Transgene biljke u fitoremedijaciji

Kapular, Matej

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:204804

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Matej Kapular

Transgene biljke u fitoremedijaciji

Završni rad

Osijek, 2018. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

TRANSGENE BILJKE U FITOREMEDIJACIJI

Matej Kapular

Rad je izrađen u: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Laboratorij za biokemiju
Mentor: : Dr. sc. Rosemary Vuković, docent

Kratak sažetak završnog rada: Fitoremedijacija je metoda čišćenja okoliša od štetnih tvari uzgojem biljaka na kontaminiranim područjima koje imaju sposobnost neutralizacije i degradacije štetnih tvari. Zbog povećanja efikasnosti, uzgajaju se biljke sa genima iz sisavaca, ljudi i mikroorganizama koji se ne nalaze prirodno u biljci. Ekspresija novih gena dovodi do stvaranja metabolizma i otpornosti na štetne tvari u okolišu. Apsorpcijom tih tvari iz tla i zraka moguće je na čist i efikasan način očistiti kontaminirana područja.

Broj stranica: 19
Broj slika: 3
Broj tablica: 0
Broj literaturnih navoda: 37
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fitoremedijacija, transgene biljke, ekspresija gena, zagađivači, metabolizam

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor's thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

TRANSGENIC PLANTS IN PHYTOREMEDIATION

Matej Kapular

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry, Biochemistry Laboratory

Supervisor: Rosemary Vuković, PhD, Asst. Prof.

Short abstract: Phytoremediaton is a method for purifying the environment from pollutants by cultivating plants in contaminated areas which have the ability to neutralize and degrade pollutants. For higher efficiency, plants are raised with genes from mammals, humans and microorganisms which don't occur naturally in plant. The expression of new genes allow plants to develop metabolism and resistances to pollutants in environment. Absorption of these substances purifies the air and soil in contaminated areas in a clean and efficient way.

Number of pages: 19
Number of figures: 3
Number of tables: 0
Number of references: 37
Original in: Croatian

Key words: transgenic plants, phytoremediation, gene expression, metabolism, pollutant, environment

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. Tipovi zagađenja 3

2.1 Anorganski spojevi 3

2.2 Organski spojevi 4

2.3 Degradacijski putevi kod biljaka 4

3. Transgene biljke u fitoremedijaciji organskih tvari 5

3.1 Enzimi citokrom P450 5

3.1.1 Unos transgena za citokrom P450 u više biljke 5

3.1.2. Ekspresija ljudskog gena *P450* u transgenim biljkama u svrhu metabolizma herbicida 5

3.1.3. Transgena riža s ljudskim genom *P450* 6

3.1.4. Transgeni krumpir i duhan s genom *P450* 6

3.1.5 Ekspresija ljudskog gena *P450* u transgenim biljkama u svrhu metabolizma halogeniranih ugljikovodika 7

3.1.6 Transgene topole s genom *P450* 7

3.2 Enzim glutation S-transferaza 8

3.2.1 Transgene biljke u fitoremedijaciji eksploziva 10

3.2.2 Transgene biljke u fitoremedijaciji pesticida heksaklorcikloheksana 12

4. Transgene biljke u fitoremedijaciji tla od metala 13

5. ZAKLJUČAK 15

6. LITERATURA 16

Kratice

PBC - poliklorirani bifenoli

PAH - policikloaromatski ugljikovodici

CYP450 – citokrom P450

GST - glutation S-transferaza

TCE – trikloretilen

TNT – trinitrotoluen

RDX – heksogen

PETN- pentaeritrol tetranitrat

DNT - dinitrotoluen

ADNT – aminodinitrotoluen

XenA- ksenobiotik-reduktaza A

XenB- ksenobiotik-reduktaza B

GTN – nitroglicerin

PETNr - pentaeritritol tetranitrat-reduktaza

NemA - N-etilmaleimid-reduktaza

HCH - heksaklorcikloheksan

1. UVOD

Industrijalizacija, agrikultura, prekomjerno rudarenje i vojna aktivnost uzrokuju otpuštanje ogromnih količina otrovnih tvari u okoliš. Zemlja, voda i zrak pod utjecajem su kemijskih i bioloških zagađivača koji uzrokuju narušavanje ekosustava, smanjenje bioraznolikosti, zagađenje podzemnih voda te narušavanje zdravlja ljudi. Čišćenje okoliša od štetnih tvari postao je veliki problem koji nema jednostavno rješenje i zahtjeva nove metode uklanjanja štetnih tvari (Cherian i Oliveira, 2005).

Uklanjanje štetnih elemenata iz tla moguće je iskopima, ispiranjem i paljenjem zagađenog tla, ali takve su metode skupe, slabe efikasnosti i same po sebi narušavaju stabilnost ekosustava jer uništavaju i nastambe životinja, smanjuje se broj biljnih vrsta na području i estetski su neugledne. U potrazi za efikasnijim rješenjem znanstvenici su shvatili da biljke i mikrobi mogu apsorbirati i inaktivirati otrovne elemente u tlu. Uzgajanjem biljaka koje efikasno apsorbiraju te elemente može se smanjiti koncentracija organskih i anorganskih otrovnih tvari u tlu. Metoda se zove fitoremedijacija.

Biljke tijekom svog razvoja apsorbiraju vodu i minerale iz tla koji su im potrebni za fotosintezu. Osim toga, znanstvenici su uvidjeli da apsorbiraju i dio štetnih tvari u tlu, koje onda transformiraju u tvari koje nisu štetne za njihov organizam. Prvotna fitoremedijacija bila je namijenjena uklanjanju teških metala poput žive, bakra, kadmija, cinka i olova iz tla. Daljnjim istraživanjem otkrili su da je moguće ukloniti i različite organske tvari poput poliaromatskih ugljikovodika, kloriranih otapala i eksploziva (Eapen i sur. 2007).

