

Woord vooraf

Deze studie zou niet mogelijk zijn geweest zonder de steun van tal van zeer behulpzame mensen rond mij. Eerst en vooral wil ik prof. dr. Jan Colpaert bedanken om mij een stageplaats te geven in het Centrum van Milieukunde aan de Universiteit van Hasselt. Daarnaast wil ik graag ing. Liesbet Pauls in het bijzonder bedanken voor haar steun niet enkel tijdens mijn stage, maar ook in de rest van mijn studieloopbaan. Graag wil ik ook drs. Laura Coninx in het bijzonder bedanken voor de geweldige begeleiding die ik heb gekregen van haar tijdens deze stage. Zonder haar dagelijkse hulp in het labo en haar uitmuntende feedback betreffende mijn scriptie was deze masterproef niet mogelijk geweest. Bovendien heeft zij en iedereen in het labo voor een zeer fijne atmosfeer gezorgd, waardoor ik graag elke dag op mijn stage arriveerde. Graag wil ik ook iedereen die geholpen heeft mij wegwijs in het labo te maken bedanken. Ook wil ik mijn vriendin, Sofie Joblin, in het bijzonder bedanken, voor de steun en liefde die ze mij gegeven heeft in de afgelopen drie jaar. Zij is er altijd geweest voor mij. Daarnaast wil ik ook graag mijn vrienden en familie bedanken voor hun steun tijdens mijn opleiding.

Inhoudsopgave

| | |
|---|----|
| Woord vooraf..... | 1 |
| Inhoudsopgave..... | 3 |
| Lijst van tabellen..... | 7 |
| Lijst van figuren..... | 9 |
| Abstract..... | 13 |
| Abstract in English..... | 15 |
| 1. Inleiding..... | 17 |
| 1.1 Situering..... | 17 |
| 1.2 Probleemstelling..... | 17 |
| 1.3 Doelstellingen..... | 19 |
| 1.3.1 Screening van de zinktolerantie en interne zinkconcentraties..... | 19 |
| 1.3.2 Karakterisering van het <i>SlZnT2</i> -gen..... | 19 |
| 2. Literatuurstudie..... | 21 |
| 2.1 Bodemvervuiling..... | 21 |
| 2.2 Fytoremediatie..... | 22 |
| 2.2.1 Fyto-extractie..... | 23 |
| 2.2.2 Fytovolatilisatie..... | 23 |
| 2.2.3 Rhizofiltratie..... | 23 |
| 2.2.4 Rhizodegradatie of fyto-stimulatie..... | 23 |
| 2.2.5 Fytostabilisatie..... | 24 |
| 2.3 Mycorrhizas..... | 25 |
| 2.4 Ectomycorrhizas..... | 26 |
| 2.4.1 Inleiding..... | 26 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4.2 | Mantel | 27 |
| 2.4.3 | Hartig net | 27 |
| 2.4.4 | Extraradicalair mycelium..... | 28 |
| 2.5 | Metaal toxiciteit en metaalhomeostase | 29 |
| 2.6 | Vorig onderzoek..... | 31 |
| 2.7 | ICP-OES..... | 32 |
| 2.8 | pYES-DEST52 vector | 33 |
| 3. | Materialen en methode | 35 |
| 3.1 | Opkweken van schimmelisolaten..... | 35 |
| 3.2 | EC50-waarde met dosis-respons experiment | 35 |
| 3.3 | Analyse van de interne Zn-concentraties | 35 |
| 3.4 | Statistische analyse | 36 |
| 3.5 | Gisttransformatie | 36 |
| 3.6 | RNA-extractie, verwijdering genomisch DNA en cDNA-synthese | 37 |
| 3.7 | Analyse promotorvarianten | 38 |
| 4. | Resultaten | 41 |
| 4.1 | Screening van de zinktolerantie en interne zinkconcentraties | 41 |
| 4.1.1 | EC50-waarde met dosis-respons experiment..... | 41 |
| 4.1.2 | Analyse van de interne Zn-concentraties | 43 |
| 4.2 | Karakterisering van het <i>SlZnT2</i> -gen | 48 |
| 4.2.1 | Gisttransformatie..... | 48 |
| 4.2.2 | Analyse promotorvarianten | 49 |
| 5. | Besluit..... | 57 |
| 6. | Toekomstvisie | 59 |
| | Bronnen..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Bijlagen..... | 65 |
| Bijlage A: Genomewalkingexperiment | 65 |
| Promotor 1..... | 65 |
| Promotor 2..... | 66 |
| Promotor 3..... | 68 |
| Bijlage B: EC50-waarden en absolute groei isolaten..... | 70 |
| Sensitieve isolaten..... | 70 |
| Mediumtolerante isolaten..... | 77 |
| Tolerante isolaten..... | 81 |
| Bijlage C: Overzicht van de gemeten metalen in de ICP-OES-analyse per isolaat | 86 |

Lijst van tabellen

| | |
|---|----|
| Tabel 1: Gegevens van de fabrikant (Euroscarf) van de gebruikte gisten (mutant en wild type)..... | 36 |
| Tabel 2: Parameters voor de PCR met cDNA..... | 38 |
| Tabel 3: Primers gebruikt in de PCR met cDNA. | 38 |
| Tabel 4: Overzicht van de primers voor de analyse van de kandidaat promotorvarianten. | 38 |
| Tabel 5: Parameters voor de PCR-reacties voor de analyse van de kandidaat promotorvarianten. | 39 |
| Tabel 6: Overzicht van promotorvarianten en isolaten waarin bevestigd werd dat deze varianten bij het gen horen. | 54 |

Lijst van figuren

| | |
|---|----|
| Figuur 1: Schematisch overzicht van de verschillende vormen van fyto remediatie..... | 22 |
| Figuur 2: Diagram van ECM in longitudale (1) en transversale (2) sectie voor de grootste levende groep van Gymnospermae (naaktzadigen), de coniferen, waartoe <i>P. sylvestris</i> behoort. | 27 |
| Figuur 3: Schematische voorstelling van cellulaire mechanismen mogelijk betrokken bij metaaltolerantie in ECM. | 30 |
| Figuur 4: Relatief expressieniveau van het <i>SlZnT1</i> -gen (a) en het <i>SlZnT2</i> -gen (b) voor tolerante (groen) en sensitieve (blauw) <i>S. luteus</i> isolaten na 48u blootstelling aan verschillende concentraties Zn (20, 200 en 1000 μ M)..... | 32 |
| Figuur 5: Overzicht van de elementen van de pYES-DEST52 vector. | 33 |
| Figuur 6: Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder..... | 40 |
| Figuur 7: Samengestelde grafiek van de procentuele groei van alle isolaten waarvan een EC50-waarde is kunnen bepaald worden..... | 42 |
| Figuur 8: Boxplots van Zn-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde.. | 44 |
| Figuur 9: Boxplots van Fe-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. | 44 |
| Figuur 10: Boxplots van Mn-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. | 45 |
| Figuur 11: Boxplots van Mg-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. | 45 |
| Figuur 12: Zn-concentraties in het mycelium..... | 46 |
| Figuur 13: Fe-concentraties in het mycelium. | 46 |
| Figuur 14: Mn-concentraties in het mycelium..... | 46 |
| Figuur 15: Mg-concentraties in het mycelium..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Figuur 16: Groei van getransformeerde gistmutant met SlZnT2 en empty vector en van getransformeerd wild type met empty vector op SC-URA medium met galactose en 0 mM Zn..... | 48 |
| Figuur 17: Groei van getransformeerde gistmutant met SlZnT2 en empty vector en van getransformeerd wild type met empty vector op SC-URA medium met galactose en 10 mM Zn. | 48 |
| Figuur 18: Resultaten van de PCR-reacties met cDNA van de gistcellen. | 49 |
| Figuur 19: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 1 met primerpaar P1PCR bij een annealingtemperatuur van 55°C. | 50 |
| Figuur 20: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 1 met primerpaar P1PCR2 bij een annealingtemperatuur van 55°C. | 50 |
| Figuur 21: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 1 met primerpaar P1PCR2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C. | 50 |
| Figuur 22: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2PCR bij een annealingtemperatuur van 55°C. | 51 |
| Figuur 23: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2PCR2 bij een annealingtemperatuur van 55°C. | 51 |
| Figuur 24: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2pair2bij een annealingtemperatuur van 55°C. | 51 |
| Figuur 25: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2pair2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C. | 51 |
| Figuur 26: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met P2pair3 bij een annealingtemperatuur van 55°C. | 52 |
| Figuur 27: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2pair3 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C. | 52 |
| Figuur 28: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3pair2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C. | 53 |

| | |
|--|----|
| Figuur 29: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3pair2 bij een annealingtemperatuur van 56.7°C. | 53 |
| Figuur 30: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3PCR bij een annealingtemperatuur van 56°C. | 53 |
| Figuur 31: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3PCR2 bij een annealingtemperatuur van 56°C. | 53 |
| Figuur 32: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3PCR2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C. | 53 |

Abstract

Het Centrum voor Milieukunde aan de Universiteit Hasselt bestudeert de ectomycorrhizaschimmel *Suillus luteus* voor de ontwikkeling van een fyto-stabilisatietoepassing. Zinktolerante ecotypes van *S. luteus* zijn immers geïsoleerd die in staat zijn om hun gastheerplant *Pinus sylvestris* op zink verontreinigde bodems te laten groeien. Om een fyto-stabilisatietoepassing uit te werken wordt het zinkexclusietolerantiemechanisme van *S. luteus* verder onderzocht.

Deze masterproef bestaat uit twee delen die dit onderzoek ondersteunen. Enerzijds worden isolaten van *S. luteus* gescreend op zinktolerantie en interne zinkconcentratie. Op basis van deze data worden isolaten voorgesteld om te selecteren voor DNA-resequencing. Anderzijds wordt het *SlZnT2*-gen, waarvan vorige data een rol in de zinktolerantie suggereren, verder bestudeerd.

De zinktolerantie wordt bepaald via een dosis-respons experiment en de interne zinkconcentraties met ICP-OES. Om het *SlZnT2*-gen verder te karakteriseren wordt een gistcomplementatie uitgevoerd en worden drie potentiële promotorsequenties van *SlZnT2* verder bestudeerd via PCR. Er wordt nagegaan of deze sequenties promotors van het gen zijn en wat hun distributie is in tolerante en sensitieve isolaten.

Van 16 isolaten zijn de EC50-waarden en interne zinkconcentraties bepaald. Het fenotype van de gist was niet succesvol hersteld, maar het gen kwam wel tot expressie in gist. Van twee promotorvarianten is vastgesteld dat deze bij het gen horen. Voor de overige promotorvariant moet de diversiteit verder onderzocht worden.

Abstract in English

The Centre of Environmental Sciences at the University of Hasselt studies the ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus* with the aim of developing of a phytostabilisation application. Zinc tolerant ecotypes of *S. luteus* that enable their host plant *Pinus sylvestris* to grow on zinc contaminated soils have been isolated. To develop a phytostabilisation application, the zinc exclusion tolerance mechanism of these *S. luteus* isolates will be further investigated.

This master's thesis consists of two parts that contribute to this research. On the one hand isolates of *S. luteus* will be screened for zinc tolerance and internal zinc concentrations. Based on these data isolates will be selected for DNA resequencing. On the other hand the *SlZnT2*-gene, which previous data suggest a role in the zinc tolerance, will be further studied.

The zinc tolerance will be determined by a dose-response experiment and the internal zinc concentrations with ICP-OES. To further characterize the *SlZnT2*-gene a yeast complementation will be conducted and three potential promoter sequences of *SlZnT2* will be studied further with PCR. Whether these sequences are promoters of the gene and what their distribution is in tolerant and sensitive isolates will be examined.

Of 16 isolates the EC50-values and internal zinc concentrations are determined. The phenotype of the yeast was not successfully restored, but the gene was being expressed in the yeast. Of two promoter variants it is determined that they are in fact promoters of the gene. For the remaining promoter variant the diversity has to be further investigated.

1. Inleiding

1.1 Situering

Dit onderzoek situeert zich binnen de onderzoeksgroep Milieubiologie in het Centrum voor Milieukunde (CMK), een onderzoeksinstituut verbonden aan de Universiteit Hasselt. Hier vindt onder andere onderzoek plaats betreffende fyto-remediatie, het gebruik van planten voor het verwijderen, afbreken of vastleggen van schadelijke stoffen uit bodems of water. [1] In de literatuurstudie die volgt wordt fyto-remediatie verder besproken.

Het onderzoek waar dit project deel van uitmaakt heeft als doel een fyto-stabilisatietoepassing te ontwikkelen met behulp van de schimmelsoort *Suillus luteus* (L. Fr.) Roussel. Dit is een ectomycorrhizaschimmel (ECM) die in symbiose leeft met *Pinus sylvestris* L. (Grove den) en deze boom kan gebruikt worden voor de fyto-stabilisatietoepassing. ECM zijn schimmels die een mutualistische relatie aangaan met de wortels van houtige planten. [2] [3] Binnen de onderzoeksgroep Milieubiologie in het CMK zijn er verschillende projecten die metaaltolerantiemechanismen (voor zink (Zn), koper (Cu) en cadmium (Cd)) in Suilloïde schimmels verder onderzoeken.

Gedurende de vorige eeuw vond in Noord-Limburg een aanzienlijke vervuiling van Zn en Cd plaats door Zn-smelters die Zn- en lood(Pb)ertsen verwerkten, waarin ook veel Cd aanwezig was. [4] [5] De biobeschikbare concentraties van deze metalen waren hoog genoeg om toxiciteit te veroorzaken waardoor er een selectiedruk voor metaaltolerantie heerste. Dit verklaart waarom in deze vervuilde gebieden vooral metaaltolerante stammen van *S. luteus* teruggevonden worden. [6] [7] [8] Fyto-remediatie, in dit geval fyto-stabilisatie, kan een geschikte techniek zijn voor de sanering van deze bodems. Hierbij wordt gebruik gemaakt van *P. sylvestris* die zoals aangehaald in symbiose leeft met *S. luteus*. Uit vorig onderzoek blijkt dat metaaltolerante Suilloïde schimmels hierbij een essentiële rol spelen. Ze beschermen namelijk de Grove den en bevoordelen deze ook in zijn groei. [9] [10] Het project focust zich op fundamentele onderzoeksvragen, om kennis te vergaren over het metaaltolerantiemechanisme, en op toegepast onderzoek voor de uitwerking van een fyto-stabilisatietoepassing.

1.2 Probleemstelling

In eerder onderzoek is al aangetoond dat fyto-stabilisatie met *P. Sylvestris*, geholpen door *S. luteus*, mogelijk is. [9] Om fyto-stabilisatie m.b.v. *S. luteus* verder te optimaliseren bestudeert doctoraatstudente Laura Coninx binnen het CMK een tolerantiemechanisme van *S. luteus* op basis van Zn-exclusie. [11]

Waarom nader wordt gekeken naar Zn-tolerantie en niet naar Cd-tolerantie heeft meerdere redenen. Om te beginnen is al aangetoond dat Cd-toxiciteit tegengewerkt wordt door een verhoogde Zn-concentratie. Deze tegenwerking komt waarschijnlijk voor omdat Cd dezelfde transportproteïnen kan gebruiken en dit heeft als oorzaak dat beide

elementen tot dezelfde groep in het periodiek systeem behoren en dus dezelfde bindingsplaatsen kunnen bezetten. [12] Dit samen met de ongeveer 20x hogere concentratie aan Zn dan Cd in de vervuilde bodems speelt een overtuigende factor om het Zn-tolerantiemechanisme te onderzoeken. [5] De hoge Zn-concentratie geeft nog een reden voor het onderzoek. Zn kan namelijk in competitie treden met andere metaaltransportproteïnen, zoals bijvoorbeeld met ijzer (Fe) en hierdoor kan deficiëntie van dit andere metaal optreden. [13]. Bij de lage Cd-concentraties gaat dit minder of niet voorkomen. Tot slot is de Zn-tolerantie in *S. luteus* al meer bestudeerd, zoals in de voorgaande doctoraatsthesisen. [13] [13] Aangezien Cd-tolerantie echter niet onbelangrijk is, richten andere onderzoekers binnen het CMK zich ook hierop. Dit omdat Cd zeer toxisch is voor planten, dieren en mensen. [14]

De probleemstelling van dit project valt binnen de doctoraatsthesis van Laura Coninx en omvat twee thema's essentieel voor dit onderzoek.

Als eerste gebeurt een screening van de **Zn-tolerantie** en **interne Zn-concentraties** van verschillende isolaten van *S. luteus* die in de afgelopen 30 jaar verzameld zijn in Noord-Limburg. Deze screening heeft meerdere redenen. Om te beginnen wilt men weten welke isolaten tolerant en welke sensitief zijn. Bovendien is het de bedoeling om de verschillende isolaten met elkaar te kunnen vergelijken en eventueel in te delen in verschillende fenotypes (bijvoorbeeld: sensitief, mild sensitief, mild tolerant, sterk tolerant). Daarnaast toonde vorig onderzoek aan dat er mogelijk nog een tweede, minder voorkomend tolerantiemechanisme in de populatie aanwezig is. Het grootste deel van de tolerante isolaten heeft een tolerantiemechanisme op basis van Zn-exclusie, maar een klein deel tolerante isolaten zijn gevonden die toch een significant grotere hoeveelheid interne Zn-concentraties hebben. (Op De Beeck Michiel, ongepubliceerd) De screening is dus nodig om schimmelisolaten te kiezen die het Zn-exclusiemechanisme hanteren, want dit is het mechanisme dat interessant is voor de fytostabilisatietoepassing. Als laatste moet ook een klein deel van de isolaten herscreend worden, aangezien deze al vele jaren in cultuur gehouden worden. Omdat ze op normaal medium (zonder Zn) in cultuur gehouden zijn, zijn ze hun fysiologische adaptatie verloren. Van deze moet nagegaan worden hoe tolerant ze zijn zonder hun fysiologische adaptatie. Ook worden schimmels uit niet vervuilde regio's in Noord-Limburg geanalyseerd en deze fungeren als controlegroep.

Ten tweede wordt het ***SIZnT2*-gen** verder gekarakteriseerd. Voorgaand onderzoek wijst erop dat dit gen een belangrijke rol speelt in de Zn-tolerantie, maar in dit onderzoek werd de functie van dit gen niet opgehelderd. [15] Dit onderzoek wordt nog verder besproken in de literatuurstudie die volgt.

1.3 Doelstellingen

1.3.1 Screening van de zinktolerantie en interne zinkconcentraties

In het eerste deel van dit project is het doel 28 schimmelisolaten te screenen op Zn-tolerantie en interne Zn-concentratie. Op basis van deze data worden een aantal isolaten geselecteerd voor DNA-resequencing.

Om deze doelstelling te behalen wordt van de gekozen isolaten, waaruit geselecteerd wordt, nagegaan hoe tolerant ze zijn door hun **EC50-waarde** (effect concentration) bij blootstelling aan Zn te analyseren. De EC50-waarde is deze Zn-concentratie in het medium waarbij een schimmelisolaat 50% minder biomassa produceerde t.o.v. de groei op standaard medium binnen een bepaalde tijdsspanne.

Daarna worden d.m.v. een zuurdigestie en een ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) analyse de **interne Zn-concentraties** bepaald om uit te sluiten dat isolaten mee in de screening zitten die tolerant zijn en niet over het exclusietolerantiemechanisme beschikken.

Uit de EC50-waarden en de interne Zn-concentraties wordt afgeleid welke isolaten het Zn-exclusiemechanisme hanteren. Hierna wordt geselecteerd van welke schimmels men het genoom wenst te resequencen.

1.3.2 Karakterisering van het *SlZnT2*-gen

Om het *SlZnT2*-gen verder te karakteriseren wordt getracht het fenotype van de Zn-sensitieve **Δ ZRC1 mutant** (*Saccharomyces cerevisiae*) **functioneel te complementeren**. Deze gist is zo gemuteerd dat hun *ZRC1*-gen, dat codeert voor een vacuolair Zn-transportproteïne, niet meer tot expressie komt. [15] Het *ZRC1*-gen in *S. cerevisiae* helpt zo mee in de Zn-homeostase door opbouw van te hoge Zn-concentraties in het cytoplasma te voorkomen door Zn naar de vacuole te transporteren. [16] Na de transformatie wordt gekeken of het fenotype hersteld is, of de mutant dus minder Zn-sensitief is.

Dat sommige isolaten meerdere kopieën van het gen hebben werd aangetoond in een vorige studie. In deze studie werd ook een kandidaat promotorvariant ontdekt. [15] Een vorig genomewalkingexperiment, uitgevoerd door Laura Coninx en terug te vinden in Bijlage A, leverde nog twee extra kandidaat promotorvarianten op. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Van deze **drie kandidaat promotorvarianten** wordt gevalideerd of ze effectief promotors van het gen zijn. Daarnaast wordt ook nagegaan hoe hun distributie in tolerante en sensitieve isolaten is.

2. Literatuurstudie

2.1 Bodemvervuiling

Vanaf de late 19^e eeuw tot midden jaren 70 zorgden pyrometallurgische bedrijven in de Kempen voor metaalcontaminatie. Deze bedrijven waren gevestigd te Lommel-Maatheide, Overpelt, Balen en Budel. [8] Metaalertsen van Zn en Pb, die ook Cd bevatte, werden hier verwerkt. Als gevolg hiervan werden grote hoeveelheden Zn, Pb en Cd uitgestoten door deze bedrijven en zijn deze metalen neergeslagen in de omgeving. Bovendien werden door de lozing van afvalwater in het oppervlaktewater ook de waterbodems vervuild en werden afvalproducten van de fabrieken later nog gebruikt in de spoor- en wegenbouw. Dit verspreidde de contaminatie nog verder en hierdoor raakte ongeveer 450 km² in de Kempen verontreinigd. Door uitloging van zware metalen zijn ook dieper gelegen bodemlagen en grondwaters aangetast. Sinds 1973 zijn deze pyrometallurgische processen vervangen door elektrochemische processen, waardoor de uitstoot verminderde. [5] Metaalionen vergaan echter niet in de natuur en deze contaminatie blijft dus nog altijd bestaan. Men spreekt dus van een historische vervuiling. [13]

Deze vervuiling van zware metalen in Noord-Limburg heeft zowel op het milieu als op de mens een nadelige impact. Uit studies blijkt dat in deze gebieden de mens een hoger risico heeft op longkanker, nierfunctiestoornissen en andere aandoeningen. [14] Ook de agrarische sector wordt door deze contaminatie aangetast. Zo kunnen op grote delen van deze gecontamineerde bodems planten niet meer groeien. Als ze wel kunnen groeien dan overschrijden geteelde voedselgewassen vaak de legale drempel voor Cd. [5] [14] Op de plaatsen waar planten nog groeien, wilt men als oplossing energiegewassen telen voor biobrandstof, waardoor de bodems nog economisch aanwendbaar blijven. [5] Waar planten niet meer groeien, wilt men met behulp van dit soort onderzoek voor een permanente begroening zorgen. Dit om tegen te werken dat de contaminant met stof of erosie verspreidt en om eventueel de bodems ook een economische waarde te geven. [5]

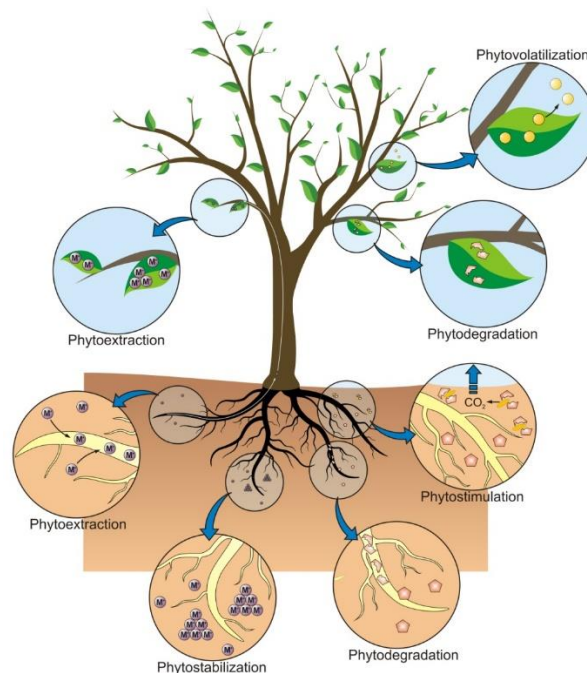
Conventionele saneringstechnieken zijn arbeidsintensief en duur en niet toepasbaar op een groot gecontamineerd gebied. [17] Deze technieken omvatten het weggraven van de bodem, gevolgd door een chemische of fysische behandeling en daarna het terugplaatsen van de grond. Daarboven zijn ze ook milieuonvriendelijk, aangezien deze technieken een nefaste impact hebben op de biologische activiteit in de bodem. Zo kunnen micro-organismen en planten minder goed of zelfs niet meer groeien na deze behandelingen. [14] [18] Als alternatief voor deze technieken wordt er gezocht naar een milieuvriendelijke, duurzame en kostenefficiënte aanpak waarbij deze bodems eventueel economisch aanwendbaar zijn. Fytoremediatie voldoet aan deze eisen en is dus een geschikte oplossing. [14] [17] [18] [19] [20] [21]

2.2 Fytoremediatie

Fytoremediatie omvat het gebruik van planten en hun geassocieerde micro-organismen voor de sanering van bodems en bodem- of oppervlaktewaters. [17] [19] [20] [21] De planten die gebruikt worden in fytoremediatie zijn best snel groeiend, competitief, robuust en tolerant voor de contaminant. Soms is het ook voordelig dat de plant een hoge biomassa kan leveren. [17]

Bij regeringen, industrieën en het grote publiek krijgen fytoremediatietechnieken een groeiende aandacht door een combinatie van de lage kostprijs van deze technieken en de gelimiteerde financiering beschikbaar voor milieusanering. Aangezien fytoremediatietechnieken, in tegenstelling tot conventionele saneringstechnieken, in-situ uitgevoerd kunnen worden, zijn deze gemiddeld tien keer goedkoper. [20] Ook voor de bevolking is fytoremediatie aantrekkelijk als een groene techniek, en dit maakt het weer interessanter voor regeringen.

Fytoremediatie kan onderverdeeld worden in een aantal subgroepen (Figuur 1). Deze worden kort besproken, met uitzondering van de subgroep fytostabilisatie, die in deze thesis van toepassing is en dus meer uitgebreid aan bod komt. Hierbij wordt vooral gekeken naar fytostabilisatie met betrekking tot metalen, aangezien de contaminanten in Noord-Limburg vooral Zn en Cd zijn.



