



Fytoremediace III.

Petr Soudek

Laboratoř rostlinných biotechnologií
Společná laboratoř ÚEB AV ČR, v.v.i. A VÚRV, v.v.i.
Akademie věd České Republiky

MECHANISMUS PŘÍJMU



PROČ ROSTLINY PŘIJÍMAJÍ TOXICKÉ KOVY ?

Table 5.2

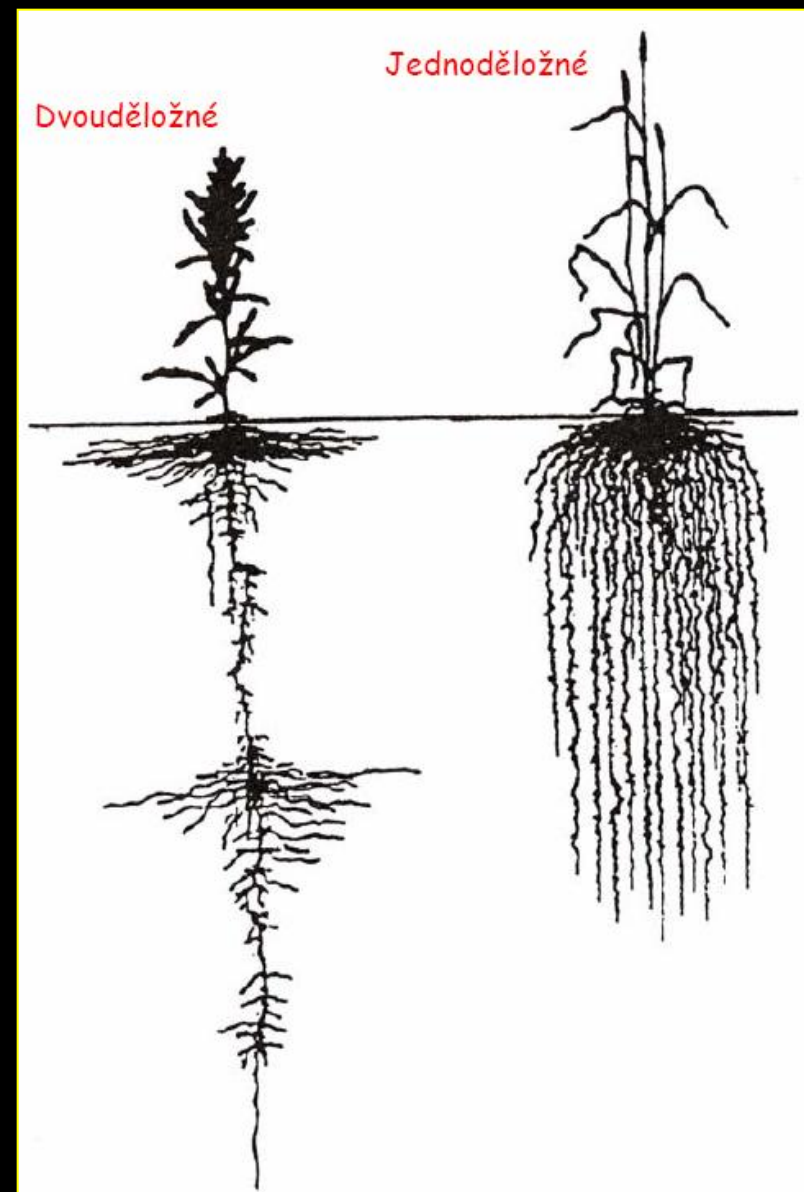
Classification of plant mineral nutrients according to biochemical function

Nutrient element	Functions
Group 1	Nutrients that form the organic compounds of plants
N	Constituent of amino acids, amides, proteins, nucleic acids, nucleotides, coenzymes, hexoamines, etc.
S	Component of cysteine, cystine, and methionine, and proteins. Constituent of lipoic acid, coenzyme A, thiamine pyrophosphate, glutathione, biotin, adenosine-5'-phosphosulfate, and 3-phosphoadenosine.
Group 2	Nutrients that are important in energy storage or structural integrity
P	Component of sugar phosphates, nucleic acids, nucleotides, coenzymes, phospholipids, phytic acid, etc. Has a key role in reactions in which ATP is involved.
B	Complexes with mannitol, mannan, polymannuronic acid, and other constituents of cell walls. Involved in cell elongation and nucleic acid metabolism.
Si	Deposited as amorphous silica in cell walls. Contributes to cell wall mechanical properties, including rigidity and elasticity.
Group 3	Nutrients that remain in ionic form
K	Required as a cofactor for more than 40 enzymes. Principal cation in establishing cell turgor and maintaining cell electroneutrality.
Na	Involved with the regeneration of phosphoenolpyruvate in C ₄ and CAM plants. Substitutes for potassium in some functions.
Mg	Required by many enzymes involved in phosphate transfer. Constituent of the chlorophyll molecule.
Ca	Constituent of the middle lamella of cell walls. Required as a cofactor by some enzymes involved in the hydrolysis of ATP and phospholipids. Acts as a second messenger in metabolic regulation.
Mn	Required for activity of some dehydrogenases, decarboxylases, kinases, oxidases, peroxidases. Involved with other cation-activated enzymes and photosynthetic O ₂ evolution.
Cl	Required for the photosynthetic reactions involved in O ₂ evolution.
Group 4	Nutrients that are involved in electron transfers
Fe	Constituent of cytochromes and nonheme iron proteins involved in photosynthesis, N ₂ fixation, and respiration.
Cu	Component of ascorbic acid oxidase, tyrosinase, monoamine oxidase, uricase, cytochrome oxidase, phenolase, laccase, and plastocyanin.
Zn	Constituent of alcohol dehydrogenase, glutamic dehydrogenase, carbonic anhydrase, etc.
Mo	Constituent of nitrogenase, nitrate reductase, and xanthine dehydrogenase.
Ni	Constituent of urease. In N ₂ -fixing bacteria, constituent of hydrogenases.

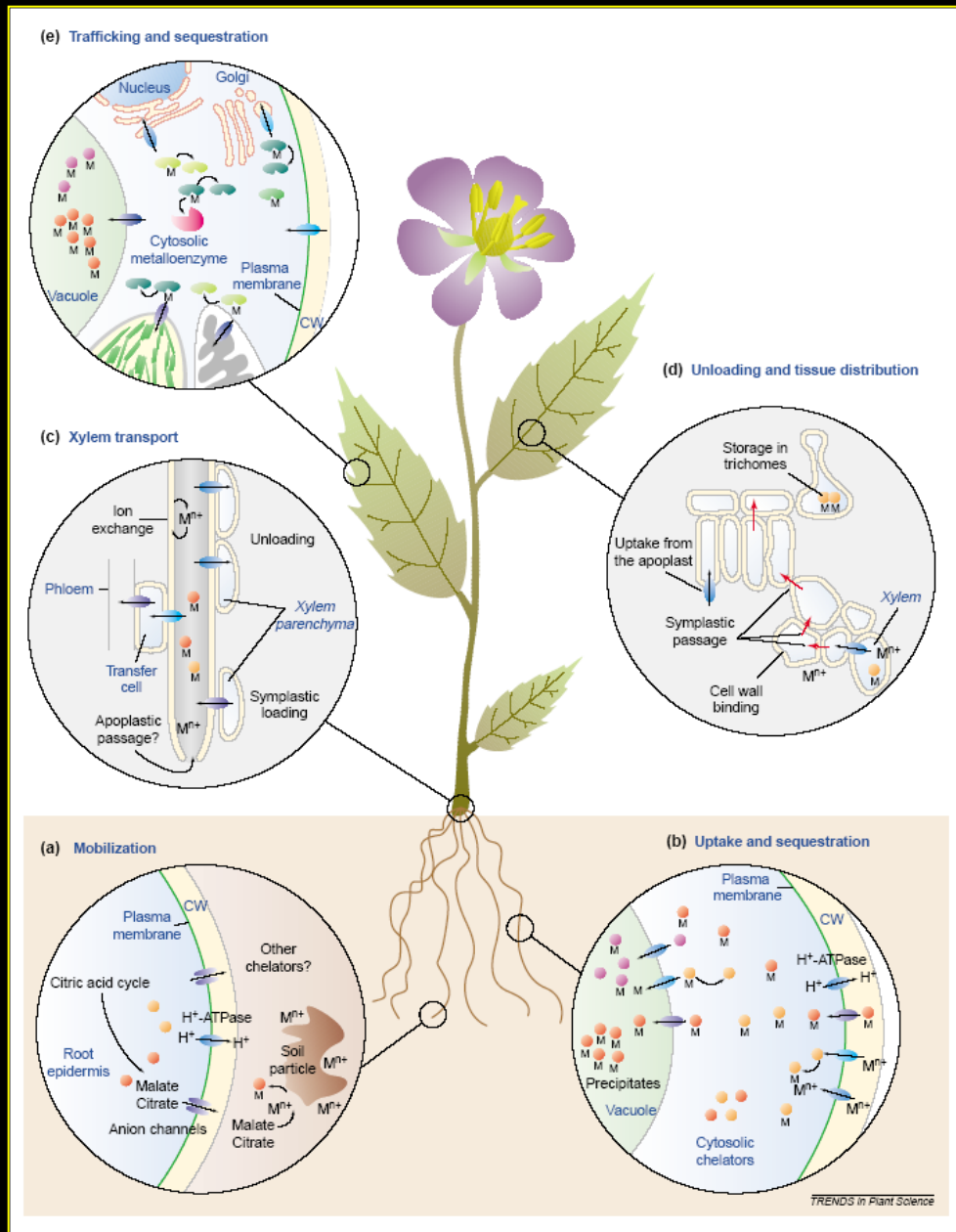
Source: After Evans and Sorget 1966 and Mengel and Kirkby 1987.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PŘÍJEM IONTŮ KOŘENEM

- ✓ velikost a architektura kořenového systému
- ✓ morfologie kořene (průměr, kořenové vlásky)
- ✓ kapacita pro příjem živin na jednotku délky nebo plochy kořene
- ✓ schopnost uvolňování látek, které ovlivňují chemické vlastnosti rhizosféry
- ✓ mykorrhiza

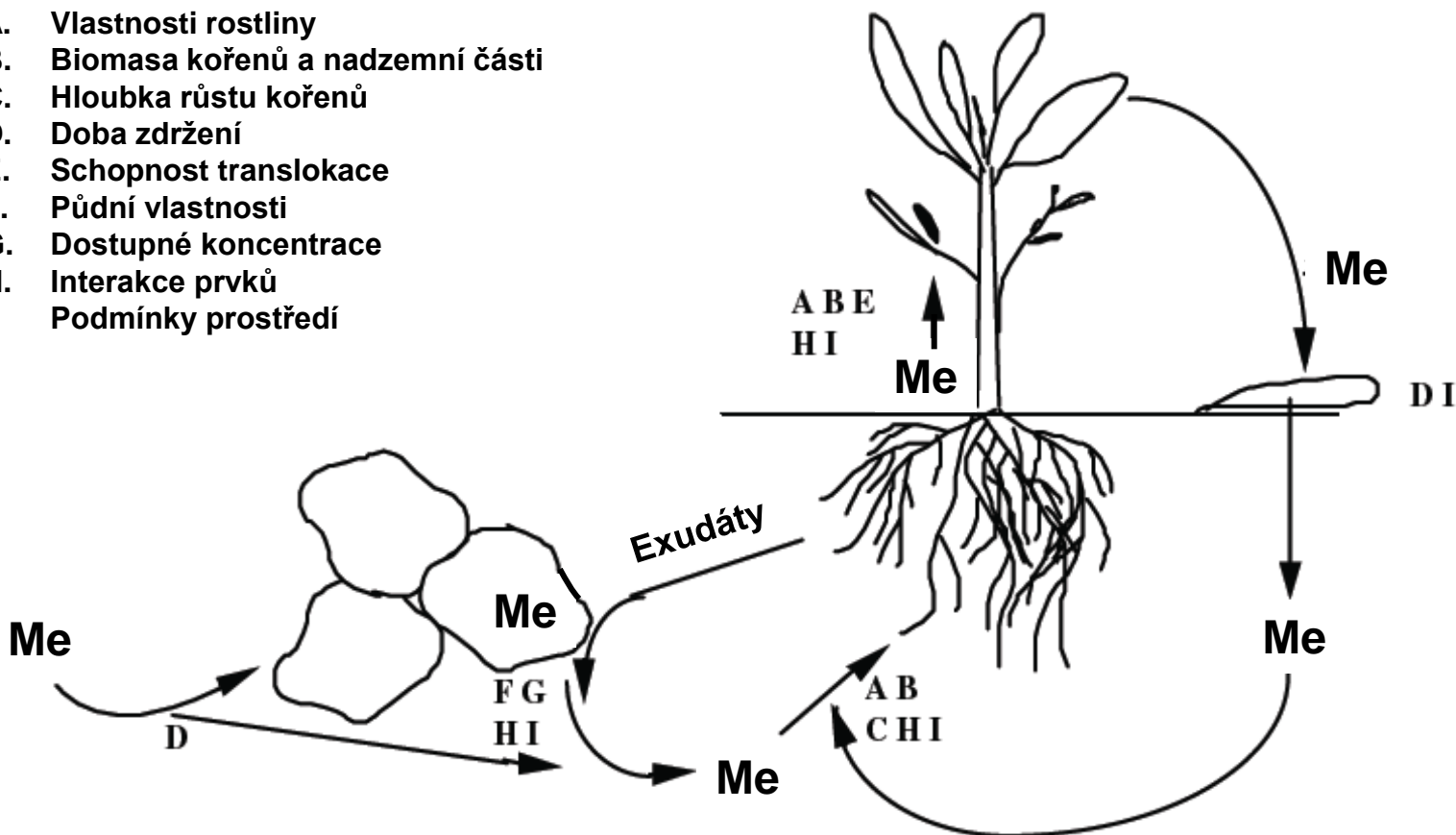


MECHANISMUS PŘÍJMU KOVŮ

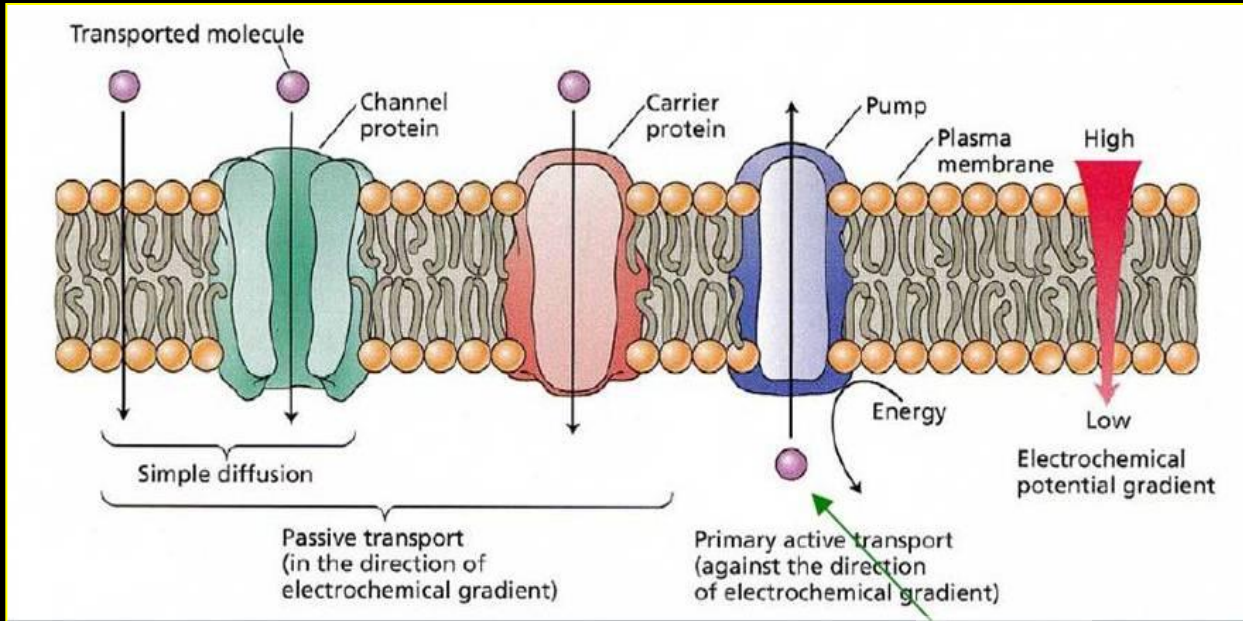


FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PŘÍJEM KOVŮ

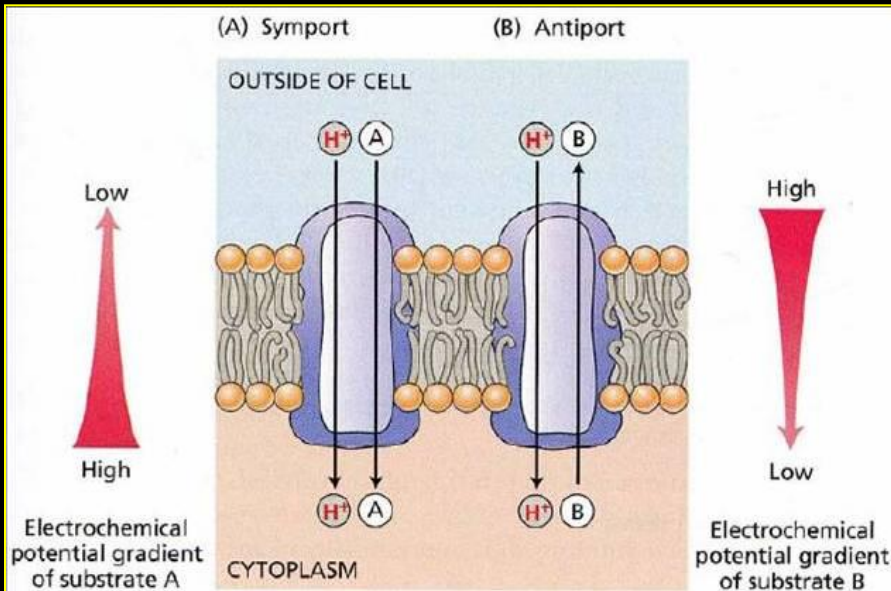
- A. Vlastnosti rostliny
- B. Biomasa kořenů a nadzemní části
- C. Hloubka růstu kořenů
- D. Doba zdržení
- E. Schopnost translokace
- F. Půdní vlastnosti
- G. Dostupné koncentrace
- H. Interakce prvků
- I. Podmínky prostředí



