

2010  
2011

## GENEESKUNDE

*master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid*

## Masterproef

*Zinktolerantie in *Suillus luteus*: een 'genetics forward' studie*

Promotor :  
Prof. dr. Jan COLPAERT

## Mieke Gregoor

*Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen, afstudeerrichting milieu en gezondheid*

De transnationale Universiteit Limburg is een uniek samenwerkingsverband van twee universiteiten in twee landen:  
de Universiteit Hasselt en Maastricht University

universiteit  
hasselt

UNIVERSITEIT VAN DE TOEKOMST



Maastricht University

Universiteit Hasselt | Campus Diepenbeek | Agoralaan Gebouw D | BE-3590 Diepenbeek  
Universiteit Hasselt | Campus Hasselt | Martelarenlaan 42 | BE-3500 Hasselt



Maastricht University

universiteit  
hasselt

UNIVERSITEIT VAN DE TOEKOMST

2010  
2011

# GENEESKUNDE

*master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid*

## Masterproef

*Zinktolerantie in *Suillus luteus*: een 'genetics forward' studie*

Promotor :  
Prof. dr. Jan COLPAERT

Mieke Gregoor

*Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen, afstudeerrichting milieu en gezondheid*



# Inhoudsopgave

Voorwoord .....	1
Samenvatting.....	3
1. Inleiding .....	5
1.1 <i>Suillus luteus</i> .....	5
1.2 Metaaltolerantie en mechanismen.....	5
1.3 Insertie mutagenese.....	9
2. Materiaal en methoden .....	11
2.1 Transformatie van <i>Suillus luteus</i> .....	11
2.1.1 Fungus materiaal .....	11
2.1.2 <i>Agrobacterium</i> materiaal .....	11
2.1.3 Co-cultuur.....	12
2.1.4 Selectie .....	13
2.2 Zinkttest .....	13
2.3 Lokalisatie van mutatie .....	14
2.3.1 DNA extractie .....	14
2.3.2 Plasmid rescue.....	14
2.3.3 TAIL-PCR analyse .....	15
2.4 Controle van mutatie .....	17
2.5 Controle hygromycineresistentie .....	17
3. Resultaten.....	19
3.1 <i>Agrobacterium</i> gemedieerde transformatie .....	19
3.2 Zinkttest .....	20
3.3 Lokalisatie van mutatie .....	24
3.3.1 Plasmid rescue.....	24
3.3.2 TAIL-PCR .....	24
3.4 Controle mutatie .....	26
3.5 Controle hygromycineresistentie .....	27
4. Discussie .....	29
4.1 <i>Agrobacterium</i> gemedieerde transformatie .....	29
4.2 Zinkttest .....	30
4.3 Lokalisatie van mutatie .....	31
4.4 Controle mutatie .....	32
4.5 Controle hygromycineresistentie .....	34

5. Conclusie .....	35
6. Referenties .....	37
7. Bijlagen .....	41
Bijlage 1 .....	41
Bijlage 2 .....	45

## Voorwoord

Bij het maken van dit eindwerk heb ik op veel personen kunnen rekenen, hierbij zou ik hen dan ook graag willen bedanken.

Allereerst zou ik mijn promotor Prof. dr. Jan Colpaert willen bedanken dat ik dit project heb mogen uitvoeren in het centrum voor milieukunde (CMK). Dankjewel voor deze kans, het vertrouwen en de steun. In het bijzonder bedank ik mijn begeleidster drs. Joske Ruytinx voor de fijne samenwerking, het enthousiasme, de goede raad en het veelvuldig nalezen van dit eindwerk. Dankjewel voor altijd zo positief te blijven en zoveel geduld te hebben met mij. Ook wil ik dr. Tony Remans bedanken voor het opvolgen, lezen en beoordelen van mijn eindwerk. Dankjewel voor de tips, blijk van interesse en appreciatie voor mijn werk.

Verder wens ik mijn medestudenten en alle personeelsleden van het CMK te bedanken voor de fijne sfeer, de leuke babbels en enthousiaste hulp in het labo. In het bijzonder wil ik Raf Vossen bedanken voor de fijne samenwerking en toffe labo-momenten.

Tot slot bedank ik mijn ouders dat ze mij de kans gegeven hebben om deze studie te volgen. Tot het einde toe waren en zijn jullie steeds een grote steun voor mij. Dankjewel aan mijn hele familie voor jullie steun en begrip in de drukke perioden van mijn opleiding. In het bijzonder wil ik Thijs bedanken voor zijn steun, geduld en verdraagzaamheid vooral op de stressvolste momenten tijdens mijn studie. Dankjewel om in mij te geloven.

Mieke



## Samenvatting

**Inleiding** Natuurlijke populaties die blootgesteld worden aan hoge zinkconcentraties ondervinden een sterke selectiedruk (Colpaert et al., 2004). Deze selectiedruk kan leiden tot een evolutionaire adaptatie aan zink, zoals geobserveerd in *Suillus luteus* populaties in de buurt van zinksmelters in Noord-Limburg (Colpaert et al., 2000). Het fysiologisch mechanisme van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus* berust naar alle waarschijnlijkheid op een verbeterde exclusie van zink (Colpaert et al. 2005). De moleculaire basis van de zinktolerantie in *Suillus luteus* is nog niet gekend. Dit project is een genomische studie voor identificatie van moleculaire determinanten van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus*.

**Materiaal en methoden** Willekeurige mutaties werden aangebracht in het genoom van *Suillus luteus* met behulp van *Agrobacterium* gemedieerde transformatie. De zinktolerantie van de transformanten wordt nagegaan door ze op te groeien op verschillende concentraties aan zink. Vervolgens wordt de zinktolerantie van de transformanten vergeleken met die van het wild type. In het genoom van de transformanten die minder zinktolerant zijn dan het wild type, wordt het geïnserteerde T-DNA gelokaliseerd met behulp van “plasmid rescue” en TAIL-PCR.

**Resultaten en Discussie** Er werden elf potentiële transformanten gevonden die op de zinkreeks een verminderde zinktolerantie vertonen in vergelijking met het wild type. Drie van deze transformanten, afkomstig van het Lm10 n26 wild type, werden in deze studie getransformeerd. De overige acht transformanten zijn ontstaan uit het Lm8 n1 wild type en komen uit een collectie van een eerder uitgevoerd experiment. Omdat de lokalisatie van het T-DNA in het genoom van deze transformanten niet succesvol was met “plasmid rescue” of TAIL-PCR, werd een controle voor de aanwezigheid van de mutatie uitgevoerd en werd de hygromycineresistentie van het wild type getest. Op basis van de resultaten van deze laatste twee testen kunnen we besluiten dat in de transformanten, afkomstig van het Lm10 n26 wild type, de mutatie initieel afwezig was. Deze transformanten hebben vals positief getest op het selectiemedium en op de zinkreeks. De controles maken eveneens duidelijk dat de transformanten, afkomstig van Lm8 n1, het T-DNA verloren hebben tijdens bewaring bij 4°C.

**Conclusie** In de toekomst dient de hygromycineresistentie van wild type nagegaan te worden alvorens deze te gebruiken voor *Agrobacterium* gemedieerde transformatie. Er blijken immers aanzienlijke verschillen in hygromycineresistentie mogelijk te zijn tussen de verschillende wild types binnen een species. We kunnen ook besluiten dat de insertie van het T-DNA niet stabiel blijft tijdens bewaring bij 4°C. Mogelijk is het invriezen van transformanten een alternatief voor bewaring gedurende langere periodes. De mogelijkheid tot invriezen van *Suillus luteus* en de stabiliteit van het ingebrachte T-DNA bij vriestemperaturen dient nog bestudeerd te worden.





# 1. Inleiding

## 1.1 *Suillus luteus*

De basidiomyceet *Suillus luteus* is een ectomycorrhiza (ECM) fungus in het genus *Suillus*, in de orde van de Boleten (Figuur 1.1). Het grootste deel van zijn levenscyclus is deze fungus dikaryoot. *Suillus luteus* vormt een ectomycorrhiza symbiose met 2-naaldige dennen, zoals *Pinus nigra* en *Pinus sylvestris* (Colpaert et al., 2000). In de mycorrhiza krijgt de fungus directe toegang tot koolhydraten geproduceerd door de plant. De plant krijgt water en mineralen, verzameld in de bodem door de fungus (Li et al., 2006). Mycorrhiza fungi geven hun gastheer ook een verhoogde weerstand tegen pathogene micro-organismen of omgevingsstress, zoals bijvoorbeeld de aanwezigheid van zware metalen in de bodem (Selosse et al., 2004).



Figuur 1.1: *Suillus luteus*

## 1.2 Metaaltolerantie en mechanismen

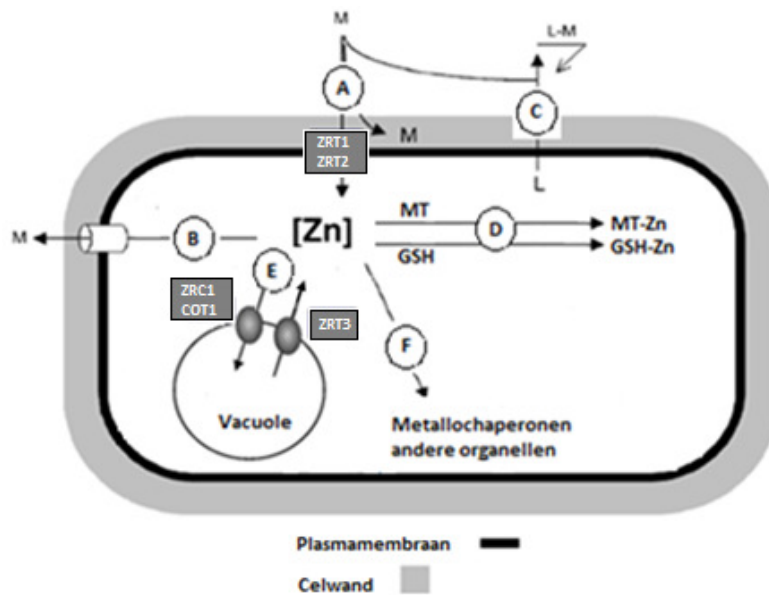
Op bodems die gecontamineerd zijn met zware metalen, worden natuurlijke populaties gestimuleerd meer tolerant te worden aan deze toxische metalen. De evolutionaire adaptatie aan zware metalen is een goed beschreven fenomeen in prokaryoten en planten (Meyer et al., 2010; Clemens et al., 2006; Nies, 2003). Maar evolutie naar metaaltolerantie gebeurt niet in alle organismen even snel. Populaties van grassen kunnen snel tolerantie ontwikkelen omdat hun relatief korte levenscyclus toelaat dat tolerante genotypes snel geselecteerd worden. In bomen daarentegen lijkt deze evolutie trager te verlopen door de trage reproductieve cyclus. Maar bomen geven weerstand aan deze metaaltoxiciteit door grote fenotypische plasticiteit en door de associatie met geadapteerde ectomycorrhiza (ECM) fungi, zoals *Suillus luteus* (Colpaert et al., 2004).

*Suillus luteus* is een fungus met een korte generatietijd en frequente seksuele reproductie. Bijgevolg kan een selectiedruk, die ontstaan is door een hoge zinkconcentratie, sneller leiden tot het ontstaan van zinktolerante populaties (Colpaert et al., 2004). In de onmiddellijke omgeving van een ontmantelde zinksmelter in Lommel-Maatheide (België) is een *Suillus luteus* populatie met adaptieve zinktolerantie gevonden (Colpaert et al., 2000).

Zink (Zn) is een essentieel sporenelement, waarvan slechts een kleine hoeveelheid vrije ionen getolereerd wordt in de cel. In de cel is Zn nodig als cofactor in metalloproteïnen, het is een structurele of catalytische component van meer dan 300 enzymen. Het feit dat Zn ook toxisch kan zijn, maakt dat de intracellulaire Zn concentratie goed gereguleerd moet worden. Wanneer er te veel Zn in de bodem aanwezig is, kan de aanwezige populatie niet groeien op deze bodem zonder zinktolerantie mechanisme. Wanneer de populatie een lage constitutieve zinktolerantie heeft, dient er een adaptieve zinktolerantie in de populatie te ontstaan.

Het exacte mechanisme van deze adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus* is nog niet bekend. De tolerantie zou een adaptatie zijn van mechanismen betrokken in de algemene homeostase van het essentiële metaal. De 4 belangrijkste processen in Zn homeostase zijn (1) gecontroleerd transport over biomembranen (in- en efflux), (2) immobilisatie door extracellulaire chelatie aan gesecreteerde organische componenten, (3) sequestratie en intracellulaire chelatie en (4) gereguleerd Zn transport naar target proteïnen via metallochaperonen en intracellulaire translocatie (Bolchi et al., 2010).

Het transport over de plasmamembraan wordt gereguleerd door transporter proteïnen, die Zn in of uit de cel transporteren. In *Saccharomyces cerevisiae* (gist) zijn Zrt1 en Zrt2 de belangrijkste Zn opname transporters, deze transporter proteïnen behoren tot de zinc-iron-permease (ZIP) familie (Figuur 1.2, A). In dit gist organisme wordt de opname van Zn door Zrt1 en Zrt2 zowel transcriptioneel als post-transcriptioneel gereguleerd. Inactivatie van Zn opname kan door inhibitie van de transcriptionele activator ZAP1. Post-transcriptioneel kan deze inactivatie gebeuren door Zn-geïnduceerde endocytose van het transporter proteïne en degradatie in de vacuole (Eide, 2003). Zn wordt uit de gistcel getransporteerd (Figuur 1.2, B) door cation diffusion facilitators (CDF's) en transporters van de P-type ATPase familie (Eide, 2006).



