

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling met

Titel: Zaadendofyten: essentiële spelers in de responsen van Arabidopsis thaliana na Cd-blootstelling?
Richting: 2de masterjaar in de biomedische wetenschappen - klinische moleculaire wetenschappen
Jaar: 2009

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

TRUYENS, Sascha

Datum: 14.12.2009

Zaadendofyten: essentiële spelers in de responsen van Arabidopsis thaliana na Cd-blootstelling?

Sascha Truyens

promotor :
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad
master in de biomedische wetenschappen klinische moleculaire
wetenschappen



Inhoudsopgave

Afkortingenlijst	
Dankwoord	
Abstract	
1 Inleiding	1
1.1 Fysiologische effecten van cadmium	1
1.1.1 Effecten van cadmium op de mens	1
1.1.2 Effecten van cadmium op planten	2
1.2 Cellulaire effecten van cadmium.....	3
1.2.1 Oxidatieve stress	3
1.2.2 Oxidatieve schade	5
1.2.3 Antioxidatieve verdediging	6
1.3 Probleemstelling.....	7
1.4 Fytoremediatie.....	8
1.5 Zaadendofyten	10
1.6 Doelstelling	10
2 Materialen en methoden	11
2.1 Identificatie en karakterisatie van de zaadendofyten	11
2.1.1 Optimalisatie van de isolatie	11
2.1.2 Isolatie	12
2.1.3 DNA extractie	12
2.1.4 ARDRA	12
2.1.5 Identificatie.....	13
2.1.6 Fenotypische karakterisatie	13
2.2 Verticale agarplaten.....	14
2.2.1 Optimalisatie van de inoculatie	14
2.2.2 Optimalisatie van de cadmiumconcentratie	15
2.2.3 Inoculatie-experiment.....	15
2.3 Hydrocultuur	16
2.3.1 Optimalisatie van de inoculatie	16
2.3.2 Optimalisatie van de cadmiumconcentratie	17
2.3.3 Inoculatie-experiment.....	17
2.3.4 Bepalen van de genexpressie.....	18

2.3.5	Metaalbepaling	18
2.4	Statistische analyse.....	19
3	Resultaten en discussie.....	19
3.1	Identificatie en karakterisatie van de zaadendofyten	19
3.1.1	Samenstelling en eigenschappen van de zaadendofytpopulatie.....	19
3.2	Verticale agarplaten.....	22
3.2.1	Optimalisatie van de inoculatie	22
3.2.2	Optimalisatie van de cadmiumconcentratie	23
3.2.3	Inoculatie-experiment.....	24
3.3	Hydrocultuur	25
3.3.1	Optimalisatie van de inoculatie	25
3.3.2	Optimalisatie van de cadmiumconcentratie	26
3.3.3	Inoculatie-experiment.....	29
4	Conclusie en synthese	34
	Referenties.....	36
	Bijlagen	39
	Bijlage 1: samenstelling van het 869 en 284 medium.....	39
	Bijlage 2: samenstelling van het CAS reagens en ST medium.....	40
	Bijlage 3: samenstelling van de Hoagland voedingsoplossing	41
	Bijlage 4: resultaten van de genexpressie voor de optimalisatie van de Cd-concentratie in hydrocultuur	42

Afkortingenlijst

AA	Ascorbaat
APX	Ascorbaatperoxidase
ARDRA	'Amplified ribosomal DNA restriction analysis'
ACC	1-aminocyclopropaan-1-carbonzuur
CAS	Chromium-azurol S
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
Cl	Chloor
CSD	Koper-zink superoxidedismutase
Cu	Koper
DHA	Dehydroascorbaat
DHAR	Dehydroascorbaatreductase
FSD	Ijzer superoxidedismutase
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreductase
GSH	Gereduceerd glutathion
GSSG	Geoxideerd glutathion
H ₂ O	Water
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
IAA	Indol-3-azijnzuur
K _{ve}	Kolonievormende eenheden
LOX	Lipoxygenase
MDHA	Monodehydroascorbaat
MDHAR	Monodehydroascorbaat reductase
O ₂	Zuurstof
O ₂ ^{-•}	Superoxide anion
¹ O ₂	Singlet zuurstof
OH [•]	Hydroxyl radicaal
OH ⁻	Hydroxyl anion
PAR	'Photosynthetic active radiation'

PCR	'Polymerase chain reaction'
ROS	Reactieve zuurstofvormen
RBOH	'Respiratory burst oxidase homolog'
Rpm	Rotaties per minuut
SOD	Superoxide dismutase
ST medium	Sucrose tryptone medium
VAP	Verticale agarplaten
Vlam-AAS	Vlam-atomaire absorptie spectrometrie
Zn	Zink

Dankwoord

Graag wil ik Prof. dr. Vangronsveld bedanken voor de mogelijkheid om deze thesisstage te lopen in het labo milieubiologie van het Centrum voor Milieukunde. Ook wil ik drs. Nele Weyens en drs. Kelly Opdenakker bedanken voor alle uitleg, de begeleiding in het labo en het nalezen van dit verslag. Verder wil ik drs. Jana Boulet bedanken voor haar hulp tijdens de stage. Ten slotte wil ik ook mijn medestudente Eline Saenen bedanken voor de fijne tijd en voor haar hulp bij de experimenten.

Abstract

De aanwezigheid van zware metalen in het milieu verstoort de werking van ecosystemen en veroorzaakt ernstige gezondheidsproblemen. Een duurzame oplossing voor deze problemen is fytoextractie, waarbij planten en hun geassocieerde micro-organismen gebruikt worden voor het verwijderen van zware metalen uit bodem en grondwater. Voor het verbeteren van fytoextractie kan gebruik gemaakt worden van endofyten. Dit zijn bacteriën die in het plantenweefsel leven en de plantengroei kunnen stimuleren.

In dit project werd het effect van zaadendofyten op *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan cadmium (Cd) bestudeerd. In een eerste fase werd een vergelijking gemaakt tussen de endofytopopulatie in zaden van planten die gedurende verschillende generaties gekweekt werden op een bodem met 2 μM Cd (Cd-zaden) en zaden van planten die niet blootgesteld werden aan Cd (controlezaden). Hieruit bleek dat in controlezaden voornamelijk *Bradyrhizobium sp.* en *Bacillus arsenicus sp.* voorkomen. In Cd-zaden waren *Bacillus sp.* het meest aanwezig. Bovendien werden eigenschappen zoals Cd-resistentie, siderofoorproductie en indol-3-azijnzuur-productie enkel vastgesteld bij de endofyten geïsoleerd uit Cd-zaden.

In een tweede fase werd een vergelijking gemaakt tussen planten afkomstig van controlezaden, Cd-zaden en controlezaden geïnoculeerd met de endofytopopulatie uit Cd-zaden. Op verticale agarplaten had de inoculatie met zaadendofyten een groeibevorderend effect: bij blootstelling aan Cd waren de lengte en groeisnelheid van de wortel significant groter bij planten die gedurende 1 week geïnoculeerd werden dan bij controleplanten en Cd-planten. In hydrocultuur leidde de inoculatie met zaadendofyten tot een verbetering van de redoxbalans bij 2 μM Cd in vergelijking met 0 μM Cd. De inoculatie van *Arabidopsis thaliana* met zaadendofyten kan dus leiden tot de aanwezigheid van bacteriën in de plant die een gunstige invloed hebben op de wortelgroei, biomassa en expressie van oxidatieve-stress gerelateerde genen bij blootstelling aan Cd.

1 Inleiding

Metalen met een dichtheid boven 5 g cm^{-3} , zoals cadmium (Cd), lood en kwik, worden ook wel zware metalen genoemd. Sinds de ontwikkeling van industriële activiteit in de 19^e eeuw, is de vervuiling van het milieu met deze zware metalen toegenomen. Deze contaminanten, afkomstig van diverse antropogene bronnen, verstoren steeds meer ecosystemen. Hun aanwezigheid in de atmosfeer, de bodem en het water veroorzaakt ernstige problemen voor alle organismen.

1.1 Fysiologische effecten van cadmium

Cd is een niet-essentieel element dat geen gekende biologische functie heeft. Het komt van nature voor in ertsen, samen met zink, lood en koper. Cd is voornamelijk in het milieu terecht gekomen via zinkwinning. Andere antropogene bronnen die Cd vrijzetten in de omgeving zijn elektriciteitscentrales gestookt met fossiele brandstoffen, metaalverwerkende industrieën, verbrandingsovens en het gemotoriseerd verkeer. Cd is bovendien aanwezig in fosfaathoudende meststoffen.

Cd wordt hoofdzakelijk gebruikt in herlaadbare nikkelcadmium batterijen, maar ook als stabilisator in PVC producten, als kleurstof en in verschillende legeringen. Cd-houdende producten worden onvoldoende gerecycleerd maar eerder gedumpt samen met ander huishoudelijk afval waardoor het milieu gecontamineerd wordt. Ook industriële uitstoot en het gebruik van meststoffen leidt tot contaminatie van bodems. Bijgevolg komt Cd terecht in voedings- en voedergewassen.

1.1.1 Effecten van cadmium op de mens

Voor de **mens** is voeding de belangrijkste bron van Cd-blootstelling in de algemene bevolking. Bovendien kunnen jonge kinderen met picagedrag grote hoeveelheden gecontamineerde bodem inslikken [1]. Een andere belangrijke Cd-bron is sigarettenrook: de Cd-concentratie in het bloed van rokers is gemiddeld 4 tot 5 maal hoger dan bij niet-rokers [2]. In gebieden met een gecontamineerde bodem ten slotte, treedt blootstelling aan Cd op via stof. [3]. Het 'International Agency for Research on Cancer' (IARC) klasseerde Cd in 1993 als een humaan carcinogeen [4]. Een recente studie toonde aan dat er een associatie bestaat tussen het risico op longkanker en de blootstelling aan Cd [5]. Cd interfereert ook met het metabolisme van calcium, vitamine D en collageen waardoor botziekten zoals osteoporose en

osteomalacie kunnen optreden. Staessen *et al.* (1999) toonden aan dat blootstelling aan Cd geassocieerd is met een verhoogd risico op botbreuken bij vrouwen en mogelijk ook met een verminderde lichaamslengte bij mannen [6]. Ten slotte kan blootstelling aan Cd nierschade veroorzaken. Hierbij treedt er in eerste instantie tubulaire dysfunctie op waardoor er een verhoogde excretie van proteïnen en enzymen plaatsvindt [1]. Deze initiële tubulaire schade kan overgaan in een meer ernstige nierbeschadiging. Zo werd blootstelling aan Cd geassocieerd met een verminderde glomerulaire filtratie [7], een verhoogd risico op nierstenen [2] en chronisch nierfalen [8].

1.1.2 Effecten van cadmium op planten

Cd is één van de gevaarlijkste zware metalen voor **planten** wegens zijn hoge mobiliteit, grote wateroplosbaarheid en lage concentratie waarbij effecten beginnen op te treden. De mate waarin Cd opgenomen wordt door de plant hangt af van de Cd-concentratie in de bodem en de biobeschikbaarheid ervan. Deze laatste wordt ondermeer beïnvloed door de aanwezigheid van organisch materiaal, de pH, de temperatuur en de concentratie van andere elementen. De opname van Cd-ionen via transmembranaire transporters staat voornamelijk in competitie met nutriënten zoals kalium, calcium, magnesium, ijzer, koper, zink en nikkel [9]. Cd penetreert de wortel via het corticale weefsel. Vervolgens bereikt het het xyleem via een apoplastische en/of symplastische route, gecomplexed door liganden zoals organische zuren en fytochelatines. Cd blijft hoofdzakelijk gelokaliseerd in de wortel en slechts beperkte hoeveelheden worden getransporteerd naar de scheut [10]. De Cd-inhoud van planten is dan ook het hoogst in de wortel en neemt af van de stengel naar de bladeren en vruchten en is het laagst in de zaden [11].

De gemakkelijkst waar te nemen **symptomen** van Cd-toxiciteit in planten zijn chlorose en een verminderde groei van de bladeren en de wortel. Groeiachterstand is het gevolg van de onderdrukking van de elongatiesnelheid van de cellen. Cd inhibeert immers op onomkeerbare wijze de protonpomp die verantwoordelijk is voor dit proces [12]. Cd vermindert bovendien de opname van mineralen door hun beschikbaarheid in de bodem te verlagen of door een reductie van de aanwezige micro-organismen [13]. Verder interfereert Cd met de opname van andere elementen, zoals calcium, magnesium, fosfor en kalium [14]. Ook de absorptie van nitraat en zijn transport van wortel naar scheut daalt. Dit kan verklaard worden doordat Cd de activiteit van het nitraatreductase in de scheut vermindert waardoor de nitraatassimilatie geïnhibeerd wordt [15]. Ook stomatale opening, transpiratie en fotosynthese worden

beïnvloed door Cd [16]. Ten slotte kan Cd de permeabiliteit van het plasmamembraan veranderen waardoor er een vermindering in waterinhoud optreedt [17].

Als respons op Cd-stress kan de plant verschillende **verdedigingsmechanismen** in werking stellen. Een eerste barrière, die voornamelijk werkt ter hoogte van de wortel, wordt gevormd door de celwand en extracellulaire koolhydraten die Cd kunnen immobiliseren. Een tweede barrière is het plasmamembraan dat het binnenstromen van Cd-ionen in het cytosol kan voorkomen. Wanneer Cd zich toch in het cytosol bevindt, kan het gecomplexeerd worden. Dit kan met de zogenaamde fytochelatines die Cd cheleren met behulp van thiolgroepen. Hierdoor kan het niet meer als schadelijke Cd-ionen circuleren doorheen het cytosol. Een ander belangrijk mechanisme in Cd-detoxificatie en tolerantie is vacuolaire compartimentalisatie. Dit voorkomt de vrije circulatie van Cd-ionen in het cytosol en concentreert ze bovendien in een beperkte zone. Na blootstelling aan Cd induceren plantencellen vaak de synthese van 'heat shock' proteïnen. Deze stress eiwitten kunnen gedenatureerde eiwitten helpen om hun oorspronkelijke conformatie terug te vinden of ze begeleiden ze naar het proteasoom waar ze afgebroken worden. Ten slotte stimuleert Cd ook de ethyleensynthese via het 1-aminocyclopropan-1-carbonzuur (ACC) synthase. Dit kan bijvoorbeeld leiden tot een versnelling van het lignificatieproces waardoor de Cd-influx verminderd wordt

1.2 Cellulaire effecten van cadmium

Toxiciteit van zware metalen op **cellulair** niveau kan enerzijds ontstaan doordat metaalionen binden aan sulfhydrylgroepen in proteïnen. Hierdoor wordt de activiteit van het proteïne gehinderd of wordt de structuur verstoord. Enzymen zijn hier het meest gevoelig voor en langdurige blootstelling aan zware metalen leidt dan ook tot een significante daling van de enzymactiviteit [18]. Anderzijds kan blootstelling aan Cd leiden tot oxidatieve stress [19]. Dit gebeurt via een indirect mechanisme aangezien Cd zelf niet redoxactief is.

1.2.1 Oxidatieve stress

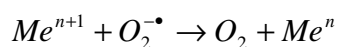
Alle organismen, met uitzondering van de anaerobe micro-organismen, hebben zuurstof (O_2) nodig als elektronenacceptor bij de productie van energie. O_2 is echter een sterke oxidator waardoor secundaire oxidaties die niet betrokken zijn in het normale celmetabolisme niet vermeden kunnen worden. Men spreekt van **oxidatieve stress** wanneer deze ongewenste

oxidaties door O₂ en zijn afgeleiden niet in voldoende mate geneutraliseerd kunnen worden waardoor de redoxbalans verstoord wordt [20]. In de plantencel zijn reactieve zuurstofvormen (ROS) voornamelijk afkomstig van de fotorespiratie, de fotosynthese, de mitochondriële respiratie en verschillende oxidasen [21].