TRANSPORTNÍ PROCESY NA MEMBRÁNÁCH



H^+ , Ca^{2+}



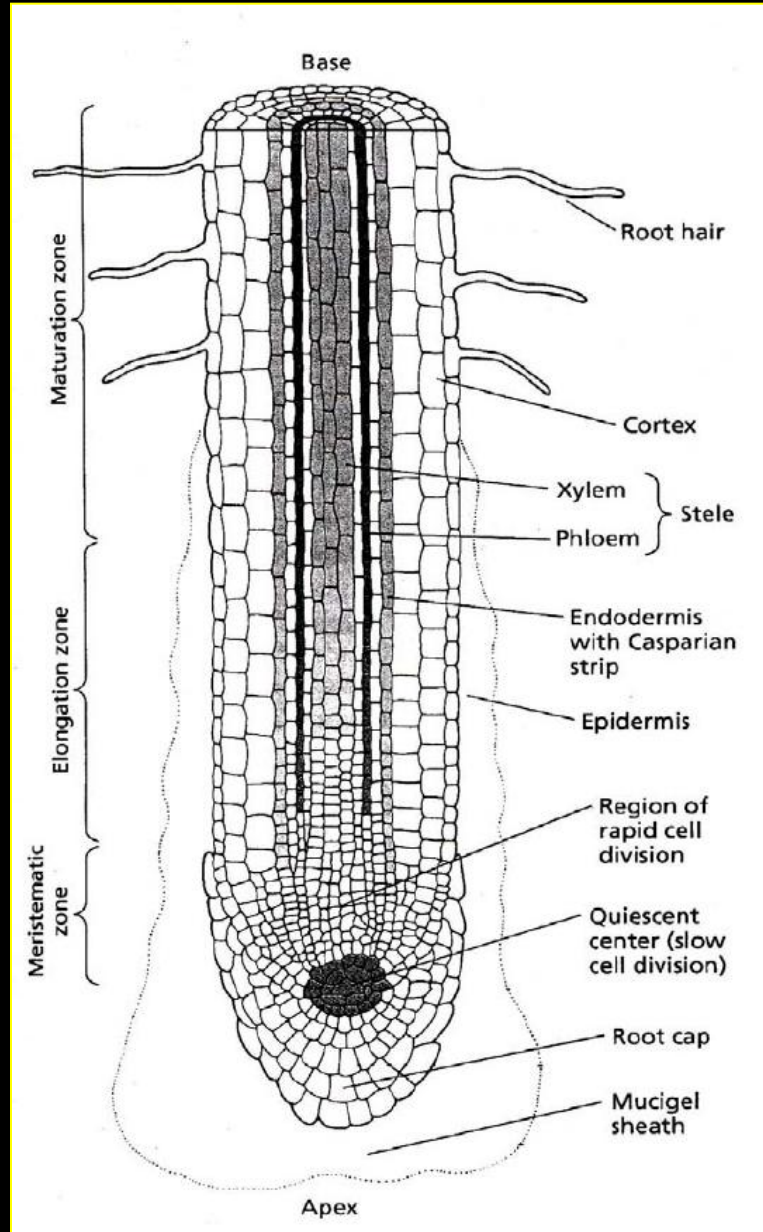
Pasivní

- prostá difuze
- zprostředkovaný transport
kanály
přenašeče

Aktivní

- primární aktivní transport
membránové pumpy
- sekundární aktivní transport
symport
antiport

KOŘEN

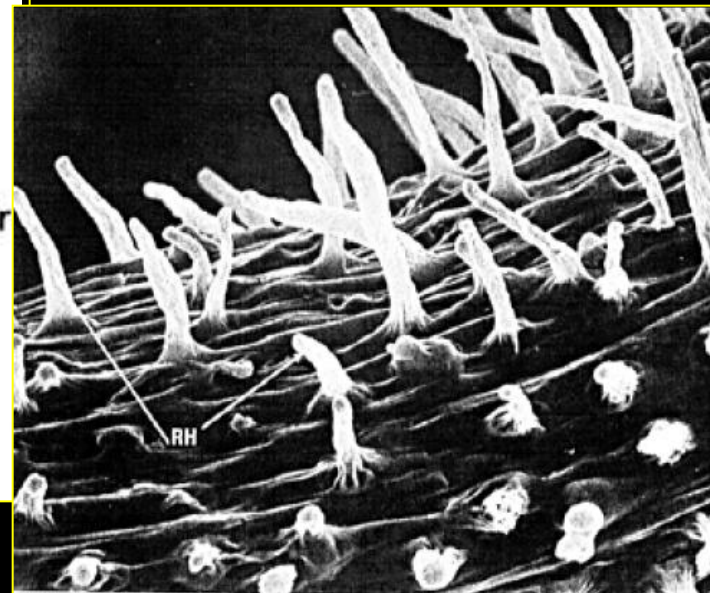
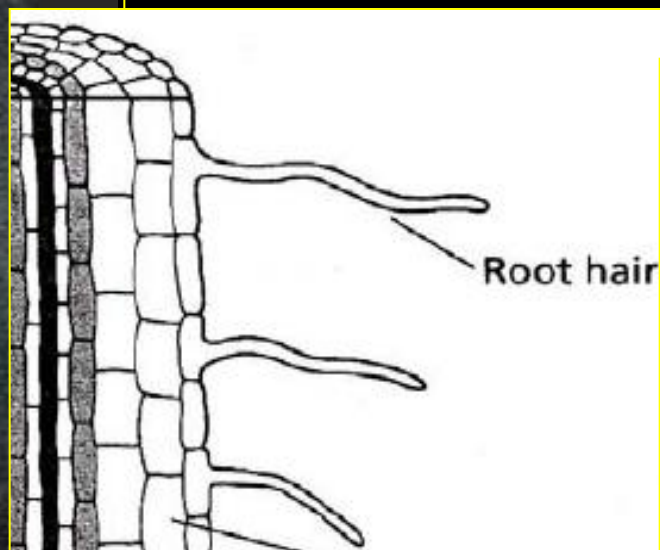


KOŘENOVÉ VLÁSKY

- výrůstky rhizodermálních buněk (trichoblastů)
- počet (kolem 100 na mm²), délka (200-300 a někdy i přes 1000 μm) a životnost (několik dní) dána genotypem i vnějšími podmínkami
- vliv fytohormonů (auxin a ethylen)

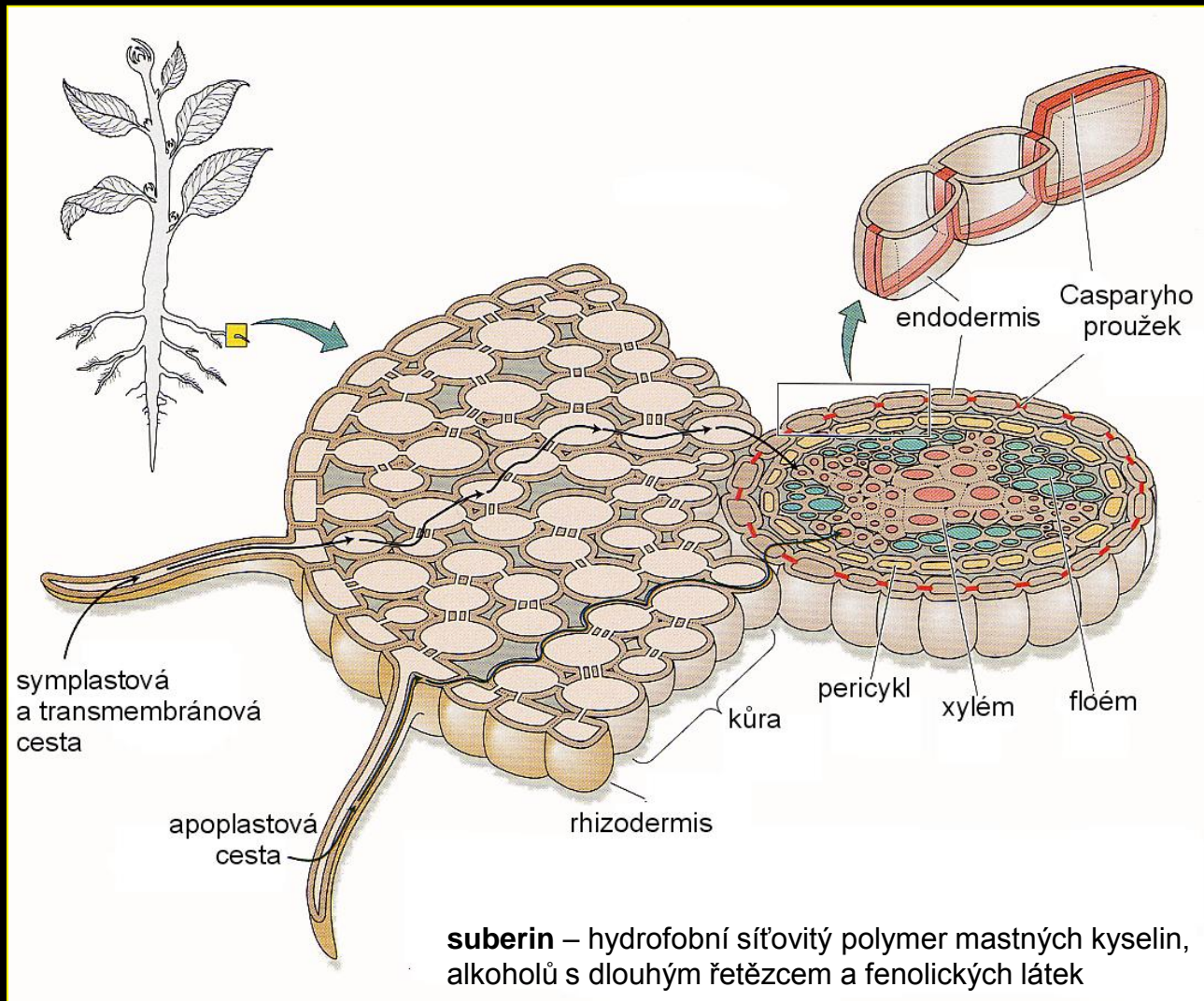
Význam:

- zvětšení povrchu kořene
- schopnost proniknout do malých půdních pórů
- účinnější příjem živin ze substrátu (díky menšímu průměru)



PŘÍJEM LÁTEK KOŘENY

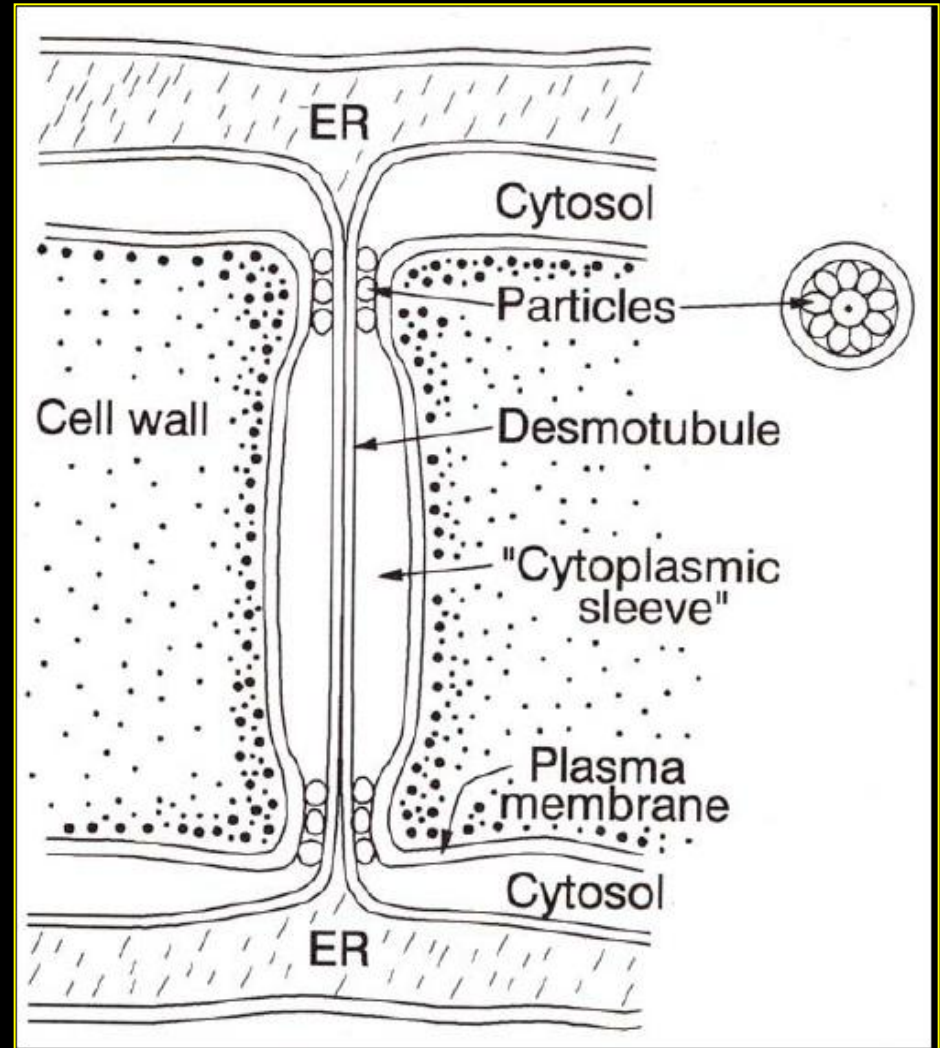
cesty : apoplast – symplast
bariéra – plazmatická membrána (Casparyho proužky)



TRANSPORT IONTŮ SYMPLASTEM

Transport prostřednictvím plasmodesmů
(kontinuum cytoplasmy a membrán)

- Možnost uzavírat plasmodesmy v reakci na vnější podmínky (deficience živin, kyslíku)
- Výskyt plasmodesmů v rostlině nerovnoměrný
- Primární a sekundární plasmodesmy



TRANSPORT LÁTEK DO XYLÉMU

Dochází ke koncentrování iontů v xylému, za nimi vstupuje voda a zvyšuje se tlak, hlavní hnací silou transportu látek v xylému je ale rozdíl vodních potenciálů v systému půda, rostlina, atmosféra

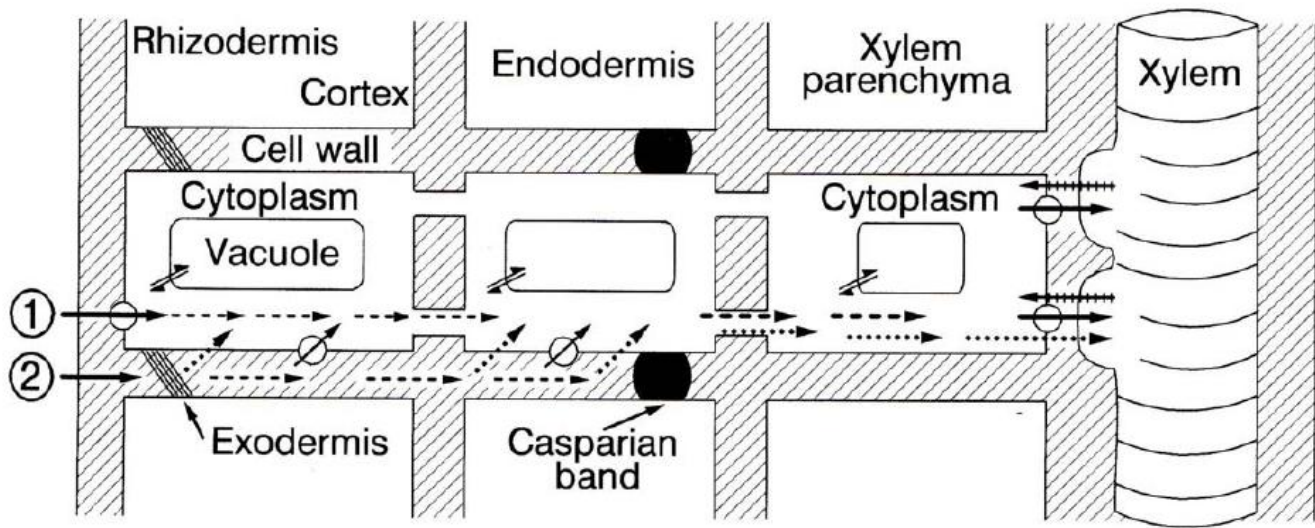


Fig. 2.35 Model for symplasmic (1) and apoplasmic (2) pathways of radial transport of ions across the root into the xylem. Key: ⊕→, active transport; ←⊖, resorption. (Modified from Läuchli, 1976a.)

ENDOMYKORHIZA

Při endomykorrhize neboli endotrofní mykorrhize pronikají houbová vlákna dovnitř do kořenových buněk rostliny. Známe několik druhů endomykorrhizy. Nejčastější houboví symbionti jsou z oddělení *Glomeromycota*.

