



Fytoremediace II.

Petr Soudek

Laboratoř rostlinných biotechnologií
Ústav experimentální botaniky
Akademie věd České Republiky



Příjem minerálních látek rostlinou

PROČ ROSTLINY PŘIJÍMAJÍ MINERÁLNÍ LÁTKY

Prvek	chemická značka	koncentrace v sušině (% , ppm)	relativní počet atomů vztaženo k počtu atomů molybdenu
získané z vody nebo CO ₂			
Hydrogen	H	6	60,000,000
Carbon	C	45	40,000,000
Oxygen	O	45	30,000,000
získané z půdy – Makroprvky (%)			
Nitrogen	N	1.5	1,000,000
Potassium	K	1.0	250,000
Calcium	Ca	0.5	125,000
Magnesium	Mg	0.2	80,000
Phosphorus	P	0.2	60,000
Sulfur	S	0.1	30,000
Silicon	Si	0.1	30,000
získané z půdy – Mikroprvky (ppm)			
Chlorine	Cl	100	3,000
Iron	Fe	100	2,000
Boron	B	20	2,000
Manganese	Mn	50	1,000
Sodium	Na	10	400
Zinc	Zn	20	300
Copper	Cu	6	100
Nickel	Ni	0.1	2
Molybdenum	Mo	0.1	1

Source: Epstein 1972, 1999.

^aThe values for the nonmineral elements (H, C, O) and the macronutrients are percentages. The values for micronutrients are expressed in parts per million.



BIOCHEMICKÁ FUNKCE

- **Skupina 1- části organických uhlíkatých sloučenin**

N- aminokyseliny, amidy, proteiny, nukleové kyseliny, nukleotidy, koenzymy, hexosaminy atd.

S – cystein, cystin, methionin-proteiny, mastné kyseliny, koenzym A, thiamin, glutathion, biotin atd.

- **Skupina 2- významné při ukládání energie nebo ve strukturální integritě**

P- fosfáty cukrů, aminokyseliny, nukleotidy, koenzymy, fosfolipidy. Klíčová úloha v reakcích zahrnujících ATP.

Si- amorfní křemík v buněčné stěně-pevnost a elastiicta buněčných stěn.

B- manitol, manan-buněčná stěna- prodlužování buněk, metabolismus nukleových kyselin

- **Skupina 3- zůstávající v podobě iontů (volných nebo vázaných)**

K- kofaktor více než 40 enzymů, základní kation udržující buněčný turgor a buněčnou elektroneutralitu.

Ca- střední lamela buněčné stěny, kofaktor enzymů hydrolýzy ATP a fosfolipidů, druhý posel v metabolické regulaci.

Mg-chlorofyl, přenos fosfátů

Cl- fotosyntetické reakce –vývoj kyslíku

Mn-aktivita dehydrogenáz, dekarboxyláz, kináz, oxidáz a peroxidáz, vývoj kyslíku

Na- regenerace fosfoenol pyruvátu u C₄ a CAM rostlin

- **Skupina 4- účastníci se redox- reakcí- přenosu elektronů**

Fe-cytochromy a nehemové proteiny pro fotosyntézu, dýchání a fixaci N₂

Zn-alkohol dehydrogenáza, karbon anhydráza atd

Cu- kofaktor dalších enzymů, plastocyanin

Ni- ureáza

Mo- nitrogenáza, nitrát reduktáza atd.

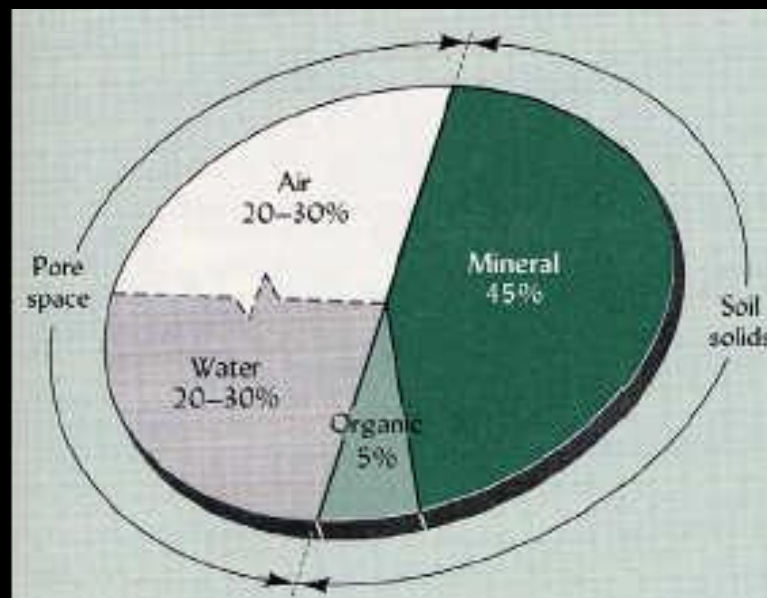
Podle Taiz and Zeiger 2002

PŘÍJEM MINERÁLNÍCH ŽIVIN

Prvky jako ionty – anionty, kationty z půdního roztoku

Půda: 4 složky:

- minerální částice:
 - ✓ kameny a štěrk
 - ✓ písek (částice o velikosti 2-0,05mm)
 - ✓ prachové částice (0,05-0,002mm)
 - ✓ jílové částice (méně než 0,002mm)
- organické částice
- voda
- vzduch



příjem možný celým povrchem těla

nejvíce kořeny z půdy

zóna s kořenovými vlásky

přijímány jako ionty – anionty, kationty z půdního roztoku

půdní roztok – hromadný tok

ionty v roztoku – difúze

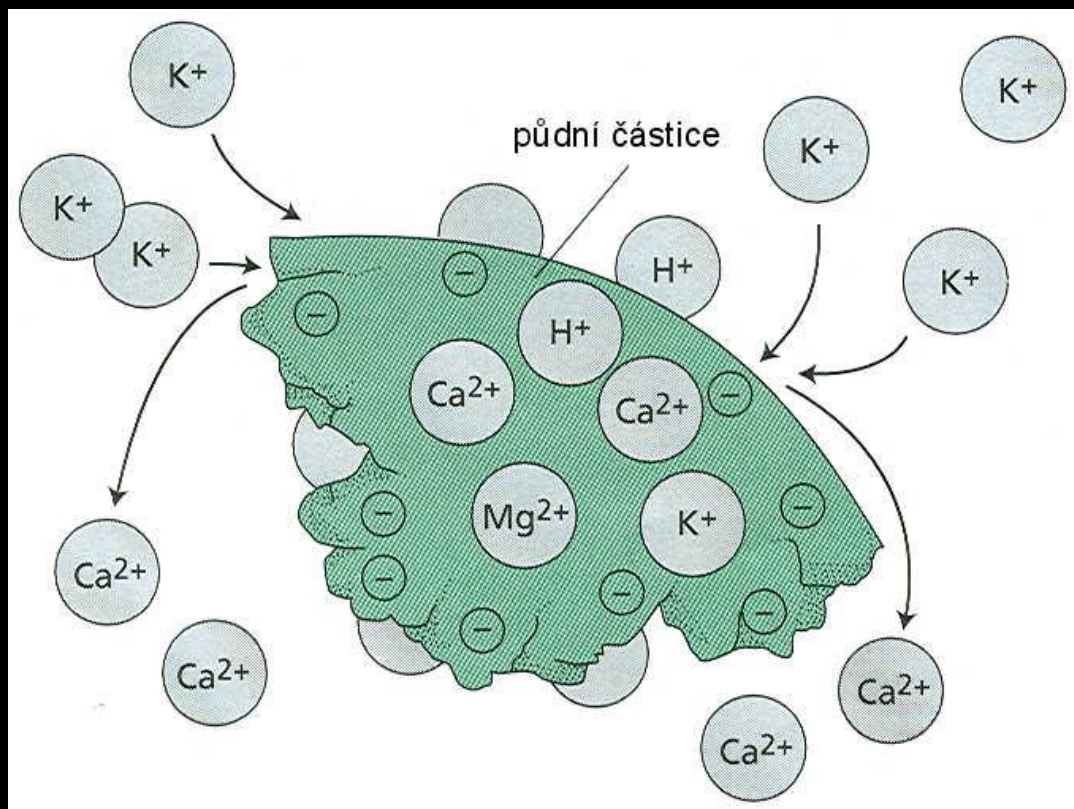
IONTOVÁ VÝMĚNNÁ KAPACITA

adsorpce kationtů na negativně nabitý povrch půdních částic

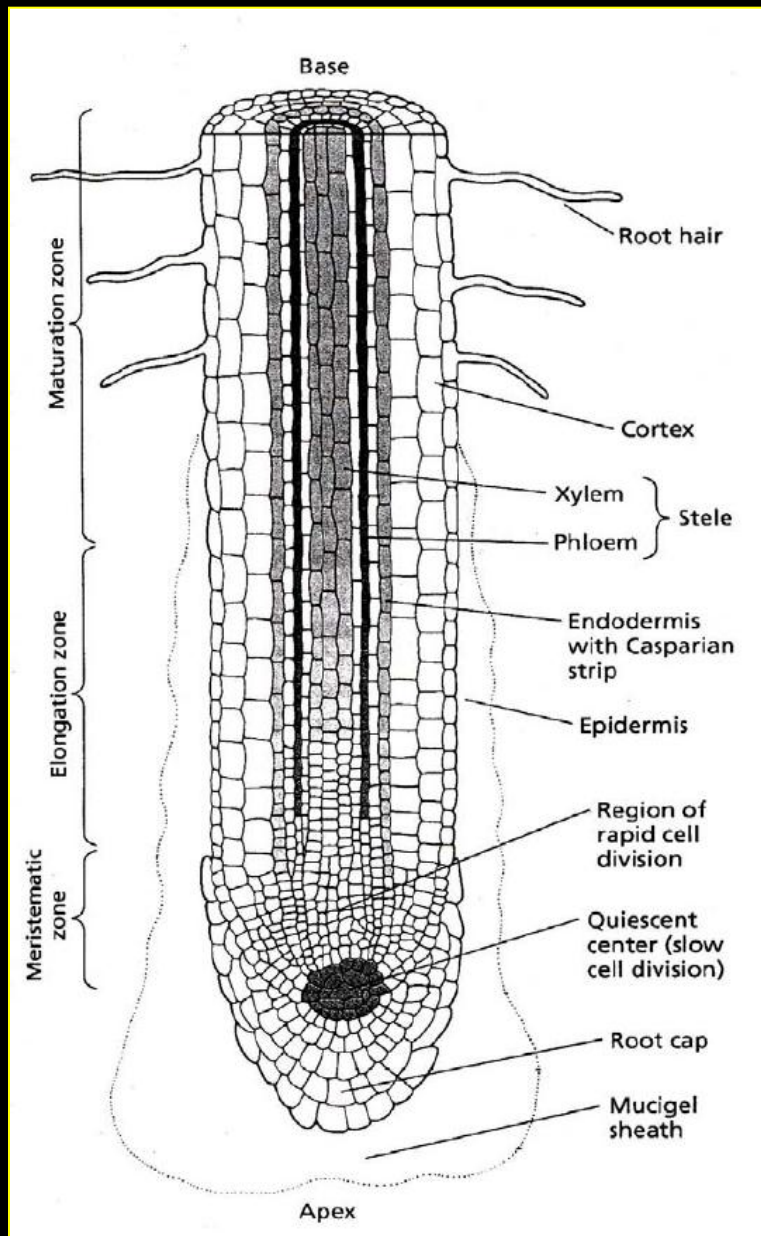


HCO_3^- – výměna za anionty v půdním roztoku na povrchu kořene

H^+ – výměna za kationty na povrchu půdních částic

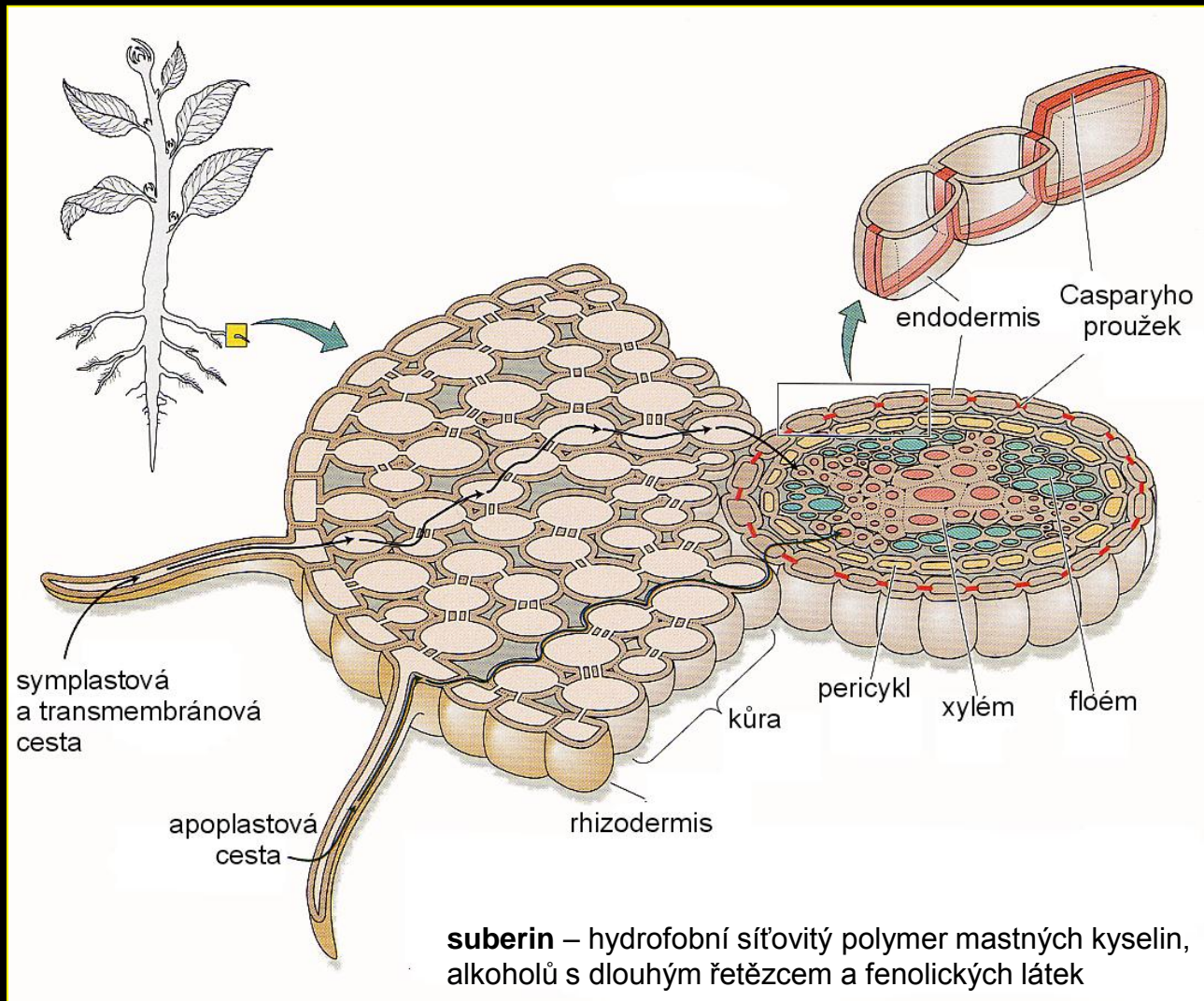


KOŘEN



PŘÍJEM LÁTEK KOŘENY

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

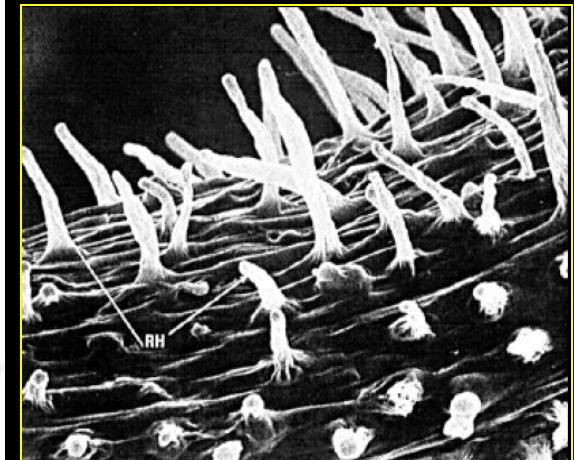
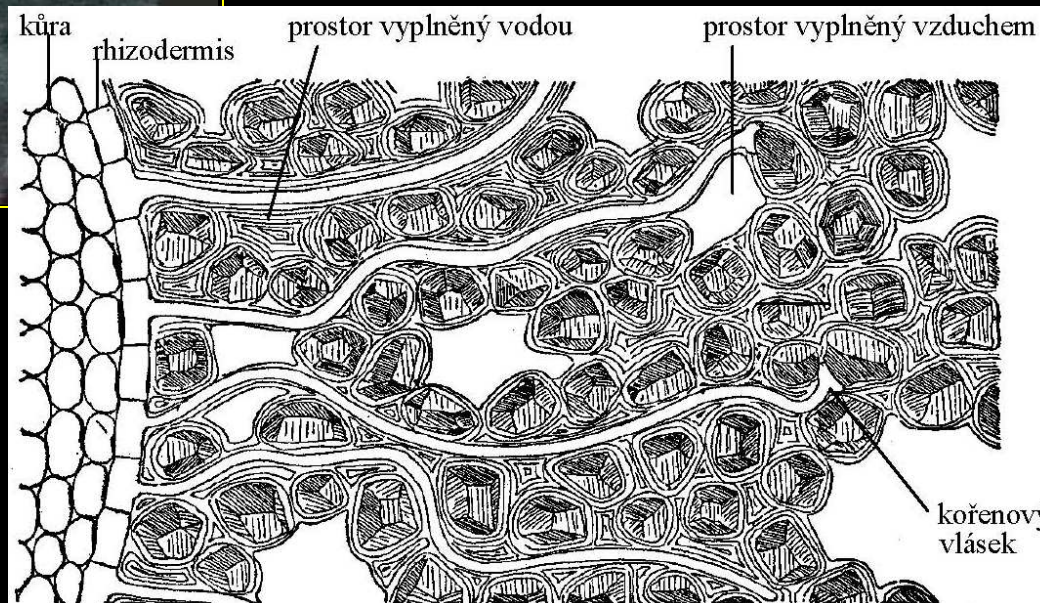