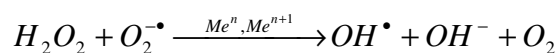
In de grondtoestand heeft O₂ 2 vrije elektronen met parallelle spin. Aangezien er geen andere moleculen met deze configuratie bestaan, is O₂ in de grondtoestand niet reactief. Door toevoer van energie, bijvoorbeeld onder de vorm van licht, treedt er spininversie op waardoor singlet zuurstof (¹O₂) gevormd wordt. Dit wordt hoofdzakelijk geproduceerd ter hoogte van de chlorofylpigmenten, maar kan ook ontstaan als een bijproduct van lipoxygenases [22]. ROS kunnen ook ontstaan wanneer er elektronen gedoneerd worden aan O₂, hetgeen optreedt in de elektronentransportketen. Hierbij wordt in eerste instantie het superoxide anion (O₂^{-•}) gevormd. Vervolgens kan dismutatie van O₂^{-•} leiden tot de vorming van waterstofperoxide (H₂O₂). Deze reactie treedt spontaan op maar kan aanzienlijk versneld worden door de superoxidedismutasen (zie 1.2.3) [20]. O₂^{-•} en H₂O₂ veroorzaken relatief weinig schade aan de cel, maar kunnen wel reageren met transitie-metalen, zoals ijzer en koper, waarbij het sterk oxiderende hydroxyl radicaal (OH[•]) gevormd wordt. Hierbij treedt eerst de Fenton reactie op, waarbij het transitie-metaal geoxideerd wordt door H₂O₂ met vorming van OH[•] en een hydroxyl anion (OH⁻) [22].



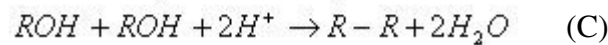
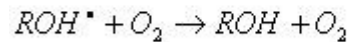
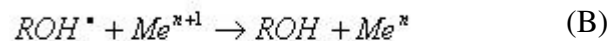
Het geoxideerde metaalion kan vervolgens opnieuw gereduceerd worden met behulp van O₂^{-•} [22].



De 2 voorgaande reacties kunnen samengevat worden in de Haber-Weiss reactie [22].

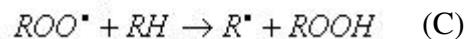
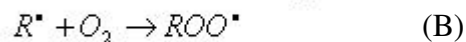
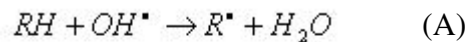


Van alle ROS is OH[•] het meest reactief. Het kan organische substraten oxideren via de additie van OH[•] of de abstractie van een waterstofatoom (H⁺) aan een organisch molecule. In de additiereactie wordt een gehydroxyleerd product gevormd (figuur 1A) dat vervolgens geoxideerd kan worden, door bijvoorbeeld een metaalion of O₂, tot een stabiel, geoxideerd molecule (figuur 1B). Er kan ook dismutatie optreden waarbij gecrosslinkte moleculen ontstaan (figuur 1C).



Figuur 1: additiereactie. A. Vorming van gehydroxyleerd product. B. Vorming van stabiel, geoxideerd molecule. C. Vorming van gecrosslinkt product.

In de abstractiereactie oxideert OH^{\bullet} een organisch substraat met vorming van water (H_2O) en een organisch radicaal (figuur 2A). Het organisch radicaal kan omgezet worden in een peroxyradicaal door de additie van O_2 (figuur 2B). Dit kan dan op zijn beurt zorgen voor de abstractie van H^+ van een ander organisch molecule waardoor een secundair organisch radicaal gevormd wordt (figuur 2C) [22]. Op deze wijze ontstaat een zeer schadelijke kettingreactie.



Figuur 2: abstractiereactie. A. Vorming van organisch radicaal. B. Vorming van peroxyradicaal. C. Vorming van secundair organisch radicaal.

1.2.2 Oxidatieve schade

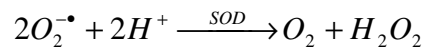
Wanneer er veel meer ROS aanwezig zijn in de cel dan dat er geneutraliseerd kunnen worden, kan **oxidatieve schade** ontstaan. Bij milde oxidatieve stress is er meestal een stijging van de intracellulaire calciumconcentratie en een toegenomen fosforylatie waardoor de proliferatie gestimuleerd wordt. Bij toenemende stress worden transitie-metalen vrijgezet die vrij-radicaal reacties katalyseren. Bovendien worden de mitochondriën beschadigd zodat er een permeabiliteitstransitie optreedt en er eventueel cytochroom c wordt vrijgezet. Tegelijkertijd worden ook transcriptiefactoren geactiveerd waardoor een adaptieve respons ontstaat. Dit houdt in dat beschermende systemen, zoals antioxidatieve enzymen en chaperones, gestimuleerd worden. Ook kan de celcyclus stilgelegd worden zodat DNA-schade hersteld kan worden. Bij ernstige oxidatieve stress is de schade aan de mitochondriën en het DNA zo groot dat apoptose geïnduceerd wordt. Bij nog grotere stress worden de caspases geïnhibeerd door oxidatie van hun actieve groep. Hierdoor wordt apoptose geïnhibeerd en zullen zwaar beschadigde cellen overleven of zal necrose optreden. Bij necrose worden metaalionen en andere toxines vrijgezet waardoor de schade zich verspreid naar naburige cellen [19].

1.2.3 Antioxidatieve verdediging

Planten hebben tijdens de evolutie een hele reeks van mechanismen verworven om zich te verdedigen tegen oxidatieve stress. Het antioxidatief verdedigingssysteem van de plant bestaat uit enzymen, zoals superoxidedismutase en uit metabolieten, zoals ascorbaat en glutathion [22].

Superoxidedismutase

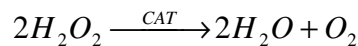
De dismutatie van $O_2^{\bullet -}$ wordt uitgevoerd door superoxidedismutasen (SOD) waarbij O_2 en H_2O_2 gevormd worden [19].



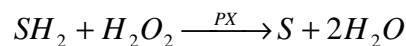
Afhankelijk van de locatie in de cel kunnen verschillende soorten SOD's teruggevonden worden. Mangaan SOD bevindt zich in de mitochondriële matrix, koper-zink SOD (CSD) in de mitochondriële intermembranaire ruimte en in de rest van de cel, en ijzer SOD (FSD) is gelokaliseerd in de chloroplasten [23].

Catalase en peroxidasen

Catalases (CAT) zijn meestal heembevattende enzymen, die de afbraak van H_2O_2 katalyseren. CAT wordt hoofdzakelijk teruggevonden in de peroxisomen waar het H_2O_2 verwijdert dat geproduceerd wordt door oxidasen [19].



Ook peroxidasen (PX) katalyseren de decompositie van H_2O_2 maar koppelen dit aan de oxidatie van organische substraten.

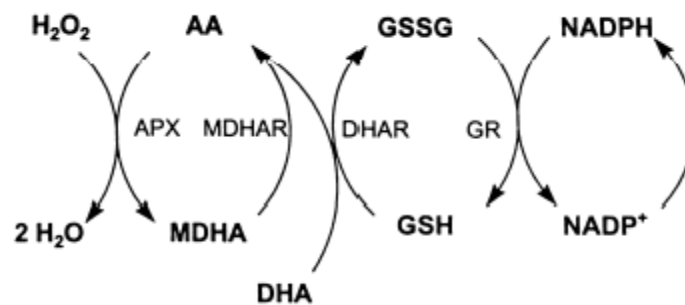


De belangrijkste peroxidasen zijn ascorbaatperoxidasen (APX) en glutathionperoxidasen (GPX), die zich in de chloroplasten en het cytosol bevinden. APX verwijderen H_2O_2 met behulp van ascorbaat (vitamine C), dat daarbij geoxideerd wordt tot monodehydroascorbaat (MDHA) [19]. De regeneratie van ascorbaat vindt vervolgens plaats in de ascorbaat-glutathion cyclus. GPX verwijdert H_2O_2 door het te reduceren tot H_2O . Deze reductie wordt gekoppeld aan de oxidatie van gereduceerd glutathion (GSH), een thiolbevattend tripeptide (glu-cys-gly). Hierbij wordt geoxideerd glutathion (GSSG) gevormd dat bestaat uit 2 GSH moleculen die verbonden worden door een disulfide brug. GSSG kan vervolgens terug

omgezet worden in GSH met behulp van het glutathionreductase in de ascorbaat-glutathion cyclus [19].

Ascorbaat-glutathion cyclus

Voor de regeneratie van ascorbaat uit MDHA wordt gebruik gemaakt van monodehydroascorbaatreductase (MDHAR) dat NAD(P)H gebruikt als reductans en van dehydroascorbaatreductase (DHAR) dat GSH gebruikt als reductans. Deze reacties vormen samen de ascorbaat-glutathion (of Halliwell-Foyer-Asada) cyclus (figuur 3) [22].



Figuur 3: ascorbaat-glutathion cyclus. AA: ascorbaat, APX: ascorbaatperoxidase, MDHAR: monodehydroascorbaatreductase, MDHA: monodehydroascorbaat, DHA: dehydroascorbaat, DHAR: dehydroascorbaatreductase, GSSG: geoxideerd glutathion, GSH: gereduceerd glutathion, GR: glutathionreductase.

Metaboliëten

Eén van de belangrijkste metaboliëten in de antioxidatieve verdediging is ascorbaat, dat aanwezig is in de chloroplasten, het cytosol, de vacuole en in de apoplastische ruimte van bladcellen. Ascorbaat zorgt voor de verwijdering van H_2O_2 waarbij het zelf geoxideerd wordt [22]. Regeneratie van gereduceerd ascorbaat gebeurt via de ascorbaat-glutathion cyclus (figuur 3). Ook GSH is een belangrijke metabolië. GSH beschermt thiolgroepen op enzymen en reageert met 1O_2 en OH^\bullet waarbij het zelf geoxideerd wordt tot GSSG. GSH wordt geregenereerd met behulp van het glutathionreductase (GR) (figuur 3) [22]. Verder zijn er nog de carotenoïden en α -tocoferol. Zij zijn vooral belangrijk bij het verwijderen van 1O_2 [22].

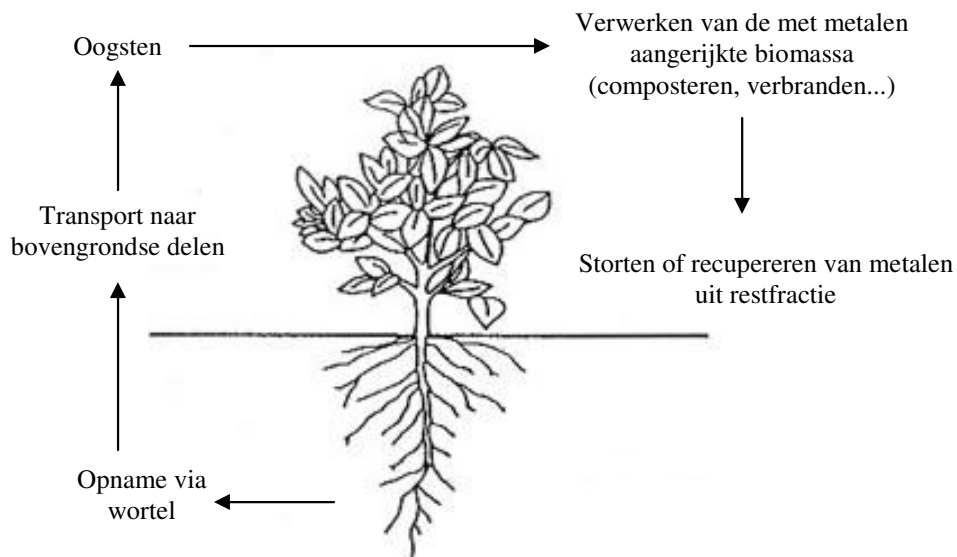
1.3 Probleemstelling

In het noorden van België (Noorderkempen) is een gebied van 259 km^2 verontreinigd met Cd. Deze regio, waar zich 3 zinksmelters bevinden, bestaat uit de gemeenten Balen, Mol, Lommel en Overpelt, en heeft ongeveer 80 000 inwoners [3]. Ondanks de ontmanteling van de smelter in Lommel in 1974, de overgang van pyrolytische naar elektrolytische zinkwinning in

Overpelt in 1974 en een volledige stop van de Cd-productie in Overpelt in 1992 en in Balen in 2002, blijft deze regio verontreinigd met toxische metalen [5]. De conventionele remediatietechnieken, zoals afgraven, kunnen hier niet toegepast worden omwille van de omvang van het gecontamineerde gebied. Ze zijn meestal te duur, te invasief en te arbeidsintensief [24]. Een mogelijke oplossing is fytoremediatie.

1.4 Fytoremediatie

Fytoremediatie is een saneringstechniek die gebruik maakt van planten en hun geassocieerde micro-organismen voor het verwijderen of stabiliseren van zware metalen of organische contaminanten in de bodem en het grondwater [24]. Een belangrijke techniek voor het remediëren van metaalverontreinigingen is **fytostabilisatie**. Hierbij zullen planten de biobeschikbaarheid van de pollutant verlagen waardoor verspreiding in de omgeving wordt tegengegaan. Deze planten kunnen de pollutant vasthouden in de bodem enerzijds doordat ze bepaalde exudaten produceren of anderzijds met behulp van wortelgeassocieerde micro-organismen waardoor het lekken van de contaminanten naar het grondwater sterk verminderd wordt. Bovendien voorkomen planten verspreiding via wind- en watererosie doordat ze een dichte vegetatie vormen [24]. Naast fytostabilisatie is **fytoextractie** een veel gebruikte techniek voor het remediëren van metaalverontreinigingen. Bij fytoextractie worden de contaminanten geabsorbeerd via de wortels en geconcentreerd in de bovengrondse delen van de plant (figuur 4). Het plantenmateriaal, waarin de contaminanten opgeslagen zitten, kan ten slotte gevaloriseerd worden voor energieproductie [25]. De restfractie kan gebruikt worden voor het recupereren van bepaalde metalen [24]. Bovendien kunnen de vervuilde gronden opnieuw economisch gevaloriseerd worden door gebruik te maken van planten die later aangewend kunnen worden voor de productie van biobrandstoffen, zoals koolzaadolie.



Figuur 4: schematisch overzicht van fytoextractie.

Het doel is dus om zoveel mogelijk metalen van de bodem naar de plant te verplaatsen. Dit kan enerzijds met de zogenaamde hyperaccumulatoren, planten die goed gedijen op een zwaar verontreinigde bodem en van nature een grote hoeveelheid metalen kunnen opslaan [26]. Anderzijds kan gebruik gemaakt worden van planten die minder metalen accumuleren maar wel veel biomassa produceren, zodat de totale hoeveelheid opgeslagen metalen toch voldoende hoog is.

De efficiëntie van fytoextractie wordt voor een groot deel bepaald door de beschikbaarheid van metalen in de bodem. Deze beschikbaarheid kan vergroot worden door de aanwezigheid van plantgeassocieerde bacteriën. Bacteriële metaalchelatoren kunnen naast het verhogen van de ijzeropname door de plant, ook de opname van andere metalen verhogen [27]. Bovendien beschikken een aantal bacteriën over resistentie/sequestratie systemen voor zware metalen. Een voorbeeld is het ncc-nre systeem dat resistentie tegen nikkel verleent doordat het de bacterie voorziet van transporters die toxische of overgeconcentreerde metalen excreteren. Vervolgens worden deze metalen geprecipiteerd op de celwand waardoor de translocatie van metalen naar de bovengrondse delen van de plant toeneemt. Door deze precipitatie wordt bovendien niet alleen de bacterie maar ook de plant beschermd tegen de toxiciteit van hoge concentraties vrije metalen [28]. Plantgeassocieerde bacteriën kunnen ook de groei van de plant bevorderen waardoor een uitgebreider wortelsysteem ontstaat waarmee bijgevolg meer metalen opgenomen kunnen worden. Groeipromotie kan zowel op directe als op indirecte wijze plaatsvinden. Directe groeipromotie kan gebeuren via stikstoffixatie, verhoging van de beschikbaarheid van nutriënten zoals fosfor en ijzer, productie van plantenhormonen zoals

auxines en cytokinines, en onderdrukking van de ethyleensynthese via ACC-deaminase activiteit. Indirecte groeipromotie vindt plaats doordat de plantgeassocieerde bacteriën de groei of activiteit van fytopathogenen onderdrukken. Dit kan door competitie voor de beschikbare plaats en nutriënten in de plant, antibiose, productie van hydrolytische enzymen, inhibitie van toxines en inductie van verdedigingsmechanismen in de plant. Ten slotte kunnen ook planthormonen, die geproduceerd worden door plantgeassocieerde bacteriën, de metaalopname in de plant verhogen [29]. Om de efficiëntie van fytoextractie nog meer te verhogen kunnen plantgeassocieerde bacteriën geïsoleerd en gemodificeerd worden. Hierbij worden zij uitgerust met bijvoorbeeld siderofoorproductie of metaal-sequestratie systemen [30]. Ten slotte kan de plant opnieuw geïnoculeerd worden met deze gemodificeerde bacterie.

