

RESPONSE OF SOYBEAN ROOTS TO IONS OF CADMIUM AND ARSENIC.

Patrik Mészáros, Ievgenija Golovatiuk, Beáta Piršélová, Jana Moravčíková, Jana Libantová, Jaroslav Michalko, Ildikó Matušíková

ABSTRACT

Heavy metals are serious contaminants of the environment with negative impact on living organisms including plants. These are considered as enter points for leaking into the food chain endangering animals and humans. A set of soybean (*Glycine max* L.) genotypes, that are grown in Slovakia, Ukraine and Hungary, were screened for sensitivity/tolerance to ions of cadmium and arsenic (both at concentrations of 5 mg.l⁻¹). Based on measurements of root growth there were two genotypes with contrasting sensitivity to heavy metal exposure selected, the most sensitive Kyivska 98 and the relatively tolerant Chernyatka. In both genotypes there was a significantly enhanced rate of lipid peroxidation observed that indicates to membrane damage as consequence of the applied stress. Protein extracts from the roots of tested plants were separated on polyacrylamide gels. The subsequent staining for chitinase activities revealed genotype specific chitinase accumulation as a component of plant defense against heavy metal stress. The involvement of detected chitinase isoforms in metal tolerance/sensitivity is becoming then evident and requires further investigations in future.

Keywords: singular, five, word, English, PCR

ÚVOD

Ťažké kovy môžeme zaradiť medzi hlavné kontaminanty životného prostredia. Väčšina rastlín je citlivá na ťažké kovy, na ich toxicitu reagujú hlavne inhibíciou rastu koreňa a výhonkov a zníženou produkciou biomasy (Peralta et al., 2001). Ťažké kovy reagujú so zložkami membrán, pričom môžu meniť ich permeabilitu, membránový potenciál a enzymatickú aktivitu. Ovplyvňujú aj príjem živín a homeostázu a sú často akumulované poľnohospodársky dôležitými plodinami (Sanità di Toppi, Gabrielli 1999). Rastliny vyvinuli rôzne obranné mechanizmy voči toxickým účinkom ťažkých kovov. Tieto mechanizmy spočívajú napríklad v syntéze fytochelátinov a metalotioneínov, vo zvýšení aktivity zložiek antioxidantného systému (Sandalio et al., 2001) a v akumulácii tzv. PR bielkovín (z angl. Pathogenesis Related proteins) obvykle akumulovaných pri patogenéze. Účinným mechanizmom je tiež zvýšenie hladiny iónov vápnika v cytosole a zvýšená aktivita proteínov teplotného šoku (Poschenrieder et al., 2006). Tolerancia rastlín k ťažkým kovom je geneticky daná, avšak jednotlivé rastlinné druhy resp. odrody prejavujú veľkú variabilitu v tolerancii k ťažkým kovom (Metwally et al., 2005). V tejto práci hodnotíme senzitivitu/toleranciu 10 odrôd sóje fazuľovej pestovaných na Slovensku, Ukrajine a Maďarsku voči iónom arzénu a kadmia.

MATERIÁL A METÓDY

Semená 10 odrôd sóje fazuľovej (*Glycine max* L.) sme získali z nasledovných zdrojov: odrody Cordoba, Essor, Merlin a Kent zo Saatbau Linz Slovensko; odrody Chernyatka, Ustya, Kyivska 98 a Vorskla z Poľnohospodárskeho ústavu Ukrajinskej Poľnohospodárskej Akadémie Vied; odrody Evans a Boroka z Bóly Zrt., Maďarsko. Semená sme sterilizovali 10 minút v 0,5% roztoku chlórnanu sodného a nakličovali v Petriho miskách na dvojitej vrstve navlhčeného filtračného papiera v tme pri 23°C, kým korene dosiahli dĺžku 3-8 mm. Korene klíčiacych semien sme následne vystavili účinkom iónov arzénu (5 mg.l⁻¹ As³⁺) a kadmia (5 mg.l⁻¹ Cd²⁺) vo forme roztokov: As₂O₃ a Cd(NO₃)₂·4H₂O po dobu 48 hodín. Po inkubácii sme korene oddelili od

semien a odvážili ich hmotnosť čerstvej hmoty. Toleranciu koreňov k iónom arzénu a kadmia sme vyjadrili tolerančným indexom (TI) podľa Wilkina (1978).