Figuur 1: Schematisch overzicht van de verschillende vormen van fytoremediatie. [22] (P. Favas, J. Pratas, M. Varun, R. D'Souza en M. Paul, „Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora,” (2014))

2.2.1 Fyto-extractie

Bij fyto-extractie worden planten gebruikt om contaminanten uit de bodem te verwijderen en deze te transporteren naar plantenweefsel dat zich boven de grond bevindt. [17] [19] [20] [21] Fyto-extractie wordt meestal gebruikt voor metalen en andere anorganische contaminanten (seleen (Se), arseen (As), radionucliden). [20] Plantenmateriaal wordt geoogst en op deze wijze wordt de contaminatie verwijderd. Daarom is het belangrijk dat de plant zeer efficiënt de contaminant in biomassa kan accumuleren en gemakkelijk te oogsten is. [19] Afhankelijk van de grootte en aard van de contaminatie kan het geoogste materiaal gebruikt worden in hout-, papier- of andere industrieën. Na herhaaldelijk oogsten vermindert het niveau van contaminatie in de bodem. [17] Een optie bij metalen is het verbranden van het geoogste materiaal en daarna de metalen recycleren. Dit wordt fytomijnen genoemd. [19] [20] Wanneer de plant door zijn eigen enzymen de contaminant afbreekt noemt men dit fytodegradatie of fytotransformatie. Dit wordt toegepast bij organische contaminanten. [1] [19] [20]

2.2.2 Fytovolatilisatie

Fytovolatilisatie is het proces waarbij planten contaminanten uit de bodem opnemen, waarna ze deze omzetten en terug vrijzetten in de atmosfeer in volatiele vorm. [17] [20] [21] Hierbij is het niet nodig om plantmateriaal te oogsten, aangezien de contaminant de site als gas verlaat. [20] Een nadeel echter is de mogelijkheid dat de volatiele vorm neerslaat in meren en oceanen, waar het omgezet kan worden in dezelfde of een andere toxische verbinding. [17] Daarom is het belangrijk om op voorhand de techniek goed uit te werken. Wanneer de volatiele vorm nog altijd toxisch is, moet hier nog een veiligheidsanalyse op toegepast worden. [20] Se, As en kwik (Hg) en een aantal volatiele organische stoffen (VOS) kunnen onderworpen worden aan deze techniek. [20]

2.2.3 Rhizofiltratie

Wanneer planten gebruikt worden in een watercultuur of moerasfilter (helofytenfilter) heet dit rhizofiltratie. De planten nemen contaminanten uit het water op in de wortels en filtreren zo het water. [17] [20] [21] De techniek is al toegepast op een waaier van anorganische contaminanten zoals metalen, Se, cyanide en nitraat, alsook op een aantal organische verbindingen zoals explosieven en herbiciden. [17] [20]

2.2.4 Rhizodegradatie of fytostimulatie

Planten kunnen de biodegradatie van organische componenten door micro-organismen in de rhizosfeer positief beïnvloeden. [1] [20] Dit heet rhizodegradatie of fytostimulatie. [20] De rhizosfeer is de zone rond de wortels van de plant die zich ongeveer 1 mm uitstrekt. Planten scheiden organische stoffen af die micro-organismen als koolstofbron kunnen gebruiken. Hierdoor komen er 1-4 keer meer micro-organismen voor in deze zone, het algemene rhizosfeereffect. [20] De micro-organismen helpen de planten op hun beurt door (1) wortelgroei te bevorderen, (2) water en mineraalopname te verhogen en (3) de inhibitie van pathogene micro-organismen. [20] Planten kunnen dit degradatieproces

stimuleren door specifieke componenten uit te scheiden. Deze componenten kunnen genen in het micro-organisme induceren of ze kunnen als cometaboliet optreden. Beide bevorderen de degradatie. [20]

2.2.5 Fytostabilisatie

Tot slot worden planten en hun geassocieerde micro-organismen bij fytostabilisatie gebruikt om de biobeschikbaarheid of mobiliteit van contaminanten, vooral metalen, in de bodem te verminderen. [17] [19] [20] [21] De planten hebben een drievoudige functie. De eerste functie is het verminderen van de hoeveelheid water dat door de gecontamineerde bodem sijpelt, wat een schadelijk percolaat kan vormen. [17] [19] Bomen zorgen zo voor een opwaartse stroom zodat contaminanten niet verder de bodem in dringen. [20] Ten tweede treden de planten op als een barrière om direct contact met de gecontamineerde bodem te vermijden. [17] Tot slot wordt ook erosie vermeden zodat de contaminant niet naar andere gebieden kan verspreiden. [17] [19] [20] Fytostabilisatie hanteert hierbij sorptie, precipitatie, complexatie of reductie van de metaalvalentie. [17] Een voordeel van deze techniek is dat er geen biomassa moet geoogst en vernietigd worden. [17] Ook is het effectief wanneer snelle immobilisatie nodig is om grond- en oppervlaktewaters te beschermen. [17] Een combinatie van bomen en grassen kan hiervoor gebruikt worden. De bomen zorgen voor een opwaartse stroom en de grassen vermijden winderosie. [17]

De biobeschikbaarheid van de contaminant is belangrijk voor de remediatie. Factoren die hierop inspelen zijn de chemische eigenschappen van de contaminant, bodemeigenschappen, milieuomstandigheden en biologische activiteit. [20] Bodems met kleinere deeltjesgrootte hebben meer water en bindingsplaatsen voor ionen, vooral kationen. [20] Kationen in de bodem worden gewisseld met de bodemoplossing volgens de kationenuitwisselingscapaciteit (cation exchange capacity CEC). CEC heeft een positieve correlatie met de hoeveelheid humus in de bodem, aangezien humus bestaat uit dood plantenmateriaal en plantencelwanden hebben negatief geladen groepen. [20]

Anorganische componenten, zoals Zn en Cd, zijn meestal aanwezig als ionen, in dit geval kationen. De biobeschikbaarheid ervan staat in relatie met de CEC en bij lagere pH stijgt de biobeschikbaarheid omdat de kationen vervangen worden door protonen (H^+). [20] De pH van de bodem kan aangepast worden door amendementen toe te voegen om zo de biobeschikbaarheid hiervan te wijzigen. Door zuren toe te voegen daalt de pH en worden kationen meer beschikbaar. Kalksteen toevoegen verhoogt de pH dan weer, waardoor kationen minder beschikbaar zijn. [20] Belangrijk hierbij is de invloed van deze amendementen te onderzoeken in controlesites, aangezien ze een negatieve invloed kunnen hebben zoals matrixeffecten (zeolieten met een hoog natriumgehalte die de bodemstructuur vernietigen) of immobilisatie van essentiële nutriënten zoals mangaan (Mn) of magnesium (Mg). [19]

De biobeschikbaarheid wordt ook bepaald door redoxcondities. In terrestrische gronden komen ze meestal in hun meest geoxideerde vorm voor en in aquatische gebieden eerder in de meest gereduceerde vorm. [20] Dit kan ook de toxiciteit beïnvloeden. [20]

Watertoevoer kan geoptimaliseerd worden om contaminantmigratie te bevoordelen maar tegelijk uitloging en afvloeiing te voorkomen. [20]

Anorganische componenten, zoals Zn en Cd, kunnen niet gedegradeerd worden, maar wel gestabiliseerd worden door de plant. Allerhande bodems, zoals industriële sites, mijnsites en landbouwgronden, alsook rioolwaters, drainagewaters vanuit de land- en mijnbouw en industriële afvalwaters, die gecontamineerd zijn met deze metalen kunnen zo behandeld worden. [20]

Micro-organismen die in de rhizosfeer van deze planten leven spelen een belangrijke rol omdat ze de plant kunnen helpen in het overwinnen van de fytotoxiciteit. [19]

In het onderzoek naar een fytostabilisatietoepassing waar dit project deel van uitmaakt wordt gebruik gemaakt van *Pinus sylvestris* L. (Grove den). Deze boom kan in een symbiotische relatie leven met de ectomycorrhiza (ECM) schimmel *S. luteus*. Beide organismen zijn inheems aan de vervuilde sites in Noord-Limburg wat gunstig is voor hun gebruik in een fytostabilisatietoepassing, aangezien de soorten competitief zijn in de lokale condities en de contaminant kunnen tolereren. [20] De Grove den zorgt voor de fytostabilisatie, maar uit vorig onderzoek is gebleken dat niet de Grove den zelf, maar de Suilloïde schimmels, waarmee deze een mutualistische relatie kan aangaan, tolerant zijn voor Zn. [8] [9] [10] In vorig onderzoek werden Grove dennen geïnoculeerd met sensitieve en tolerante isolaten van *Suillus bovinus*, een zustersoort nauwverwant aan *S. luteus*, en blootgesteld aan 150 µM Zn. De sensitieve isolaten hadden moeilijkheden om te ontwikkelen. De verminderde groeistimulatie zorgde voor een significante vermindering in de concentratie van nutriënten in de Grove den, waardoor deze slechter groeide. De tolerante isolaten hadden minder moeilijkheden en zorgden zo voor een significante verbetering in de opname van nutriënten van de Grove den, wat voor een verbeterde groei zorgde. In dit onderzoek werd een hogere concentratie van Zn in naalden gevonden bij dennen geïnoculeerd met sensitieve isolaten, maar geen significante verschillen. Hier werd aangehaald dat conclusies over metaalconcentraties in bladweefsel met voorzichtigheid behandeld moeten worden, aangezien hier een complex mechanisme voor instaat. Dit onderzoek toonde aan dat een genetische adaptatie voor Zn-tolerantie in Suilloïde schimmels nodig is voor de normale ontwikkeling van de schimmel en om een normaal niveau van nutriëntenverwerving te onderhouden voor hun gastheer in bodems vervuild met Zn. [10]

2.3 Mycorrhizas

Veel micro-organismen in de bodem gaan een symbiotische relatie aan met een gastheerplant en beïnvloeden zo de prestaties van de plant. De meest voorkomende van

deze micro-organismen zijn bodemschimmels, de mycorrhizas, die een wederzijdse wortel-schimmel associatie vormen. [2] [3] De mycorrhizas worden onderverdeeld in ecto- en endomycorrhizas. ECM vormen een mantel en een Hartig net van intercellulair hyfen (schimmeldraad) op de wortels van voornamelijk houtige planten. [2] [3] Endomycorrhizas daarentegen worden gekarakteriseerd door de penetratie van wortelcellen door hyfen van de schimmel. Omdat de ontwikkeling van de intracellulaire hyfen zeer divers is wordt de groep van endomycorrhiza verder onderverdeeld in arbusculaire, ericoïde, arbutoïde, monotropoïde, orchidee- en ectendomycorrhizas. [2] De mycorrhizaschimmel waarmee in deze thesis gewerkt wordt, *S. luteus*, valt onder de ECM en deze soort wordt daarom verder in detail bekeken.

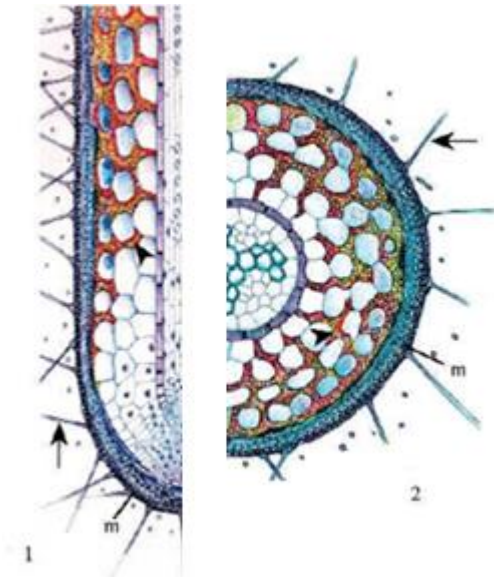
2.4 Ectomycorrhizas

2.4.1 Inleiding

De ECM worden gekenmerkt door drie eigenschappen: (1) de vorming van een mantel van hyfen die een grote portie van laterale wortels gaat bedekken, (2) de ontwikkeling van hyfen tussen de wortelcellen die een complexe hoog vertakte structuur vormen genaamd het Hartig net en (3) hyfen die vanuit de mantel in de omgevende grond groeien, het extraradicalair mycelium. [2] [3] Sommige ECM vormen in het extraradicalair mycelium ook lineaire aggregaten van hyfen, die rhizomorfen worden genoemd. Deze structuren zijn gespecialiseerd in het snelle transport van water en nutriënten.

Het grootste deel van de ECM, ook *S. luteus*, vallen onder de basidiomyceten. De rest zijn ascomyceten of zygomyceten. Ongeveer 80% zijn epigeen met voortplantingsstructuren die bovengronds voorkomen. De rest zijn hypogeen en vormen deze structuren dus ondergronds. Sommige van deze schimmels kunnen met veel planten een symbiotische relatie aangaan, terwijl anderen gespecialiseerd zijn in een bepaalde gastheer. [2]

In de volgende stukken wordt een kort overzicht gegeven van de verschillende structuren van een ECM schimmel: de mantel, het Hartig net en het extraradicalair mycelium. Deze structuren worden weergegeven in Figuur 2. Hierbij wordt gekeken naar hun ontwikkeling, kenmerken en functies.



Figuur 2: Diagram van ECM in longitudinale (1) en transversale (2) sectie voor de grootste levende groep van Gymnospermae (naaktzadigen), de coniferen, waartoe *P. sylvestris* behoort. Te zien is een mantel (m), het Hartig net (pijlpunten) en extraradicalair mycelium (pijlen). Hier is te zien dat het Hartig net bij coniferen kan doordringen tot de corticale cellen. (R. Larry Peterson, et al, Mycorrhizas, Anatomy and Cell Biology, 2004)

2.4.2 Mantel

De mantel komt in contact met zowel de wortels, de zogenaamde binnenste mantel, als met de bodem, de zogenaamde buitenste mantel. De mantel kan zo interageren met de wortelharen, het wortelmutsje of de epidermale plantcellen. [2] Wortelharen reageren in sommige gevallen door het aanmaken van dikkere celwanden. [2]

In de meeste gevallen komen hyfen eerst in contact met het wortelmutsje of de epidermale plantcellen. Na contact met de wortelcellen vertakken de hyfen sterk, om zo de oppervlakte voor nutriëntuitwisseling te vergroten. Hyfen breiden uit en wortelharen en oude cellen van het wortelmutsje worden in de mantel geïncorporeerd. [2] [3] Het worteloppervlak kan bedekt worden met losse of compacte hyfen. [2]

De hoge vertakkingsgraad van de binnenste mantel wijst erop dat ook deze structuur betrokken is bij de bidirectionale beweging van nutriënten, alhoewel deze functie voornamelijk door het Hartig net wordt uitgeoefend. Zo worden glucose en/of fructose, afkomstig van de plant, geabsorbeerd door de schimmel en daarna omgezet in andere nuttige koolwaterstoffen. De mantel slaat deze en andere stoffen zoals vetten, proteïnen, fenolen en polyfosfaten voor korte of lange tijd op. [2] Compacte hyfen kunnen de gastheerplant ook beschermen tegen waterverlies, pathogenen en contaminanten. [2]

2.4.3 Hartig net

Het Hartig net vormt zich uit hyfen van de binnenste mantel en groeit tussen de wortelcellen om zo een complexe nutriëntuitwisselingsinterfase te vertegenwoordigen. Bij coniferen ontwikkeld het Hartig net rond zowel epidermale als corticale plantcellen en

neemt het vaak het grootste volume van de cortex in. [2] [3] De mechanische intrusie van hyfen tussen epidermale en corticale plantcellen wordt geholpen door het conisch karakter van de toppen. [2] De intrusie kan ook geholpen worden door de secretie van hydrolytische enzymen. [2] [3] De intercellulaire connecties van wortelcellen kunnen hierbij verloren gaan. Het voornaamste kenmerk van het Hartig net is de complexiteit van de vertakkingen. Hierbij worden tubulaire hyfen vervangen door een hoog vertakte manier van groei, waardoor de oppervlakte voor nutriëntuitwisseling wordt vergroot. [2] [3] Het cytoplasma van deze structuren heeft vaak meer organellen, wat wijst op een verhoogde metabole activiteit. [2]

De nutriëntuitwisseling wordt vooral uitgevoerd door het Hartig net. Zo worden de meeste suikers, afkomstig van de plant, in het Hartig net opgenomen en de meeste nutriënten en water, afkomstig van de schimmel, afgegeven aan de wortelcellen. [2]

2.4.4 Extraradicalair mycelium

Het extraradicalair mycelium groeit uit de buitenste mantel en vormt een uitgebreid netwerk van hyfen. [2] [3] Dit netwerk vormt verbindingen tussen wortels van dezelfde plant of tussen wortels van verschillende planten. [2] Bij de ontwikkeling kunnen hyfen groeien rond bodemdeeltjes en deze zelfs insluiten. Ze kunnen ook rond en in bacteriekolonies, uitwerpselen van aardwormen, stuifmeel, organisch afval en soms zelfs rotsen groeien. [2]

Bij de meeste ECM kunnen hyfen in complexe lineaire structuren, genaamd rhizomorfen, groeien. Deze bestaan uit een variabel aantal individuele hyfen die onderling verbonden zijn door verschillende mechanismen. [2] [3] Een centraal vergroot hyfe bestaat bij meer complexe rhizomorfen en laat snel transport van water en nutriënten toe. [2] De buitenste hyfen van de rhizomorf kunnen verdikte, gepigmenteerde wanden hebben voor structurele ondersteuning of tegen verlies van water. [2] [3]

Uit het extraradicalair mycelium wordt ook het vruchtlichaam, de paddenstoel, gevormd. Dit impliceert het lokaal vertakken van extraradicalaire hyfen, de organisatie van deze hyfen tot discrete structuren en de differentiatie van de verschillende zones. Verschillende mechanismen worden gehanteerd voor de verspreiding van de sporen die gevormd worden in het vruchtlichaam. [2]

Het extraradicalair mycelium staat in voor de mobilisatie, absorptie en translocatie van minerale nutriënten en water van de bodem naar de plantwortels. [2] [3] Als rhizomorfen aanwezig zijn, sturen fijne hyfen water en nutriënten naar deze structuren voor een snelle translocatie door de centrale hyfen. [2] Koolstofverbindingen verkregen van de plant gaan in de andere richting, voor energie- en groeidoelinden. [2]

2.5 Metaal toxiciteit en metaalhomeostase

Metaal toxiciteit wordt in dit deel kort besproken omdat bepaalde *S. luteus* isolaten tolerantie hebben ontwikkeld voor Zn en Cd. Daarna worden de verschillende homeostasemechanismen die ECM kunnen hanteren om zichzelf te beschermen aangehaald.

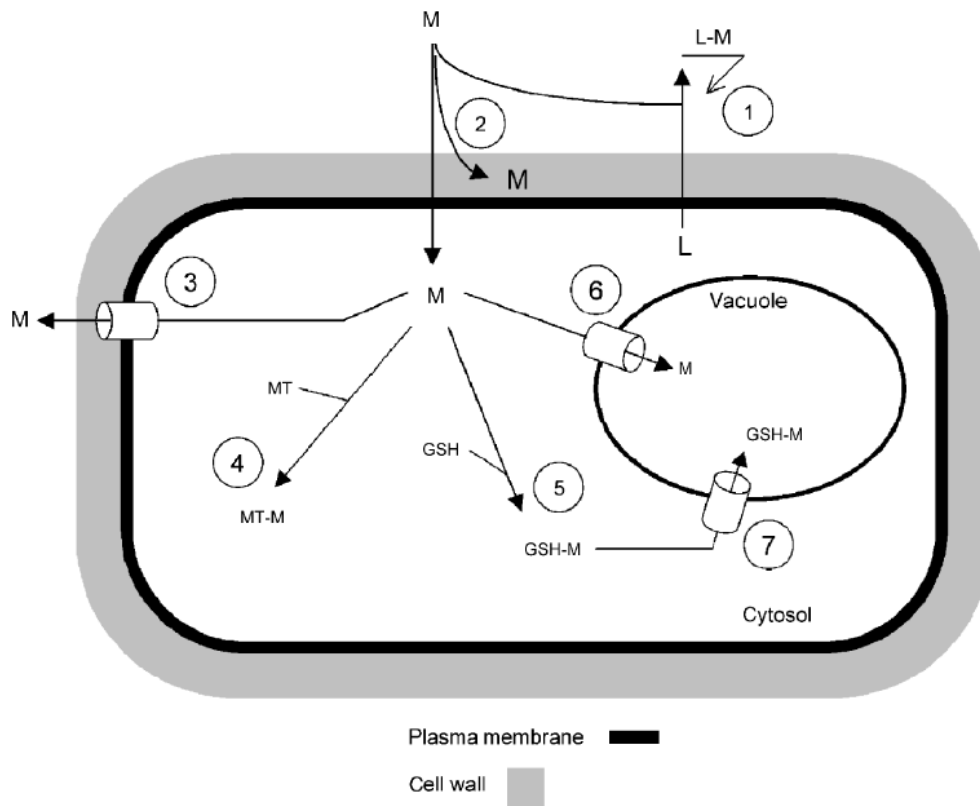
Voor organismen bestaan twee groepen metalen. De eerste soort zijn metalen die niet nodig zijn voor de normale groei en herstel van een organisme en worden niet-essentiële nutriënten genoemd. Voorbeelden hiervan zijn Pb, Cd, arseen (As), Hg, enz. Deze zijn toxisch bij zeer lage concentraties. De tweede soort zijn deze die nodig zijn voor de groei en herstel van cellen. Cofactoren van enzymen of structurele componenten van celwanden, celorganellen of membranen zijn voorbeelden van functies van deze metalen. Deze metalen worden essentiële nutriënten genoemd en hun concentraties in de cel worden strikt gereguleerd. Als de concentraties van deze metalen echter te groot worden, dan zijn ze toxisch. Voorbeelden van deze metalen zijn Zn, Mg, Mn, ijzer (Fe), koper (Cu), enz. [13] [23]

Toxische concentraties van metalen kunnen direct of indirect schade in de cel veroorzaken. Metalen kunnen toxisch zijn door het direct binden aan proteïnen. Deze proteïnen geraken zo geïnhibeerd of gedenatureerd en de metalen zorgen ook voor oxidatieve stress. [13] [23] [24] Deze oxidatieve stress komt voort uit de verwekking van reactieve oxygen species (ROS). Deze worden direct gevormd uit de Haber-Weiss reacties of indirect door de interactie met het antioxidantsysteem en het verstoren van het elektrontransportsysteem, het binden aan proteïnen, enz. [13] [23] [24] Metaalionen die in overvloed voorkomen kunnen ook essentiële metalen vervangen en zo deficiëntie veroorzaken. [13] Dit werd vastgesteld in vorig onderzoek, waar lagere concentraties voor Mn en Fe werden waargenomen bij Zn-sensitieve isolaten van *S. luteus* die blootgesteld werden aan 1000 μM Zn. [15] Hier heeft Zn in competitie getreden met Mn en Fe voor bindingsplaatsen van transportproteïnen die normaal deze laatste in de cel verplaatsen.

Toxische concentraties van metalen leiden dus tot cellulaire stress. Dit kan op zijn beurt leiden tot een vermindering in het welzijn van het organisme. Als er daadwerkelijk een daling is in de fecunditeit, de potentiële reproductieve capaciteit, dan is dit organisme benadeeld ten opzichte van andere individuen van dezelfde soort en wordt tegen het genotype van dit organisme geselecteerd. Deze metaal geïnduceerde selectiedruk werkt ook op individuen van een gemeenschap die de capaciteit hebben om zich aan te passen aan deze toxische omgevingen. Zij zijn dus bevoordeeld en er wordt voor hun genotype geselecteerd. [13] Dit is zeker te zien bij *S. luteus* waarbij meer tolerante isolaten gevonden worden op metaalvervuilde gebieden dan op de controle gebieden. [6] [7] [13]

Een overzicht van de beschermingsmechanismen is te zien in Figuur 3. Een ECM schimmel kan als eerste beschermingsmechanisme organische zuren, zoals oxaalzuur,

secretieren om metaalionen extracellulair af te zonder en te laten neerslaan. [25] Vele secreties verhogen echter de beschikbaarheid van metalen en dit is dus geen voor de hand liggend mechanisme. [26] De celwand en het celmembraan kunnen ook de accumulatie van metaalionen in het cytoplasma voorkomen. Deze structuren bezitten negatieve ladingen op proteïnen en polysachariden en kunnen zo veel metaalionen binden. Dit wordt biosorptie genoemd. [25] Wanneer de toxische metalen toch in de cel geraken, dan kan de ECM zich beschermen met transportproteïnen. Deze kunnen een verhoogde efflux veroorzaken wat de opbouw van hoge intracellulaire concentraties vermijdt. [25] [24] Als echter te veel ionen in de cel geraken, dan moeten deze afgezonderd worden. Hierbij spelen metallothioneïnen, glutathione en fytochelatines een belangrijke rol. Metaal-ligand complexen kunnen hierna intracellulair in vacuolen opgeslagen worden. [25] [24] Wanneer toch schade aan de cel wordt toegebracht, proberen herstelmechanismen dit tegen te gaan. Heat shock proteïnen worden hier bijvoorbeeld opgereguleerd. Superoxidase dismutasen, ascorbaat, glutathion, peroxidasen en katalasen helpen met het herstellen van de redoxbalans. [27]



Figuur 3: Schematische voorstelling van cellulaire mechanismen mogelijk betrokken bij metaaltolerantie in ECM. M, metaalion; 1) extracellulaire chelatie door uitgescheiden liganden (L); 2) celwandbinding; 3) verhoogde efflux; 4) intracellulaire chelatie door metallothioneïnen (MT); 5) intracellulaire chelatie door glutathione (GSH); 6) subcellulaire compartimentering; 7) vacuolaire compartimentering van GSH-M-complex. (M. Bellion, et al, Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi, 2006)

2.6 Vorig onderzoek

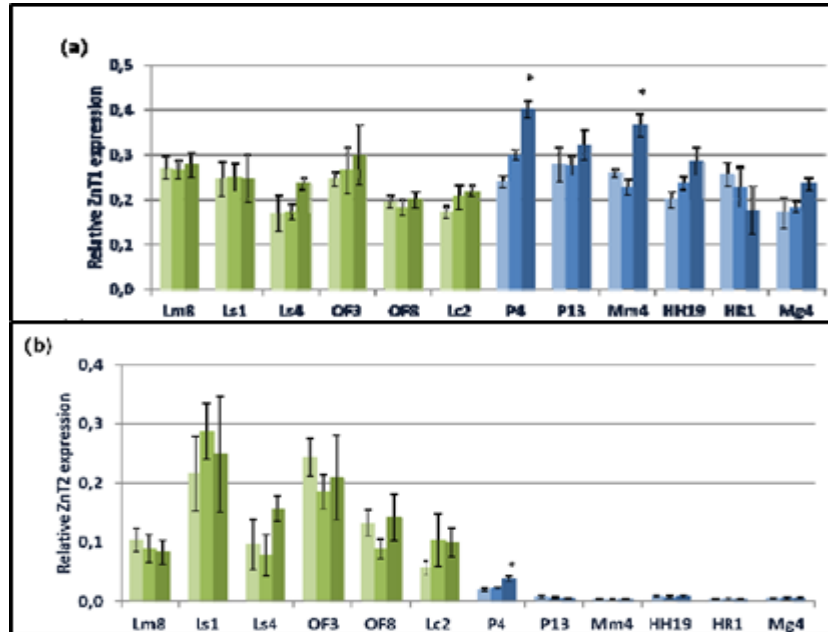
Nieuwe genotypen worden constant in de natuur gevormd door willekeurige mutaties en genetische recombinatie bij soorten met seksuele voortplanting. Zo worden individuen die metaaltolerant zijn met lage frequentie gevonden. Dit is ook voor *S. luteus* het geval, zoals blijkt uit onderzoek waarbij isolaten werden vergeleken uit metaalvervuilde sites en controlesites. [7] [13] [28] Hier werd ook een gradiënt vastgesteld die met de metaalvervuiling overeen kwam. [13] [28]

Bij metaal geïnduceerde selectiedruk hebben bepaalde genotypen van een organisme een evolutionair voordeel. Deze komen daarom frequenter in vervuilde gebieden voor. Wanneer deze genetische adaptatie frequent voorkomt in de natuur spreekt men van een nieuw ecotype. Enkel wanneer er een significant verschil is tussen ecotypes van een soort met betrekking tot metaaltolerantie spreekt men van adaptieve metaaltolerantie. [13] Enkel een paar mycorrhizaschimmels met een echte adaptieve metaaltolerantie zijn gerapporteerd, waaronder *S. luteus*. [8] [28]

Onderzoek wijst op een metaaltolerantiemechanisme op basis van efflux van *S. luteus* voor Zn. Men zag hier dat bij langere blootstelling (10-14 dagen) aan hoge concentraties Zn de tolerante isolaten minder Zn accumuleerden dan de sensitieve. [8] [13] [29]

Ander onderzoek identificeerde twee genen in *S. luteus* isolaten die codeerde voor twee transportproteïnen, *SlZnT1* en *SlZnT2*, behorende tot de CDF (cation diffusion facilitator) familie. [15] CDF transportproteïnen spelen een belangrijke rol in de Zn-homeostase van eukaryoten. Ze verwijderen Zn uit het cytosol en spelen daarom een belangrijke rol in het voorkomen van Zn toxiciteit. CDF transporters worden gekarakteriseerd door zes transmembranaire delen en een histidine-rijk motief (HX)_n in de cytosolische lus tussen transmembranaire helix IV en V. Voor de meeste CDF proteïnen ligt dit histidine-rijk deel vlak achter helix IV en heeft het drie tot zes HX herhalingen. [15] [30] Dit voorgaand onderzoek toonde aan dat *SlZnT1* 6 transmembranaire delen en drie HX herhalingen heeft en zo een standaard CDF proteïne is. Het onderzoek toonde ook aan dat *SlZnT2* echter 2 HX domeinen heeft, het eerste achter helix IV met zeven herhalingen en het tweede vlak voor helix V met vijf herhalingen. Ook werd bevestigd dat beide proteïnen een specifiek kenmerk hebben voor de groep van Zn transporterende CDF proteïnen, een HXXXD motief in de transmembranaire helices II en V. In dit onderzoek toonde een homologie vergelijking dat *SlZnT1* en *SlZnT2* overeenkwamen met *ZRC1* van *S. cerevisiae* en *GintZnT1* van *Rhizophagus intraradices*, respectievelijk. *ZRC1* is een Zn transportproteïne dat Zn naar de vacuole pompt. Van *GintZnT1* is de metaal specificiteit en lokalisatie niet geweten. Dit onderzoek bevestigde dat ook *SlZnT1* een transportproteïne voor Zn naar de vacuole is, maar de functie van *SlZnT2* werd niet opgehelderd. Wel werd bevestigd dat een significant verschil bestaat in het expressieniveau van *SlZnT2* tussen tolerante en sensitieve isolaten, waarbij deze bij tolerante vaker tot expressie kwam (Figuur 4 b). Dit kan geassocieerd worden met adaptieve metaaltolerantie. Voor *SlZnT1* werd geen

verschil in expressieniveau waargenomen (Figuur 4 a) en dit gen zorgt ook niet voor een efflux. Ook werd vastgesteld, door vergelijking met ander onderzoek [8], dat voor de tolerante isolaten met een hoger expressieniveau van *SlZnT2* minder Zn geaccumuleerd werd in de cel. Dit transportproteïne kan dus een rol spelen in het effluxmechanisme. Daarnaast werd aangetoond dat de tolerante isolaten meerdere genkopieën (twee tot zeven) hebben van het *SlZnT2*-gen en dat sensitieve isolaten maar één hebben. Bovendien toonde dit onderzoek aan dat sensitieve en tolerante isolaten een verschillende promotorsequentie hebben voor dit gen. [15]