KOŘENOVÉ VLÁSKY

- výrůstky rhizodermálních buněk (trichoblastů)
- počet (kolem 100 na mm^2), délka (200-300 a někdy i přes 1000 μm) a životnost (několik dní) dána genotypem i vnějšími podmínkami
- vliv fytohormonů (auxin a ethylen)

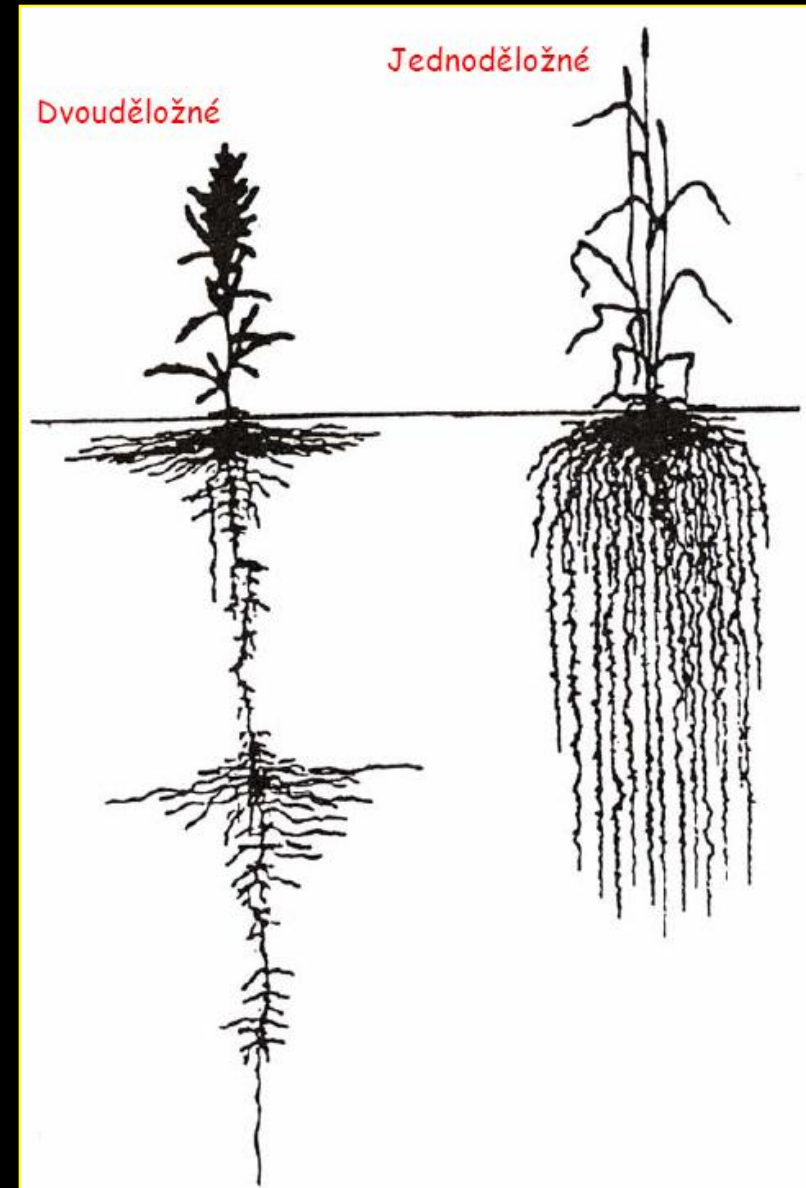
Význam:

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



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



VLIV SELEKTIVNÍ PŘÍTOMNOSTI ŽIVIN NA TVORBU KOŘENOVÉHO SYSTÉMU

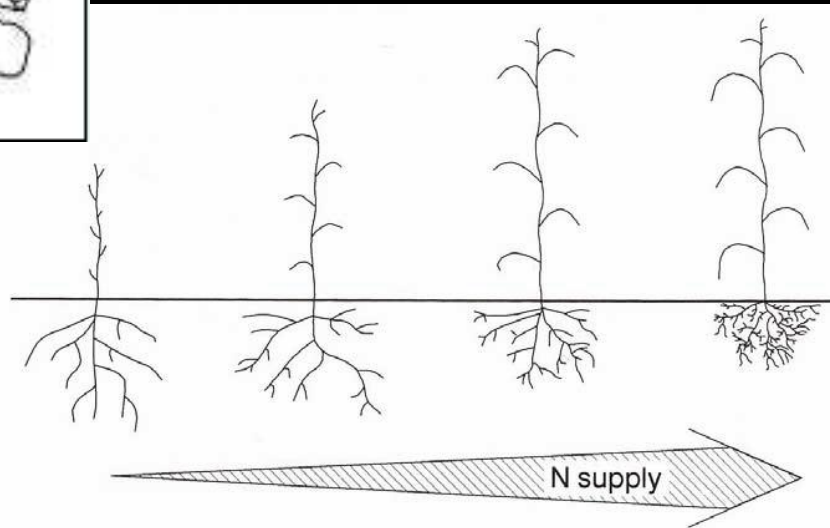
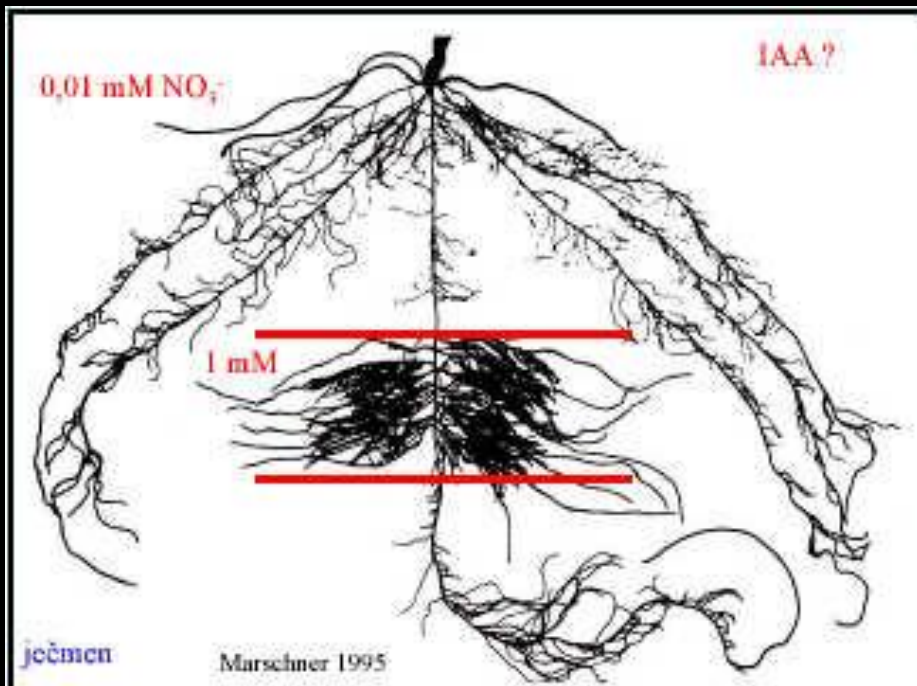


Fig. 8.16 Schematic representation of the effect of increasing levels of nitrogen supply to the roots during early growth stages on the root and shoot growth of cereal plants.



Transport látek přes membránu

POHYB LÁTEK PŘES MEMBRÁNU

množství volné energie schopné konat práci = transportovat látku přes membránu je dáno:

- ✓ koncentrací dané látky
- ✓ tlakem
- ✓ nábojem

hodnota μ_i (chemický potenciál) integruje působení těchto faktorů

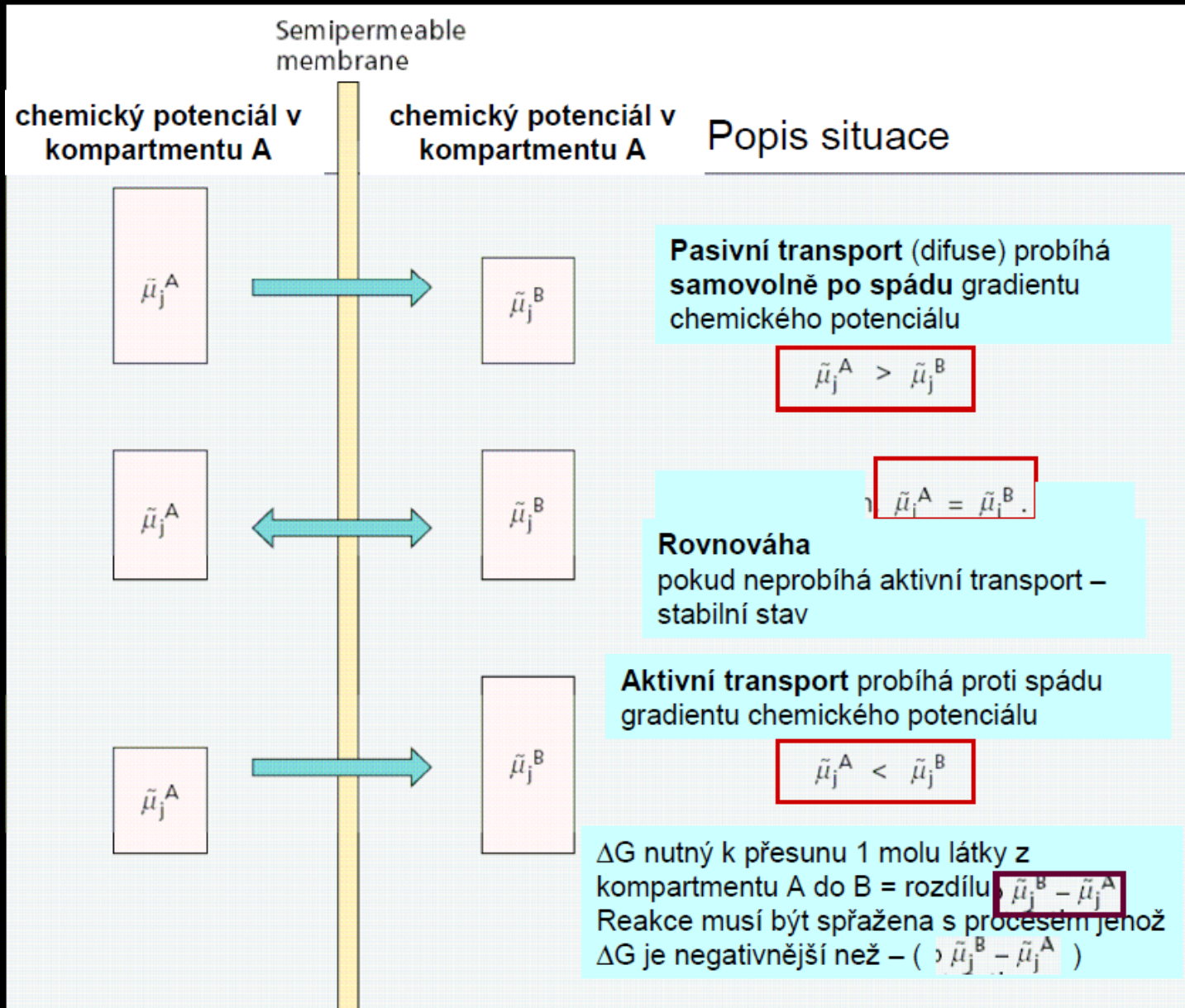
Pohyb látek přes membránu: hnací silou je

$\Delta\mu_j$ rozdíl chemického potenciálu dané látky na opačných stranách membrány

u iontů hraje důležitou roli **náboj** \longrightarrow potenciál **elektrochemický** μ_i

