pozornost a negativní kritiku laické veřejnosti jako využití GMO v zemědělství. Je to pravděpodobně způsobeno hlavně tím, že studie vedoucí k získání takových GMO jsou zatím prováděny v laboratorním, maximálně poloprovodním měřítku. V první řadě se jedná o syntézu antigenů savčích patogenů, které by po konzumaci příslušné rostliny mohly vyvolat imunitní reakci a fungovat jako vakcíny. Kromě toho byla ověřována exprese imunoglobulinů, nebo jejich fragmentů¹⁴. V transgenních bramborách se podařilo exprimovat a ověřit funkčnost (u myší) vakcíny pro hepatitidu B (povrchový antigen), posléze byla stejná vakcína exprimována v tabáku. Kromě toho byly popsány např. exprese enterotoxinu (LT-B) z *E. coli*, nebo kapsidového proteinu Norwalk viru, glykoprotein B cytomegaloviru, podjednotka B toxinu cholery a některé další¹⁵.

2.3. Příprava transgenních rostlin pro účely fytořemediace

V posledním století průmyslová výroba, těžební průmysl a různé městské aktivity způsobily rozsáhlou kontaminaci půdy. Jednou z možností odstranění kontaminantů z půdy jsou fyzikálně-chemické postupy. Tyto techniky jsou ovšem ekonomicky náročné a většinou poškozují životní prostředí. Proto se v současné době výzkum orientuje na použití biologických metod. Jednou z nich je fytořemediace. Fytořemediace je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci a odstranění polutantů ze životního prostředí nebo zmírnění jejich škodlivého šíření¹⁶. Je to technologie, která může být uplatněna při odstraňování anorganických i organických polutantů přítomných v půdě, vodě a ve vzduchu¹⁷. V roce 1999 představovalo uplatnění fytořemediálních postupů tržní hodnotu vyčíslenou na 35 milionů amerických dolarů. Předpokládá se, že tato hodnota se během 5-ti let zvýší desetinásobně.

Je obecně platné, že fytořemediace je nejlépe využitelná na velkých plochách, kde kontaminace dosahuje maximálně do hloubky 5-ti metrů. Podle různých způsobů uplatnění se fytořemediace obecně dělí do několika oblastí^{16,18}.

Fytoextrakce (někdy nazývána fytoakumulace) je založena na schopnosti rostlin odebírat škodlivé látky z půdy a akumulovat je v nadzemních částech. Tato metoda je většinou spojována s odstraňováním těžkých kovů. Většina rostlin je schopna akumulovat těžké kovy přítomné v půdě nebo ve vodě. Rostliny obsahující těžké kovy jsou nakonec sklizeny, zpopelněny a uloženy na určitých místech, nebo se dále využijí ke znovuzískání kovů.

Fyotransformace je využití rostlin k přeměně organických polutantů.

Fyostimulace představuje stimulaci mikrobiální degradace působením rostlinných exsudátů.

Rhizofiltrace je využití rostlinných kořenů k absorpci nebo adsorpci polutantů, především kovů, ze spodních vod. Z mnoha testovaných rostlin se jako jedny z nejúčinnějších ukázaly hydroponicky pěstované slunečnice, které byly využity k odstranění radionuklidů z povrchové vody v okolí Černobylu¹⁹.

Fyostabilizace je metoda, kdy pomocí rostlin dochází k redukci dosažitelnosti a rozšiřování polutantů v životním prostředí.

Fyovolatilizace je příjem a převedení některých polutantů do plynné fáze pomocí rostlin.

Užití rostlin k odstranění polutantů ze vzduchu – představuje schopnost rostlin akumulovat, případně metabolizovat toxické látky ze vzduchu.

Předmětem základního výzkumu je určit, které rostliny se nejvíce hodí pro fytořemediace. Ne všechny druhy rostlin jsou schopné metabolizovat nebo akumulovat polutanty. Požadavkem na rostliny odstraňující těžké kovy je, aby rychle rostly v kontaminovaném prostředí, byly pokud možno rezistentní, akumulovaly toxické kovy a převáděly kationty nebo oxyanionty do sklíditelných (nadzemních) částí, nebo je přeměňovaly na méně toxické formy²⁰. Výhodné jsou také rostliny, které jsou schopné odstraňovat více než jeden polutant, protože znečištění nebývá většinou pouze jednou sloučeninou.