1.5 Zaadendofyten

Binnen de plantgeassocieerde bacteriën kan een onderscheid gemaakt worden tussen bacteriën die aanwezig zijn in de rhizosfeer en endofyten of bacteriën die in de plant leven, zonder hun gastheer schade toe te brengen. Een belangrijke groep binnen de endofyten zijn de zaadendofyten. Deze bacteriën worden via het zaad doorgegeven van generatie op generatie en zijn reeds in het embryo aanwezig.

Cultiveerbare endofytische bacteriën werden reeds geïsoleerd uit zaden van onder andere rijst [31], koolzaad [32], Noorse spar [33] en eucalyptus [34]. Over hun functie is echter nog maar weinig bekend. Cankar *et al.* [33] konden aantonen dat zaden van de Noorse spar endofyten bevatten met groeipromoverende eigenschappen. Zij suggereren dan ook dat zaden kunnen dienen als vector voor gunstige bacteriën. Verder werd reeds vastgesteld dat inoculatie van *Nicotiana tabacum* met zaadendofyten positieve effecten heeft op de plantengroei. Bij blootstelling aan Cd resulteerde inoculatie met Cd-resistente zaadendofyten in meer biomassa en een hogere Cd-concentratie in de plant [35].

1.6 Doelstelling

In dit project wordt het effect van zaadendofyten op *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan Cd bestudeerd. Het gebruik van *Arabidopsis thaliana* biedt vele voordelen: het is een kleine plant met een korte generatietijd en veel nakomelingen. Bovendien heeft het een relatief klein

nucleair genoom dat volledig gekend is. Bijgevolg is *Arabidopsis thaliana* het modelorganisme geworden voor zeer uiteenlopende studies binnen de plantkunde.

In een **eerste luik** van dit project wordt de endofytische populatie in zaden van planten die gedurende verschillende generaties gegroeid zijn op een bodem met Cd (Cd-zaden) vergeleken met die in zaden van planten die niet werden blootgesteld aan Cd (controlezaden). Hiervoor zullen de zaadendofyten genotypisch gekarakteriseerd worden met behulp van 'amplified ribosomal DNA restriction analysis' (ARDRA) zodat ze geïdentificeerd kunnen worden. Vervolgens wordt een fenotypische karakterisatie uitgevoerd op basis waarvan Cd-resistente zaadendofyten geselecteerd kunnen worden. In een **tweede luik** worden planten afkomstig van controlezaden, van Cd-zaden en van controlezaden geïnoculeerd met de zaadendofytpopulatie uit Cd-zaden vergeleken bij blootstelling aan Cd. Hiervoor zullen de Cd-concentraties en inoculatiecondities zowel in hydrocultuur als op verticale agarplaten (VAP) geoptimaliseerd worden. Vervolgens zal *Arabidopsis thaliana* gekweekt worden in hydrocultuur waarna de morfologische parameters, de expressie van oxidatieve stressgerelateerde genen en de Cd-gehalten bepaald zullen worden. Ten slotte wordt *Arabidopsis thaliana* ook gekweekt op VAP zodat de wortelgroei bij de verschillende planten opgevolgd kan worden.

2 Materialen en methoden

2.1 Identificatie en karakterisatie van de zaadendofyten

Om de zaadendofyten van *Arabidopsis thaliana* te identificeren en karakteriseren, werd eerst de isolatie van deze bacteriën uit de zaden geoptimaliseerd. Vervolgens werden de zaadendofyten geïsoleerd en opgekweekt waarna het DNA geëxtraheerd werd. Verder werden ze genotypisch gekarakteriseerd met behulp van ARDRA zodat ze geïdentificeerd konden worden. Ook werd een fenotypische karakterisatie uitgevoerd op basis waarvan een aantal interessante zaadendofyten geselecteerd konden worden.

2.1.1 Optimalisatie van de isolatie

De optimalisatie van de isolatie werd uitgevoerd op oude controlezaden van *Arabidopsis thaliana*. Voor de sterilisatie werden de zaden verpakt in een filter. In een 1^e stap werden ze al dan niet gespoeld in 70% ethanol gedurende 1 minuut. In een 2^e stap werden de zaden

gesteriliseerd in een Chloor (Cl)-oplossing met Tween 80 (1 druppel per 100 ml). Hierbij werden verschillende concentraties en tijden uitgetoet. Voor de 1% Cl-oplossing werd gespoeld gedurende 3, 5, 10, 15 of 20 minuten. Voor de 0,1% Cl-oplossing was dit 3, 5 of 10 minuten. In een 3^e stap werden ze 4 maal kort gespoeld in steriel, gedestilleerd water. Hierna werden ze nog 4 maal 5 minuten gespoeld in een groter volume steriel, gedestilleerd water. Het laatste spoelwater werd uitgeplaat op rijk 869 medium (bijlage 1) om te controleren of het steriliseren effectief was. Eveneens werden 10 zaadjes overgebracht op rijk medium om de oppervlaktesterilisatie te controleren. De overige zaden werden vervolgens overgebracht in een mortier met 500 µl steriel 10 mM MgSO₄ en gedurende 1 minuut gemalen. Hiervan werd een verdunningsreeks gemaakt van 0 tot 10⁻². Deze werd uitgeplaat op 1/10 rijk medium (869) en geïncubeerd bij 30°C. Na 1 week werd de oppervlaktesteriliteit gecontroleerd en werd het aantal gereïsoleerde kolonies geteld. Daaruit bleek dat een optimale isolatie verkregen werd door geen gebruik te maken van ethanol en te steriliseren gedurende 3 minuten in een 0,1% Cl-oplossing.

2.1.2 Isolatie

Bij de isolatie van de zaadendofyten bleken de verse zaden, die minder gerijpt waren, niet bestand tegen het sterilisatieprotocol uit 2.1.1 waardoor de zaadendofyten gedood werden. Bijgevolg werd overgeschakeld naar sterilisatie gedurende 1 minuut in een 0,1% Cl-oplossing. De isolatie verliep verder op dezelfde wijze als in 2.1.1. Na 1 week werden de morfologisch verschillende kolonies geteld en werd het aantal kolonievormende eenheden (kve) per gram zaad berekend. Deze kolonies werden opgezuiverd op 1/10 rijk medium en vervolgens opgekweekt in vloeibaar rijk medium (869) bij 30°C.

2.1.3 DNA extractie

De DNA extractie werd uitgevoerd met behulp van de 'DNeasy blood & tissue kit' (Qiagen). De kwantiteit en kwaliteit van het DNA werden gecontroleerd gebruik makend van de 'Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer' (Isogen Life Sciences).

2.1.4 ARDRA

In een 1^e stap werd het 16S ribosomaal DNA (rDNA) geamplificeerd met behulp van een 'polymerase chain reaction' (PCR). Hierna werd voor elke bacterie een 'fingerprint' gemaakt door het 16S rDNA te knippen met een restrictie-enzym en de fragmenten te scheiden met behulp van gelelektroforese.

Elke PCR bestond uit 49 μl 'mastermix' en 1 μl DNA extract. De 'mastermix' bestond uit 5 μl PCR-buffer, 1 μl 10 mM dNTP-mix, 2 μl 50 mM MgSO_4 , 1 μl 'forward' primer (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), 1 μl 'reverse' primer (ACGGGCGGTGTGTRC) en 0,2 μl Taq polymerase. Deze 'mastermix' werd aangevuld met RNase vrij water zodat per reactie een volume van 50 μl verkregen werd. Als blanco werd 49 μl 'mastermix' gebruikt. Volgende cyclus werd gebruikt: 1 herhaling van 5 minuten bij 95°C, 35 herhalingen van 1 minuut bij 94°C, 30 seconden bij 52°C, 3 minuten bij 72°C en 1 herhaling van 10 minuten bij 72°C.

Voor de restrictie werd 2,9 μl buffer, 0,3 μl van het restrictie-enzym HpyCH₄ IV (knipplaats: 5'...A[▼]CGT...3'), 1,1 μl RNase en 4,3 μl RNase vrij water toegevoegd aan 20 μl geamplificeerd 16S rDNA. Het geheel werd geschud gedurende 2 uur bij 37°C. De verkregen fragmenten werden ten slotte gescheiden in een 1,5% agarose gel gedurende 2 uur bij 90V.

2.1.5 Identificatie

Het 16S rDNA werd opgezuiverd met behulp van de 'PCR purification kit' (Qiagen). Sequencing gebeurde door 'VIB Genetic Service Facility' (Universiteit Antwerpen). De consensus sequenties werden bepaald met behulp van het 'Staden Package'. Identificatie werd uitgevoerd door de verkregen 16S rDNA sequenties te vergelijken met die van de referentiestammen in de Ribosomal Data Base (RDB II).

2.1.6 Fenotypische karakterisatie

De bacteriën werden uitgeplaat op 4 verschillende media, namelijk 248 medium met CMIX (bijlage 1) en 0,4 mM Cd, 0,8 mM Cd, 0,6 mM zink (Zn) of 0,4 mM koper (Cu). Deze werden gedurende een week gegroeid bij 30°C, waarna de groei geëvalueerd werd.

Voor het testen van de siderofoor- en organische zuurproductie werden de zaadendofyten opgekweekt in vloeibaar 869 medium (bijlage 1). Vervolgens werd 20 μl van de bacteriële suspensie overgebracht in 800 μl cultuurmedium. Voor de siderofoorproductie was dit 284 medium met CMIX (bijlage 1) zonder $\text{Fe(III)NH}_4\text{Citraat}$ en met 4,8 ml/l $\text{Fe(III)NH}_4\text{Citraat}$. Voor de organische zuurproductie was dit sucrose tryptone (ST) medium (bijlage 2). De microtiterplaten werden 5 dagen geïncubeerd bij 25°C. Vervolgens werden de siderofooren gedetecteerd met behulp van de methode van Schwyn en Neilands (1987) [36], waarbij 100 μl chromium-azurol S (CAS) reagens (bijlage 2) werd toegevoegd aan elke well. In aanwezigheid van siderofooren werd het ijzer uit het CAS reagens gebonden waardoor er een

kleuromslag plaatsvond van blauw naar oranje. Na 4 uur werden oranje wells als positief voor siderofoorproductie beschouwd. De organische zuren werden gedetecteerd met behulp van de methode van Cunningham en Kuiack (1992) [37], waarbij verzuring van het medium gevisualiseerd werd met behulp van het alizarine red S reagens. Aan elke well werd 100 μ l van deze pH-indicator toegevoegd. Na 15 minuten werden gele wells beschouwd als positief voor organische zuurproductie.

De productie van indol-3-azijnzuur (IAA) werd nagegaan met behulp van de Salkowski test (aangepast van Patten *et al.*, 2002 [38]). Hierbij werden de bacteriën in het donker gegroeid in 5 ml 869 medium (bijlage 1) met 0,5 g/l tryptofaan gedurende 4 dagen bij 28°C en geschud aan 110 rotaties per minuut (rpm). Na centrifugatie bij 6000 rpm gedurende 15 minuten werd 0,5 ml supernatant gemengd met 1 ml Salkowskireagens (50 ml 35% HClO₄, 1 ml 0,5 M FeCl₃). Een roze kleuromslag na 20 minuten werd beschouwd als positief voor IAA-productie.

2.2 Verticale agarplaten

Om de wortelgroei te kunnen onderzoeken, werden de planten gegroeid op verticale agarplaten (VAP) [39]. In een 1^e fase werden de Cd-concentraties en inoculatiecondities geoptimaliseerd. Vervolgens werd een wortelgroei-experiment uitgevoerd waarbij controleplanten, Cd-planten en controleplanten geïnoculeerd met de endofytopopulatie uit Cd-zaden vergeleken werden bij blootstelling aan Cd.

Het groeimedium van de VAP werd gebaseerd op een 50-voudige verdunning van Gamsborg's B5-medium [40]. Per plaat werd 40 ml medium gebruikt. Voor het zaaien werden de zaden van *Arabidopsis thaliana* gesteriliseerd zoals vermeld in 2.1.2 en gedurende 2 dagen geïncubeerd bij 4°C om een homogene kieming te verkrijgen. De groeicondities waren als volgt: temperatuur van 18°C (nacht) en 22°C (dag), afwisseling van licht en donker om de 12 uur en een 'photosynthetic active radiation' (PAR) van 100 μ Einstein.m⁻².s⁻¹.

2.2.1 Optimalisatie van de inoculatie

De optimalisatie werd uitgevoerd met 2 Cd-resistente wortelendofyten, een *Pseudomonas sp.* en een *Spinghomonas sp.* geïsoleerd uit *Arabidopsis thaliana*. De planten, afkomstig van controlezaden, werden geïnoculeerd met 10⁶ of 10⁸ kve/ml en dit op dag 0 (onmiddellijk na

het zaaien) of op dag 6 (bij wortelgroei). De inoculatie duur bedroeg 3 of 7 dagen. De juiste concentratie aan bacteriën werd verkregen door ze op te kweken in vloeibaar 869 medium (bijlage 1) en vervolgens 15 minuten te centrifugeren bij 6000 rpm, waarna het pellet verdund werd in steriel 100 μM CdSO_4 . Er werd gebruik gemaakt van CdSO_4 omdat de bacteriën hun Cd-resistentie niet zouden verliezen. De inoculatie werd uitgevoerd door 400 μl bacteriële suspensie uit te smeren op de VAP. Blootstelling aan de bacteriën werd gestopt door de planten over te brengen naar een nieuwe agarplaat met behulp van een steriele tandenstoker. Niet-geïnoculeerde planten werden gebruikt als controle. Per conditie werden 3 technische en 30 biologische herhalingen gebruikt.

De reïsolatie van de wortelendofyten werd 3 weken na het zaaien uitgevoerd. Hiervoor werden de wortels gedurende 5 minuten gesteriliseerd in een 0,1% Cl-oplossing met Tween 80 (1 druppel per 100 ml). Vervolgens werden ze 3 maal gespoeld in steriel, gedestilleerd water gedurende 5, 10 en 5 minuten. Het laatste spoelwater werd uitgeplaat op rijk 869 medium (bijlage 1) om te controleren of het steriliseren effectief was. De wortels werden vervolgens gedurende 30 seconden gemalen in een mortier met 500 μl steriel 10 mM MgSO_4 . Hiervan werd een verdunningsreeks gemaakt van 0 tot 10^{-1} . Deze werd uitgeplaat op 284 medium met CMIX en 0,4 mM Cd (bijlage 1) en geïncubeerd bij 30°C gedurende 1 week. Per conditie werden 2 mengstalen gebruikt.

2.2.2 Optimalisatie van de cadmiumconcentratie

Zowel Cd- als controlezaden werden blootgesteld aan 0, 1, 2, 5 en 10 μM Cd door 400 μl CdSO_4 -oplossing op de VAP uit te smeren. Vervolgens werd de wortellengte gedurende 3 weken opgevolgd en geanalyseerd met het computerprogramma 'Optimas6'. Per conditie werden 3 technische en 30 biologische herhalingen gebruikt. Aan de hand van deze gegevens werden 2 Cd-concentraties gekozen om mee verder te werken.