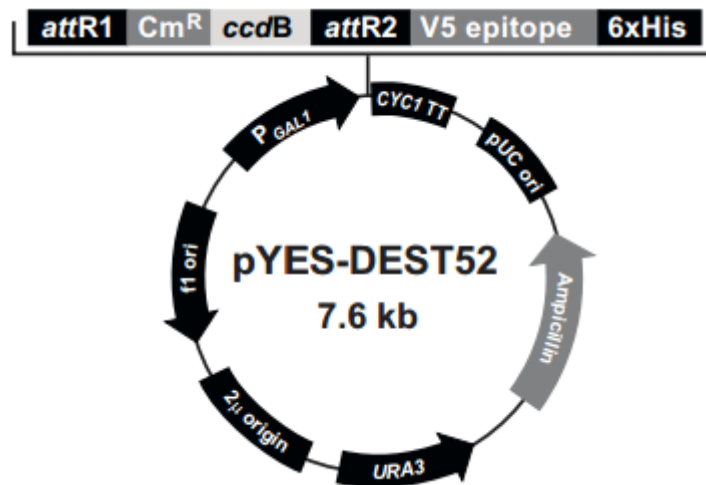
Figuur 4: Relatief expressieniveau van het *SlZnT1*-gen (a) en het *SlZnT2*-gen (b) voor tolerante (groen) en sensitieve (blauw) *S. luteus* isolaten na 48u blootstelling aan verschillende concentraties Zn (20, 200 en 1000 μ M). Hogere Zn-concentraties komen overeen met meer donkere staven. (J. Ruytinx, Mechanisms of metal homeostasis and detoxification in metal sensitive and tolerant isolates of *Suillus luteus*, an ectomycorrhizal fungus (PhD Thesis))

2.7 ICP-OES

De interne Zn-concentraties van de verschillende isolaten worden bepaald met ICP-OES. Een ICP-OES analyse is gebaseerd op de spontane emissie van fotonen van atomen en ionen die geëxciteerd worden in een radiofrequent (RF) geïnduceerd argon plasma. [31] [32] Een plasma is een geïoniseerd gas dat macroscopisch neutraal is. [32] Een radiofrequentie generator produceert een hoog frequent veld dat de elektronen versnelt en deze botsen met en ioniseren de argonmoleculen tot een plasma. [32] Vloeibare stalen worden verneveld en onderworpen aan deze plasma. Het staal droogt snel, verdampt en de ionen en atomen geraken geëxciteerd door botsingen op hoge temperatuur. Hierna wordt de emissie opgemeten om verschillende elementen te analyseren. [31]

2.8 pYES-DEST52 vector

De pYES-DEST52 vector, waarmee *S. cerevisiae* getransformeerd wordt, is een 7.6 kb lange vector afgeleid van pYES2/CT en aangepast voor gebruik met de Gateway® Cloning Technology. De vector wordt geleverd als een supercoiled plasmide. Deze vector is ontworpen voor hoog niveau, galactose geïnduceerde expressie in *S. cerevisiae*. Figuur 5 toont een overzicht van de elementen van deze vector. DNA van de donorvector vervangt de regio tussen basen 518 en 2228.



Figuur 5: Overzicht van de elementen van de pYES-DEST52 vector.

Volgende elementen zijn terug te vinden in de vector:

- De gist GAL1 promotor voor hoog niveau, galactose geïnduceerde proteïne expressie in *S. cerevisiae*: basen 1-451;
- De T7 promotor: basen 475-494;
- Twee recombinante sites, attR1 (basen 511-635) en attR2 (basen 2118-2242), na de GAL1 promotor voor recombinatoire klonering van het gen van belang vanuit een donor vector;
- Het chloramfenicolresistentiegen gelocaliseerd tussen de twee attR sites voor tegenselectie: basen 771-1430;
- Het ccdB gen gelocaliseerd tussen de twee attR sites voor negatieve selectie: basen 1772-2077;
- De V5 epitoot (basen 2265-2306) en 6xHis tag (basen 2316-2333) voor detectie en opzuivering;
- Cytochroom c (CYC1) polyadenylatie sequentie voor gepaste terminatie en verwerking van het recombinante transcript: basen 2366-2619;
- De 2μ oorsprong voor episomaal onderhoud en hoogkopie replicatie: basen 5610-7081;
- De URA3 auxotrofe merker voor selectie van gisttransformanten: basen 4499-5606;

- De pUC oorsprong voor hoogkopie replicatie en onderhoud van het plasmide in *E. coli*: basen 2803-3476
- Het ampicilline (*bla*) resistentiegen voor selectie in *E. coli*: basen 3321-4481;
- De f1 intergenische regio voor productie van enkelstrengig DNA in F plasmide bevattende *E. coli*: basen 7149-7604.

[33] (*pYES-DEST52 Gateway™ Vector: A destination vector for cloning and inducible*, 2002.)

3. Materialen en methode

In dit onderzoek wordt gewerkt met Zn-tolerante en –sensitive stammen van *S. luteus*. Zn-tolerante stammen van *S. luteus* werden eerder verzameld door vorige onderzoekers op metaalvervuilde sites in Lommel-Maatheide, Lommel-Sahara en Neerpelt. De Zn-sensitieve stammen zijn verzameld op niet-vervuilde, controle sites in Meeuwen-Gruitrode, Paal en Maasmechelen. [7] [12] [29] [34]

3.1 Opkweken van schimmelisolaten

De schimmels worden gekweekt op vast, aangepast FRIES medium. De oplossing bevat uiteindelijk 28 mM glucose, 5,4 mM ammoniumtartraat, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mM NaCl, 0,2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 μM $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 56 μM myo-inositol, 0,1 μM biotine, 0,5 μM pyridoxine, 0,3 μM riboflavine, 0,8 μM nicotinamide, 0,7 μM *p*-aminobenzoëzuur, 0,3 μM thiamine, 0,2 μM Ca-pantothenaat en 0,8% agar. [28]

Om de schimmels efficiënt te kunnen oogsten is het nodig dat ze enerzijds niet in het medium groeien en anderzijds er gemakkelijk af te halen zijn. Hiervoor wordt er op elke voedingsbodem een laagje cellofaan gelegd, dat eerst geautoclaveerd wordt. De schimmels kunnen hier niet door groeien, maar wel voedingsstoffen opnemen. Ook zijn ze hierdoor zeer gemakkelijk te oogsten, aangezien ze niet aan de cellofaan blijven plakken.

3.2 EC50-waarde met dosis-respons experiment

Een dosis-respons experiment is opgesteld om de Zn-sensitiviteit van de schimmels te achterhalen. Uit schimmels opgekweekt op voedingsbodems met verschillende concentraties Zn (als $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) worden de EC50-waarden van deze schimmels bepaald. Om de schimmels op te kweken wordt modified FRIES medium gebruikt dat aangelengd is met verschillende concentraties Zn waarop de schimmels geënt worden. Deze concentraties zijn 0, 100, 200, 400, 800 en 1200 ppm. De schimmels worden twee weken opgekweekt bij 23°C en dan geoogst. Hierna volgt lyofilisatie en massabepaling waarna de EC50-waarde berekend wordt via non-lineaire regressie met behulp van statistisch programma R 3.2.2.

De schimmels worden geënt door van een op voorhand opgekweekt isolaat een stukje (schimmel + vast medium) uit te snijden en dit met de schimmelkant op de nieuwe plaat te leggen. De gemiddelde massa van deze blokjes (bepaald van blokjes van isolaten die niet groeiden) wordt afgetrokken van het drooggewicht (na lyofilisatie) bij de verwerking van de resultaten.

3.3 Analyse van de interne Zn-concentraties

Door schimmels op te kweken op modified FRIES medium dat 100 ppm Zn bevat bij 23°C en deze te lyofiliseren, kan hierna een zuurdigestie en ICP-OES analyse hier op

uitgevoerd worden. De zuurdigestie begint met aan de stalen 1 ml HNO₃ suprapur toe te voegen. De volgende dag worden de stalen verwarmd tot 60°C tot ze droog zijn. Hierna wordt er weer 1 ml HNO₃ suprapur toegevoegd en worden de stalen verwarmd tot 110°C tot ze weer droog zijn. Deze stap wordt nog een keer herhaald waarna er 1 ml HCl suprapur 37% aan de stalen wordt toegevoegd. Ze worden weer opgewarmd tot 110°C tot ze droog zijn. Tot slot wordt er 4.5 ml millipore water aan de stalen toegevoegd waarna hieraan 500 µl 20% HCl wordt toegevoegd. Nu zijn de stalen klaar voor een ICP-OES analyse. Tussen elke oplossingsstap worden de stalen gevortext. Bij de gegevensverwerking wordt de gemeten concentratie van het metaal genomen t.o.v. het drooggewicht van het isolaat. De negatieve controle bestaat uit een waterstaal en de positieve controle (referentie) uit 50 mg droog spinaziepoeder.

De volgende metalen worden gemeten en verder statistisch geanalyseerd: Zn, Fe, Mn en Mg. Fe en Mn worden meegenomen omdat zij, zoals Zn, door CDF-transportproteïnen worden verplaatst. Mg wordt meegenomen als controle.

3.4 Statistische analyse

Statistische analyse wordt uitgevoerd in programma R 3.2.2. Alle data zijn van de ICP-OES analyse loggetransformeerd om een normale verdeling te verkrijgen. De normaliteit is getest m.b.v. een Shapiro Wilk test en de homoscedasticiteit met een Bartlett test. Om na te gaan of significante verschillen aanwezig zijn wordt eenweg ANOVA gebruikt. De Tukey HSD wordt gebruikt om twee groepen te vergelijken.

3.5 Gisttransformatie

De coderende sequentie van het *SlZnT2*-gen was reeds gekloneerd in een destination vector (Invitrogen™ Gateway™ pYES-DEST52). M.b.v. deze vector wordt de Zn-sensitieve Δ ZRC1 mutant van *S. cerevisiae* getransformeerd. De mutant wordt ook met de lege vector getransformeerd als negatieve controle ter bevestiging dat het effectief het *SlZnT2*-gen is dat verantwoordelijk is voor het resultaat. De niet-gemuteerde gist (wild type) wordt meegenomen als positieve controle voor het fenotype en wordt ook met de lege vector getransformeerd zodat deze ook kan groeien op het medium. De gebruikte mutant en het wild type zijn verkregen bij Euroscarf en hun bijhorende gegevens (van Euroscarf) zijn te vinden in Tabel 1.

Tabel 1: Gegevens van de fabrikant (Euroscarf) van de gebruikte gisten (mutant en wild type).

| Referentienummer | Naam | Mutant of wild type | Mating type | Genotype |
|-------------------|-------------|---------------------|-------------|--|
| Y00826, Euroscarf | YMR2 43c | Δ zrc1 | a | BY4741; MATa; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YMR243c::kanMX4 |
| Y00000, Euroscarf | BY474 1 | WT BY4741 | a | MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0 |

De transformatie wordt gedaan met de LiAc/SS-carrier DNA/PEG methode. [35] Op de eerste dag wordt een precultuur van de gisten gemaakt door ze overnacht op te groeien in 5 ml 2x YPAD medium (Yeast extract-peptone-dextrose medium + adenine). Dit medium bevat 20 g/l Difco yeast extract, 40 g/l Difco Peptone, 40 g/l glucose, 200 mg/l adenine hemisulfaat en 33 g/l Difco Bacto-agar. [36] Op de tweede dag wordt de concentratie aan cellen bepaald met een spectrofotometer (Novaspec Plus Amersham Biosciences) op golflengte 600 nm (1×10^6 cellen/ml: OD600 = 0.1), waarna het juiste volume wordt bepaald om 2.5×10^8 cellen toe te voegen aan 50 ml 2x YPAD medium. De gisten worden 3 tot 5 uur geïncubeerd op een schudmachine bij 30°C en tussendoor gemeten met de spectrofotometer tot de concentratie 2×10^7 cellen/ml is. Vervolgens wordt de oplossing gecentrifugeerd voor 5 minuten bij 3000 g. Hierna worden cellen gewassen met 25 ml steriel water (5 min, 3000 g) en nog een keer met 1 ml steriel water (5 min, 3000 g), waarna het volume wordt aangelengd met steriel water tot 1 ml. Per transformatie wordt 100 µl van deze oplossing gepipetteerd in een steriele 1.5 ml eppendorf tube en gecentrifugeerd. Het supernatant wordt verwijderd en een transformatiemix (240 µl PEG 3500 50% w/v, 36 µl LiAc 1.0 M, 50 µl gekookt SS-carrier DNA, 34 µl plasmide DNA + water) wordt toegevoegd. De 1.5 ml eppendorf tubes worden geïncubeerd bij 42°C voor 40 minuten waarna deze worden gecentrifugeerd (30 s, 3000 g). Het supernatant wordt verwijderd en de gistcellen worden opgelost in 1 ml steriel water en geïnoculeerd op SC-URA (Synthetic Complete without Uracil) selectiemedium en geïncubeerd bij 30°C voor 3 tot 4 dagen. Dit medium bevat 6.7 g/l Difco Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids), 20 g/l glucose, 1.4 g/l SC-URA Drop-Out MIX. [36]

Na de selectie op het SC-URA medium worden vijf kolonies (herhalingen) per transformatie geïnoculeerd in vloeibaar SC-URA medium met galactose i.p.v. glucose. Na incubatie bij 30°C voor een dag worden deze oplossingen verdund tot OD600 = 1, waarna verdunningsreeksen (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , ...) worden geënt op vast SC-URA medium met galactose en 10 mM Zn om te analyseren of het fenotype hersteld is. Deze verdunningsreeksen worden ook geënt op vast SC-URA medium met galactose als positieve controle.

3.6 RNA-extractie, verwijdering genomisch DNA en cDNA-synthese

Een oplossing van 400 µl getransformeerde gistcellen (OD600 = 1) wordt gecentrifugeerd (5 min, 8000 rpm) en het supernatant wordt weggegooid. Hierna volgt RNA-extractie met de RNeasy Plant Mini Kit van Qiagen volgens het protocol. [37] Na de extractie wordt de concentratie van RNA gemeten en de zuiverheid bepaald met de Thermo NanoDrop™ 1000. Voor de verwijdering van het genomisch DNA wordt 1 µg RNA genomen en gebruik gemaakt van de TURBO DNA free™ Kit en bijhorend protocol. [38] Tot slot voor de cDNA-synthese wordt gebruik gemaakt van de PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) en bijhorend protocol. [39]

De PCR wordt uitgevoerd bij volgende parameters (Tabel 2):

Tabel 2: Parameters voor de PCR met cDNA.

| Stap | | Temperatuur (°C) | Tijd |
|----------------------|-------------|------------------|-------------|
| Initiële denaturatie | | 94 | 2 minuten |
| 25-35 PCR cyclussen | Denaturatie | 94 | 30 seconden |
| | Annealing | 55 | 30 seconden |
| | Verlengen | 72 | 1 minuut/kb |
| Einde | | 4 | onbeperkt |

De primers gebruikt in de PCR zijn te zien in Tabel 3.

Tabel 3: Primers gebruikt in de PCR met cDNA.

| Naam primer | Code forward primer | Code reverse primer |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| Genkopienummer PCR2 | ATCCATTCCAGCACTAT TCAGC | GAATCAAGCAAGCAGA ATCCAC |
| Genexpressie | CGACGGTAAGGTGGAA ATAAAC | TGGTGAGCCAGATGAC AAGA |

Gebruikt in de gelelektroforese zijn de Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (6 µl) (Figuur 6) en de Thermoscientific 6xDNA loading dye (5µl). De gelelektroforese wordt uitgevoerd bij 70 V met de Biorad Powerpac™ Basic in een 1.5% agarosegel met GelRed.

Foto's van de gelelektroforese worden genomen met de ImageQuant RT ECL en software IQuant Capture-RT ECL.

3.7 Analyse promotorvarianten

DNA extracties waren op voorhand uitgevoerd. DNA van vier tolerante (Lm8, LS1, LS4 en OF3), vier sensitieve (P4, P13, HH19 en Mg4) en een controle (Lm8n1) isolaat wordt geanalyseerd. Van dit controle-isolaat is het DNA al gesequenced. Vertrekkend hiervan wordt een PCR (Techne TC-5000) uitgevoerd met elk van de gekozen primers, te zien in Tabel 4.

Tabel 4: Overzicht van de primers voor de analyse van de kandidaat promotorvarianten. Primers aangeduid in cursief hebben de forward primer voor het ATG startcodon en de reverse primer achter het ATG startcodon van *SlZnT2*.

| Promotor variant | Naam primer | | Code forward primer | Code reverse primer |
|------------------|--|---------------|-------------------------|----------------------------|
| | Volledig | Afkorting | | |
| 1 | ZNT2 <i>prom1_F(_R)</i> <i>qPCR</i> | P1PCR | CTGCTGGCGAT TTGCTCT | GGTGCCGAGGG ATTCTATG |
| | ZNT2 <i>prom1_F(_R)</i> <i>qPCR2</i> | <i>P1PCR2</i> | GCAAAGAGG CGTAAGGAGT | AGCCGTAGGAG TAACGAGAATG |

| | | | | |
|---|-------------------------------|---------|---------------------------------|----------------------------------|
| 2 | ZNT2 prom2_F(_R) qPCR | P2PCR | CGGGCTGGTAA ATAATGGAATG T | TGGGAGATCGT GTTACAGTTCT |
| | ZNT2 prom2_F(_R) qPCR2 | P2PCR2 | ACGTGGTGGTT AGTTCTTCGAA | GGGTGCGATAC GTCTTGATAGT |
| | PCR prom2 pair 2 F (R) | P2pair2 | CCGATTTCTTTA GGCATGTCGT | GGCGAGGTAGT TGAAATAGAGC |
| | PCR prom2 pair 3 F (R) | P2pair3 | CGTGGTGGTTA GTTCTTCGAAA | CATGGATGATA AATATGGCGAG GT |
| 3 | ZNT2 prom3_F(_R) qPCR | P3PCR | GACGCGCAAAT CATGACCTC | GGAGTCGCCGA GAGATTAGC |
| | ZNT2 prom3_F(_R) qPCR2 | P3PCR2 | TGTGTTCTTTC GTCGAAGTCT | AGAGCAAGAGA ACCAACGACAT |
| | qPCR prom3 pair 2 F (R) | P3pair2 | CTTGTGGAGAT TCGCATTCTCG | AGTGGCAGAAG AGGTCATGATT |

De componenten voor elke PCR, buiten primers, DNA en 10 mM dNTP mix, worden verkregen bij Invitrogen™ en zitten samen in de Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase kit. De 10 mM dNTP mix wordt verkregen bij Invitrogen™. Per PCR wordt een 25 µl staal aangemaakt dat 2.5 µl 10x PCR buffer, 0.75 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTP mix, 0.5 µl 10 µM forward primer, 0.5 µl 10 µM reverse primer en 0.1 µl Platinum™ Taq DNA Polymerase bevat. Hieraan wordt een voldoende hoeveelheid isolaat-DNA toegevoegd (1.5 µl; 0.5 ng/µl). Elke PCR wordt uitgevoerd bij volgende parameters (Tabel 5):

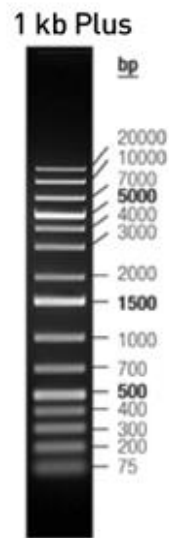
Tabel 5: Parameters voor de PCR-reacties voor de analyse van de kandidaat promotorvarianten.

| Stap | | Temperatuur (°C) | Tijd |
|----------------------|-------------|------------------|-------------|
| Initiële denaturatie | | 94 | 2 minuten |
| 25-35 PCR cyclussen | Denaturatie | 94 | 30 seconden |
| | Annealing | 55-56.7 | 30 seconden |
| | Verlengen | 72 | 1 minuut/kb |
| Einde | | 4 | onbeperkt |

Gebruikt in de gelelektroforese zijn de Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (6 µl) (Figuur 6) en de Thermo Scientific 6xDNA loading dye (5µl). De gelelektroforese wordt uitgevoerd bij 70 V met de Biorad Powerpac™ Basic in een 1.5% agarosegel met GelRed.

Foto's van de gelektroforese worden genomen met de ImageQuant RT ECL en software IQuant Capture-RT ECL.

Voor de negatieve controle wordt een waterstaal gebruikt als input voor elke PCR en de positieve controle bestaat uit een mengeling van DNA van de isolaten Lm8, LS1, LS4, P4, P13 en Lm8n1.



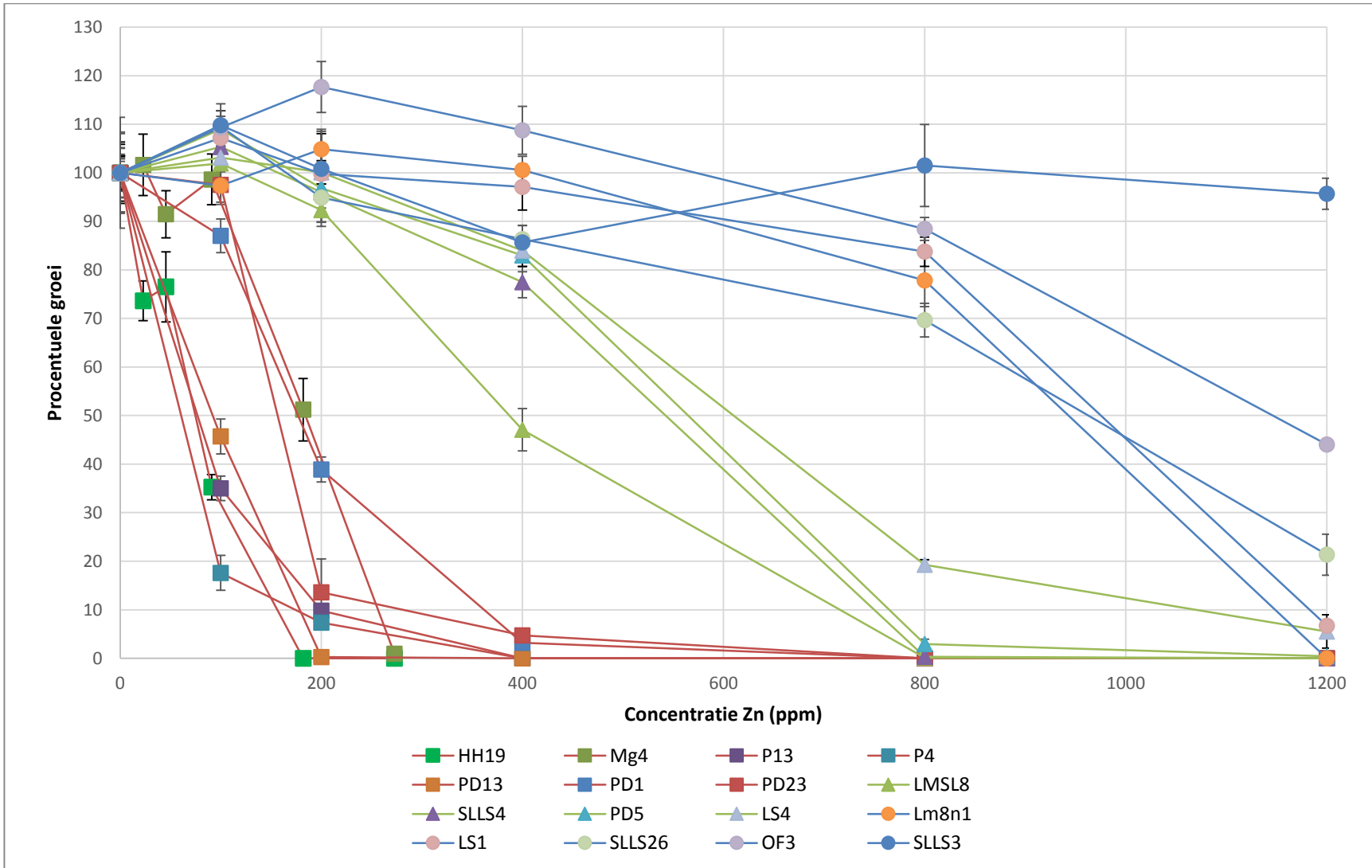
Figuur 6: Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

4. Resultaten

4.1 Screening van de zinktolerantie en interne zinkconcentraties

4.1.1 EC50-waarde met dosis-respons experiment

Van 16 isolaten zijn EC50-waarden bepaald. In Figuur 7 is de samengestelde grafiek te zien van de procentuele groei van deze isolaten. Aangezien Zn een essentiële nutriënt is, staat op de x-as de extra Zn dat werd toegevoegd aan het standaard medium voor dit experiment. Voor de aparte grafieken van de isolaten voor de absolute groei wordt verwezen naar Bijlage B. Hierin wordt ook de EC50-waarde per isolaat vermeld. Drie groepen zijn te onderscheiden in Figuur 7. Als eerste deze aangeduid met rode lijnen is de groep van Zn-sensitieve isolaten. Zij hebben een EC50-waarde van 0-200 ppm Zn (HH19, Mg4, P13, P4, PD13). Ten tweede de groep met groene lijnen zijn de isolaten die mediumtolerant zijn voor Zn met een EC50-waarde van 350-700 ppm Zn (LMSL8, SLLS4, PD5, LS4). Tot slot zijn er de blauwe lijnen voor Zn-tolerante isolaten met een EC50-waarde van >900 ppm Zn (Lm8n1, LS1, SLLS26, OF3, SLLS3).



Figuur 7: Samengestelde grafiek van de procentuele groei van alle isolaten waarvan een EC50-waarde is kunnen bepaald worden. Drie groepen zijn te onderscheiden: (1) rood voor sensitieve isolaten, (2) groen voor mediantolerante isolaten en (3) blauw voor tolerante isolaten.

4.1.2 Analyse van de interne Zn-concentraties

Figuur 8 toont de Zn-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes. De sensitieve isolaten verschillen significant van de mediumtolerante (Tukey HSD: $p < 0.01$), alsook van de tolerante (Tukey HSD: $p < 0.01$). De mediumtolerante isolaten verschillen borderline van de tolerante (Tukey HSD: $p = 0.051$). Aangezien de Zn-concentratie in het mycelium voor sensitief isolaat Mg4 een waarde heeft die buiten drie maal de interkwartielafstand ligt, wordt deze hier als uitschieter beschouwd. Mg4 wordt daarom ook bij de andere geanalyseerde metalen (Fe, Mn en Mg) weggelaten. Dit isolaat heeft voor deze metalen steeds een lage waarde (Figuur 13, Figuur 14 en Figuur 15) en wordt daarom in volgend onderzoek nog een keer geanalyseerd.