Figuur 1.2: Zinkhomeostase in de cel: (A) Zn wordt geïmmobiliseerd door celwandbinding of opgenomen in de cel door Zn transporters Zrt1 en Zrt2. (B) Exclusie van Zn uit de cel. (C) Extracellulaire chelatie met gesecreteerde ligand (L). (D) Intracellulaire chelatie met metallothionine (MT) en glutathion (GSH). (E) Zn wordt naar de vacuole getransporteerd door Zrc1 en Cot1, efflux uit de vacuole gebeurt door Zrt3 transporter. (F) Zn bindt aan metallochaperonen of wordt naar andere organellen getransporteerd.

Buiten de cel kan Zn geïmmobiliseerd worden door celwandbinding (Figuur 1.2,A) of door extracellulaire chelatie aan gesecreteerde componenten, zoals citraat en oxalaat (Figuur 1.2,C) (Bellion et al., 2006).

Zn kan intracellulair binden aan chelatoren zoals glutathion en metallothionine (Figuur 1.2, D)(Bellion et al., 2006). Eveneens kan het metaal gecompartmenteerd worden in intracellulaire organellen. De vacuole is de belangrijkste plaats van Zn sequestratie. Wanneer Zn in hoge concentratie in de gistcel aanwezig is, wordt het naar de vacuole getransporteerd door cation diffusion facilitators, Zrc1 en Cot1 (Figuur 1.2, E). Bij Zn deficiëntie kan deze vacuolaire Zn voorraad aangesproken worden door upregulatie van het Zrt3 transporter proteïne (ZIP familie)(Figuur 1.2, E). Zn is eveneens vereist in verschillende secretore processen in het endoplasmatisch reticulum en Golgi apparaat, het metaal wordt dus ook naar deze cellulaire organellen van de gist getransporteerd (Figuur 1.2, F) (Eide, 2006).

Metallochaperonen zijn proteïnen die Zn binden (Figuur 1.2, F) en het afleveren aan metalloproteïnen via proteïne-proteïne interacties. Zn heeft een groot aantal target proteïnen, waaronder Cu/Zn superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase, ... (Eide, 2006).

Hoewel Zn een redox-inactief metaal is, kan het indirect toch zorgen voor productie van “reactive oxygen species” (ROS) (Bellion et al., 2006). Om oxidatieve stress te vermijden, moet de cel in staat zijn de vorming van reactieve zuurstofvormen of de bijwerkingen ervan tegen te gaan. Recent werd eveneens aangetoond dat de aanwezigheid van ijzer (Fe) invloed kan hebben op de Zn homeostase (Shanmugam et al., 2011). De metaal transporters IRT1 en IRT2 zijn belangrijk voor Fe homeostase, maar ze transporteren eveneens Zn. Een competitie voor deze transporters werd geobserveerd tussen Fe en Zn.

Zn kan ook de mitotische activiteit van de cel beïnvloeden, de membraanintegriteit en permeabiliteit veranderen en zelfs cellen doden. Op moleculair niveau kan Zn de genexpressie veranderen van genen betrokken in verschillende biologische processen. Veel van deze genen coderen voor proteïnen die geassocieerd zijn met verdediging tegen oxidatieve stress (Wang et al., 2009). De meerderheid van de genen is nog niet functioneel geïdentificeerd en de biochemische mechanismen voor Zn toxiciteit zijn nog niet volledig gekend (Wang et al., 2009).

Het mechanisme van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus* berust naar alle waarschijnlijkheid op een verbeterde exclusie van Zn (Colpaert et al., 2005). Deze conclusie werd getrokken uit het feit dat Zn-resistente isolaten minder Zn accumuleerden dan Zn-sensitieve, groeiend op bodems met een overmaat aan Zn. Er wordt verondersteld dat celwandbinding deel is van het constitutieve mechanisme van de zinktolerantie (Colpaert et al., 1992). Een verhoging van de productie van organische zuren werd niet geobserveerd in *Suillus luteus* (Colpaert et al., 2005).

*Suillus luteus* isolaten die een zinktolerantie ontwikkeld hebben, kunnen niet enkel overleven op gecontamineerde bodems, maar beschermen ook hun gastheer tegen metaal toxiciteit. Deze bescherming gebeurt door de overdracht van nutriënten naar de gastheer zo efficiënt mogelijk te laten verlopen en de overdracht van toxische componenten naar de gastheer minimaal te houden (Bellion et al., 2006; Colpaert et al., 2008). Het exclusiemechanisme voorkomt dus niet enkel metaalstress in de hyfen van de schimmels, maar draagt eveneens bij aan de bescherming van de gastheer.

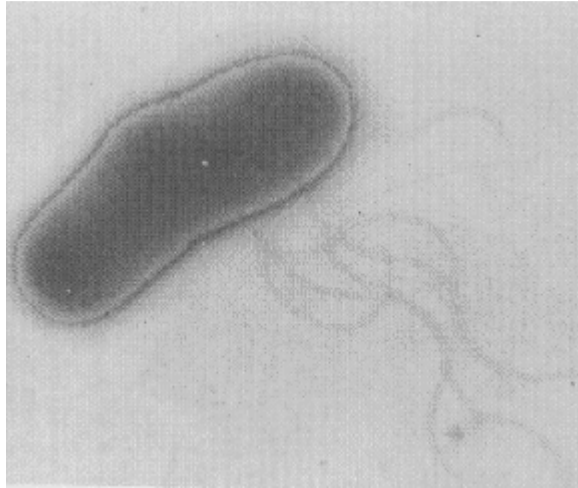
We kunnen stellen dat het fysiologisch mechanisme van de zinktolerantie steeds duidelijker wordt, maar de moleculaire basis is nog niet gekend. Recent werd een transcriptoom- en proteoom-studie opgezet voor het identificeren van determinanten van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus*. De transcriptoomanalyse was niet succesvol in de identificatie van een determinant van deze tolerantie (Muller et al., 2007). De proteoom studie is nog steeds lopende.

Dit project is een studie van het genoom voor identificatie van determinanten van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus*. Recent werd reeds een studie uitgevoerd waarbij vooral gekeken werd naar chromosoom merkers (Muller et al. 2007). In dit project echter onderzoeken we de sequentie in zijn geheel.

### 1.3 Insertie mutagenese

In deze studie zal er gebruik gemaakt worden van *Agrobacterium* gemedieerde transformatie om een gekend stuk DNA in te brengen op een willekeurige plaats in het genoom van *Suillus luteus*. Aangezien het genoom van *Suillus luteus* nog niet gekend is, is *Agrobacterium* gemedieerde transformatie een gepaste methode om determinanten van de adaptieve zinktolerantie te identificeren. De willekeurige mutatie zorgt ervoor dat we ons niet enkel focussen op de zinktransporters, die verwacht worden primaire determinanten te zijn van het exclusie mechanisme. Met deze methode is het namelijk eveneens mogelijk secundaire determinanten te identificeren. De collectie transformanten die in deze studie aangelegd zal worden, kan ook nog gebruikt worden in toekomstige studies met *Suillus luteus* aangezien het genoom van deze fungus nog onbekend is.

Het transfer DNA (T-DNA) van *Agrobacterium tumefaciens* wordt gebruikt om de mutatie aan te brengen in het genoom van de fungus. *Agrobacterium tumefaciens* (Figuur 1.3) is een bodembacterie die tumoren doet ontstaan in gastheerplanten (White et al., 2007). Als een gastheerplant gekwetst is, kan *Agrobacterium tumefaciens* een welbepaald stuk DNA inbrengen in het genoom van deze plant. *Agrobacterium* gemedieerde transformatie wordt als biotechnologische tool gebruikt door in het transfer DNA, genen in te bouwen die men wil transfereren. Het inbrengen van een gekend stuk DNA heeft als voordeel dat het niet alleen zorgt voor een mutatie, maar ook de plaats van mutatie merkt. Hierdoor wordt de identificatie van het getroffen gen gemakkelijker. Reeds in 1998 werd aangetoond dat *Agrobacterium* gemedieerde transformatie ook als biotechnologische tool toepasbaar is in fungi (de Groot et al., 1998). Om de transformanten te kunnen selecteren, wordt er eveneens een selectiemerker ingebracht in het T-DNA,. In dit project wordt een hygromycine resistentiegen gebruikt als selectiemerker. *Agrobacterium tumefaciens* stam AGL-1 wordt gebruikt om *Suillus luteus* te transformeren. AGL-1 is een derivaat van de supervirulente A281 stam.



Figuur 1.3: *Agrobacterium tumefaciens*

In deze studie wordt het T-DNA dus op een willekeurige plaats in het genoom van de fungus ingebracht, waardoor de verschillende transformanten verwacht worden elk uniek te zijn. Indien het T-DNA in een functioneel gen ingebracht wordt, wordt dit gen uitgeschakeld. Door insertie in een promotor, wordt de expressie getroffen van genen die verbonden zijn aan deze promotor. Ook het treffen van een “enhancer” of “silencer” verandert de expressie van de betrokken genen.

Door het veranderen van het genotype van de schimmel kan er een fenotypische verandering optreden in de vorm van een verandering in zinktolerantie. Het doel van dit project is determinanten te identificeren van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus*.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Transformatie van *Suillus luteus*

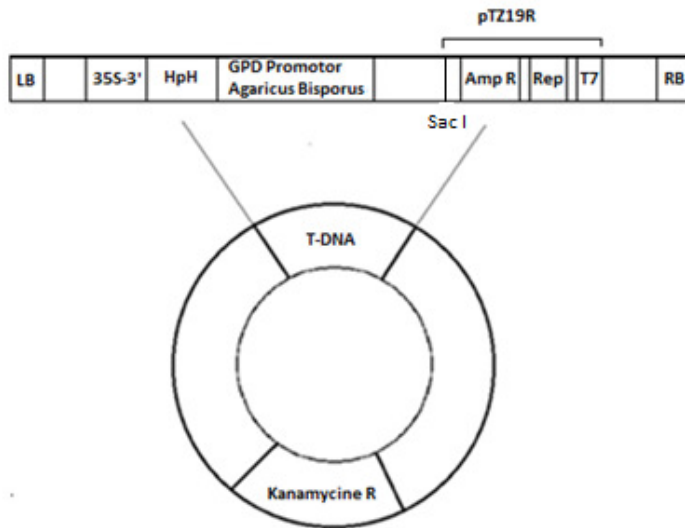
#### 2.1.1 Fungus materiaal

In dit project werd een zinktolerante stam van *Suillus luteus* gebruikt, namelijk Lm10 n26. Deze monokaryote fungus werd bekomen uit een spore van een paddenstoel uit Lommel-Maatheide (België). Friesmedium is het basismedium waarop de schimmel opgegroeid werd, dit medium bestaat uit 5,43 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{tartraat}$ ; 0,41 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,18 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,34 mM NaCl; 1,34 mM KCl; 0,24 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,02 mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 50,3  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 3,39 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 74  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 33,3 mM D-glucose; 55,5  $\mu\text{M}$  Myo-inositol; 0,27  $\mu\text{M}$  Thiamine.HCl; 0,1  $\mu\text{M}$  Biotine; 0,58  $\mu\text{M}$  Pyrodoxine; 0,27  $\mu\text{M}$  Riboflavine; 0,82  $\mu\text{M}$  Nicotinamide; 0,72  $\mu\text{M}$  p-Aminobenzeezuur; 0,42  $\mu\text{M}$  Ca-pantothenaat en 10% agar. De pH van het medium werd gecorrigeerd naar 4,8. Voor de transformatie groeide de schimmel een week op een cellofaan op het Fries medium. 24 uur voor de transformatie werd ze volledig van het cellofaan genomen, gefragmenteerd met behulp van een mixer en in vloeibaar Fries medium gebracht. De schimmelcultuur werd vervolgens 24 uur al schuddend geïncubeerd bij 25°C.

#### 2.1.2 *Agrobacterium* materiaal

De *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 stam met plasmide pBGgHg/pTZ19R (Figuur 2.1) werd gebruikt om *Suillus luteus* te transformeren. Het plasmide bestaat uit pBGgHg (Chen et al., 2000), waarin pTZ19R (Fermentas) geligeerd werd (Figuur 2.1). *Agrobacterium tumefaciens* culturen groeiden op in gemodificeerd LB gesupplementeerd met 50  $\mu\text{g}$  kanamycine per ml. Gemodificeerd LB bestaat uit 10% caseïnehydrolysaat en 5% gistextract en wordt op pH 7 gebracht met HCl. De vloeibare *Agrobacterium* culturen groeiden 24 uur al schuddend bij 28°C.





Figuur 2.1: Plasmide met pBGgHg backbone, waarin pTZ19R geligeerd werd. LB: T-DNA linker border van pBGgHg backbone. RB: T-DNA rechter border van pBGgHg backbone. 35S-3': *Cauliflower mosaic virus* terminator. HpH: hph gen van *E. coli* codeert voor aminocyclitol phosphotransferase dat resistentie geeft aan Hygromycine B. GPD Promotor *Agaricus bisporus*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotor van *Agaricus Bisporus*. Sac I: restrictie plaats voor het SacI restrictie enzym. Amp R: *bla* gen van *E. coli* codeert voor een  $\beta$ -lactamase dat resistentie geeft aan ampiciline. Rep: Replicon voor replicatie van het plasmide. T7: T7 promotor. Kanamycine R: *aadA* gen van *E. coli* codeert voor aminoglycoside phosphotransferase dat resistentie geeft aan kanamycine.