Analýzám sme podrobili najmenej 50 koreňov klíčencov z každej odrody nakličovaných v troch nezávislých opakovaniach experimentu.

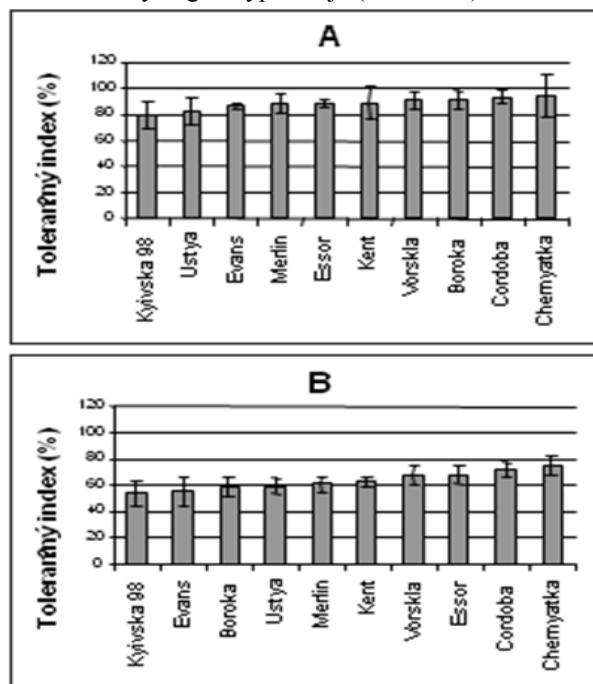
Hladinu peroxidácie lipidov sme stanovili meraním množstva malondialdehydu (MDA) podľa Dhindsa et al., (1981).

Proteíny izolované podľa Hurkman, Tanaka (1986) sme separovali pomocou SDS-PAGE (Laemli 1970) a farbili na chitinázovú aktivitu podľa Pan et al., (1991). Obrázky gélov sme analyzovali softvérom Scion Image.

Údaje sme štatisticky vyhodnotili Studentovým t-testom z 3-6 nezávislých opakovaní každého experimentu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

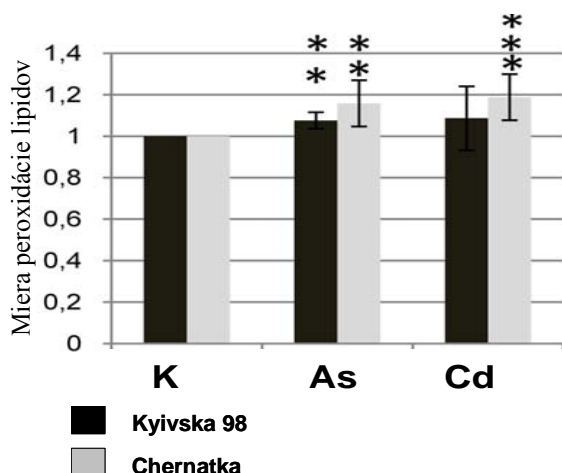
Aplikované dávky ťažkých kovov spôsobili inhibíciu rastu koreňov všetkých genotypov sóje (obrázok 1).



Obrázok 1 Tolerancia koreňov rôznych odrôd sóje fazuľovej voči iónom kadmia (A) a arzenu (B) pri testovaných dávkach: $5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ a $5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ As}^{3+}$. Hodnoty zodpovedajú aritmetickým priemerom hodnôt $TI \pm SD$ z troch nezávislých opakovaní experimentu. Tolerančné indexy pritom naznačujú, že jednotlivé odrody sóje prejavili variabilitu v tolerancii voči testovaným kovom.