2.2.3 Inoculatie-experiment

Zowel controle- als Cd-zaden werden gezaaid op VAP. Zes dagen na het zaaien werden deze met behulp van een steriele tandenstoker overgezet naar nieuwe agarplaten. Hierbij werd een deel van de controleplanten geïnoculeerd door 400 μl bacteriële suspensie op de nieuwe agarplaat uit te smeren. Deze suspensie was representatief voor de endofytopopulatie die geïsoleerd werd uit de Cd-zaden. Deze bestond uit 4 niet Cd-resistente zaadendofyten, namelijk 4,29% *Bacillus sp.*, 13,70% *Bacillus arsenicus sp.*, 1,59% *Bacillus niacini sp.* en

79,37% *Bacillus circulans* sp., en 1 Cd-resistente zaadendofyt, namelijk 0,53% *Bacillus arsenicus* sp.. De bacteriën werden opgelost in steriel 5 mM MgSO₄, 5 mM MgSO₄ en 200 μM CdSO₄ of 5 mM MgSO₄ en 1000 μM CdSO₄ tot in totaal een concentratie van 10⁸ kve/ml verkregen werd. Platen met niet-geïnoculeerde controleplanten en Cd-planten werden ingesmeerd met 400 μl 5 mM MgSO₄, 400 μl 5 mM MgSO₄ met 200 μM CdSO₄ of 400 μl 5 mM MgSO₄ met 1000 μM CdSO₄. Na 7 dagen werden de planten overgebracht naar een nieuwe agarplaat. Aan de helft van de geïnoculeerde controleplanten werd opnieuw bacteriële suspensie toegediend en dit tot het einde van het experiment. Blootstelling aan CdSO₄ werd bij alle condities verdergezet tot het einde van het experiment. De wortellengte werd opgevolgd en geanalyseerd met het programma 'Optimas6'. Per conditie werden 5 technische en 20 (geïnoculeerde) of 40 (niet-geïnoculeerde) biologische herhalingen gebruikt.

2.3 Hydrocultuur

Voor het verkrijgen van uniforme planten, werd gebruik gemaakt van hydrocultuur. Dit is de meest geschikte kweekmethode voor gecontroleerde plantengroei [41]. In een 1^e fase werden de Cd-concentraties en inoculatiecondities geoptimaliseerd. Vervolgens werd een experiment uitgevoerd waarbij controleplanten, Cd-planten en controleplanten geïnoculeerd met de endofytopopulatie uit Cd-zaden vergeleken werden bij blootstelling aan Cd wat betreft hun morfologische parameters, expressie van oxidatieve stress-gerelateerde genen en Cd-gehalte.

Voor de kweek van *Arabidopsis thaliana* in hydrocultuur werd gebruik gemaakt van een Hoagland voedingsoplossing (bijlage 4), een temperatuur van 18°C (nacht) en 22°C (dag), afwisseling van licht en donker om de 12 uur, een vochtigheid van 65% en een PAR van 180 μEinstein.m⁻².s⁻¹. Voor het zaaien werden de zaden gesteriliseerd en geïncubeerd zoals vermeld in 2.1.2.

2.3.1 Optimalisatie van de inoculatie

De optimalisatie werd uitgevoerd met een Cd-resistente *Pseudomonas* sp. geïsoleerd uit de wortel van *Arabidopsis thaliana*. In een 1^e fase werden dezelfde inoculatieparameters als in 2.2.1 getest. In een 2^e fase werden nog 6 andere inoculatiecondities getest. Hierbij werden de zaden al dan niet gedurende een uur ondergedompeld in een bacteriële suspensie van 10⁸ kve/ml waarna ze gezaaid werden in zand verzadigd met bacteriële suspensie (10⁸ kve/ml). Deze bacteriële suspensie werd toegediend gedurende 3 dagen, 1 week of 2 weken. De juiste

concentratie aan bacteriën werd telkens verkregen door ze 15 minuten te centrifugeren bij 6000 rpm en te verdunnen in Hoagland voedingsoplossing. De inoculatie werd uitgevoerd door de juiste hoeveelheid bacteriële suspensie toe te voegen aan de Hoagland voedingsoplossing. Bovendien werden alle planten blootgesteld aan 1 μM CdSO_4 opdat de bacterie zijn Cd-resistentie niet zou verliezen. Niet-geïnoculeerde planten werden gebruikt als controle. Per conditie werden 2 technische en 180 (fase 1) of 90 (fase 2) biologische herhalingen gebruikt. De reisolatie van de wortelendofyt werd uitgevoerd zoals vermeld in 2.2.1. Hiervoor werden per conditie 3 mengstalen gebruikt.

2.3.2 Optimalisatie van de cadmiumconcentratie

Zowel Cd- als controlezaden werden gedurende 3 weken blootgesteld aan 0, 1, 2 en 5 μM Cd door CdSO_4 -oplossing toe te voegen aan de Hoagland voedingsoplossing. Bij het oogsten werden wortels en bladeren gescheiden, gewogen en ingevroren in vloeibare stikstof. Vervolgens werden de gewichten van blad en wortel en de expressie van oxidatieve stress-gerelateerde genen geanalyseerd (zie 2.3.4). Er werden 3 huishoudgenen gemeten namelijk AT5G15710, AT2G28390, AT5G08290 [42]. Verder werden 5 genen betrokken in de ROS-productie gemeten: lipoxygenase-1 (LOX1) in de wortel, LOX2 in het blad, ‘respiratory burst oxidase homolog’ C (RBOHC), RBOHD en RBOHE. Ook werden APX1, FSD1, CSD1/2 en CAT1, die belangrijk zijn in de antioxidatieve verdediging, gemeten. Bovendien werd het Cd-gehalte in blad en wortel bepaald voor elke conditie (zie 2.3.5). Aan de hand van de gegevens werd 1 Cd-concentratie gekozen om mee verder te werken.

2.3.3 Inoculatie-experiment

Zowel controle- als Cd-zaden werden gezaaid in hydrocultuur en blootgesteld aan 0 of 2 μM Cd. De helft van de controlezaden werd geïnoculeerd volgens het optimale protocol bepaald in 2.3.1, namelijk zaaien in zand verzadigd met een bacteriële suspensie van 10^8 kve/ml en deze toedienen gedurende 7 dagen. De samenstelling van deze suspensie is dezelfde als in 2.2.3 en werd verkregen zoals beschreven in 2.3.1. Per conditie werden 2 technische en 180 biologische herhalingen gebruikt. Na 3 weken werden wortels en bladeren gescheiden, gewogen en ingevroren in vloeibare stikstof. Vervolgens werden de gewichten van blad en wortel en de expressie van oxidatieve stress-gerelateerde genen geanalyseerd (zie 2.3.4). Er werden 3 huishoudgenen gemeten namelijk AT5G15710, AT2G28390, AT5G08290 [42]. Verder werden 5 genen betrokken in de ROS-productie gemeten: LOX1 (enkel in wortel), LOX2 (enkel in blad), RBOHC, RBOHD en RBOHE (enkel in wortel). Ook werden APX1/2,

FSD1, CSD1/2 en CAT1 die belangrijk zijn in de antioxidatieve verdediging, gemeten. Ten slotte werd het Cd-gehalte in blad en wortel bepaald voor elke conditie (zie 2.3.5).

2.3.4 Bepalen van de genexpressie

Disruptie van het bevroren weefsel werd uitgevoerd met behulp van 2 stalen bolletjes in elk staal en de 'Retsch Mixer Mill MM2000'. De RNA extractie werd uitgevoerd met de 'mirVana miRNA Isolation Kit' (Ambion). De kwantiteit en kwaliteit van het RNA werden gecontroleerd gebruik makend van de 'NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer' (Isogen Life Sciences). Het cDNA werd aangemaakt met behulp van de 'Quantitect Reverse Transcription Kit' (Qiagen). De stalen werden vervolgens 10 maal verdund in 1/10 Tris EDTA buffer. Real-time PCR werd uitgevoerd in een 96-well plaat in het 'ABIPrism 7000 sequence detection system' (Applied Biosystems). Volgende cyclus werd gebruikt: 1 herhaling van 15 minuten bij 95°C en 40 herhalingen van 15 seconden bij 94°C, 30 seconden bij 50-60°C en 30 seconden bij 72°C gevolgd door het genereren van een dissociatiecurve om te controleren op specifieke amplificatie. Elke reactie bestond uit 5 µl 'Fast SYBR Green PCR Master Mix', 0,3 µl genspecifieke forward en reverse primer, 1,9 µl RNase vrij water en 2,5 µl cDNA. 'No template controls' bevatten 2,5 µl RNase vrij water in plaats van cDNA. De verkregen gegevens werden met behulp van de $2^{-\Delta Ct}$ methode [43] geanalyseerd ten opzichte van meerdere huishoudgenen. Dit geeft een relatieve kwantificering van de bestudeerde transcripten ten opzichte van de controle. Voor elke conditie werden 4 à 5 biologische herhalingen gebruikt.

2.3.5 Metaalbepaling

Voor de Cd-bepaling werden zowel voor blad als voor wortel mengstalen van 300 tot 800 mg vers plantenmateriaal (gemiddeld 25 planten) gemaakt. Na het drogen werd maximaal 100 mg afgewogen, fijngemalen en overgebracht in warmtebestendige buizen die 3 maal gespoeld werden met 10% HCl, 3 maal met gedestilleerd water en 3 maal met millipore water. Aan deze buisjes werd 1 ml HNO₃ toegevoegd waarna ze verhit werden tot 110°C om ze te laten droogdampen. Deze procedure werd 3 maal herhaald met HNO₃ en 1 maal met HCl. Vervolgens werden de stalen terug opgelost in 0,4 ml 20% HCl en 3,6 ml millipore water en overgebracht in plasticen buizen. Het Cd-gehalte in de stalen werd ten slotte bepaald met behulp van vlam-atomaire absorptie spectrometrie (vlam-AAS).

2.4 Statistische analyse

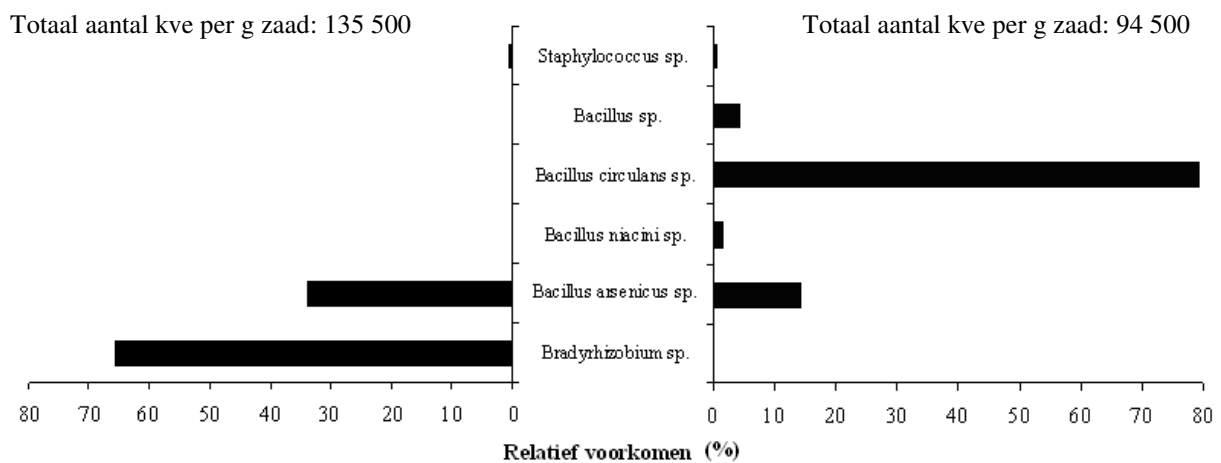
De statistische verwerking van de data werd uitgevoerd met een ANOVA gevolgd door een Tukey test voor post-hoc vergelijkingen in SAS v9.1 of met een Kruskal-Wallis test in Microsoft Excel 2003.

3 Resultaten en discussie

3.1 Identificatie en karakterisatie van de zaadendofyten

3.1.1 Samenstelling en eigenschappen van de zaadendofytopopulatie

De cultiveerbare zaadendofytopopulatie in controlezaden bestond uit 65,68% *Bradyrhizobium sp.*, 33,95% *Bacillus arsenicus sp.* en 0,37% *Staphylococcus sp.* (figuur 5). De cultiveerbare zaadendofytopopulatie in Cd-zaden bestond uit 79,37% *Bacillus circulans sp.*, 14,23% *Bacillus arsenicus sp.*, 1,59% *Bacillus niacini sp.*, 4,29% *Bacillus sp.* en 0,53% *Staphylococcus sp.* (figuur 5).



Figuur 5: samenstelling van de cultiveerbare endofytopopulatie in controlezaden (links) en Cd-zaden (rechts). Het relatief voorkomen wordt uitgedrukt als een percentage van het totaal aantal kve per g zaad.

Een groot gedeelte van de cultiveerbare zaadendofytopopulatie, zowel in controle- als Cd-zaden, bestond uit *Bacillus sp.*. Deze gram-positieve bacterie werd ook teruggevonden in zaden van andere plantensoorten zoals koolzaad [32] en eucalyptus [34]. Het resterende gedeelte van de populatie in controlezaden bestond hoofdzakelijk uit *Bradyrhizobium sp.*. Deze gram-negatieve bacterie kan atmosferische stikstof omzetten naar stikstofverbindingen die door de plant gebruikt kunnen worden [44]. Zowel *Bacillus sp.* als *Bradyrhizobium sp.* hebben gekende groeipromoverende eigenschappen. Bijgevolg zorgt de kolonisatie van zaden door deze bacteriën voor de aanwezigheid van gunstige micro-organismen tijdens de vroege

ontwikkelingsstadia van de plant. Een andere groeibevorderende bacterie die veel voorkomt in zaden is *Pseudomonas sp.*. Deze werd ondermeer teruggevonden in zaden van tabak [35], koolzaad [32] en Noorse spar [33], maar werd noch in controlezaden noch in Cd-zaden van *Arabidopsis thaliana* teruggevonden. Opmerkelijk is, ten slotte, de aanwezigheid van *Staphylococcus sp.* in beide soorten zaden. Prithiviraj *et al.* (2005) hebben echter aangetoond dat *Staphylococcus sp. Arabidopsis thaliana* kan infecteren [45].

Alle geïsoleerde zaadendofyten werden vervolgens getest op metaalresistentie en productie van sideroforen, organische zuren en IAA. In de controlezaden werden geen bacteriën met metaalresistentie, siderofoorproductie of IAA-productie teruggevonden. De productie van organische zuren kwam wel bij alle soorten voor (tabel 1). In de Cd-zaden vertoonden een deel van de *Bacillus arsenicus sp.* Cu-resistentie en een deel Cd-resistentie. Ongeveer 1/3 van deze soort produceerde bovendien sideroforen. Verder vertoonden 31,75% van de *Bacillus circulans sp.* Zn-resistentie en 63,5% Cu-resistentie. Organische zuurproductie werd bij alle soorten teruggevonden, behalve bij *Bacillus circulans sp.*. IAA-productie kwam zowel bij *Bacillus arsenicus sp.*, *niacini sp.* en *circulans sp.* voor (tabel 1). Uit deze resultaten blijkt dat de endofytpopulatie uit Cd-zaden over mechanismen beschikt die mogelijk de effecten van Cd-stress in de plant kunnen tegengaan. De aanwezige Cd-resistentie kan mogelijk ontstaan doordat de bacterie de vrije metalen kan precipiteren op de celwand. Op deze wijze beschermt zij niet alleen zichzelf maar ook de plant tegen de toxiciteit van hoge concentraties vrije metalen. Bovendien kan de vrije concentratie aan Cd-ionen verlaagd worden door de productie van sideroforen. De productie van het planthormoon IAA ten slotte kan de plantgroei bevorderen. Deze mechanismen werden in veel mindere mate teruggevonden bij de endofytpopulatie in de controlezaden.

Tabel 1: metaalresistentie en productie van sideroforen, organische zuren en IAA van de verschillende species in controle- en Cd-zaden. +: eigenschap aanwezig, -: eigenschap niet aanwezig.

Species	0,4 mM Cd	0,8 mM Cd	0,6 mM Zn	0,4 mM Cu	Sideroforen	Organische zuren	IAA	Relatief voorkomen (%)
Controlezaad								
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	32,84
	-	-	-	-	-	+	-	32,84
<i>Bacillus arsenicus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,74
	-	-	-	-	-	+	-	33,21
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	0,37
Cd-zaad								
<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	2,06
	-	-	-	-	-	+	-	2,22
<i>Bacillus arsenicus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	6,61
	-	-	-	-	-	-	+	1,59
	-	-	-	-	-	+	-	1,80
	-	-	-	-	+	-	-	2,38
	-	-	-	-	+	-	+	0,53
	-	-	-	+	+	-	-	0,79
	+	-	-	-	+	-	-	0,53
<i>Bacillus niacini sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,53
	-	-	-	-	-	-	+	0,53
	-	-	-	-	-	+	-	0,53
<i>Bacillus circulans sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	15,87
	-	-	-	+	-	-	-	15,87
	-	-	-	+	-	-	+	15,87
	-	-	+	+	-	-	-	31,75
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	0,53

Ook is gebleken dat de isolatie van de zaadendofyten niet succesvol was wanneer het zaad te jong is. De zaadhuid is dan onvoldoende ‘afgerijpt’ waardoor de sterilisatievloeistof de zaden binnendringt en de endofyten doodt. Na ongeveer 50 dagen bewaring bij kamertemperatuur konden de zaadendofyten succesvol geïsoleerd worden (tabel 2). Naarmate de zaden ouder werden, nam het aantal zaadendofyten weer af. Zaden die bewaard werden bij 4°C bevatten na ongeveer 100 dagen wel nog endofyten (tabel 2).