### 2.1.3 Co-cultuur

Op de dag van de transformatie werd de *Agrobacterium* cultuur in de ochtend gecentrifugeerd. Het pellet werd geresuspendeerd in inductiemedium. Het inductiemedium bestaat uit 10 mM glucose; 0,025 % glycerol; 10,65 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 11,77 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,57 mM NaCl; 2,03 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,34 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 8,8  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3,78 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 50 mM 2-(4-morfolino)-ethaan sulfaat (MES) op pH 5,3 en 200 mM acetosyringone (AS).

De suspensie van *Agrobacterium tumefaciens* in inductiemedium wordt dan verder verdund met dit inductiemedium tot een  $\text{OD}_{660}$  van 0,15. Vervolgens werd de *Agrobacterium* cultuur gedurende 4 à 6 uur geïncubeerd op 28°C, zodat de finale  $\text{OD}_{660}$  tussen 0,3 en 0,4 ligt. Na incubatie wordt 50  $\mu\text{l}$  schimmelsuspensie en 50  $\mu\text{l}$  *Agrobacterium tumefaciens* cultuur samengebracht op glas microfiber schijfjes van 6 mm in diameter en op vast inductiemedium geplaatst. Dit vast inductiemedium bestaat uit 10,65 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 11,77 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,57 mM NaCl; 2,03 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,34 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 8,8  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 3,78 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5 mM glucose; 0,025 % glycerol; 50 mM MES; 200 mM AS en 8,5 % agar. De co-cultuur van fungus en *Agrobacterium tumefaciens* wordt 72u geïncubeerd op 23°C.

### 2.1.4 Selectie

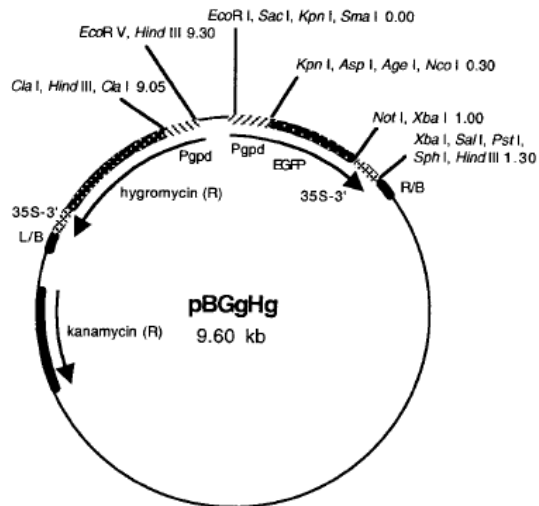
Na incubatie worden de glas microfiber schijfjes overgeplaatst naar 14cm diameter platen met selectiemedium. Het *selectiemedium* bestaat uit Friesmedium aangevuld met 200  $\mu$ M cefotaxime en 50  $\mu$ g/ml hygromycine. Cefotaxime zal ervoor zorgen dat *Agrobacterium* gedood wordt. De aanwezigheid van hygromycine in het medium helpt de fungi te identificeren die getransformeerd zijn door insertie van het T-DNA met hygromycine resistentiegen. De platen worden geïncubeerd op 23°C.

Wanneer de schimmels naast de glas microfiber schijfjes groeien op het eerste selectiemedium, worden de schimmelculturen zonder drager overgezet naar 90cm diameter platen met selectiemedium. Dit tweede selectiemedium bestaat uit Fries medium aangevuld met 25  $\mu$ g/ml hygromycine voor de eerste drie transformaties. In transformatie 4 bestond het tweede selectiemedium uit Fries medium met 50  $\mu$ g/ml hygromycine.

### 2.2 Zinktest

Om te bepalen of de aangebrachte mutaties in het genoom van de schimmels invloed hebben op de zinktolerantie van deze fungi, wordt de tolerantie nagegaan in een zinktest. In deze test worden de transformanten, die ontstaan zijn uit transformatie van het Lm10 n26 wild type, getest. Eveneens worden eerder bekomen transformanten getest, deze transformanten zijn ontstaan uit ander wild type, namelijk Lm8 n1. De zinktolerante Lm8 n1 stam is ook afkomstig van Lommel-Maatheide (België). In de eerder getransformeerde A-reeks werd het pBGgHg plasmide geïnserteerd, dat weergegeven is in figuur 2.2. In tegenstelling tot het plasmide in figuur 2.1, werd pTZ19R niet in dit pBGgHG plasmide geligeerd.

Door zowel de transformanten als het wild type te laten groeien op een cellofaan op Fries medium met verschillende concentraties aan Zn, zal duidelijk worden of de tolerantie van de transformanten verschilt met die van de wild type fungus. Elk isolaat wordt geplaatst op 20  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM Zn. Er werden 3 biologische herhalingen uitgevoerd. Nadat de schimmels 14 dagen op de verschillende concentraties aan Zn groeiden, werden ze volledig van het cellofaan afgenomen en gewogen. Er werd nagegaan of de relatieve biomassa van de transformant op de zinkreeks significant verschilt met die van het wild type, door gebruik te maken van de niet-parametrische Kruskal-Wallis test.



Figuur 2.2: De pBGgHG plasmide, met kanamycine resistentie (R), het *EGFP* en hygromycine resistentie (R) gen onder invloed van *A. bisporus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (Pgpdc) en de *Cauliflower mosaic virus* terminator (35S-3'), de rechter (R/B) en linker border (L/B) van het T-DNA.

## 2.3 Lokalisatie van mutatie

### 2.3.1 DNA extractie

Het DNA van de schimmels met een verminderde zinktolerantie werd geëxtraheerd met behulp van de "DNeasy plant mini kit" van Qiagen, al werd het protocol van deze kit niet volledig gevolgd. Schimmels die een week op cellofaan groeiden, werden met behulp van vloeibare stikstof en mortier fijngemalen. Vervolgens werd hieraan 400 µl RLC van "RNeasy plant mini kit" en 4 µl RNase A toegevoegd. De instructies van de "DNeasy plant mini kit" werden gevolgd vanaf stap 4. In de laatste stap werd geëluëerd met 30 µl in plaats van 100 µl AE buffer. De hoeveelheid DNA werd bepaald met behulp van een nanodropspectrofotometer.

### 2.3.2 Plasmid rescue

De locatie van het T-DNA in het genoom van transformant C2 werd bepaald met "plasmid rescue". Het T-DNA van de transformanten van de A-reeks kan met behulp van deze methode niet gelokaliseerd worden omdat deze transformanten gemuteerd werden met een plasmide (Figuur 2.2), dat geen ampicilline resistentiegen en geen replicon bevat.

#### a. Restrictie, opzuivering en ligatie

Na extractie werd het DNA van transformant C2 geknipt met het Sac I restrictie-enzym van Fermentas. De digestiemix bestaat uit 10x Buffer Sac I, 20 units Sac I en 1 µg DNA aangelengd met H<sub>2</sub>O tot 30 µl. Deze mix werd gedurende 16 uur geïncubeerd op 37°C. De restrictiereactie werd gestopt door incubatie op 65°C gedurende 20 minuten.

Het gedigesteerd DNA werd vervolgens opgezuiverd met behulp van "QIAquick PCR Purification Kit". In de laatste stap van het protocol van deze kit werd gekozen voor elutie met 15 µl H<sub>2</sub>O in plaats van 50 µl elutie buffer. De concentratie DNA in deze oplossing werd bepaald met een nanodropspectrofotometer.

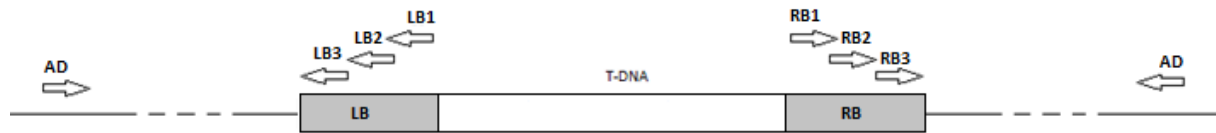
De opgezuiverde DNA fragmenten werden dan geligeerd tot vorming van circulaire DNA fragmenten. Deze ligatie gebeurt in een mix die bestaat uit 50 ng DNA, 10x T4 DNA ligase Buffer en 5 units T4 DNA ligase aangelengd met H<sub>2</sub>O tot 50 µl. De ligatiereactie gebeurt tijdens incubatie op 22°C gedurende 1 uur. Deze reactie wordt uiteindelijk gestopt door een incubatie van 10 minuten op 65°C.

#### b. Transformatie competente *E. coli* cellen

Na ligatie werd 2 µl van de circulaire DNA fragmenten ingebracht in competente *Escherichia coli* cellen. Nadat het DNA en de competente *E. coli* cellen een half uur samen op ijs hebben gestaan, volgde een heat-shock van 30 seconden op 42°C. De cellen werden dan gedurende 1 uur geschud in 200 µl Soc medium op 37°C. Het Soc medium bestaat uit 0,5% Yeast Extract, 2% Tryptone, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> en 20 mM Glucose. De *E. coli* cellen die het T-DNA bevatten werden geselecteerd door ze op te groeien op LB met 50 µg/ml ampicilline op 37°C. Deze selectie is mogelijk omdat het T-DNA waarmee de insertie is uitgevoerd, het ampicilline resistentiegen bevat (Figuur 2.1).

#### 2.3.3 TAIL-PCR analyse

De locatie van het T-DNA werd eveneens bepaald met behulp van een Thermal Asymmetric InterLaced (TAIL)-PCR. Deze methode werd gebruikt voor transformanten A68, A71 en C2. Voor deze TAIL-PCR werd het DNA van de transformanten met behulp van "DNeasy plant mini kit" van Qiagen geëxtraheerd, op dezelfde manier als beschreven in 2.6.



Figuur 2.3: Schematische voorstelling van T-DNA met rechter (RB) en linker border (LB), waarin de posities van de specifieke primers weergegeven zijn. De willekeurige primers binden aan het genomische DNA (gDNA) dat het T-DNA flankiert.

Een TAIL-PCR bestaat uit drie opeenvolgende PCR reacties met een korte willekeurige primer en 3 ‘nested’ primers die specifiek zijn voor de T-DNA border (Tabel 2.1). De TAIL-PCR wordt in deze studie zowel aan de linker (LB) als de rechter border (RB) uitgevoerd. De specifieke primer waarmee de eerste PCR reactie wordt uitgevoerd (RB1 of LB1), ligt het verst van de border en dus ook het verst van de willekeurige primer (AD) (Figuur 2.3). De eerste PCR mix bestond uit 400 ng DNA, 10x Dreamtaq Green buffer, 0,4 mM dNTP, 1,25 units DreamTaq™ DNA Polymerase van Fermentas en 400 nM forward en reverse primers, aangevuld met H<sub>2</sub>O tot 25 µl. Voor de tweede en derde PCR reactie werd het PCR product van de voorgaande reactie telkens 50 x verdund. De PCR mix voor deze reacties was identiek aan deze van de eerste reactie, behalve dat er 1 µl 50x verdund PCR product van de voorgaande reactie werd gebruikt in plaats van 400 ng DNA. De secundaire RB en tertiaire primer RB liggen precies 103 bp van elkaar (Figuur 2.3). Het verschil tussen de locatie van de secundaire en tertiaire LB primer is 114 bp. Omdat de amplicons van de tertiaire PCR reactie 103 (RB) of 114 bp (LB) korter zijn dan die van de secundaire reactie, kunnen we de specifieke PCR producten van de aspecifieke onderscheiden.

Tabel 2.1: Sequenties van de primers die gebruikt werden voor de TAIL-PCR.

Primer	Sequentie
Rechter border 1 (RB 1)	GGCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
Rechter border 2 (RB 2)	AACGTCGTGACTGGGAAAACCCT
Rechter border 3 (RB 3)	CCCTTCCCAACAGTTGCGCA
Linker border 1 (LB 1)	GGGTTCCCTATAGGGTTTCGCTCATG
Linker border 2 (LB 2)	CATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCT
Linker border 3 (LB 3)	GAATTAATTCGGCGTTAATTCAGT
AD 1	NTCGASTWTSWGTT
AD 2	NGTCGASWGANAWGAA
AD 3	WGTGNAGWANCANAGA

W = A of T; N = A, T, C of G; S = G of C

De reactiecondities en thermische instellingen zijn beschreven in tabel 2.2. De TAIL-PCR werd uitgevoerd met 3 verschillende willekeurige primers AD1, AD2 en AD3 (Tabel 2.1). De primaire, secundaire en tertiaire PCR producten werden op een 1% agarose gel in TAE gescheiden door middel van elektroforese en gekleurd met gelred. De gel werd onder een UV lamp bekeken en er werd een UV-scan van gemaakt.