Vnútrodruhová variabilita v odpovedi na ióny ťažkých kovov bola popísaná aj inými autormi (Belimov et al., 2003, Metwally et al., 2005). Arzén prejavil vyššiu toxicitu ako kadmium u väčšiny genotypov a spôsobil takmer 50 %-nú inhibíciu rastu koreňov v prípade odrody Kyivska 98. Korene tohto genotypu prejavili najvyššiu citlivosť voči obom testovaným kovom, naopak relatívne najtolerantnejšie boli korene odrody Chernyatka. Korene týchto dvoch odrôd sme podrobili ďalším analýzám.

Zvýšenie hladiny MDA ako signál zvýšenej peroxidácie lipidov a následného poškodenia membrán sme zaznamenali vo všetkých koreňoch vystavených účinkom kovov oboch študovaných odrôd (obrázok 2).



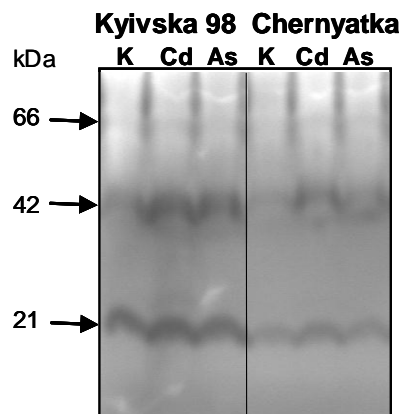
Obrázok 2 Relatívna miera peroxidácie lipidov v koreňoch najsenzitívnejšej testovanej odrody Kyivska 98 a relatívne najtolerantnejšej odrody Chernyatka vplyvom aplikovaných dávok arzenu (As) a kadmia (Cd) vzhľadom ku kontrole (K). Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchýlku hodnôt z 3-6 opakovaní experimentu. Hladiny významnosti rozdielov: ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Štatisticky významné zvýšenie miery peroxidácie lipidov v porovnaní s kontrolou sme zaznamenali v koreňoch odrody Chernyatka vplyvom Cd^{2+} (pri $p < 0,001$) aj As^{3+} ($p < 0,01$), ako aj v koreňoch odrody Kyivska 98 vplyvom arzenu ($p < 0,01$). Zvýšenú peroxidáciu lipidov vplyvom ťažkých kovov pozorovali aj Metwally et al., (2005), ktorí podobné rozdiely pripisovali rôznym schopnostiam niektorých odrôd vyrovnat' sa s následkami oxidatívneho stresu.

Vystavenie koreňov účinku iónov As^{3+} a Cd^{2+} viedlo k štatisticky významnému zvýšeniu obsahu bielkovín v koreňoch v porovnaní s kontrolnými vzorkami (pri $p \leq 0,05$), čo môže naznačovať zvýšenú syntézu

obránných proteínov. Na druhej strane tento jav môže byť aj dôsledkom dehydratácie pletiva, čo je často pozorovaným prejavom toxicity ťažkých kovov.

Zmeny v profíloch celkových proteínov zo stresovaných koreňov sme po separácii na polyakrylamidových géloch nezaznamenali. Následne sme pomocou špecifického enzýmového substrátu v géloch detekovali aktivity jednotlivých izoforiem chitináz. Identifikovali sme celkovo tri izoformy chitináz (obrázok 3).



Obrázok 3 Isoformy chitináz v proteínovom extrakte koreňov z dvoch testovaných genotypov sóje. Izolované proteíny z koreňov kontrolných rastlín (K) a z koreňov vystavených iónom kadmia (Cd) a arzenu (As) boli separované na polyakrylamidových géloch a následne detekované pomocou špecifického enzýmového substrátu.

Zmeny v akumulácii jednotlivých izoforiem chitináz sme vyjadrili ako násobky kontroly (tabuľka 1). Po kvantifikácii aktivít jednotlivých izoforiem sme údaje podrobili štatistickým analýzám. Naše výsledky naznačili, že niektoré chitinázy (21 kDa) neprejavili závislosť na prítomnosti kovu. Naopak, akumulácia iných izoforiem (66 a 42 kDa) bola zrejme ovplyvnená stresom vyvolaným kovom (tabuľka 1).