Při remediaci organických polutantů je žádoucí, aby je rostliny zcela mineralizovaly na netoxické produkty.

Je zřejmé, že polutanty mohou být odstraněny díky řadě biofyzikálních a biochemických procesů, sorpci, transportu

a translokaci, akumulaci nebo transformaci. Mnoho elementárních polutantů vstupuje do rostlin prostřednictvím základních transportních systémů určených pro transport živin. Řada xenobiotik je následně ukládána do vakuol jako ochrana proti toxickému působení. Zejména při akumulaci těžkých kovů, ale i odstraňování organických sloučenin je hlavním limitujícím faktorem použití rostlin dlouhá doba potřebná k dekontaminaci půdy. Proto je v současnosti uplatňována snaha šlechtěním či genovými manipulacemi získat rostliny upravené na míru požadavkům fytořemediace. V nedávné době se již objevily v odborné literatuře zmínky o možnosti zvýšení exprese existujících genů, nebo vnesení bakteriálních nebo savčích genů do rostlin, jejichž exprese by zajistila zvýšení přirozených reakcí a schopností rostlin. Zatím použití geneticky modifikovaných rostlin pro tento účel nebylo realizováno v praxi v širším měřítku, přesto je to však pouze otázka času, kdy dojde i k polním pokusům.

V tabulce II jsou uvedeny příklady transgenů a transgenních rostlin, které byly dosud připraveny pro zvýšení akumulace, rezistence a transportu některých anorganických polutantů. V tabulce III jsou pak dokumentovány příklady transgenních rostlin se zvýšenou schopností transformace organických polutantů.

Samotná exprese příslušných transgenů v rostlině a její zvýšená účinnost v praktickém měřítku pro fytořemediace znečištěných ploch nebyla zatím ověřována a pokusy, jež měly ukázat chování rostlin s „vylepšenými vlastnostmi“, byly většinou prováděny v laboratorním měřítku, kdy rostliny rostly na agaru nebo hydroponicky (viz tab. II, III). Na kontaminované půdě bylo testováno jen několik transgenních rostlin^{22,23,25}.

2.3.1. Fytořemediace prostředí znečištěného rtuť

V dřívějších dobách byla v chemickém, papírenském a těžebním průmyslu hojně využívána rtuť. Vzhledem k nedostatku znalostí o toxicitě rtuť a potenciálním dopadu na životní prostředí, docházelo k vypouštění odpadních vod do blízkých vodních zdrojů. To způsobilo dvě rozsáhlé otravy lidí v Japonsku v 60-tých letech. Klinické výzkumy ukazují, že organické deriváty, jako např. kation methylrtuti (CH_3Hg^+), jsou základní formy rtuť, které se akumulují v rybách a v jejich konzumentech a způsobují neurodegenerativní symptomy²⁶.

Methylrtuť je vzácnější odpadní produkt, ale může být produktem mikrobiální konverze anorganické rtuť. Kation CH_3Hg^+ je v sedimentech méně pevně vázán v komplexech s organickými a anorganickými ligandy než sůl dvojmočné rtuť Hg(II) , a proto je více biologicky dostupný²⁷. Kromě toho je více rozpustný v lipidech, což ještě umocňuje jeho toxicitu.

Vzhledem k vysoké ceně těžby a skladování nebezpečných sedimentů nebylo doposud remediováno mnoho míst kontaminovaných sloučeninami rtuť.

Gramnegativní bakterie, které rostou v půdě kontaminované rtuť, mají vyvinutou rezistenci ke rtuť, která je geneticky kódována *mer* operonem⁵. Ten obsahuje 5 až 6 genů (citlivé regulátorové proteiny, transportní proteiny, organomerkurilyasu a reduktasu rtuť). V rámci tohoto operonu jsou dva geny, *merA* a *merB*, které kódují enzymy katalyzující reakce přeměny rtuť. *MerB* kóduje organomerkurilyasu, která katalyzuje štěpení vazby uhlík–rtuť v mnoha organortuťných sloučeninách, jako je acetát methylrtuť a fenylrtuť.