Tabel 2.2: Cyclus instellingen voor TAIL-PCR. (Liu et al.,1995)

Reactie	Stap	# Cycli	Programma
Primaire PCR	1	1	93°C 1 min; 95°C 1 min
	2	5	94°C 30 sec; 62°C 1 min; 72°C 2,5 min
	3	1	94°C 30 sec; 25°C 3 min; ramping naar 72°C over 3 min;
	4	15	72°C 2,5 min
	5	1	94°C 10 sec; 68°C 1 min; 72°C 2,5 min
Secundaire PCR	6	12	94°C 10 sec; 64°C 1 min; 72°C 2,5 min
			94°C 10 sec; 64°C 1 min; 72°C 2,5 min
			94°C 10 sec; 44°C 1 min; 72°C 2,5 min
5	1	72°C 5 min	
Tertiaire PCR	7	20	94°C 15 sec; 44°C 1 min; 72°C 2,5 min
	5	1	72°C 5 min

## 2.4 Controle van mutatie

Omwille van problemen met het lokaliseren van het T-DNA in het genoom van de transformanten, werd een controle van de mutatie uitgevoerd met behulp van een PCR reactie. De PCR mix bestond uit 400 ng DNA, 10x Dreamtaq Green buffer, 0,4 mM dNTP, 1,25 units DreamTaq™ DNA Polymerase van Fermentas en 300 nM van elke primer, aangelengd met H<sub>2</sub>O tot 25 µl. De HpH-Fwd (AAGCCTGAACTCACCGCGAC) en HpH-Rev (CTATTCCTTTGCCCTCGGAC) primers, die hier gebruikt werden, zijn specifiek voor het hygromycine resistentiegen dat zich in het T-DNA bevindt.

Tijdens de PCR reactie werden de stalen 1 min tot 95°C verwarmd voor denaturatie. Vervolgens werden er 40 cycli doorlopen waarbij de stalen 30s op 95°C worden gedensatureerd, 30s op 60°C werden gehouden voor “primer annealing” te bekomen en 1 min op 72°C worden geëlongeerd. Ten slotte volgde de finale extensie gedurende 5 min op 72°C.

De PCR producten werden op een 1% agarose gel in TAE gescheiden met behulp van elektroforese en gekleurd met gelred. De gel werd onder een UV lamp bekeken en er werd een UV-scan van gemaakt.

## 2.5 Controle hygromycineresistentie

Afwezigheid van de mutatie in het genoom van de transformaten heeft geleid tot het uitvoeren van een tweede controle. Ditmaal werd de hygromycineresistentie van het wild type Lm10 n26 gecontroleerd. Het wild type werd opgegroeid op Friesmedium met verschillende hygromycineconcentraties. Elk isolaat werd geplaatst op Friesmedium met 0, 25, 50, 75 en 100 µg/ml hygromycine. Er werden 3 biologische herhalingen uitgevoerd.

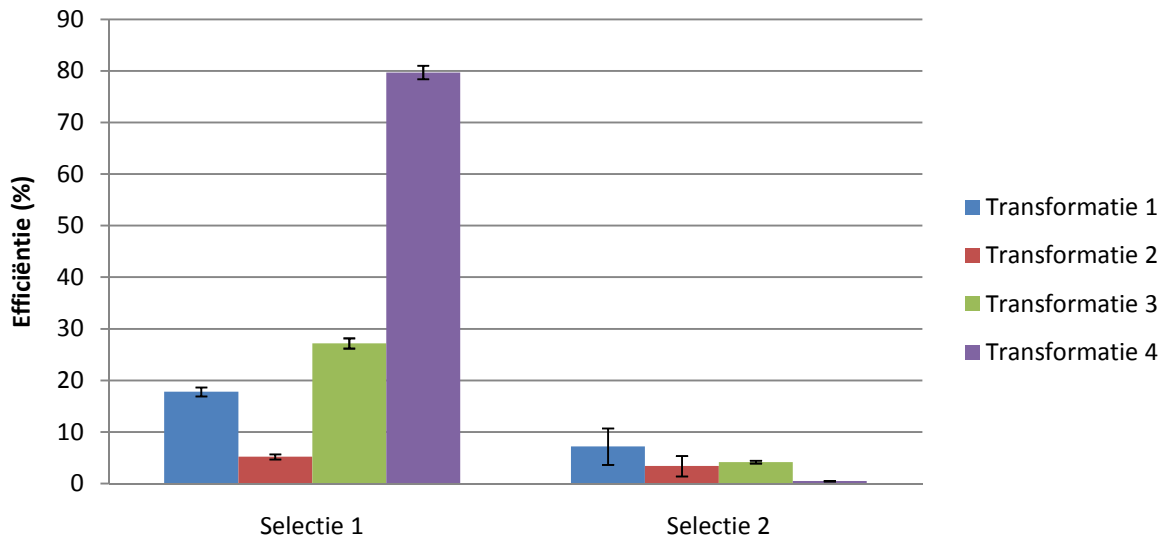


### 3. Resultaten

#### 3.1 *Agrobacterium* gemedieerde transformatie

Voor het aanbrengen van mutaties in het genoom van *Suillus luteus*, werd *Agrobacterium* gemedieerde transformatie gebruikt. De monokaryote schimmel Lm10 n26 werd met deze methode op een willekeurige plaats in het genoom gemuteerd. Omdat het ingebrachte T-DNA het hygromycine resistentiegen bevat, wordt verwacht dat na transformatie enkel de gemuteerde fungi op selectiemedium met 200  $\mu$ M cefotaxime en 50  $\mu$ g/ml hygromycine groeien.

In dit project werden vier *Agrobacterium* gemedieerde transformaties uitgevoerd. De fungi werden geselecteerd op basis van de groei op het selectiemedium met hygromycine. In transformatie 1 groeide 17,8% van de fungi op selectiemedium met 200  $\mu$ M cefotaxime en 50  $\mu$ g/ml hygromycine (Figuur 3.1). In transformatie 2 groeide 5,2% van de fungi op dit eerste selectiemedium (Figuur 3.1). De derde transformatie leverde een percentage van 27,2 op na de eerste selectie (Figuur 3.1). De laatste transformatie had na de eerste selectie een efficiëntie van 79,7% (Figuur 3.1). De variatie tussen de verschillende platen binnen elke transformatie wordt weergegeven door de foutbalken (Figuur 3.1) die de standaardfout (SE) weergeven.



Figuur 3.1: Gemiddelde transformatie-efficiëntie  $\pm$  SE na de eerste en tweede selectie. (n=20 voor transformatie 1, 2 en 3; n=40 voor transformatie 4)

De getransformeerde schimmels worden vervolgens zonder drager overgezet op een tweede selectiemedium met 25  $\mu$ g/ml hygromycine. 40,5% van de transformanten die de eerste selectie overleefden, groeide ook op dit tweede selectiemedium in transformatie 1. De totale efficiëntie van transformatie 1 na de tweede selectie is dan 7,2% (Figuur 3.1). Van transformatie 2 groeit 65,4% van



de transformanten eveneens op het tweede selectiemedium. De totale efficiëntie van transformatie 2 na de tweede selectie is 3,4% (Figuur 3.1). Na transformatie 3 groeide 6,4% van de transformanten van de eerste selectie ook op het tweede selectiemedium. Deze transformatie heeft dus een totale efficiëntie van 4,2% na de tweede selectie (Figuur 3.1). In transformatie 4 werd 50 µg/ml hygromycine toegevoegd aan het tweede selectiemedium. 6,27% van de transformanten die groeiden op het eerste selectiemedium, groeide eveneens op dit tweede medium. De totale efficiëntie van transformatie 4 is dan 0,5%.

We kunnen stellen dat na de eerste selectie de efficiënties van transformatie 1, 2 en 3 veel van elkaar verschillen, maar dat de totale efficiënties na de tweede selectie korter bij elkaar liggen. De totale efficiënties van deze drie transformaties liggen tussen 3,4% en 7,2%.

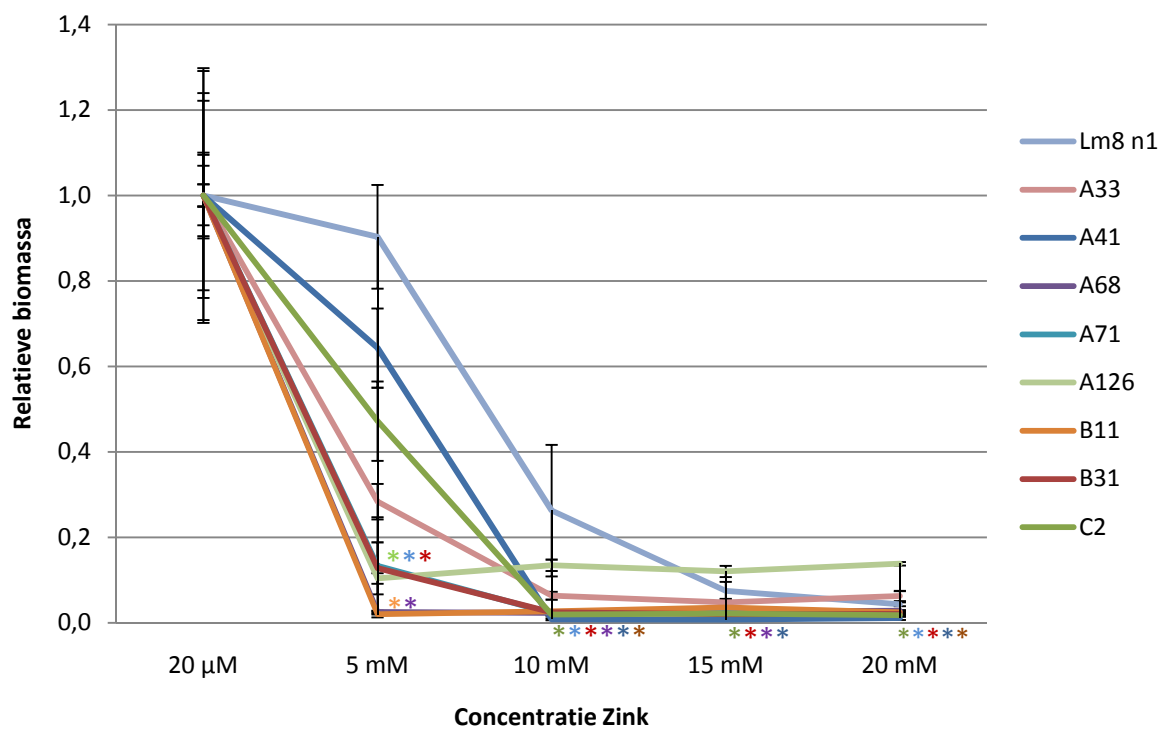
De totale efficiëntie van de transformatie 4 is lager dan die van de transformatie 1, 2 en 3. In transformatie 4 was de selectiedruk in het tweede selectiemedium hoger door toevoeging van 50 µg/ml hygromycine aan het selectiemedium in plaats van 25 µg/ml hygromycine.

### 3.2 Zinktest

Om na te gaan of de zinktolerantie van de gemuteerde schimmels verschillend is met die van het wild type, werd een zinktest uitgevoerd. Er werden in totaal 166 transformanten getest met behulp van deze zinktest. 95 transformanten zijn afkomstig uit een collectie van eerdere transformaties van het Lm8 n1 wild type (resultaten in Bijlage 1), de overige 71 transformanten zijn afkomstig van de transformaties met het Lm10 n26 wild type (resultaten in Bijlage 2). In figuur 3.2 en 3.4 is de relatieve biomassa van de transformanten weergegeven nadat deze 14 dagen werden opgegroeid op Fries medium met 20 µM, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM zink. Enkel de transformanten met een beduidend lagere zinktolerantie dan het wild type zijn weergegeven in deze figuren.

In figuur 3.2 is Lm8 n1 het wild type waaruit de transformanten zijn ontstaan en dus fungeert deze stam als controlefungus in deze zinktest. De Lm8 n1 fungus groeit even goed op medium met 5 mM Zn als op medium met 20 µM zink, de controle concentratie (Figuur 3.2). Ook bij 10 mM Zn blijft deze schimmel groeien, maar de biomassa is zichtbaar afgenomen. De biomassa van de transformanten, daalt op medium met 5 mM Zn onder de 65%, wanneer we vergelijken met de controle concentratie (Figuur 3.2). Voor transformanten A68, A71, A126, B11 en B31 is de relatieve biomassa op 5 mM Zn significant ( $P < 0,05$ ) verschillend met deze van de controlefungus (Figuur 3.2,\*). De transformante fungi groeiden minimaal op medium met 10 mM Zn (Figuur 3.2). Op deze concentratie is de daling van de relatieve biomassa significant ( $P < 0,05$ ) voor de transformanten A41, A68, A71, B11, B31 en C2 in vergelijking met de controlefungus (Figuur 3.2,\*). Op medium met 15 mM Zn is er een significant

( $P < 0,05$ ) verschil in relatieve biomassa voor de transformanten A41, A68, B31 en C2, wanneer we vergelijken met de controlefungus (Figuur 3.2,\*). De relatieve biomassa van transformanten A41, A71, B11, B31 en C2 op medium met 20 mM Zn verschilt significant ( $P < 0,05$ ) van de relatieve biomassa van Lm8 n1 op deze concentratie (Figuur 3.2,\*). Transformanten A33, A41, A68, A71, A126, B11, B31 en C2 testten allemaal positief op de eerste zinkreeks, omdat de relatieve biomassa op medium met 5 mM Zn lager is dan 65% in vergelijking met deze op de controle concentratie. De acht transformanten worden bijgevolg meegenomen naar volgende experimenten waarin de locatie van het T-DNA bepaald zal worden. De transformanten A41, B11, B31 en C2 werden echter wel nog getest op een tweede zinkreeks.