Sarma (2011) je naveo da postoji nekoliko strategija za fitoremedijaciju:

1. Fitoekstrakcija: biljke apsorbiraju metale preko korijenja i skladište ih u izdancima koji se kasnije mogu ponovno iskoristiti
2. Fitovolatilizacija: biljke apsorbiraju metale te ih ispuštaju u drugom obliku procesom volatilizacije
3. Fitostabilizacija: imobilizacija i vezanje organskih i nekih anorganskih molekula s česticama tla preko reakcije korijena i mikroba na njima
4. Fitofiltracija: biljke apsorbiraju i adsorbiraju metale preko korijenja iz vode i iz vodenih otpadnih područja

Spora brzina apsorbiranja i skladištenje štetnih tvari u biljkama pokazalo je znanstvenicima da je metoda moguća ali nije bila efikasna (Eapen i sur. 2007). Istraživanja su pokazala da određene biljke imaju veću sposobnost apsorbiranja i akumulacije štetnih tvari. Takve biljke nazvane su hiperakumulatorima i na njima se temelje daljnja istraživanja. Određivanje specifičnih gena odgovornih za akumulaciju i transport metalnih iona i drugih štetnih tvari u biljci, pruža mogućnost znanstvenicima za daljnje povećanje efikasnosti fitoremedijacije. Genetičkim inženjeringom moguće je povećati ekspresiju tih gena. Biljke s ciljanom promjenom gena putem tehnologije rekombinantne DNA nazivamo transgenim biljkama (Yang i sur. 2005).

2. Tipovi zagađenja

U većini je slučajeva izvor zagađenja čovjek. Tipovi zagađenja podijeljeni su u dvije glavne skupine: organski i anorganski zagađivači. Organski nisu toliko opasni za biljku kao anorganski, jer se teže akumuliraju u tlu i nisu toliko reaktivni. Primjeri organskih zagađivača su poliklorirani bifenoli (PBC), policikloaromatski ugljikovodici (PAH), nitroaromatske molekule (eskplozivi), halogenirani ugljikovodici. Većina ih je otrovna, teratogena, ali i kancerogena.

Teški metali poput žive, olova, kadmija, i spojeva koji nisu metalne prirode poput arsena, radija, cezija, stroncija, tricija i tehnicija čine anorganske zagađivače. U visokim koncentracijama iznimno su otrovni jer uzrokuju stvaranje slobodnih radikala koji dovode do oksidativnog stresa. Također su iznimno reaktivni te interferiraju s funkcijom i strukturom proteina, zamjenjuju druge bitne nutrijente (Pulfort, Watson, 2003). Biljke se štite od tih spojeva degradacijom ili spremanjem istih u vakuole.

2.1 Anorganski spojevi

Apsorbiranje metala putem biljaka ovisi o više faktora. Koncentracija metala, sastav tla i pH tla mogu povećati ili smanjiti apsorpciju putem korijenja biljaka. U zadnja dva desetljeća, istraživanja su pokazala da određene specijalizirane biljke mogu akumulirati više od 3% teških metala u samu stabljiku i više od 25% u biljnom soku bez očitih oštećenja samog organizma (Baker i Brooks 1989). Mehanizmi tolerancije uključuju akumulaciju cinka u staničnim stjenkama, keliranje nikla citratom, keliranje kobalta i cinka jabučnom kiselinom, te povezivanje kobalta s oksalatnim kristalima kalcija u tkivima biljaka. Poznavanje tih mehanizama pomoći će u određivanju bitnih genetičkih karakteristika koje određuju toleranciju na metale, a koje bi se tako mogle prenijeti na netolerantne biljke koje pak imaju s veću biomasu i dublji korijenski sustav. Rezultirajuća biomasa, bogata mineralom, mogla bi se čak i reciklirati nakon izgaranja biljke, što bi dovelo do bitnog ekonomskog značaja. Proces recikliranja metala iz biljaka naziva se biorudarenje (Robinson i sur. 2000).

Fitoremedijacija mogla bi se koristiti i za čišćenje i drugog tipa anorganskih spojeva, a to su radionuklidi. Oni su radioaktivni te su iznimno opasni za ljudsko zdravlje. Ovakva zagađenja dolaze iz eksplozije atomske bombe, te nesreće s nuklearnim elektranama koje su se dogodile u Černobilu i Fukushimi. Negri i Hinchman (2000) radili su istraživanje o

fitoremedijaciji radioaktivnih elementa i pokazali da je to jedna od mogućnosti čišćenja okoliša od takvih elemenata.

2.2 Organski spojevi

Razvoj pesticida u moderno doba doveo je do razvoja biljaka koje imaju poboljšanu sposobnost metaboliziranja istih. One koje imaju brz metabolizam i koje mogu pesticide brzo transformirati u netoksične tvari vrlo su poželjne. Isto tako, za druge organske otrovne tvari poželjne su one koje su efikasne u degradaciji istih.

Biljka i njezin korijen mogu stvoriti povoljne uvjete u tlu za mikrobnu aktivnost koja sama po sebi ima remedijacijska svojstva. Kombinacija biljki i mikroba obećava veću efikasnost i brže čišćenje okoliša od ugljikovodika nastalih iz naftnih derivata.

Isto tako, različite biljke imaju različitu otpornost na određene otrovne tvari. Potrebno je prvo istražiti kemijski sastav tla da bi se ciljano išlo na uklanjanje tog elementa iz tla. Apsorpcija herbicida ovisna je o kemijskim svojstvima spoja, okolišnih čimbenika i karakteristika biljaka (Paulo i sur. 2011).

2.3 Degradacijski putevi kod biljaka

Metabolizam ksenobiotika u višim biljkama, ljudima i životinjama događa se u tri koraka (Schmidt i sur. 2006a,b):

1. Transformacija ili konverzija – hidrofobni polutanti su transformirani u manje hidrofobne metabolite preko N-, O-, i S-dealkiliranja, aromatskom i alifatskom hidroksilacijom, epoksidacijom, peroksidacijom, oksidativnom desulfurizacijom, sulfioksidacijom i redukcijom pomoću enzima citokrom P450 (CYP450). Kataliza reakcija enzimom CYP450 bitan je početni korak koji vodi do detoksikacije, inaktivacije i ekskrecije (Schmidt i sur. 2006a,b).
2. Konjugacija - metaboliti iz prve faze direktno se konjugiraju s glutationom, šećerima ili aminokiselinama i stvaraju se hidrofilni spojevi.
3. Kompartmenizacija - konjugirani metaboliti spremaju se u vakuole ili stanične stjenke. Ovaj korak ima dvije odvojene faze: transport i spremanje u vakuole, te i spajanje sa staničnom stjenkom i ekskrecija.