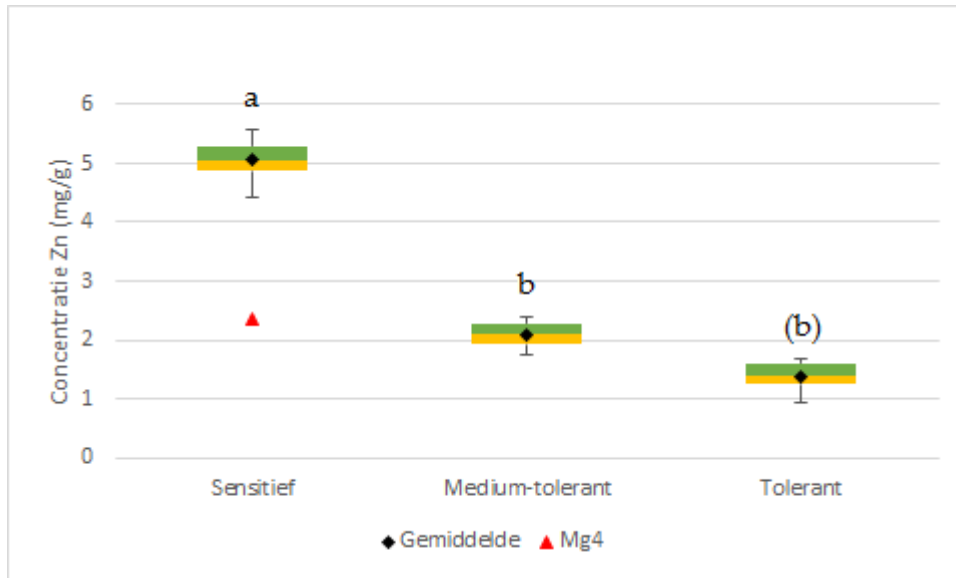
Voor Zn geldt de normale verdeling niet en dit heeft te maken met het kleine aantal isolaten dat getest is. In de toekomst is het de bedoeling om meer isolaten te testen. Toch is gekozen om parametrisch te testen omdat de homoscedasticiteit wel in orde is en ANOVA redelijk robuust is voor afwijkingen van een normale verdeling.

In Figuur 9 is de Fe-concentratie in het mycelium te zien per onderscheiden fenotype. Significante verschillen bestaan tussen de sensitieve en de tolerante isolaten (Tukey HSD: $p < 0.02$) en tussen de sensitieve en mediumtolerante isolaten (Tukey HSD: $p < 0.02$). Tussen de tolerante en mediumtolerante is er geen significant verschil.

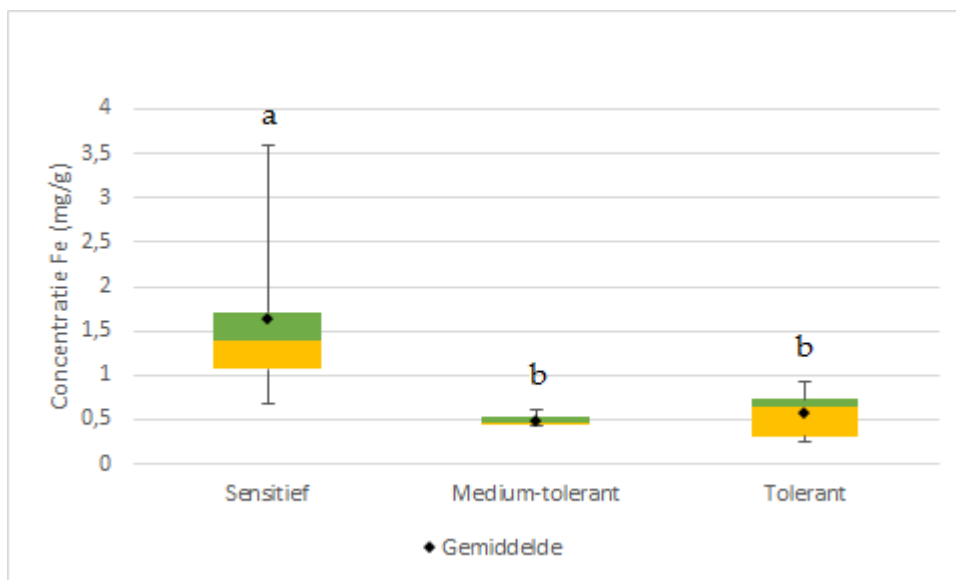
De Mn-concentratie in het mycelium is te zien in Figuur 10. Tussen de drie onderscheiden fenotypes bestaat er geen significant verschil.

In Figuur 11, de Mg-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes, is er ook geen significant verschil te zien tussen de onderscheiden fenotypes.

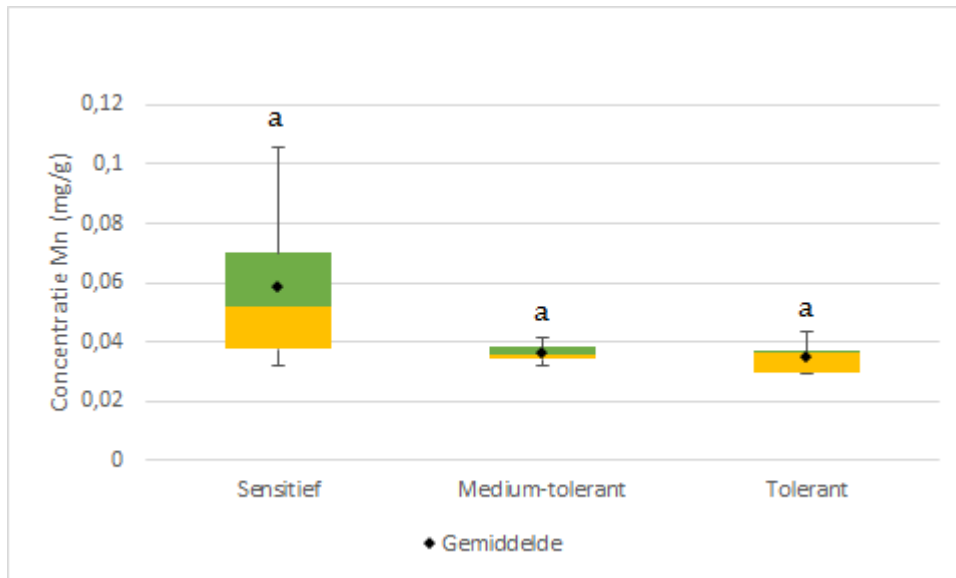
Figuur 12, Figuur 13, Figuur 14 en Figuur 15 tonen de gemeten Zn-, Fe-, Mn- en Mg-concentraties in het mycelium per isolaat.



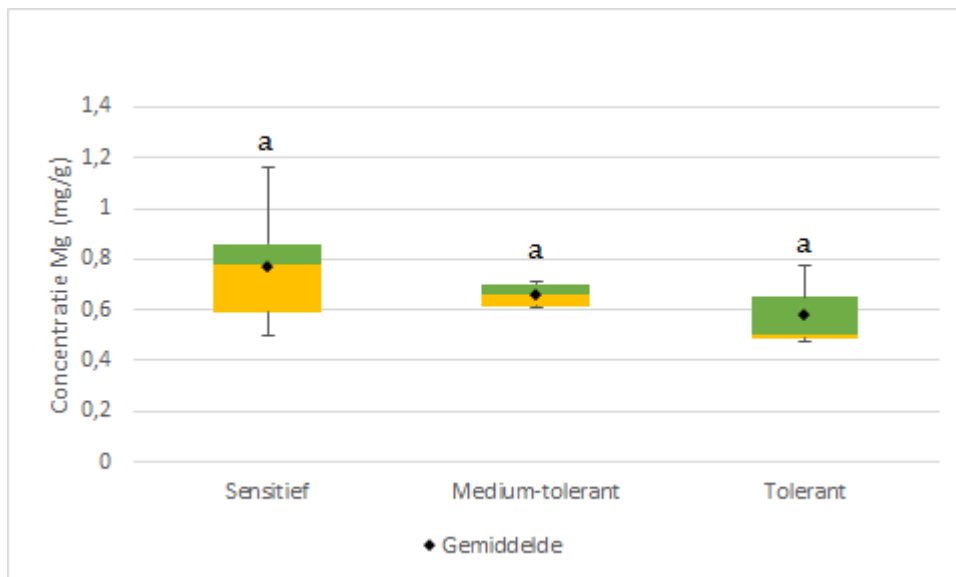
Figuur 8: Boxplots van Zn-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. Significante verschillen op het 95%-betrouwbaarheidsniveau zijn aangeduid met verschillende letters. Borderline significante verschillen op het 95%-betrouwbaarheidsniveau zijn aangeduid met een letter tussen haakjes.



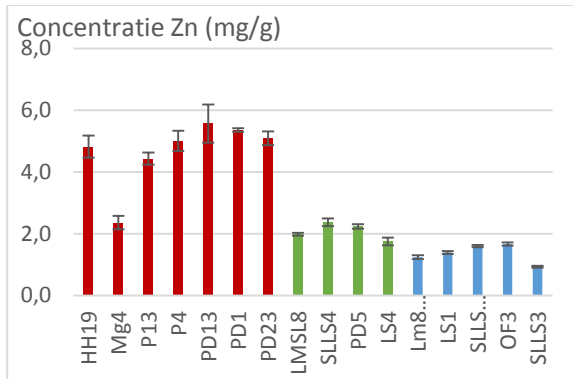
Figuur 9: Boxplots van Fe-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. Significante verschillen op het 95%-betrouwbaarheidsniveau zijn aangeduid met verschillende letters.



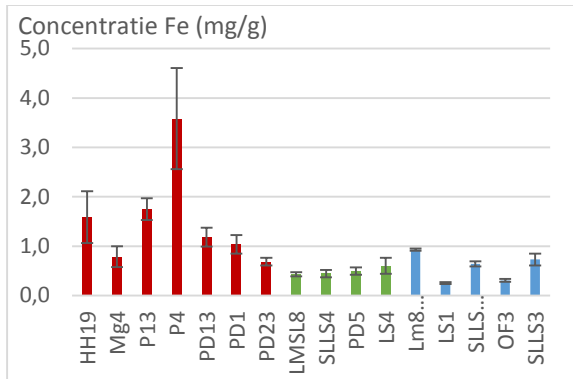
Figuur 10: Boxplots van Mn-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. Significante verschillen op het 95%-betrouwbaarheidsniveau zijn aangeduid met verschillende letters.



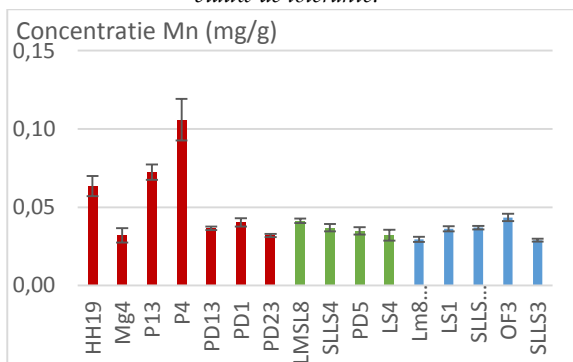
Figuur 11: Boxplots van Mg-concentraties in het mycelium van de drie onderscheiden fenotypes op basis van de EC50-waarde. Significante verschillen op het 95%-betrouwbaarheidsniveau zijn aangeduid met verschillende letters.



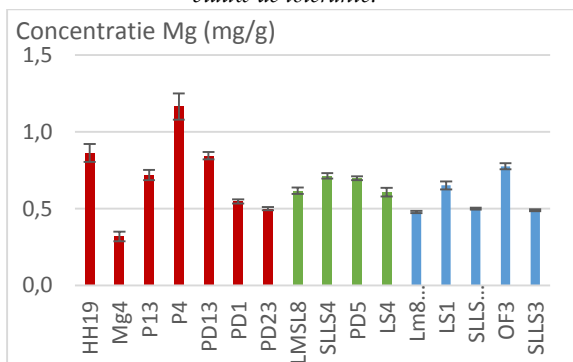
Figuur 12: Zn-concentraties in het mycelium. Rood zijn de sensitieve isolaten, groen de mediumtolerante en blauw de tolerante.



Figuur 13: Fe-concentraties in het mycelium. Rood zijn de sensitieve isolaten, groen de mediumtolerante en blauw de tolerante.



Figuur 14: Mn-concentraties in het mycelium. Rood zijn de sensitieve isolaten, groen de mediumtolerante en blauw de tolerante.



Figuur 15: Mg-concentraties in het mycelium. Rood zijn de sensitieve isolaten, groen de mediumtolerante en blauw de tolerante.

Bespreking

In een vorige studie is gebleken dat Mg een goede controle is. [13] In deze studie verschillen de interne Mg-concentraties niet significant en is de trend van de interne Zn-concentraties niet zichtbaar in de interne Mg-concentraties (Figuur 8 en Figuur 11).

Voor de drie onderscheiden fenotypes blijkt dat de mediumtolerante en tolerante isolaten significant minder Zn in de cel hebben dan de sensitieve isolaten (Figuur 8). Dit ondersteunt wederom dat de Zn-tolerantie in deze tolerante isolaten tot stand komt d.m.v. een exclusiemechanisme. Alle onderzochte tolerante isolaten zijn dus goede kandidaten voor DNA-resequencing.

Een significant verschil wordt ook waargenomen tussen de interne Fe-concentraties van (medium)tolerante en sensitieve isolaten (Figuur 9). In een voorgaand onderzoek werd een correlatie tussen Zn en Fe waargenomen. [13] Een gelijkaardige trend wordt ook waargenomen in de interne Mn-concentraties (Figuur 10), alhoewel hier geen significante verschillen aanwezig zijn. Als een CDF-transporter voor Zn (SlZnT2) aan de basis ligt van de Zn-tolerantie kan dit een verklaring zijn voor de significante verschillen bij de Fe-concentraties en de trend bij de Mn-concentraties, aangezien een CDF-transporter, zoals SlZnT2, Fe en Mn ook met lage affiniteit zou kunnen transporteren.

De spreiding bij de sensitieve isolaten is groter dan bij de tolerante isolaten en heeft te maken met dat de sensitieve isolaten geïsoleerd zijn uit een groter aantal gebieden. Waarschijnlijk is er dus een grotere genetische variatie in deze groep. De tolerante isolaten komen van een kleiner aantal gebieden die Zn-vervuild zijn en hier heerst een selectiedruk voor Zn-tolerantie.

Voor de sensitieve isolaten is enkel Mg4 geen goede kandidaat voor DNA-resequencing, aangezien deze voor de Zn-concentraties als uitschieter wordt beschouwd.

Dat de EC50-waarde van niet alle 28 isolaten is bepaald heeft meerdere redenen. Om te beginnen moeten de isolaten twee weken groeien voordat ze geoogst worden. Dit heeft tot gevolg dat er telkens pas na twee weken kan gezien worden welke isolaten slecht gegroeid zijn of welke isolaten een grote spreiding hebben op de technische herhalingen. De isolaten die slecht groeiden werden meteen weer opgezet bij de volgende reeks, maar diegenen met grote spreidingen werden pas later ontdekt bij de gegevensverwerking, nadat de nieuwe reeks al was gestart. In totaal zijn er 5 reeksen van schimmels opgestart waarbij er gemiddeld 10-15 isolaten per reeks werden opgekweekt.

Ook werden de meeste isolaten bewaard in een koelcel, waarbij ze eerder waren opgekweekt op vast medium. Voor veel van deze isolaten was het lastig om terug te acclimatiseren bij de aanvang van dit experiment, maar na een paar keer overenten begonnen de meesten wel terug goed te groeien. Sommigen bleven het echter lastig hebben om terug te beginnen groeien en waren na twee weken telkens te weinig gegroeid om betrouwbaar het drooggewicht te bepalen. Andere isolaten groeiden inconsistent. Zo waren er isolaten die weinig of niet groeiden op een lage concentratie zoals 0 of 100 ppm Zn en veel harder groeiden bij hogere concentraties zoals 200 of 400 ppm Zn, waarna de groei terug afnam tot 1200 ppm Zn.

Nog een reden is de luchtcirculatie in de broedstoof waar de isolaten werden opgekweekt. In de eerste en de tweede reeks werd gewerkt met parafilm om de petriplaten af te dichten en op elkaar te houden en voor gasuitwisseling werden gaatjes gesneden in de parafilm. In de tweede reeks echter waren de bovenste platen die op de bovenste plank in de broedstoof stonden uitgedroogd omdat ze recht onder de ventilator geplaatst waren. Dit had natuurlijk tot gevolg dat de getroffen isolaten opnieuw moesten worden opgezet. Hierna werden de platen afgeplakt met Micropore™ tape. Dit is een tape die gasuitwisseling toelaat maar wel zorgt voor een "luchtcirculatiebarrière" waardoor de voedingsbodems niet meer konden uitdrogen.

Een laatste reden is dat sommige isolaten simpelweg een tragere groeisnelheid hebben dan andere en dus na twee weken niet genoeg biomassa hebben aangemaakt voor een betrouwbare analyse. Deze isolaten langer laten groeien kan een oplossing zijn, maar dan zijn de resultaten niet meer vergelijkbaar. Een andere oplossing bestaat er in om meer

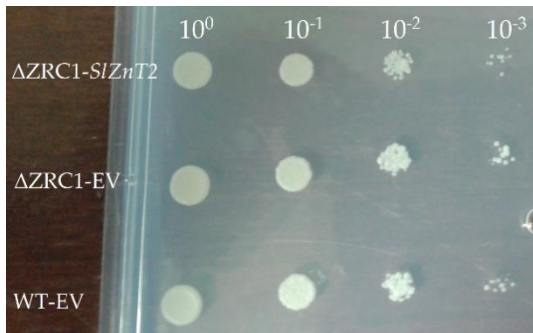
entmateriaal te nemen, maar hiervoor moet dan apart een gemiddelde massa bepaald worden, die afgetrokken wordt van het drooggewicht.

Ook bij de bepaling van de interne Zn-concentraties gelden deze redenen, met daarbovenop dat de staalvoorbereiding (zuurdigestie) voor ICP-OES een week in beslag neemt.

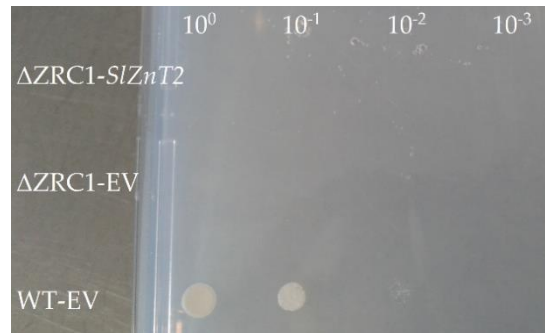
4.2 Karakterisering van het *SlZnT2*-gen

4.2.1 Gisttransformatie

Het fenotype van de gistmutant Δ ZRC1 die getransformeerd is met het *SlZnT2*-gen is niet succesvol hersteld. De getransformeerde gistcellen groeien niet op een voedingsbodem met 10 mM Zn, zoals te zien in Figuur 17. Dit in tegenstelling met het wild type getransformeerd met de empty vector, die wel groeit op 10 mM Zn. De mutant met de empty vector (negatieve controle) groeit niet op 10 mM Zn. Figuur 16 toont de controleplaat met 0 mM Zn, waarop te zien is dat ze allemaal kunnen groeien.



Figuur 16: Groei van getransformeerde gistmutant met *SlZnT2* en empty vector en van getransformeerd wild type met empty vector op SC-URA medium met galactose en 0 mM Zn.



Figuur 17: Groei van getransformeerde gistmutant met *SlZnT2* en empty vector en van getransformeerd wild type met empty vector op SC-URA medium met galactose en 10 mM Zn.

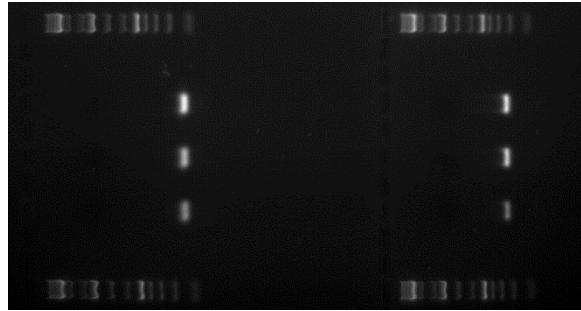
Genexpressie *SlZnT2* in Δ ZRC1

Om na te gaan of het *SlZnT2*-gen wel tot expressie komt wordt een RNA-extractie, verwijdering van genomisch DNA en cDNA synthese uitgevoerd. Hierna volgt een PCR met genspecifieke primers. Dit toont aan dat er wel degelijk RNA van het gen aanwezig is en dat het gen dus tot expressie komt, zoals te zien in Figuur 18, waarin drie herhalingen (drie verschillende kolonies) bij twee verschillende primers oplichten.

Bespreking

Er treedt dus geen functionele complementatie op in de gist. Dit kan te maken hebben met de fylogenetische afstand tussen *S. luteus*, een basidiomycete, en *S. cerevisiae*, een ascomycete. Eventueel wordt het proteïne correct aangemaakt, maar mist het een signaalsequentie die voor *S. cerevisiae* nodig is om het proteïne naar de juiste plaats te brengen. Een andere mogelijkheid is dat de signaalsequentie wel aanwezig is, maar dat *S. cerevisiae* deze niet herkent. Posttranslationele modificaties die nodig zijn voor een

functioneel SlZnT2-proteïne kunnen ook ontbreken in *S. cerevisiae*. Net omgekeerd kunnen posttranslationale modificaties aangebracht worden die niet nodig zijn en zo tot gevolg een niet functioneel proteïne geven. Ook verschillen in posttranscriptionele regulatie voor SlZnT2 tussen *S. luteus* en *S. cerevisiae* kunnen aanleiding geven tot een niet werkend proteïne.



Figuur 18: Resultaten van de PCR-reacties met cDNA van de gistcellen. Links toont de reactie met primer Genkopienuummer PCR2 en rechts met Genexpressie.

Als controle worden de lengtes van de bandjes vergeleken met de lengte die teruggevonden zou moeten worden. Voor primer Genkopienuummer PCR2 moet de lengte 106 bp zijn en liggen de bandjes tussen lengtes 75 en 100 bp van de ladder. Voor primer Genexpressie moet de lengte 221 bp zijn en liggen de bandjes tussen lengtes 200 en 300 van de ladder. (Coninx Laura, ongepubliceerd)

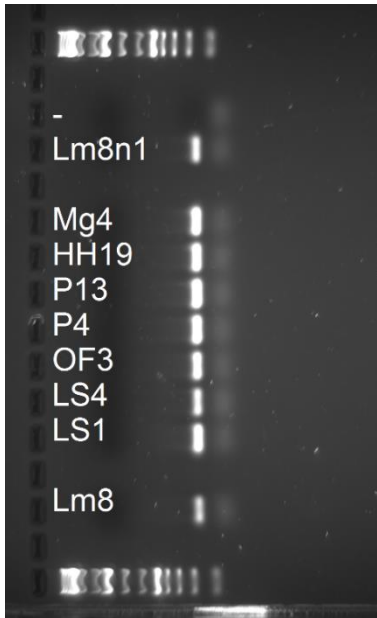
4.2.2 Analyse promotorvarianten

Promotorvariant 1

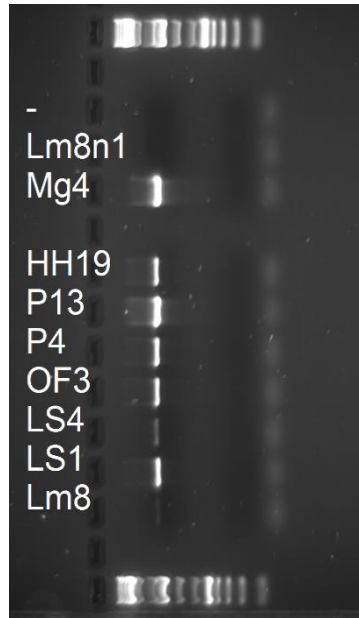
Zoals te zien in Figuur 19, de PCR met primerpaar P1PCR, is voor elk isolaat een bandje aanwezig. Figuur 20 en Figuur 21 tonen de reactie met primerpaar P1PCR2 bij verschillende annealingtemperaturen (55°C en 56.3°C). Hier is te zien dat bij annealingtemperatuur 55°C enkel bij Lm8n1 geen bandje aanwezig is. Bij 56.3°C komt bij Lm8n1, HH19, P13 en OF3 geen bandje voor.

Het minteken en plusteken staan voor negatieve en positieve controle. De positieve controle heeft hier geen bandje.

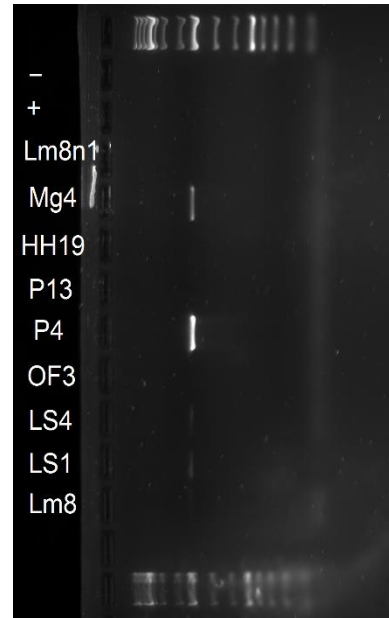
Als controle wordt de lengte van de bandjes vergeleken met de lengte die terug zou moeten gevonden worden op basis van het genomewalkingexperiment. Voor P1PCR2 moet de lengte 145 bp zijn en de bandjes zijn gelegen, volgens de ladder (Figuur 6), tussen bp 75 en 200. Voor P1PCR2 moeten de bandjes 1366 bp lang zijn en deze zijn gelegen nabij het het bandje van de ladder van 1500 bp.



Figuur 19: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 1 met primerpaar P1PCR bij een annealingtemperatuur van 55°C.



Figuur 20: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 1 met primerpaar P1PCR2 bij een annealingtemperatuur van 55°C.



Figuur 21: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 1 met primerpaar P1PCR2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C.

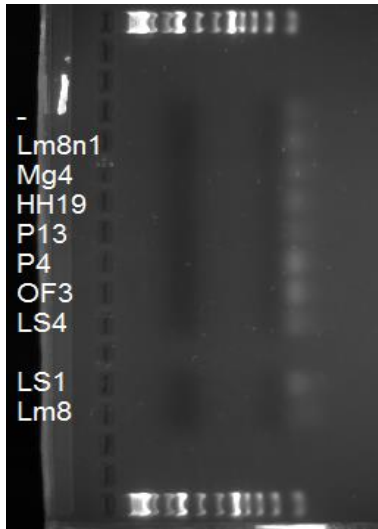
Promotorvariant 2

Figuur 22 geeft de PCR met primerpaar P2PCR weer en Figuur 23 deze van primerpaar P2PCR2. Bij deze reacties komt nergens een bandje voor.

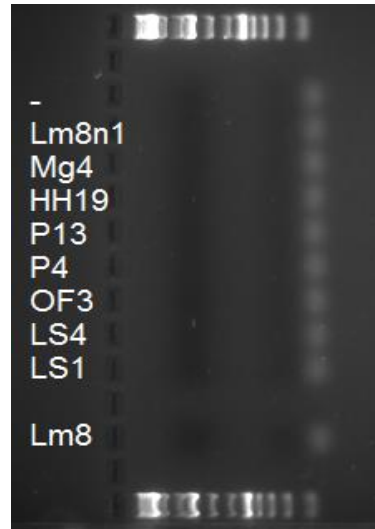
Figuur 24 en Figuur 25 tonen de PCR-reacties met primerpaar P2pair2 bij verschillende annealingtemperaturen (55°C en 56.3°C). Een bandje komt twee keer bij Lm8 voor en een keer bij Lm8n1 (56.3°C). De positieve controle licht in Figuur 25 wel op.

In Figuur 26 en Figuur 27 zijn de PCR-reacties met primerpaar P2pair3 bij verschillende annealingtemperaturen (55°C en 56.3°C) weergegeven. Een bandje is enkel aanwezig bij Lm8 en LS1. De positieve controle heeft weer geen bandje.

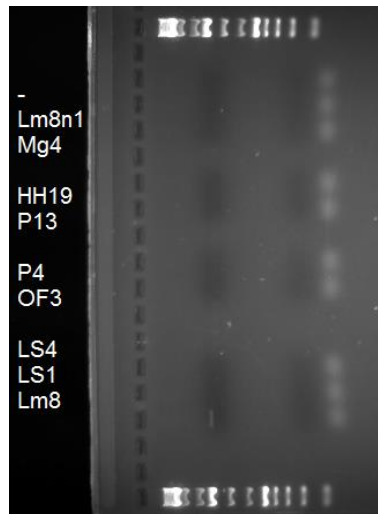
Ook hier volgt de controle met de ladder (Figuur 6). Voor P2pair2 volgt uit het genomewalkingexperiment dat bandjes met lengte 1265 bp moeten worden teruggevonden en de bandjes liggen nabij het bandje van 1500 bp van de ladder. P2pair3 geeft volgens het genomewalkingexperiment lengte 194 bp en dit bandje ligt nabij 200 bp.