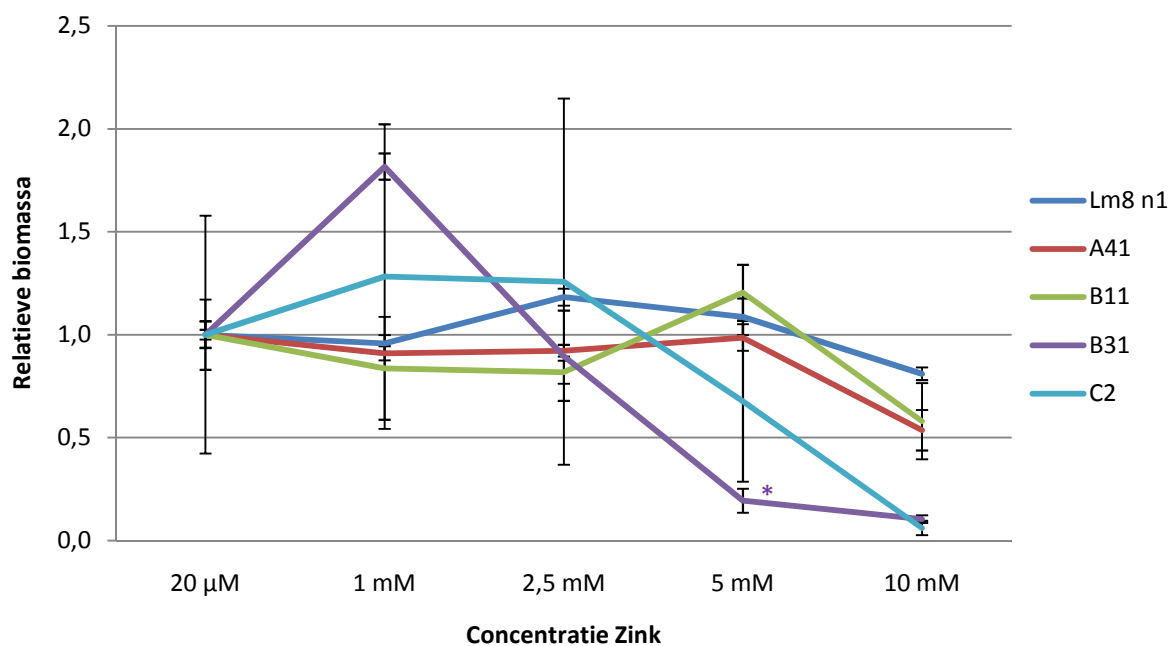
Figuur 3.2: Gemiddelde biomassaproductie ( $n=3$ )  $\pm$  SE na 14 dagen groei op verschillende zinkconcentraties met Lm8 n1 als controlefungus. De significante verschillen t.o.v. de controlefungus: \*  $P < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

Om de verminderde zinktolerantie van de transformanten te bevestigen, werden ze een tweede keer getest op een zinkreeks met lagere zinkconcentraties. Figuur 3.3 geeft de relatieve biomassa weer van de transformanten na 14 dagen gegroeid te hebben op Fries medium met 20 µM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM en 10 mM. De controlefungus, Lm8 n1, groeide op deze tweede zinkreeks op alle concentraties. De transformanten B11 en A41 hadden een relatieve biomassa van meer dan 65% op alle concentraties tot en met 5 mM zink, wanneer we vergelijken met de controle concentratie. Op 10 mM Zn groeiden deze fungi ook, maar de relatieve biomassa was op deze hoogste concentratie

gehalveerd. De transformanten, B31 en C2, groeiden beide op medium tot en met 2,5 mM Zn (>65%). Maar reeds op 5 mM Zn daalt bij deze fungi de biomassa tot minder dan 65% in vergelijking met deze op de controle concentratie. De relatieve biomassa van transformant B31 is significant ( $P < 0,05$ ) verschillend van de biomassa van de controlefungus op medium met 5 mM Zn. Op medium met 10 mM Zn was er geen groei meer waar te nemen van de C2 en B31 transformanten.

De locatie van het T-DNA in het genoom van transformanten A41 en B11 wordt verder niet bepaald, omdat de verminderde zinktolerantie van deze fungi op de tweede zinkreeks niet bevestigd werd. De verminderde zinktolerantie werd in de tweede zinkreeks enkel bevestigd voor de transformanten B31 en C2. De relatieve biomassa van deze twee transformanten daalt namelijk op 5 mM Zn onder de 65% in vergelijking met deze op de controle concentratie.

Hoewel de zinktolerantie van de transformanten A33, A68, A71 en A126 niet werd getest op een tweede zinkreeks, worden de zes transformanten A33, A68, A71, A126, B31 en C2 meegenomen naar verdere experimenten waarin de locatie van het T-DNA bepaald zal worden.

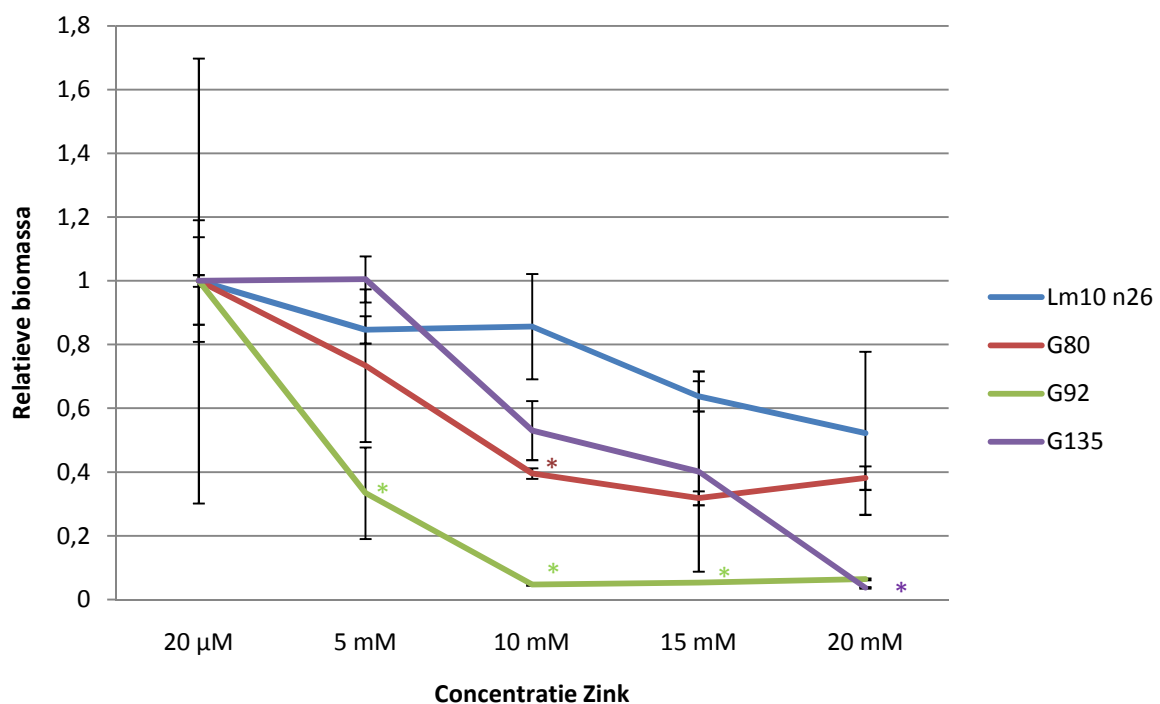


Figuur 3.3: Gemiddelde biomassaproductie ( $n=3$ )  $\pm$  SE na 14 dagen groei op verschillende zinkconcentraties. De significante verschillen t.o.v. de controlefungus: \*  $P < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

Figuur 3.4 geeft de transformanten weer die zijn ontstaan uit het wild type Lm10 n26. Deze transformanten zijn ontstaan uit de vier transformaties in dit project. In figuur 3.4 zijn enkel de transformanten weergegeven die een verminderde zinktolerantie hebben ten opzichte van de controlefungus. Aangezien de transformanten afkomstig zijn van het Lm10 n26 wild type, is de Lm10 n26 fungus de controlefungus in deze zinktest.

Lm10 n26 groeit op alle zinkconcentraties, maar vanaf de zinkconcentratie van 15 mM werd de biomassa gehalveerd. De relatieve biomassa van transformanten G80 en G135 halveert reeds op medium met 10 mM Zn. Er is een significant ( $P < 0,05$ ) verschil tussen de relatieve biomassa van transformant G80 en die van de controlefungus op 10 mM Zn. De relatieve biomassa van transformant G135 en Lm10 n26 is significant ( $P < 0,05$ ) verschillend op medium met 20 mM Zn. Voor transformant G92 werd een verminderde biomassaproductie (daling tot 30%) reeds geobserveerd op medium met 5 mM zink. Er is een significant ( $P < 0,05$ ) verschil tussen de relatieve biomassa van transformant G92 en de controlefungus op medium met 5, 10 en 15 mM Zn.

De locatie van het T-DNA in de drie transformanten, die afkomstig zijn van het Lm10 n26 wild type, wordt gelokaliseerd in verdere experimenten. Deze transformanten vertonen een verminderde zinktolerantie in vergelijking met het wild type aangezien de relatieve biomassa van de drie transformanten op 10 mM Zn daalt onder de 65% in vergelijking met deze op de controle concentratie.



Figuur 3.4: Gemiddelde biomassaproductie ( $n=3$ )  $\pm$  SE na 14 dagen groei op verschillende zinkconcentraties met Lm10 n26 als controlefungus. De significante verschillen t.o.v. de controlefungus: \*  $P < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

### 3.3 Lokalisatie van mutatie

Transformanten A68, A71, B31 en C2 waren de eerste transformanten met een verminderde zinktolerantie die gevonden werden. De locatie van het T-DNA werd dus het eerst bepaald in deze transformanten. Bij aanvang van de experimenten was er onvoldoende materiaal beschikbaar van transformant B31, om deze reden werd enkel het DNA van transformanten A68, A71 en C2 in deze testen gebruikt.

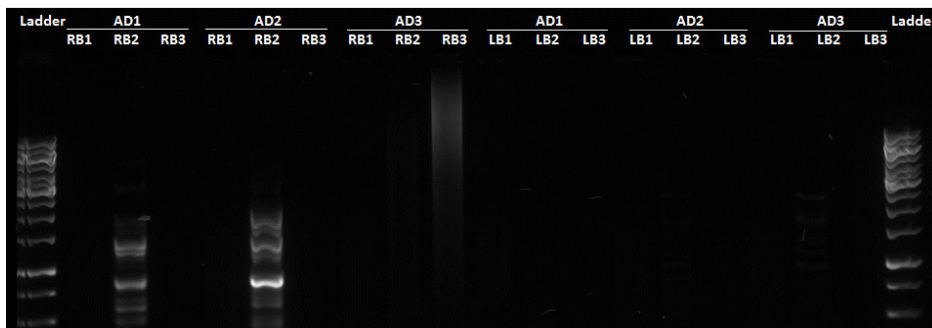
#### 3.3.1 Plasmid rescue

Het T-DNA werd gelokaliseerd in transformant C2 met behulp van “plasmid rescue”. Deze methode kan niet gebruikt worden voor transformanten van de A-reeks. Deze transformanten werden namelijk gemuteerd met het originele pBGgHg plasmide, waarin het pTZ19R plasmide niet geligeerd is. Omdat de transformanten van deze A-reeks bijgevolg geen ampicilline resistentiegen en geen replicon in het T-DNA hebben, kan het T-DNA niet gelokaliseerd worden met deze methode.

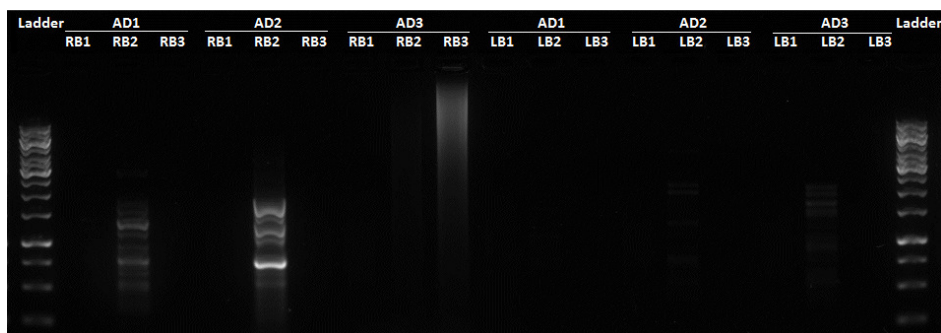
Na 16 uur groeide op het LB medium met 50 µg/ml ampicilline geen kolonies. De locatie van het T-DNA in het genoom van transformant C2 kon dus niet bepaald worden met behulp van deze methode.