vyjadřuje se jako napětí v mV nebo jako energie v kJ . mol⁻¹

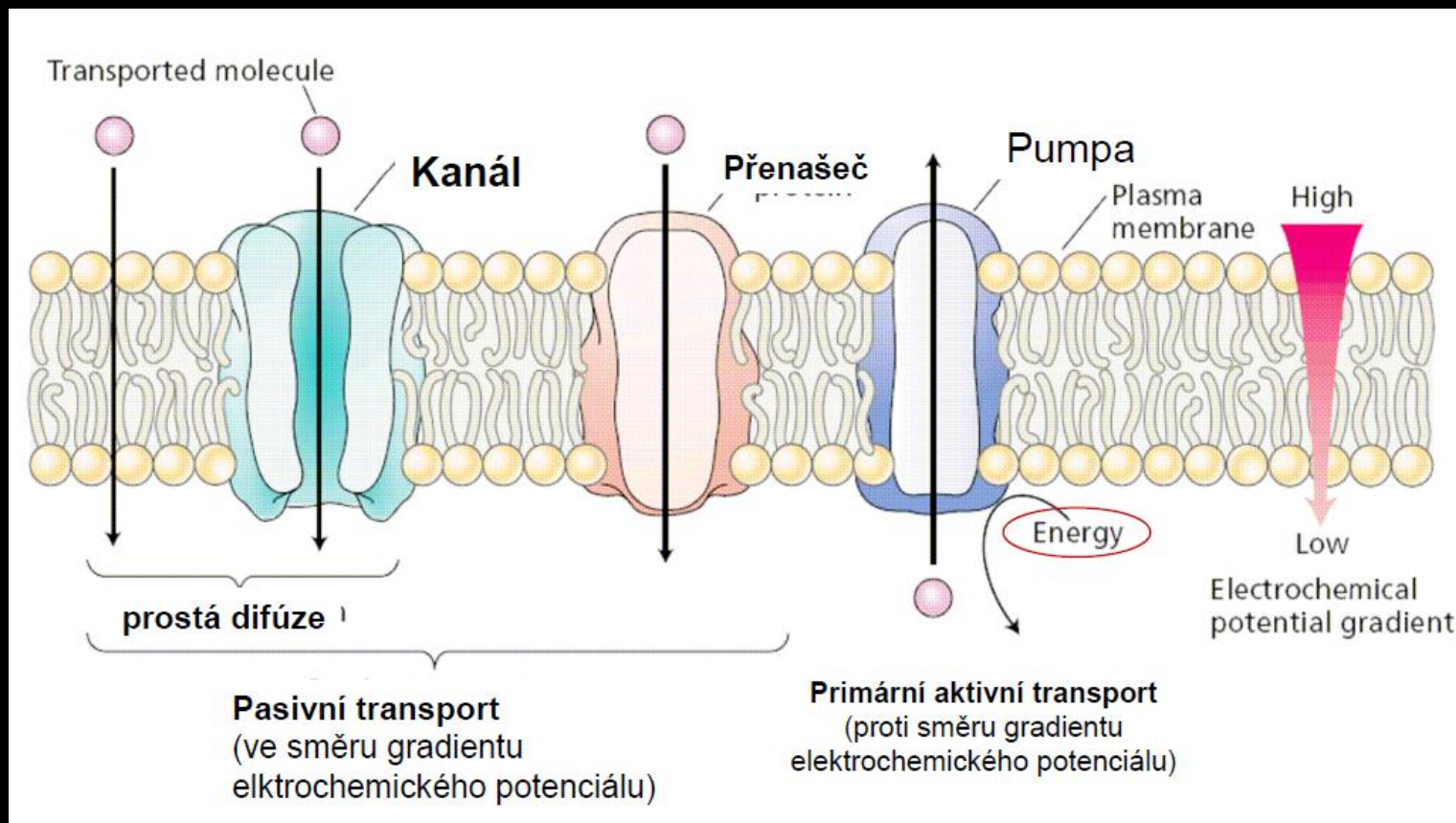
TRANSPORT MINERÁLNÍCH LÁTEK



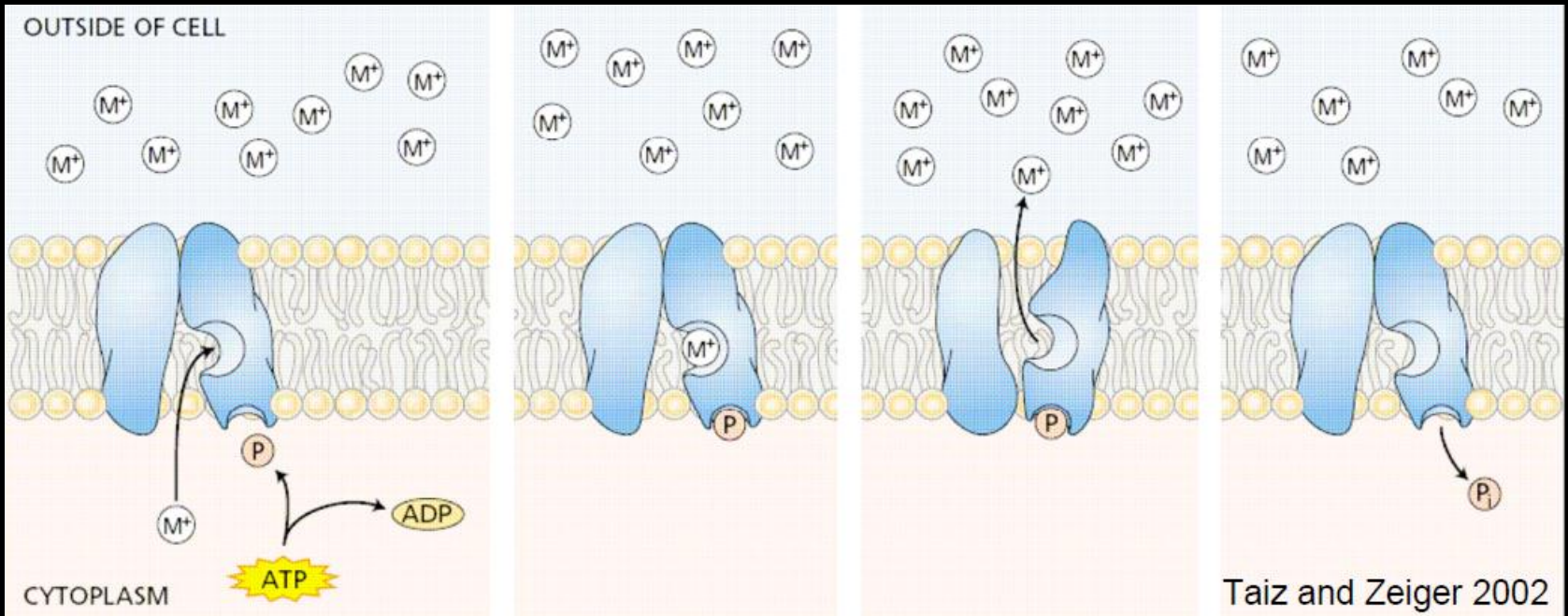
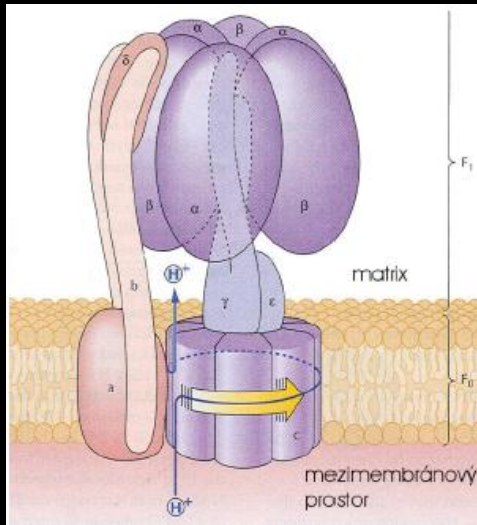
PUMPY – PŘENAŠEČE – KANÁLY

rychlost transportu

- ✓ kanály přenášejí 10⁶ až 10⁸ iontů za sekundu
- ✓ přenašeče přenášejí 10³ iontů za sekundu
- ✓ pumpy přenášejí 10² iontů za sekundu



PUMPY



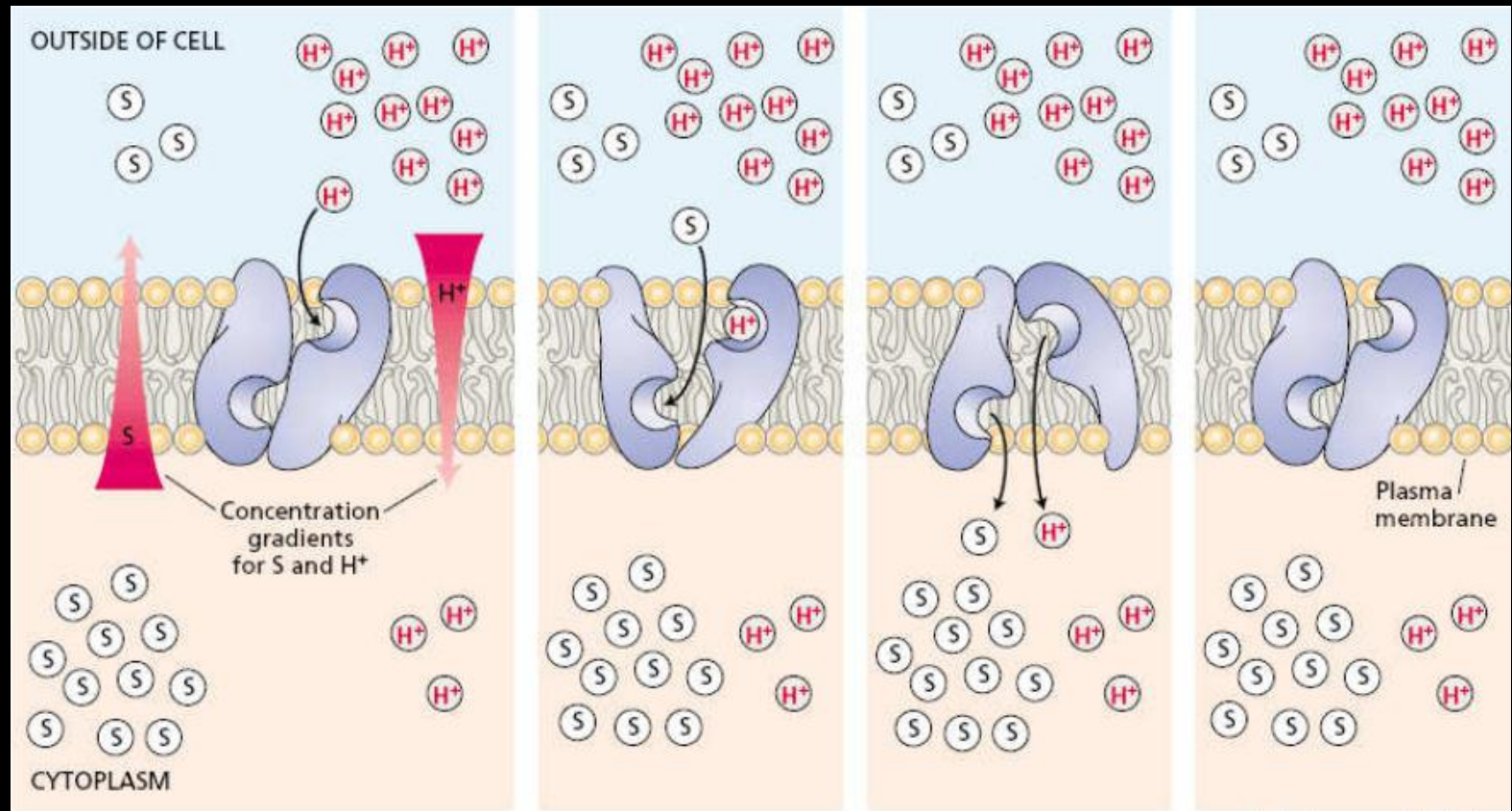
Taiz and Zeiger 2002



PŘENAŠEČE

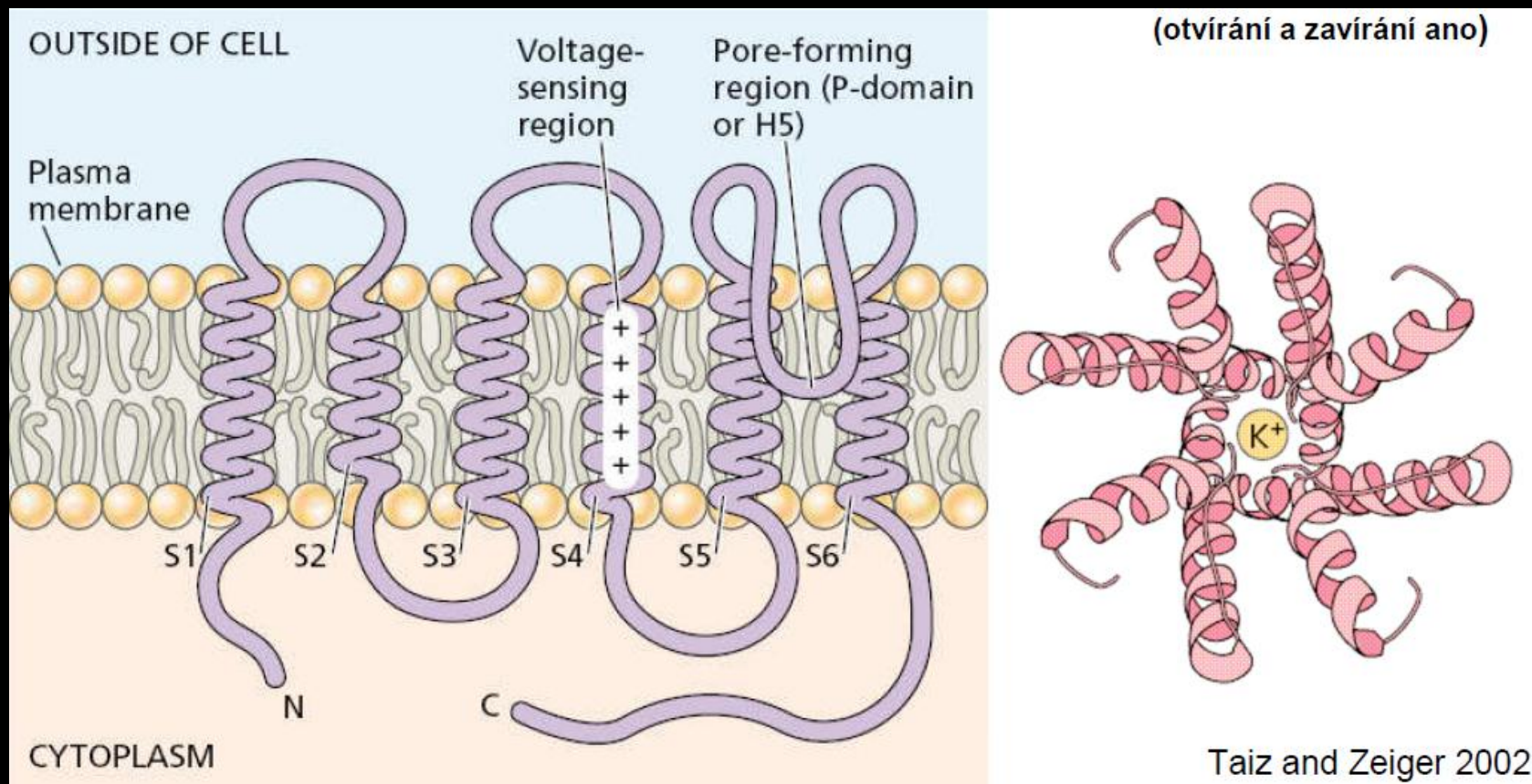
- při přenosu mění konformaci
- přenos aktivní nebo pasivní

schéma sekundárního aktivního transportu přenašečem (symport)

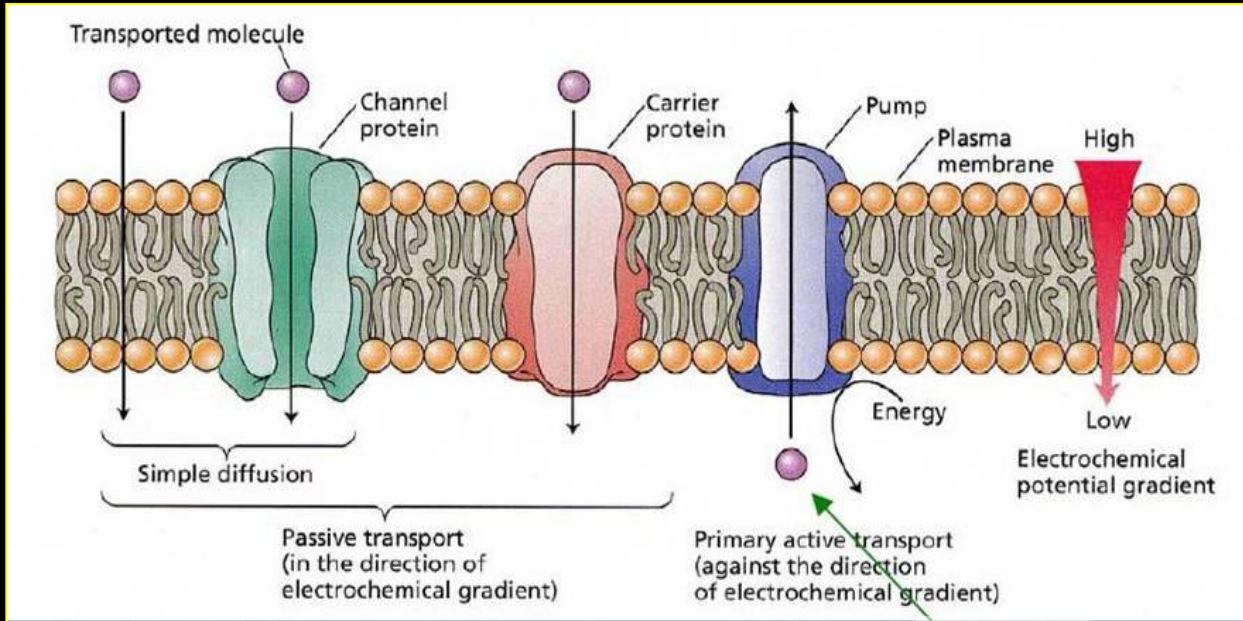


KANÁLY

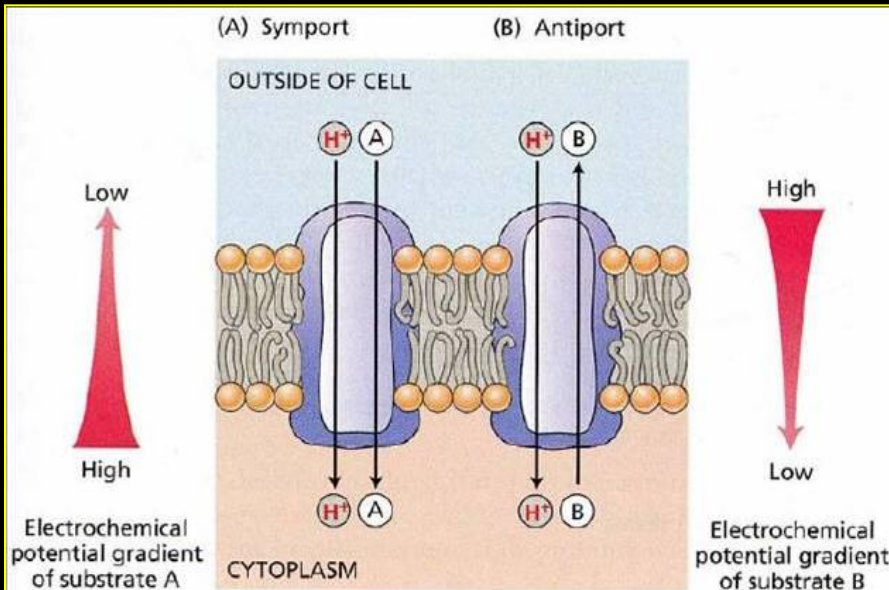
- usnadňují **pasivní spontánní** přenos látek přes membránu
- zůstávají otevřeny různě dlouhou dobu, spontánně se zavírají
- různá míra **selektivity**
- **vlastní přenos** látky není spojen se změnou konformace transportního proteinu