Tabulka II

Příklady transgenních rostlin se zvýšenou schopností transformovat organické polutanty

Transgen	Produkt	Zdroj	Transgenní rostlina	Účel/efekt	Kultivační medium
<i>PETNred</i> ³¹	pentaerythritol tetranitrát reduktasa	<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	<i>N. tabacum</i>	odbourávání výbušnin, schopnost růstu na některých výbušninách	agar
<i>cyp2E1</i> ³⁰	dehalogenasa cytP450 2E1	savčí	<i>N. tabacum</i>	640-ti násobná oxidace TCE, debrominace EDB	hydroponie
<i>bph C</i> ³³	dihydroxybifenyldioxygenasa	<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>N. tabacum</i>	odbourávání hydroxyderivátů PCB, zvýšení rezistence	agar

Tabulka III

Příklady transgenních rostlin se zvýšenou akumulací, rezistencí nebo zvýšeným transportem těžkých kovů, (převzato a upraveno dle Krämer a Chardonnens²¹)

Transgen	Produkt	Zdroj	Transgenní rostlina	Účel/efekt	Kultivační medium
<i>mer A</i> ⁵	Hg (II) reduktasa	G ⁻ bakterie	<i>Liriodendron tulipifera</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	zvýšená akumulace Hg + vypařování	agar,
<i>mer A</i> <i>mer B</i> ²⁰	Hg (II) reduktasa lyasa	G ⁻ bakterie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	zvýšená tolerance Hg + vypařování	agar, roztok
<i>APS1</i>	ATP sulfurylase	<i>A. thaliana</i>	<i>Brassica juncea</i>	dvojnásobná akumulace Se	hydroponie
<i>MT-I</i>	MT ^a	myš	<i>N. tabacum</i>	20-ti násobná rezistence Cd	agar
<i>CUP1</i>	MT ^a	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. oleracea</i>	16-ti násobná rezistence Cd	hydroponie
<i>HisCUP1</i> ^{22,25}	polyHis-MT ^a	<i>S. cerevisiae</i>	<i>N. tabacum</i>	akumulace Cd 190 %	agar, půda
<i>gsh2</i>	GSH-synthasa	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	akumulace Cd 125 %	hydroponie
<i>gsh 1</i>	γ-Glu-Cys synthasa	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	akumulace Cd 190 %	hydroponie
<i>NtCBP4</i>	kanál pro M ⁺ ^b	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	tolerance Ni, akumulace Pb 200 %	hydroponie
<i>ZAT1</i>	transport Zn	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	zvýšení tolerance Zn	hydroponie
<i>ACC</i> ²³	ACC ^c deaminasa	bakterie	<i>Lycopersicon esculentum</i>	zvýšená rezistence, akumulace Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn	půda
<i>FRO2</i> ²⁴	reduktasa železitého chelátu	<i>A. thaliana</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i> <i>N. tabacum</i>	redukce Fe(III) na Fe (II) na povrchu kořenů	hydroponie

^a MT = metalothionein, ^b M⁺ = kation, ^c ACC = aminocyklopropan-karboxylová kyselina

Produkt této reakce, sůl dvojmocné rtuti Hg(II), je substrátem pro enzym reduktasu iontů rtuti, kódovanou *merA*. Tento enzym je rozpustná NADPH-dependentní, disulfidová oxidoreduktasa obsahující FAD, která katalyzuje redukci Hg(II) na méně toxickou Hg(0) (schéma 1).

Tyto reakce snižují relativní toxicitu kovu a umožňují vypařování ze systému. Ovšem využití bakterií je z hlediska velké plochy neefektivní, a proto byla navržena remediace takto znečištěných půd a sedimentů pomocí geneticky modifikovaných rostlin.

Při jejich přípravě byla prvním krokem exprese *merA* z bakteriálního transposonu Tn21 v rostlinách^{5,28}. Ačkoliv byl použit velmi účinný rostlinný systém, nebyl detegován žádný

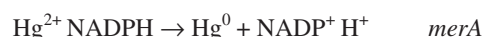
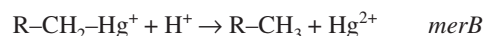