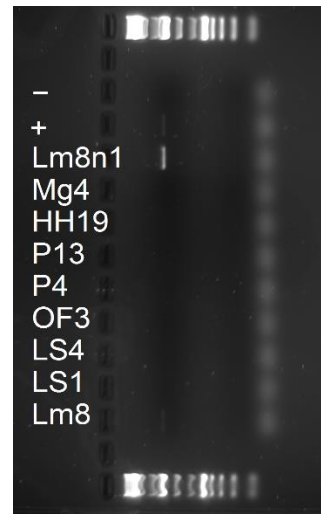
Figuur 22: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2PCR bij een annealingtemperatuur van 55°C



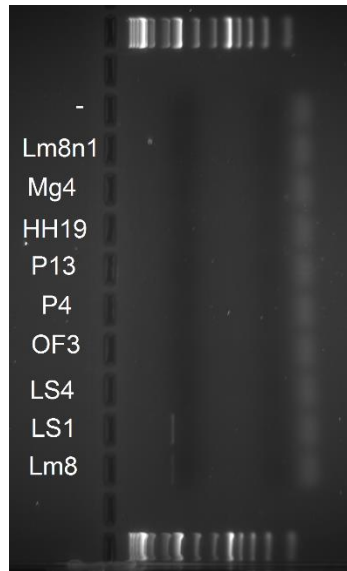
Figuur 23: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2PCR2 bij een annealingtemperatuur van 55°C.



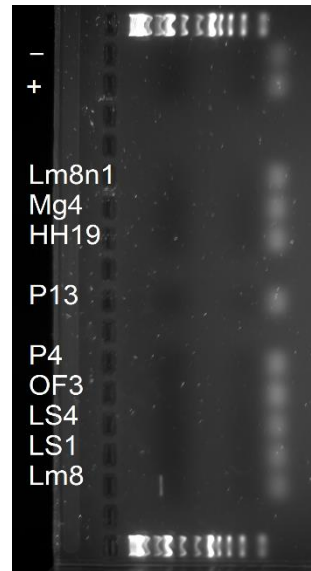
Figuur 24: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2pair2 bij een annealingtemperatuur van 55°C.



Figuur 25: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2pair2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C.



Figuur 26: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met P2pair3 bij een annealingtemperatuur van 55°C.



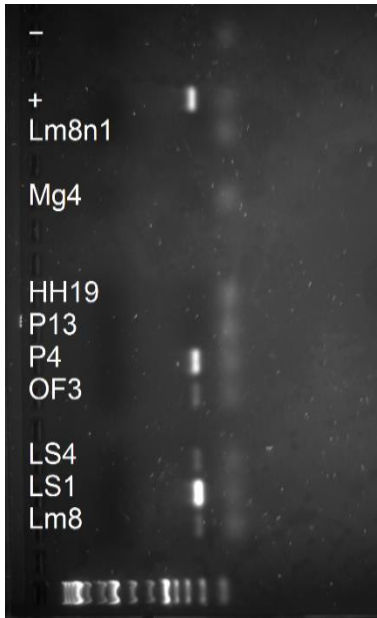
Figuur 27: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 2 met primerpaar P2pair3 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C.

Promotorvariant 3

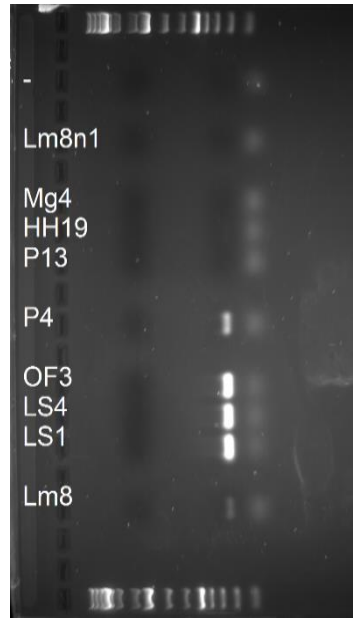
In Figuur 28, Figuur 29 en Figuur 30 is te zien dat enkel bij de tolerante isolaten een bandje terug te vinden is, met uitzondering van het sensitieve isolaat P4. Figuur 28 en Figuur 29 tonen de PCR-reacties met primerpaar P3pair2 bij verschillende annealingtemperaturen (56.3°C en 56.7°C). Figuur 30 toont de PCR voor primerpaar P3PCR. In deze laatste reactie zijn ook een paar bandjes terug te vinden voor isolaten P13, HH19 en Mg4. In Figuur 28 licht de positieve controle fel op.

Figuur 31 en Figuur 32 geven de resultaten weer van de PCR met primerpaar P3PCR2 bij verschillende annealingtemperaturen (56°C en 56.3°C). De positieve controle licht op en bij OF3, LS4 en LS1 komen bandjes voor.

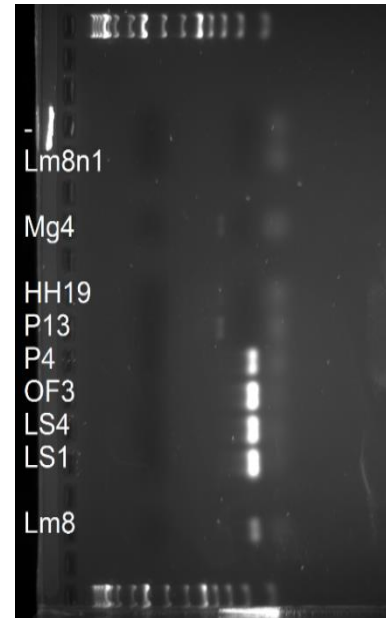
Volgens het genomewalkingexperiment moet P3pair2 bandjes geven van 194 bp lang en deze worden ook nabij het bandje van 200 bp van de ladder gevonden. Voor P3PCR moeten de bandjes 113 bp lang zijn en deze liggen tussen bandjes 75 en 200 bp van de ladder. De bandjes van P13, HH19 en Mg4 van P3PCR liggen tussen 200 en 300 bp van de ladder en hebben dus niet de juiste lengte. Tot slot voor P3PCR2 moeten de bandjes 1615 bp lang zijn en deze liggen tussen bandjes 1500 en 2000 bp van de ladder.



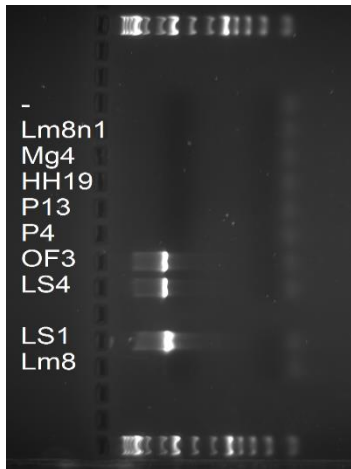
Figuur 28: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3pair2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C.



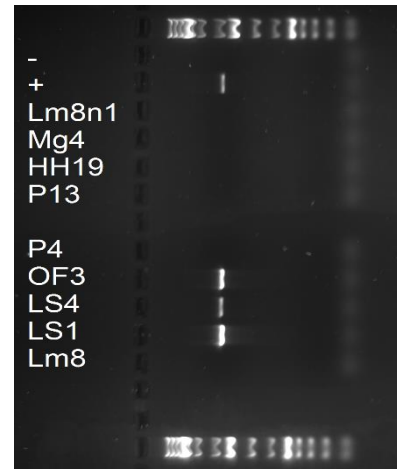
Figuur 29: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3pair2 bij een annealingtemperatuur van 56.7°C.



Figuur 30: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3PCR bij een annealingtemperatuur van 56°C.



Figuur 31: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3PCR2 bij een annealingtemperatuur van 56°C.



Figuur 32: Resultaten van de PCR voor promotorvariant 3 met primerpaar P3PCR2 bij een annealingtemperatuur van 56.3°C.

Bespreking

De positieve controle licht niet overal op. Deze werd enkel meegenomen bij PCR-reacties waarvan de werking van het primerpaar nog niet bevestigd was. Dit omdat voor de positieve controle een mengstaal van DNA nodig is en er niet veel DNA van het experiment extra is. Een mengstaal werd genomen om de kans te verhogen dat in iedere PCR de positieve controle zou werken, maar blijkt geen goede mogelijkheid om een positieve controle te ontwikkelen. Waarschijnlijk is er te weinig DNA in het mengstaal (1.5 µl; 0.125 ng/µl per DNA staal) om bij elke PCR een In de toekomst wordt voor de positieve controle DNA van een staal genomen waarvan nu geweten is dat het werkt in de PCR, bijvoorbeeld voor P3PCR2 wordt isolaat LS1, LS4 of OF3 genomen.

De negatieve controle geeft nergens een bandje, wat erop wijst dat waarschijnlijk geen kruiscontaminatie heeft plaatsgevonden en dat de gegevens dus betrouwbaar zijn.

Bij de primerparen die in Tabel 4: Overzicht van de primers voor de analyse van de kandidaat promotorvarianten. Primers aangeduid in cursief hebben de forward primer voor het ATG startcodon en de reverse primer achter het ATG startcodon van *SlZnT2*. Tabel 4 cursieve namen hebben ligt één primer (F) voor het startcodon van het gen (± 100 bp stroomopwaarts) en één primer (R) achter het startcodon (± 300 bp stroomafwaarts). Deze primerparen bevestigen, bij het terugvinden van een promotorvariant en na sequencing, dat deze variant bij het gen hoort. Deze primerparen en de isolaten waarbij een bepaalde promotorvariant is teruggevonden worden weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Overzicht van promotorvarianten en isolaten waarin bevestigd werd dat deze varianten bij het gen horen.

| Promotorvariant | Primerpaar | Isolaten | |
|-----------------|------------|--------------------|--------------------|
| | | Sensitief | Tolerant |
| 1 | P1PCR2 | Mg4, HH19, P13, P4 | OF3, LS4, LS1, Lm8 |
| 2 | P2PCR2 | / | / |
| | P2pair2 | / | Lm8n1, Lm8 |
| | P2pair3 | / | LS1, Lm8 |
| 3 | P3PCR2 | / | OF3, LS4, LS1 |

In het genomewalkingexperiment zijn fragmenten van promotorvariant 1 teruggevonden bij alle onderzochte isolaten (OF3, LS1, Lm8, Mg4, P4, P13). (Coninx Laura, ongepubliceerd) Promotorvariant 1 wordt ook hier teruggevonden in alle isolaten, zowel tolerante als sensitieve.

Bij primerpaar P1PCR wordt ook voor Lm8n1 een bandje gevonden. Het genoom van Lm8n1 is echter gesequenced en hieruit volgt dat dit isolaat maar 1 kopie van het gen heeft met promotorvariant 2. [40] Dit primerpaar is dus niet specifiek genoeg om enkel promotorvariant 1 te amplificeren. Het stuk DNA dat dit primerpaar amplificeert is gelegen in het begin van de promotorregio, waar de verschillende promotorvarianten een

grote gelijkenis vertonen. Dit verklaart waarom de lengte van het teruggevonden fragment van Lm8n1 even lang is als deze van de andere isolaten. Primerpaar P1PCR zal dus in de toekomst niet meer gebruikt worden.

Voor de isolaten waarvan promotor 1 werd teruggevonden in het genomewalkingexperiment, wordt met primerpaar P1PCR2 nu ook een bandje teruggevonden. Na uitknippen van de bandjes en sequencing wordt de sequentie van promotor 1 teruggevonden. Ook voor HH19 en LS4, die niet meegenomen zijn in het genomewalkingexperiment, wordt na uitknippen en sequencing promotor 1 teruggevonden. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Aangezien bij primerpaar P1PCR2 de primers voor en achter het startcodon binden, bevestigt dit primerpaar tevens dat deze sequentie een promotor van het gen is.

Promotorvariant 3 wordt enkel bij de tolerante isolaten teruggevonden, met uitzondering van P4 (P3PCR, P3pair2). Dit kan worden verklaard met behulp van vorig onderzoek. Hier werd aangetoond, zoals al vermeld in de literatuurstudie, dat er een significant verschil bestaat tussen het expressieniveau van het *SLZnT2*-gen tussen tolerante en sensitieve isolaten. Alhoewel het expressieniveau voor sensitief isolaat P4 lager lag dan voor de tolerante isolaten, lag dit toch hoger dan voor de rest van de sensitieve isolaten, te zien in Figuur 4 b (p.32). [15]

Voor isolaten OF3, LS1, Lm8 en P4 werden in het genomewalkingexperiment fragmenten van promotor 3 teruggevonden. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Na uitknippen en sequencing van de PCR-producten van de reactie met primerpaar P3PCR2, bevestigen tolerante isolaten OF3, LS1 en LS4 dat promotorvariant 3 daadwerkelijk een promotor van het gen is.

Fragmenten van promotor 2 werden in het genomewalkingexperiment teruggevonden bij Lm8 en P4. Deze fragmenten vertonen veel variatie. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Promotorvariant 2 wordt hier enkel teruggevonden in tolerante isolaten Lm8n1, LS1 en Lm8, waarbij ook bevestigd wordt, na sequencing, dat deze variant een promotor van het gen is (P2pair2 en P2pair3). Dat deze variant niet bij meer isolaten wordt teruggevonden kan te maken hebben met de variabiliteit die deze promotor vertoont. De sequentie van deze promotorvariant is het minst geconserveerd. Binnen het lopende onderzoek is men nog niet zeker of hier gesproken moet worden van één of meerdere promotorvarianten of subvarianten omdat er zoveel variatie is. Dit maakt het zeer moeilijk om primers te ontwikkelen voor de detectie van promotorvariant 2. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Meer onderzoek is hier nodig om de variatie in deze promotorvariant(en) te achterhalen en om te bevestigen dat deze variant vooral of enkel in sensitieve/tolerante isolaten aanwezig is.

Dat isolaat P4 twee kopieën van het gen heeft werd in vorig onderzoek aangetoond. In dit onderzoek werd voor dit isolaat promotor 2 teruggevonden. [15] Dit zorgt voor controverse omtrent dit isolaat, aangezien in dit onderzoek in het genomewalking-experiment fragmenten zijn teruggevonden in P4 van promotor 1, 2 en 3. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Voor dit isolaat geeft enkel primerpaar P1PCR2 uit Tabel 6 een bandje en na sequencing wordt bevestigd dat promotor 1 een promotor van het gen is en in P4 voorkomt. De primerparen van promotorvarianten 2 en 3 uit Tabel 6 geven geen bandje bij P4 en voor dit isolaat kan dus niet bevestigd worden welke van de twee varianten daadwerkelijk aanwezig is. Als promotor 3 in isolaat P4 een promotor van *SlZnT2* is dan kan het juist zijn dat promotor 3 geassocieerd is met een hogere expressie, want P4 heeft, zoals aangehaald, ook een hogere expressie (Figuur 4 b, p.32). Promotor 3 vertoont echter minder variatie dan promotor 2 en dit wil zeggen dat de kans kleiner is dat hier de reactie geen resultaat geeft. Het is dus waarschijnlijker dat P4 promotor 2 heeft en hier de reactie geen resultaat geeft, omdat deze promotor meer variatie vertoont en omdat fragmenten van deze promotor twee keer worden teruggevonden in P4, zowel in dit als in vorig onderzoek. [15] (Coninx Laura, ongepubliceerd) Verder onderzoek moet dus uitwijzen in welke mate promotor 3 geassocieerd is met een hogere expressie en welke promotor nu effectief in P4 aanwezig is.

In voorgaand onderzoek werd vastgesteld dat de sensitieve isolaten, met lage genexpressie (Figuur 4 b, p. p.32), twee kopieën van het gen hebben, telkens met promotor 1 of met promotor 1 en 2. De onderzochte tolerante isolaten hadden meerdere kopieën (gemiddeld 5) met promotor 1, 2 of 3. [15] Uit het huidige onderzoek blijkt dat 12 mediumtolerante isolaten twee genkopieën met promotor 3 hebben en 12 tolerante isolaten vijf genkopieën met promotor 3 hebben. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Dit wijst erop dat het verschil in genexpressie waarschijnlijk het gevolg is van zowel de promotor als het genkopienummer. In isolaten met een hogere expressie van *SlZnT2* wordt promotorvariant 3 telkens teruggevonden en isolaat P4 spreekt dit voorlopig niet tegen. Meer onderzoek is nodig om het verband te bevestigen en het relatieve belang van iedere factor te achterhalen.

In Figuur 30 zijn bandjes te zien voor isolaten P13, HH19 en Mg4. Deze bandjes hebben niet de juiste lengte die moet worden teruggevonden en zijn dus vermoedelijk aspecifiek.

De primerparen P2qPCR en P2qPCR2 geven geen resultaten en hier wordt niet meer mee verder gewerkt.

5. Besluit

Van 16 isolaten zijn EC50-waarden en interne Zn-concentraties bepaald en drie fenotypen zijn onderscheiden: (1) sensitief, (2) mediumtolerant en (3) tolerant. Na statistische analyse zijn significante verschillen voor interne Zn-concentraties gevonden tussen de sensitieve en mediumtolerante en tussen de sensitieve en tolerante isolaten. Tussen de mediumtolerante en tolerante isolaten heerst een borderline verschil. Dit bevestigt wederom het vermoeden dat de Zn-tolerantie in de tolerante isolaten tot stand komt door een exclusiemechanisme. Significante verschillen zijn ook gevonden voor interne Fe-concentraties tussen sensitieve en mediumtolerante en tussen sensitieve en tolerante isolaten. Een gelijkaardige trend wordt ook waargenomen voor de interne Mn-concentraties. Deze vaststellingen kunnen de hypothese ondersteunen dat een CDF-transportproteïne zou instaan voor de Zn-tolerantie door Zn-exclusie uit de cel te promoten. Dit omwille van het feit dat CDF-transporters naast Zn ook Fe en Mn kunnen transporteren en er daarom een gelijkaardige trend bij deze metalen kan worden teruggevonden.

Alle sensitieve isolaten en alle tolerante isolaten buiten Mg4 zijn geschikte kandidaten voor DNA-resequencing.

Het fenotype van de gistmutant $\Delta ZRC1$ kon niet functioneel gecomplementeerd worden. cDNA-synthese en PCR bevestigd dat het gen wel tot expressie komt. Dit kan te maken hebben met de fylogenetische afstand tussen *S. luteus* en *S. cerevisiae*. Verschillen tussen de organismen bij posttranscriptionele regulatie, posttranslationale modificaties en/of signaalsequenties leiden tot het niet functioneren van het eiwit.

Promotor 1 wordt teruggevonden in alle isolaten en promotor 3 enkel bij tolerante isolaten, met uitzondering van sensitief isolaat P4. Hierbij is bevestigd dat deze effectief promotors van het gen zijn. Als isolaat P4 promotor 3 heeft, ondersteunt dit het hypothetisch verband tussen hogere expressie van *SlZnT2* en promotor 3. Het is echter waarschijnlijker dat isolaat P4 promotor 2 heeft aangezien de kans groter is dat promotor 2 niet wordt teruggevonden. Dit omdat promotor 2 meer variatie vertoont dan promotor 3. Verder onderzoek moet uitmaken of bij promotor 2 van één of meerdere promotorvarianten moet gesproken worden. Dit maakt het zeer moeilijk om efficiënte primers te ontwikkelen voor de detectie.

6. Toekomstvisie

Met deze resultaten bestaat een basis om isolaten te selecteren voor DNA-resequencing. Deze basis moet nog uitgebreid worden door meer isolaten te screenen op EC50-waarden en interne metaalconcentraties. Dit is ook nodig om het Zn-exclusiemechanisme verder te achterhalen en bijkomend om de significante verschillen in interne Fe-concentraties (Figuur 9) en de trend in interne Mn-concentraties (Figuur 10) verder te analyseren. Na resequencing van het genoom van (medium)tolerante isolaten kan vergeleken worden met vorige data of het aantal genkopieën teruggevonden in vorige studies klopt. Ook kan nagegaan worden welke promotorsequenties aanwezig zijn in bepaalde isolaten en hoe verschillend de promotorsequenties zijn. Dat er een grote variatie bestaat in de sequentie van promotor 2 en in mindere mate in de sequentie van promotor 3 is namelijk al geweten (SNPs en INDELS). (Coninx Laura, ongepubliceerd) Samen met de resequencing van het genoom van sensitieve isolaten kan dit inzicht geven omtrent het verschil in genexpressie van *SlZnT2*, alsook verdere informatie over promotor 1. Een andere methode moet wel gezocht worden om het *SlZnT2*-gen te karakteriseren, aangezien deze en voorgaande functionele gistcomplementaties niet succesvol waren. [15] Aangezien een verschil in genexpressie bestaat voor dit gen tussen tolerante en sensitieve isolaten (Figuur 4 b), is het belangrijk om de functie van het eiwit te kennen.

De EC50-waarden en interne Zn-concentraties geven ook een basis voor het kruisingsexperiment dat volgt. Hierin is het de bedoeling om een krachtig, hypertolerant en plantengroei-promoverend isolaat te maken voor de uitwerking van de fytostabilisatietoepassing. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Dit isolaat heeft als doel de Grove den zeer efficiënt te beschermen en zo vlot mogelijk te laten groeien op Zn-vervuilde bodems, met stabilisatie van de vervuiling tot gevolg. Voor dit kruisingsexperiment is bijkomende data nodig omtrent de Zn-homeostase (karakterisatie van CDF- en ZIP-transportproteïnen), waarbij DNA-resequencing ook een rol zal spelen.

Ook moet meer onderzoek verricht worden naar promotorvariant 2, wat mogelijk wordt met DNA-resequencing. Meer en betere primers moeten ontwikkeld worden voor de detectie van deze promotorvariant(en) in isolaten en om de distributie in tolerante en sensitieve isolaten te achterhalen.

Bronnen

- [1] „CMK - Centrum voor milieukunde UHasselt: Milieubiologie,” [Online]. Available: http://www.uhasselt.be/UH/CMK/CMK_nl-Onderzoek/CMK_nl-Onderzoek-Onderzoeksgroepen/Milieubiologie-.html.
- [2] R. L. Peterson, H. B. Massicotte en L. H. Melville, „Introduction, Chapter 1: Ectomycorrhizas,” in *Mycorrhizas, Anatomy and Cell Biology*, Ottawa, Ontario, Canada, NRC Research Press, CABI Publishing, 2004, pp. 1-51.
- [3] S. Smith en D. Read, „Introduction, Section 2 Ectomycorrhizas,” in *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press, Elsevier, 2008, pp. 1-10, 189-385.
- [4] *Cadmiumvervuiling in Noord Limburg, nieuwe ontwikkelingen*, 2006.
- [5] M. Verlaek en K. Weynants, „FAQ Zware Metalen Noorderkempen 2006,” Medische Milieukundigen bij de Limburgse LOGO's, 2006.
- [6] J. Colpaert, „Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi,” in *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*, London, Elsevier, Academic Press, 2008, pp. 157-173.
- [7] L. Muller, J. Vangronsveld en J. Colpaert, „Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats,” *Molecular Ecology*, nr. 16, pp. 4728-4737, 2007.
- [8] J. Colpaert, L. Muller, M. Lambaerts, K. Adriaensen en J. Vangronsveld, „Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi,” *New Phytologist*, vol. 162, pp. 549-559, 2004.
- [9] K. Adriaensen, D. van der Lelie, A. Van Laere, J. Vangronsveld en J. V. Colpaert, „A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress,” *New Phytologist*, vol. 161, pp. 549-555, 2003.
- [10] K. Adriaensen, J. Vangronsveld en J. Colpaert, „Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings,” *Mycorrhiza*, vol. 16, pp. 553-558, 2006.
- [11] J. Ruytinx, H. Nguyen, M. Van Hees, M. Op De Beeck, J. Vangronsveld, R. Carleer, J. Colpaert en K. Adriaensen, „Zinc export results in adaptive zinc tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus bovinus*,” *Metallomics*, vol. 5, pp. 1225-1233, 2013.

- [12] E. Krznaric, J. H. L. Wevers, C. Cloquet, J. Vangronsveld, F. Vanhaecke en J. V. Colpaert, „Zn pollution counteracts Cd toxicity in metal-tolerant ectomycorrhizal fungi and their host plant, *Pinus sylvestris*,“ *Environmental Microbiology*, vol. 12, nr. 8, pp. 2133-2141, 2010.
- [13] M. Op De Beeck, *Heredity of zinc tolerance in Suillus luteus and impact of metal pollution on ectomycorrhizal fungal communities (PhD Thesis)*, 2014.
- [14] N. Witters, S. Van Slycken, A. Ruttens, K. Adriaensen, E. Meers, L. Meiresonne, F. Tack, T. Thewys, E. Laes en J. Vangronsveld, „Short-Rotation Coppice of Willow for Phytoremediation of a Metal-Contaminated Agricultural Area: A Sustainability Assessment,“ *Bioenerg. Res.*, vol. 2, pp. 144-152, 2009.
- [15] J. Ruytinx, *Mechanisms of metal homeostasis and detoxification in metal sensitive and tolerant isolates of Suillus luteus, an ectomycorrhizal fungus (PhD Thesis)*, 2013.
- [16] S. Miyabe, S. Izawa en Y. Inoue, „The Zrc1 Is Involved in Zinc Transport System between Vacuole and Cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*,“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 282, pp. 79-83, 2001.
- [17] J. Chhotu en M. Fulekar, „Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques,“ *African journal of Biotechnology*, vol. 8, nr. 6, pp. 921-928, 2009.
- [18] P. Padmavathiamma, A. Mushtaque en A. Hayder, „Phytoremediation - A sustainable approach for contaminant remediation in arid and semi-arid regions – a review,“ *Emir. J. Food Agric.*, vol. 26, nr. 9, pp. 757-772, 2014.
- [19] J. Vangronsveld, R. Herzig, N. Weyens, J. Boulet, A. K. A. Ruttens, T. Thewys, A. Vassilev, E. Meers, E. Nehnevajova, D. van der Lelie en M. Mench, „Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field,“ *Environ Sci Pollut Res*, vol. 16, pp. 765-794, 2009.
- [20] E. Pilon-Smiths, „Phytoremediation,“ *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 56, pp. 15-39, 2005.
- [21] A. Karami en Z. Shamsudding, „Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods,“ *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, nr. 25, pp. 3689-3698, 2010.
- [22] P. Favas, J. Pratas, M. Varun, R. D'Souza en M. Paul, „Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora,“ 2014. [Online]. Available: <http://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil->

contamination/phytoremediation-of-soils-contaminated-with-metals-and-metalloids-at-mining-areas-potential-of-nativ. [Geopend 1 Juni 2016].

- [23] L. Coninx, *Investigating the Zinc Homeostasis Network in Suillus luteus: Zinc Transporters (Masterproef)*, 2013.
- [24] J. Hall, „Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, pp. 1-11, 2002.
- [25] M. Bellion, M. Courbot, C. Jacob en D. C. M. Blaudez, „Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi,” *FEMS Microbiol Lett*, vol. 254, nr. 2, pp. 173-181, 2006.
- [26] T. Y. X. Li, H. ZL, P. STofella en Q. Hu, „Root responses and metal accumulation in two contrasting ecotypes of *Sedum alfredii* Hance under lead and zinc toxic stress,” *Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, vol. 40, pp. 1081-1096, 2005.
- [27] A. Cuypers, K. Smeets, J. Ruytinx, K. Opdenakker, E. Keunen en T. H. N. V. N. Remans, „The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper response in *Arabidopsis thaliana* seedlings,” *Journal of Plant Physiology*, vol. 168, pp. 309-316, 2011.
- [28] J. Colpaert, P. Vandenkoornhuysen, K. Adriaensen en J. Vangronsveld, „Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*,” *New Phytol*, vol. 147, pp. 367-379, 2000.
- [29] J. Colpaert, K. Adriaensen, L. Muller, M. Lambaerts, C. Faes, R. Carleer en J. Vangronsveld, „Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi,” *Mycorrhiza*, vol. 15, nr. 8, pp. 628-634, 2005.
- [30] L. Gaither en D. Eide, „Eukaryotic zinc transporters and their regulation,” *Biometals*, vol. 14, pp. 3-4, 2001.
- [31] H. Xiandeng en J. T. Bradley, „Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry,” in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000, pp. 9468-9485.
- [32] K. Sniegowski en R. De Waele, „Cursus Instrumentele Analyse FIIW Biochemie,” 2014-2015, pp. 92-97.
- [33] *pYES-DEST52 Gateway™ Vector: A destination vector for cloning and inducible*, 2002.