TRANSPORTNÍ PROCESY NA MEMBRÁNÁCH



H^+ , Ca^{2+}



Pasivní

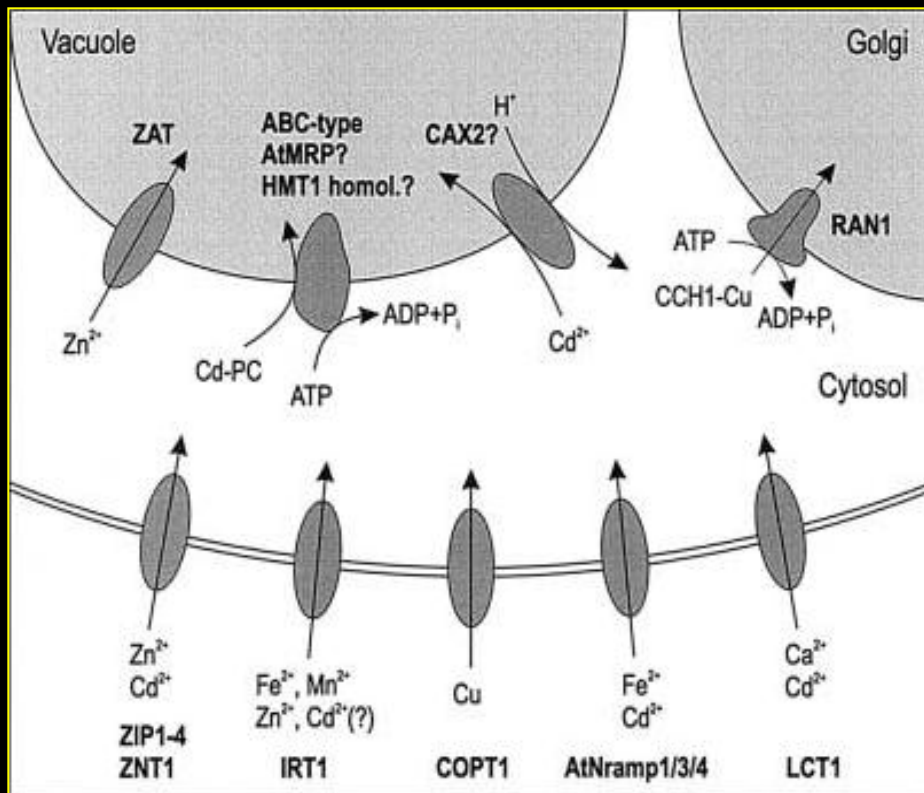
- prostá difuze
- zprostředkovaný transport kanály přenašeče

Aktivní

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



ROSTLINNÉ TRANSPORTÉRY KOVŮ



- Rodina ZIP transportních proteinů
- Cu transportéry
- Rodina NRAMP transportních proteinů
- ATPásy: P_{1B} ATPásy
- Rodina CDF transportních proteinů
- Kation/ H^+ antiportéry
- Rodina ABC transportních proteinů
- Další přenašeče těžkých kovů

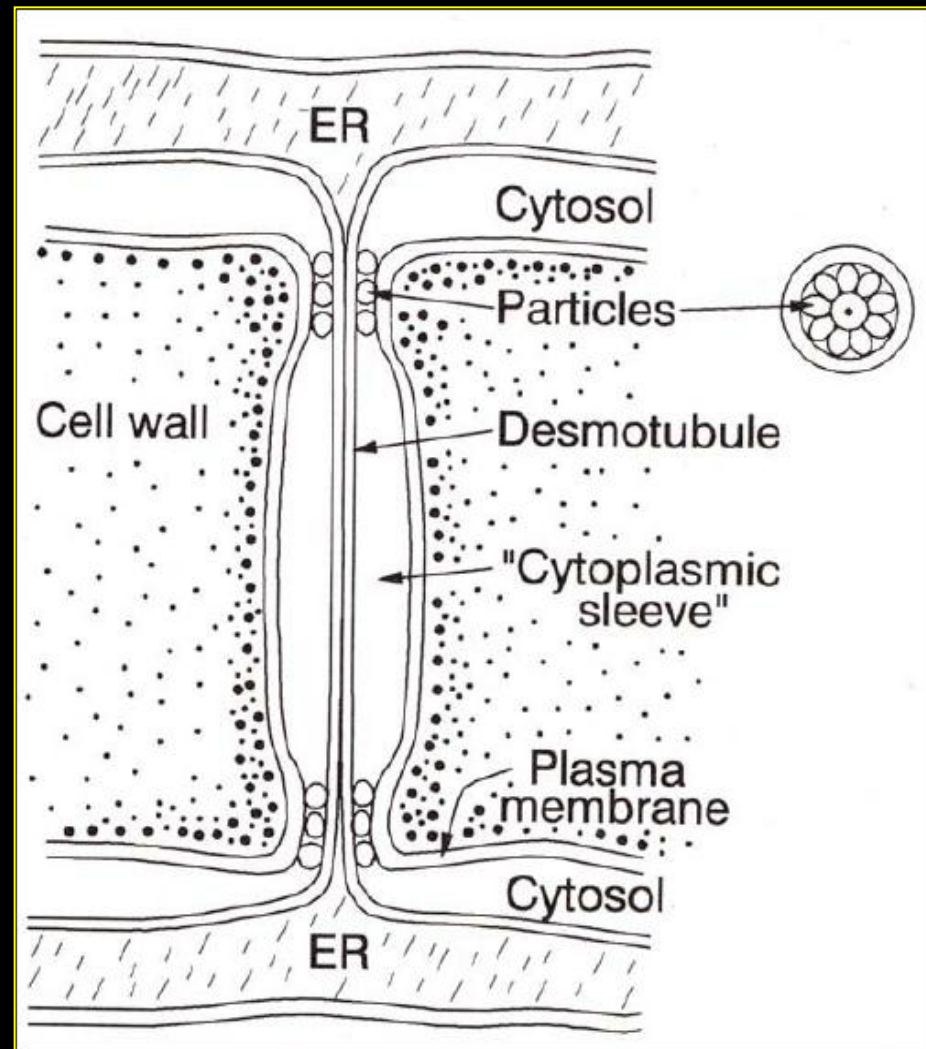


Transport látek v rostlině

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

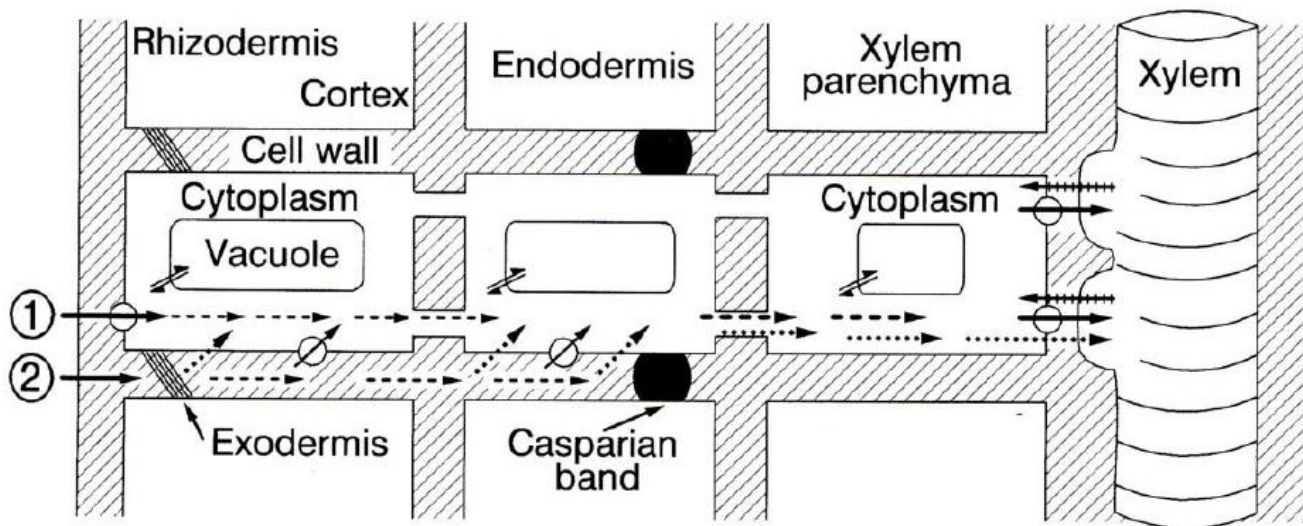
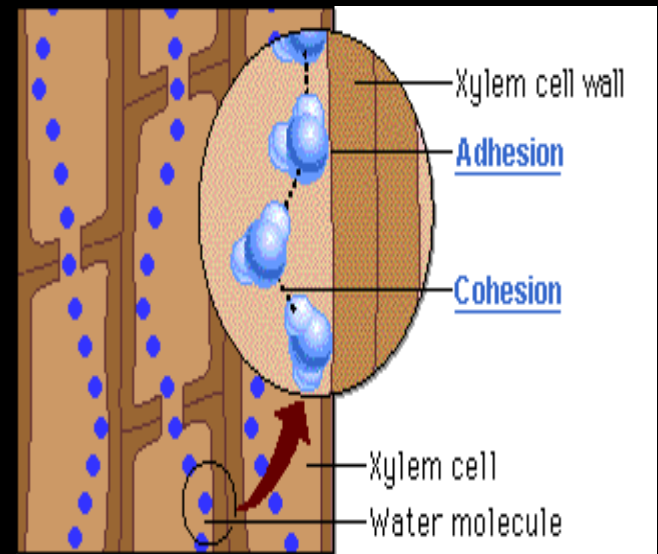
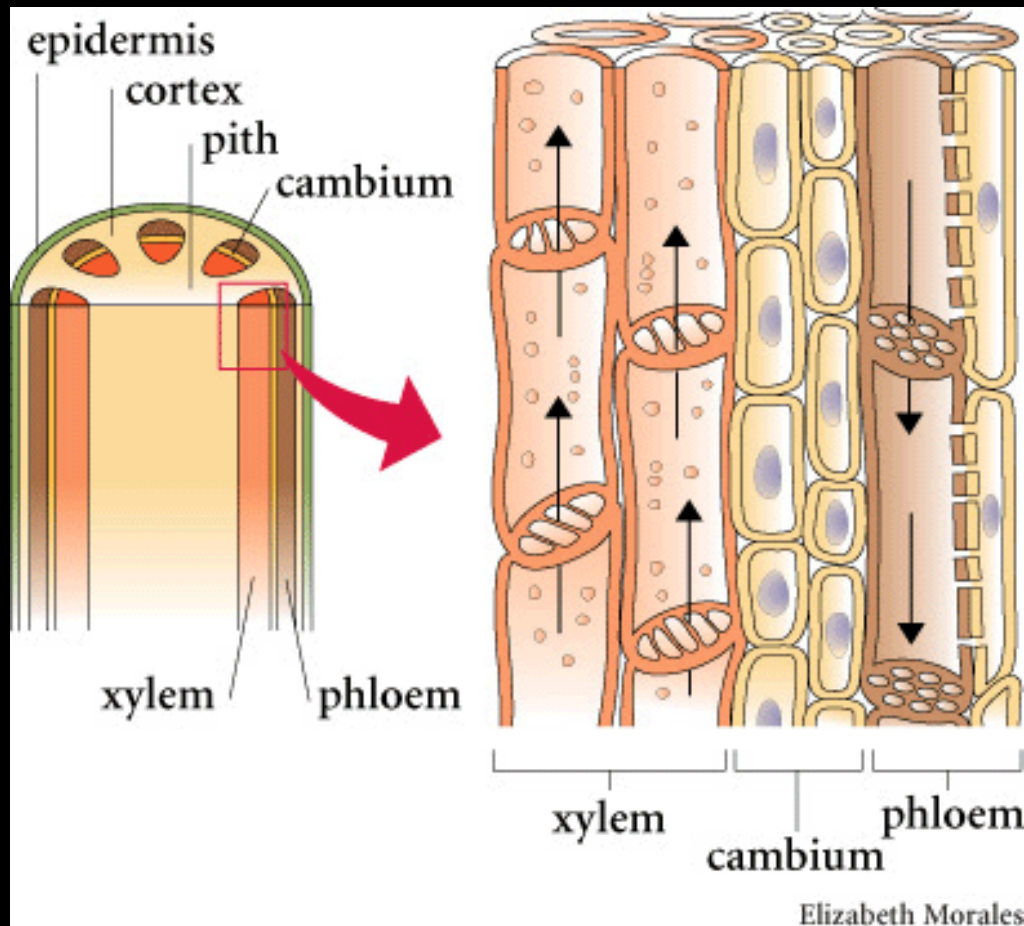
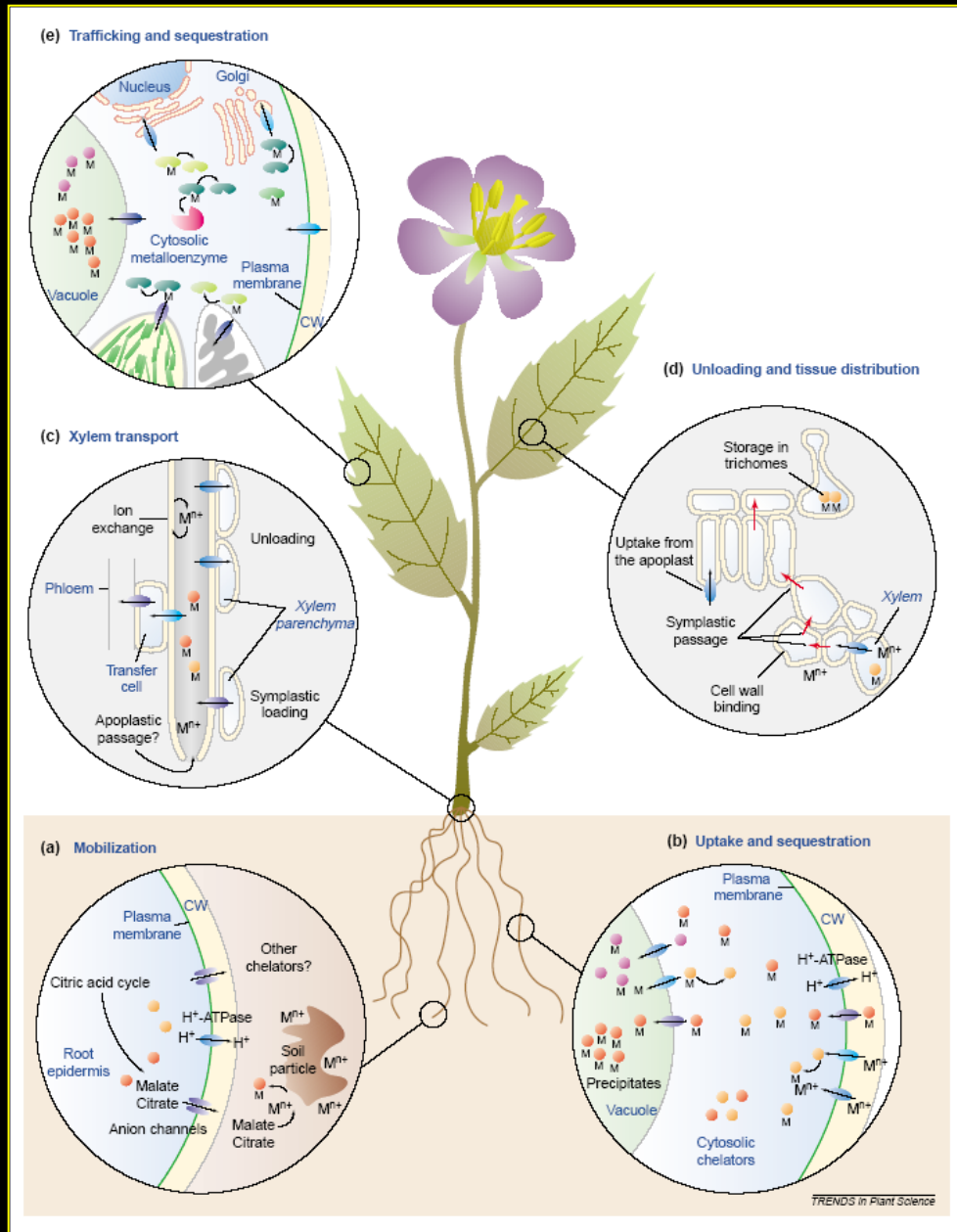