Schéma 1

merA-protein. Původní bakteriální *merA* je GC bohatý (67 %) v porovnání s rostlinnými geny, navíc má *merA* hojnost CpG dinukleotidových sekvencí, které jsou potenciálními místy pro DNA metylaci a následné tlumení genů. Proto Rugh a spol.²⁸ zkonstruovali mutantní *merA* s modifikovaným kódujícím úsekem (*merA9*) a vložili jej do rostliny *Arabidopsis thaliana*. Semena klíčila a sazeničky rostly v médiu obsahujícím až 100 μM rtuti (HgCl₂). Transgenní rostlinky uvolňovaly dva až třikrát více elementární rtuti Hg⁰ než kontrolní rostliny. Rostliny se také ukázaly jako rezistentní k toxické hladině sloučenin obsahujících Au³⁺. K určení efektivity využití transgenních rostlin pro fytoremediace znečištění rtutí byl vybrán žlutý topol (*Liriodendron tulipifera*) pro své žádoucí biologické a strukturální charakteristiky²⁸. Bylo prokázáno, že transgenní topol uvolňuje desetkrát více elementární rtuti Hg⁰ v porovnání s kontrolní rostlinou. Ačkoliv nebyl tento systém testován v polních podmínkách, z výsledků je zřejmé, že genetické inženýrství může zvýšit schopnost rostlin odstraňovat polutanty z půdy. Vzhledem k tomu, že uvolňování rtuti do ovzduší

je z ekologického hlediska nežádoucí, byly připraveny další rostliny, které rtuť akumulují.

2.3.2. Zvýšená akumulace těžkých kovů

V přírodě bylo popsáno několik druhů rostlin s vysokou schopností akumulovat těžké kovy. Tyto tzv. hyperakumulátory jsou schopny hromadit mnohonásobně větší množství kovu než jiné druhy rostoucí ve stejných podmínkách na téže lokalitě. Hyperakumulátory, nalezené většinou v oblastech, kde na povrch vystupuje ruda s vysokým obsahem kovu (např. Kongo, Nová Kaledonie apod.), se však obvykle vyznačují tvorbou malého množství biomasy a zřejmě se nehodí k použití pro fytořemediaci. Mechanismy hyperakumulace nejsou dostatečně prozkoumány, avšak jsou snahy zvýšit účinnost akumulace těžkých kovů u rostlin vytvářejících značné množství biomasy. S tímto cílem byly připraveny transgenní rostliny se zvýšenou tvorbou glutathionsynthasy či fytochelatinsynthasy, což v obou případech vedlo ke zvýšení akumulace Cd (cit.²²), a jsou studovány transgenní rostliny s vnesenými geny pro bílkoviny transportující kovy přes membrány, viz tabulka III. Několik pracovišť vneslo do rostlin geny kódující několik typů metalothioneinů (savčí, kvasničné, hmyzí i humánní), tato snaha vedla však většinou pouze ke zvýšení rezistence vůči některým těžkým kovům^{22,24}, nikoliv ke zvýšení akumulace. Pro zvýšení vazebné kapacity byla studována možnost zavedení další vazebné oblasti s vysokou afinitou k těžkým kovům do implementované bílkoviny, jak popsali Macek a spol.²² Takto byl kombinací genu *CUP1* pro kvasničný metalothionein ze *Saccharomyces cerevisiae* a genu pro histidinovou kotvu z komerčního plazmidu *pTrcHis* (Invitrogene) připraven konstrukt vnesený pomocí *A. tumefaciens* do tabáku²². Srovnání geneticky modifikovaných linií tabáku s kontrolními rostlinami ukázalo zvýšení rezistence a dobrý růst v půdě kontaminované kadmii i výrazné zvýšení akumulace kadmia při kultivaci v hydroponii a v písku s kadmii (190 % kontroly)²⁵.

2.3.3. Biodegradace výbušnin

Dalším aktuálním problémem je znečištění životního prostředí výbušninami. Mezi obvyklé výbušniny řadíme: 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX), oktahydro-1,3,5,7-tetraazocin (HMX) a jejich aminoderiváty²⁹. Studie ukázaly, že rostliny mohou transformovat TNT bez pomoci mikroorganismů. Většina studií se zaměřila právě na TNT, ačkoliv se jen zřídka vyskytuje sám na znečištěných místech.

Některé experimenty se zabývají studiem schopností vodních rostlin *Myriophyllum spicatum*, *Myriophyllum aquaticum* a hairy root kultur *Catharanthus roseus* absorbovat a transformovat TNT²⁹. Bylo prokázáno, že tyto rostliny jsou schopné transformovat TNT rychle a hlavně bez akumulace aminonitrotoluenů nebo azoxy dimérů. Vzhledem k výše uvedenému poznatku se další studie zaměřily na určení času potřebného k transformaci TNT a stanovení jeho vedlejších produktů³⁰. Paralelně dochází ke stanovení kinetických parametrů degradace aminodinitrotoluen (ADNT-2 isomery) na diaminonitrotoluen (DANT-2 isomery) a další produkty, pravděpodobně triaminotoluen (TAT).