3. Transgene biljke u fitoremedijaciji organskih tvari

3.1 Enzimi citokrom P450

Enzimi CYP450 dio su superporodice hem proteina bitnih za oksidativni, peroksidativni i reduktivni metabolizam različitih skupina spojeva uključujući endobiotike poput steroida, masnih kiselina, prostaglandina, leukotriena, te ksenobiotika koji uključuju većinu terapeutskih lijekova i zagađivača okoliša. Taj sustav enzima nalazi se u mikrosomima i sastoji se od nekoliko izooblika CYP450 i nespecifičnih NADPH-citokrom P450 oksireduktaza. Podijeljeni su u više porodica i podporodica. Broj porodica i enzima je različit u različitim organizmima (Nina i sur. 2011)

Iako P450 monoksigenaze igraju bitnu ulogu u oksidativnom metabolizmu endogenih i egzogenih lipofilnih spojeva, saznanja o P450 vrstama koje metaboliziraju ksenobiotike u biljkama vrlo su slaba. Kod ljudi je p450 dosta dobro istražen te se nagađa da ljudi imaju bar 53 različitih gena *P450* i 24 pseudogena (Nelson 1999). Bar njih 11 su eksprimirani u ljudskoj jetri i zaslužni su za 90% P450-ovisnog metabolizma terapeutskih lijekova. Oni oksidiraju ugljik i dušik te stvaraju većinom hidroksilne skupine i skidaju alkilne skupine koje su slične metaboličkim procesima kod biljaka. Inui i suradnici (2001) istraživali su 11 ljudskih CYP450 koji mogu metabolizirati 27 herbicida i 4 insekticida. Istraživači su tako došli na ideju da ubace gen za CYP450 iz sisavaca i ljudi u više biljke s ciljem povećanog metabolizma ksenobiotika.

3.1.1 Unos transgena za citokrom P450 u više biljke

Transgen za izoenzime CYP450 (*CYP1* i *CYP3*) unesen je u više biljke poput duhana (*Nicotiana tabaccum*), krumpira (*Solanum tuberosum*, riže (*Oryza sativa*) i uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). Ti se geni mogu unijeti u mnoge biljne vrste transformacijom pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* ili direktnim prijenosom gena (Doty 2008). Primarni cilj ovih genskih manipulacija je razvoj vrsta sposobnih za pojačani metabolizam ksenobiotika (herbicida i pesticida) i njihovo čišćenje iz tla i podzemnih voda.

3.1.2. Ekspresija ljudskog gena *P450* u transgenim biljkama u svrhu metabolizma herbicida

Herbicidi su ekonomski vrlo bitni jer smanjuju gubitke u usjevima uslijed rasta korova. Zbog korištenja herbicida razvili su se korovi koji su otporni na njih, što uzrokuje potrebu za većim količinama herbicida. Prekomjernim špricanjem herbicidima povećava se

koncentracija štetnih tvari u tlu i podzemnim vodama. Stoga, biljke korištene za fitoremedijaciju takvih područja moraju biti otporne na herbicide. Enzimi CYP450 i glutation S-transferaza (GST) igraju veliku ulogu u povećanoj degradaciji herbicida. Transgeni kukuruz, pšenica, tulipan i zrnati grah koji su eksprimirali humani CYP450 prikazuju veliku otpornost na neke od najpoznatijih herbicida poput atrazina, linurona i klorotoluona te se mogu koristiti u fitoremedijacijske svrhe (Fonne-Pfister, Kreuz,1990; Frear,1995; Moreland i sur. 1993).

3.1.3. Transgena riža s ljudskim genom *P450*

Riža je jedna od najbitnijih prehrambenih namirnica svijeta. Najviše ju koriste države velikih populacija poput Kine, Indije, Indonezije i Egipta jer je prihod iznimno visok zbog više vegetacijskih razdoblja u godini. Za veću proizvodnju riže nužno je povećati njenu otpornosti na herbicide, što je moguće postići unosom gena zaduženih za metabolizam ksenobiotika kao što su geni *P450*, čime bi se postiglo i čišćenje tla od ostalih agrokemikalija (Ohkawa i sur. 1999; Kawahigashi i sur. 2007). Transgena riža s ljudskim genom *CYP1A1* imala je normalne morfološke i fiziološke karakteristike iste kao i riža divljeg tipa, dok su se biljke međusobno razlikovale prema sposobnosti degradacije ksenobiotika zbog dodanih gena. Također je, transgena riža pokazala i povećanu toleranciju na 10 od 13 testiranih herbicida različitih kemijskih porodica (Kawahigashi i sur. 2008).

3.1.4. Transgeni krumpir i duhan s genom *P450*

Shiota i suradnici (1994, 1996) svojim su istraživanjima pokazali kako transgeni duhan s genima štakora *CYP1A1* i kvaščevim genom za NADPH-CYP450 oksoreduktazu, metabolizira jedan od poznatijih herbicida klorotoluron preko N-demetilacije i metil-hidroksilacije.

Inui i suradnici (1993) uzgojili su transgeni krumpir koji je eksprimirao ljudski gen *CYP1A1* te je pokazao veliku toleranciju prema poznatijim herbicidima kao što su atrazin, klorotoluron i piriminobak-metil. Također su kasnije dobili i transgeni krumpir s istovremenom ekspresijom 3 različita ljudska gena *P450* (*CYP1A1*, *CYP2B6* i *CYP2C9*). Kombinacija tih gena pokazala značajnu otpornost prema herbicidima koji inhibiraju fotosintezu (atrazin, klorotoluron, metabenzatiazuron), biosintezu lipida (acetoklor, metolaklor), biosintezu karotenoida (norflurazon). Prema Inuiu i Ohkawai (2005) ta otpornost se razvila zbog kooperativnog metabolizma herbicida uslijed ekspresije tri gena *P450*.