Fig. 2.35 Model for symplasmic (1) and apoplasmic (2) pathways of radial transport of ions across the root into the xylem. Key: ⊕→, active transport; ←, resorption. (Modified from Läuchli, 1976a.)

TRANSPORT LÁTEK XYLÉMEM



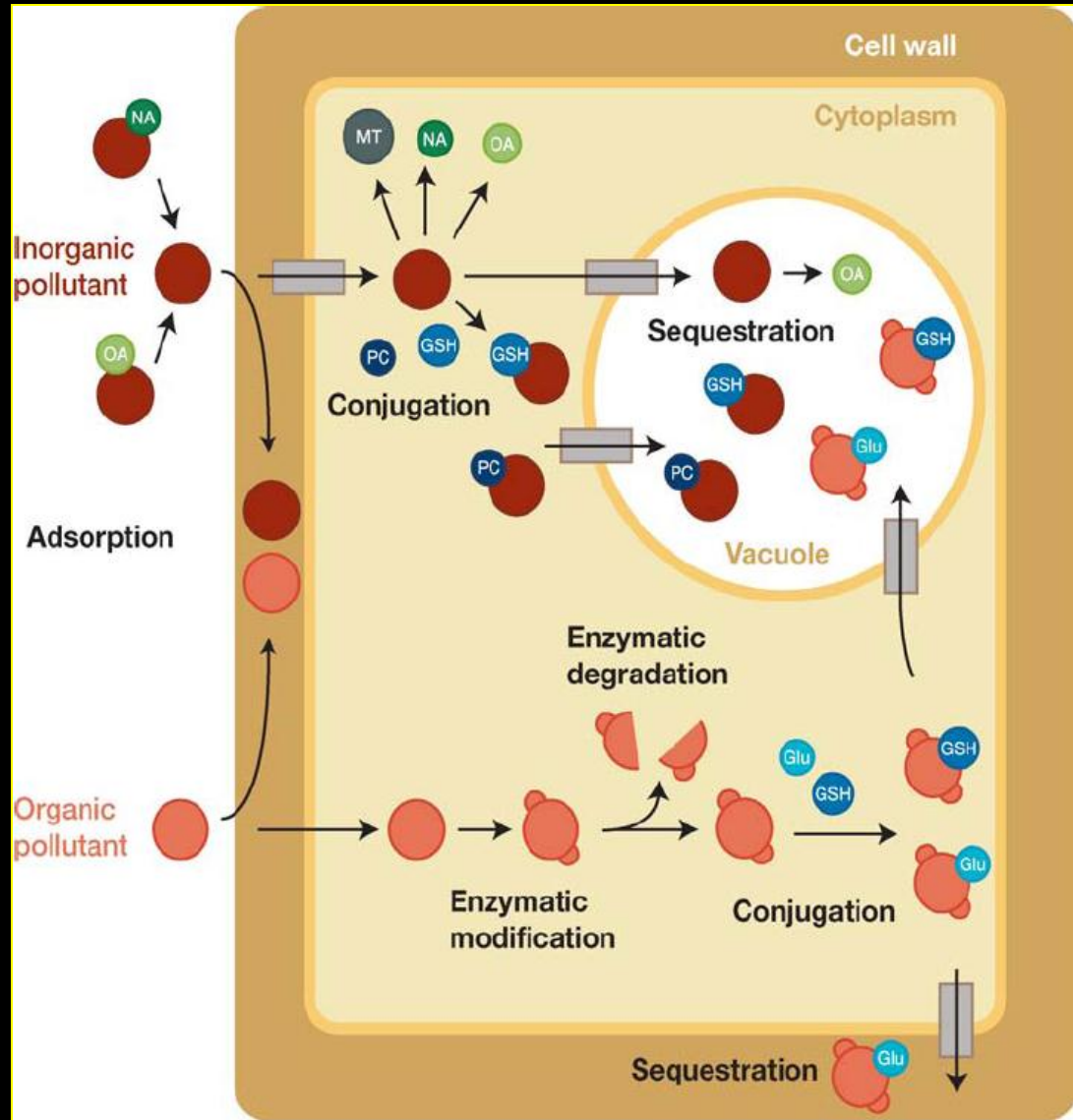
MECHANISMUS PŘÍJMU KOVŮ



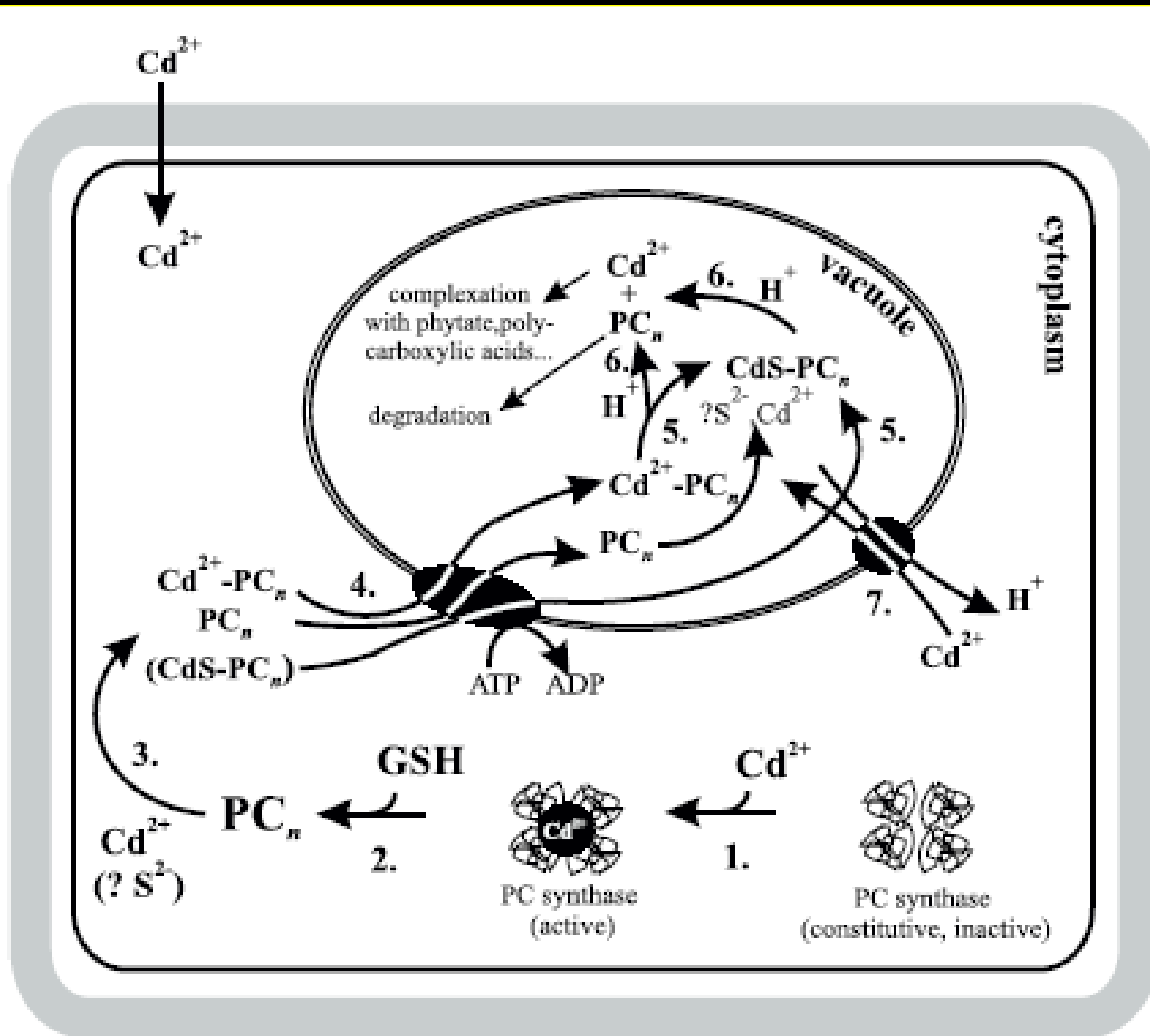


Konjugace, degradace, sequestrace látek v rostlině

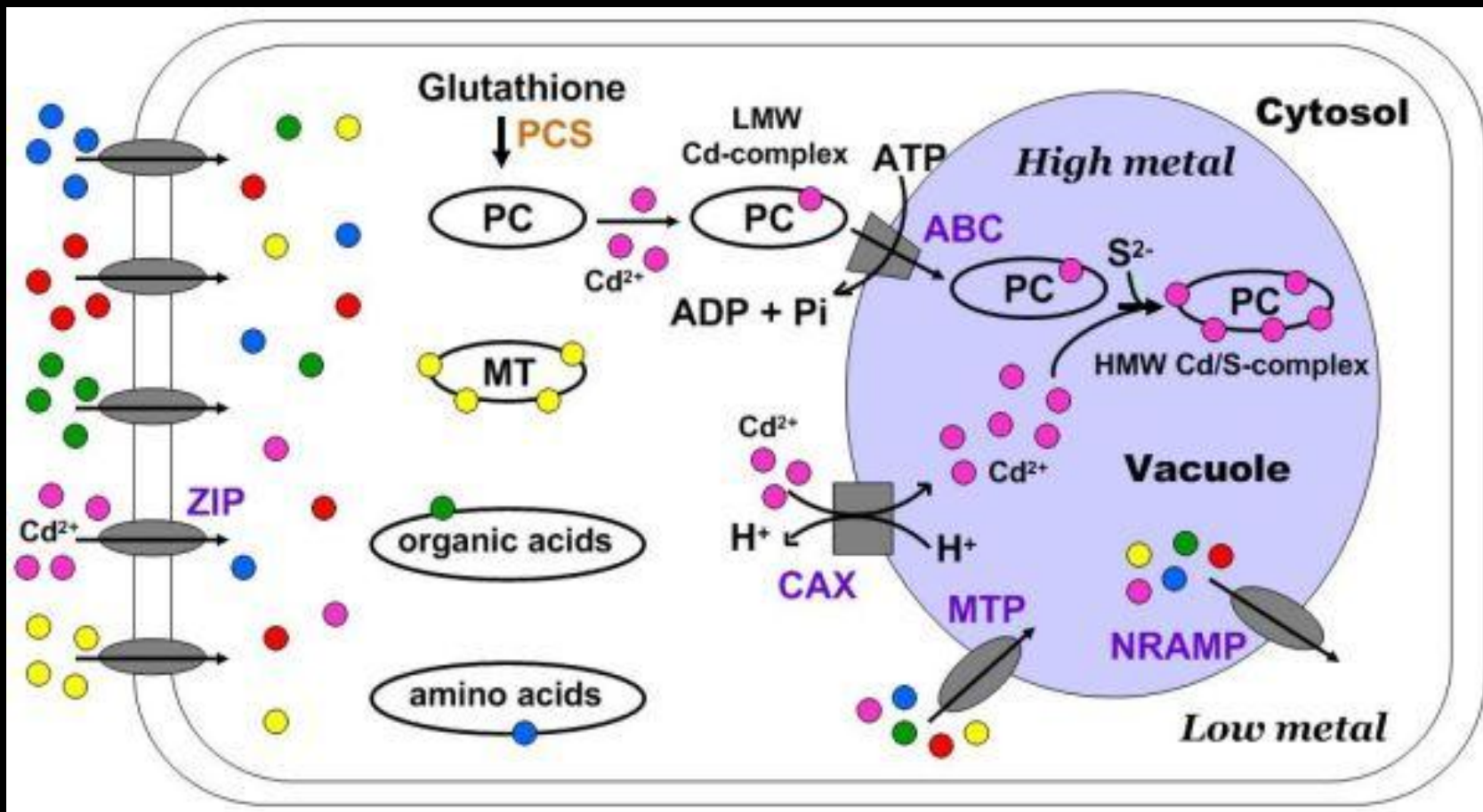
MECHANISMUS DETOXIFIKACE TĚŽKÝCH KOVŮ



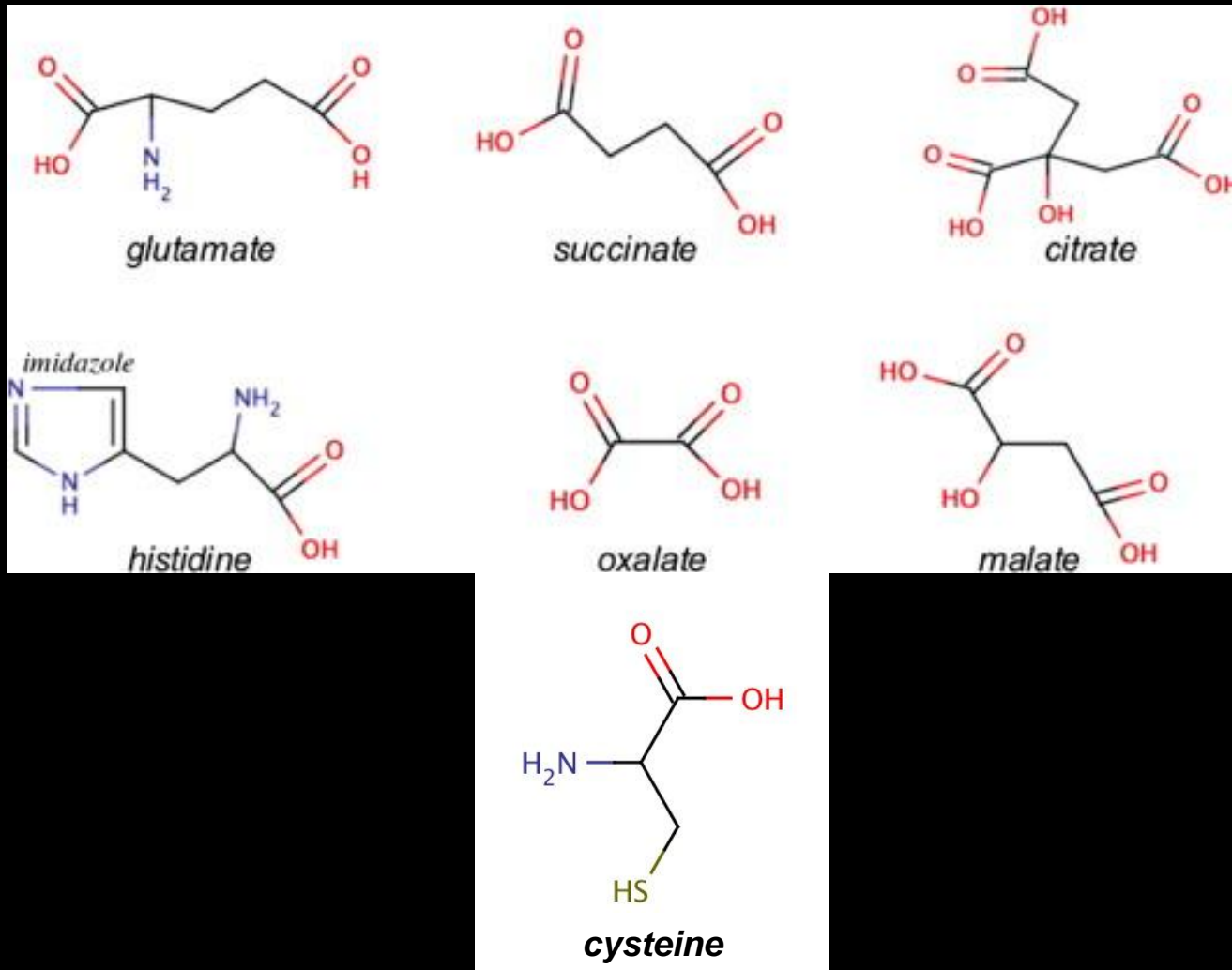
MODEL SYNTÉZY FYTOCHELATINU



BIOLOGICKÉ CHELATUJÍCÍ SLOUČENINY



AMINOKYSELINY A ORGANICKÉ KYSELINY



METALOTHIONEINY

obsahují typické dvě kov-vážíci, na cystein- bohaté domény
konformace podobnou čince
klasifikovány na základě uspořádání Cys zbytků

✓ I. třída

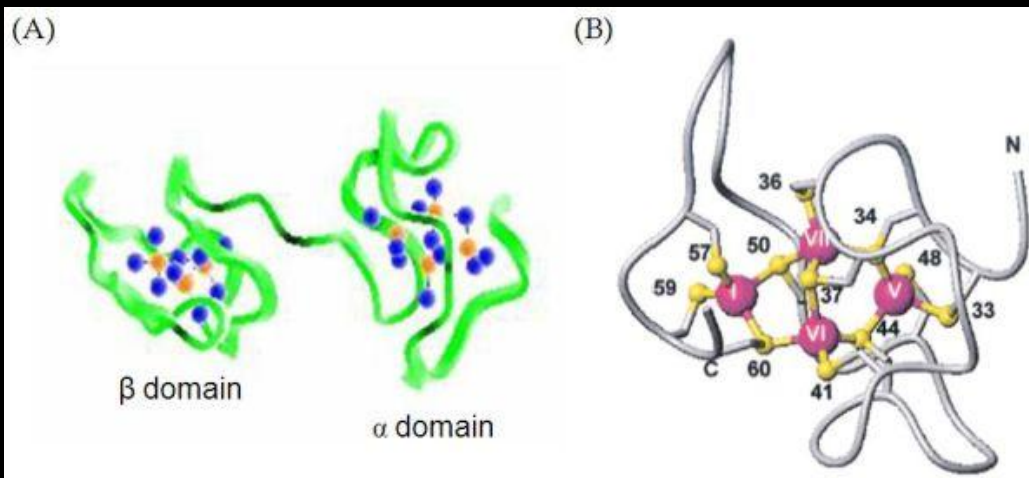
- obsahují 20 vysoce konzervovaných Cys zbytků
- rozšířeny v obratlovcích

✓ II. třída

- metalothioneiny z rostlin a hub a také z bezobratlých živočichů
- bez striktního uspořádání cysteinů
- tři typy

✓ III. třída

- tomto klasifikačním systému jsou PCs



METALOTHIONEINY

Typ 1

- obsahuje celkem šest motivů
- distribuovány rovnoměrně mezi dvěma doménami
- obě domény vzájemně separovány pomocí přibližně 40 aminokyselin

Typ 2

- obsahuje dvě na cystein bohaté domény separované můstkem o přibližně 40 aminokyselinových zbytcích
- první pár cysteinů jako motiv Cys-Cys
- Cys-Gly-Gly-Cys motiv se vyskytuje na konci N-terminální domény
- sekvence N-terminální domény jsou vysoce konzervativní
- C-terminální doména obsahuje tři Cys-Xaa-Cys motivy
- můstková oblast oddělující tyto domény druhově velmi variabilní



METALOTHIONEINY

Typ 3

- obsahuje pouze čtyři Cys zbytky v N-terminální doméně
- shodná sekvence pro první tři je Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys
- čtvrtý cystein ve vysoce konzervativním motivu Gln-Cys-Xaa-Lys-Lys-Gly
- šest Cys zbytků v C-terminální doméně v Cys-Xaa-Cys motivech
- obě domény odděleny jedna od druhé asi 40 aminokyselinovými zbytky

Typ 4

- odlišný od ostatních rostlinných MTs
- skládá ze tří na cystein bohatých domén