#### 3.3.2 TAIL-PCR

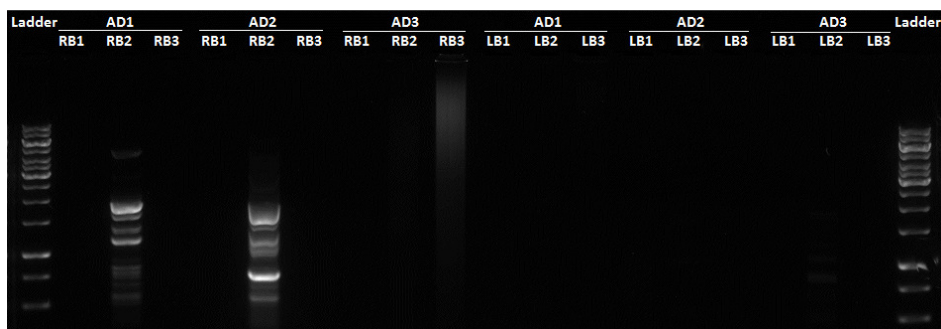
De locatie van de mutatie werd eveneens bepaald met behulp van een TAIL-PCR reactie. Deze reactie werd uitgevoerd voor de isolaten A68, A71 en C2. De amplicons die gevormd werden met het DNA van transformant A68, werden gescheiden op gel (Figuur 3.5). In figuur 3.6 is de gel weergegeven waarop de amplicons gescheiden zijn, die bekomen werden met het DNA van transformant A71. De amplicons van transformant C2, werden gescheiden op de gel weergegeven in figuur 3.7.



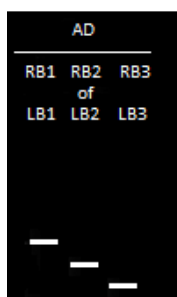
Figuur 3.5: Gel van amplicons die bekomen werden door TAIL-PCR met DNA van de A68 transformant.



Figuur 3.6: Gel van amplicons die bekomen werden door TAIL-PCR met DNA van de A71 transformant.



Figuur 3.7: Gel van amplicons die bekomen werden door TAIL-PCR met DNA van de C2 transformant.



Figuur 3.8: Schematische voorstelling van het verwachte patroon dat de amplicons zullen vormen op gel, wanneer geamplificeerd met een willekeurige primer (AD) en 3 specifieke primers van de linker (LB) of rechter border (RB).

In figuur 3.8 is het verwachte patroon weergegeven dat de amplicons zullen vormen na amplificatie met TAIL-PCR. Dit patroon werd echter niet geobserveerd op de gels van deze TAIL-PCR reacties (Figuur 3.5, 3.6, 3.7). Het aantal bandjes binnen één laan is op enkele plaatsen hoger dan verwacht. Er werden meerdere bandjes geobserveerd na amplificatie met de RB2 primer in combinatie met de AD1 of AD2 primer (Figuur 3.5, 3.6, 3.7). Minder goed zichtbaar is het meervoud aan bandjes na amplificatie met primer LB2, wanneer gecombineerd met primers AD2 en AD3 (Figuur 3.5, 3.6, 3.7).

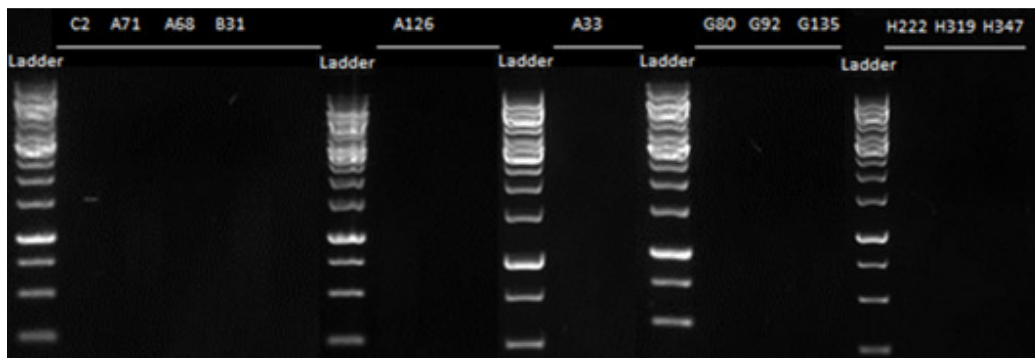
Volgens het patroon in figuur 3.8 dienen er drie bandjes naast elkaar waargenomen te worden, die gevormd werden door reactie met één willekeurige primer en de drie specifieke primers van één border regio. De amplicons zouden dan elke keer enkele basenparen korter worden. Dit werd niet gezien in dit experiment (Figuur 3.5, 3.6, 3.7).

### 3.4 Controle mutatie

Omdat het T-DNA niet gelokaliseerd kon worden met behulp van “plasmid rescue” en TAIL-PCR, werd met behulp van een PCR reactie de aanwezigheid van de mutatie in het genoom van de transformanten gecontroleerd. Het hygromycine resistentiegen, dat aanwezig is in het T-DNA, werd geamplificeerd in deze reactie.

Er werden twaalf transformante schimmels gecontroleerd op de aanwezigheid van dit hygromycine resistentiegen. Hoewel transformanten H222, H319 en H347 geen verminderde zinktolerantie vertoonden op de zinktest, werd de aanwezigheid van het T-DNA in het genoom toch gecontroleerd. Deze drie transformanten werden gemuteerd in transformatie 4, waar het tweede selectiemedium 50 µg/ml hygromycine bevat in plaats van 25 µg/ml. Omdat de selectiedruk in dit tweede selectiemedium verhoogd is, verwacht men dat de kans groter is dat deze transformanten de mutatie bevatten.

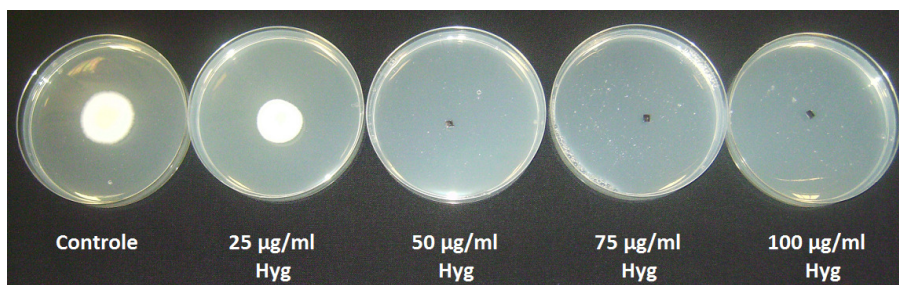
In figuur 3.9 zijn de gels zichtbaar waarop de amplicons gescheiden werden. Voor geen enkele transformant is er een bandje waar te nemen op deze gel. We kunnen besluiten dat het T-DNA afwezig is in het genoom van deze twaalf transformanten.



Figuur 3.9: Gelelektroforese van PCR producten, die bekomen werden met DNA van transformante fungi en het primerpaar voor het hygromycine resistentiegen.

### 3.5 Controle hygromycineresistentie

Omwille van de afwezigheid van het T-DNA in het genoom van de transformanten, werd een bijkomende controle uitgevoerd. In deze tweede controle werd de hygromycineresistentie van het wild type Lm10 n26 nagegaan. In voorgaande experimenten was de hygromycineresistentie van Lm8 n1 reeds bepaald. Het Lm8 n1 wild type is resistent tegen hygromycineconcentraties tot 10  $\mu\text{g/ml}$ . Het Lm10 n26 wild type groeide na twee weken op de controle plaat (0  $\mu\text{g/ml}$  hygromycine) en op het medium met 25  $\mu\text{g/ml}$  hygromycine (Figuur 3.10). De resultaten van deze hygromycinereeks waren identiek bij observatie na drie weken. De wild type fungus Lm10 n26 is dus resistent tegen hygromycine tot een concentratie van 25  $\mu\text{g/ml}$ .



Figuur 3.10: Wild-type Lm10 n26 op hygromycinereeks met 0, 25, 50, 75 en 100  $\mu\text{g/ml}$  hygromycine.





## 4. Discussie

### 4.1 *Agrobacterium* gemedieerde transformatie

Dit project heeft als doel determinanten te identificeren van de adaptieve zinktolerantie in *Suillus luteus*. Op een willekeurige plaats in het genoom van de fungus werd een genotypische verandering aangebracht, die een fenotypische verandering, in de vorm van een verminderde zinktolerantie, tot gevolg kan hebben. Een willekeurige mutatie in het genoom van de zinktolerante *Suillus luteus* stam, Lm10 n26, werd bekomen door *Agrobacterium* gemedieerde transformatie.

In dit project werden vier *Agrobacterium* gemedieerde transformaties uitgevoerd. De efficiëntie van een transformatie wordt bepaald op basis van de hygromycineresistentie van de transformanten. In een voorgaand experiment, waarin het wild type Lm8 n1 getransformeerd werd, bleek deze methode erg succesvol. De transformanten die overbleven na vier selecties op medium met 25 µg/ml hygromycine, bleken allemaal het hygromycine resistentiegen te bevatten en dus getransformeerd te zijn.

In dit project zijn de efficiënties van de vier transformaties verschillend van elkaar (17,8%; 5,2%; 27,2% en 79,7%). Dit verschil is mogelijk te wijten aan het groeistadium waarin de schimmel zich bevindt bij aanvang van de transformatie. Het is belangrijk dat de cellen van de fungus heel levensvatbaar zijn en een actief metabolisme hebben op het moment van de transformatie (Kemppainen et al., 2011).

In voorgaande studies werd *Agrobacterium* gemedieerde transformatie reeds uitgevoerd in *Suillus bovinus* en *Laccaria bicolor*. *Agrobacterium* gemedieerde transformatie van het genoom van *Suillus bovinus* en *Laccaria bicolor* leverde respectievelijk 66,7 en 55% aan transformanten op (Hanif et al., 2002; Kemppainen et al., 2005).

In deze studie wordt hetzelfde protocol voor *Agrobacterium* gemedieerde transformatie gebruikt als in de studies met *Laccaria bicolor* en *Suillus bovinus*, weliswaar met enkele aanpassingen (Hanif et al., 2002; Kemppainen et al., 2005). De hygromycineconcentratie in het eerste selectiemedium van de transformatie van *Suillus bovinus* (25 µg/ml) is lager in vergelijking met deze in de transformatie van *Suillus luteus* (50 µg/ml) (Hanif et al., 2002). In het selectiemedium van de transformatie van *Laccaria bicolor* is de hygromycineconcentratie (300 µg/ml) hoger dan deze in ons selectiemedium (Kemppainen et al., 2005). De hygromycineconcentratie in het selectiemedium wordt bepaald op basis van hygromycineresistentie van het wild type. Uit voorgaand experiment bleek dat het wild type Lm8 n1 van *Suillus luteus* resistent is tegen 10 µg/ml hygromycine. Bijgevolg werd in deze studie, waarin we het Lm10 n26 wild type van *Suillus luteus* transformeren, de eerste selectie uitgevoerd op

medium met 50 µg/ml hygromycine. De tweede selectie gebeurde op medium met 25 µg/ml hygromycine.

De transformatie van *Suillus bovinus* en *Laccaria bicolor* gebeurde op een andere drager, namelijk cellofaan (Hanif et al., 2002; Kemppainen et al., 2005). Uit een voorgaand experiment bleek echter dat glas microfiber schijfjes meer optimaal zijn dan cellofaan als drager voor *Agrobacterium* gemedieerde transformatie met *Suillus luteus*. Het effect van deze drager op de transformatie-efficiëntie wordt dus verwacht minimaal te zijn.

De efficiëntie van de *Agrobacterium* gemedieerde transformatie is mogelijk afhankelijk van de hygromycineconcentratie in het selectiemedium, maar is eveneens species-afhankelijk. *Agrobacterium* gemedieerde transformatie blijkt minder efficiënt in *Suillus luteus* dan in *Laccaria bicolor* of *Suillus bovinus*.

Binnen eenzelfde transformatie met *Suillus luteus* is er eveneens variatie in efficiëntie tussen de verschillende platen, waarop fungus en *Agrobacterium* in cocultuur werden gebracht. Deze variatie kan ontstaan door het feit dat de tijdspanne tussen het aanbrengen van de schimmelsuspensie op de glas microfiber schijfjes en het toevoegen van de *Agrobacterium tumefaciens* cultuur, niet constant is over alle platen.

Na de tweede selectie liggen de efficiënties van de eerste drie transformaties korter bij elkaar (7,2% ; 3,4% en 4,2%) dan na de eerste selectie. We kunnen besluiten dat een grote efficiëntie na de eerste selectie, een hoger percentage aan vals positieven inhoudt, zodat de totale transformatie-efficiënties uiteindelijk gelijkend zijn. Het feit dat de efficiëntie van transformatie 4 (0,5%) na de tweede selectie lager ligt dan die van de overige drie transformaties, is te verklaren door de verhoogde selectiedruk in het tweede selectiemedium van deze transformatie. Het tweede selectiemedium in transformatie 4 bevatte 50 µg/ml hygromycine in plaats van 25 µg/ml.

## 4.2 Zinktest

De zinktolerantie van de transformanten werd getest op een reeks met verschillende concentraties aan zink. Acht transformanten uit een voorgaande studie vertoonden op deze zinkreeks een verminderde zinktolerantie in vergelijking met het wild type, Lm8 n1, waaruit ze zijn ontstaan. Van de transformanten die afkomstig zijn van het Lm10 n26 wild type, hadden drie fungi een verminderde zinktolerantie in vergelijking met de controlefungus. We vermoeden dat het T-DNA in deze transformanten werd ingebracht op de plaats van een determinant van de zinktolerantie.

