

# Transgenní rostliny obsahující bakteriální dioxygenasu

TRANSGENIC PLANTS CONTAINING BACTERIAL DIOXYGENASE

Jitka Viktorová<sup>1</sup>, Martina Nováková<sup>1,2</sup>, Martina Macková<sup>1,2</sup>, Kateřina Demnerová<sup>1</sup>, Tomáš Macek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Vysoká škola chemicko-technologická a <sup>2</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR: Společná laboratoř ÚOCHB a VŠCHT

Dle Stockholmské konvence jsou perzistentní organické polutanty sloučeniny, které přetrvávají v životním prostředí, jsou široce rozšířené, hromadí se v tukových tkáních a jsou toxické pro člověka a další živočichy. Jejich snaha o odstranění z životního prostředí se zvýšila při studiu bakterií schopných tyto látky metabolizovat. Ovšem mikroorganismy mají řadu nevýhod pro použití při remediaci. Nevytváří dostatečné množství biomasy, jsou náchylné na změnu podmínek, mohou být patogenní a také je nelze sledovat pouhým okem. Oproti tomu použití rostlin nesoucích mikrobiální degradační geny poskytuje výhody rostlinného i bakteriálního systému. Velmi častým způsobem, jak bakterie odbourávají organická xenobiotika, je využití enzymů z řady dioxygenas. Substrát je oxidován na méně toxické produkty za spotřeby polovičního množství energie než v případě monooxygenas, které jsou přítomny ve většině eukaryot. Expresí genu pro 1,2-dihydroxynafthalendioxygenasu (*nabC*) z bakterie *Pseudomonas putida* v transgenním tabáku vedla k řadě fenotypových a biochemických změn. Degradace 1,2,4- a 3-chlorbenzoové kyseliny bylo dosaženo vnesením genu pro chlorkatechol-1,2-dioxygenasu (*cbnA*) z bakterie *Ralstonia eutropha* NH9 do rýže seté. Tento gen byl rovněž přenesen z bakterie *Plesiomonas* sp. do rostliny huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Transgenní rostliny nejevily morfologické ani růstové odlišnosti, avšak měly vyšší toleranci ke katecholu než divoký typ, ve vyšším množství ho extrahovaly z média a snáze převáděly na méně toxickou *cis,cis*-mukonovou kyselinu. Dalším genem pro dioxygenasu, která byla vybrána pro přenos z bakterie *Terrabacter* sp. do rostliny huseníček rolní, byl gen kódující extradioldioxygenasu (*dbfB*). Expresí tohoto genu se dosáhlo až 12× rychlejší degradace 2,3-dihydroxybifenyly. Naše laboratoř vybrala pro přenos geny kódující velkou a malou podjednotku toluendioxygenasy (*todC1* a *todC2*) z bakterie *Pseudomonas putida* F1 a gen kódující 2,3-dihydroxybifenylyl-1,2-dioxygenasu (*bpbC*) z bakterie *Pandoraea pnomenusa* B-356. Cílovou rostlinou byl v obou případech tabák viržinský. Gen *bpbC* kóduje třetí enzym bakteriální degradační dráhy polychlorovaných bifenyly (PCB) aerobní cestou. Tento krok je významný proto, že štěpí aromatickou strukturu bifenylového kruhu. U připraveného transgenního tabáku byla v první filiační generaci ověřena exprese selekčního markeru pro antibiotickou rezistenci. Přítomnost transgenu *bpbC* byla ověřena na úrovni DNA agarosovou elektroforézou po izolaci rostlinné DNA a amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí se specifickými primery. Na úrovni RNA byla přítomnost transgenu ověřena agarosovou elektroforézou po izolaci rostlinné RNA, převedením do komplementární DNA a amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí. Expresí genu *bpbC* na úrovni proteinu byla detekována podle typu použitého detekčního markeru. První rostlinná linie obsahovala gen pro luciferasu ve fúzi s genem *bpbC*. Positivní exprese byla potvrzena po postříku substrátem

pro luciferasu. Druhá rostlinná linie obsahovala gen pro enzym  $\beta$ -glukuronidasu ve fúzi s genem *bpbC*. Protein BphC byl stanoven přítomností modrého barviva v pletivech rostlin po působení specifického substrátu pro enzym  $\beta$ -glukuronidasu a následnou extrakcí chlorofylu. Poslední rostlinné linie obsahovaly funkční gen *bpbC* ve fúzi s genem pro histidinovou kotvu. Protein BphC byl purifikován na koloně s niklem. Následovala denaturující polyakrylamidová elektroforéza a prokázání přítomnosti BphC pomocí Western blotu se specifickou protilátkou proti histidinové kotvě. Fenotypové projevy transgenních rostlin byly stejné ve srovnání s divokým typem tabáku, avšak degradační aktivita byla prokázána až 2,3násobným úbytkem 2,3-dihydroxybifenyly (2,3-DHB) z tekutého média oproti rostlinám divokému typu. Kapalinovou chromatografií s diode array detektorem se podařilo prokázat, že v rostlinách se 2,3-DHB, chybějícího v tekutém médiu, nachází pouze pětina. Ovšem plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem se nepodařilo prokázat přítomnost produktu (2-hydroxy-6-oxo-6-chlorfenyl-hexa-2,4-dienová kyselina), což je pravděpodobně dáno jeho vysokou nestabilitou. Během degradačního pokusu byl rovněž měřen přírůstek biomasy, kterou rostliny tvořily ve vodě s obsahem toxického substrátu, který sloužil jako jediný zdroj živin. Prokázalo se, že transgenní linie v přítomnosti PCB tvořily až 3× více biomasy než netransgenní tabák.

*Poděkování: Práce byla realizována z finančních zdrojů poskytnutých MSM 1M06030, MSM 6046137305 a účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 21/2010.*

**Viktorová J., Nováková M., Macková M., Demnerová K., Macek T.: Transgenic plants containing bacterial dioxygenase**

Genetically modified plants can serve as highly efficient alternative for degradation of various dangerous organic pollutants such as polychlorinated biphenyls (PCBs), toluene and others from the environment. These compounds are persistent toxic xenobiotics difficult to destroy. The transfer of bacterial genes encoding dioxygenases into plant genome may help to successful and efficient phytoremediation. It was confirmed by transfer of the gene for 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase to plants *Nicotiana tabacum*. The decrease of toxic substrate in medium in the presence of transgenic tobacco was up to 54 % higher than in the case of non transgenic plants. Genetically modified plants even produced higher amount of biomass and were more viable.

**Key words:** phytoremediation, genetically modified plants, organic pollutants, polychlorinated biphenyls, *Nicotiana tabacum*, dioxygenases.

**Kontaktní adresa – Contact address:**

prof. Ing. Tomáš Macek, CSc., ÚOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: tom.macek@uochb.cas.cz; Ing. Jitka Viktorová, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6, e-mail: prokesoj@vscht.cz