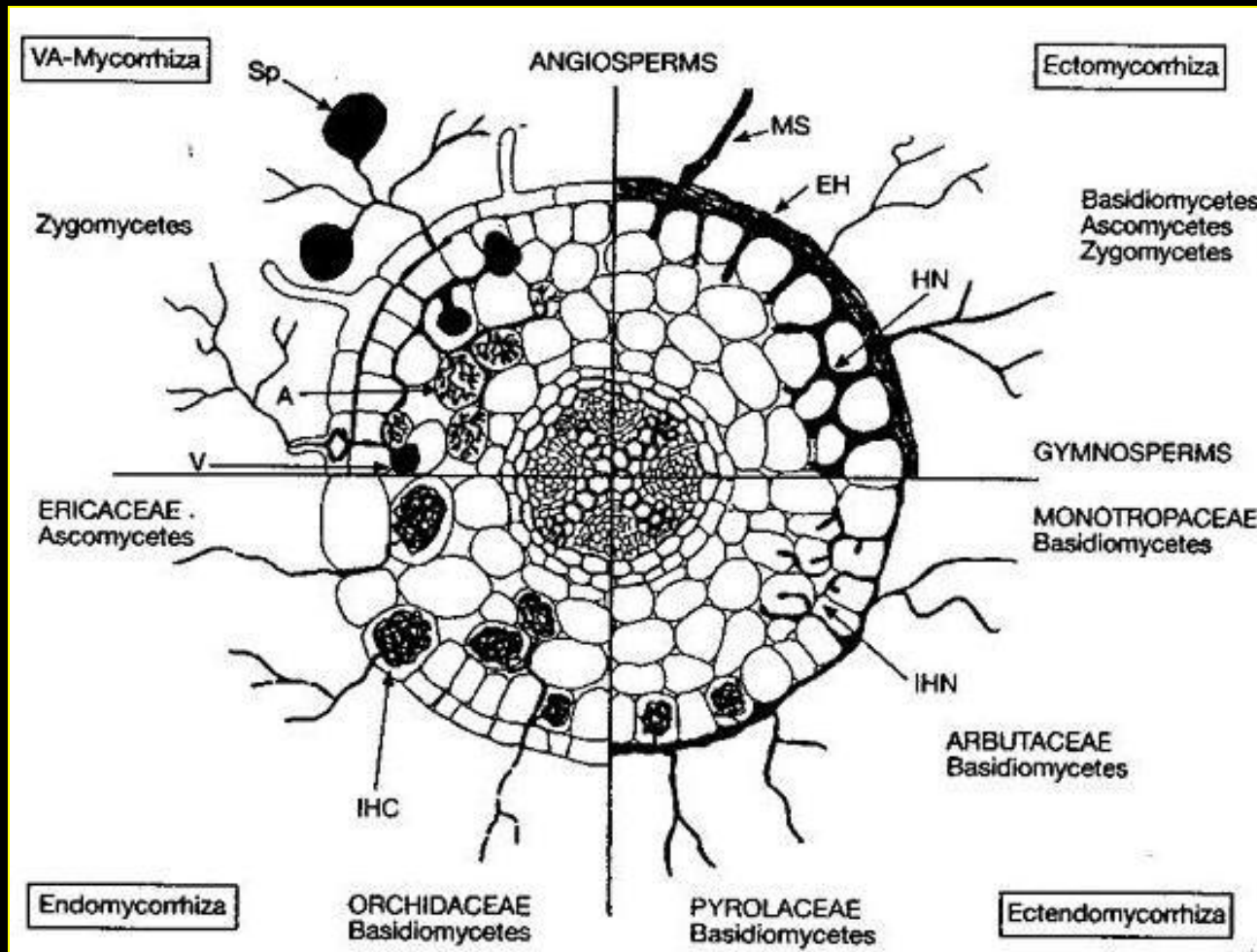
- **Arbuskulární mykorrhiza** (vezikulo - arbuskulární): v buňkách se hyfy větví do stromečkovitého útvaru - arbuskulu. Je to nejčastější druhy endomykorrhizy.
- **Erikoidní mykorrhiza** (vřesovcotvaré a *Epacridaceae*)
- **Orchideoidní mykorrhiza** (orchideje), včetně mykotrofie



EKTOMYKORHIZA

- méně častá (asi 2000 rostlinných druhů)
- většina ektomykorhizních hub jsou vřeckaté či stopkaté houby, tedy skupiny, k nimž patří také hřib či muchomůrka, a dále zygomycety
- mezi rostliny, které jsou v ektomykorhizním svazku, patří např. dub, borovice, eukalyptus, bříza, *Dipterocarpus* či oliva
- vytváří kolem kořene tzv. *hyfový plášť*, díky němuž se zvyšuje savá plocha soustavy
- kořeny s tímto typem mykorhizy většinou díky tomu zakrňují, větví se vidličnatě a jsou ztlustlé.
- změnu ovlivňují hormony produkované houbou, například auxiny
- nejsou na svých hostitelích tolik závislé, jak tomu je u endomykorhizy

MYKORHIZA



Schématické znázornění různých typů mykorrhizy. MS – provazce hyf, EH – vnější houbový plášť, HN – Hartigova síť, IHN – vnitrobuněčná síť hyf, IHC – vnitrobuněčné houbové útvary, V – vezikuly, A – arbuskuly, Sp – spóry.

TRANSPORTNÍ PROCESY V BUŇCE

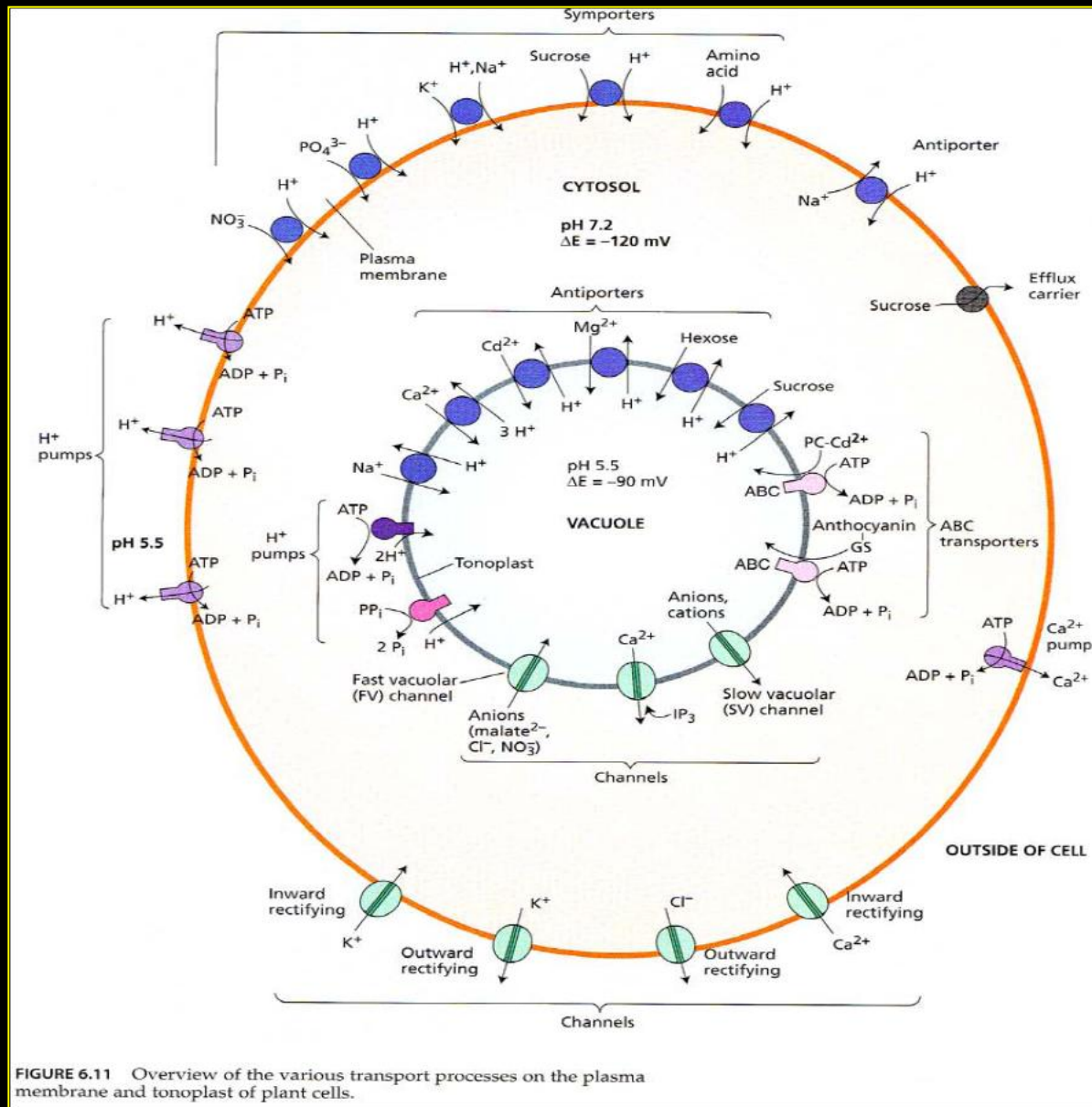
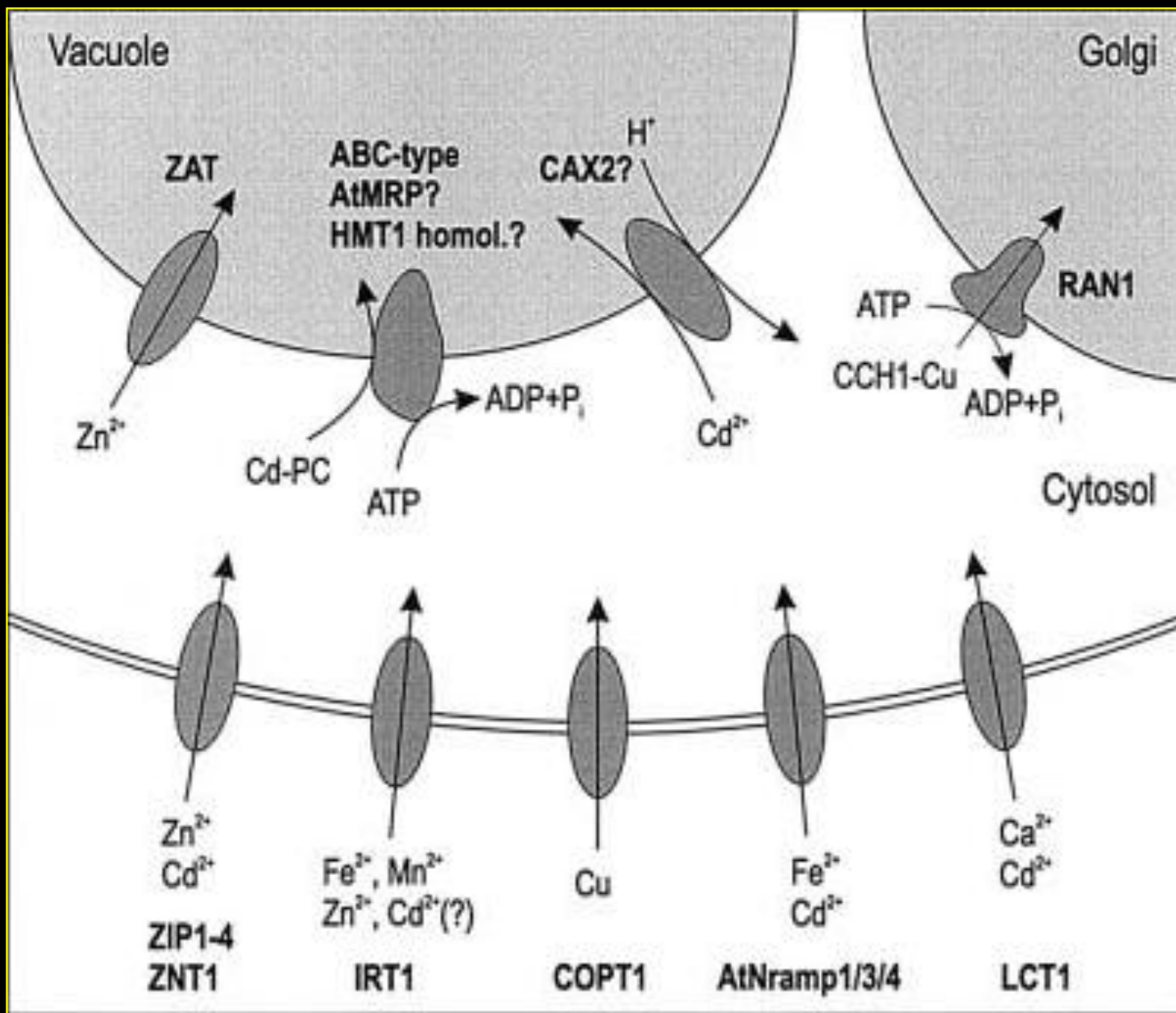
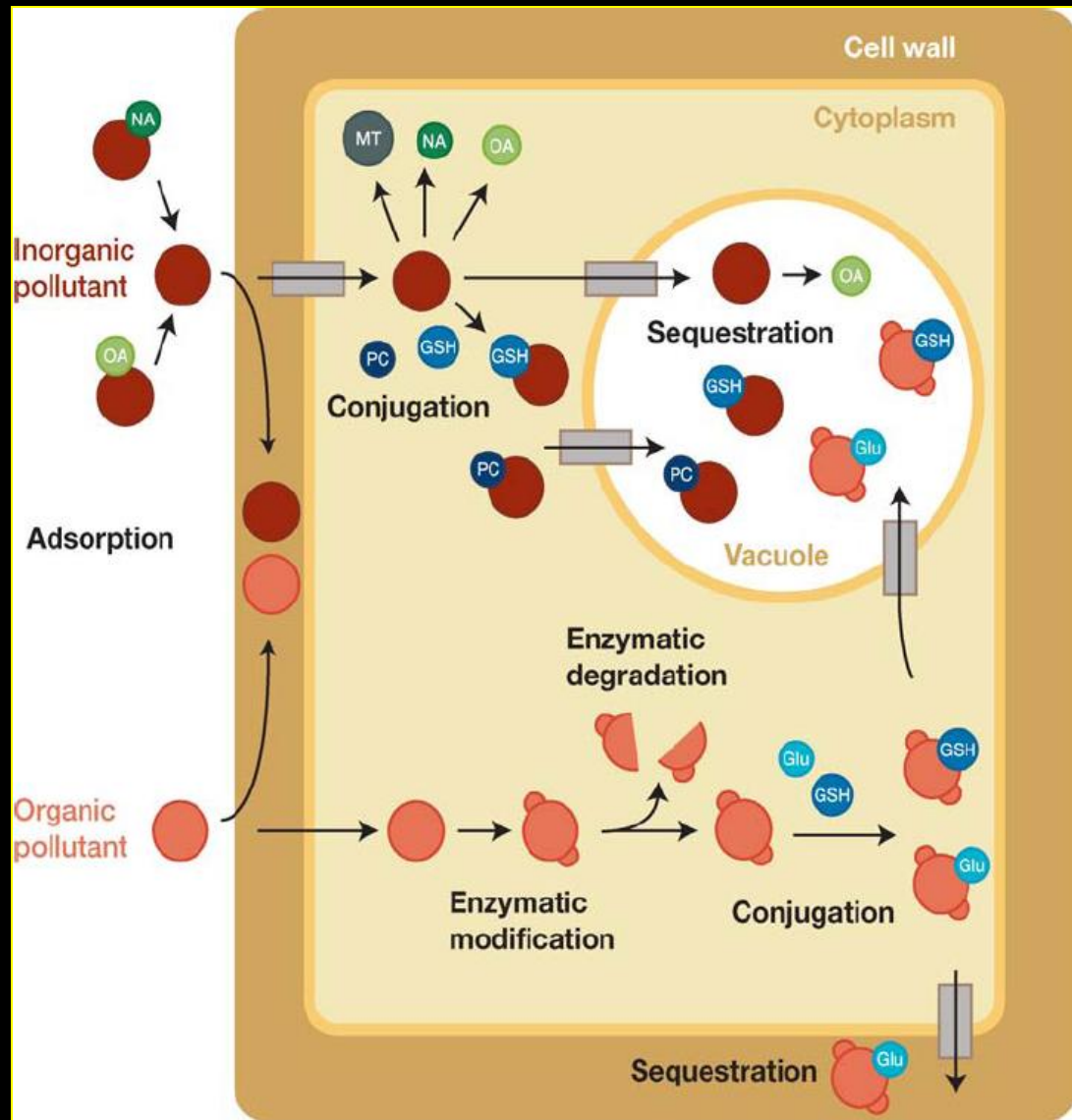


FIGURE 6.11 Overview of the various transport processes on the plasma membrane and tonoplast of plant cells.

ROSTLINNÉ TRANSPORTÉRY KOVŮ



MECHANISMUS DETOXIFIKACE TĚŽKÝCH KOVŮ



BIOLOGICKÉ CHELATUJÍCÍ SLOUČENINY

Organické kyseliny (citrónová, malonová nebo maleinová)

Aminokyseliny (cystein, histidin, methionin atd.)