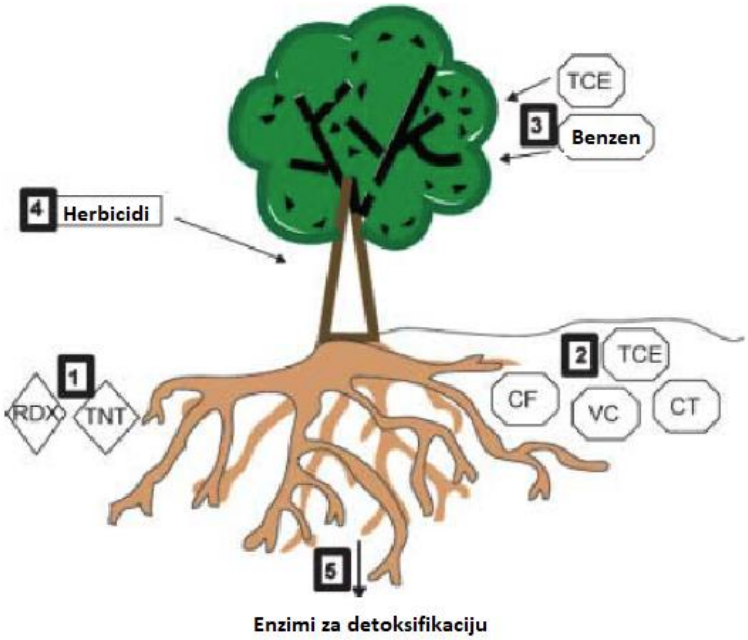
3.1.5 Ekspresija ljudskog gena *P450* u transgenim biljkama u svrhu metabolizma halogeniranih ugljikovodika

Halogenirani ugljikovodici poput vinil-klorida, (Slika 1) trikloretilena (TCE), ugljikovog tetraklorida, benzena i kloroforma česti su zagađivači okoliša i izazivaju velike zdravstvene probleme kod ljudi, životinja i biljaka. Vrlo su kancerogeni, napadaju živčani sustav i poznati su hematotoksini. U okolišu se nađu zbog prevelike naftne industrije (benzen), dezinfekcije pitke vode (kloroform) i drugih potreba snažne industrijalizacije.

Citokrom CYP2E1 je enzim koji može oksidirati skoro sve halogenirane ugljikovodike, a nalazimo ga u sisavcima. Doty i suradnici (2000) su metodama rekombinantne DNA unijeli gen *CYP2E1* u duhan te tako povećali mogućnost metaboliziranja TCE-a u duhanu za 640 puta. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se potvrdilo da neki drugi toksični spojevi ne nastaju zbog promjene metabolizma.

3.1.6 Transgene topole s genom *P450*

Zbog velike biomase, dubokog korijenja i dugovječnosti stabala, mnogi su znanstvenici svoja istraživanja usmjerili na dobivanje transgenih stabala u svrhe fitoremedijacije. Doty i suradnici (2007) uzgojili su hibridnu topolu (*Populus tremula x Populus alba*) s transgenom *CYP2E1* iz zeca. Namjena je takve biljke uklanjanje reaktivnih ugljikovodika iz hidroponskih otopina. Transgene topole pokazale su ubrzan metabolizam TCE-a, vinil-klorida, ugljikova tetraklorida i benzena za čak 3.37 do 4.6 puta u odnosu na topole divljeg tipa. Dobivene biljke su također učinkovite i u uklanjanju volatilnih zagađivača zraka (uklonjeno je 79% više TCE-a ,29% više vinil-klorida i 27% više benzena u odnosu na kontrolne topole).



Slika 1. Fitoremedijacija organskih zagađivača uz pomoć transgenih biljaka. (1) Fitotoksični utjecaj trinitrotoluena (TNT) i heksogena (RDX) može se smanjiti ekspresijom gena iz bakterija, koje stvaraju enzime koji pomažu u degradaciji tih spojeva. (2) Trokloretilen (TCE) i ostale male volatilne kemikalije bolje se degradiraju kada transgene biljke eksprimiraju gen *CYP2E1* iz sisavaca. (3) Čišćenje volatilnog TCE-a i benzena iz zraka također je pojačano uz ekspresiju gena *CYP2E1* u trasngenim biljkama. (4) Ekspresija gena *CYP2B6* ili gena za gama-glutamilcistein-sintetazu pomažu biljkama u degradaciji različitih herbicida. (5) Sekrecija detoksicirajućih enzima poput lakaze 1 ili haloalkan-dehalogenase omogućava degradaciju fitotoksičnih spojeva poput ugljikova tetraklorida (TC), kloroforma (CF), vinil-klorida (VC). Preuzeto i prilagođeno prema Doty (2008).