- [34] E. Krznicaric, N. Verbruggen, J. H.L. Wevers, R. V. J. Carleer en J. V. Colpaert, „Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd,” *Environmental Pollution*, vol. 157, pp. 1581-1588, 2009.
- [35] R. Gietz en R. Woods, „Transformation of yeast by the LiAc/SS Carrier DNA/ PEG method,” *Methods in Enzymology*, vol. 350, pp. 87-96, 2002.
- [36] „The yeast media page: Complex Media,” [Online]. Available: <https://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/media.html>. [Geopend 2 6 2016].
- [37] „RNeasy® Mini Handbook,” 6 2012. [Online]. Available: <http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf>. [Geopend 11 6 2016].
- [38] „Ambion (Life Technologies) - TURBO DNA-free™ Kit,” [Online]. Available: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf. [Geopend 2 6 2016].
- [39] „TaKaRa - PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time),” [Online]. Available: [http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/RR037A_e\[1\].v0610\[0\].pdf](http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/RR037A_e[1].v0610[0].pdf). [Geopend 2 6 2016].
- [40] „*Suillus luteus* DNA scaffold_117:48330-50672 (+),” JGI, [Online]. Available: http://genome.jgi.doe.gov/pages/getDnaResult.jsf?db=Suilu3&position=scaffold_117:48330-50672&assemblyFile=&strand=+&case=unch&strand=+. [Geopend 12 6 2016].

Bijlagen

Bijlage A: Genomewalkingexperiment

Deze sequenties zijn afkomstig uit het huidig onderzoek. (Coninx Laura, ongepubliceerd) Het ATG-startcodon staat telkens in het vet aangeduid. Het cursief deel is de JGI sequentie van *SlZnT2* dat in isolaat Lm8n1 gesequenced is. [40] Rode stukken zijn Primers zijn telkens onderlijnd en in een bepaalde kleur aangeduid. Aan het begin van elke promotor staat de naam van de primers in dezelfde kleur met de bijhorende sequenties en lengte nog eens vermeld. Wanneer deze primers een verschillende kleur hebben, wil dit zeggen dat twee primerparen overlappende sequenties hebben. Voor promotor 2 zijn twee sequenties te vinden. De eerste afkomstig van het in het huidig onderzoek uitgevoerd genomewalkingexperiment. Het tweede afkomstig van vorig onderzoek. [15]

Promotor 1

Primers:

1. P1PCR (ZNT2 prom1_F(_R) qPCR):

CTGCTGGCGATTTGCTCT en **CATAGAATCCCTCGGCACC** (145 bp)

2. P1PCR2 (ZNT2 prom1_F(_R) qPCR2):

GCAAAAGAGGCGTAAGGAGTT en **CATTCTCGTTACTCTACGGCT** (1366 bp)

GCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTCTGCATCTTTCTTCGCGCGCTCCAGTTGAATCTCATGCCTCA
AGAGCATCTCTTTGGTATCAGGTGAGCATACTACACGGGCAGCAAATGATTTTGACGATAGGCCG
AGAATGTGGTCGGTATGGGAGTGGGTGAGGAGATATAATGCTGGTGTGTTGTATGGAGCTGGA
AGGTGAGCTGTGCAGGTGAAACAGTCAACACGGATGGGATAAGGAAGT**GCAAAAGAGGCGTA**
AGGAGTTCCTGGGGGCATCGCTAGGTGTCGACGACTATGGGTGAACACTGAAGTACTGAAGGA
GAAACCGAGAAAGCATGTAAGAGAGAGTTGTGTGAAAGTCAGAAAGAGTCAGAGCTGCAGCGC
AGGATCCGGACAGGAGGTGACCGCGACCAAATGGGACTCAAAGTCAGATGCCCCAGTGATTG
GTCACGTGTCATACCATTTTCTCAACTGCTGTGCGAGACTCGGCACCGCGGCGACAA**CTGCTGGC**
GATTTGCTCTAGATTTGCTTTCTTGCGCTTTGAAATTTGTTGAAGGCAGTCTCCTCGGTGTCGACG
TGTTATCAAGAACCCACACCGACATGGATGAACTTATCCAACGTTGAGGTAT**CATAGAATCCCTC**
GGCACCCACGATGATCGGAGAGCATCCACACAGTGCGCAACGATTCAATATATCACGCAGGCCA
GATAGCAGGTGTGGTATTGACACACCCTATCCACCAAAGTCAGATTGATCTTGACCAGTGAGCG
CCTACAAGTACTCGGCGATGGTGACTGAAACACCTTATCAGTTTACATATTAATAATTGCAGCAA
ATATCTCGCAACTTCTTCTCCTTCCCCATTATGTTACGCCACGTGACCCATTGTAACAATACTAG
TGGAAGCAACGTGAGTTTACGCGGAGACTGCGTGCTTTGAGTTGAGCCCTAACTACAATCGAG
AATTTACCGCATGCACCCATGGCTTAGCTCAAGTCTTACATTATAAGTTAGACAAGTTGAACGTG
TGCCGGAGACCCGTATCCTGCAAGGTGGACACGCGGAGTAATTGTGGCTTCGAGAAACGTTGAT
TCCATCACACCACAATTTCAAAGTCTTTGTCCTTTGTTAACTTCGATCTCCCATGCTCGACATTCGT
TTTTAGTACTTATATATAAATCCCTCCCTCATTCTTTCTCTACTACGAAGAGTGCCAACCACA**ATG**
GCATTATCTCGTTCAGCTCGCATCAC**ACTGTTGCTCGTCATCGACATTTTATTCTTCTTCTTAGA**ACT

CGTCGTCGGTGAGCCACATCTTCAGCTGTTGCTTTGGTCGATGATCGAATTTACAATTCAACAGGT
TATGTCGTTGGTTCTCTTGCTCTCGTCGCCGATAGCTTCCACATGCTCAAGTGAGTGTCAGCCTTAA
AGTCTACGACATATGTTTTGTGACCATGCCATTGTCAGTGATGTGATGAGCTTGGTCGTCGCTTG
TATGCTATCAAGGTTTCGAGCCAGACCTAGCTATTCTTTGTTGCTTTAGTGAACATAATATAACAGCT
GACGGGAAAGACCGCCGATCATTCTCGTTACTCCTACGGCTGGCAAAGGGCCGAAATTCTTGCA
CTTTAACCAATGCTGTTTTCTACTTGCATTATGTTTCTCTGTTGGCTTGCAGGCAGTGGAACGCTT
CTCCAGTATTCAAGGTTAGTCCAACGCGTACTTCATACATACCTTCACAAACACCCTACTATCAAGA
CGTATCGCACCCCTTCTCGTGGTTATAGTGGGAGCTTGCGGTCTGGCCTCAAACGTTTTCGGATT
TCTCTTATTCCACGGTACTGTGCTCTATTTCAACTACCTCGCCATATTTATCATCCATGTCTCAGAA
CATGGTCACTCTCATTGCGATGGCCATTCTCATGGCGACAAGGGCCATGCACATGCAACGCATAACC
GTCACCAACGATATTCCCGTCCAGGACTCATCCGCCACTGTCCGCGCTCGCACAGGATCTTACTCGT

Promotor 2

Huidig onderzoek

Primers:

1. P2PCR (ZNT2 prom2_F(_R) qPCR):
CGGGCTGGTAAATAATGGAATGT en **AGAACTGTAACACGATCTCCCA** (97 bp)

TACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTAAATAATGGAATGTTCTGGAAGATGTA
ATGACGTCAAATAGAATAGTAAAGAAGAAAGAGAAAAATAGAACTGTAACACGATCTCCCATG
TCGACATTCGTTTTAGTACTTATATATAAATCCCTCCCTCATTCTTCTCCTACTACGAAGAGTGCC
AACCACAATGGCATTATCTCGTTCAGCTCGCATCACACTGTTGCTCGTCATCGACATTTTATTCTTC
TTCTTAGAACTCGTCGTCGGTGAGCCACATCTTCAGCTGTTGCTTTGGTCGATGATCGAATTTACAA
TTCAACAGGTTATGTCGTTGGTTCTCTTGCTCTCGTCGCCGATAGCTTCCACATGCTCAAGTGAGTG
TCAGCCTTAAAGTCTACGACATATGTTTTGTGACCATGCCATTGTCAGTGATGTGATGAGCTTGGT
CGTCGCTTTGTATGCTATCAAGGTTTCGAGCCAGACCTAGCTATTCTTTGTTGCTTTAGTGAACATAA
TATAACAGCTGACGGGAAAGACCGCCGATCATTCTCGTTACTCCTACGGCTGGCAAAGGGCCGAA
ATTCTTGCACTTTAACCAATGCTGTTTTCTACTTGCATTATGTTTCTCTGTTGGCTTGCAGGCAGT
GGAACGTTCTCCAGTATTCAAGGTTAGTCCAACGCGTACTTCATACATACCTTCACAAACACCCTA
CTATCAAGACGTATCGCACCCCTTCTCGTGGTTATAGTGGGAGCTTGCGGTCTGGCCTCAAACGT
TTTTCGGATTTCTTATTCCACGGTACTGTGCTCTATTTCAACTACCTCGCCATATTTATCATCCAT
GTCTCAGAACATGGTCACTCTCATTGCGATGGCCATTCTCATGGCGACAAGGGCCATGCACATGCA
ACGCATACCGTCACCAACGATATTCCCGTCCAGGACTCATCCGCCACTGTCCGCGCTCGCACAGGA
TCTTACTCGTCGATGTACGGACACCCAGCCGCTACCCGAGCTGCAGTTTACAAGCCGCGCAGGAT
ATTGCCATAGCATCCCCTAGTTCA

Vorig onderzoek

Primers:

1. P2PCR2 (ZNT2 prom2_F(_R) qPCR2):

ACGTGGTGGTTAGTTCTTCGAA en **ACTATCAAGACGTATCGCACCC** (1398 bp)

2. P2pair2 (PCR prom2 pair 2 F (R)):

CCGATTTCTTTAGGCATGTCGT en **GCTCTATTTCAACTACCTCGCC** (1265 bp)

3. P2pair3 (PCR prom2 pair 3 F (R)):

CGTGGTGGTTAGTTCTTCGAAA en **ACCTCGCCATATTTATCATCCATG** (1511 bp)

CTCGNCNNTNNNCANNNTTCTNNNATCTCCGTGCGATCTATGTCCATCGCNTACGGATCCTTGCT
TNGTGANAGGAGGGCTGATNAGCGTCTCCTNNCTTCGACGTCAAGGGCNTGTCNAGCCAGCCG
TCGAGNGTNTCNGGNATNTTCTCGAAGGCGAGGATAGCGGAGACTATCTCGCGNTNGAGACCG
TNNCTAAGGAACATGATGCGNGTGGCTTCTTCGGTNATNCCGGTGTGCGCNATNATGGTTCTAT
ANANNATGCGTAAGCGGCTACGCTGCCGGTCTGTTTCANGGANANATGCGGCGTATAGCCG
TCATGCCACGTTCTTCGGATANAANAGNTTNTTGA**ACGTGGTGGTTAGTTCTTCGAA**CTNCCA
TANNTTTCGGCTTCTACTGCNACTTTCAACTTCCCNTTCTGCCATTTGGCAGCCTCGCCTTTAGTC
ATNCGGCTGAGGAAGAAGATGACTTTCTTCTTGTGCTGTCGTATAACNTCGTCGTTTATNTGAAG
GTAGGCTATCATCTGNAGATACCAACCTTGGGCNACGCGAGTGTGCCATTGAAGGGGGANGG
AGCGGTG**CCNATTTCTTTAGGCATGTCGT**CGTNGTTTGGGGNTGTGGGGATGGNTTCTNTANGAG
TGGGTCCAAAAGTTCCACTGNTGTNCTGCCGGTGCCTTGGCTTTCCTAAAGTCNGACCACTCTTG
TAGTGNCCAAACGTTTCCGTTCTCGTCTGGGAGGGTAAACTCCTGTCGTTCTTCGCTCCAGATAAA
ACCTGGAGGAGTGGGGATCTGAGACGTGGTGTCTGGTTCTGGGCGCCTGTTTCGAGTGAANGGC
GCAGATGTNGATTAACCTTGACTTTTGTTACGCTCGGCGTTGGTTAGACGTCTTAGTATCAAAGT
TCAGAGTCAAAGTCAATGTTCTATAGCNAGTAAGCTAGTCTGCAGGCCCTGGTCTGCGTAGGTCA
AGTTANAGATANAGGAAGTAAATAGTAGNGTTTATATAGGGANGCGTAATNNGGGTTAAAGCG
GAGCTTTAAATAATGGAATGTTCTGGAAGATGTAATGACGTCAAATAGAATAGTAAAGAAGAAA
GAGAAAAATAGAAGTAAACACGATCTCCCATGCTCGACATTCTGTTTTTACTTATATATAAAT
CCCTCCCTCATTCTTCTCCTACTACGAAGAGTGCCAACCA**ATGG**CATTATCTCGTTCAGCTCGC
ATCAC**ACTGTTGCTCGTCATCGACATTTTATTCTTCTTCTT**AGAACTCGTCGTCGGTGAGCCACATCT
TCAGCTGTTGCTTTGGTTCGATGATCGAATTTACAATTCAACAG**GTTATGTCGTTGTTCTCTTGCTC**
TCGTCGCCGATAGCTTCCACATGCTCAAGTGAGTGTGAGCCTTAAAGTCTACGACATATGTTTTGT
GACCATGCCATTGTCAG**TGATGTGATGAGCTTGGTCGTCGCTTTGATGCTATCAAG**GTTTCGAGCC
AGACCTAGCTATTCTTTGTTGCTTTAGTGAACATAATATAACAG**CTGACGGGAAAGACCGCCGATC**
ATTCTCGTTACTCCTACGGCTGGCAAAGGGCCGAAATTCTTGACGCTTAAACCAATGCTGTTTTCT
ACTTGATTATGTTTTCTGTTGGCTTGCAGGCAAGTGAACGCTTCTCCAGTATTCAAGGTTAGTCC
AACGCGTACTTCATACATACCTTCAAAACACCCT**ACTATCAAGACGTATCGCACCCCTTCTCGTG**
GTTATAGTGGGAGCTTGCAGTCTGGCCTCAAACGTTTTCGGATTTCTTATTCCAGGTACTGTC

**GCTCTATTTCAACTACCTCGCCATATTTATCATCCATGTCTCAGAACATGGTCACTCTCATTTCGCAT
GGCCATTCTCATGGCGACAAGGGCCATGCACATGCAACGCATACCGTCACCAACGATATTC**

Promotor 3

Primers:

1. P3PCR (ZNT2 prom3_F(_R) qPCR):

GGAGTCGCCGAGAGATTAGC en **GAGGTCATGATTGCGCGTC** (113 bp)

2. P3PCR2 (ZNT2 prom3_F(_R) qPCR2):

TGTGTTCTTTTCGTCTGAAGTCT en **ATGTCGTTGGTTCTTTGCTCT** (1615 bp)

3. qPCR prom3 pair 2 F (R)

AGTGGCAGAAGAGGTCATGATT en **CGAGAATGCGAATCTCCACAAG** (194 bp)

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTCTGGAGCGTCGCGTATCTGCGATGGTAT
GGATTAGATGTGTGAGAGATGTGAGAGAGAGTATATGCGCAACAGGAAGAGGCCCGTGCCTTC
AAATGAGTGAGCATGTACAGAGAGTGCATATAGTCTTATCGACCATGCGGTATCATGTTCAAAC
TCACAAAGAGCATCCGAGAAAGATGTATGTAGAGGGCGCAAGTGAAATGTGATAAGAGTACGCAC
AATTTCTGCAAATTCTGCTGCTGTTCCCATCTGTGGGGAACTCGCTTGAGTTGATTTTCGTCTGTTG
ATGGAAGTGCTTCTCGAGCCTCGATATGATAGATGACGACAGACGCGATATTTGTCTGGGGTGCC
ATTAACACCTTTTTGACTACGACTTGGAGAGGGGAGGAGCGGATATGGCCGATTTTGGCATAGA
GTTGCTCATGAGAATACGGGCCCGGAAACGACCTTCGCTAGCTCATCTGCGATATACTCGTCG
CAGACGCCACGATAAATGTCCGCGCCCGGTAGATTTTGGGGAGTGTAGGAGGAGACAAGAGGA
GCCATGTCACCGATGGGAAAGCCGTGGCGGAGTTTCCACATGAGTTCGGGAAACTGATGGGTGA
GTTGGTAGCTTCGAGCAGATAATCGAAACCTTCGGGCGAGTATGGTGTGTTGACGAGAGAGTA
ATCGTGATCAAGATCATATGGAGACGCTTGTGTTTGCAGGTTATTGAAATATATGTGCCTCGCGGC
AGGTTGGCAAGATGCTTCAAGATGGGGAACGTGCACCAAGAAAGAATCCTCATCTACGAGGTCA
GAGACAGGAGCGGGAGAGGGCGCCATGATCGGCTCGCCACAGAATGAACACAAATGTTGCTC
GGAATGGTCTCGCTTGCATTGACGACGAGGGTTGTTGAGATTGAATCCGATACAGAGTTGAGAG
CTGTTGGAACGTCTGCAGAGGTTTCCGCTGAGTACTTCGCGAAAGCT**TGTGTTCTTTTCGTCTGAA**
GTCTCTTCAGTGACGCAGAGAATCGATGACCGGTACGTCCGACAGATGATGCACATGGGGTCAA
CAGACTTGGCAGCTTTGGAGTCTCGAAAGGAAGACTGGTCCGCGTCTGATTTCTTCGACTGACGC
TTGACAGATGAGTCTTTGTCATACGGCTCAAAGCGAGAGGGCCAGCGACAGCGGAGCGATCAA
CGAAGGAGGATGAACGAAGTTGCTCTGCGTGACGAAAAATTTCTGCTTGTAAAGGTGGCATACTTC
TTTTTCTGTAAACGATGGCTCCACTCTGCCTCGTCATGCTGATGTGGGCGTAAGGCATAATTCTGC
CTAGTTTCGATATCAAATCCAAGATGGCTCGAAAATTTCTTCGAACGGCGTCATCCTTGCAAGA
GTGTTGAAGTGAGAGCTCCATCGTTTACGGATGGTTCATCACCGACGTCAGCGATCCATGTAAG
ATAACGTTGGAAGGCTCTTGCCAGGTGAGAGGATCTAAGTCACGCTCGTTCTCGAACTGCGTCA
AATCGAGAAGGTGGTGGAGAGACCCGTTAACGTGCACCTTAGTACGTTTGGGGAGTGTCTTCA
CGATGCAGACGCTCTGTGTTCTTATTGGAAAAGAGAACGAGGGGGCAGTATTCACCAGCGTTAG
CTAGATCTTGGATGAAATGATGGATCCCGAAATTGTATGAAGAGTCGAGGCCACTAGTGACAGC

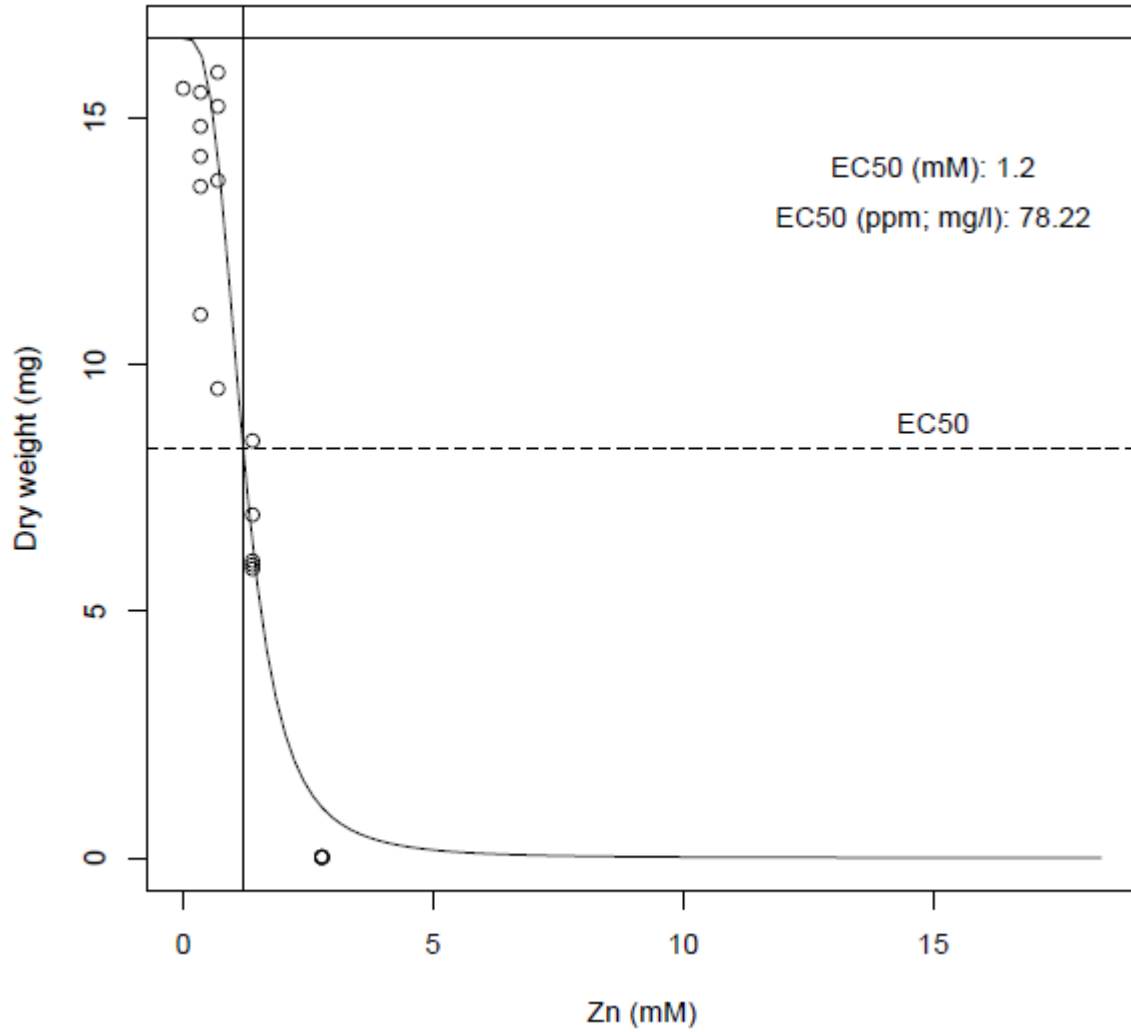
GGTCTCCTGGGAGGTGTTGAACAGAACCTTAGAGACGGAGGCAATGGTTGGTCTCGCGCTAGGT
ACTTTTGGACCGACAATGCTGTGCGAGCACAGCACTACCCTGAGCCTGCGAATTGGGGGAAAGATT
GACGAAAGCAGAGATCCACTGTTGCAAACCAGTAGCGGTAGTGGGAATGGGCAAAGGGGTTTC
GTCTGCGGGGACGTTTAGTTCACCTGCGTCTCTGCGAATTTGCAGAGCCGCGTTGTCAGTGACTC
GGCGAGCATTCTCGGCCACGACTTGATCACGAGTCATTTGGGGCCCCGTGATGGCGGGAGTCGC
CGAGAGATTAGCAGAAGTAGCTCCTAAAGGAGTTGCAGAAGCGGTGGCTACAGGGTTACCTGA
CGCGTTGGAGTGAGTGGCAGAAGAGGTCATGATTGCGCGTCAGAAGAGATGGACTAAAACG
TAGGGCGCCGCACAAATGGGGAGAGGGAAGTAGAAGAGAGAAACACAAAACGGCGAATCTTCG
AAGCAGAGCAGTATTTGAGTGCAGGCGCACAGACCAGTGCCATTCTCGTTCCGAAGCACGAGAA
TGCGAATCTCCACAAGGACGCTTACAAAGGCCCTTTTACATGCGTCAACGATCGCAAGCTCACG
ATCCGCTCGGAACGTACACGTTTTAGTACTTATATATAAATCCCTCCCTCATTCTTTCTCCTACTAC
GAAGAGTGCCAACCACAATGGCATTATCTCGTTCAGCTCGCATCACACTGTTGCTCGTCATCGACA
TTTTATTCTTCTTCTTAGAACTCGTCGTCGGTGAGCCACATCTTCAGCTGTTGCTTTGGTTCGATGAT
CGAATTTACAATTCAACAGGTTATGTCGTTGGTCTCTTGTCTCGTCGCCGATAGCTTCCACATGC
TCAAGTGAGTGTGAGCCTTAAAGTCTACGACATATGTTTTGTGACCATGCCATTGTCAGTGATGTG
ATGAGCTTGGTCGTCGCTTTGTATGCTATCAAGGTTTCGAGCCAGACCTAGCTATTCTTTGTTGCTTT
AGTGAACATAATATAACAGCTGACGGGAAAGACCGCCGATCATTCTCGTACTCCTACGGCTGGC
AAAGGGCCGAAATTCTTGAGCTTTAACCAATGCTGTTTTCTACTTGCATTATGTTTCTCTGTTGG
CTTGACAGGACAGTGGAACGCTTCTCCAGTATTCAAGGTTAGTCCAACGCGTACTTCATACATACCTT
CACAAACACCCTACTATCAAGACGTATCGCACCCCCTTCTCGTGGTTATAGTGGGAGCTTGCGGTC
TGGCCTCAAACGTTTTCGGATTTCTTATTCCACGGTAAGTGTGCTCTATTTCAACTACCTCGCCAT
ATTTATCATCCATGTCTCAGAACATGGTCACTCTCATTGCGATGGCCATTCTCATGGCGACAAGGG
CCATGCACATGCAACGCATACCGTCACCAACGATATCCCCTCCAGGACTCATCCGCCACTGTCCG
CGCTCGCACAGGATCTTACTCGTCGATGTACGGACACCCAGCCGCTACCCGAGCTGCAGTTTACA
AGCCGCGCAGGATATTGCCATAGCATCCCCTAGTTCACACCAGCGAAACGCCTCATCATCATCCTG
TTCTATACGGGTGGTTCCTCGACGGTAAGGTGGAAATAAACATCACGGAGACTCCTTGTCTCGATC
ACAGGCAAGACAAAATCGAATCCTCCACAATGCCCCACTTCCGAGTGGTCACAGTCACAGTCATG
ATCATTACATGGGTCAATGAATATGCGTGCCCTCATGCTTACGTCATGGGTGATGCTCTCGGCA
ACATTGGTGTAATTGTGACAGGTCTTGTCATCTGGCTCACCAGTTGGAGTGGTTCGGTTCTACCTTG
ATC

Bijlage B: EC50-waarden en absolute groei isolaten

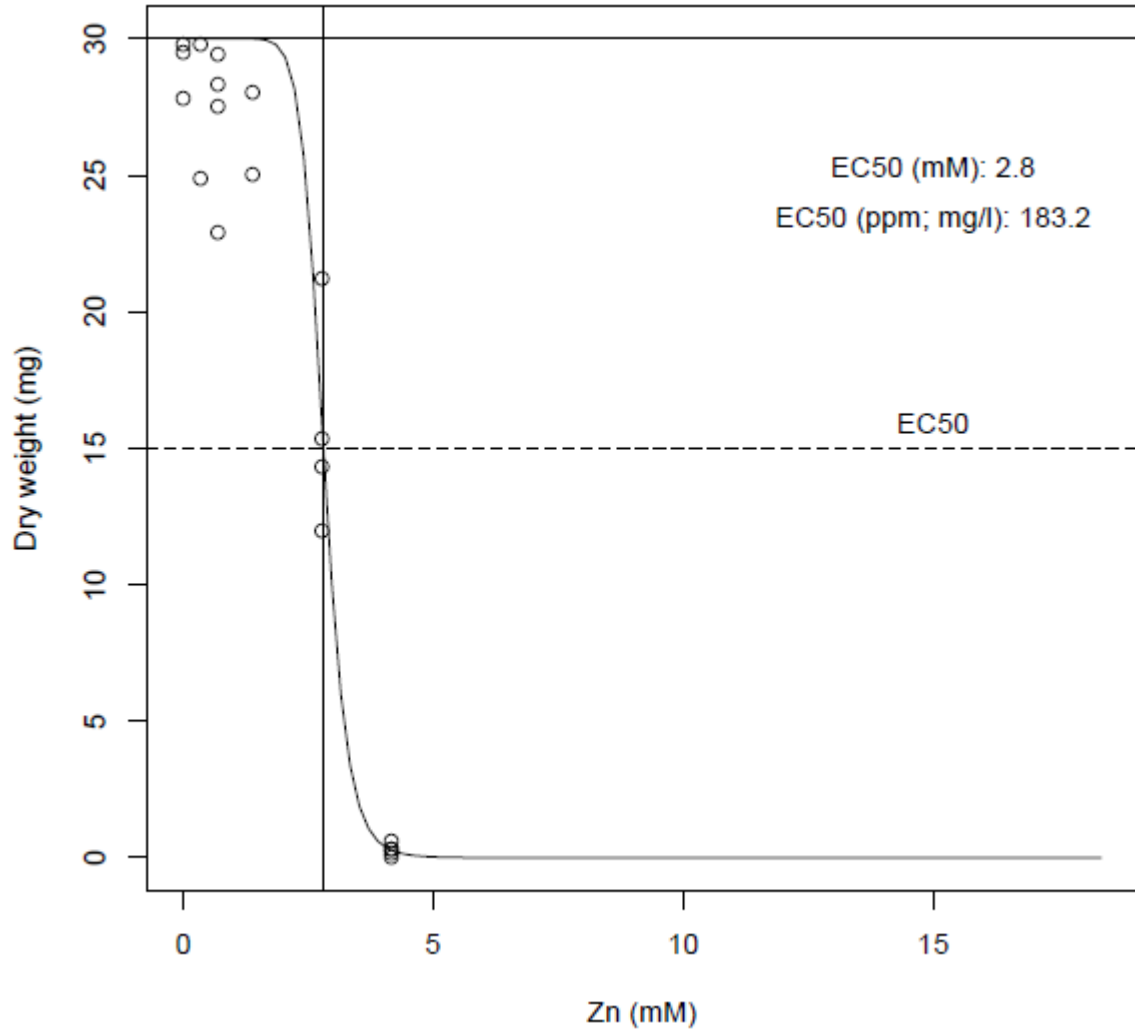
Deze worden weergegeven in dezelfde volgorde als in Figuur 7 en in Figuur 12 tot 14. De grafieken zijn afkomstig van statistisch programma R 3.2.2.