Tabel 2: kve/g zaad voor controle- en Cd-zaden bij kamertemperatuur en bij 4°C.

Tijdstip (dagen)	Kve/g zaad			
	Kamertemperatuur		4°C	
	Controlezaden	Cd-zaden	Controlezaden	Cd-zaden
0	0	0	-	-
11	0	0	-	-
28	2500	2250	-	-
47	210500	95500	-	-
81	0	750	-	-
96	0	0	1000	3500

Ten slotte is uit de optimalisatie van de isolatie gebleken dat het standaard sterilisatieprotocol voor *Arabidopsis* zaden, dat gebaseerd is op Balcells [46], alle zaadendofyten doodt. Dit heeft mogelijk een negatieve invloed op de kiemcapaciteit en verdere ontwikkeling van de plant. Bijgevolg zou het beter zijn om in de toekomst gebruik te maken van het protocol uit 2.1.2 aangezien dit eveneens tot een effectieve oppervlakteriliseratie leidt.

3.2 Verticale agarplaten

3.2.1 Optimalisatie van de inoculatie

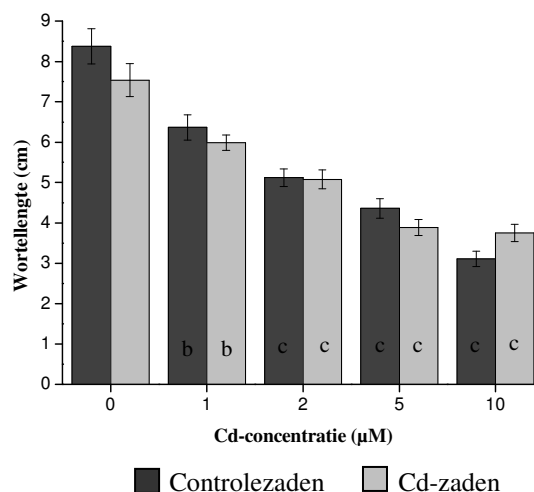
Voor de optimalisatie van de inoculatie op VAP werden verschillende inoculatiecondities getest. Van de 2 geteste endofyten werd enkel de Cd-resistente *Pseudomonas sp.* teruggevonden na reïsolatie. Hiermee werden bij inoculatie met 10^8 kve/ml meer kolonies teruggevonden dan met 10^6 kve/ml. Bovendien werden meer kolonies teruggevonden wanneer de inoculatie plaatsvond na 6 dagen dan wanneer deze onmiddellijk plaatsvond. Ten slotte werden ook meer kolonies teruggevonden bij inoculatie gedurende 7 dagen dan gedurende 3 dagen (tabel 3). Bijgevolg werd voor het inoculatie-experiment inoculatie met 10^8 kve/ml na 6 dagen en met een duur van 7 dagen geselecteerd als inoculatiemethode.

Tabel 3: overzicht optimalisatie inoculatie op VAP.

Tijdstip inoculatie	Concentratie (kve/ml)	Duur (dagen)	Controle oppervlakte-sterilisatie wortel	Kve/wortel
Dag 0	10^6	3	Niet ok	21
		7	Ok	4
	10^8	3	Niet ok	45
		7	Ok	1
Dag 6	10^6	3	Ok	6
		7	Ok	48
	10^8	3	Ok	4
		7	Ok	60

3.2.2 Optimalisatie van de cadmiumconcentratie

Voor het selecteren van 2 geschikte Cd-concentraties werd *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan verschillende Cd-concentraties op VAP. Hieruit bleek dat de wortellengte afneemt bij toenemende Cd-concentraties zowel voor Cd- als controlezaden (figuur 6).

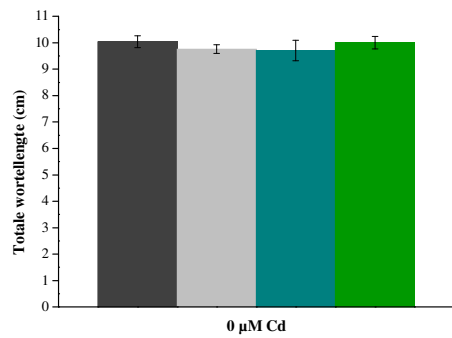


Figuur 6: wortellengte in functie van de Cd-concentratie voor Cd-zaden en controlezaden. $b = p < 0,01$ en $c = p < 0,001$ t.o.v. controlezaad $0 \mu\text{M}$ Cd voor controlezaden en t.o.v. Cd-zaad $0 \mu\text{M}$ Cd voor Cd-zaden.

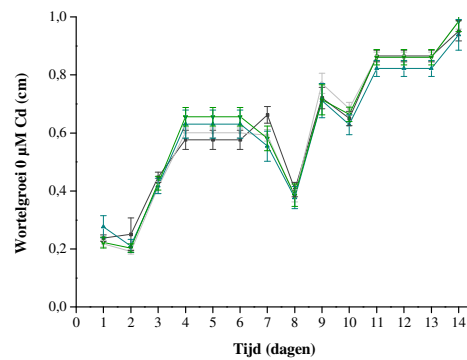
Voor het inoculatie-experiment werden $2 \mu\text{M}$ Cd en $10 \mu\text{M}$ Cd geselecteerd omdat de planten hier respectievelijk een kleine en een grote vermindering in wortellengte vertoonden in vergelijking met de niet-blootgestelde planten. Bovendien werd $0 \mu\text{M}$ Cd meegenomen als controleconditie. Er werden in dit experiment geen verschillen waargenomen tussen controle- en Cd-zaden. Een mogelijke verklaring is dat de zaden onvoldoende gerijpt waren op het moment van de oppervlakteresterilisatie waardoor de sterilisatievloeistof het zaad binnengedrongen is en alle zaadendofyten gedood heeft. Dit bleek ook uit het feit dat uit deze zaden geen endofyten geïsoleerd konden worden.

3.2.3 Inoculatie-experiment

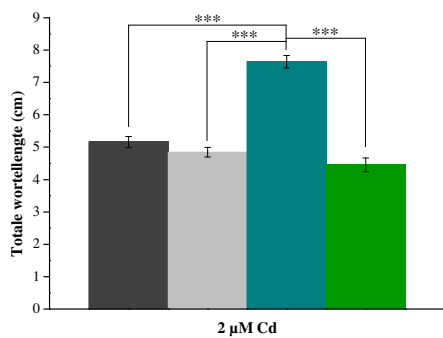
Tijdens het inoculatie-experiment op VAP werden planten afkomstig van controlezaden, Cd-zaden en controlezaden geïnoculeerd met de endofytopopulatie uit Cd-zaden vergeleken wat betreft de totale wortellengte en groeisnelheid van de wortel. Hieruit bleek dat er geen significante verschillen waren tussen de verschillende condities bij 0 μM Cd, zowel voor de totale wortellengte (figuur 7A) als voor de groeisnelheid (figuur 7D). In afwezigheid van Cd was de totale wortellengte en de groeisnelheid van de wortel dus hetzelfde voor controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten. De aanwezigheid van de zaadendofytopopulatie had hier geen groeibevorderend effect. Bij 2 μM Cd waren zowel de totale lengte (figuur 7B) als de groeisnelheid (figuur 7E) significant groter bij de planten die gedurende 1 week geïnoculeerd werden dan bij de andere condities. Ook bij blootstelling aan 10 μM Cd werden deze significante verschillen teruggevonden (figuur 7C en F). Bij blootstelling aan Cd kwam het groeibevorderend effect dus wel tot uiting. De planten ondervonden dus enkel voordeel van de inoculatie indien ook Cd aanwezig was. Inoculatie gedurende 2 weken bleek te lang, aangezien deze planten op hetzelfde niveau bleven als de niet-geïnoculeerde controleplanten. Mogelijk werd de concentratie aan endofyten in de plant te hoog waardoor het groeibevorderend effect niet meer tot uiting kon komen. Verder werden geen verschillen waargenomen tussen controle- en Cd-planten. Dit kan mogelijk verklaard worden door het feit dat het groeibevorderend effect pas tot uiting komt wanneer de bacteriën in grote aantallen aanwezig zijn, zoals bij de geïnoculeerde planten (10^8 kve/ml). Bijgevolg zou het interessant zijn om in toekomstige experimenten de invloed van inoculatie met deze zaadendofytopopulatie op de Cd-planten na te gaan.



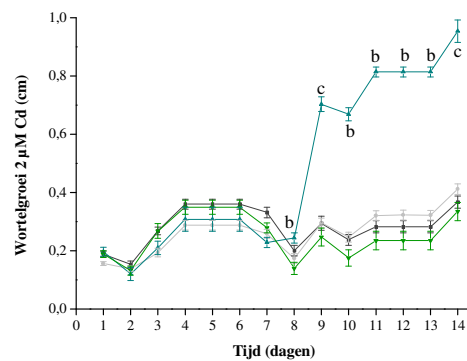
A



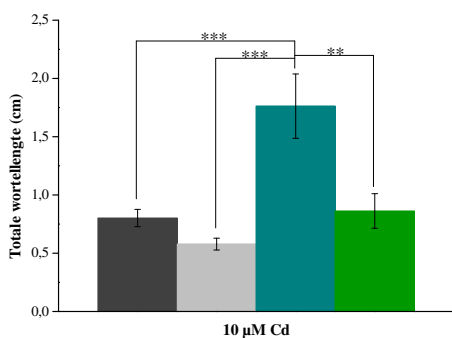
D



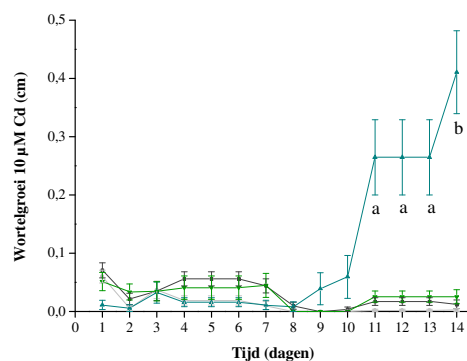
B



E



C



F

■ Controleplanten ■ Cd-planten ■ Geinoculeerde planten (1 week) ■ Geinoculeerde planten (2 weken)

Figuur 7: A, B, C: totale wortellengte na 3 weken voor de verschillende Cd-concentraties. A. 0 μM Cd. B. 2 μM Cd. C. 10 μM Cd. D, E, F: wortelgroei per dag voor de verschillende Cd-concentraties. D. 0 μM Cd. E. 2 μM Cd. F. 10 μM Cd. Dag 1 op de grafieken komt overeen met de 1^e dag na inoculatie. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. a = $p < 0,05$; b = $p < 0,01$; c = $p < 0,001$ t.o.v. controleplanten, Cd-planten en planten geinoculeerd gedurende 2 weken op dezelfde dag.

3.3 Hydrocultuur

3.3.1 Optimalisatie van de inoculatie

Voor de optimalisatie van de inoculatie in hydrocultuur werden verschillende inoculatiecondities getest. Uit de resultaten van de reisolutie bleek dat de inoculatieparameters die getest werden in de 1^e fase niet tot een geslaagde inoculatie leiden (resultaten niet

weergegeven). Bij gebruik van de parameters uit de 2^e fase werd de Cd-resistente *Pseudomonas sp.* wel teruggevonden na reïsolatie. In het blad werden meer kolonies teruggevonden naarmate er langer geïnoculeerd werd (tabel 4). Het onderdompelen van de zaden in een bacteriële suspensie had geen eenduidig effect op het aantal gereïsoleerde kolonies (tabel 4). Uit de wortel konden echter geen kolonies gereïsoleerd worden. Dit wijst er mogelijk op dat de sterilisatieprocedure te sterk was. Het sterilisatieprotocol werd immers geoptimaliseerd met wortels afkomstig van planten gegroeid op zand. In hydrocultuur hadden de wortels echter een andere, veel minder stevige structuur. Bijgevolg moet in een toekomstig experiment de optimalisatie van de isolatie van de endofyten ook geoptimaliseerd worden voor hydrocultuur.

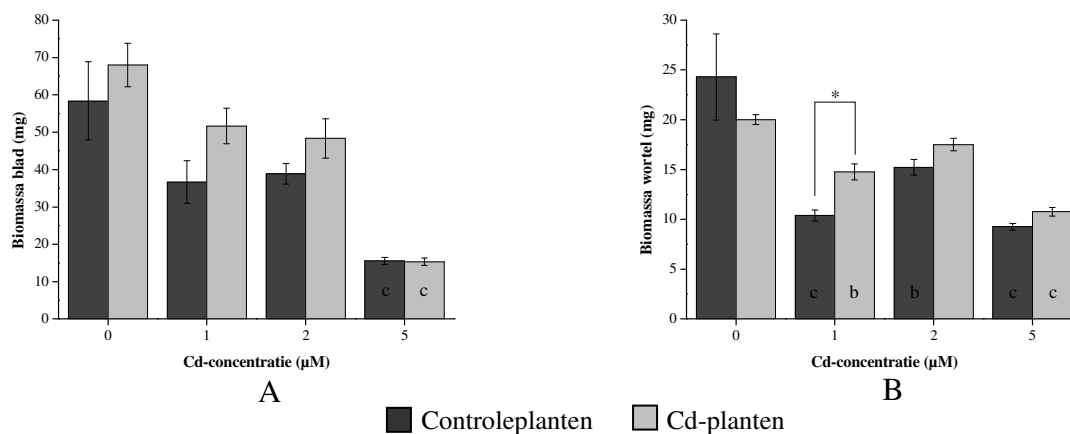
Voor het inoculatie-experiment werd zaaien in zand verzadigd met een bacteriële suspensie van 10⁸ kve/ml (zonder onderdompeling van de zaden) en deze toedienen gedurende 7 dagen geselecteerd als inoculatiemethode. Hoewel meer kolonies gereïsoleerd werden bij een inoculatie-duur van 14 dagen, werd toch gekozen voor 7 dagen omdat de planten bij 14 dagen een vermindering in groei vertoonden. Bovendien was de oppervlaktesterilisatie van de bladeren niet in orde bij 14 dagen.

Tabel 4: overzicht optimalisatie inoculatie in hydrocultuur.

Tijdstip inoculatie	Concentratie (kve/ml)	Duur (dagen)	Zaden in bacteriële suspensie	Controle oppervlakte-sterilisatie blad	Kve/g VG (blad)
Dag 0	10 ⁸	3	Nee	Ok	111
			Ja	Ok	76
		7	Nee	Ok	583
			Ja	Ok	170
		14	Nee	Niet ok	1073
			Ja	Niet ok	3894

3.3.2 Optimalisatie van de cadmiumconcentratie

Voor het selecteren van een geschikte Cd-concentratie in hydrocultuur werd *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan verschillende Cd-concentraties. Hieruit bleek dat planten die blootgesteld werden aan 5 µM Cd significant lichtere blaadjes hadden in vergelijking met de niet-blootgestelde planten (figuur 8A). Wortels die blootgesteld werden aan Cd waren ook significant lichter dan wortels die niet blootgesteld werden (figuur 8B). Bovendien was er een significant verschil tussen de wortels van planten afkomstig van controlezaden en Cd-zaden bij blootstelling aan 1 µM Cd (figuur 8B).



Figuur 8: biomassa in functie van de Cd-concentratie voor controleplanten en Cd-planten. A. Blad. B. Wortel. * = $p < 0,05$. b = $p < 0,01$ en c = $p < 0,001$ t.o.v. controlezaad 0 μM Cd voor controleplanten en t.o.v. Cd-zaad 0 μM Cd voor Cd-planten.