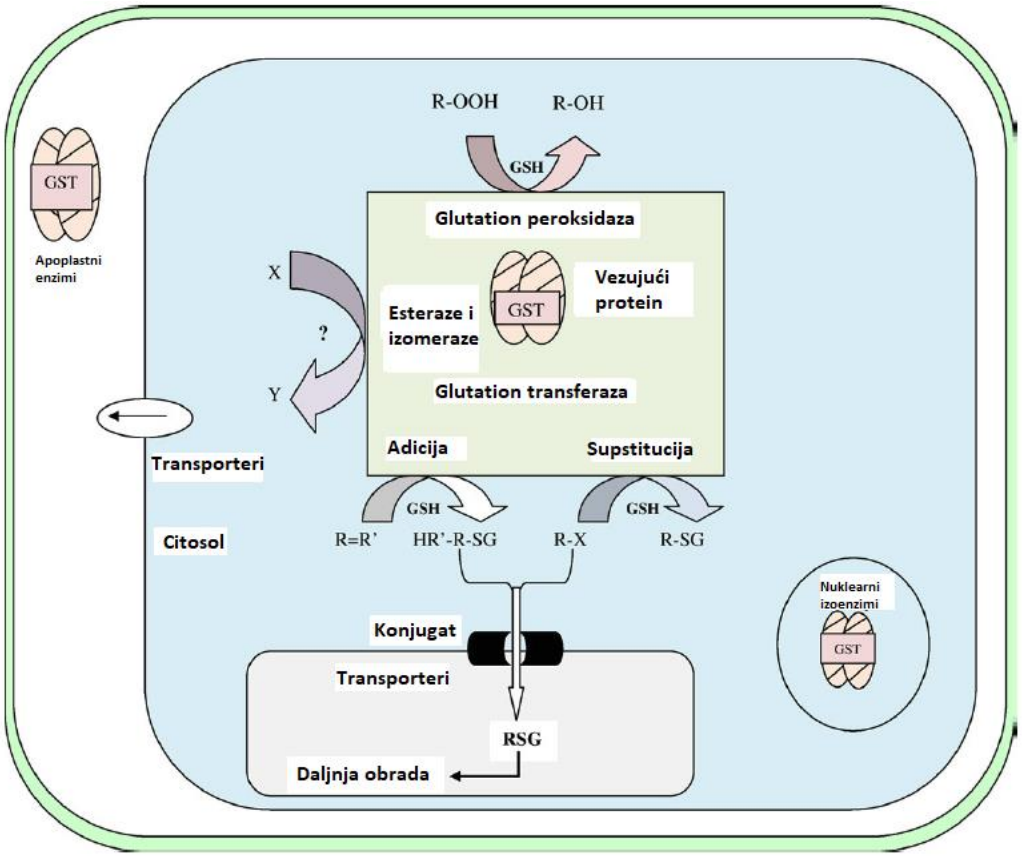
3.2 Enzim glutation S-transferaza

Osim P450 oksidacije, konjugacija glutationom još je jedan bitan mehanizam za detoksikaciju ksenobiotika (Slika 2). Enzimi GST su porodica multifunkcionalnih enzima zaslužnih za staničnu detoksikaciju i ekskreciju mnogih fizioloških spojeva. Nalazimo ih u mikroorganizmima, biljkama i životinjama. Oni kataliziraju nukleofilni napad reduciranog glutationa na egzogene i endogene elektrofilne spojeve. Produkti nakon konjugacije glutationa su obično hidrofilni. To svojstvo pomaže u detoksikaciji stanica i eliminaciji štetnih tvari. Enzimi GST se sastoje od dvije podjedinice koje mogu stvoriti homodimerske

i heterodimerske izoenzime. Količina različitih izoenzima uvjetuje raspon štetnih tvari koje organizam može detoksicirati i eliminirati iz organizma.

Noctor i Foyer (1998) uspjeli su prenijeti gen iz bakterije koji kodira γ-glutamil-cistein-sintetazu, regulatorni enzim za biosinteze glutationa, u topolu. Povećana ekspresija glutationa povećala je antioksidativnu aktivnost biljnih stanica protiv slobodnih radikala koji uzrokuju oksidativni stres. Osim toga, istraživanja su pokazala da povećana koncentracija glutationa u stanicama povećava otpornost prema različitih herbicida.

Karavangeli i suradnici (2005) prenijeli su gen koji kodira enzim GST1 u duhan i tako povećali ekspresiju tih gena u biljci. GST1 ima iznimnu kataboličnu aktivnost za kloroacetanilidne herbicide (npr. alaklor). Daljni testovi pokazali su da transgeni duhan ima značajno bolju toleranciju na taj herbicid nego kontrolne ne-transgene biljke. Također, slični testovi na topoli (*Populus trichocarpa*) i gorušici (*Brassica juncea*) pokazali su ogromnu razliku u ekspresiji enzima GST-a i toleranciju na herbicide atrazin, 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB), metolaklor i fenanitren.

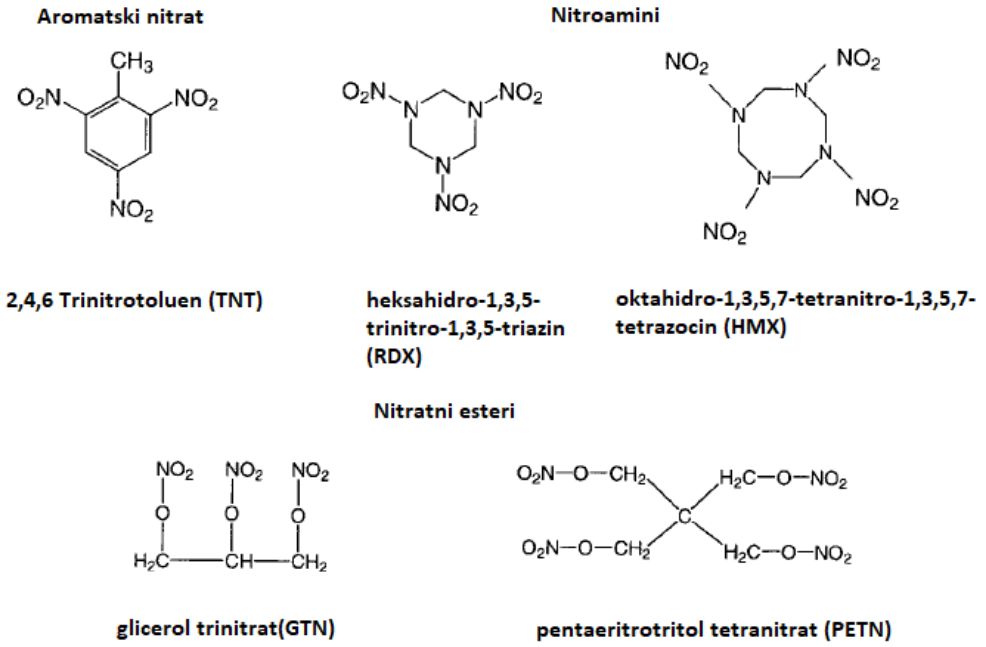


Slika 2. Prikaz uloge glutation S-transferaze (GST) u detoksikaciji ksenobiotika i endogenom metabolizmu. Detoksikacija kada enzim GST prevodi spojeve u manje toksične spojeve procesom konjugacije substitucijskim i adicijskim reakcijama te priprema spojeva za buduće reakcije koje uključuju izrezivanje, preraspodjelu i sekundarnu konjugaciju. Većina biljnih enzima GST su u citosolu, iako ih ima u apoplastu i jezgri. Konjugirane molekule se transportiraju u vakuole na daljnju obradu. Druga uloga GST je pomoć u endogenom metabolizmu. Preuzeto i prilagođeno prema Abhilash i sur.(2009)