French a spol.³¹ studovali degradaci zbytků výbušnin po-

mocí půdních bakterie *Enterobacter cloacae* PB2 a prokázali schopnost této bakterie využít nitráty výbušnin jako pentaerythritoltetranitrát (PETN) a glyceroltrinitrát (GTN) jako jediný zdroj dusíku k růstu. Denitrifikace je účinná díky NADPH-dependentní PETN-reduktase. Studie ukazují, že PETN-reduktasa je schopná degradovat aromatické výbušniny jako 2,4,6-trinitrotoluen, nejdůležitější a trvalý polutant vojenských území. Již delší dobu je známo, že rostlinné buňky mohou denitrifikovat GTN. Předpokládá se, že denitrifikace probíhá glutathion-dependentním mechanismem, podobně jako je tomu u savčích buněk. Transgenní tabák (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi) byl oproti kontrolním rostlinám schopen klíčit a růst v médiu obsahujícím 1 mM GTN nebo 0,05 mM TNT. Přestože nebyly identifikovány produkty redukce TNT PETN reduktasou, je zřejmé, že jsou menšími inhibitory klíčení rostlin než produkty normálního metabolismu TNT v rostlinách (aminodinitrotolueny a diaminodinitrotolueny), které jsou mnohem toxičtější než výchozí látka.

Z výše uvedeného tedy vyplývá možné využití exprese PETN reduktasy v rostlinách k detoxifikaci TNT reziduí. Předpokládá se také, že exprese PETN reduktasy může vést k rezistenci k nitroaromatickým herbicidům, což by mělo nemalý význam pro zemědělství.

2.3.4. Využití cytochromu P450 pro bioremediace

Cytochrom P450 je známý svou schopností podílet se na oxidaci širokého okruhu sloučenin, mezi které patří i xenobiotika³². Cytochrom P450 se nachází v mikroorganismech, stejně tak i v rostlinách a zvířatech, a podílí se zde na mnoha typech chemických transformací, jako například alifatická hydroxylace, epoxidace, dealkylace, dehalogenace a jiné různé mechanismy určené k inaktivaci a detoxifikaci. Mnohé z těchto reakcí jsou klíčem pro bioremediace. Mikrobiální P450 jsou zvláště užitečné pro biodegradace, neboť jsou všudypřítomné a mají silný redukční a oxidační potenciál. Nedávné studie ukázaly schopnost přírodně se vyskytujících P450 degradovat sloučeniny jako atrazin, thiokarbamatové herbicidy a haloalkany.

Byla prokázána schopnost cytochromu P450 IIE1 oxidovat trichlorethylen (TCE), tetrachlormethan (TCM), dibromethylen (DBE) a některé další chlorované sloučeniny³⁰. TCE je oxidován pomocí cytochromu P450 IIE1 na chloral, který je dále metabolizován na trichlorethanol, trichloroctovou kyselinu, popřípadě oxid uhličitý, chloridový ion, a vodu. Tento poznatek vedl k zavedení genu pro cytochrom P450 IIE1 do tabáku a topolů. Pro zajištění aktivity a stability enzymu byly současně s ním vloženy geny pro oxidoreduktasu a cytochrom B5. Tyto tři proteiny tvoří komplex v buněčných mikrosomech. Vytvořené transgenní rostliny budou testovány na zvýšenou schopnost metabolizovat TCE a jiné sloučeniny.

3. Výhody a nevýhody použití GMO

Pro přípravu a využití transgenních rostlin je mnoho důvodů. Jsou to především možnost vyšších výtěžků zemědělských plodin na téže ploše, příprava odrůd odolnějších vůči vnějším poškozením včetně škůdců, zvýšení nutriční hodnoty potravin, produkce nových látek (monoklonální protilátky, vakcíny, enzymy, inzulin) a obnovení půdního fondu znečiš-

těného cizorodými látkami. Odstranění znečištění je podmínkou pro zabránění vstupu toxických látek do potravních řetězců, což přispívá k zachování zdraví člověka a biologické diverzity. Z tohoto přehledu je zřejmé, že transgenní rostliny našly uplatnění v praxi a své přívržence. Jako nevýhody jsou oponenty GMO uváděny především tyto:

- 1) Vzhledem ke složitosti rostlinného genomu nelze odhadnout všechny změny a jejich důsledky,
- 2) Možnost horizontálního přenosu a vznik plevelných rostlin odolných vůči hmyzím škůdcům a virům,
- 3) Nutnost používání stále většího množství herbicidů díky vzniku nových odrůd rostlin rezistentních vůči obvyklým herbicidům,
- 4) Vznik alergických reakcí na produkty GMO,
- 5) Nahrazení bohaté místní flóry monokulturami – ztráta biodiverzity,
- 6) Vyvolání nežádoucí rezistence k antibiotikům u lidí, zvířat, eventuálně mikroorganismů,
- 7) Snaha firem produkujících GMO prosadit své zájmy přes negativní efekty, které by se zavedením GMO mohly objevit.

Značnou část těchto argumentů lze však při dostatečné analýze problému a detailní diskusi vyvrátit. Výhody pak lze obecně shrnout do následujících bodů:

- 1) Zvýšení růstu a produkce využitelného rostlinného produktu,
- 2) Zvýšení kvality včetně nutričních a skladovacích vlastností,
- 3) Zvýšení schopnosti adaptovat se na specifické podmínky životního prostředí způsobujícího stres, včetně prostředí kontaminovaného anorganickými a organickými polutanty,
- 4) Zvýšení rezistence vůči nemocem a rostlinným škůdcům,
- 5) Nižší spotřeba agrochemikálií a redukce nežádoucích přístupů používaných v zemědělství ohrožujících životní prostředí, což výrazně ohrožuje zisky firem produkujících herbicidy atd.,
- 6) Produkce nových látek,
- 7) Využití nových surovin,
- 8) Možnosti účinnějších a rozsáhlejších fyto-remediací.

4. Závěr

Díky nejruznějším haváriím a nešetrným výrobním technologiím narůstá znečištění životního prostředí zatím stále rychleji, než se je daří odstraňovat. Proto jsou zapotřebí nové postupy remediace, účinné a přitom natolik ekonomicky přijatelné, aby mohly být použity v dostatečně velkém měřítku. Klasické chemické a fyzikální metody nelze z ekonomických důvodů použít například k remediaci rozlehlých osevních ploch, odkud toxické látky vstupují přímo do potravinářských surovin. Použití rostlin a jejich kořenového systému při odstraňování polutantů a xenobiotik z půdy, vody, sedimentů i vzduchu; fyto-remediace a rhizo-remediace patří k přístupům, které mohou přispět k řešení problému. Podle dosavadních výsledků může být využití transgenních rostlin významnou součástí zmíněných technologií. Pouze snižování kontaminace prostředí může zabránit vstupu toxických látek do potravního řetězce, přispět k zachování biologické diverzity (kterou ohrožuje jistě více znečištění prostředí než použití transgenních plodin), a tak přispět k udržitelnému rozvoji.

Autoři děkují za podporu svého výzkumu grantu 203/99/1628 GA ČR a výzkumným záměrům J19/98:2232500003 a Z4-055-905.