In deze studie vertoont 6,6% van de transformanten op de zinkreeks een verminderde zinktolerantie in vergelijking met het wild type. Recent werd in een studie van Pagani een gelijkaardige zinktest uitgevoerd met mutanten van de gist *Saccharomyces cerevisiae* (Pagani et al., 2007). In deze test vertoonde 1,84% van de transformanten een verminderde zinktolerantie in vergelijking met het wild type. De relatief grote proportie aan transformanten dat een verminderde zinktolerantie vertoont in deze studie, doet vermoeden dat een aantal van deze transformanten vals positief test op deze zinkreeks.

Om de verminderde zinktolerantie te bevestigen, werden vier transformanten (A41, B11, B31 en C2) getest op een tweede zinkreeks met lagere zinkconcentraties. De gedaalde zinktolerantie van transformanten C2 en B31 werd op deze tweede reeks eveneens waargenomen. De verminderde zinktolerantie van transformanten A41 en B11 daarentegen werd niet bevestigd. Deze laatste twee transformanten kunnen het T-DNA verloren hebben terwijl ze groeiden op de eerste zinkreeks. Maar het is eveneens mogelijk dat het initieel mycelium, dat werd gebruikt voor de eerste zinkreeks, in een mindere metabole toestand verkeerde bij aanvang van de test. In dat geval is het mogelijk dat het resultaat van deze eerste zinkreeks vals positief is.

### 4.3 Lokalisatie van mutatie

Transformanten A68, A71, B31 en C2 waren de eerste transformanten met een verminderde zinktolerantie die gevonden werden op de zinkreeks. Op het moment dat het identificatie-experiment startte was er enkel voldoende materiaal beschikbaar van de transformanten A68, A71 en C2. Om deze reden werd de locatie van het T-DNA het eerst bepaald in deze drie transformanten.

In het “plasmide rescue” experiment werd enkel het DNA van transformant C2 gebruikt. Recent was deze methode in *Laccaria bicolor* succesvol in het isoleren van de T-DNA-gDNA junctie in 69% van de transformanten (Kempainen et al., 2008). In de huidige studie echter leverde de “plasmid rescue” geen kolonies op. Het T-DNA in het genoom van transformant C2 kon niet met behulp van “plasmid rescue” gelokaliseerd worden.

Het DNA van de drie transformanten A68, A71 en C2 werd vervolgens gebruikt in een TAIL-PCR. In voorgaande studies, werd de TAIL-PCR succesvol uitgevoerd met behulp van de willekeurige primers AD1, AD2 en AD3 (Tabel 2.1). Amplificatie met de AD3 primer leverde in 90% van de geanalyseerde transformanten amplicons op in *Fusarium oxysporum* (Mullins et al. 2000). In *Arabidopsis thaliana* werd 96% van de transformanten succesvol geamplificeerd in een TAIL-PCR met de drie willekeurige primers AD1, AD2 en AD3 (Liu et al., 1995). In *Hebeloma cylindrosporum* werd 84,5% van de transformanten met deze 3 willekeurige primers geamplificeerd (Combier et al., 2003).

In deze studie werden de amplicons van de TAIL-PCR gescheiden op gel, maar het verwachte patroon werd niet geobserveerd. We verwachten dat, wanneer gecombineerd met eenzelfde willekeurige primer (AD), er enkel een amplicon kan gevormd worden met de RB2 en/of RB3 primer (LB2 en/of LB3) indien er eveneens een amplicon gevormd werd met de RB1 primer (LB1). Deze verwachting berust op het feit dat de RB2 en RB3 primers (LB2 en LB3) telkens binnen het amplicon liggen, dat werd bekomen in de voorgaande PCR reactie. Aangezien het PCR product van de voorgaande reactie als startmateriaal gebruikt werd in de tweede en derde reactie, worden de PCR producten van elke reactie elke keer een aantal basenparen korter. De steeds korter wordende amplicons geven idealiter een trapsgewijs patroon op de gel (Figuur 3.8). Dit verwachte patroon werd in dit TAIL-PCR experiment niet geobserveerd.

Aangezien er amplicons gevormd werden met de RB2 of RB3 primer (LB2 of LB3), wanneer er geen amplicon zichtbaar is na amplificatie met RB1 (LB1), zijn deze amplicons niet afkomstig van de T-DNA-gDNA junctie in de transformanten. We verwachten dat de amplicons ontstaan zijn door aspecifieke binding van de RB2 of RB3 primer (LB2 of LB3).

#### 4.4 Controle mutatie

Omdat de lokalisatie van de T-DNA in het genoom van de drie transformanten niet succesvol was, werd de aanwezigheid van het insert in het DNA gecontroleerd. Met behulp van een PCR reactie werd nagegaan of het hygromycine resistentiegen, dat deel uitmaakt van het ingebrachte T-DNA, aanwezig is in het DNA van de transformanten. De controle van de mutatie met behulp van deze HpH-Fwd en HpH-rev primers werd reeds uitgevoerd in *Laccaria bicolor* en *Suillus bovinus* (Kemppainen et al., 2005; Hanif et al., 2002). In deze twee studies bleek de test erg succesvol te zijn.

Indien mogelijk werd fungusmateriaal, dat rechtstreeks afkomstig is van medium met hygromycine, gebruikt voor controle van de mutatie in de transformanten. Het materiaal dat afkomstig is van de zinkreeks is niet optimaal voor deze test. De transformanten kunnen het T-DNA op de zinkreeks verloren hebben aangezien het medium van de zinkreeks geen hygromycine bevat. Hygromycine werd niet toegevoegd aan dit medium omdat het wild type, waarmee de transformanten vergeleken worden, het hygromycine resistentiegen niet bevat. Ook kan de interactie tussen de beide stressoren, Zn en hygromycine, de resultaten van de zinktest beïnvloeden.

Het T-DNA is niet aanwezig in het genoom van de drie transformanten A68, A71 en C2. De afwezigheid van het T-DNA in het genoom verklaart waarom de mutatie niet gelokaliseerd kon worden met behulp van "plasmid rescue" en TAIL-PCR.

Vervolgens werden de overige transformanten, die een verminderde zinktolerantie vertoonden in de zinktest, eerst gecontroleerd op de aanwezigheid van het T-DNA alvorens over te gaan tot de lokalisatie van de mutatie. Transformanten A33, A126, B31, G80, G92 en G135 werden gecontroleerd op de aanwezigheid van het hygromycine resistentiegen. Maar ook in het genoom van deze transformanten bleek het hygromycine resistentiegen afwezig te zijn.

We weten dat de transformanten, die ontstaan zijn uit het Lm8 n1 wild type, het T-DNA verloren hebben. De aanwezigheid van de mutatie werd bij deze transformanten namelijk bevestigd na 4 selecties op medium met 25 µg/ml hygromycine. Na deze bevestiging werden de transformanten bewaard bij 4°C om 6 maanden later getest te worden op de zinkreeks. Mogelijk hebben deze transformanten het insert verloren tijdens de bewaring bij 4°C. Indien het T-DNA volledig verloren is gegaan, is het niet langer mogelijk dat er een determinant van de zinktolerantie getroffen is en is het resultaat van de zinkreeks bijgevolg vals positief geweest. Dit kan gebeuren wanneer het initieel mycelium van deze zinkreeks in een mindere metabole toestand verkeerde bij aanvang van de test. Anderzijds is het ook mogelijk dat het insert slechts deels verloren is gegaan, en het achtergebleven gedeelte van het plasmide zorgt voor het behoud van de fenotypische verandering in de vorm van een verminderde zinktolerantie. In dat geval werd het T-DNA in deze transformanten wel ingebracht op de plaats van een determinant van de zinktolerantie, maar is het niet langer mogelijk om de mutatie te lokaliseren.

In transformanten G80, G92 en G135, die afkomstig zijn van het Lm10 n26 wild type, is het T-DNA eveneens afwezig. De aanwezigheid van de mutatie in het genoom van deze transformanten werd niet gecontroleerd na selectie op medium met 25 µg/ml hygromycine. De transformanten werden meteen na de selectie getest op de zinkreeks. Deze transformanten kunnen het T-DNA dus verloren hebben op het selectiemedium wanneer de selectiedruk onvoldoende was.

Transformanten H222, H319 en H347 zijn eveneens afkomstig van het wild type Lm10 n26, maar deze transformanten werden getransformeerd in transformatie 4. In deze transformatie werden de transformanten geselecteerd op selectiemedium met 50 µg/ml hygromycine in plaats van 25 µg/ml. Ondanks de verhoogde selectiedruk bevatten ook deze drie transformanten het T-DNA niet. We vermoeden dat de mutatie initieel afwezig was in deze transformanten.

## 4.5 Controle hygromycineresistentie

Indien de selectiedruk in het selectiemedium onvoldoende hoog is, kunnen transformanten het T-DNA verliezen op dit medium of kunnen ze vals positief testen. De hygromycineconcentratie in het selectiemedium wordt bepaald op basis van de hygromycineresistentie van het wild type, waaruit de transformanten ontstaan. In deze studie werd verondersteld dat de hygromycineresistentie van het Lm10 n26 en het Lm8 n1 wild type gelijk zijn. Het Lm8 n1 wild type is resistent tegen hygromycine tot een concentratie van 10 µg/ml.

Omwille van de afwezigheid van de mutatie in het genoom van de transformanten, wordt de hygromycineresistentie van het wild type Lm10 n26 toch nagegaan op een hygromycinereeks. De wild type fungus test resistent tegen hygromycineconcentraties tot 25 µg/ml. In de vier transformaties in deze studie gebeurde de eerste selectie op 50 µg/ml hygromycine, deze concentratie is voldoende hoog om een eerste selectie op uit te voeren. Maar aangezien een eerste selectie nog een groot aantal vals positieven oplevert, werden de transformanten nog een tweede keer geselecteerd.

In transformaties 1, 2 en 3 gebeurde deze tweede selectie op selectiemedium met 25 µg/ml hygromycine. Het hygromycine resistentiegen is in de transformanten, die afkomstig zijn van het Lm10 n26 wild type, niet noodzakelijk om te kunnen groeien op medium met 25 µg/ml hygromycine omdat dit wild type reeds resistent is tegen 25 µg/ml hygromycine. Deze hygromycineconcentratie (25 µg/ml) is dus onvoldoende om de mutatie te stabiliseren. De transformanten G80, G92 en G135 kunnen op dit tweede selectiemedium het T-DNA verliezen en vals positief testen.

In transformatie 4 werd de hygromycineconcentratie in het tweede selectiemedium verhoogd van 25 µg/ml naar 50 µg/ml. Men verwacht dat de transformanten van deze transformatie (H222, H319 en H347) het insert niet verliezen op dit selectiemedium omdat de selectiedruk voldoende hoog is. Toch blijken ook deze transformanten de mutatie niet te bevatten. Dit resultaat wijst erop dat de mutatie initieel afwezig was in deze fungi en dat de schimmels vals positief getest hebben op zowel het selectiemedium als op de zinkreeks.

Het Lm8 n1 wild type is, zoals reeds eerder vermeld, resistent tegen hygromycine tot een concentratie van 10 µg/ml. De hygromycineconcentratie van 25 µg/ml in het tweede selectiemedium is dus voldoende om de mutatie te stabiliseren in het genoom van de transformanten, die afkomstig zijn van Lm8 n1. Deze transformanten zijn het insert dus waarschijnlijk niet verloren op het selectiemedium, maar tijdens bewaring op 4°C.

## 5. Conclusie

We kunnen stellen dat er elf potentiële transformanten gevonden werden waarin vermoedelijk een zinkdeterminant getroffen werd door insertie van het T-DNA van *Agrobacterium tumefaciens*. Deze elf transformanten hebben een verminderde zinktolerantie in vergelijking met het wild type. De locatie van het T-DNA in het genoom van deze transformanten kon echter niet bepaald worden met “plasmid rescue” of TAIL-PCR.

In de zo genoemde transformanten, die afkomstig zijn van het wild type Lm10 n26, is het T-DNA mogelijk initieel afwezig geweest. Het wild type Lm10 n26 blijkt resistent te zijn tegen hygromycine tot een concentratie van 25 µg/ml. Maar zelfs wanneer de transformanten geselecteerd worden op een selectiemedium met 50 µg/ml hygromycine, blijkt het T-DNA afwezig in het genoom van de overlevenden. De fungi hebben de mutatie dus waarschijnlijk nooit gehad en testten vals positief op zowel het selectiemedium als op de zinkreeks.

De acht transformanten die afkomstig zijn van het Lm8 n1 wild type hebben het T-DNA verloren. Na vier selecties op medium met 25 µg/ml hygromycine werd de aanwezigheid van de mutatie bevestigd in het genoom van de transformanten. De transformanten werden dan zes maanden bewaard bij 4°C, alvorens getest te worden op een zinkreeks. Maar de transformanten met een verminderde zinktolerantie bleken de mutatie niet langer te bevatten. Aangezien Lm8 n1 wild type resistent is tegen hygromycineconcentraties tot 10 µg/ml, kunnen de transformanten het T-DNA niet verloren hebben op selectiemedium met 25 µg/ml hygromycine. Vermoedelijk zijn ze het insert verloren tijdens bewaring bij 4°C.