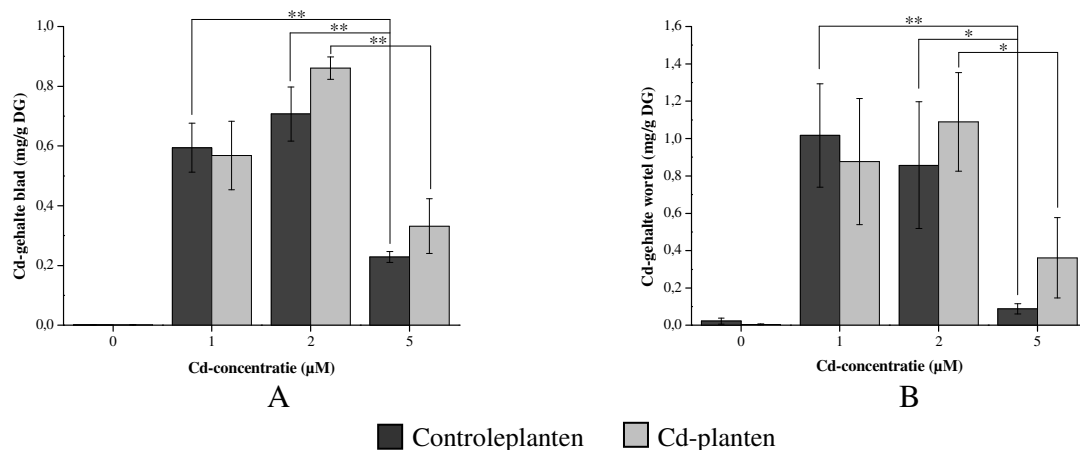
Uit de resultaten van de genexpressie (bijlage 4) bleek dat er een trend is waarbij Cd-planten hun antioxidatieve verdediging sneller activeren dan controleplanten. Dit was het geval voor CSD1 en APX1 in blad en wortel en voor CSD2, FSD1 en CAT1 in de wortel. Dit verschil was significant bij CSD2 in de wortel ($p < 0,01$) en bij CAT1 in de wortel ($p < 0,001$). Bovendien bleef de antioxidatieve verdediging van de Cd-planten meestal intact bij de hogere Cd-concentraties, terwijl deze bij de controleplanten dan al over het maximum heen was. Dit was significant verschillend bij CSD1 in het blad (2 μM : $p < 0,01$) maar ook bij CSD2 in het blad kon deze trend teruggevonden worden. Wat de expressie van pro-oxidatieve genen betreft, was er een trend waarbij deze genen meestal eerder geïnduceerd werden bij de Cd-planten dan bij de controleplanten. Dit was het geval voor RBOHC, RBOHE (significant: $p < 0,05$) en LOX1 in de wortel en bij RBOHD in blad en wortel.

Het feit dat Cd-planten beter groeien en beter in staat zijn hun redoxbalans in evenwicht te houden kan verklaard worden door verschillen in samenstelling van de endofytopopulatie. Deze zaden waren 2 maanden oud op het ogenblik van de sterilisatie waardoor de sterilisatievloeistof minder gemakkelijk kon binnendringen en minder zaadendofyten kon doden. Zoals blijkt uit 3.1.1 bezit de endofytopopulatie uit Cd-zaden plantgroeibevorderende eigenschappen zoals productie van sideroforen en IAA. De verhoogde productie van sideroforen in de aanwezigheid van zware metalen kan verklaard worden door het feit dat metaalionen in competitie staan met Fe voor binding aan de sideroforen. Bijgevolg zijn meer sideroforen nodig om de metaal-geïnduceerde Fe-deficiëntie in de plant op te heffen [47]. Daarnaast kunnen sideroforen de zware metalen binden waardoor ze enerzijds de concentratie

aan vrije metaalionen verlagen en anderzijds de metaal-geïnduceerde inhibitie van de IAA-productie verminderen. De verlaagde concentratie van IAA in de aanwezigheid van zware metalen kan het gevolg zijn van een lagere biosynthese ten gevolge van metaaltoxiciteit of door degradatie via het IAA-peroxidase dat verhoogd aanwezig is bij metaalgecatalyzeerde vorming van vrije radicalen [47].

Verder werden Cd-planten gedurende verschillende generaties gegroeid op Cd-houdende grond. Hierdoor blijken zij sneller te reageren op een nieuwe blootstelling aan Cd. Zij gaan ROS produceren zodat een signalisatiecascade op gang komt die de antioxidatieve verdediging activeert.

Uit de metaaldoseringen ten slotte bleek dat er, zowel voor blad als wortel, geen significante verschillen in Cd-gehalte waren tussen controle- en Cd-planten. Verder was het Cd-gehalte in blad en wortel van planten blootgesteld aan 1, 2 of 5 μM Cd significant verschillend van niet-blootgestelde planten (niet aangeduid), behalve in de wortel van controleplanten blootgesteld aan 5 μM Cd. In het blad waren er significante verschillen in Cd-gehalte tussen controleplanten blootgesteld aan 5 μM Cd en controleplanten blootgesteld aan 1 of 2 μM Cd (figuur 9A). Bij de Cd-planten was een significant verschil in Cd-gehalte tussen planten blootgesteld aan 5 μM Cd en planten blootgesteld aan 2 μM Cd (figuur 9A). Dezelfde verschillen werden teruggevonden in de wortel (figuur 9B).



Figuur 9: Cd-gehalte in functie van de Cd-concentratie waaraan de controle- en Cd-planten werden blootgesteld. A. Blad. B. Wortel. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Planten blootgesteld aan 5 μM Cd hadden lagere Cd-gehaltenes in blad en wortel dan planten blootgesteld aan 1 of 2 μM Cd. Dit kan verklaard worden door het feit dat blootstelling aan een hoge Cd-concentratie de werking van de transportsystemen in de wortel verstoort.

Hierdoor zullen minder Cd-ionen en minder nutriënten opgenomen worden waardoor deze planten kleiner waren en een lager Cd-gehalte hadden. Deze concentratie is bijgevolg niet geschikt voor het hierop volgende inoculatie-experiment.

Op basis van de resultaten van de biomassa, de genexpressie en de metaalbepaling werd 2 μM Cd gekozen als optimale concentratie voor het inoculatie-experiment. Als controleconditie werd gebruik gemaakt van 0 μM Cd.

3.3.3 Inoculatie-experiment

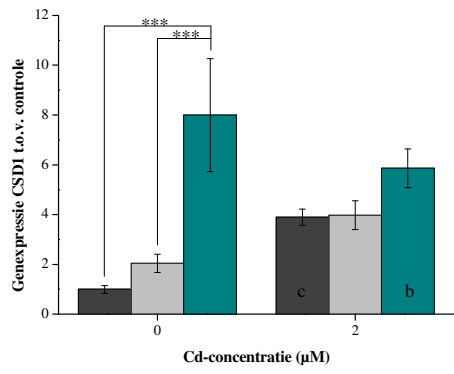
Tijdens het inoculatie-experiment werd een vergelijking gemaakt tussen controleplanten, Cd-planten en controleplanten geïnoculeerd met de endofytopopulatie geïsoleerd uit Cd-zaden. Hieruit bleek dat de biomassa van blad en wortel meestal het grootst was bij controleplanten en het laagst bij de geïnoculeerde planten, zowel bij blootstelling aan 0 als 2 μM Cd (tabel 5). Relatief gezien echter, nam bij controleplanten de biomassa van zowel het blad als de wortel af bij 2 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd. Bij Cd-planten en geïnoculeerde planten werd hier een stijging waargenomen (tabel 5). Dit kan mogelijk verklaard worden door verschillen in zaadendofytopopulatie tussen enerzijds controleplanten en anderzijds Cd-planten en geïnoculeerde planten. De endofytopopulatie in de Cd-planten en geïnoculeerde planten had een groeibevorderend effect op de planten indien zij blootgesteld werden aan Cd.

Tabel 5: biomassa voor de verschillende types van planten bij 0 en 2 μM Cd. Het relatief gemiddelde werd uitgedrukt t.o.v. hetzelfde type planten bij 0 μM Cd.

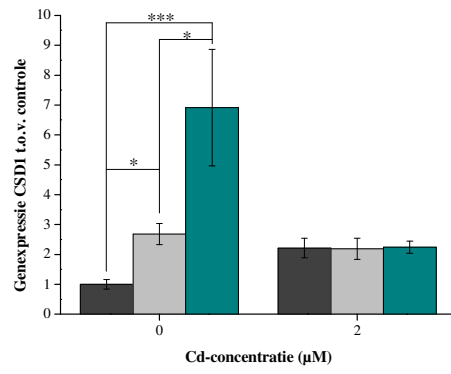
	0 μM Cd		2 μM Cd	
	Gemiddelde \pm SE			
	Absoluut (mg)	Relatief (%)	Absoluut (mg)	Relatief (%)
	Blad			
Controleplanten	97,93 \pm 2,76	100 \pm 2,82	86,26 \pm 2,60	88,09 \pm 2,66
Cd-planten	80,71 \pm 2,27	100 \pm 2,81	78,39 \pm 1,39	97,12 \pm 1,72
Geïnoculeerde planten	59,70 \pm 0,89	100 \pm 1,49	63,19 \pm 0,67	105,84 \pm 1,12
	Wortel			
Controleplanten	68,63 \pm 2,22	100 \pm 3,24	53,96 \pm 3,74	78,62 \pm 3,74
Cd-planten	45,65 \pm 1,14	100 \pm 2,50	65,11 \pm 3,63	142,63 \pm 3,63
Geïnoculeerde planten	29,16 \pm 0,47	100 \pm 1,60	45,17 \pm 2,53	154,89 \pm 2,53

De resultaten van de genexpressie toonden geen significant effect aan van Cd op de expressie van RBOHC/D/E en LOX1/2 die betrokken zijn bij de **ROS-productie** (figuur 10I-O). Hier werd enkel een trend vastgesteld waarbij de geïnoculeerde planten milde oxidatieve stress vertoonden indien zij niet werden blootgesteld aan Cd.

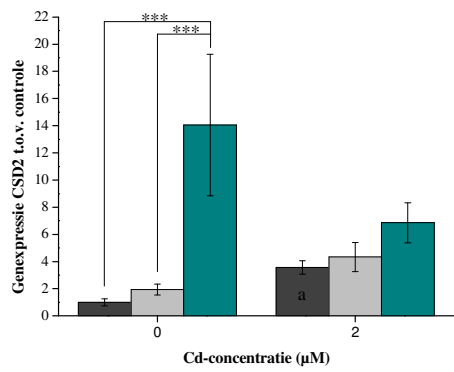
Op basis van de resultaten van de ROS-producerende genen werd geen significante stijging van de **antioxidatieve verdediging** verwacht bij blootstelling aan 2 μM Cd. Uit de data blijkt ook dat bij de *controleplanten* de expressie van CSD2 (wortel), CAT1 (blad en wortel) en APX2 (blad en wortel) op hetzelfde niveau bleef (figuur 10D-H). In het geval van CSD1 (blad en wortel) en CSD2 (blad) werd een lichte toename vastgesteld (figuur 10A-C). Bij FSD1 en APX1 werden geen eenduidige resultaten teruggevonden (niet weergegeven). Bij de *Cd-planten* bleef de expressie van de antioxidatieve verdediging bij 2 μM Cd meestal op hetzelfde niveau als bij 0 μM Cd. Enkel bij CAT1 in het blad werd een significante afname waargenomen (figuur 10E). Deze kan verklaard worden door het feit dat Cd-planten beschikken over endofyten die in staat zijn om Cd-stress tegen te gaan (zie 3.1.1). Bij de *geïnoculeerde planten* die niet blootgesteld werden aan Cd werd een duidelijke toename van de antioxidatieve verdediging waargenomen. Deze toename was significant verschillend met de controle- en/of Cd-planten bij CSD1/2 (blad en wortel) en APX2 (wortel) (figuur 10A-D, H). Deze trend was ook aanwezig bij CAT1 (blad en wortel) en APX2 (blad) (figuur 10E-G). De aanwezigheid van een hoge concentratie zaadendofyten bleek dus een negatief effect te hebben indien dit niet gecombineerd werd met blootstelling aan Cd. Bij blootstelling aan 2 μM Cd is de antioxidatieve verdediging van de geïnoculeerde planten immers terug op het niveau van de controle- en Cd-planten. Deze daling was significant verschillend ten opzichte van 0 μM Cd bij CSD1 (blad en wortel), CSD2 (wortel) en CAT1 (blad en wortel) (figuur 10A, B, D-F). Deze trend kon ook teruggevonden worden bij CSD2 (blad) en APX2 (blad en wortel) (figuur 10C, G, H). De aanwezigheid van de zaadendofyten bleek bijgevolg de negatieve effecten van Cd op de oxidatieve stress-gerelateerde genexpressie tegen te gaan.