Tabuľka 1 Akumulácia izoforiem chitináz v proteínovom extrakte koreňov sóje fazuľovej.

Údaje zodpovedajú relatívnym hodnotám aritmetického

Testovaná odroda	Molekulová hmotnosť (kDa)	Cd^{2+} (5 mg.l^{-1})	As^{3+} (5 mg.l^{-1})
Kyivska 98	66	$0,81 \pm 0,09$ **	$0,84 \pm 0,11$ *
	42	$1,50 \pm 0,37$ *	$1,25 \pm 0,18$
	21	$1,30 \pm 0,25$	$0,87 \pm 0,11$
Chernyatka	66	$1,10 \pm 0,15$	$0,99 \pm 0,23$
	42	$1,78 \pm 0,60$	$1,56 \pm 0,35$ *
	21	$1,08 \pm 0,16$	$1,00 \pm 0,06$

priemeru $\pm SD$ ($n = 3$), kontrola = 1. Hladiny významnosti rozdielov: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

V koreňoch odrody Kyivska 98 sme v koreňoch stresovaných rastlín zaznamenali zníženie aktivitu/akumuláciu izoformy s veľkosťou 66 kDa, naopak v koreňoch odrody Chernyatka sme podobnú zmenu

nedetekovali. Najvýraznejšie zmeny sme zaznamenali v prípade izoformy s veľkosťou 42 kDa, ktorá sa akumulovala v koreňoch oboch odrôd ako dôsledok vplyvu kadmia a arzenu (obrázok 3, tabuľka 1).

Medziodrodové rozdiely v akumulácii chitináz poukazujú na možné medziodrodové rozdiely v obrane rastlín voči iónom ťažkých kovov. Zmeny v akumulácii izoform chitináz vplyvom kovov boli zaznamenané aj v pletivách iných rastlín (Margis-Pinheiro et al., 1994; Jung et al., 1995; Rivera-Becerril et al., 2005). Navyše Békésiová et al., (2008) poukázali aj na rozdiely v akumulácii týchto enzýmov v závislosti od aplikovaného typu kovu. Hoci v súčasnosti nie je možné vysloviť jednoznačné závery o úlohe chitináz v procese obrany rastlín voči kovom, výsledky doterajších pozorovaní naznačujú, že chitinázy sú stabilnou zložkou obranného systému rastlín voči kovom, môžu však zohrávať aj oveľa špecifickejšiu úlohu ako sa doteraz predpokladalo.

ZÁVER

Testované odrody sóje prejavili variabilitu v citlivosti k iónom arzenu a kadmia. Tolerancia koreňov testovaných odrôd voči iónom kadmia sa pohybovala v rozmedzí 80-94 % a voči iónom arzenu v rozmedzí 54-75 %. Najvyššiu toleranciu voči oboj ťažkým kovom prejavili korene odrody Kyivska 98 a najvyššiu korene odrody Chernyatka. Rozdiely v citlivosti koreňov testovaných genotypov sa prejavili aj v miere poškodenia bunkových membrán a v akumulácii jednotlivých izoform chitináz. Naše výsledky potvrdzujú, že chitinázy sú aktívnou zložkou obranných mechanizmov rastlín vystavených účinkom ťažkých kovov. Ich úloha a mechanizmus pôsobenia v rastlinných bunkách však stále nie sú známe. Ďalšie analýzy týchto molekúl umožnia nielen pochopiť obranné mechanizmy rastlín resp. niektoré aspekty toxicity/tolerancie, ale pomôžu tiež identifikovať proteínové markéry pre konkrétne environmentálne stresy vrátane ťažkých kovov.

LITERATÚRA

BELIMOV, A. A., SAFRONOVA, V. I., TSYGANOV, V. E., BORISOV, A. Y., KOZHEMYAKOV, A. P., STEPANOK, V. V., MARTENSON, A. M., GIANINAZZI-PEARSON, V., TIKHONOVICH, I. A. 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.). In *Euphytica*, vol. 131, 2003, č.1, p. 25-35.