3.2.1 Transgene biljke u fitoremedijaciji eksploziva

Vojna aktivnost i ratovi mogu zagaditi tlo ostacima eksploziva i sličnih kemijskih tvari u tlu i vodi. Cijela vojna industrija ispušta štetne tvari u okoliš te trenutno predstavlja veliki problem za očuvanje stabilnosti i čistoću okoliša.(Slika 3.) Eksplozivi se dijele na tri različite skupine: nitratni esteri, aromatski nitrati i nitramini. Nitratni esteri uključuju glicerol-trinitrate (nitroglicerin, GTN) i pentaeritrol tetranitrate (PETN). Aromatski nitrati u sebi imaju aromatski prsten s više nitro-skupina kao što su 2,4,6-trinitrotoluen(TNT), dinitrotoluen (DNT), aminodinitrotoluen (ADNT) i nitrobenzeni. Nitroamini u sebi sadrže N-nitro-skupine. Najbitniji eksploziv u vojnim operacijama je RDX, iznimno je eksplozivan, ali i štetan za okoliš. Čak i u minimalnim količinama može doći do eksplozije što ga čini

vrlo opasnim ako se nađe u okolišu. Osim toga, toksičan je i poznati je mutagen (Honeycutt i sur. 1996).



Slika 3. Kemijska struktura najpoznatijih eksploziva. Preuzeto i prilagođeno prema Rosser i suradnici (2001).

U normalnim ekološkim uvjetima većina eksploziva vrlo je otporna na različite biološke procese koji bi ih neutralizirali poput biodegradacije, volatilizacije i hidrolize. Teška razgradnja znači da dugo ostaju u tlu i vodi. Istraživanja su pokazala da različiti mikroorganizmi imaju enzime koji ih mogu transformirati u lakše razgradive spojeve (Ramos i sur. 2005). To su enzimi poput ksenobiotik-reduktaze A i B (XenA i XenB) u bakteriji *Pseudomonas*, pentaeritritol tetranitrat-reduktaza (PETNr) u bakteriji *Enterobacter cloacae*, N-etilmaleimid-reduktaza (NemA) u bakteriji *Escherichia coli* i enzim OYE (od engl. *old yellow enzyme*) u kvascu *Saccharomyces cerevisie* (Ramos i sur. 2005; Orville i sur. 2004a, b).

TNT je eksploziv iznimno široke uporabe. Trovanje TNT-om je uzrokuje hepatitis, plastičnu anemiju, i žučanu hipoacidozu koja prethodi raku. Nagađa se da je tijekom Prvog svjetskog rata čak 17 000 ljudi bilo otrovano TNT-om, od toga je 475 smrtnih slučajeva. Fizičko uklanjanje zagađenog okoliša iznimno je skupo i temelji se na izgaranju spoja iz zemlje što ostavlja velike ožiljke na tlu i uništava biljke i životinje na tom području.

Hughes i sururadnici (1997) napravili su istraživanje na vodenim biljkama, te su pokazali da je TNT moguće metabolizirati čak i bez prisutnosti mikroorganizama. Primjena je ograničena jer je brzina metaboliziranja iznimno spora i jer je TNT fitotoksičan. Rosser i suradnici (2001) su tako došli na ideju da unesu bakterijski gen za nitroreduktazu u genom biljke. Transgene biljke je pokazale su značajnu razliku u otpornosti na eksploziv i lakše su ga biodegradirale.

PETN i nitroglicerin su nitratni esteri, bezbojni, teški i iznimno ekplozivni. Razgradnja PETN-a i nitroglicerina u prirodi je iznimno teška. Određene bakterije poput bakterije *Enterobacter cloacae* imaju enzim PETNr uz pomoć koje mogu razgraditi nitroglicerin i PETN i iskoristiti njihov dušik za rast i razvoj. Rosser i suradnici (2001) su tehnikom rekombinantne DNA uspjeli bakterijski gen koji kodira enzim PETNr unijeti u duhan. Rezultati istraživanja su pokazala značajnu otpornost transgenog duhana na PETN, nitroglicerin i TNT i povećanu razgradnju istih.

3.2.2 Transgene biljke u fitoremedijaciji pesticida heksaklorcikloheksana

Jedan od najvećih zagađivača tla i podzemnih voda je heksaklorcikloheksan (HCH) i njegovi izomeri. HCH je pesticid koji je u uporabi od 1940-tih. Čestom i nekontroliranom uporabom u zadnjih 80 godina zagadio je brojne različite ekološke sustave. Procijenjeno je da trenutno u svijetu ima od 1.6 do 4.8 milijuna tona HCH u tlu i podzemnim vodama. Zadnjih nekoliko godina prestaje uporaba tog pesticida. Abhilash i Singh (2008) su identificirali nekoliko biljnih vrsta sposobnih za akumulaciju izomera HCH-a, kao što su *Solanum torvum, Withania somnifera, Lantana camera, Achyranthes aspera, Dalbergia sisso, Calotropis procera, Erinathus munja.* Abhilash i Singh (2009) također su otkrili da biljka *Withania somnifera* može ubrzati razgradnju lindana, izomera HCH-a, u tlu za čak 73%. Za razgradnju HCH-a potreban je enzim dehidroklorinaza koja se nalazi u bakteriji *Sphingomonas paucimobilis*. Gen koji dovodi do ekspresije ovog enzima je *LinA* kojeg su Nagata i suradnici (1993) uspjeli izolirati iz bakterije. Iako još nije osmišljen protokol za unos tih gena u biljke, u budućnosti, promjenom genoma biljke *Withania somnifera* mogla bi dovesti do vrlo efikasne fitoremedijacije pesticida ove vrste Abhilash i sur.(2009).