Fytochelatiny (krátké polypeptidy, $(\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n = 2 - 11$)

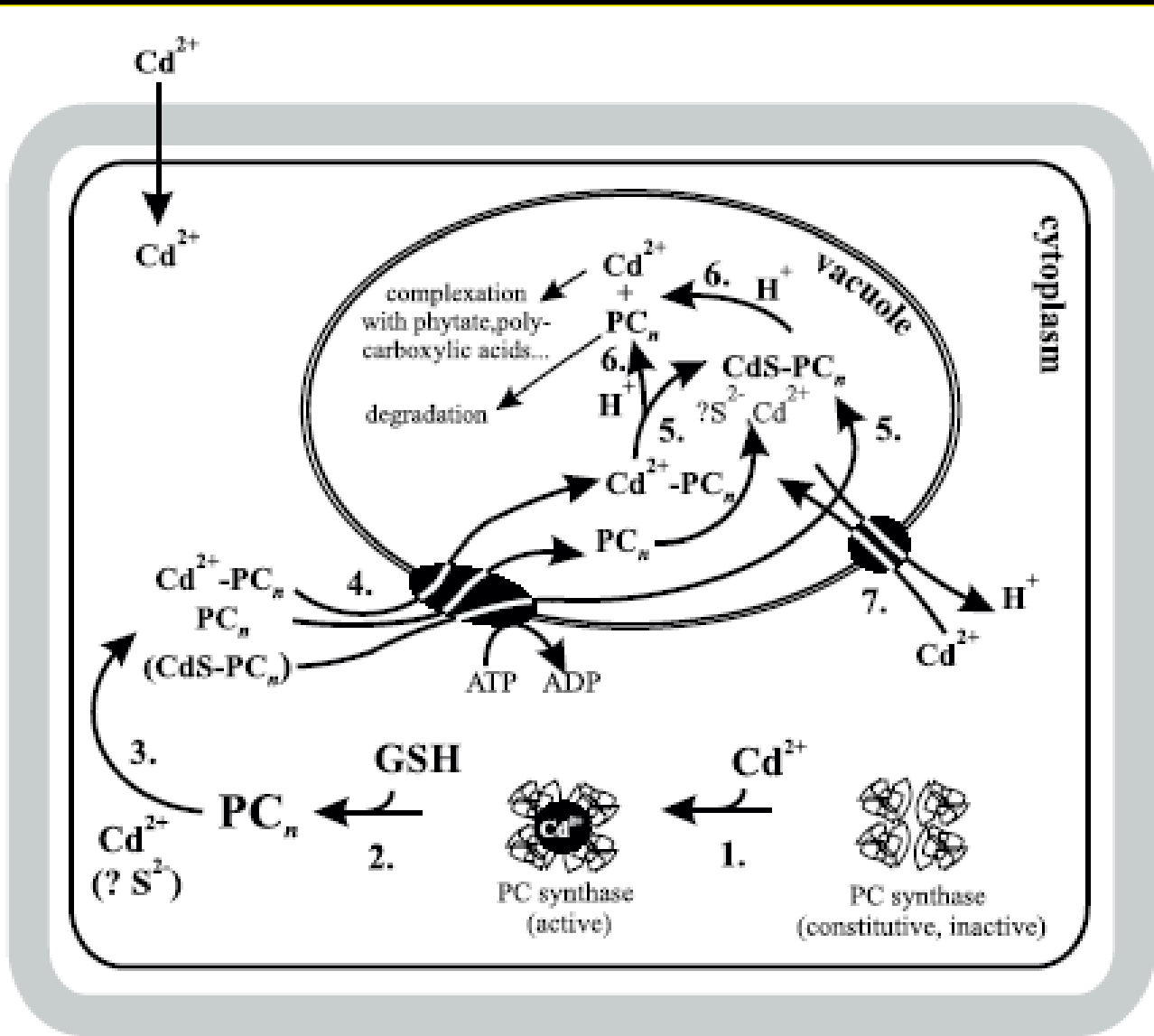
Metalothioneiny (genově kódované polypeptides)

Metallochaperony (proteiny)

„Heat shock“ proteiny



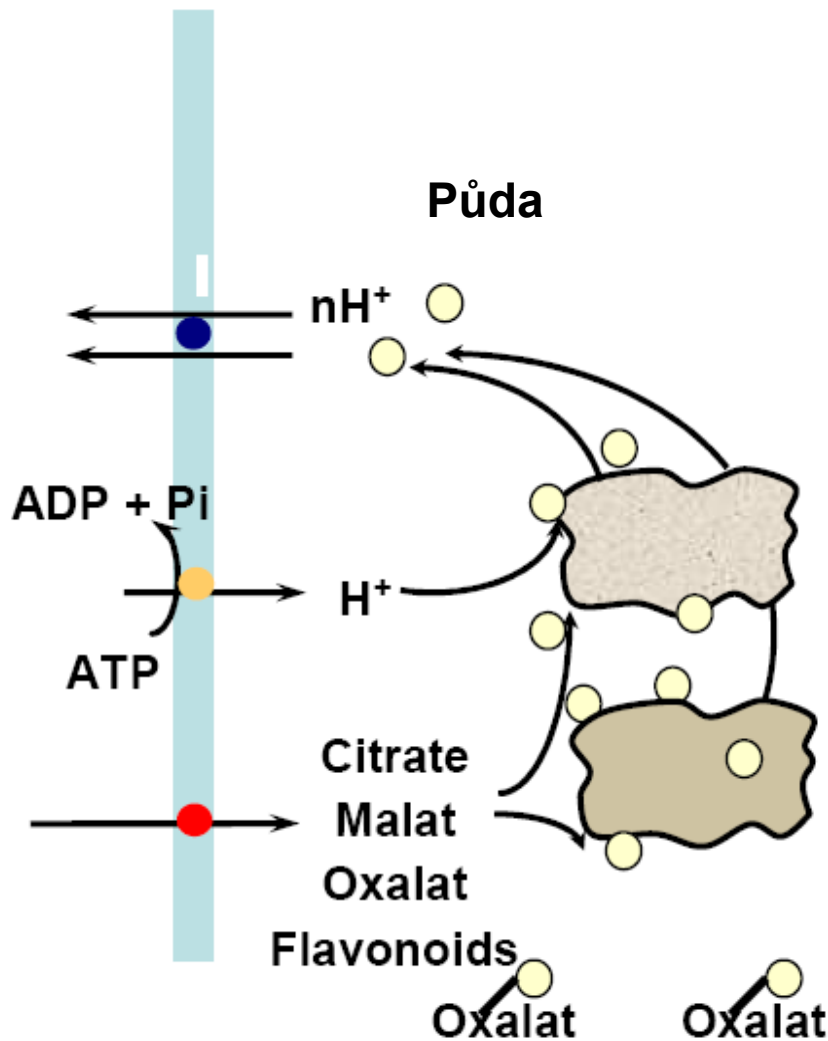
MODEL SYNTÉZY FYTOCHELATINU



KOŘENOVÉ EXUDÁTY

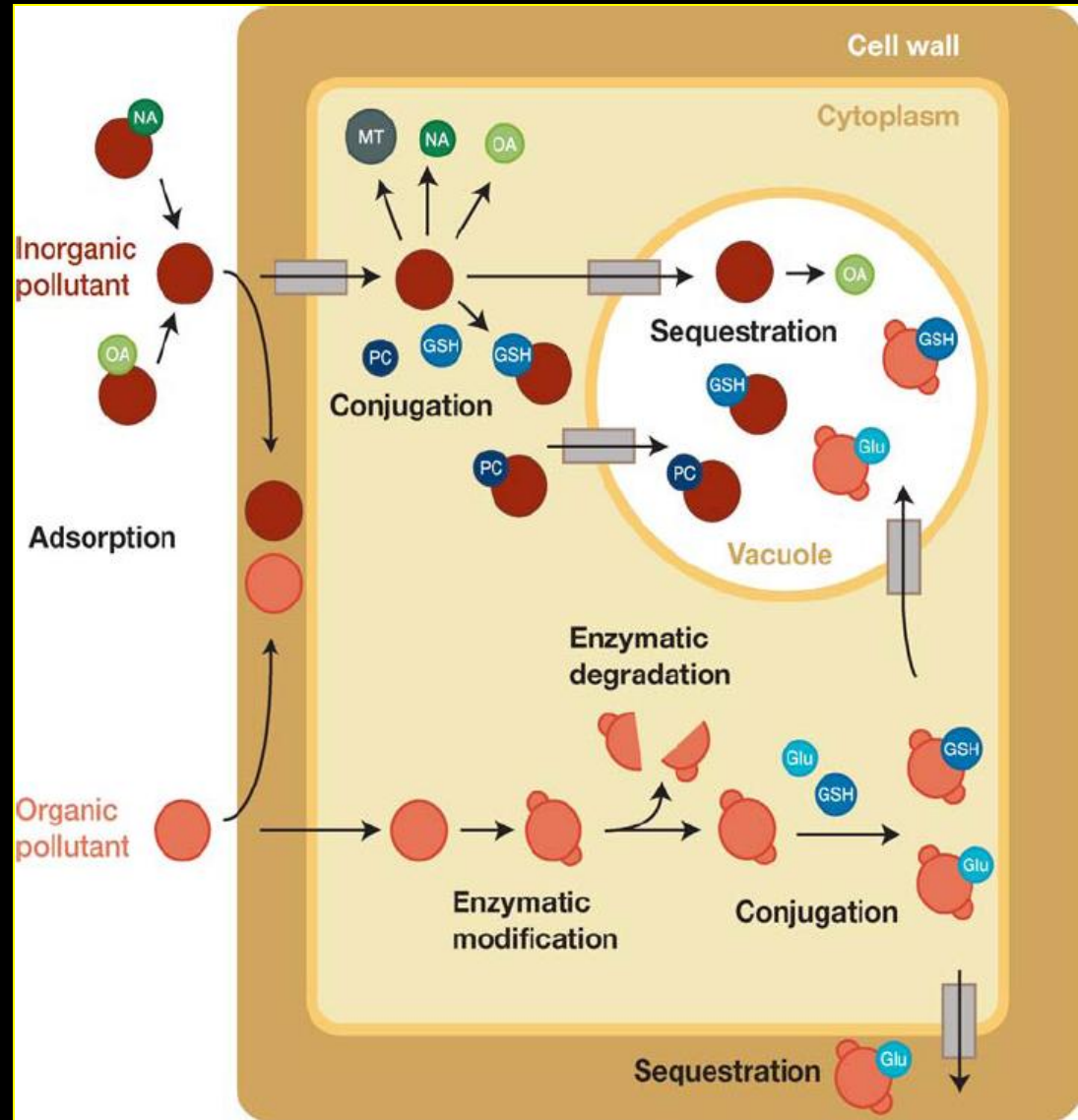
Cytosol

Půda



FÁZE BIOTRANSFORMACE ORGANICKÝCH LÁTEK

- I. Konverze - nesyntetické reakce
- II. Konjugace
- III. Kompartimentace - uskladnění



ENZYMY I. FÁZE

- Peroxidasy
- Nitroreduktasy
- Esterasy
- Cytochromy P450
 - Stovky isoform
 - Mezi druhové rozdíly
 - Konstitutivní x indukovatelné
 - Řada indukčních mechanismů



ENZYMY II. FÁZE

- **Glutathion-S-transferasy**
 - Multifunkční enzymy
 - Řada isoform
 - Cytosolické
 - Konstitutivní i indukovatelné
 - Genetický polymorfismus
 - Významná role v sensitivitě vůči herbicidům
- **Glukosyltransferasy a malonyltransferasy**
 - Odpovídá živočišné glukuronosyltransferase
 - Konjugace $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ xenobiotika s glukosou nebo kys. malonovou
 - N- nebo O- glukosylace nebo malonylace

ENZYMY III. FÁZE

- **Místo uskladnění:**
 - **Vakuoly**
 - **Buněčná stěna**
- **Důvod:**
 - **Nestabilita konjugátů**
 - **Inhibice konjugačních enzymů produktem**
- **Transport:**
 - **Velmi rychlý**
 - **ATP-dependentní přenašeče**

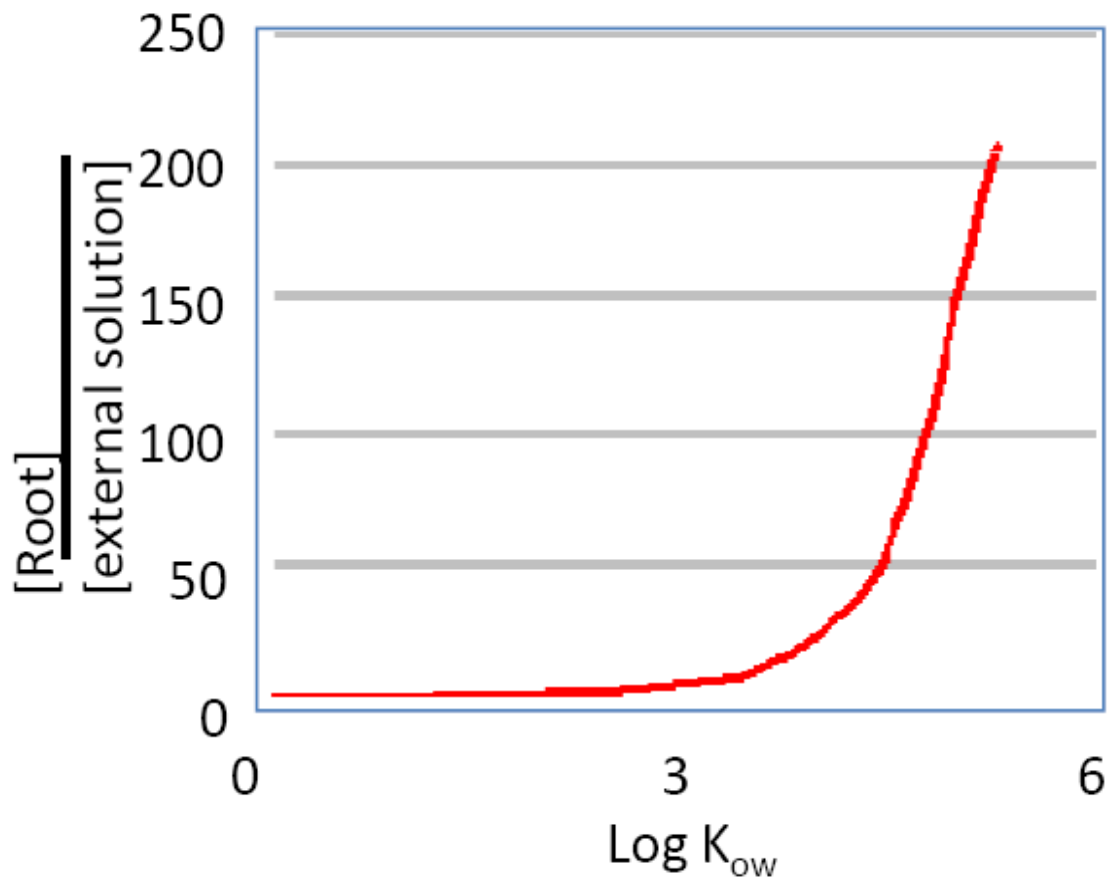


PŘÍJEM ZÁVISÍ NA MNOHA FAKTORECH

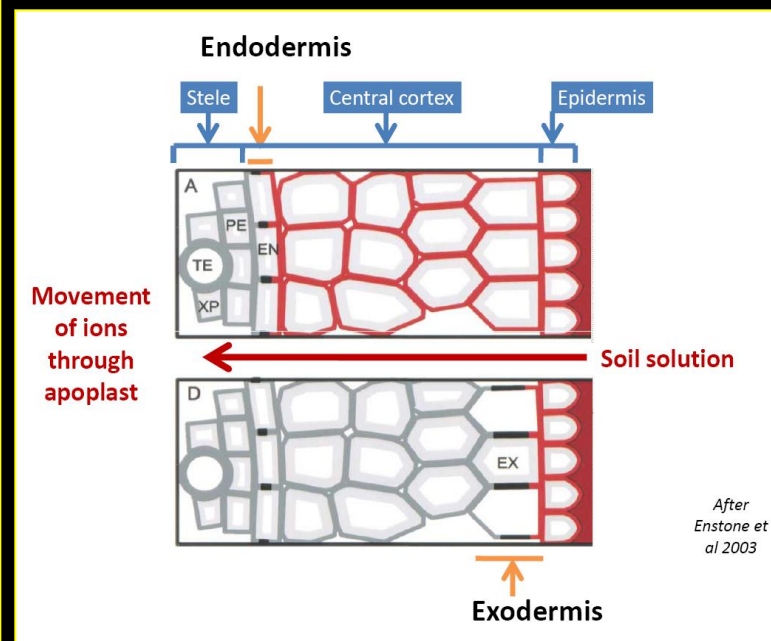
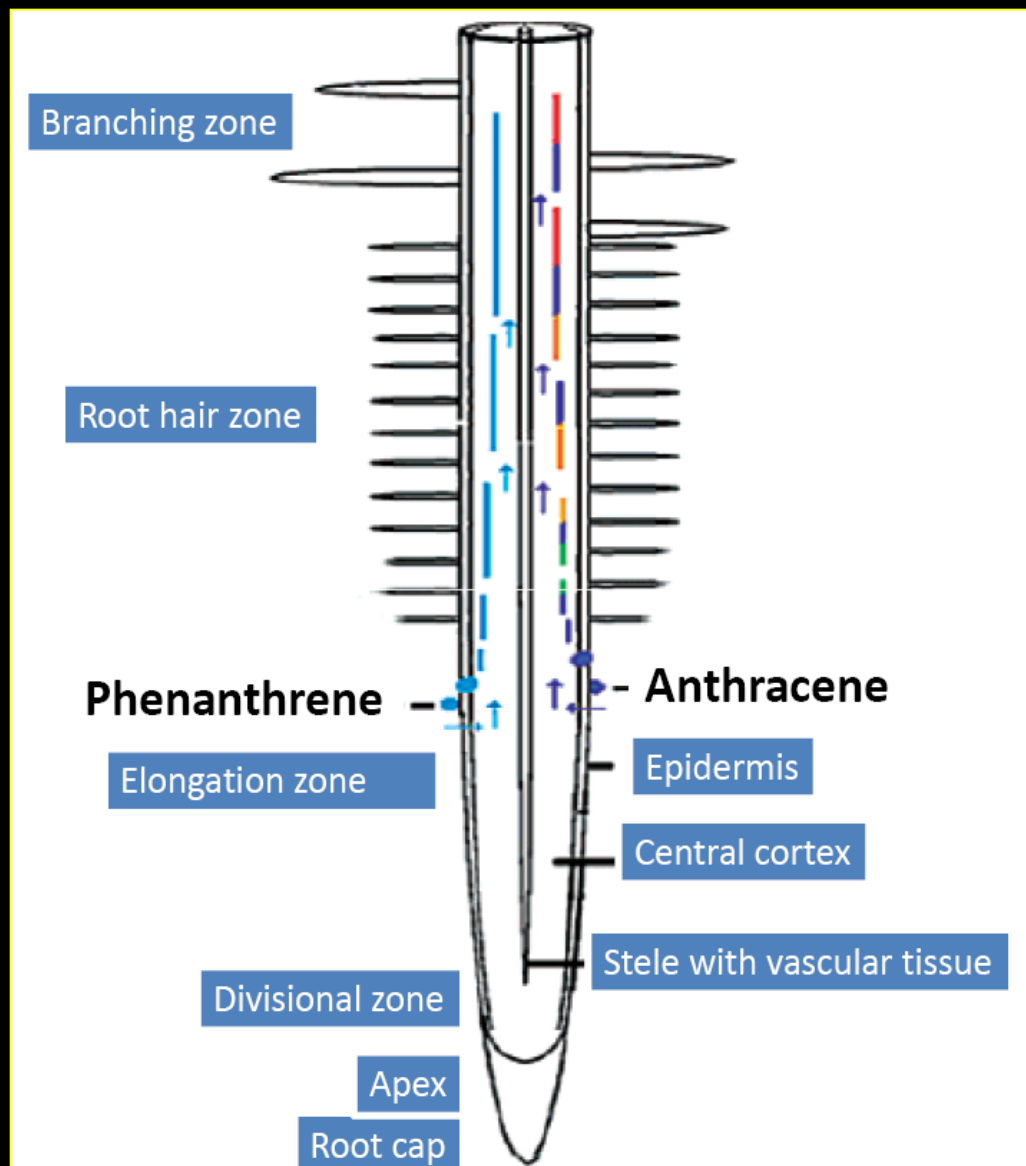
- Molekula – $\log K_{OW}$, MW
- Složení půdy (jíl, oxidy železa, organická hmota)
- Typy a množství lipidů v kořenových buňkách
- Rychlost transpirace
- Kořenové exudáty
- Snížení růstu
- Enzymatická výbava

ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT OKTANOL - VODA

Hydroponické kultury

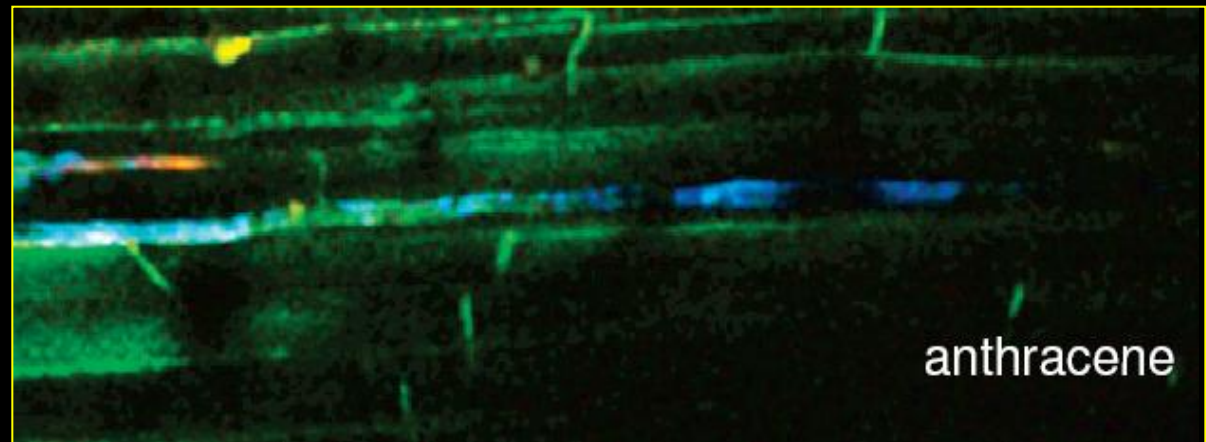
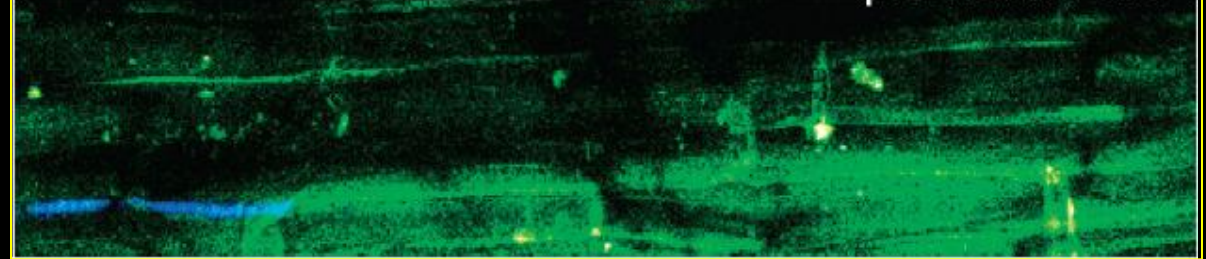
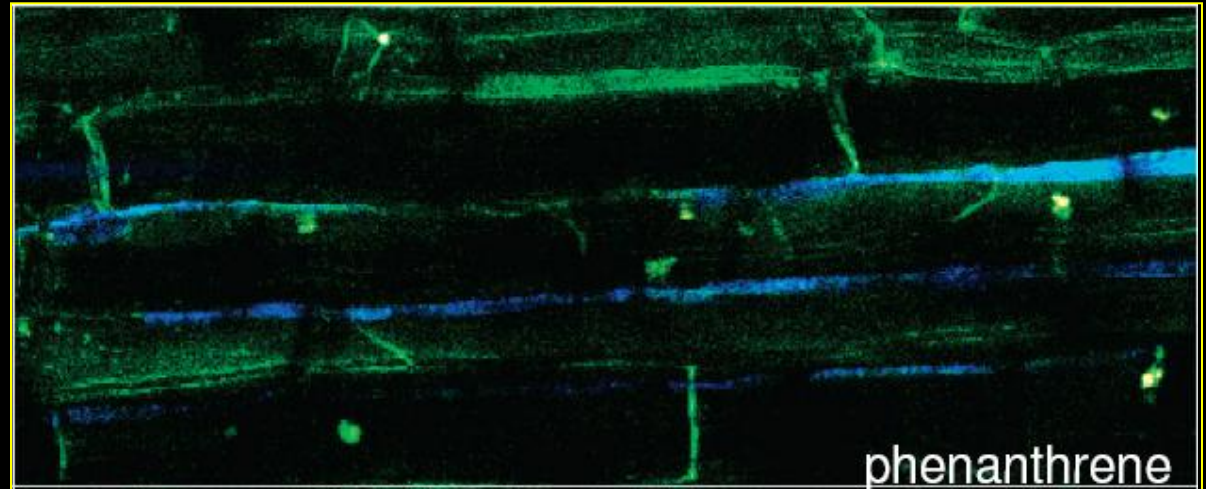


VSTUP A TRANSPORT ORG. LÁTEK V KOŘENI



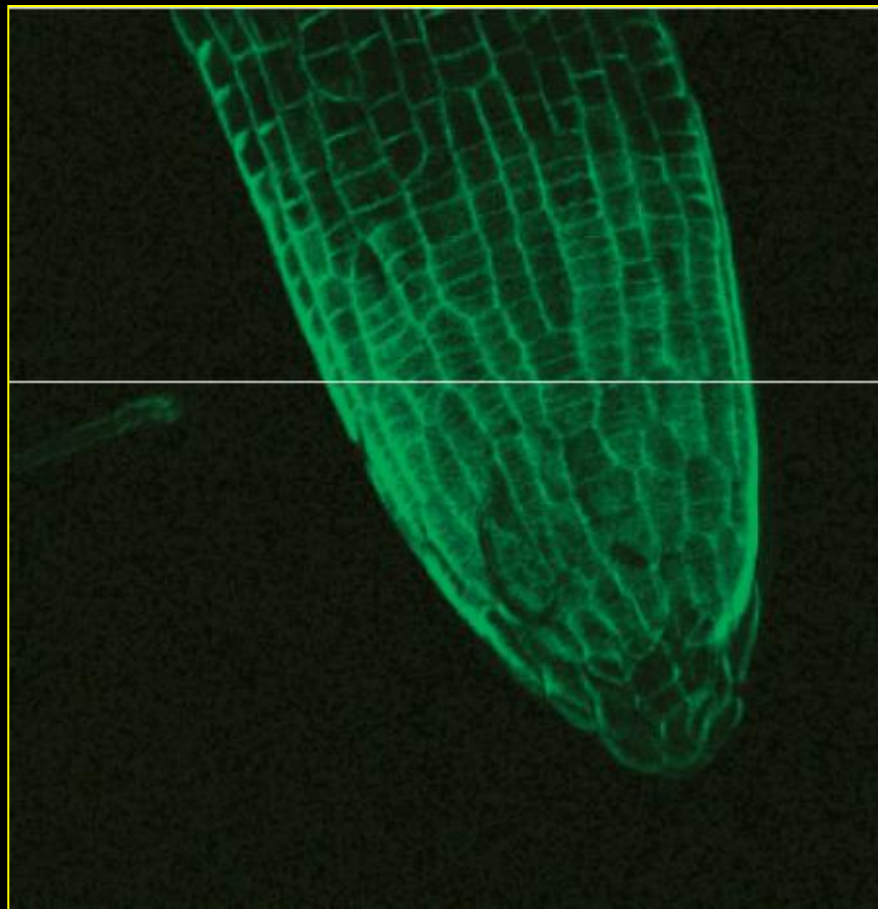
DVOUFOTONOVÁ EXCITAČNÍ MIKROSKOPIE

- Apoplastické toky nebo vazby
- Degradace v zralých kortikálních buňkách
- Žádný transport do vodivých pletiv



KOŘENOVÁ ŠPIČKA

Žádný antracén/fenantrén ve vodivých pletivech

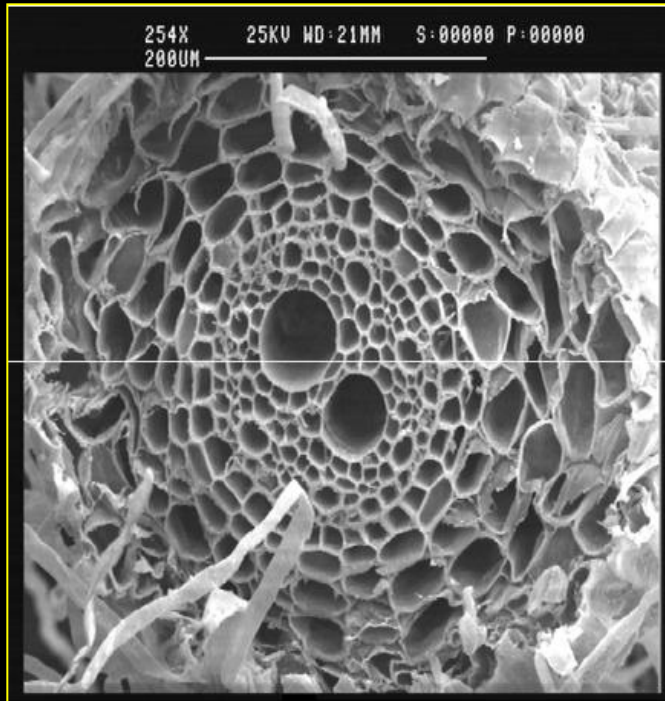


Žádný antracén/fenantrén v kořenové špičce

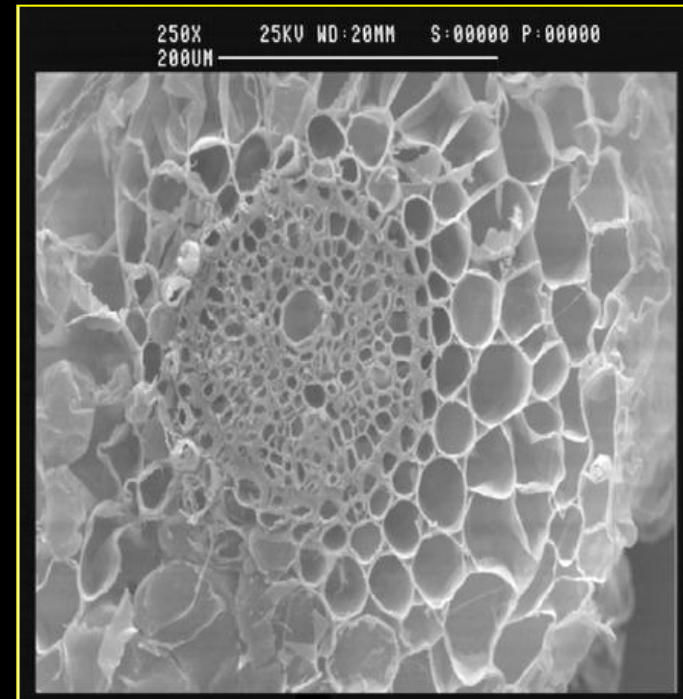
Žádný vstup látek do aktivně dělících buněk (žádný příjem vody)

VLIV NA BUNĚČNÉ ÚROVNI

Kořeny kostřavy rostoucí v:



Kontrolní půda

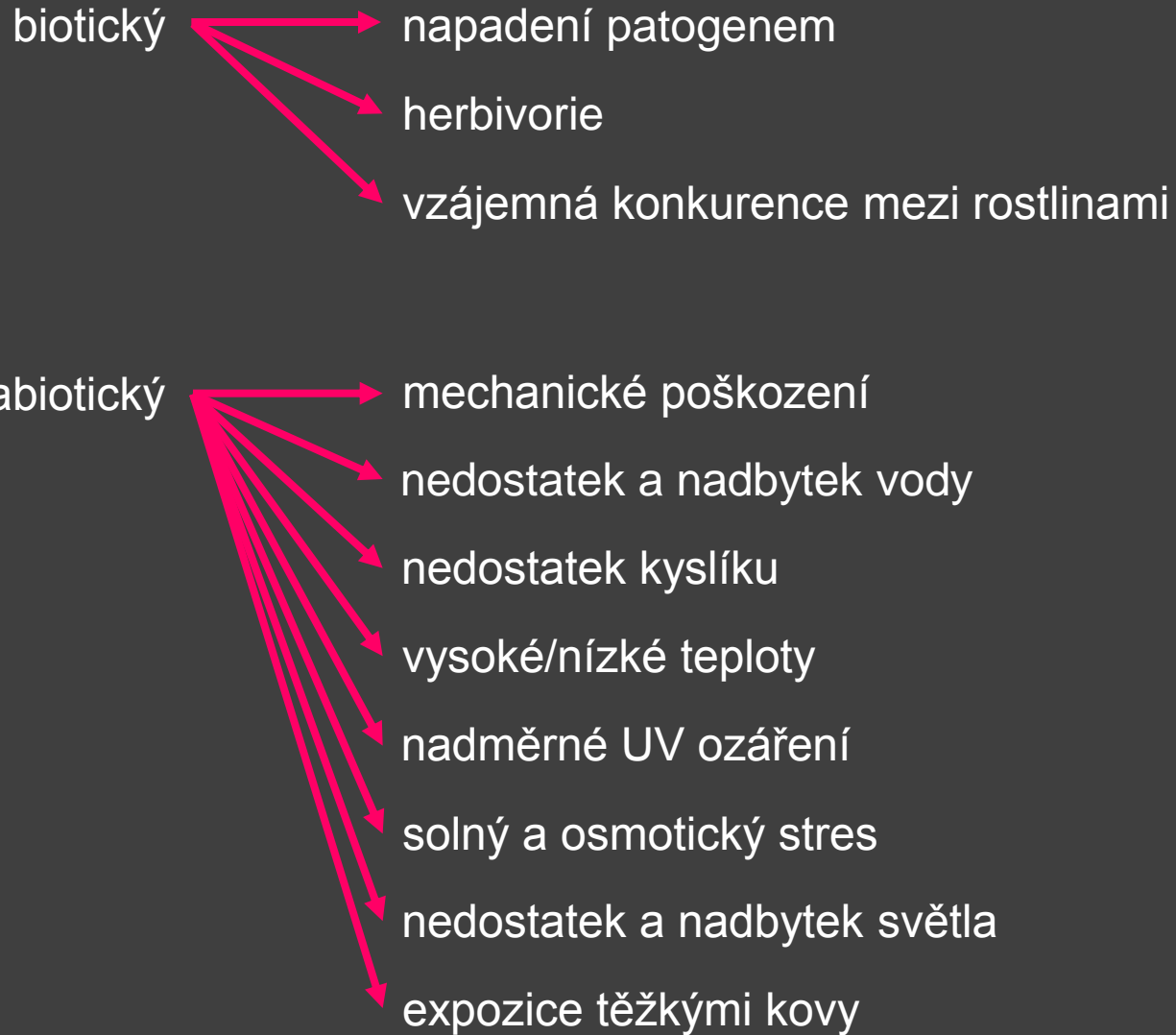


Půda kontaminovaná ropou

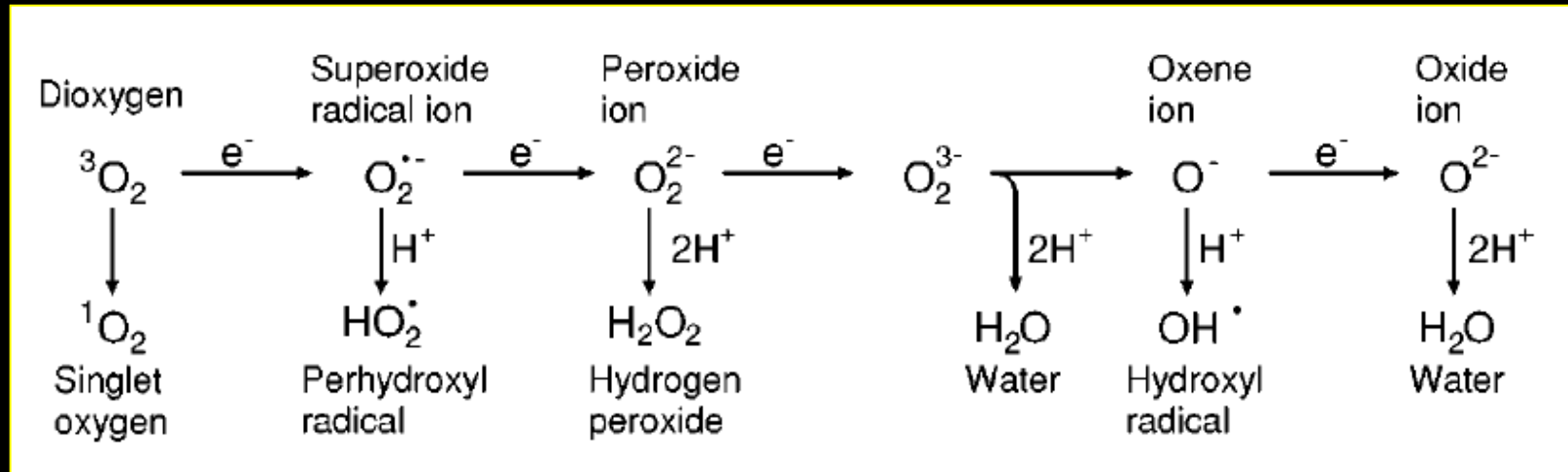
STRES ROSTLIN



STRES



FORMY REAKTIVNÍHO KYSLÍKU (ROS)