- každá obsahuje 5 nebo 6 konzervativních cysteinových zbytků
- jsou separovány 10 až 15 zbytky
- většina cysteinů je jako Cys-Xaa-Cys motivy



FYTOCHELATINY

PCs je $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$, kde n je číslo od 2 do 11

- ✓ s aminokyselinou $\beta\text{-Ala}$ - čeled *Fabaceae*
- ✓ s aminokyselinou Ser - čeled *Poaceae*
- ✓ s aminokyselinou Glu - v kořenech semenáčků *Zea mays*
- ✓ Gly-deficitní - např. v *Oryza sativa*

syntetizovány z prekursoru glutathionu (GSH)

biosyntézy GSH se účastní enzym γ -glutamylcysteinsynthetasa (E.C.6.3.2.2.)

γ -glutamylcystein dipeptidyl transpeptidasa (fytochelatin synthasa) syntetizuje PCs

tetramer o celkové molekulární hmotnosti 95 kDa (podjednotka 25 kDa)

geny fytochelatin synthasy poprvé identifikovány v *Arabidopsis* (AtPCS1 a AtPCS2)

Indukovány:

Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Sb^{3+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Hg^{2+} , AsO_4^{3-} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , SeO_3^{2-} , Au^+ , Bi^{3+} , Te^{4+} , W^{6+}

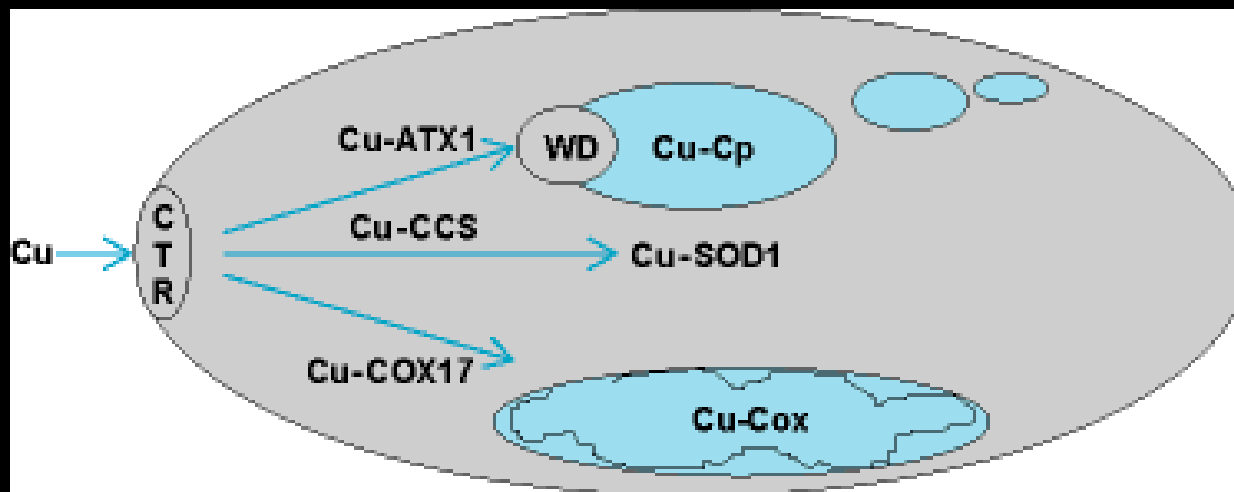
Neindukují:

K^+ , Na^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , MoO_4^{2-} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , VO^{2+} , UO_2^{2+}



METALOCHAPERONY

- intracelulární transportní proteiny přechodných kovů
- slouží enzymům s kovovými kofaktory
- funkce není detoxifikační
- cílem je ochránit kovový iont a usnadnit partnerství s apoenzymem



CTR - transportér mědi

CCS - copper chaperone pro SOD1

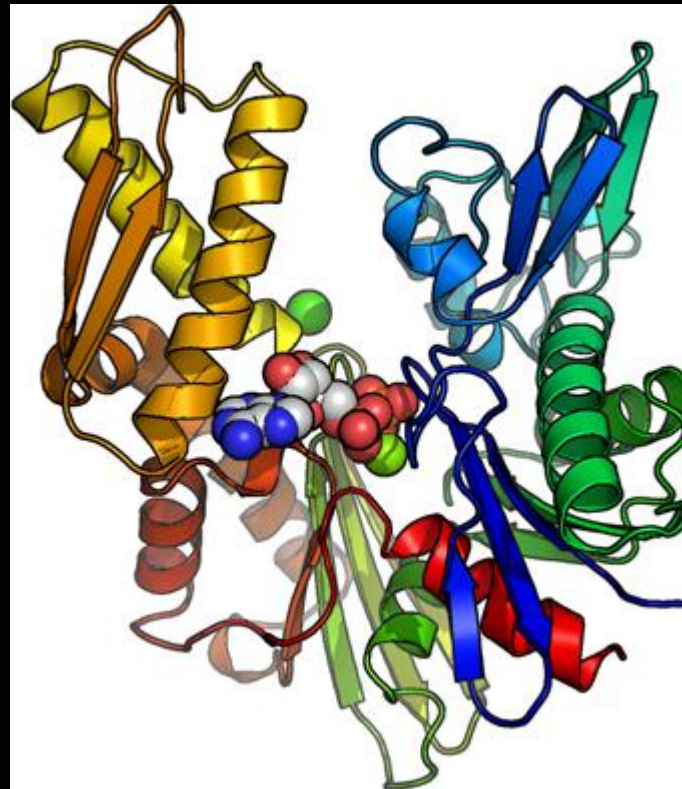
ATX1 - anti-oxidant protein

COX17 - cytochrom oxidasa 17

SOD1 - superoxid dismutasa

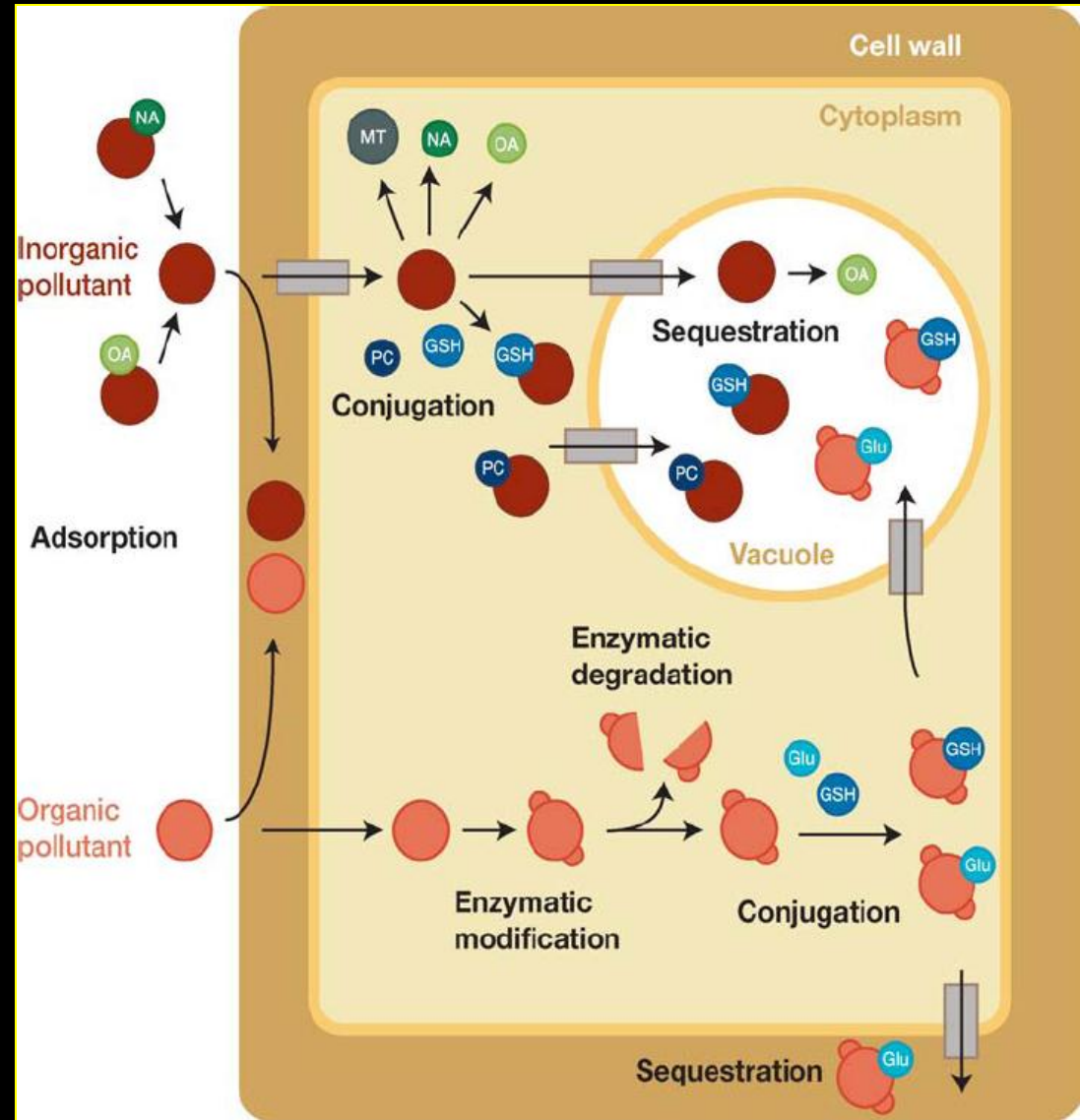
„HEAT SHOCK“ PROTEINY

- Heat shock proteiny (HSP) indukovány v reakci na růst organismů při teplotách vyšších než jejich optimální růst teploty.
- vyskytují se u všech skupin živých organismů
- klasifikovány dle velikosti molekul
- vznikají v reakci na různé stresové podmínky včetně těžkých kovů
- působí jako molekulární chaperony při syntéze bílkovin
- možná funkce v oblasti ochrany a opravy bílkovin za stresových podmínek.