4. Transgene biljke u fitoremedijaciji tla od metala

Za razliku od organskih spojeva metali se ne mogu metabolizirati ili pretvoriti u manje toksične oblike. Poneki metali poput selena i žive moguće je pretvoriti u njihove volatilne oblike te ispustiti u atmosferu. Fitoremedijacija metala u tlu zahtjeva biljke velike biomase, otporne na metale i koje ih mogu translocirati iz korijenja u izdanke ili spremiti u vakuole. Većina izoliranih gena koji uvjetuju mogućnost translokacije metala, spremanje u izdanke i vakuole pronađeni su u biljkama sposobnim za hiperakumulaciju metala u svoje organe (npr. uročnjak). Većina takvih biljaka male je veličine, niskog rasta, i žive samo na određenim područjima što ih čini nepogodnim za fitoremedijaciju. Stoga, znanstvenici pokušavaju prenijeti gene odgovorne za hiperakumulaciju u biljke puno veće biomase te dubljeg i šireg korijenja poput breze i topole.

Dhankher i suradnici (2002) uspjeli su dobiti transgene biljke uročnjaka koje eksprimiraju gene iz soje i bakterije *Escherichia coli* odgovorne za prijenos i spremanje arsena u vakuole. Transgene biljke rasle su značajno bolje u odnosu na kontrolne biljke, dok su kontrolne biljke imale male i bolesne izdanke. Nakon nekoliko tjedana biomasa transgenih biljaka je bila 6 puta veća u odnosu na kontrolnu skupinu, te je nakupljala 3 puta više arsena iz tla.

Živa je metal koji stvara značajne probleme u prehrambenom lancu jer ih ribe apsorbiraju iz vode. Rugh (1996) je trasformirao uročnjak s genom *merA*, iz bakterije koja je imuna na živu. Gen *merA* kodira enzim živinu-reduktazu. Transgene biljke razvile su otpornost, te uspijevaju preživjeti u mediju koji je iznimno otrovan za netransformirane biljke. Gen *merA* je kasnije korišten u daljnjim istraživanjima na topolama kojea su također pokazale povećanu otpornost i bolju apsorpciju žive u organizam. Transgene biljke mogu preživjeti letalne doze tog metala jer ga pretvaraju u manje volatilni oblik.

Još jedan metal koji je čest u zagađenim tlima je selen. On je toksičan u visokim koncentracijama jer zamjenjuje sumpor u proteinima. S druge strane, sisavci imaju enzim selenocistein-liazu koja to sprječava, stoga su znanstvenici odlučili napraviti transgenu uročnjak koji će eksprimirati gen za selenocistein-liazu. Rezultati su pokazali da su biljke koje su eksprimirale navedeni gen imale veću otpornost na selen. Transgene biljke pokazale su puno brži rast korijena, dok je povećanje apsorpcije selena bila je minimalna (Pilon i sur. 2003). Pilon i suradnici su isto tako napravili istraživanje na smeđoj gorušici (*Brassica*

juncea) koja je eksprimirala transgen za ATP-sulfurilazu. Transgene biljke su pokazale 4.3 puta veću sposobnost akumulacije selena u listovima u odnosu na kontrolne biljke.

Za ostale teške metale znanstvenici su također imali puno uspjeha u stvaranju transgenih biljaka za fitoremedijaciju. Fitokelatini su molekule koje se vežu na metale i pomažu u otpornosti organizma. U duhan *Nicotiana glauca* je prenesen gen iz pšenice koji kodira enzim fitokelatin-sintazu, a koja povećava koncentraciju fitokelatina u organizmu. Rezultati pokazuju da transgeni duhan akumulira više metala nego kontrolna biljka. U hidroponskim uvjetima transgeni duhan je akumulirao 24 puta više kadmija kroz korijenje i 3 puta više u listovima, 36 puta više olova u korijenu i 9 puta više u listovima, 12 puta više bakra u listovima biljke nego u kontrolnim biljkama. Također, biljke s transgenom za fitokelatin-sintazu su puno bolje rasle i imale veću biomasu (Martinez i sur., 2006).

5. ZAKLJUČAK

Čovjek je svojim utjecajem zagadio zrak, tlo i vodu. U potrazi za efikasnim rješenjem otkriveno je da određene biljke mogu svojim metabolizmom razgraditi i neutralizirati štetne spojeve u tlu. Proces je nazvan fitoremedijacija. Zbog različitih prepreka poput dugog vegetativnog razdoblja, fitotoksičnosti štetnih tvari, logističkih poteškoća i nedovoljno znanstvenih istraživanja, fitoremedijacija još nije dosegla široku upotrebu.

Različita su istraživanja pokazala kako drugi organizmi poput ljudi, sisavaca i mikroogranizama imaju već razvijene metabolizme za neutraliziranje štetnih tvari, koje su inače prisutne u tlima. Razvoj genetičkog inženjerstva omogućio je znanstvenicima prijenos gena koji pokreću te metabolizme u biljkama. Cilj je ubaciti gen koji kodira enzime koji mogu degradirati, akumulirati ili neutralizirati štetne tvari iz okoliša.

Dokazano je da te transgene biljke imaju puno veću otpornost i mogućnost razgradnje štetnih elemenata. Sama tehnologija rekombinantne DNA nije još dovoljno daleko uznapredovala da bi iskoristili fitoremedijaciju kao ključno rješenje u čišćenju okoliša. Istraživanja su vrlo obećavajuća i potrebno je potaknuti svijest o tim novim strategijama.

6. LITERATURA

Abhilash, P.C., Singh, N. (2008) Distribution of hexachlorocyclohexane isomers in soil samples from a small scale industrial area of Lucknow, North India, associated with lindane production. Chemosphere 73: 1011–1015.

Abhilash P.C., Singh N. (2009) *Withania somnifera* Dunal mediated dissipation of lindane from simulated soil: implications for rhizoremediation of contaminated soils. Journal of Soils and Sediments

Baker, A.J.M., Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1: 81-126.

Cherian S., Oliveira M.M. (2005) Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. Environmental Science and Technology 39: 9377–9390.