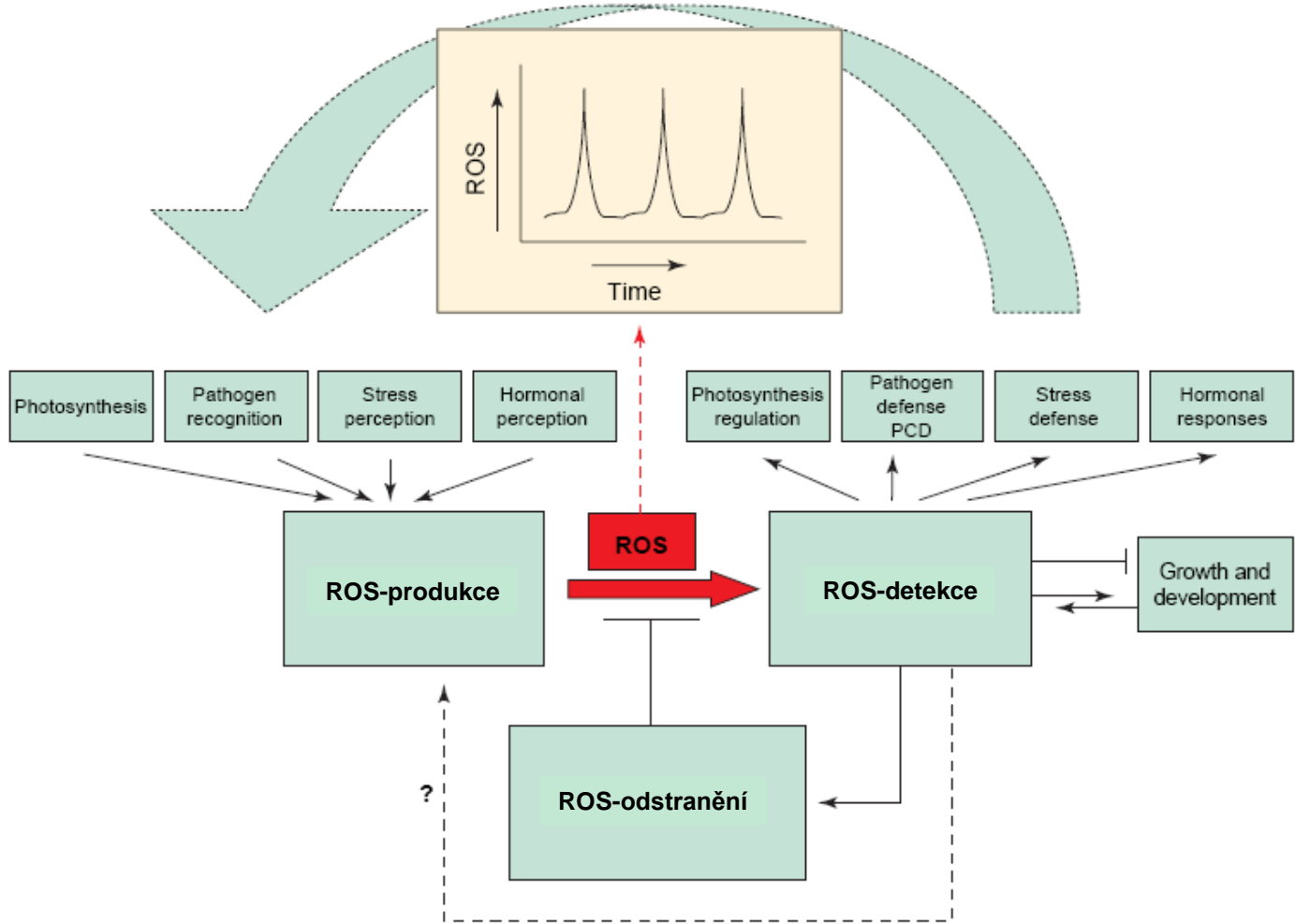


ROS

Mechanism	Localization	Primary ROI
Production		
Photosynthesis ET and PSI or II	Chl	O_2^-
Respiration ET	Mit	O_2^-
Glycolate oxidase	Per	H_2O_2
Excited chlorophyll	Chl	O_2^1
NADPH oxidase	PM	O_2^-
Fatty acid β -oxidation	Per	H_2O_2
Oxalate oxidase	Apo	H_2O_2
Xanthine oxidase	Per	O_2^-
Peroxidases, Mn^{2+} and NADH	CW	H_2O_2, O_2^-
Amine oxidase	Apo	H_2O_2
Scavenging		
Superoxide dismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O_2^-
Ascorbate peroxidase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Catalase	Per	H_2O_2
Glutathione peroxidase	Cyt,	$H_2O_2, ROOH$
Peroxidases	CW, Cyt, Vac	H_2O_2
Thioredoxin peroxidase	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2
Ascorbic acid	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2, O_2^-
Glutathione	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
α -Tocopherol	Membranes	$ROOH, O_2^1$
Caretenoids	Chl	O_2^1
Avoidance		
Anatomical adaptations	Leaf structure, epidermis	O_2^-, H_2O_2, O_2^1
C_4 or CAM metabolism	Chl, Cyt, Vac	O_2^-, H_2O_2
Chl movement	Cyt	O_2^-, H_2O_2, O_2^1
Suppression of photosynthesis	Chl	O_2^-, H_2O_2
PS and antenna modulations	Chl	O_2^-, O_2^1
Alternative oxidases	Chl, Mit	O_2^-

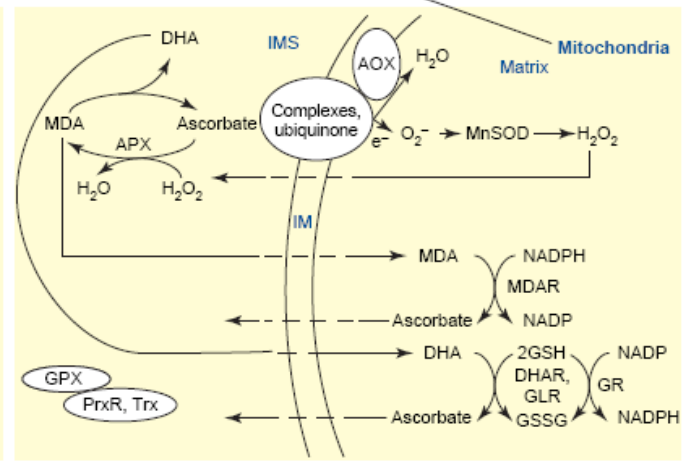
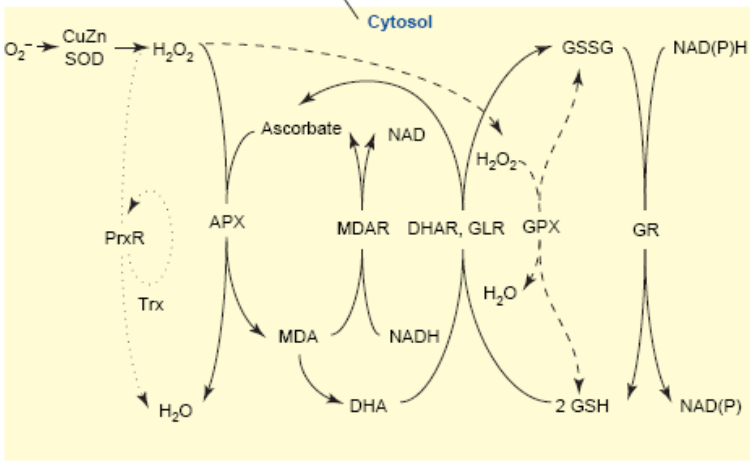
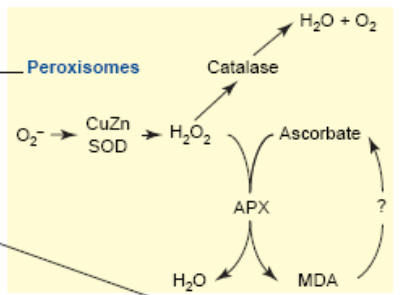
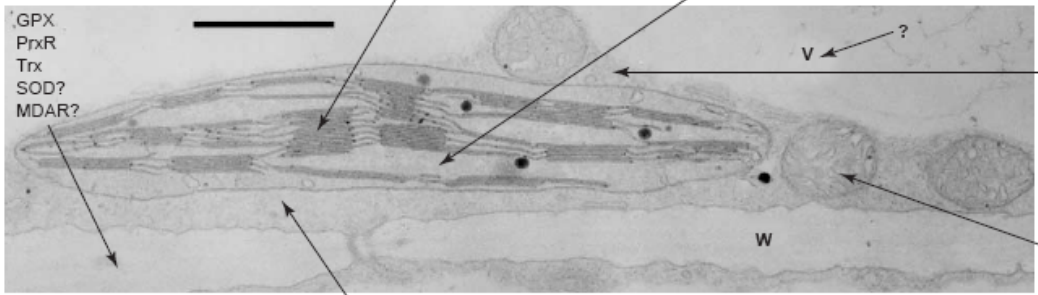
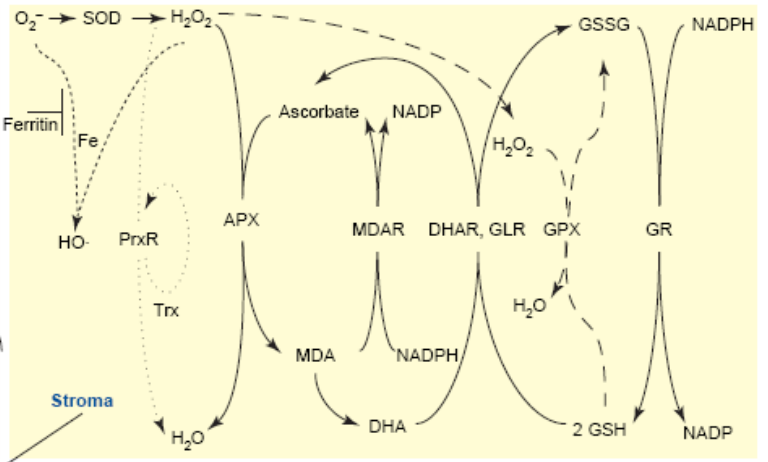
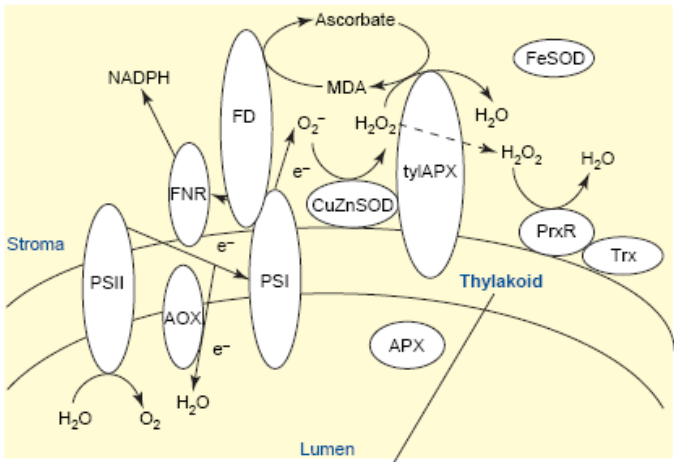
Apo - apoplast
Chl - chloroplast
CW - buněčná stěna
Cyt - cytosol
ET - elektronový transport
Mit - mitochondrie
 O_2^1 - singletový kyslík
Per - peroxisom
PM - plasmatická membrána
PS - fotosystém
ROI - meziproduct rektivního kyslíku
Vac - vakuola

ROS



ROS

Petr Soudek - Fytoremediace III.

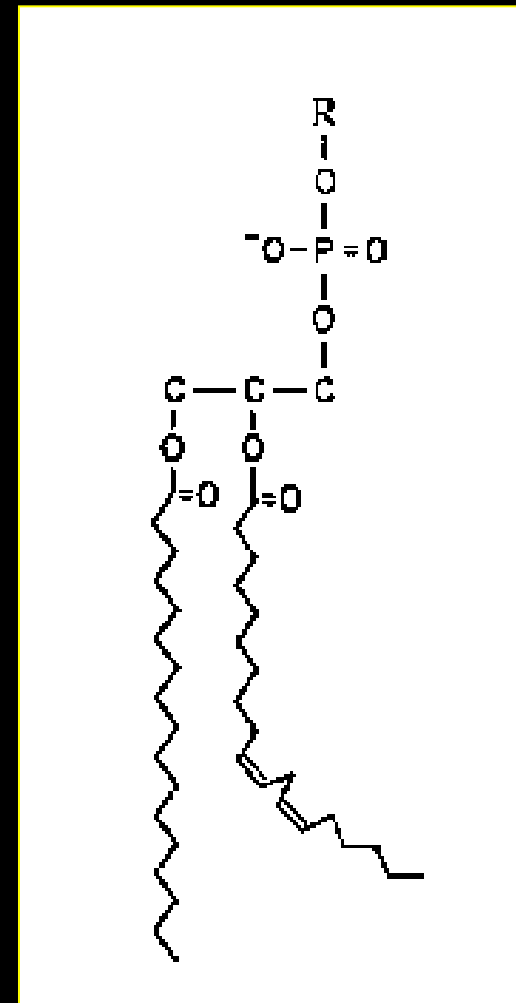
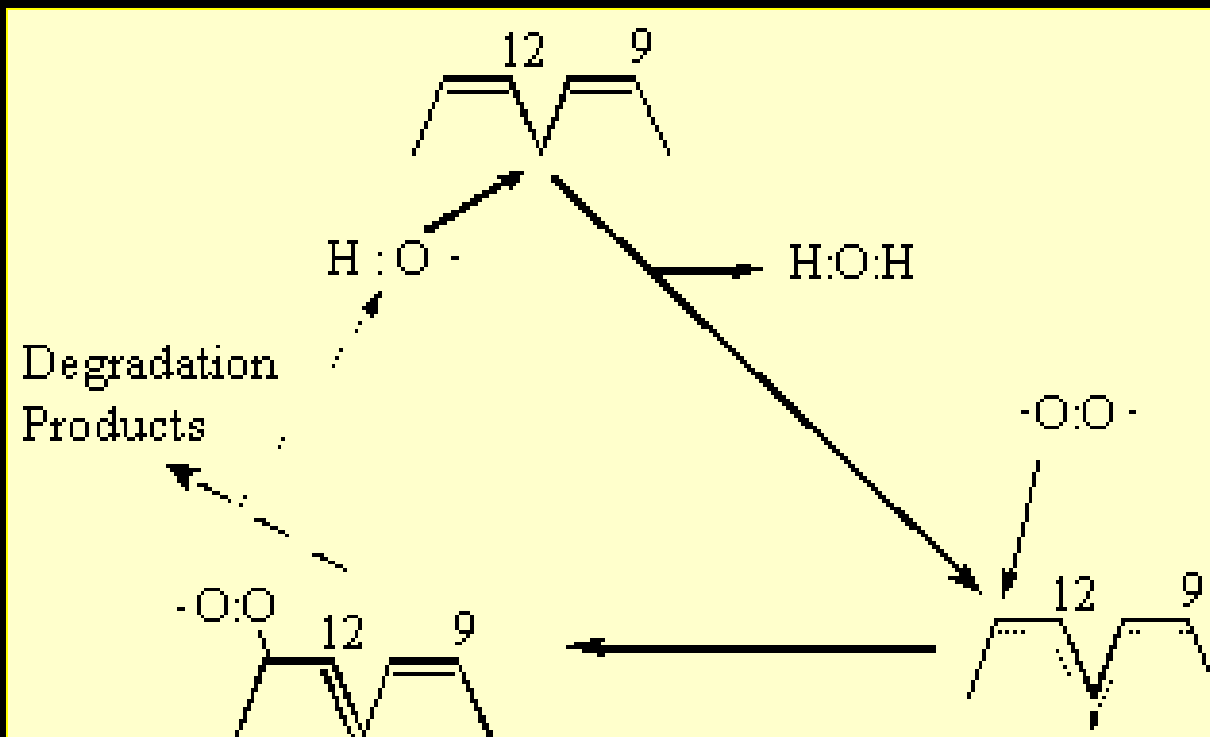


BIOLOGICKÉ REAKCE KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ

- Oxidativní poškození lipidů
- Oxidativní poškození proteinů
- Oxidativní poškození DNA



OXIDATIVNÍ POŠKOZENÍ LIPIDŮ



OXIDATIVNÍ POŠKOZENÍ PROTEINŮ

Oxidativní poškození proteinů zahrnuje:

- místně specifické modifikace aminokyselin
- fragmentaci peptidových řetězců
- hromadění produktů zesíťovacích reakcí
- změnu elektrického náboje
- zvýšení citlivosti na proteolýzu

Aminokyseliny v peptidech se liší v odolnosti vůči poškození a různé formy aktivního kyslíku se liší ve své potenciální reaktivitě.

Primární, sekundární a terciární struktura proteinů mění relativní odolnost některých aminokyselin.

Aminokyseliny obsahující síru a thiolové skupiny jsou velmi citlivé oblasti.