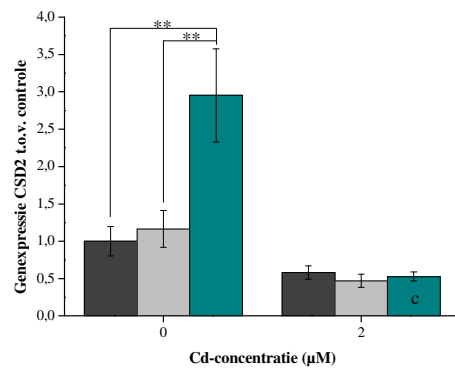
A



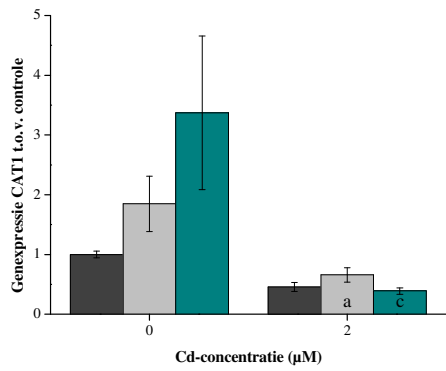
B



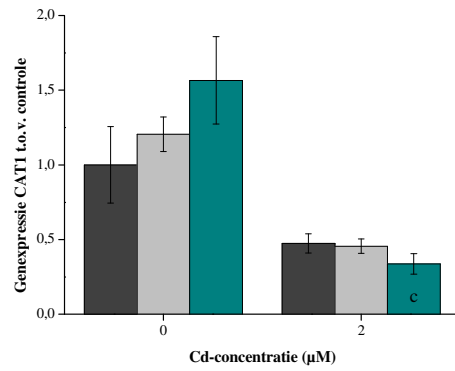
C



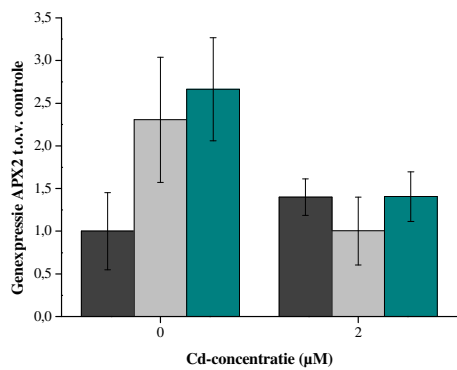
D



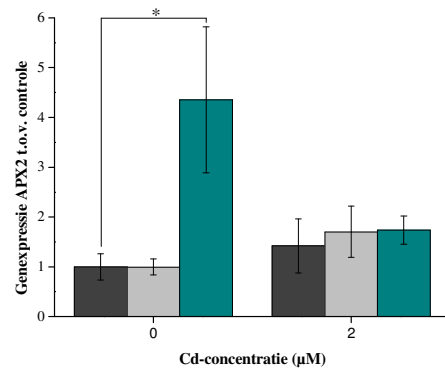
E



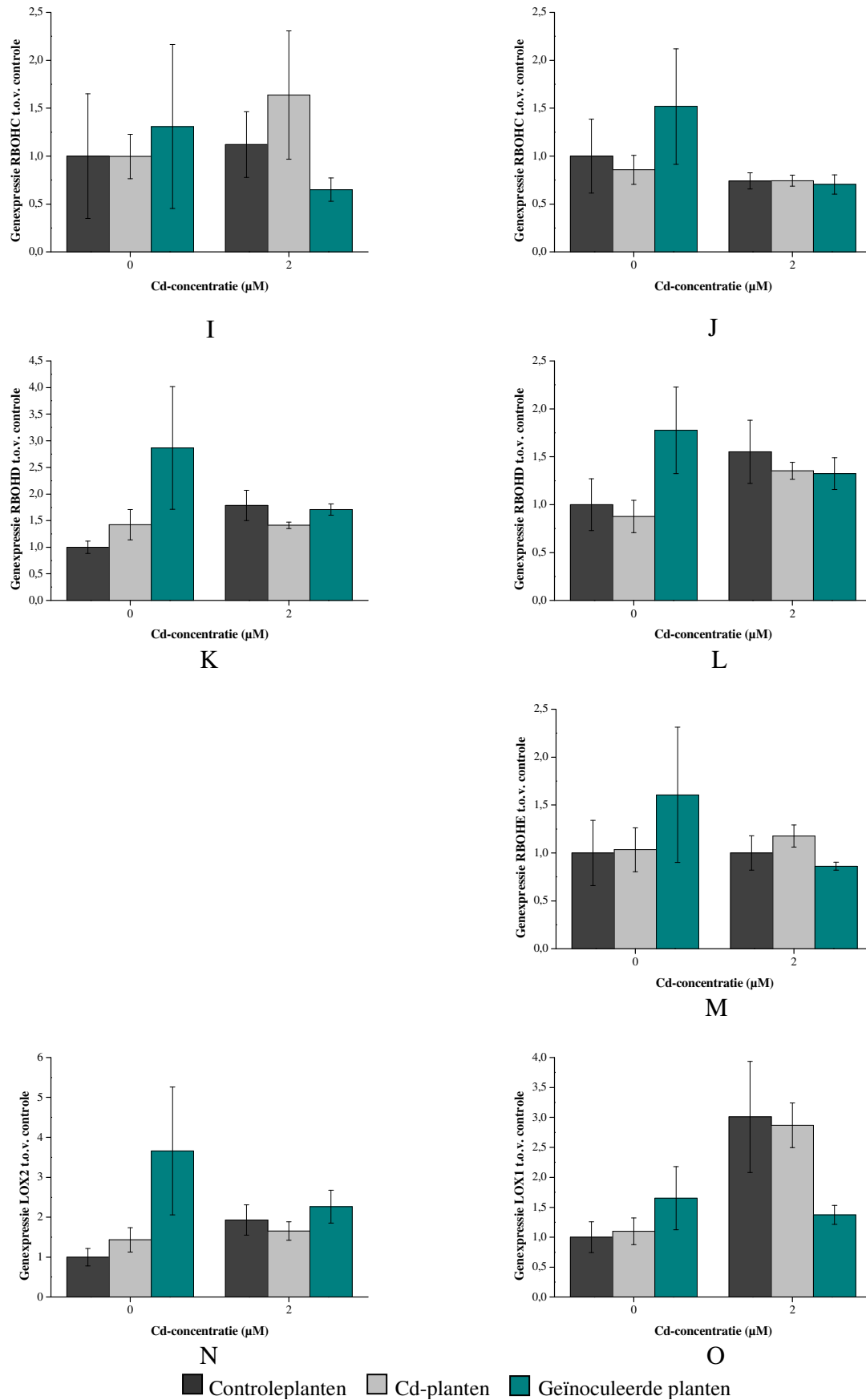
F



G



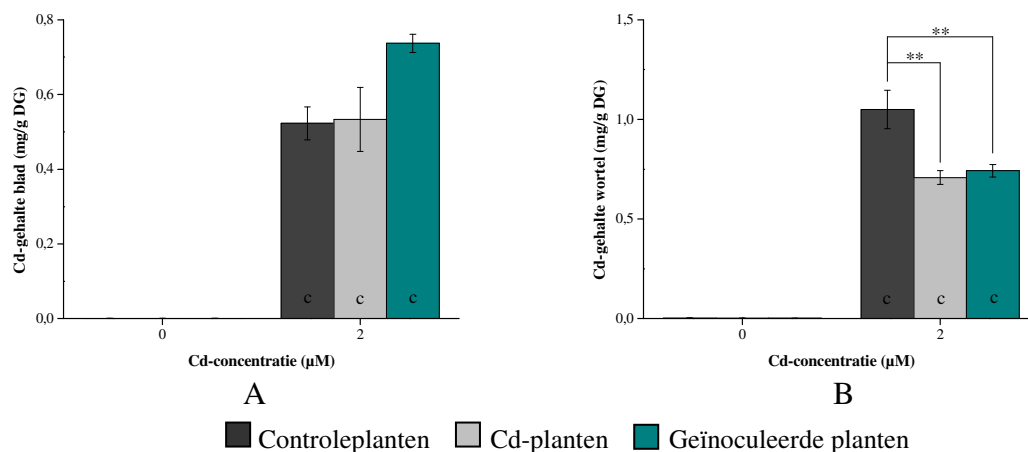
H



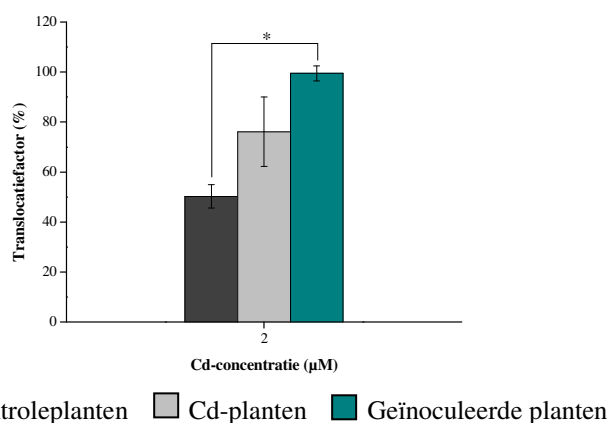
Figuur 10: resultaten van de genexpressie bij controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten (links: blad, rechts: wortel). Alle resultaten werden uitgedrukt t.o.v. de controleplanten bij 0 μM Cd. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. a = p < 0,05; b = p < 0,01; c = p < 0,001 t.o.v. hetzelfde type plant bij 0 μM Cd.

Opmerkelijk was de matige toxiciteit van 2 μM Cd zowel op de biomassa als op de genexpressie. Dit was ook in tegenspraak met de gegevens verkregen bij de optimalisatie van de Cd-concentratie in hydrocultuur (zie 3.3.2). Een mogelijke verklaring is dat de zaden nog beter afgerijpt waren op het moment van de sterilisatie waardoor de zaadendofytpopulatie beter of volledig intact bleef. Dit kan de plant mogelijk minder gevoelig maken voor lage Cd-concentraties. In de toekomst zou bijgevolg het verband tussen sterilisatieprocedure, ouderdom van de zaden en Cd-toxiciteit verder onderzocht moeten worden.

Uit de metaaldoseringen bleek dat het Cd-gehalte in het blad niet significant verschillend is tussen controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten, zowel bij 0 als 2 μM Cd (figuur 11A). In de wortel was het Cd-gehalte bij de Cd-planten significant lager dan bij de controleplanten bij blootstelling aan 2 μM Cd (figuur 11B). Een mogelijke verklaring is dat Cd-planten, in tegenstelling tot controleplanten, zich hebben aangepast zodat minder Cd opgenomen wordt. Ook in de wortel van de geïnoculeerde planten was het Cd-gehalte significant lager dan bij de controleplanten (figuur 11B). Dit kan mogelijk verklaard worden door de aanwezigheid van de zaadendofyten die de Cd-translocatie van wortel naar blad bevorderden. De translocatiefactor van geïnoculeerde planten was significant hoger dan deze van controleplanten (figuur 12). Dit kan ook de trend verklaren waarbij het Cd-gehalte in het blad van de geïnoculeerde planten hoger was dan in de controle- en Cd-planten bij 2 μM Cd (figuur 11A). Mastretta *et al.* (2008) toonden eerder al aan dat inoculatie van *Nicotiana tabacum* met zaadendofyten de Cd-translocatie van wortel naar scheut kan verhogen [35]. Ook bij de Cd-planten kon een trend waargenomen worden waarbij de translocatiefactor hoger was dan bij de controleplanten (figuur 12). Mogelijk zorgden de aanwezige endofyten ook hier voor een verhoogde Cd-translocatie van wortel naar blad.



Figuur 11: Cd-gehalte in functie van de Cd-concentratie waaraan de controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten werden blootgesteld. A. Blad. B. Wortel. ** = $p < 0,01$. c = $p < 0,001$ t.o.v. hetzelfde type planten bij 0 µM Cd.



Figuur 12: Translocatiefactor [= (Cd-gehalte blad/Cd-gehalte wortel) x 100] voor controleplanten, Cd-planten en geïnoculeerde planten bij 2 µM Cd. * = $p < 0,05$.

4 Conclusie en synthese

In dit project werd nagegaan of zaadendofyten een essentiële rol spelen in de responsen van *Arabidopsis thaliana* na Cd-blootstelling. In een eerste fase werd een vergelijking gemaakt tussen de endofytopopulatie in Cd-zaden en controlezaden. Hieruit bleek dat in controlezaden voornamelijk *Bradyrhizobium sp.* en *Bacillus arsenicus sp.* voorkomen. In Cd-zaden waren *Bacillus sp.* het meest aanwezig. Eigenschappen zoals Cd-resistentie, siderofoorproductie en IAA-productie werden enkel vastgesteld bij de endofytopopulatie geïsoleerd uit Cd-zaden.

In een tweede fase werd een vergelijking gemaakt tussen planten opgegroeid uit controlezaden, Cd-zaden en controlezaden geïnoculeerd met de endofytopopulatie geïsoleerd uit Cd-zaden. Op verticale agarplaten had de inoculatie met zaadendofyten een

groeibevorderend effect: zowel de totale lengte als de groeisnelheid van de wortel waren bij blootstelling aan Cd significant groter bij planten die gedurende 1 week geïnoculeerd werden dan bij controle- en Cd-planten. De afwezigheid van dit groeibevorderend effect bij Cd-planten wijst erop dat groeipromotie enkel plaatsvond indien de bacteriën in grote aantallen aanwezig waren, zoals bij de geïnoculeerde planten. Bijgevolg zou het interessant zijn om in toekomstige experimenten de invloed van inoculatie met deze zaadendofytpopulatie op de Cd-planten na te gaan.

In hydrocultuur zonder Cd-blootstelling zorgde de inoculatie met zaadendofyten voor een verstoring van de redoxbalans bij *Arabidopsis*. Bij blootstelling aan 2 μM Cd bleek de redoxbalans opnieuw naar een evenwicht te gaan. De genexpressie bij controle- en Cd-planten reageerde weinig tot niet op blootstelling aan 2 μM Cd. Deze matige Cd-toxiciteit bleek ook uit de analyse van de biomassa's en kan mogelijk het gevolg zijn van een betere afrijping van de zaden op het moment van de sterilisatie waardoor de zaadendofytpopulatie beter behouden of volledig intact bleef. Dit kan de plant minder gevoelig maken voor lage Cd-concentraties. In de toekomst zou dus het verband tussen sterilisatieprocedure, ouderdom van de zaden en Cd-toxiciteit verder onderzocht moeten worden.

Men kan besluiten dat de inoculatie van *Arabidopsis thaliana* met zaadendofyten kan leiden tot de aanwezigheid van bacteriën in de plant die een gunstige invloed hebben op de wortelgroei, de biomassa en de expressie van oxidatieve-stress gerelateerde genen bij blootstelling aan Cd.

Referenties

1. Järup, L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* 2003. 68: 167-82.
2. Järup, L., M. Berglund, C. Elinder, G. Nordberg, and M. Vahter. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health.* 1998. 24 (Suppl 1): 1-51.
3. Hogervorst, J., M. Plusquin, J. Vangronsveld, T. Nawrot, A. Cuypers, E. Van Hecke, H. Roels, R. Carleer, and J. Staessen. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ Res.* 2007. 103: 30-7.
4. International Agency for Research on Cancer. Cadmium and cadmium compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1993: 119-200.
5. Nawrot, T., M. Plusquin, J. Hogervorst, H. Roels, H. Celis, L. Thijs, J. Vangronsveld, E. Van Hecke, and J. Staessen. Risk of cancer and environmental exposure to cadmium in a prospective population study. *Lancet Oncol.* 2006. 7: 119-26.
6. Staessen, J., H. Roels, D. Emelianov, T. Kuznetsova, L. Thijs, J. Vangronsveld, and R. Fagard. Environmental exposure to cadmium, forearm bone-density, and risk of fractures: prospective population study. *The Lancet.* 1999. 353: 1140-4.
7. Bernard, A., H. Roels, J. Buchet, A. Cardenas, and R. Lauwerys. Cadmium and health: the Belgian experience. *IARC Scientific Publications.* 1992(118): 15-33.
8. Hellström, L., C. Elinder, B. Dahlberg, M. Lundberg, L. Järup, B. Persson, and O. Axelson. Cadmium exposure and end-stage renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2001. 38: 1001-8.
9. Clarkson, D. and U. Lüttge. Mineral nutrition. Divalent cations, transport and compartmentalization. *Progr Bot.* 1989. 51: 93-112.
10. Cataldo, D., T. Garland, and R. Wildung. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiol Biochem.* 1983. 73: 844-8.
11. Blum, W. Cadmium uptake by higher plants. In: *Proceedings of extended abstracts from the Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements.* U.o. California, Editor. 1997: Berkeley. p. 109-10.
12. Aidid, S. and H. Okamoto. Responses of elongation rate, turgor pressure and cell wall extensibility of stem cells of *Impatiens balsamina* to lead, cadmium and zinc. *Biometals.* 1993. 6: 245-9.
13. Moreno, J., T. Hernandez, and C. Garcia. Effect of a cadmium-containing sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soils. *Biol Fert Soils.* 1999. 28: 230-7.
14. Das, P., S. Samantaray, and G. Rout. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollution.* 1997. 98: 29-36.
15. Hernandez, L., R. Carpena-Ruiz, and A. Garate. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr.* 1996. 19: 1581-98.
16. Sanita di Toppi, L. and R. Gabbrielli. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany.* 1999. 41: 105-30.
17. Costa, G. and J. Morel. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol Biochem.* 1994. 32: 561-70.
18. Van Assche, F. and H. Clijsters. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 1990. 13: 195-206.
19. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006. 141: 312-22.

20. Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C. R. Biologies*. 2004. 327: 649–62.
21. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 2002. 7(9): 405-10.
22. Arora, A., R. Sairam, and G. Srivastava. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 2002. 82(10): 1227-38.
23. Fridovich, I. Superoxide radical and SODs. *Annu Rev Biochem*. 1995. 64: 97-112.
24. Glick, B. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv*. 2003. 21: 383-93.
25. Vassilev, A., J. Schwitzguebel, T. Thewys, D. Van Der Lelie, and J. Vangronsveld. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Scientific World Journal*. 2004 4: 9-34.
26. Weyens, N., S. Monchy, J. Vangronsveld, S. Taghavi, and D. van der Lelie. Plant-microbe partnerships for bioremediation. In: *Microbiology of hydrocarbons, Oils, Lipids and derived compounds*. Submitted.
27. van der Lelie, D. Biological interactions: the role of soil bacteria in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. In: *Metal-Contaminated Soils: In Situ Inactivation and Phytoremediation*. J. Vangronsveld and S. Cunningham, Editors. 1998, Springer-Verlag: New York. p. 31-50.
28. Haferburg, G. and E. Kothe. Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol*. 2007. 47: 453–67.
29. López, M., J. Peralta-Videa, J. Parsons, T. Benitez, and J. Gardea-Torresdey. Gibberellic acid, kinetin, and the mixture indole-3-acetic acid-kinetin assisted with EDTA-induced lead hyperaccumulation in alfalfa plants. *Environ Sci Technol*. 2007. 41: 8165-70.
30. Lodewijckx, C., S. Taghavi, M. Mergeay, J. Vangronsveld, H. Clijsters, and D. Van der Lelie. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. *Int J Phytorem*. 2001. 3: 173-87.
31. Tripathi, A., S. Verma, S. Chowdhury, M. Leubhn, A. Gatteringer, and M. Schlöter. *Ochrobactrum oryzae* sp. nov., an endophytic bacterial species isolated from deep water rice in India. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006. 56: 1677-80.
32. Granér, G., P. Persson, J. Meijer, and S. Alstrom. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003. 224: 269-76.
33. Cankar, K., H. Kraigher, M. Ravnkar, and M. Rupnik. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karts). *FEMS Microbiol Lett*. 2005. 244: 341-5.
34. Ferreira, A., M. Quecine, P. Lacava, S. Oda, J. Azevedo, and W. Araújo. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by Pantoea agglomerans. *FEMS Microbiol Lett*. 2008. 287: 8-15.
35. Mastretta, C., S. Taghavi, D. van der Lelie, A. Mengoni, F. Galardi, C. Gonelli, T. Barac, J. Boulet, N. Weyens, and J. Vangronsveld. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce Cd phytotoxicity. *Int J Phytorem*. 2009. 11(3): 252-67.
36. Schwyn, B. and J. Neilands. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 1987. 160(1): 47-56.
37. Cunningham, J. and C. Kuyack. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol*. 1992. 58(5): 1451-8.
38. Patten, C. and B. Glick. Role of pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*. 2002. 68(8): 3795–801.