Dhankher O.P., Li Y., Rosen B.P., Shi J, Salt D., Senecoff J.F., Sashti N.A., Meagher R.B. (2002**)** Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. Nature Biotechnology 20: 1140–1145.

Doty S.L. (2008) Enhancing phytoremediation through the use of transgenic plants and entophytes. New Phytologist 179:318–333.

Doty S.L., Shang Q.T., Wilson A.M., Moore A.L., Newman L.A., Strand S.E. i sur. (2007) Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants contain mammalian P450 2E1. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97:6287–6291

Eapen S. i sur. (2007) Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. Biotechnology Advances 25: 442–451.

Fonne-Pfister R., Kreuz K. (1990) Ring-methyl hydroxylation of chlorotoluron by an inducible cytochrome P450 dependent enzyme from maize. Photochemistry 29: 2793–2796.

Frear D.S. (1995) Wheat microsomal cytochrome P450 monooxygenases: characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides. Drug metabolism and drug interactions 12: 329–357.

Honeycutt M.E., Jarvis A.S., McFarland V.A.. (1996) Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6- trinitrotolulene and its metabolites. Ecotoxicology and environmental safety 35: 282–287.

Inui H., Ohkawa H. (2005) Herbicide resistance plants with mammalian P450 monooxygenase genes. Pest management science 61: 286–291.

Inui H., Shiota N., Motoi Y., Ido Y., Inoue T., Kodama T. i sur. (2001) Metabolism of herbicides and other chemicals in human cytochrome P450 species and in transgenic potato plant co-expressing human CYP1A1, CYP2B6 and CYP2C19. Journal of pesticide science 26: 28–40.

Karavangeli M., Labrou N.E., Clonis Y.D., Tsaftaris A.(2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. Biomolecular engineering 22: 121–128.

Kawahigashi H., Hirose S., Ohkawa H., Ohkawa Y. (2007) Herbicide resistance of transgenic rice plants expressing human CYP1A1. Biotechnology advances 25:75–85.

Martinez M., Bernal P., Almela C., Velez D., Garcia-Agustin P., Serrano R.,Navarro-Avino J. (2006) An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. Chemosphere 64: 478–485.

Moreland D.E., Corbin F.T., McFarland J.E. (1993) Oxidation of multiple substrates by cron microsomes. Pesticide biochemistry and physiology 47: 206–214.

Nelson D.R. (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. Archives of biochemistry and biophysics 369: 1-10.

Negri M.C., Hinchman R.R., (2000). The use of plants for the treatment of radionuclides. In: Phytoremediation Of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment, Raskin, I. & Ensley, E.D. (Ed.), 107-132, New York: Wiley.

Nina K., Andrew G. M., Caroline J., Birgit K., Joanna Y.W. (2011) Phylogenetic and Functional Analysis of the Vertebrate Cytochrome P450 2 Family. Journal of Molecular Evolution 72: 56-71

Noctor G., Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 49: 249–279.

Ohkawa H., Tsujii H., Ohkawa Y. (1999) The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops. Pesticide science 55:1–8.

Orville A.M., Manning L., Blehart D.S., Fox B.G., Chambliss G.H. (2004a) Crystallization and preliminary analysis of xenobiotic reductase B from Pseudomonas fluorescens l-C. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60: 1289–1291.

Orville A.M, Manning L., Blehert D.S., Studts J.M., Fox B., Chambliss G.H. (2004b) Crystallization and preliminary analysis of xenobiotic reductase A and ligand complexes from Pseudomonas putida II-B. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60: 957–961.

Paulo C.F., Ana L.S.C., Claiton L.L.(2011). Transgenic Plants for Enhanced Phytoremediation–Physiological Studies, Genetic Transformation, María Alvarez, (Ed), IntechOpen, 305-327

Pilon M., Owen J.D., Garifullina G.F., Kurihara T., Mihara H., Esaki N., Pilon-Smits E.A.H. (2003) Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic Arabidopsis expressing a mouse selenocysteine lyase. Plant Physiology 131: 1250–1257.

Pulford I.D., Watson C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. Environment International 29: 529-540.

Ramos J.L., Gonzalez-Perez M.M, Caballero A., van Dillewijn P. (2005) Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. Current opinion in biotechnology 16: 275–281.

Robinson B.H., Mills T.M, Petit D., Fung L.E., Green S.R., Clothier B.E. (2000) Natural and induced cadmium accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. Plant and Soil 227: 301–306.

Rosser S.J., French C.E., Bruce N.C. (2001) Engineering plants for the phytoremediation of explosives. In vitro cellular & developmental biology. Plant : journal of the Tissue Culture Association 37: 330–333.

Rugh C.L., Wilde H.D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O. (1996**)** Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93: 3182–3187.

Sarma, H. (2011) Metal hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology. Journal of Environmental Science and Technology, Vol.4, No.2, 118-138.

Schmidt B., Faymonville T., Gembé E., Joußen N., Schuphan I. (2006a) Comparison of the biotransformation of the 14C-labelled insecticide carbaryl by non-transformed and human CYP1A1, CYP1A2-, and CYP3A4-transgenic cell cultures of Nicotiana tabacum. Chemistry & Biodiversity 3: 878–896.

Schmidt B., Joußen N., Bode M., Schuphan I. (2006b) Oxidative metabolic profiling of xenobiotics by human P450s expressed in tobacco cell suspension cultures. Biochemical Society transactions 34: 1241–1245.

Shiota N., Inui H., Ohkawa H. (1996) Metabolism of the herbicide chlortoluron in transgenict obacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Pesticide biochemistry and physiology 54: 190–198.

Shiota N., Nagasawa A., Sakakai T., Yabusaki Y., Ohkawa H. (1994) Herbicide-resistant tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1(CYP1A1) and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Plant Physiology 106-117.

Yang X., Jin X.F., Feng Y., Islam E. (2005). Molecular Mechanisms and Genetic bases of Heavy Metal Tolerance/Hyperaccumulation in Plants. Journal of Integrative Plant Biology, Vol.47, No.9, 1025-1035.