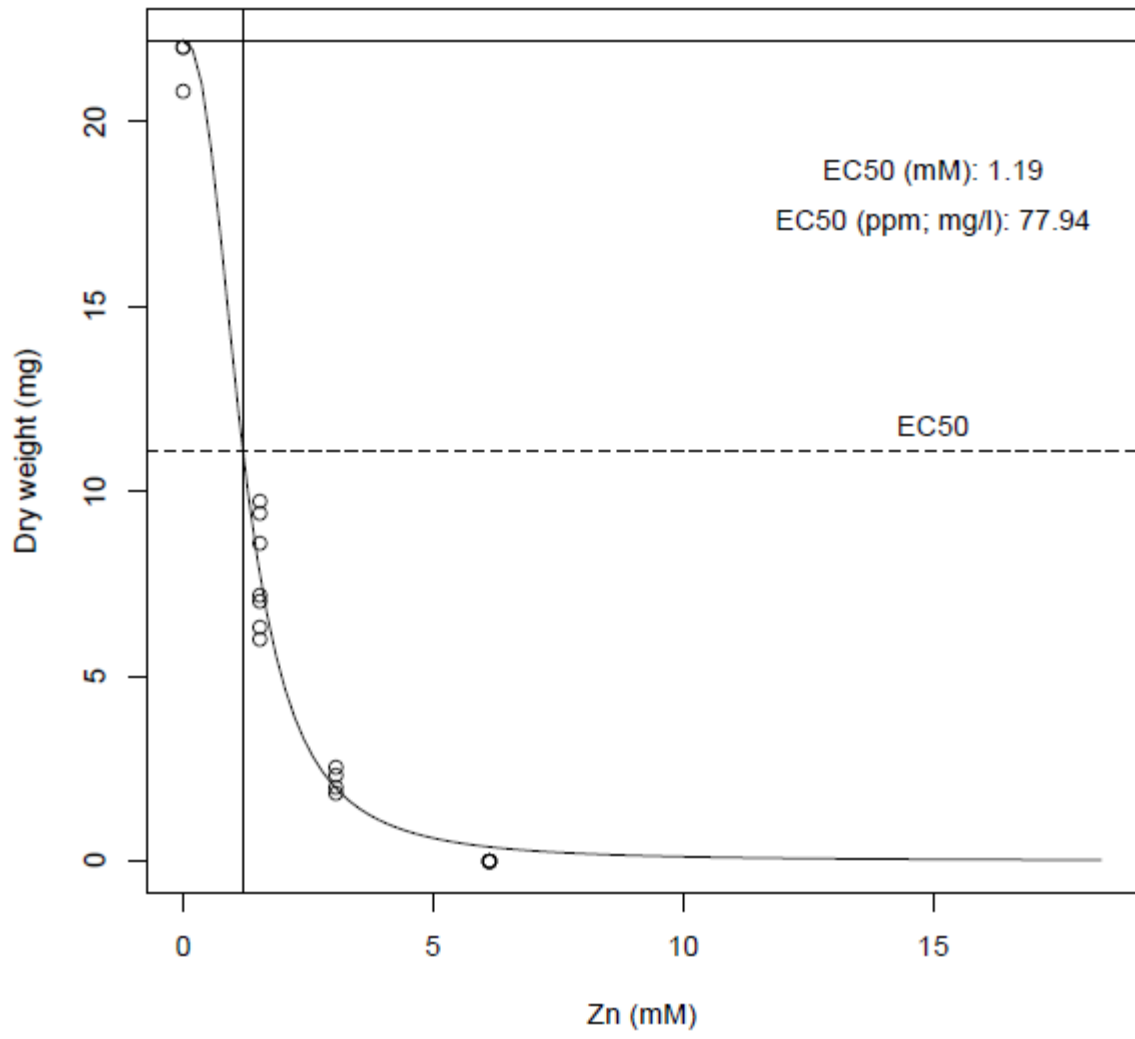
Sensitieve isolaten

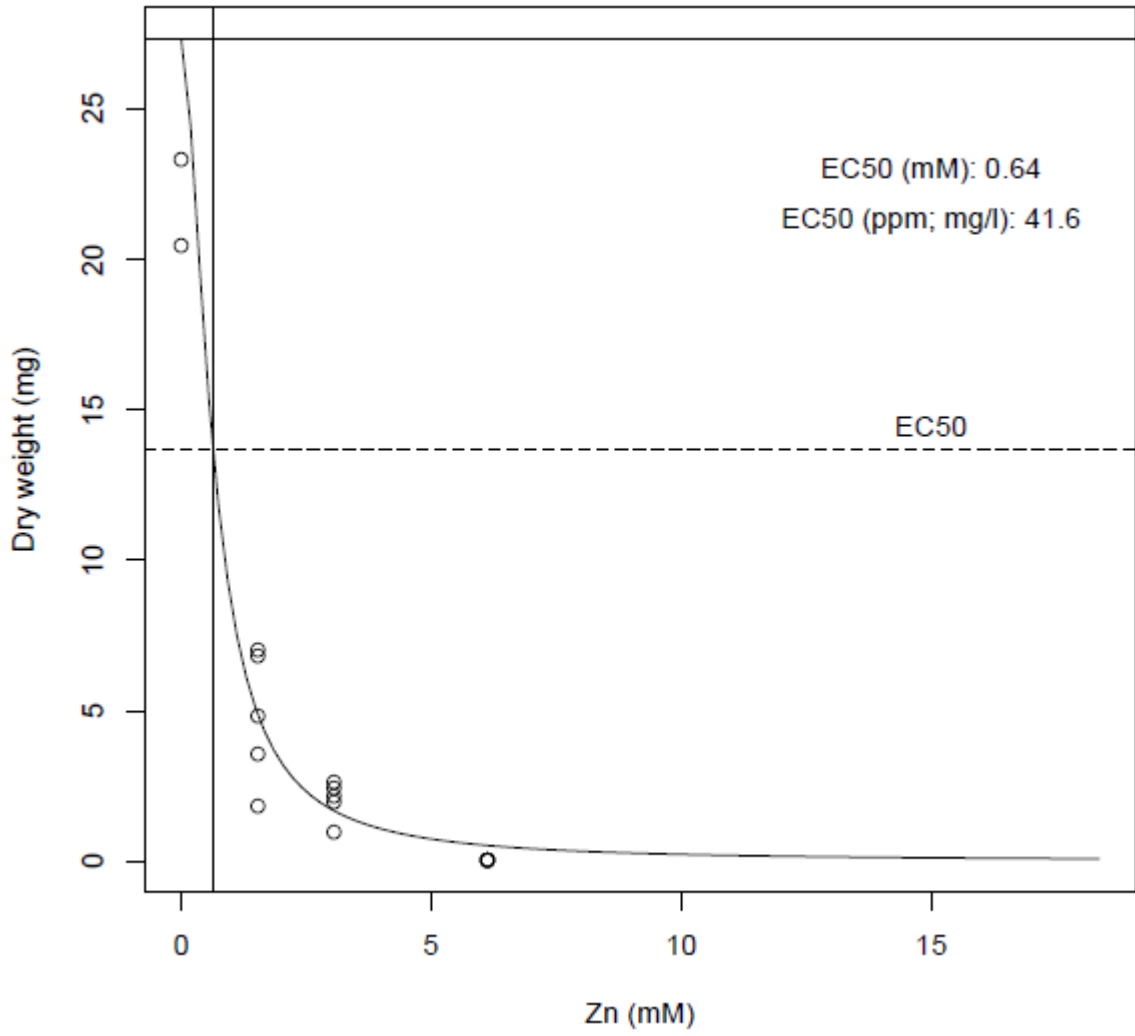
HH19



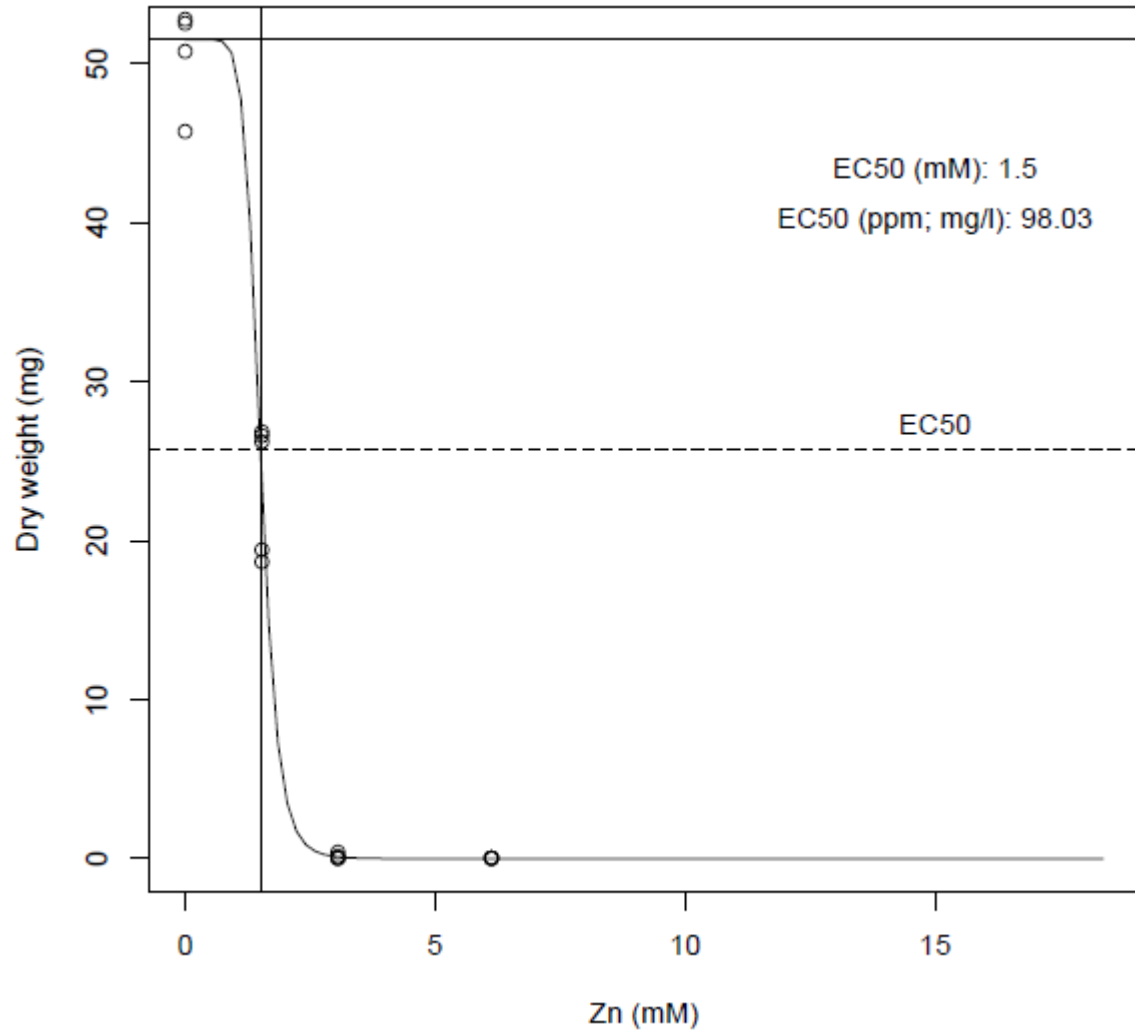
Mg4



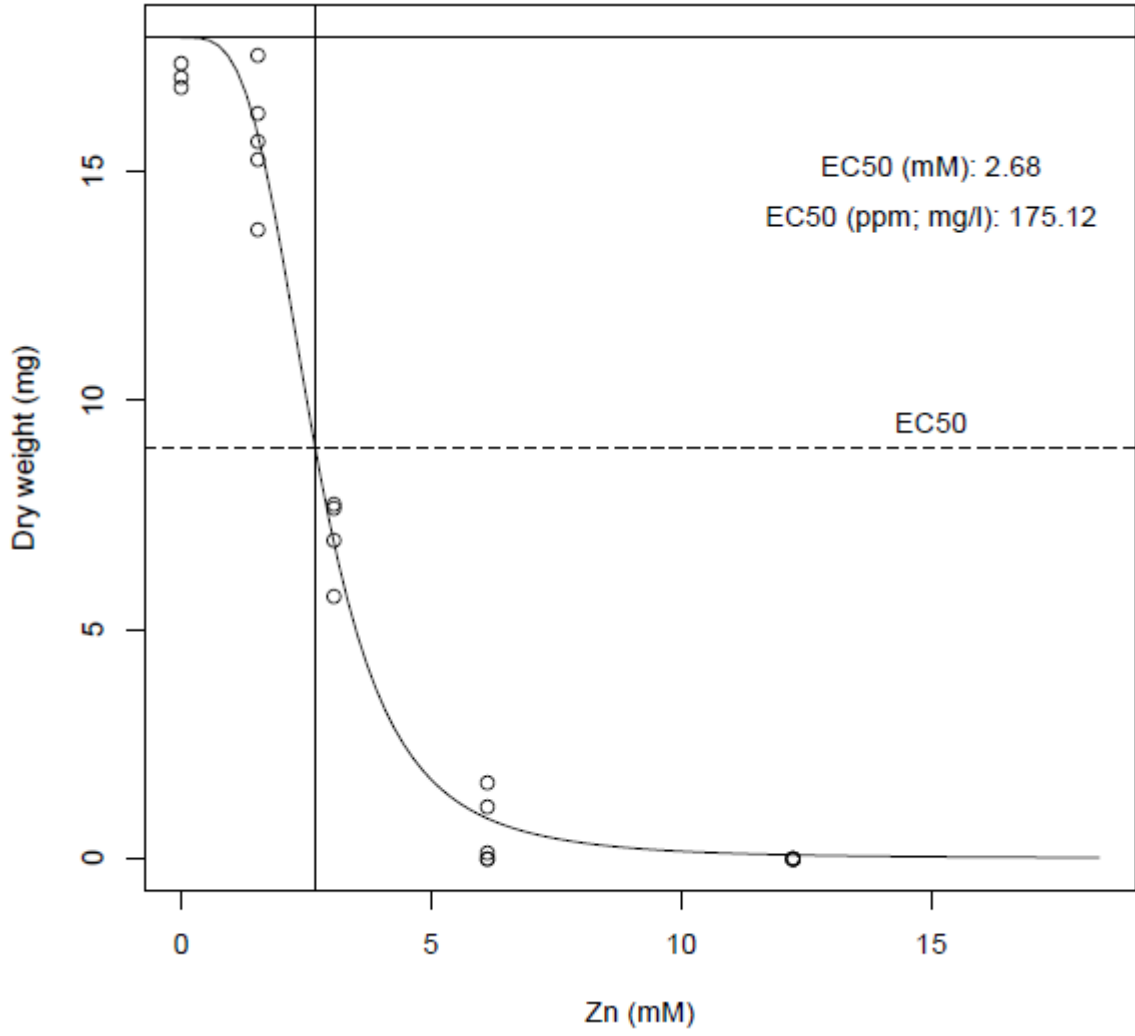




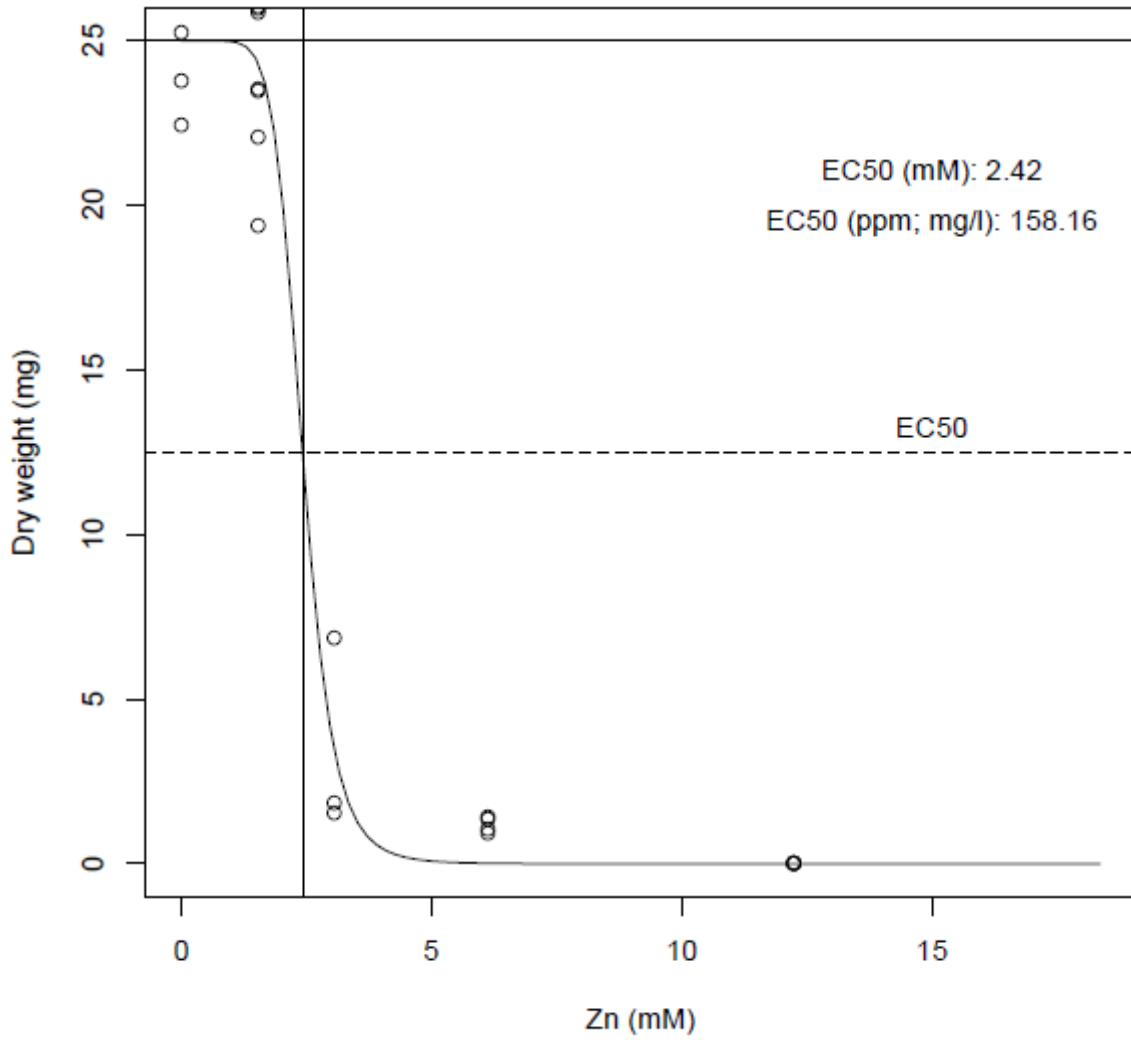
PD13



PD1

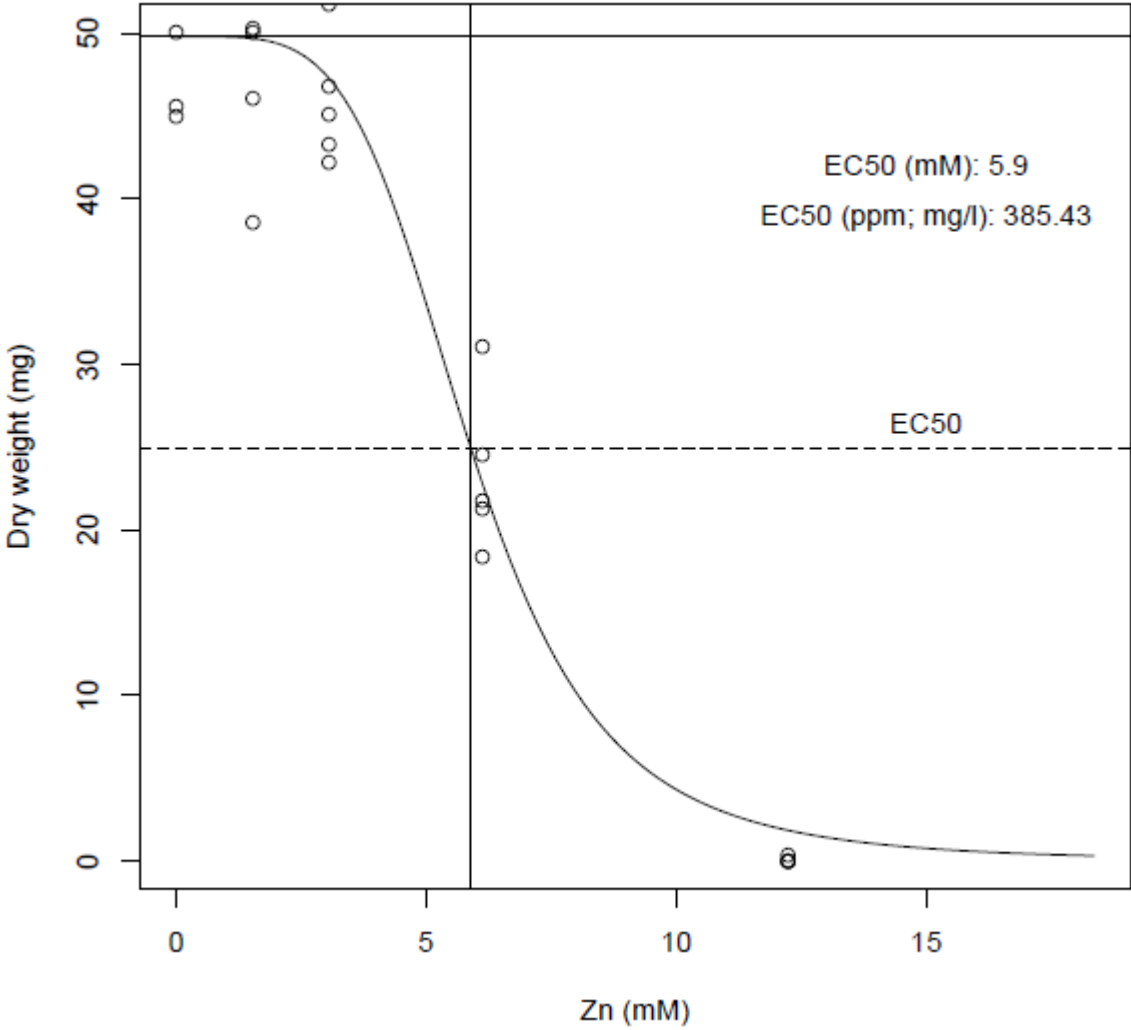


PD23

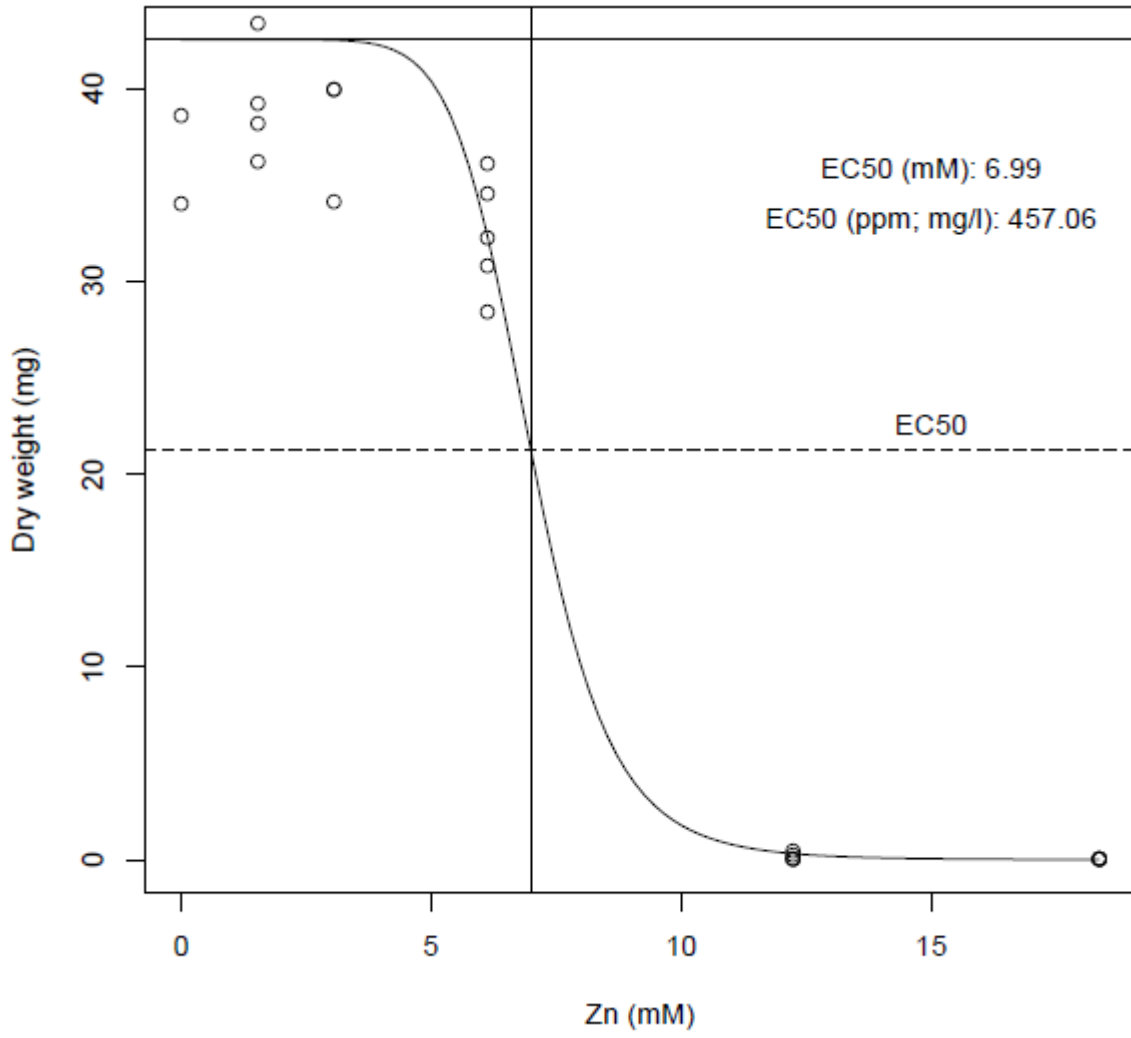


Mediumtolerante isolaten

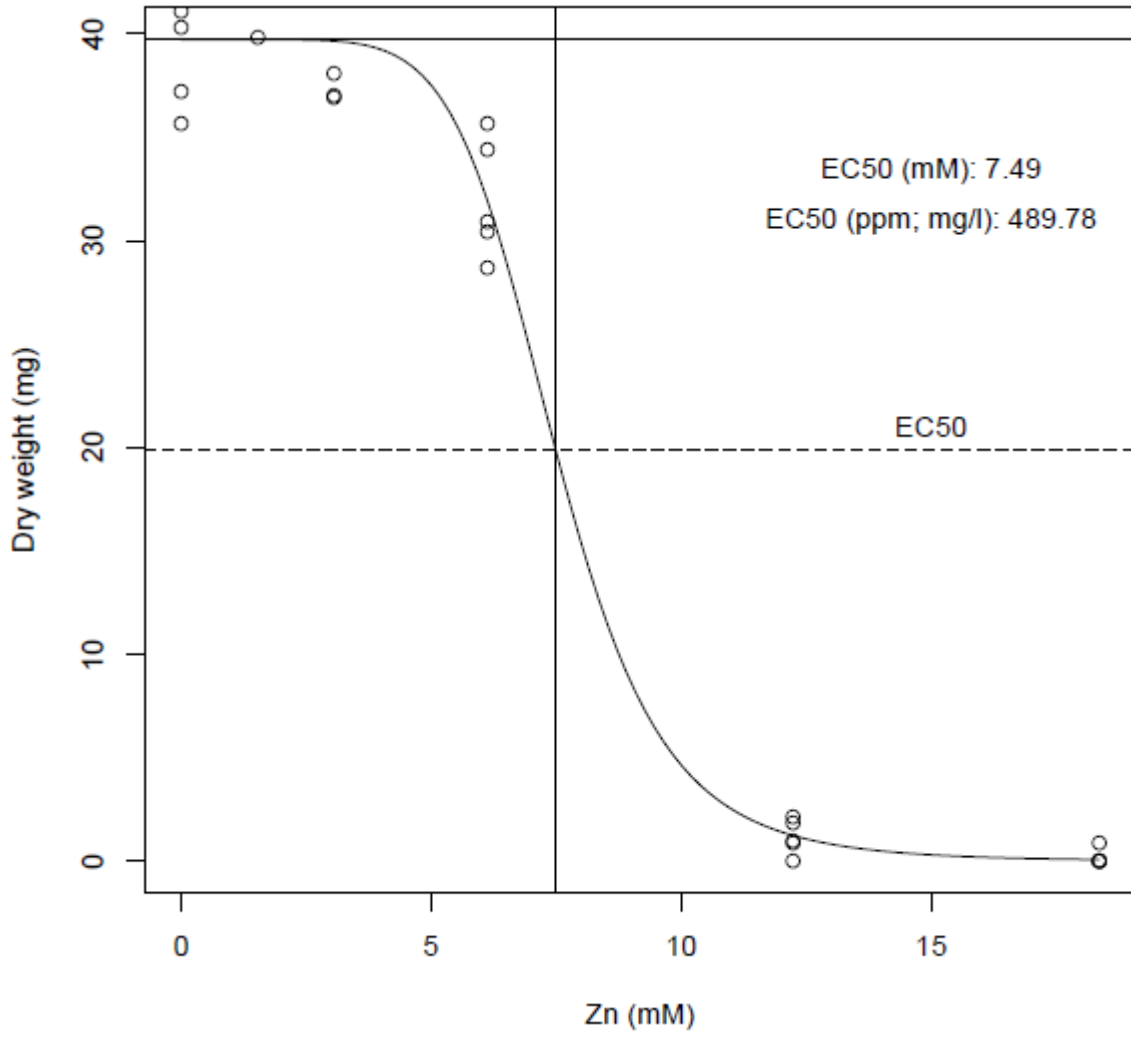
LMSL8



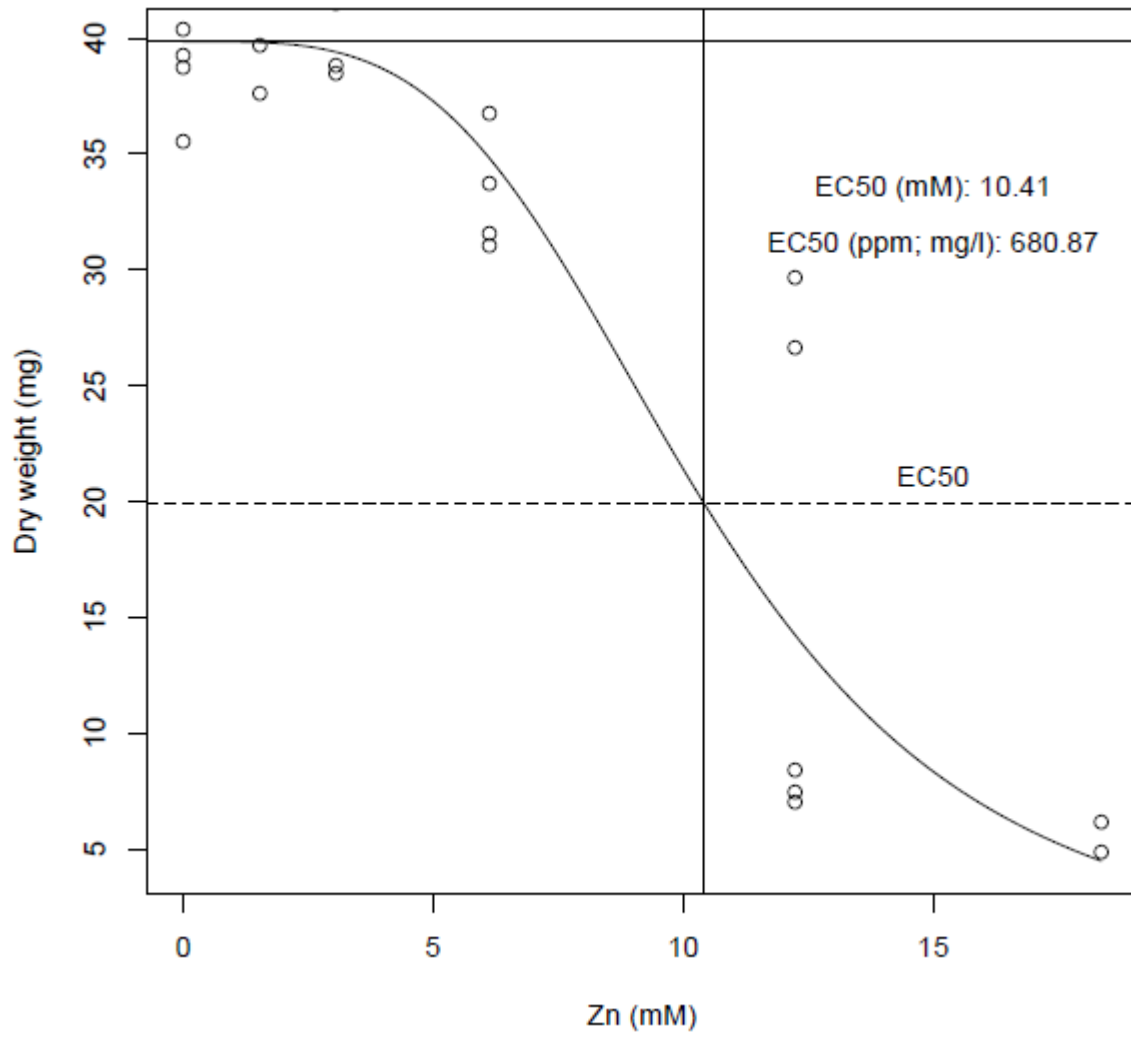
SLLS4



PD5

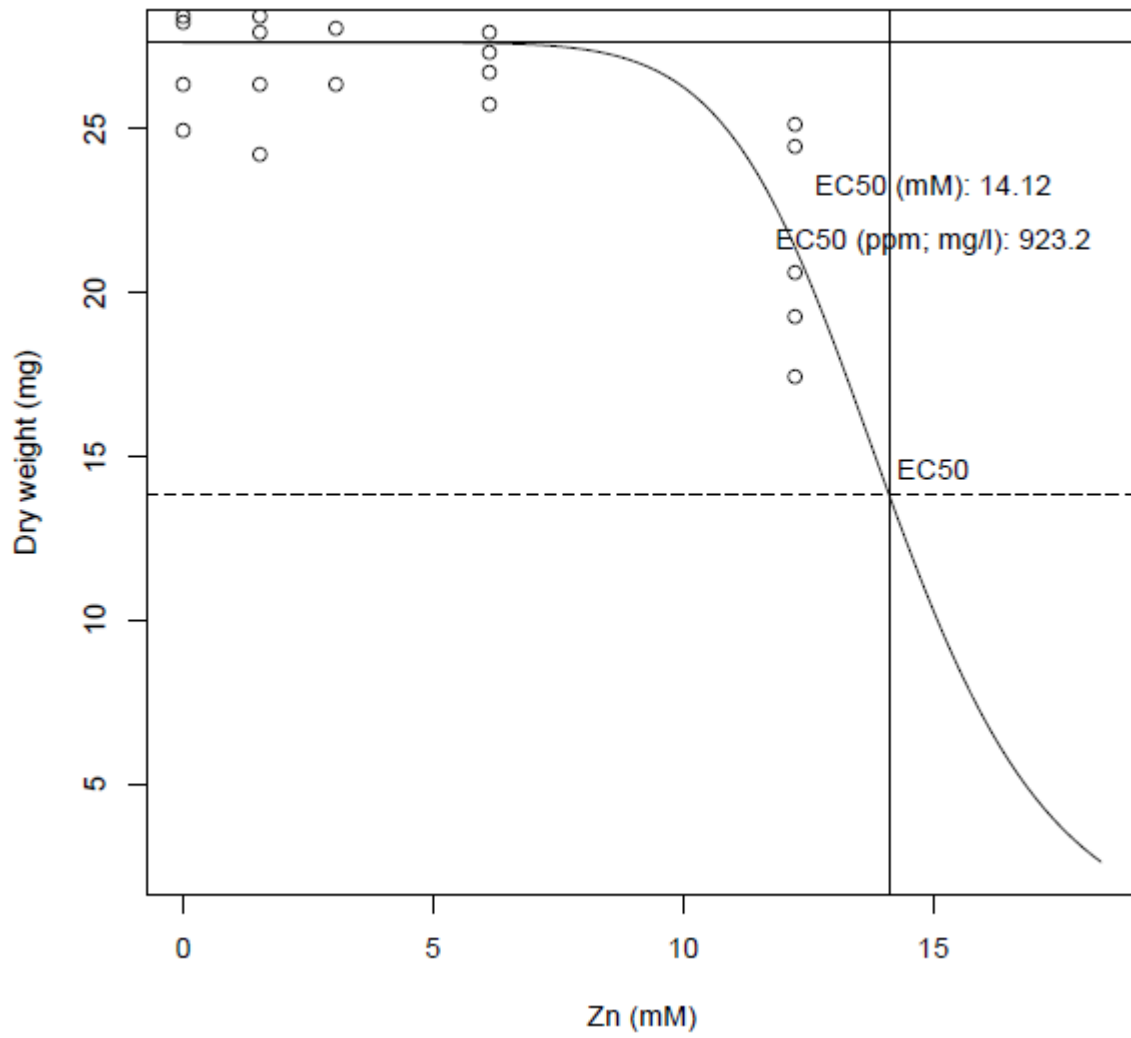


LS4

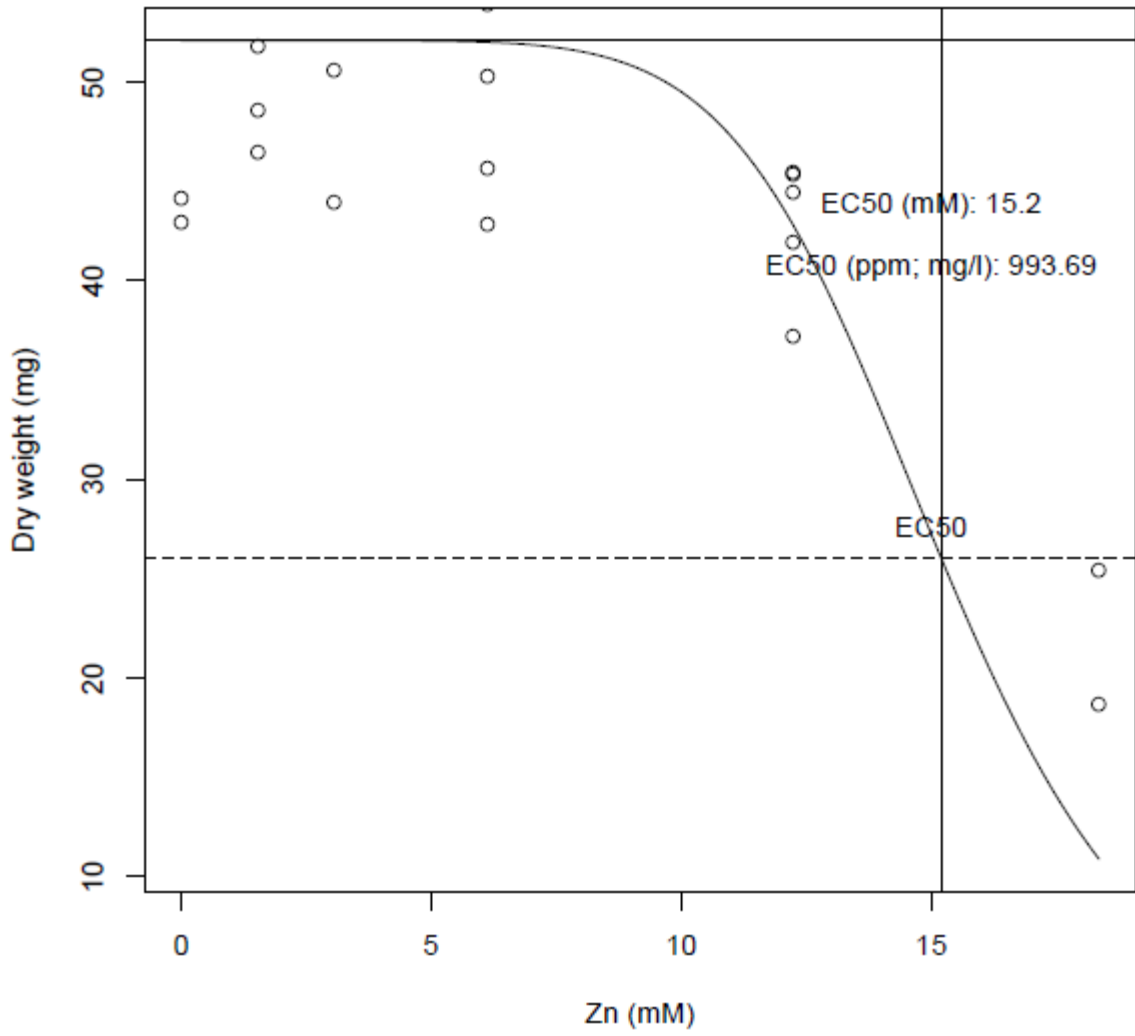


Tolerante isolaten

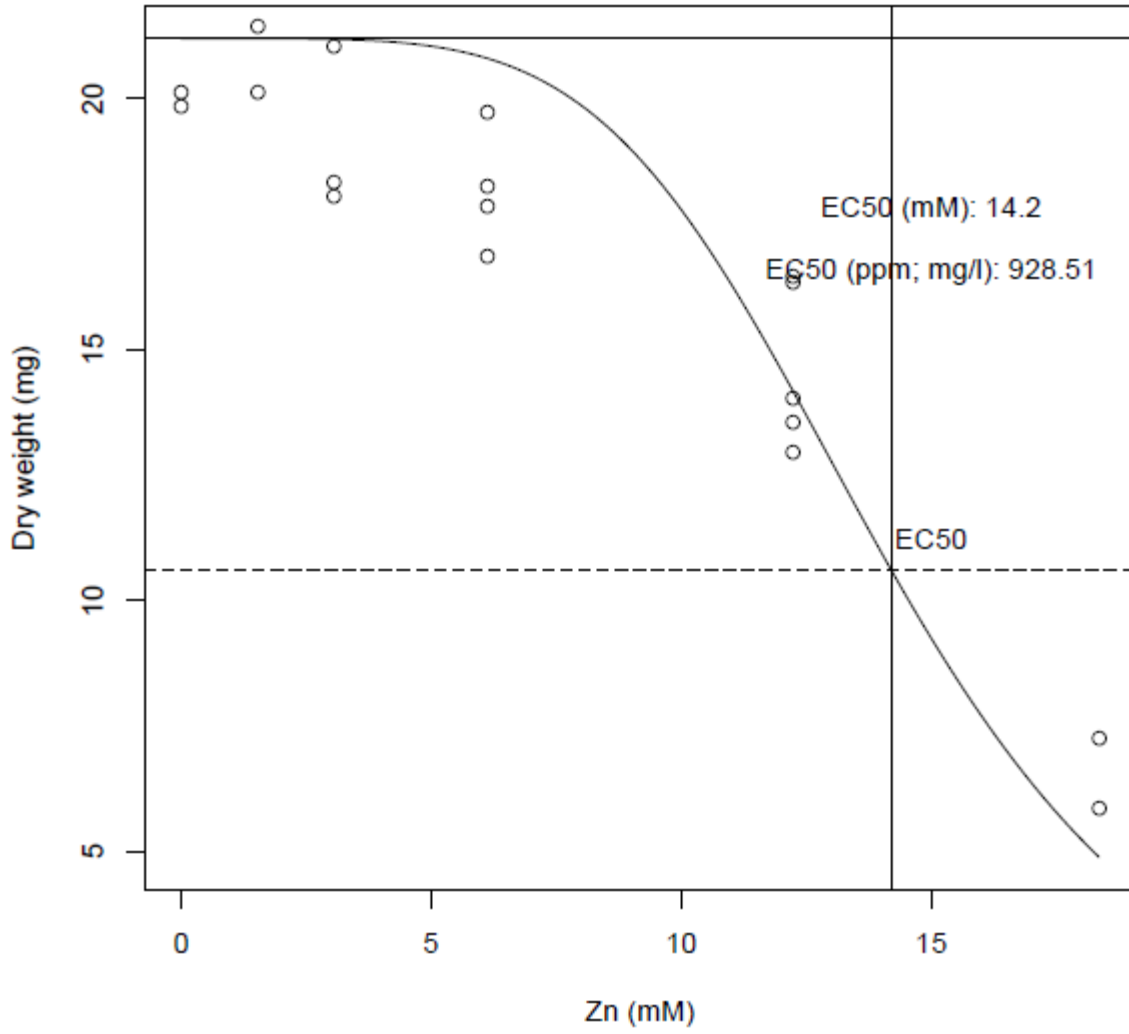
Lm8n1



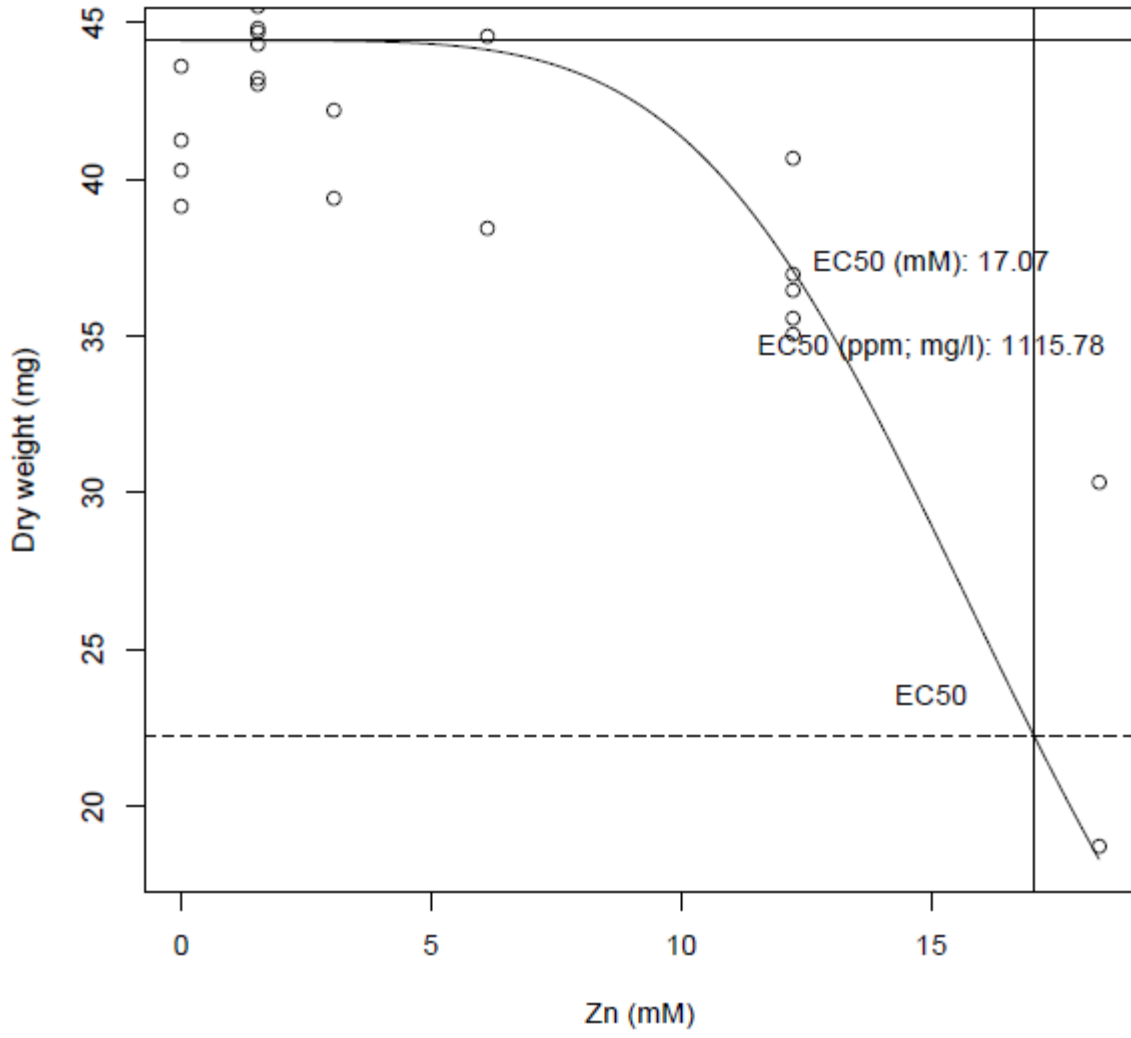
LS1



SLLS26

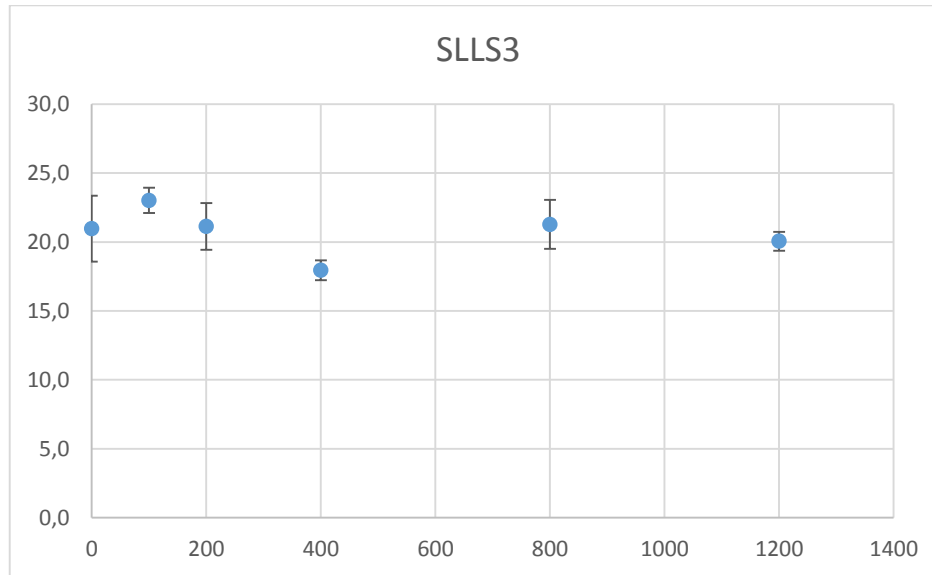


OF3



SLLS3

Voor dit isolaat kan geen EC50-waarde berekend worden met R 3.2.2. Dit omdat de hoogste extra toegevoegde Zn-concentratie 1200 ppm is en dit isolaat bij deze concentratie nog altijd geen 50% verminderde groei vertoont. Dit isolaat krijgt dus als EC50-waarde: >1200 ppm. De grafiek van absolute groei uit excel wordt wel weergegeven.



Bijlage C: Overzicht van de gemeten metalen in de ICP-OES-analyse per isolaat

| Isolaat | Zn | | Fe | | Mn | | Mg | |
|---------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| | Concentratie | Standaard-fout | Concentratie | Standaard-fout | Concentratie | Standaard-fout | Concentratie | Standaard-fout |
| HH19 | 4,824E+00 | 3,608E-01 | 1,587E+00 | 5,233E-01 | 6,347E-02 | 6,429E-03 | 8,628E-01 | 5,829E-02 |
| Mg4 | 2,363E+00 | 2,160E-01 | 7,854E-01 | 2,109E-01 | 3,204E-02 | 4,667E-03 | 3,193E-01 | 3,162E-02 |
| P13 | 4,434E+00 | 1,984E-01 | 1,750E+00 | 2,220E-01 | 7,240E-02 | 4,987E-03 | 7,190E-01 | 3,274E-02 |