BÉKÉSIÓVÁ, B., HRAŠKA, S., LIBANTOVÁ, J., MORAVČÍKOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I. 2008. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. In *Molecular Biology Reports*, vol. 35, 2008, č. 4, p. 579-588.

DHINDSA, R. S., MATOWE, W. 1981. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 32, 1981, p. 79-91.

HURKMAN, W. J., TANAKA, C. K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two dimensional gel electrophoresis. In *Plant Physiology*, vol. 81, 1986, p. 802-806.

JUNG, J. L., MAUREL, S., FRITIG, B., HAHNE, G. 1995. Different pathogenesis-related-proteins are expressed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to physical, chemical and stress factors. In *Journal of Plant Physiology*, vol. 145, 1995, č. 1-2, p. 153-160.

LAEMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. In *Nature*, vol. 227, 1970, č. 5259, p. 680-685.

MARGIS-PINHEIRO, M., MARIVET, J., BURKARD, G. 1994. Bean class-IV chitinase gene - structure, developmental expression and induction by heat-stress. In *Plant Science*, vol. 98, 1994, č. 2, p. 163-173.

METWALLY, A., SAFRONOVA, V. I., BELIMOV, A. A., DIETZ, K. J. 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L.. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, 2005, č. 409, p. 167-178.

PAN, S. Q., YE, X. S., KUC, J. 1991. A technique for detection of chitinase, β -1,3-glucanase and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. In *Phytopathology*, vol. 81, 1991, p. 970-974.

PERALTA, J. R., GARDEA-TORRESDEY, J. L., TIEMANN, K. J., GOMEZ, E., ARTEAGA, S., RASCON, E., PARSONS, J. G. 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 66, 2001, č. 6, p. 727-734.

POSCHENRIEDER, C. H., TOLRA, R., BARCELÓ, J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress? In *Trends in Plant Science*, vol. 11, 2006, p. 288-295.

RIVERA-BECERRIL, F., METWALLY, A., MARTIN-LAURENT, F., VAN TUINEN, D., DIETZ, K. J., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. 2005. Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum sativum* L.. In *Water Air and Soil Pollution*, vol. 168, 2005, č. 1-4, p. 171-186.

SANDALIO, L. M., DALURZO, H. C., GOMEZ, M., ROMERO-PUERTAS, M. C., DEL RIO, L. A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, 2001, č. 364, p. 2115-2126.

SANITA` di TOPPI, L., GABBRIELLI, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. In *Environmental and Experimental Botany*, vol. 41, 1999, č. 2, p. 105-130.

WILKINS, D. A. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root length. In *The New Phytologist*, vol. 80, 1978, p. 623-633.

Pod'akovanie:

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov VEGA 2/0011/08 a MVTS COST FA 0605.

Contact addresses:

Patrik Mészáros, Department of Botany and Genetics, Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher University, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra Slovakia, E-mail: patrik.meszaros@ukf.sk

Beáta Piršelová, Department of Botany and Genetics, Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher

University, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra Slovakia,
E-mail: beata.pirselova@ukf.sk

Ievgeniya Golovatiuk, Department of Plant Physiology
and Ecology, Faculty of Biology, Taras Shevchenko
Kyiv National University, Academician Glushkov
Avenue 12, 01601 Kyiv, Ukraine. E-mail:
yevgeniya_g@ukr.net

Jana Moravčíková, Institute of Plant Genetics and
Biotechnology, Slovak Academy of Sciences,
Akademická 2, 950 07 Nitra Slovakia, E-mail:
jana.moravcikova@savba.sk

Jana Libantová, Institute of Plant Genetics and
Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická
2, 950 07 Nitra Slovakia, E-mail: jana.libantova@savba.sk

Jaroslav Michalko, Institute of Plant Genetics and
Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická
2, 950 07 Nitra Slovakia, E-mail:
jaroslav.michalko@savba.sk

Ildikó Matušiková,¹Institute of Plant Genetics and
Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická
2, 950 07 Nitra Slovakia, E-mail:
ildiko.matusikova@savba.sk

.