LITERATURA

1. Koprowski H., Yusibov V.: *Vaccine* 19, 2735 (2001).
2. Mason H., Arntzen C.: *Science* 268, 714 (1995).
3. McGarvey B., Hammond J., Dienet M., Hooper D., Fu Z., Dietzschold B., Koprowski H. a Michaels F.: *Biotechnology* 13, 1484 (1995).
4. Poirier Y., Dennis D., Klomparens K., Somerville C.: *Science* 256, 520 (1992).
5. Rugh C. L., Wilde H. D., Stack N. M., Thompson D. M., Summers A. O., Meagher R. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3182 (1996).
6. Barrett C., Cobb E., McNicol R., Lyon G.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47, 135 (1997).
7. Ondřej M., Drobník J., Gartland K. M. A., Gartland J. S.: *Genové inženýrství, učební text v rámci programu TEMPUS PHARE*. VŠCHT, Praha 1999.
8. Gelvin S. B.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 227 (1998).
9. Maliga P.: *Cold Spring Harbor Course Molecular and Development Biology of Plants*, 1990.
10. Old R. W., Primrose S. B.: *Blackwell Scientific Publications*, str. 268. Oxford 1994.
11. Meyers R. A.: *Molecular Biology and Biotechnology*, str. 689. Verlag Chemie Publishers, New York 1995.
12. Flavell R. B.: *TIBTECH* 13, 313 (1995).
13. Stilwell D.: *Biochemist* 1997, 20.
14. Ma J. K., Hiatt A., Hein M., Vine N. D., Wang F., Stabila P., van Dolleweerd C., Mostov K., Lehner T.: *Science* 268, 716 (1995).
15. Ma J. K. C.: *Nat. Biotechnol.* 2000, 18.
16. Cunningham S., Berti W., Huang J.: *TIBTECH* 13, 393 (1995).
17. Macek T., Káš J., Macková M.: *Biotechnol. Adv.* 2000, 23.
18. Salt D., Blaylock M., Kumar N., Duschenkov V., Ensley B., Chet I.: *Biotechnology* 13, 468 (1995).
19. Chaney R. L., Malik M., Li Y. M., Brown S. L., Angle J. S. Baker A. J. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 279 (1997).
20. Meagher R. B.: *Plant Biotechnol.* 3, 153 (2000).
21. Krämer U., Chardonens A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 661 (2001).
22. Macek T., Macková M., Burkhard J., Demnerová K., v knize: *Effluents from Alternative Demilitarization Technologies* (Holm F. W., ed.), str. 71. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1998.
23. Grichko V. P., Filby B., Glick B. R.: *J. Biotechnol.* 81, 45 (2000).
24. Kärenlampi S., Schat H., Vangronsveld J., Verkleij J. A. C., Van der Lelie D., Mergeay M., Tervahauta A. I.: *Environ. Pollut.* 107, 225 (2000).
25. Macek T., Macková M., Pavlíková D., Száková J., Truksa M., Cundy A. S., Kotrba P., Yancey N., Scouten W. H.: *Acta Biotechnol.*, v tisku.
26. Bizily S., Rugh C., Meagher R.: *Nat. Biotechnol.* 18, 213 (2000).
27. Heaton A. C. P., Rugh C. L., Wang N., Meagher R. B.: *J. Soil Contamin.* 7, 497 (1998).
28. Rugh C., Senecoff J., Meagher R., Merkle S.: *Nat. Biotechnol.* 16, 925 (1998).

29. Rivera R., Medina V. F., Larson S. L., McCutcheon S. C.: *J. Soil Contamin.* 7, 511 (1998).
30. Newman L. A., Doty S. L., Gery K. L., Heilman P. E., Muiznieks I., Shang T. Q., Siemieniec S. T., Strand S. E., Wang X., Wilson A. M., Gordon M. P.: *J. Soil Contamin.* 7, 531 (1998).
31. French Ch. E., Rosser S. J., Davies G. J., Nicklin S., Bruce N. C.: *Nat. Biotechnol.* 17, 491 (1999).
32. Kellner D. G., Maves S. A., Sligar S. G.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 274 (1997).
33. Frančová K., Borovka R., Macková M., Macek T.: *Acta Biotechnol.*, v tisku.

K. Frančová^a, T. Macek^b, K. Demnerová^a, and M. Macková^a (^a*Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic,*

***Prague*): Transgenic Plants – a Potential Tool for Decontamination of Environmental Pollutants**

Transgenic plant technology showed many obvious advantages over conventional plant breeding approaches to crop improvement. Recent discoveries allowed the engineering of new transgenic plants generating desirable products, such as enzymes, polymers and vaccines. Among new approaches, the use of transgenic plants specifically tailored for the bioremediation of organic pollutants and heavy metals have recently occurred. This paper gives an overview of results of present research in phytoremediation of the polluted environment using transgenic plants and their improved properties. Preparation and properties of genetically modified plants changing mercury into less toxic forms, plants with improved abilities of Cd accumulation, degrading explosives (TNT) or other substances and oxidising TCE (trichloroethylene) are described. Advantages and disadvantages of the use of GM plants are discussed.

The Organising Committee and the Slovenian Chemical Society

cordially invite you to participate at
the 1st Central European Conference

“Chemistry towards Biology”

The conference will be held from **8 to 12 September 2002** in Portorož, Slovenia.
To receive more detailed information please connect: <http://www.portoroz2002.ki.si>.

Prof. Venčeslav Kaučič
President of International
Programme Committee