| P4 | 5,009E+00 | 3,278E-01 | 3,583E+00 | 1,021E+00 | 1,059E-01 | 1,326E-02 | 1,165E+00 | 8,494E-02 |
| PD13 | 5,572E+00 | 6,179E-01 | 1,182E+00 | 1,900E-01 | 3,651E-02 | 1,057E-03 | 8,444E-01 | 2,343E-02 |
| PD1 | 5,366E+00 | 5,434E-02 | 1,037E+00 | 1,898E-01 | 4,031E-02 | 2,644E-03 | 5,475E-01 | 1,329E-02 |
| PD23 | 5,096E+00 | 2,220E-01 | 6,864E-01 | 7,636E-02 | 3,201E-02 | 1,045E-03 | 5,000E-01 | 1,099E-02 |
| LM5L8 | 1,985E+00 | 4,956E-02 | 4,327E-01 | 4,285E-02 | 4,140E-02 | 1,384E-03 | 6,170E-01 | 2,076E-02 |
| SLLS4 | 2,375E+00 | 1,201E-01 | 4,462E-01 | 7,431E-02 | 3,694E-02 | 2,327E-03 | 7,140E-01 | 1,797E-02 |
| PD5 | 2,242E+00 | 7,537E-02 | 4,953E-01 | 7,649E-02 | 3,492E-02 | 2,406E-03 | 6,976E-01 | 1,244E-02 |
| LS4 | 1,749E+00 | 1,244E-01 | 6,040E-01 | 1,610E-01 | 3,220E-02 | 3,440E-03 | 6,081E-01 | 2,784E-02 |
| Lm8n1 | 1,241E+00 | 6,193E-02 | 9,294E-01 | 2,275E-02 | 2,949E-02 | 1,635E-03 | 4,783E-01 | 6,480E-03 |
| LS1 | 1,397E+00 | 4,677E-02 | 2,558E-01 | 1,871E-02 | 3,625E-02 | 1,568E-03 | 6,514E-01 | 2,651E-02 |
| SLLS26 | 1,603E+00 | 3,921E-02 | 6,398E-01 | 5,155E-02 | 3,696E-02 | 1,143E-03 | 5,006E-01 | 6,778E-03 |
| OF3 | 1,669E+00 | 5,379E-02 | 3,082E-01 | 2,897E-02 | 4,344E-02 | 2,398E-03 | 7,757E-01 | 2,030E-02 |
| SLLS3 | 9,369E-01 | 3,153E-02 | 7,302E-01 | 1,188E-01 | 2,897E-02 | 9,887E-04 | 4,899E-01 | 5,744E-03 |

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Screening van zinktolerantie en verdere karakterisering van de <i>SIZnT2</i> transporter in isolaten van de ectomycorrhizaschimmel <i>Suillus luteus</i>

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2016**

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.

Voor akkoord,

Van Loy, Marnix

Datum: **13/06/2016**