Jiné formy poškození proteinů volnými radikály jsou ireverzibilní:

- oxidace železo-síra center peroxidem ničí enzymatickou funkci
- mnoho AMK prodělá specifickou ireverzibilní modifikaci když je protein oxidován (tryptofan je snadno zesíťován do formy bityrosinu)



OXIDATIVNÍ POŠKOZENÍ DNA

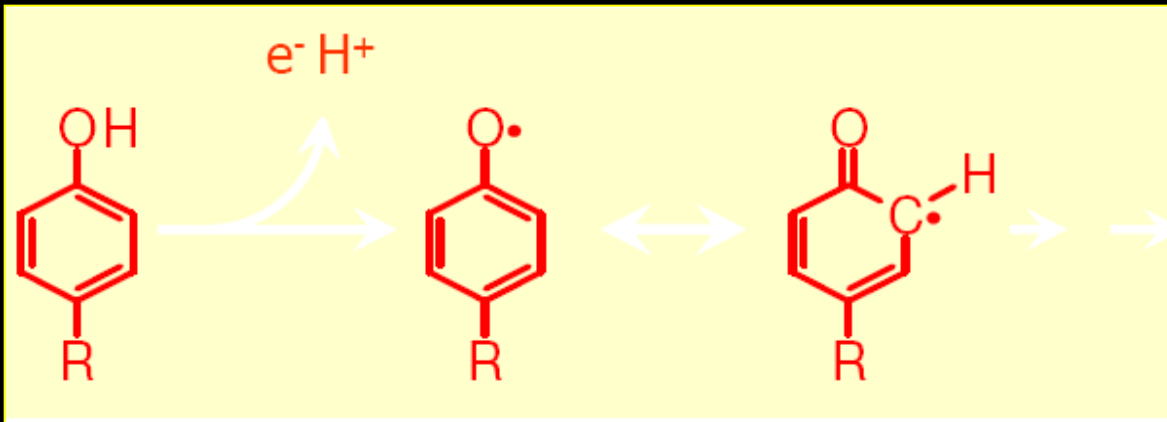
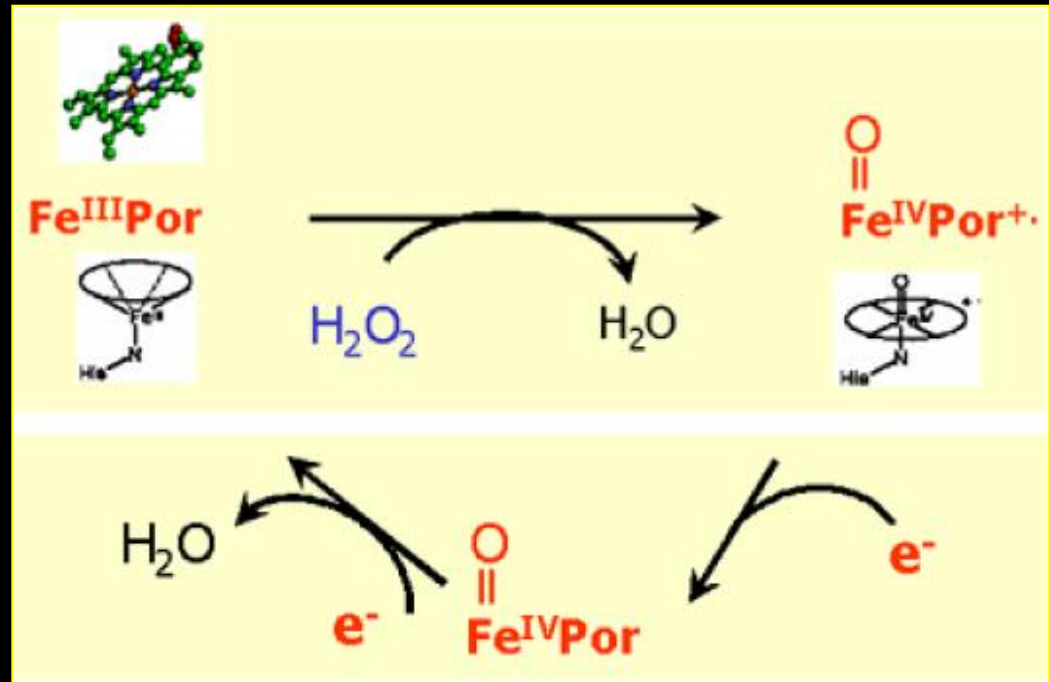
Aktivní kyslík a činitelé kteří generují volné kyslíkové radikály jako jsou třeba ionizující záření, inkukují množství poškození DNA that cause deletions, mutations and other lethal genetic effects. Characterisation of this damage to DNA has indicated that both the sugar and the base moieties are susceptible to oxidation, causing base degradation, single strand breakage, and cross-linking to protein (Imlay and Linn, 1986). Degradation of the base will produce numerous products, including 8-hydroxyguanine, hydroxymethyl urea, urea, thymine glycol, thymine and adenine ring-opened and -saturated products.

OBRANNÝ MECHANISMUS

- **Superoxid dismutasa**
- **Katalasa**
- **Kyselina askorbová**
- **Glutathion**
- **Tokoferol**
- **Karotenoidy**
- **Polyaminy**

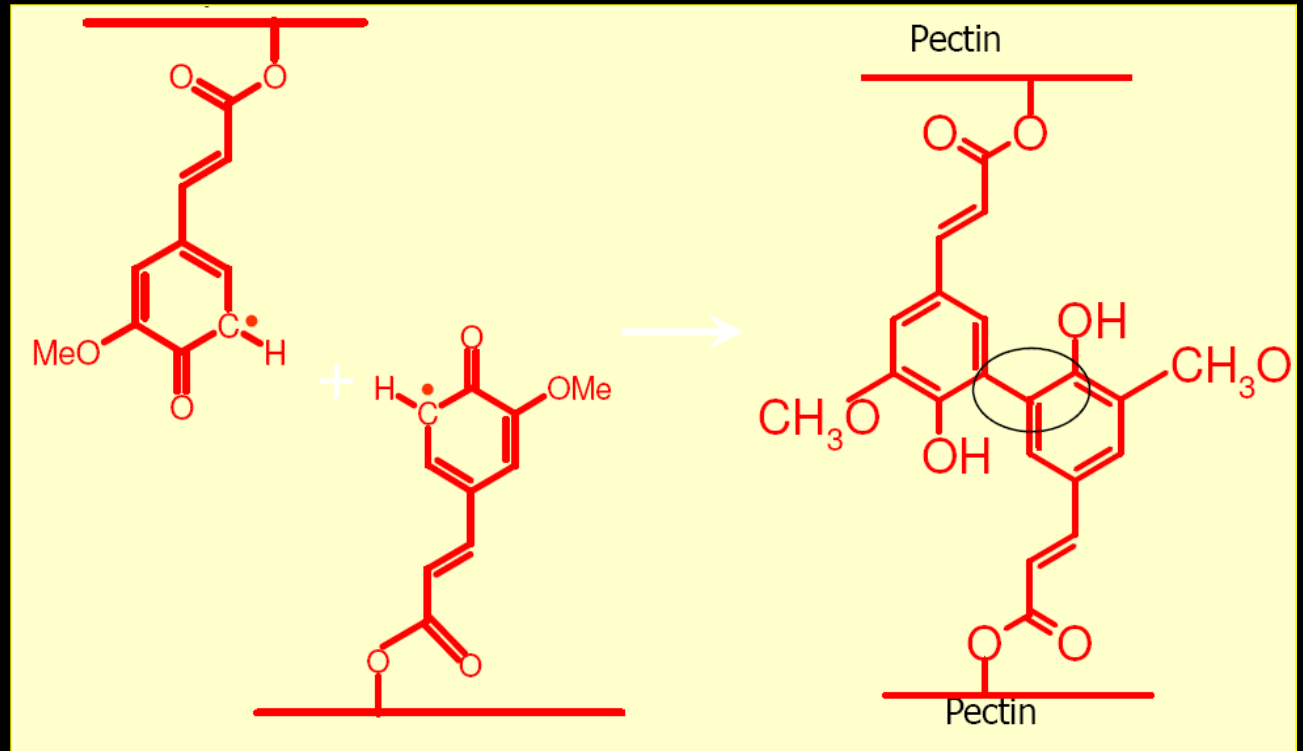


Cell-wall lignification & thickening is catalysed by peroxidase



reactive radical products

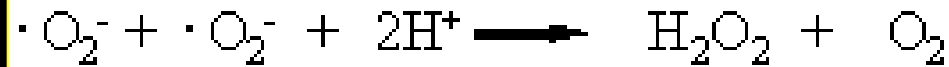
Plant cell wall crosslinks



SUPEROXID DISMUTASA

SOD is now known to catalyse the dismutation of superoxide to hydrogen peroxide and oxygen:

Superoxide Dismutase



Mn-SOD: mitochondria

Fe-SOD: chloroplast

CuZn-SOD: chloroplast

CuZn-SOD: cytosol

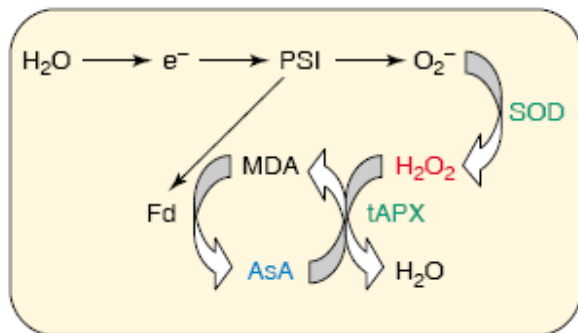
The Mn-SOD is found in the mitochondria of eukaryotic cells; some Cu/Zn-SOD isozymes are found in the cytosol, others in the chloroplasts of higher plants. The Fe-SOD isozymes are often not detected in plants, but when detected, Fe-SOD is usually associated with the chloroplast compartment

KATALASA

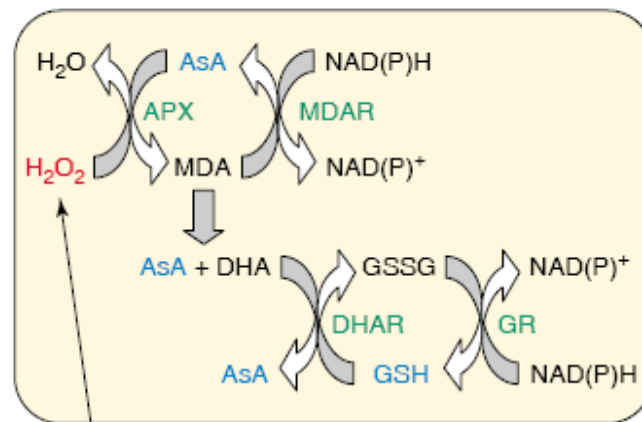
Catalase is a heme-containing enzyme that catalyses the dismutation of hydrogen peroxide into water and oxygen. The enzyme is found in all aerobic eukaryotes and is important in the removal of hydrogen peroxide generated in peroxisomes (microbodies) by oxidases involved in β -oxidation of fatty acids, the glyoxylate cycle (photorespiration) and purine catabolism.

DALŠÍ ENZYMY

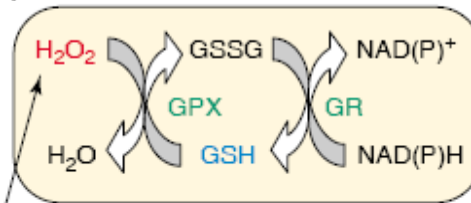
(a)



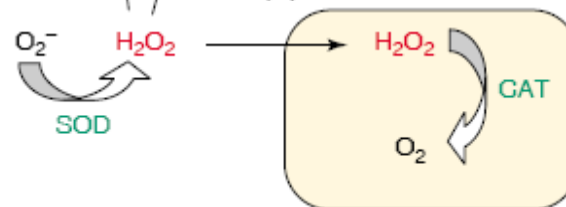
(b)



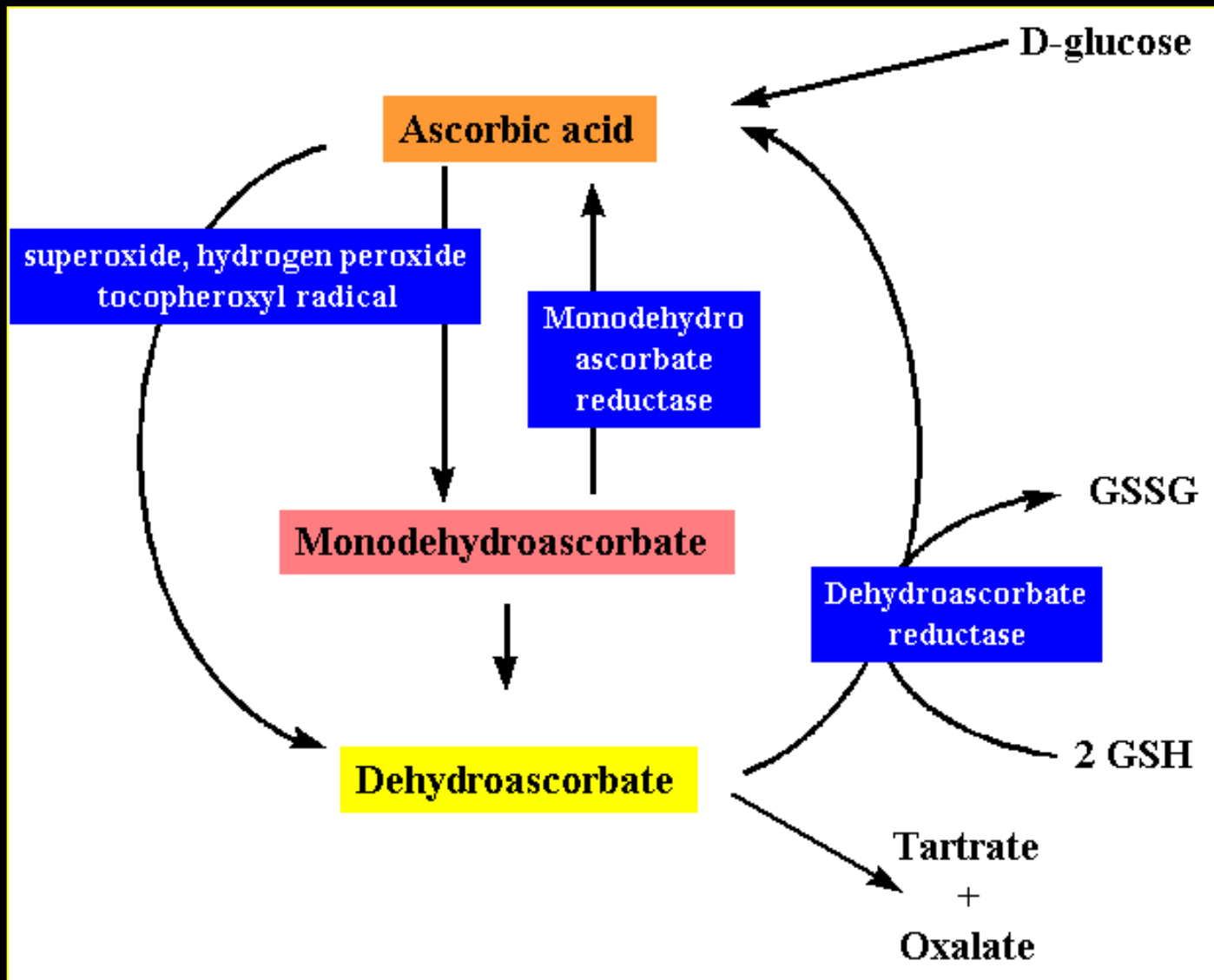
(c)



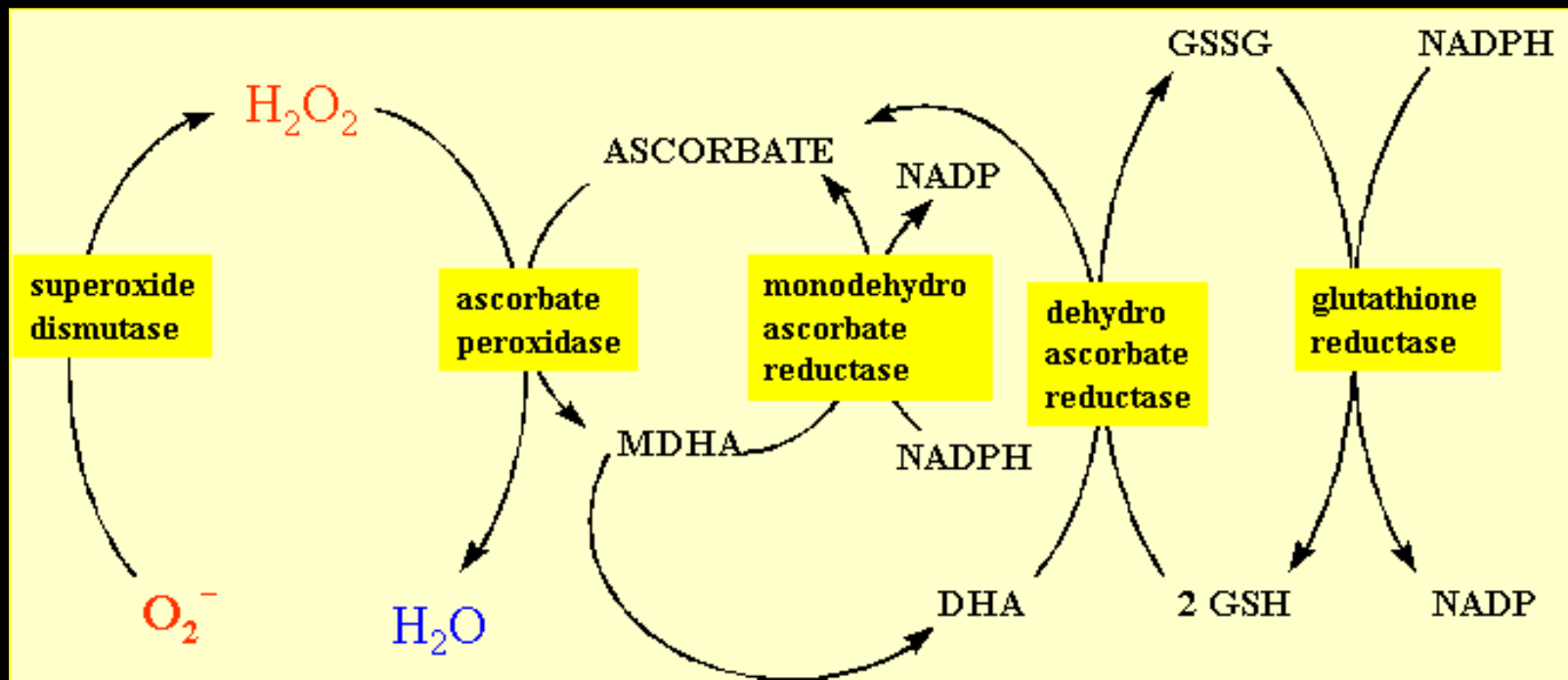
(d)