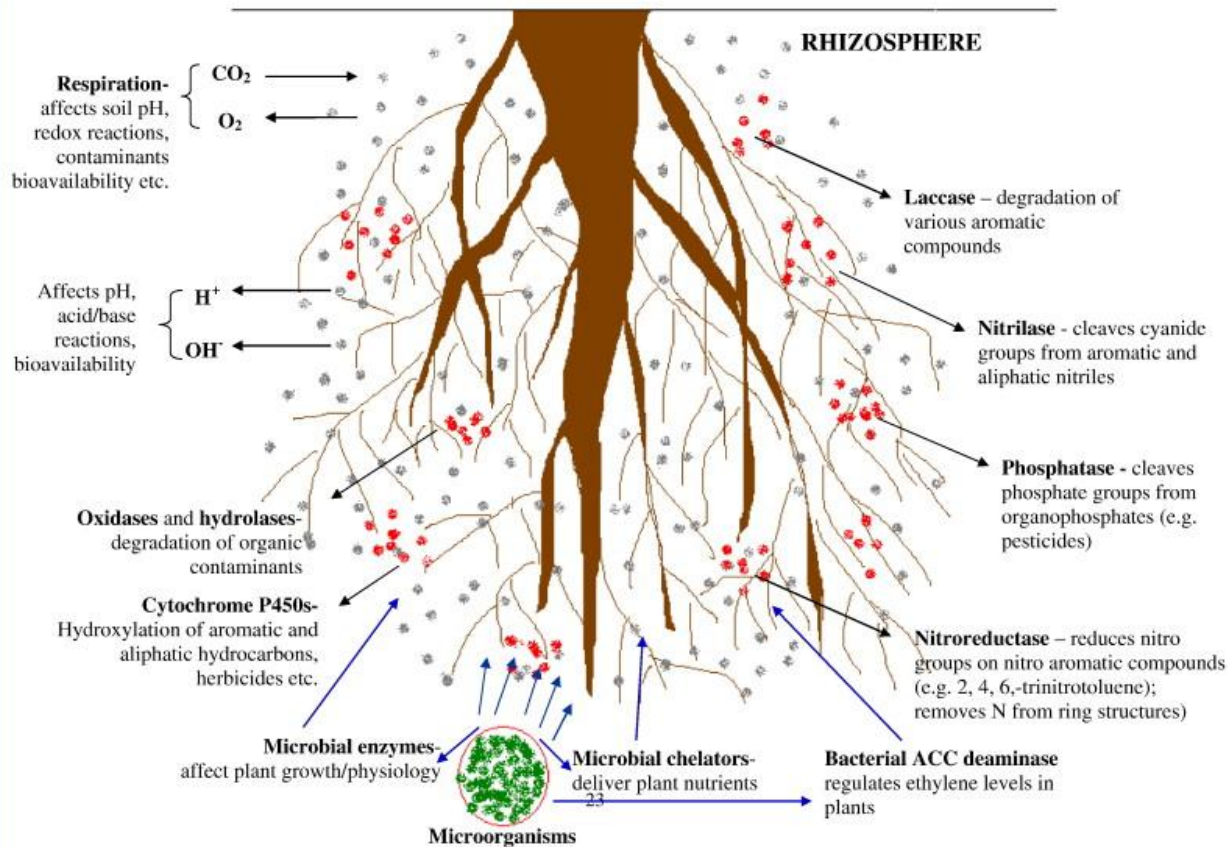
FÁZE BIOTRANSFORMACE ORGANICKÝCH LÁTEK

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



ENZYMY I. FÁZE

- Peroxidasy
- Nitroreduktasy
- Esterasy
- Cytochromy P450
 - Stovky isoformem
 - 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, –NH₂, –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**

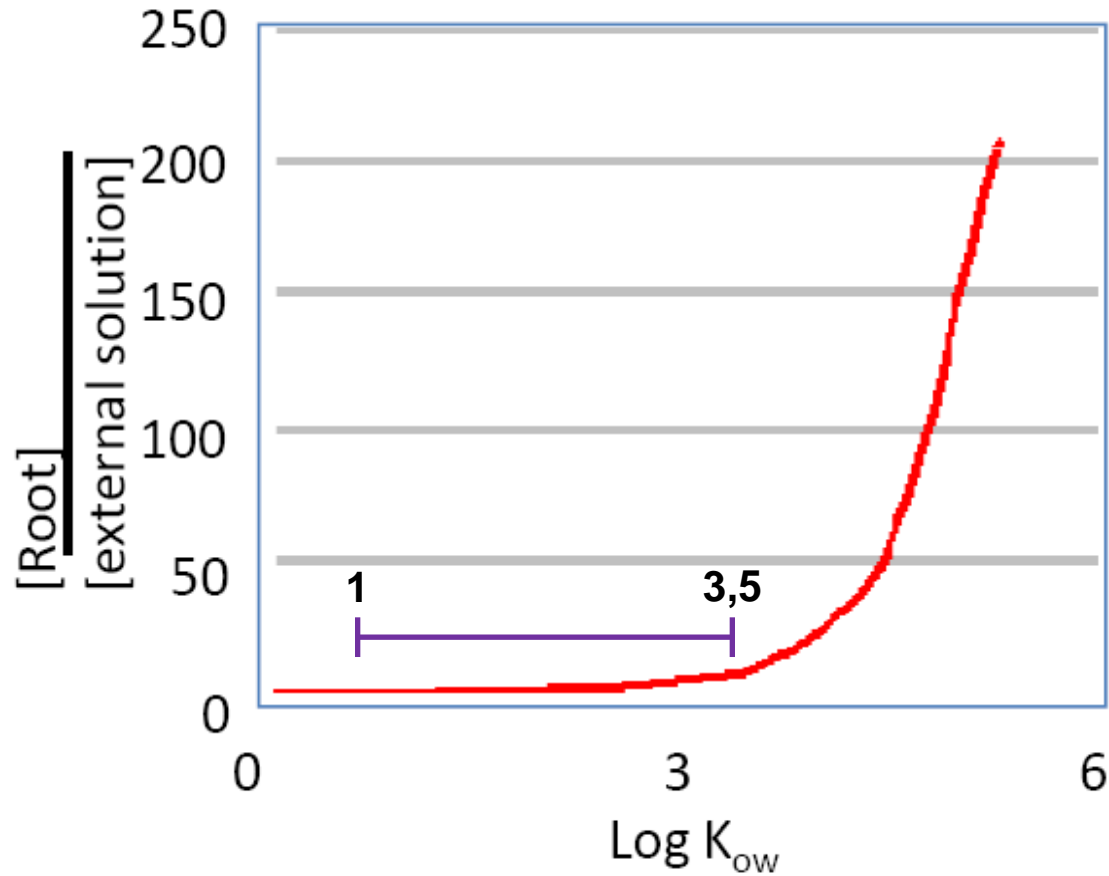


PŘÍJEM ZÁVISÍ NA MNOHA FAKTORECH

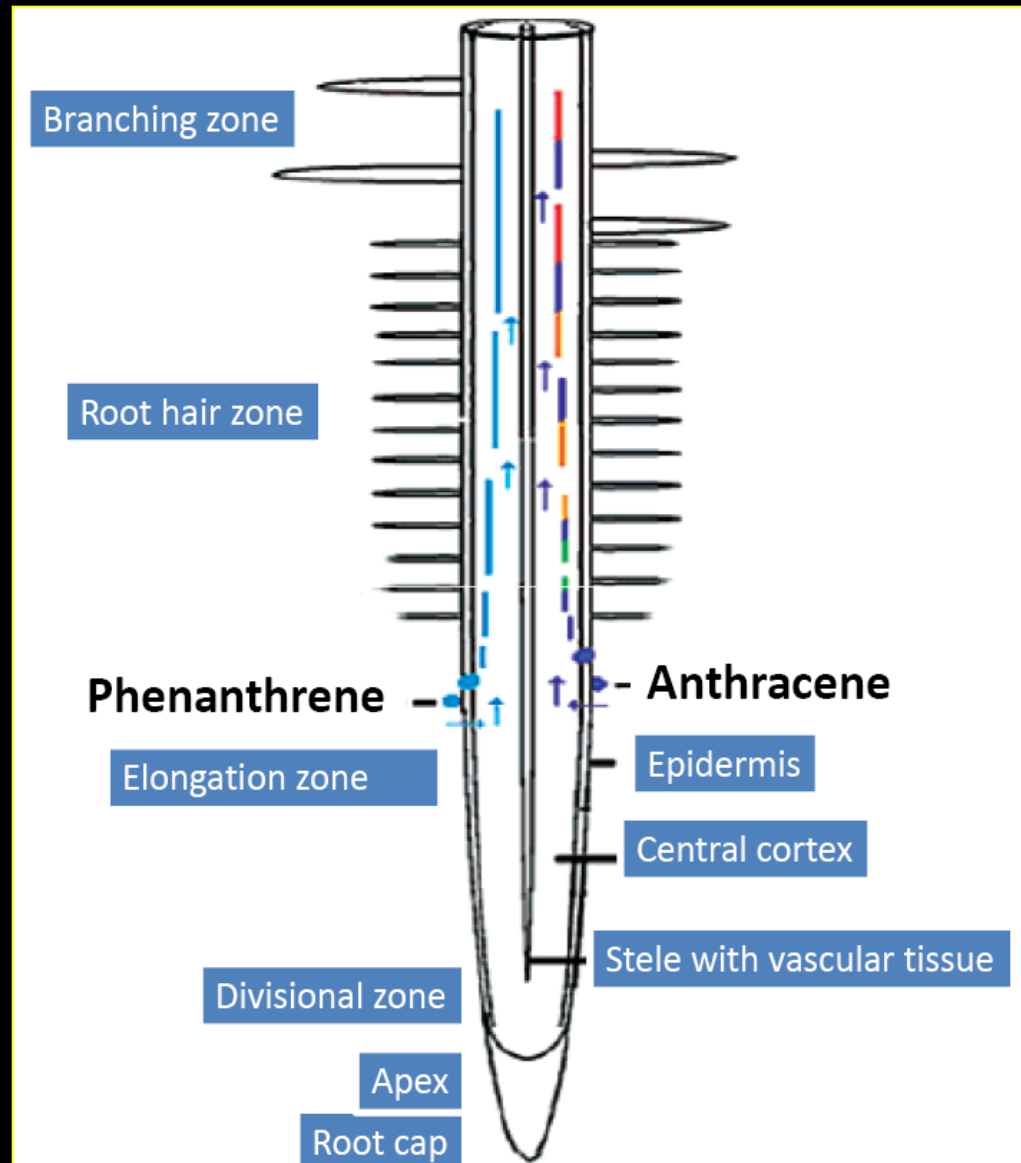
- Molekula – $\log K_{OW}$, MW
- Složení půdy (jíl, oxidy železa, organická hmota)
- Typy a množství lipidů v kořenových buňkách
- Rychlost transpirace
- Kořenové exudáty
- Snížení růstu
- Enzymatická výbava

ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT OKTANOL - VODA

Hydroponické kultury

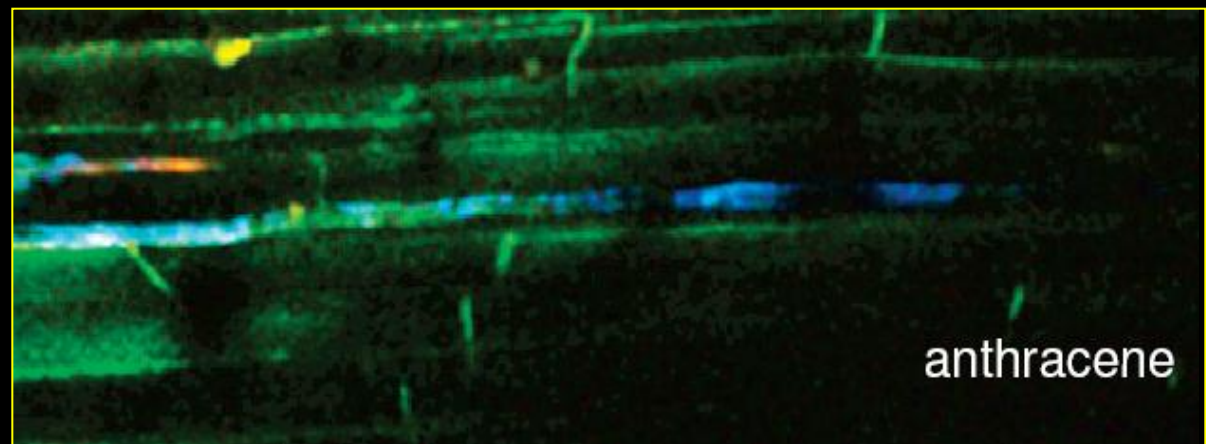
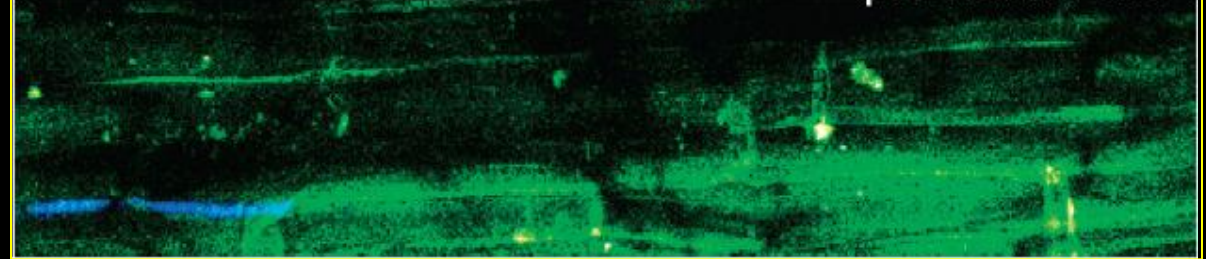
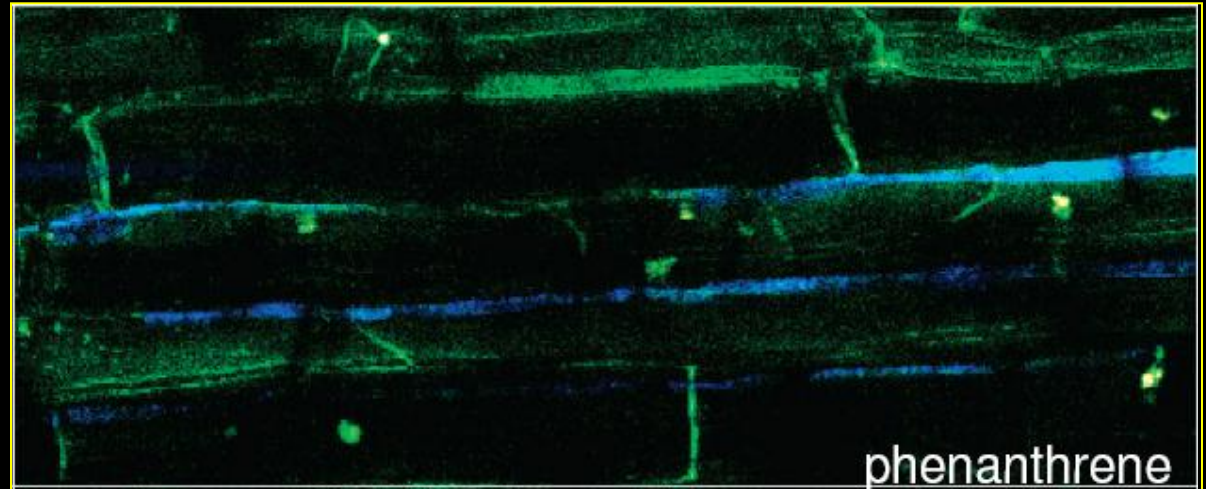