39. Remans, T., P. Nacry, M. Pervent, T. Girin, P. Tillard, M. Lepetit, and A. Gojon. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2006. 140: 909-21.
40. Zhang, H. and B. Forde. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science.* 1998. 279: 407-9.
41. Smeets, K., J. Ruytinx, F. Van Belleghem, B. Semane, D. Lin, J. Vangronsveld, and A. Cuypers. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem.* 2008. 46: 212-8.
42. Remans, T., K. Smeets, K. Opdenakker, D. Mathijsen, J. Vangronsveld, and A. Cuypers. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta.* 2008. 227: 1343-9.
43. Wong, M. and J. Medrano. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005. 39(1): 75-85.
44. van Rhijn, P. and J. Vanderleyden. The rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev.* 1995. 59(1): 124-42.
45. Prithiviraj, B., H. Bais, A. Jha, and J. Vivanco. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *The Plant Journal.* 2005. 42: 417-32.
46. Balcells, L. A method for sterilising *Arabidopsis* seed. In: *Arabidopsis: The complete guide.* 1993: Flanders D and Dean C.
47. Dimpka, C., A. Svatos, D. Merten, G. Büchel, and E. Kothe. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microbiol.* 2008. 54: 163-72.

Bijlagen

Bijlage 1: samenstelling van het 869 en 284 medium

Per liter gedestilleerd water:

869		284	
Product	Hoeveelheid	Product	Hoeveelheid
Tryptone	10 g	Tris	6,06 g
Yeast extract	5 g	NaCl	4,68 g
NaCl	5 g	KCl	1,49 g
Glucose D+	1 g	NH ₄ Cl	1,07 g
CaCl ₂ H ₂ O	0,345 g	Na ₂ SO ₄	0,43 g
NaOH	Tot pH = 7	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,20 g
Agar 2	15 g	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,03 g
		Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,04 g
		Fe(III)NH ₄ Citraat (48 mg/100 ml)	10 ml
		SI7 spoorelementen	1ml
		HCl	Tot pH = 7
		Agar 2	20 g

SI7 spoorelementen (per liter gedestilleerd water):

25% HCl: 1,3 ml

CoCl₂6H₂O: 190 mg

ZnSO₄7H₂O: 144 mg

CuCl₂2H₂O: 17 mg

MnCl₂4H₂O: 100 mg

NiCl₂6H₂O: 24 mg of NiSO₄6H₂O: 26,3 mg

H₃BO₃: 62 mg

Na₂MoO₄2H₂O: 36 mg

CMIX (per liter medium):

Lactaat: 0,7 ml

Glucose: 0,52 g

Gluconaat: 0,66 g

Fructose: 0,54 g

Succinaat: 0,81 g

Bijlage 2: samenstelling van het CAS reagens en ST medium

CAS reagens

Per 25 ml gedestilleerd water:

1,5 ml 10 mM hexadecyltrimethylammoniumbromide (HDTMA)

3,75 ml 10 mM HCl

0,375 ml 1 mM FeCl₃

1,875 ml 2 mM chrome azurol S (CAS)

7,5 ml piperazine

2,5 ml 40 mM sulfosalicylic zuur

ST medium

Per liter gedestilleerd water:

Sucrose: 20 g

Tryptone: 5 g

Spoorelementen: 10 ml

pH: geen correctie

Spoorelementen (per liter medium): 20 mg NaMoO₄

200 mg H₃BO₄

20 mg CuSO₄·5H₂O

100 mg FeCl₃

20 mg MnCl₂·4H₂O

280 mg ZnCl₂

Bijlage 3: samenstelling van de Hoagland voedingsoplossing

Per 10 liter gedestilleerd water:

50 ml macro-elementen

Per liter gedestilleerd water: KNO_3 : 10,2 g

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 7,08 g

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 2,3 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 4,9 g

1 ml spoorelementen

Per liter gedestilleerd water: H_3BO_3 : 2,86 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1,81 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,08 g

$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,09 g

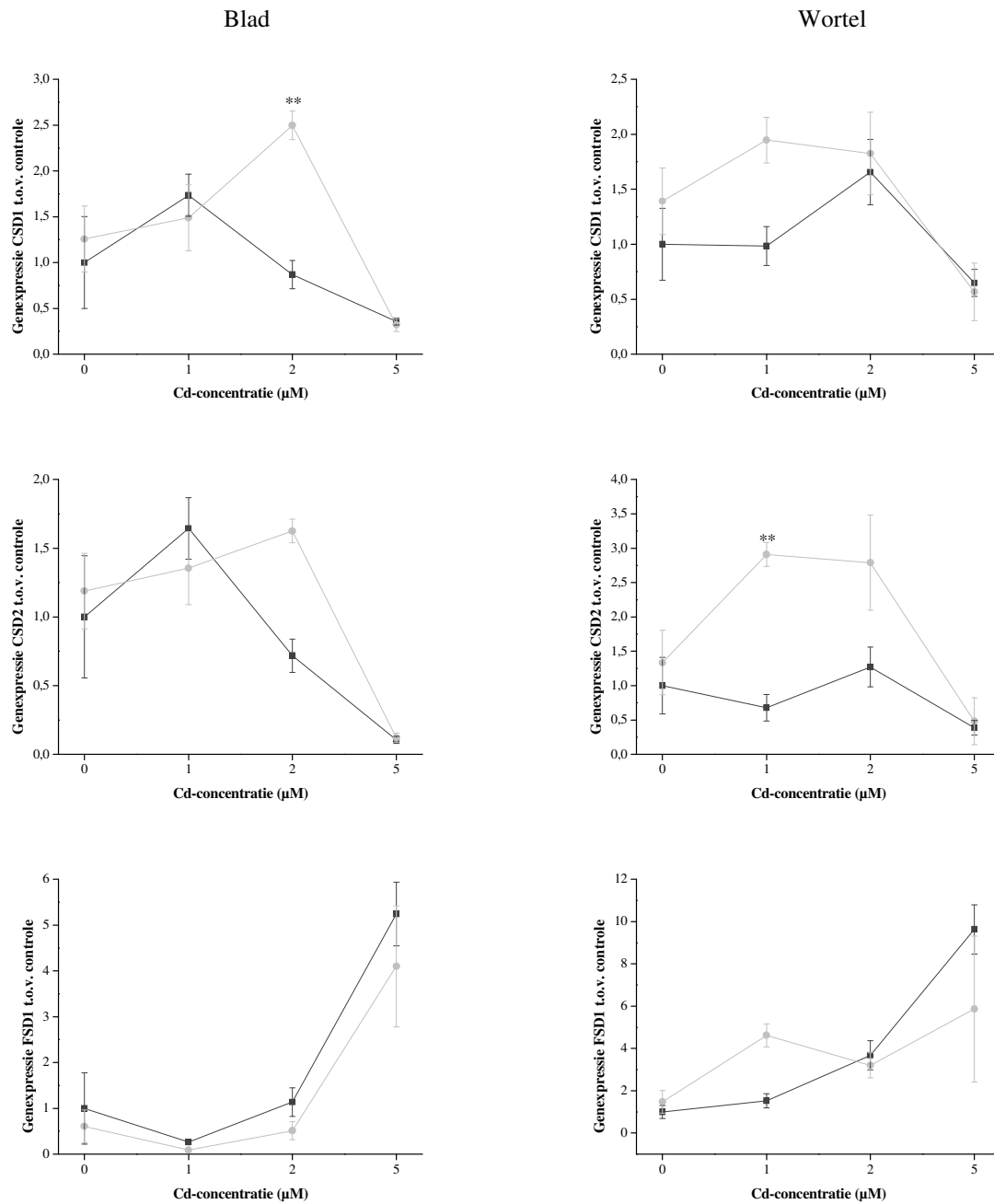
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,22 g

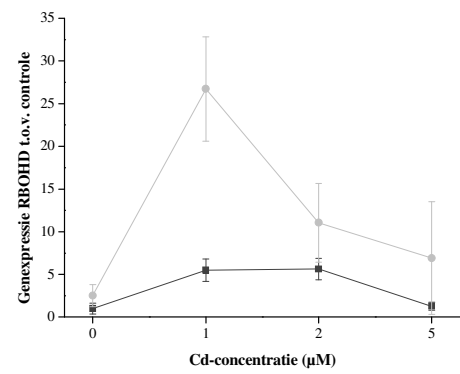
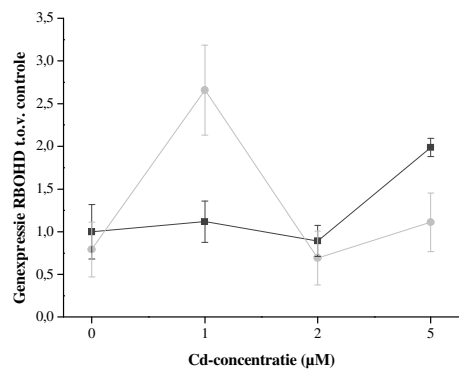
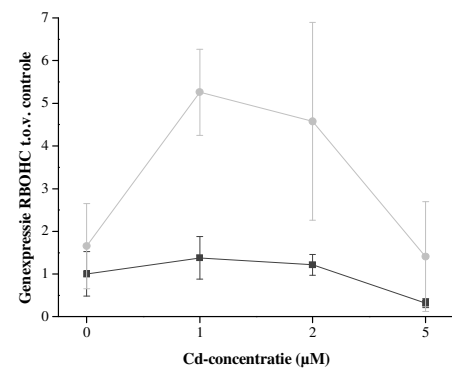
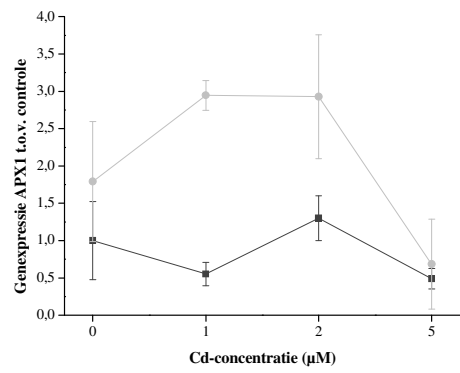
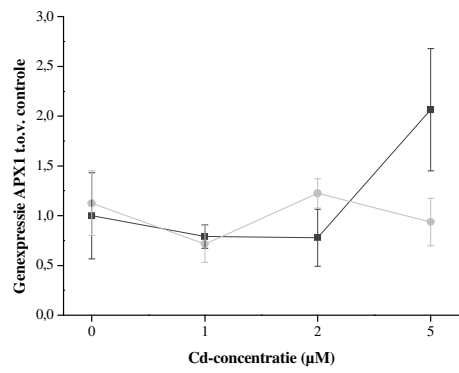
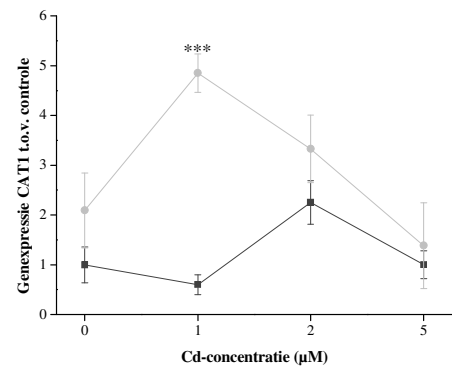
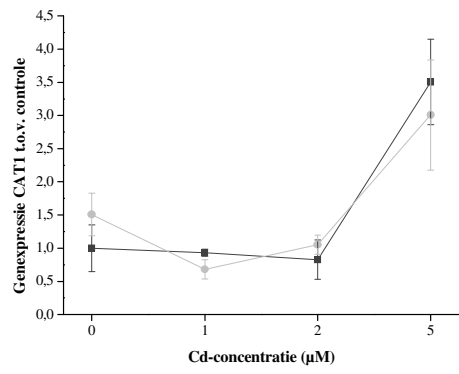
600 μl ijzer-EDTA

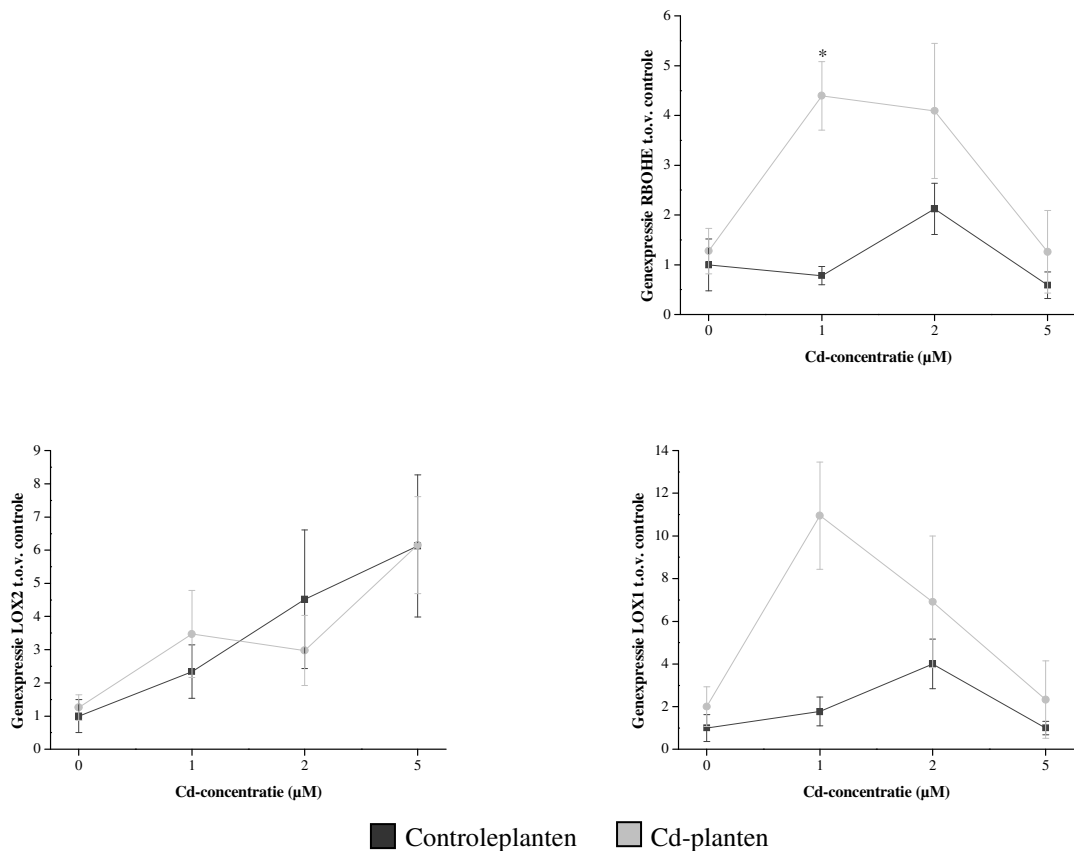
Per liter gedestilleerd water: EDTA.Na: 7,6 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5 g

Bijlage 4: resultaten van de genexpressie voor de optimalisatie van de Cd-concentratie in hydrocultuur







Figuur 4.1: resultaten van de genexpressie voor de optimalisatie van de Cd-concentratie in hydrocultuur (links: blad, rechts: wortel). Alle resultaten werden uitgedrukt t.o.v. de controleplanten bij 0 μM Cd. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ t.o.v. dezelfde Cd-concentratie bij de controleplanten.