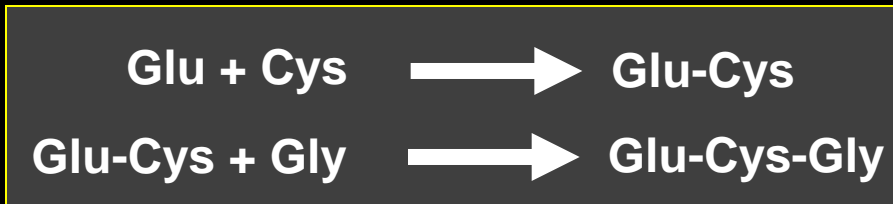
ASKORBÁT



ASKORBÁT



GLUTATHION

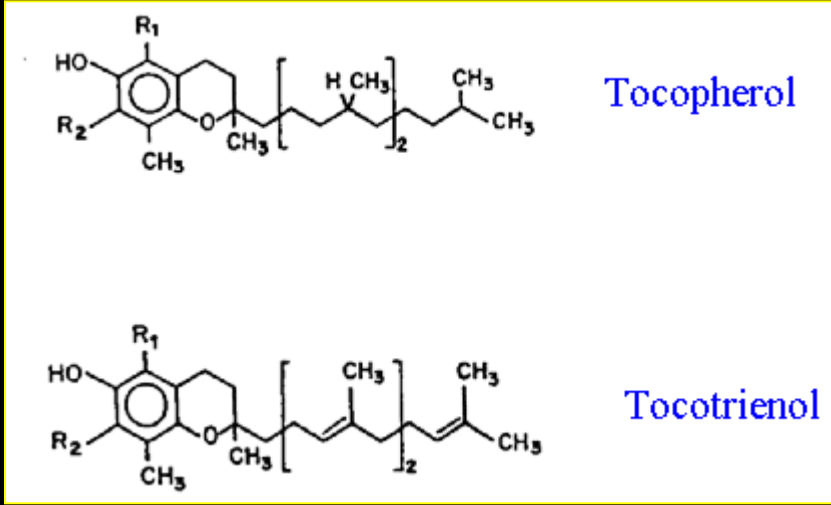


Glutathione (GSH) is a tripeptide (Glu-Cys-Gly) whose antioxidant function is facilitated by the sulphhydryl group of cysteine. On oxidation, the sulphur forms a thiyl radical that reacts with a second oxidised glutathione forming a disulphide bond (GSSG).



TOKOFEROL

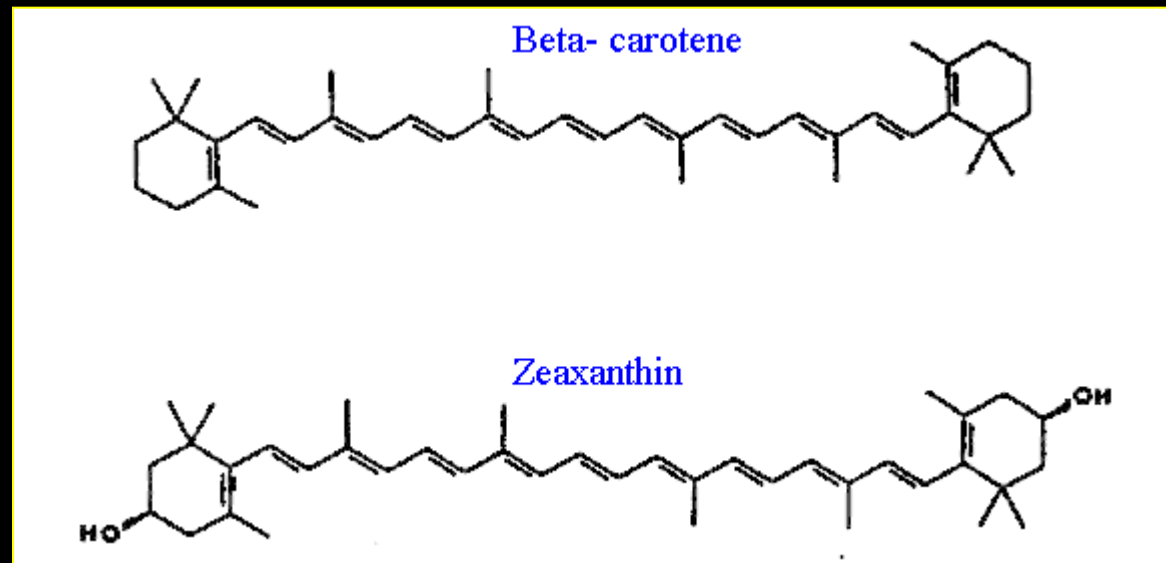
α -tocopherol (vitamin E)



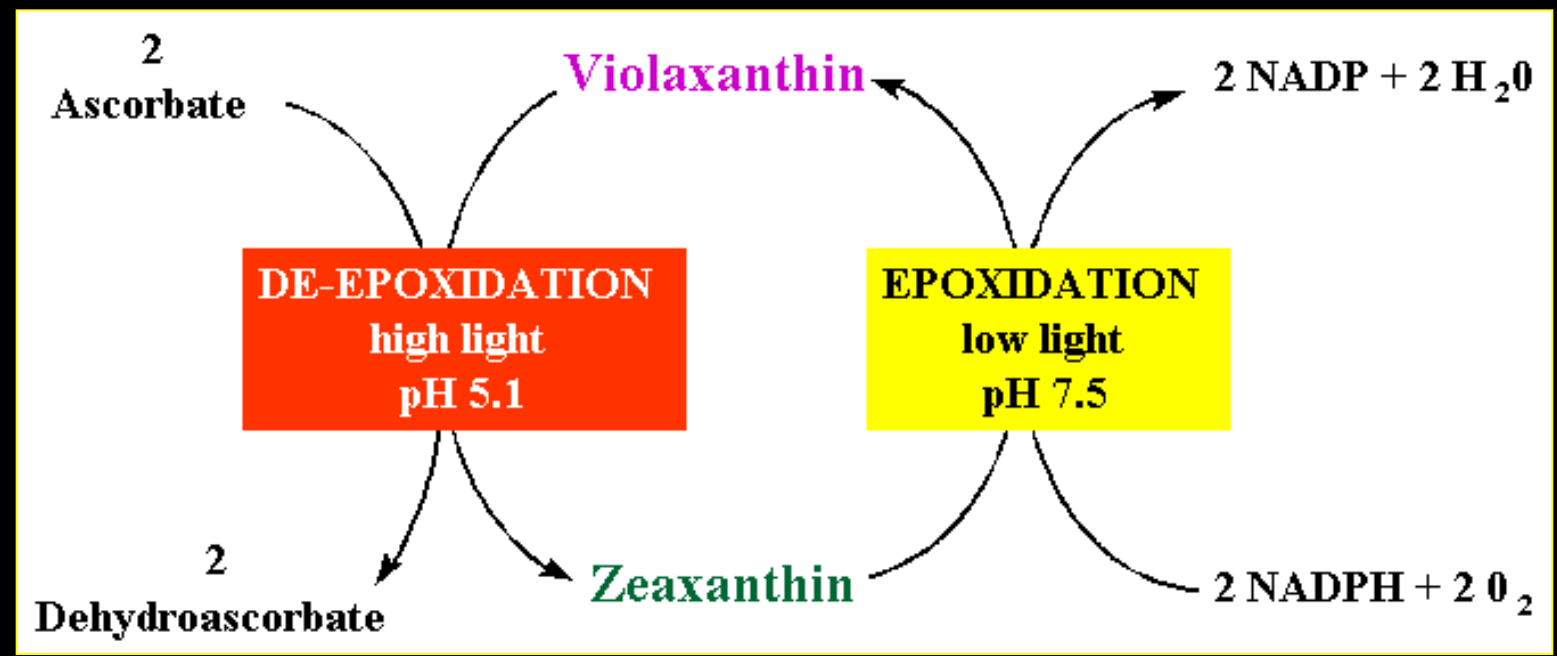
Its hydrophobic nature dictates that α -tocopherol is located exclusively in cell membranes and is oriented with the benzoquinone ring in close association with the carbonyl of the glycerol component of the phospholipid, and with the phytyl chain associated with the fatty acids in the hydrophobic inner regions of the membrane bilayer. The ring oxygen is near the surface of the membrane bilayer but remains exposed to the lipid environment. The tocopheroxyl radical is stabilised by the fully substituted benzoquinone ring and therefore does not propagate the radical reaction. This is in effect a termination reaction making tocopherol an effective free radical trap.

KAROTENOIDY

Carotenoids are C₄₀ isoprenoids and tetraterpenes that are located in the plastids of both photosynthetic and non-photosynthetic plant tissues. In chloroplasts, the carotenoids function act as accessory pigments in light harvesting, but perhaps a more important role is their ability to detoxify various forms of activated oxygen and triplet chlorophyll that are produced as a result of excitation of the photosynthetic complexes by light.



KAROTENOIDY



POLYAMINY

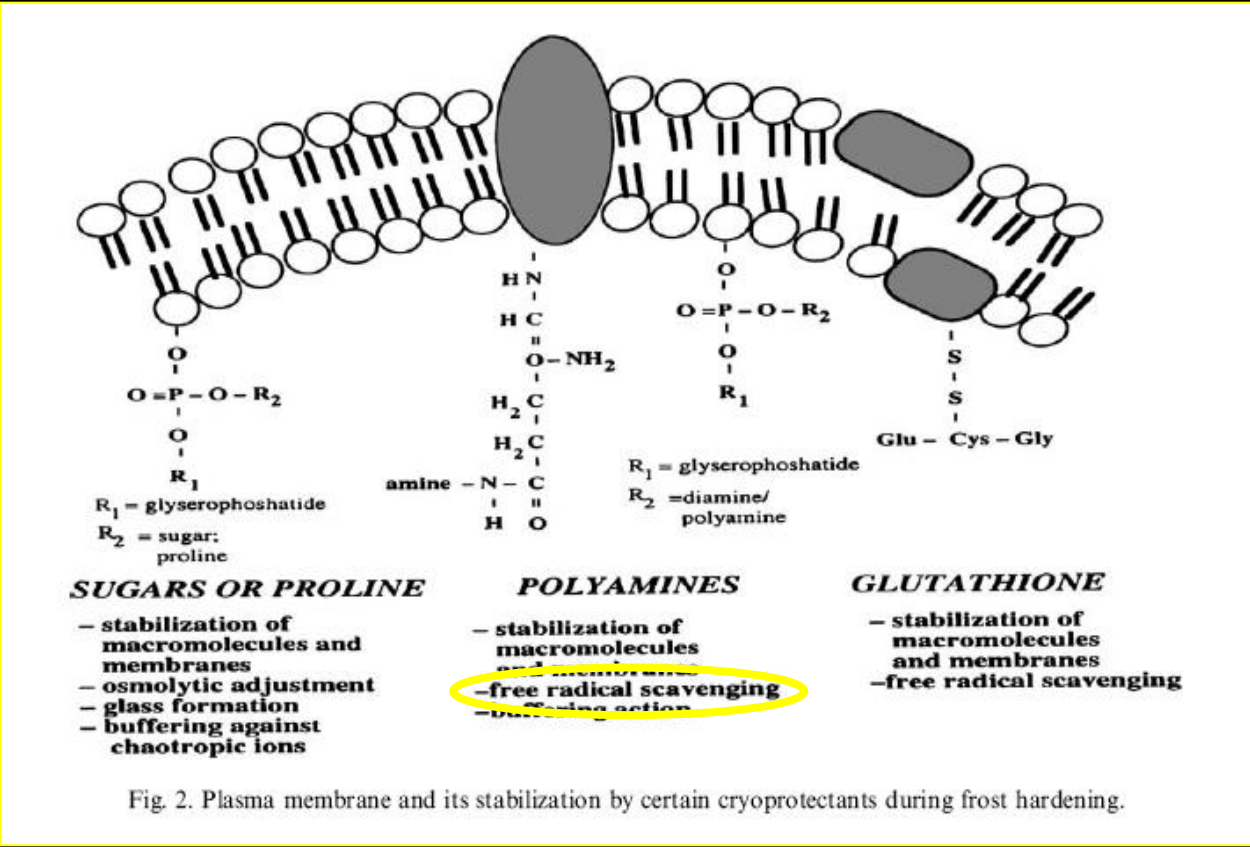
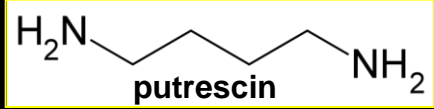
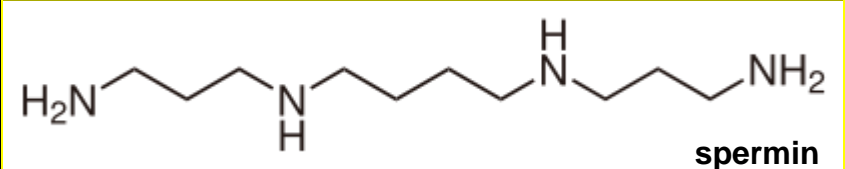
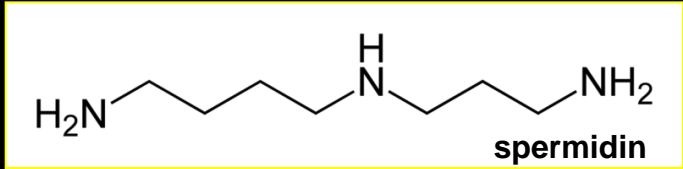


Fig. 2. Plasma membrane and its stabilization by certain cryoprotectants during frost hardening.

POLYAMINY

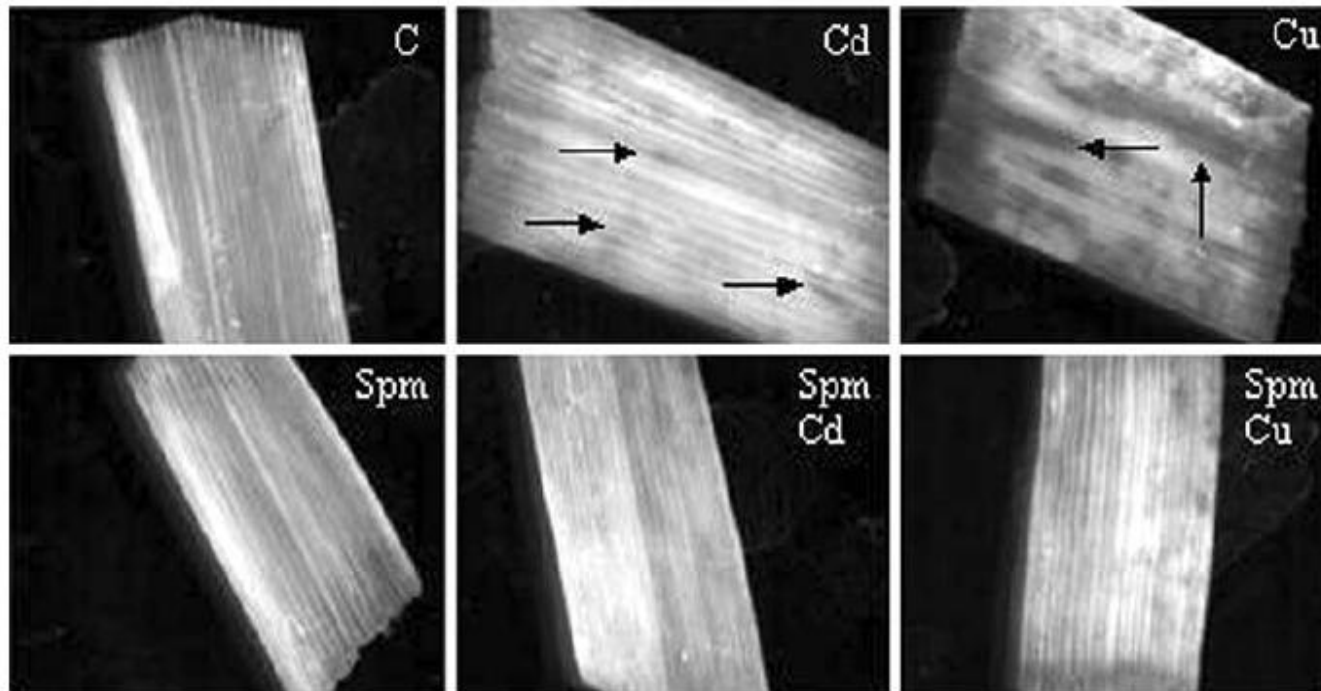


Figure 2. Histochemical detection of H₂O₂ in wheat leaf segments. Leaf segments were incubated for 14 h under continuous light. Spm pretreatment consisted of 6 h preincubation with 1 mM Spm before metal (Cd or Cu) incubation. Treatments are detailed in the figure. Leaves were infiltrated with 1 mg/ml DAB for 1 h under dark, and then illuminated until appearance of brown spots (see arrows) to evidence H₂O₂ formation. To visualize DAB deposits, leaves were bleached in boiling ethanol. The figure is representative of three different experiments.