VSTUP A TRANSPORT ORG. LÁTEK V KOŘENI



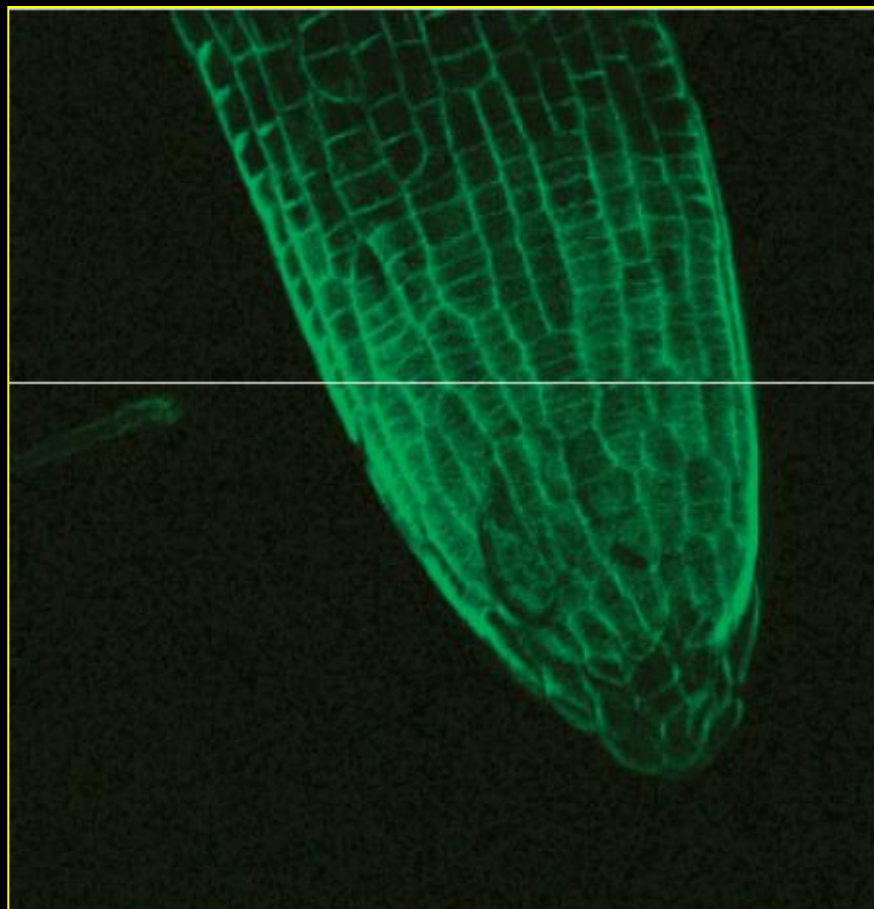
DVOUFOTONOVÁ EXCITAČNÍ MIKROSKOPIE

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



KOŘENOVÁ ŠPIČKA

Žádný antracén/fenantrén ve vodivých pletivech



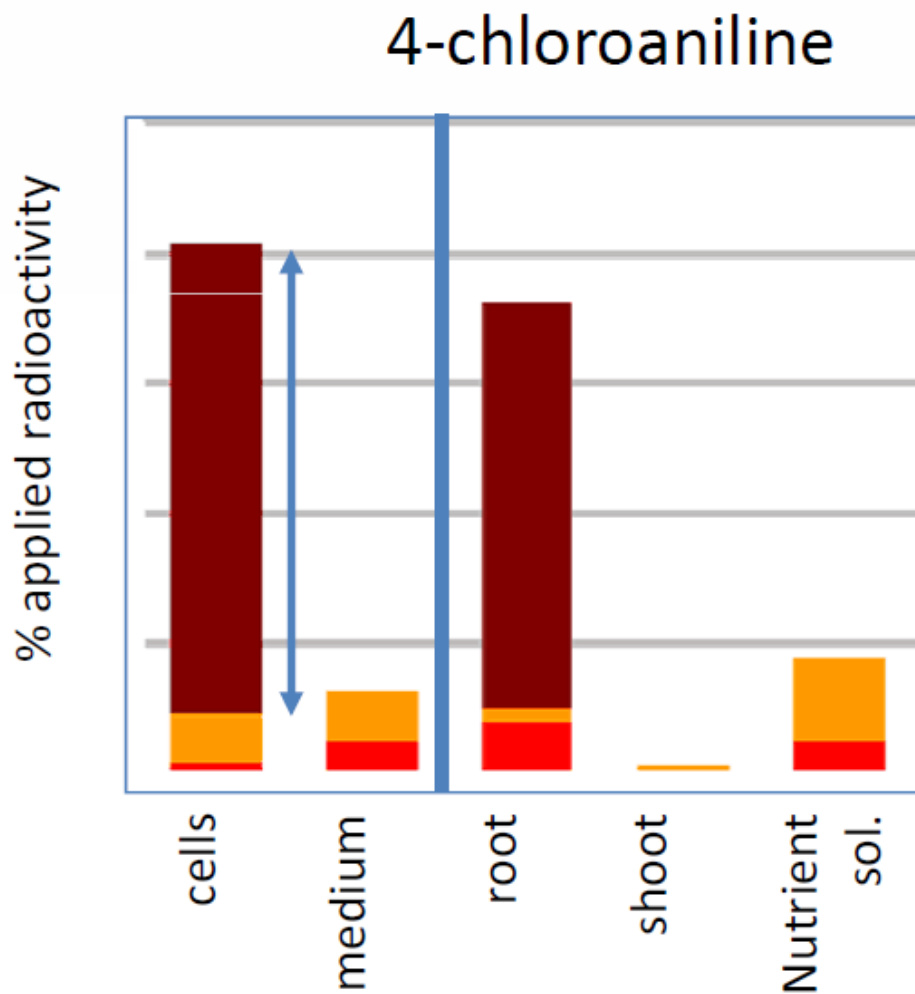
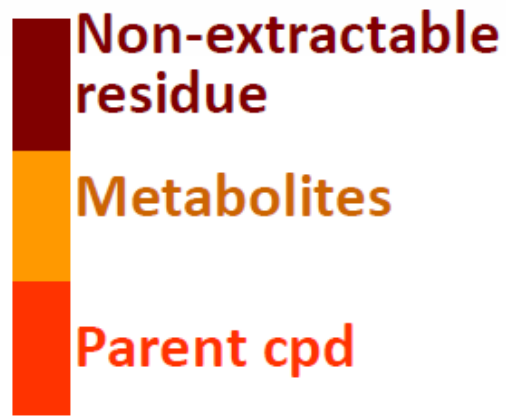
Žádný antracén/fenantrén v kořenové špičce

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





BUNĚČNÁ A HYDROPONICKÁ KULTURA PŠENICE TRANSPORT METABOLITŮ Z KOŘENŮ ?



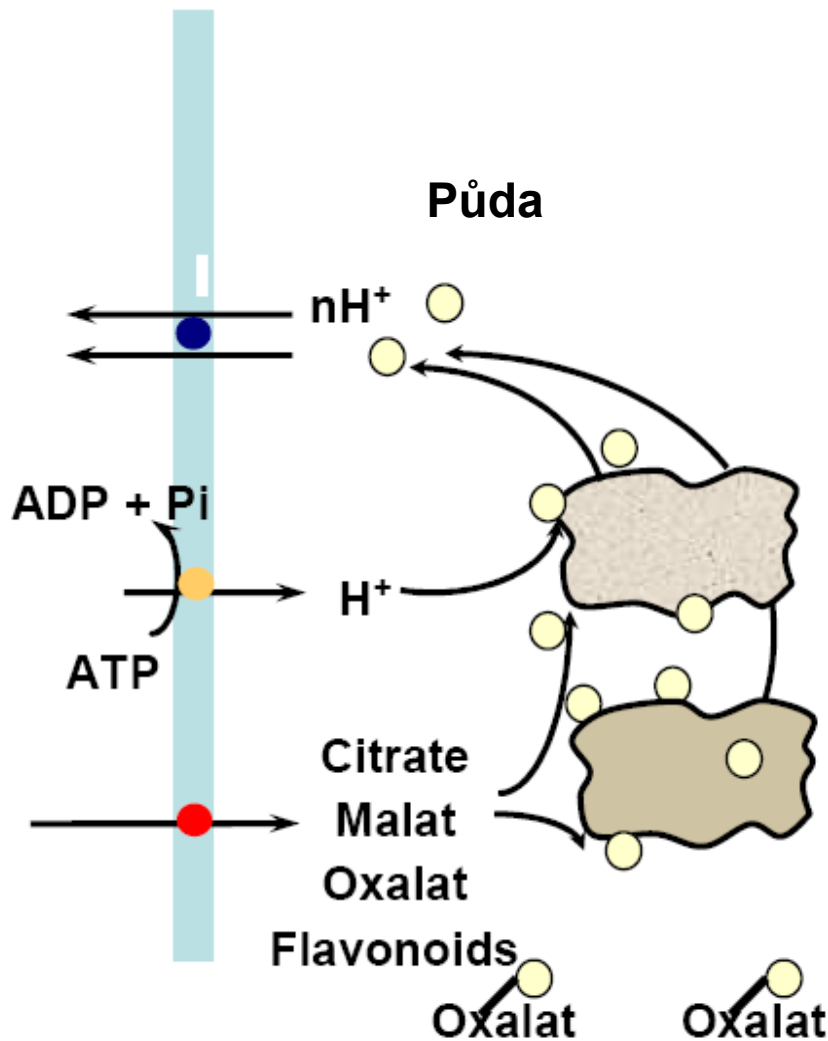


Vnější faktory zlepšující příjem látek

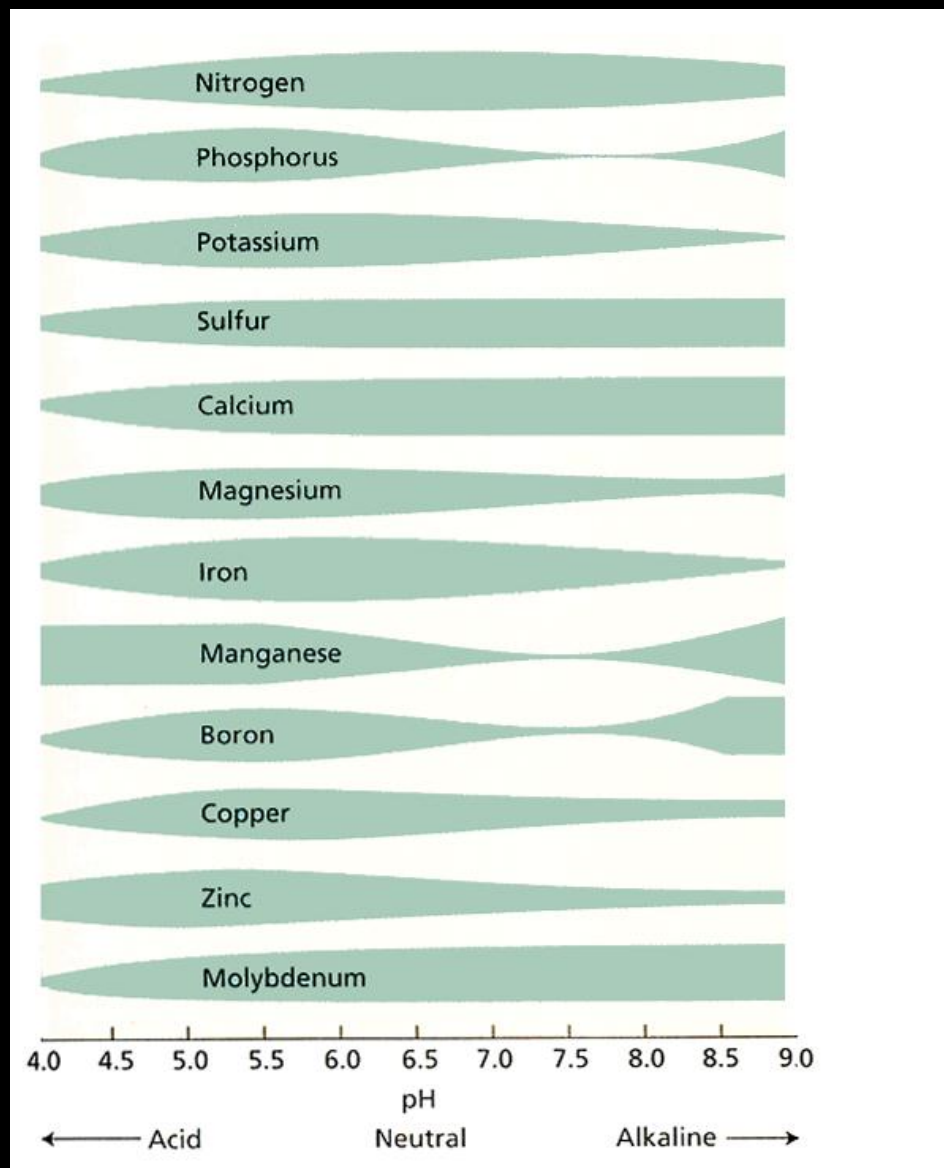
KOŘENOVÉ EXUDÁTY

Cytosol

Půda



VLIV pH NA PŘÍJEM MINERÁLNÍCH ŽIVIN



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

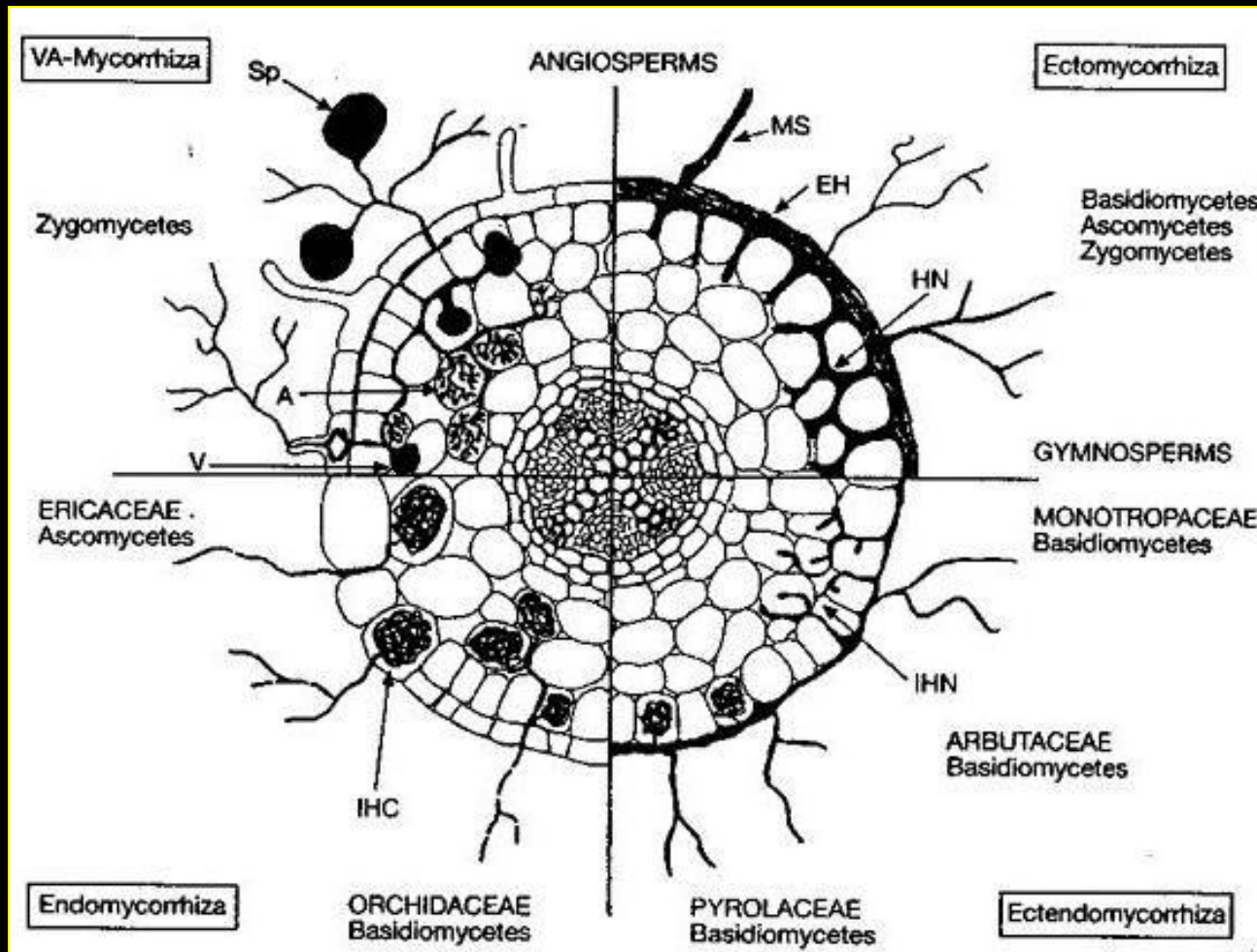


EKTOMYKORHIZA

- 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.