In de toekomst dient de hygromycineresistentie van wild type nagegaan te worden alvorens deze te gebruiken voor *Agrobacterium* gemedieerde transformatie. Met de Lm8 n1 en Lm10n26 wild types van *Suillus luteus*, hebben we gezien dat er aanzienlijke verschillen in hygromycineresistentie kunnen zijn tussen de verschillende wild types binnen een species. We kunnen ook besluiten dat we de transformanten best niet bewaren bij 4°C omdat de mutatie niet stabiel blijft tijdens bewaring bij 4°C. Het invriezen van de transformanten zou een alternatief kunnen zijn voor bewaring gedurende langere periodes. Momenteel is het invriezen van *Suillus luteus* isolaten nog geen routine en is het onderzoek nog steeds lopende. Wanneer het invriezen van *Suillus luteus* isolaten mogelijk blijkt te zijn, dient de stabiliteit van het ingebrachte T-DNA bij vriestemperaturen eveneens nog bestudeerd te worden.





## 6. Referenties

- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Guinet F, Blaudez D, Chalot M. (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology letters* 254 (2): 173-181.
- Bolchi A , Ruotolo R, Marchini G, Vurro E, Sanità di Toppi L. (2010) Genome-wide inventory of metal homeostasis-related gene products including a functional phytochelatin synthase in the hypogeous mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Fungal Genetics and Biology*.
- Chen X, Stone M, Schlagnhauser, Romaine CP. (2000) A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10):4510-3.
- Clemens S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707–1719.
- Colpaert JV, Vanassche JA. (1992) The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of the ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 145(2): 237-243.
- Colpaert JV, Vanderkoornhuysen P, Adriaensen K, Vangronsveld J. (2000) Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist*. 147: 367-379
- Colpaert JV, Muller LAH, Lambaerts M, Adriaensen K, Vangronsveld J. (2004) Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytologist* 162(2): 549-559.
- Colpaert JV, Adriaensen K, Muller LAH, Lambaerts M, Faes C, Carleer R, Vangronsveld J. (2005) Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi. *Mycorrhiza* 15(8): 628-634.
- Colpaert JV. (2008) Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi. Avery S, Stratford M, van West P. *Stress in yeast and filamentous fungi*. London: Elsevier, Academic press. 157-173.
- Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Marmeisse R. (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters*;220(1):141-8.
- de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*; 16(9):839-42.
- Eide DJ. (2003) Multiple Regulatory Mechanisms Maintain Zinc Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Nutrition*. 133(5 Suppl 1):1532S-5S.
- Eide DJ. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 711–722
- Hanif M, Pardo A, Gorfer M, Raudaskoski M. (2002) T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics*; 41(3): 183-8.

- Kemppainen M, Duplessis S, Martin F, Pardo AG. (2008) T-DNA insertion, plasmid rescue and integration analysis in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbiology Biotechnology*. 1(3):258-69.
- Kemppainen M, Circosta A, Tagu D, Martin F, Pardo AG. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* ;16(1):19-22.
- Kemppainen MJ, Pardo AG. (2011) Transformation of the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioeng Bugs* ;2(1):38-44.
- Li H, Smith SE, Holloway RE, Zhu Y, Smith FA. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*. 172(3): 536-43.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal*; 8(3):457-63.
- Meyer CL, Kostecka AA, Saumitou-Laprade P, Créach A, Castric V, Pauwels M, Frérot H. (2010) Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist*. 185(1):130-42.
- Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*. 48(1): 1-17.
- Muller LA, Craciun AR, Ruytinx J, Lambaerts M, Verbruggen N, Vangronsveld J, Colpaert JV. (2007) Gene expression profiling of a Zn-tolerant and a Zn-sensitive *Suillus luteus* isolate exposed to increased external zinc concentrations. *Mycorrhiza* 17(7) : 571-80.
- Muller LAH, Vangronsveld J, Colpaert JV. (2007) Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats. *Molecular Ecology* 16: 4728–4737.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. (2000) *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology*; 91(2):173-80.
- Nies DH. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 27: 313–339.
- Pagani MA, Casamayor A, Serrano R, Atrian S, Ariño J. (2007) Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Molecular Microbiology*; 65(2):521-37.
- Remonsellez F, Orell A, Jerez CA. (2006) Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology*.152:59-66.
- Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuysen P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327(7):639-48.

Shanmugam V, Lo JC, Wu CL, Wang SL, Lai CC, Connolly EL, Huang JL. (2011) Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* - the role in zinc tolerance. *New phytologist* 190: 125-137

White CE, Winans SC. (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philosophical Transactions of Royal Society B: Biological Sciences*. 362(1483): 1135-48.

Wang C, Zhang SH, Wang PF, Hou J, Zhang WJ. (2009) The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* 75(11):1468-76.



## 7. Bijlagen

### Bijlage 1

Tabel 7.1: Relatieve biomassa van het wild type Lm8 n1 en de transformanten afkomstig van dit wild type, na 14 dagen groei op medium met 20  $\mu$ M, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM zink.

Isolaat	20 $\mu$ M	5mM	10mM	15mM	20mM
Lm8 n1 (WT)	1	0,903391	0,262739	0,074825	0,04319
A19	1	1,035053	0,045096	0,008468	0,01024
A20	1	0,895147	0,318024	0,01502	0,014154
A22	1	0,824903	0,127577	0,006443	0,012887
A25	1	0,904446	0,4069	0,022229	0,017177
A28	1	1,029524	0,793625	0,027027	0,025999
A29	1	1,165504	0,043933	0,012087	0,01325
A30	1	0,793297	0,140508	0,015612	0,018526
A32	1	0,939251	0,770717	0,307579	0,030817
A33	1	0,283529	0,063488	0,047935	0,062723
A34	1	0,741732	0,086614	0,085827	0,062205
A35	1	0,875643	0,089813	0,008085	0,01367
A38	1	1,017701	0,17532	0,016858	0,026298
A39	1	0,839902	0,022672	0,012905	0,014126
A40	1	0,965132	0,05325	0,011749	0,013455
A41	1	0,642828	0,008127	0,006908	0,010836
A43	1	1,018093	0,898615	0,121597	0,027384
A47	1	0,734759	0,01619	0,011393	0,010993
A49	1	0,704015	0,093532	0,009618	0,01106
A50	1	1,070289	0,348575	0,037475	0,041599
A51	1	0,826203	0,064171	0,008976	0,00783
A53	1	0,79943	0,028707	0,025665	0,01692
A54	1	0,923614	0,076009	0,012825	0,012071
A55	1	0,955278	0,059569	0,010864	0,01358
A56	1	0,675016	0,014647	0,017194	0,012099
A57	1	0,947351	0,247283	0,011889	0,012058
A58	1	0,855207	0,085057	0,015335	0,017653
A59	1	2,491259	0,043706	0,057692	0,042541
A60	1	0,926732	0,029854	0,023967	0,023336
A63	1	0,574215	0,080773	0,011219	0,012944
A64	1	0,932371	0,03564	0,011127	0,015821
A65	1	0,842105	0,02448	0,017544	0,016116
A66	1	1,207642	0,05631	0,035696	0,028658
A68	1	0,025449	0,023204	0,026198	0,028069
A70	1	0,908145	0,0166	0,0166	0,017043
A71	1	0,133074	0,022129	0,0314	0,020634
A74	1	0,842105	0,02448	0,017544	0,016116
A76	1	0,650389	0,016942	0,014949	0,022125

Tabel 7.1 (vervolg): Relatieve biomassa van het wild type Lm8 n1 en de transformanten afkomstig van dit wild type, na 14 dagen groei op medium met 20  $\mu$ M, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM zink.

Isolaat	20 $\mu$ M	5mM	10mM	15mM	20mM
A77	1	0,796108	0,006819	0,008149	0,010976
A78	1	0,957915	0,037236	0,010391	0,018878
A79	1	1,037669	0,098358	0,011912	0,011108
A80	1	1,244121	0,67218	0,02491	0,033878
A81	1	1,024191	0,085973	0,026975	0,017403
A82	1	0,84718	0,647521	0,023158	0,01871
A83	1	1,233389	0,284672	0,080292	0,013288
A85	1	1,00523	0,68473	0,16548	0,010751
A86	1	0,717669	0,380161	0,048233	0,014383
A87	1	0,809418	0,557869	0,26456	0,015861
A88	1	0,921537	0,438687	0,145444	0,017371
A91	1	0,110085	0,084103	0,100513	0,098803
A92	1	0,244488	0,101227	0,107232	0,101227
A93	1	0,071325	0,070963	0,081825	0,08979
A94	1	0,900069	0,039234	0,03531	0,029772
A96	1	0,129553	0,109272	0,099338	0,091474
A97	1	0,712008	0,006954	0,019505	0,010176
A98	1	0,796466	0,015018	0,017845	0,043286
A99	1	0,829133	0,029569	0,02818	0,027386
A102	1	0,225067	0,105121	0,106918	0,106469
A109	1	1,079332	0,029436	0,02881	0,03048
A119	1	0,972388	0,103075	0,040477	0,032319
A121	1	0,946501	0,051871	0,044142	0,042514
A124	1	0,304339	0,034669	0,03197	0,03197
A126	1	0,103663	0,134432	0,120147	0,138095
A162	1	0,428152	0,109342	0,108085	0,137411
A166	1	1,065008	0,063887	0,06299	0,059628
A180	1	0,68016	0,064806	0,03011	0,038086
A181	1	0,531819	0,057251	0,049681	0,065058
A186	1	0,342385	0,377804	0,375443	0,459268
A242	1	0,081723	0,055153	0,097826	0,06401
A300	1	0,944478	0,37591	0,019114	0,022755
B5	1	1,065303	0,081039	0,070024	0,077105
B6	1	0,917441	0,095063	0,012504	0,011702
B9	1	0,879158	0,00932	0,008356	0,014945
B11	1	0,019792	0,026958	0,035318	0,024569
B16	1	0,582067	0,013338	0,012597	0,016858
B18	1	0,885374	0,265544	0,033142	0,017529
B20	1	0,263438	0,118421	0,022256	0,016657
B21	1	1,201446	0,138843	0,022346	0,016595
B22	1	0,845747	0,055468	0,087691	0,058109
B23	1	1,223232	0,030707	0,037374	0,042828

Tabel 7.1 (vervolg): Relatieve biomassa van het wild type Lm8 n1 en de transformanten afkomstig van dit wild type, na 14 dagen groei op medium met 20  $\mu$ M, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM zink.

Isolaat	20 $\mu$ M	5mM	10mM	15mM	20mM
B27	1	1,38208	0,027291	0,032441	0,015448
B28	1	0,791034	0,084138	0,083448	0,083448
B29	1	0,895066	0,088754	0,012816	0,020506
B30	1	0,768565	0,153929	0,038933	0,056236
B31	1	0,127478	0,024782	0,019826	0,02042
B32	1	0,680488	0,055488	0,085976	0,07378
B33	1	0,963256	0,05729	0,05729	0,0403
B42	1	1,175495	0,125354	0,015973	0,014557
B43	1	0,795665	0,135549	0,042486	0,037572
B45	1	1,17259	0,188091	0,016068	0,013611
B46	1	0,890784	0,013137	0,017451	0,024314
B51	1	0,862697	0,03246	0,011977	0,010762
C1	1	1,051621	0,085234	0,007003	0,007803
C2	1	0,471728	0,018924	0,02166	0,018012
C3	1	1,005082	0,058724	0,014869	0,008282
C5	1	0,834348	0,01087	0,014565	0,012174





## Bijlage 2

Tabel 7.2: Relatieve biomassa van het wild type Lm10 n26 en de transformanten afkomstig van dit wild type, na 14 dagen groei op medium met 20  $\mu$ M, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM zink.

Isolaat	20 $\mu$ M	5mM	10mM	15mM	20mM
Lm10 n26 (WT)	1	0,846512	0,856616	0,638011	0,522213
E2.1	1	1,053986	0,680163	0,855775	0,943346
E 2.2	1	1,30103	1,046348	1,21676	1,11236
E 4.1	1	1,090468	1,060615	1,00197	1,041521
E 5.1	1	0,952837	0,653943	0,810464	0,701695
E 5.2	1	0,875414	0,789044	0,233488	0,280318
E 6.1	1	1,207834	1,042686	0,963389	1,086011
E 6.2	1	0,973615	0,866273	0,76647	0,938873
E 6.5	1	0,444205	0,649186	0,607759	0,853448
E 6.6	1	0,936559	0,993266	0,964735	0,760057
E 6.7	1	0,942424	0,75311	0,940351	0,831419
E 7.1	1	1,067532	1,059947	0,990228	1,073804
E 7.3	1	1,145767	0,752195	0,88163	0,90007
E 7.4	1	0,959693	0,98686	1,087111	0,777204
E 8.2	1	1,240455	1,225183	1,023721	1,080422
E 8.3	1	0,693803	0,532265	0,492094	0,654274
E 8.6	1	1,280441	1,046186	0,917425	0,843247
E 10.5	1	1,184675	1,114705	0,882542	1,262904
E 12.4	1	1,001242	0,923841	0,693295	0,717715
E 15.2	1	0,992576	0,842465	0,772829	0,752784
E 16.2	1	1,006908	1,088554	0,987282	1,082274
E 16.4	1	0,590581	0,437475	0,717034	0,68497
E 16.6	1	1,065964	0,971778	1,139578	1,137198
E 16.10	1	1,081783	0,962658	0,949879	0,92347
E 16.11	1	1,119117	0,920912	0,556041	0,391557
E 18.3	1	1,082735	1,008724	0,975939	0,952582
E 18.5	1	0,452661	0,60312	0,048515	0,100876
E 19.1	1	3,707581	3,797834	2,104693	0,589651
E 20.1	1	3,205843	1,786189	1,22178	0,413015
F1	1	1,007085	0,893881	0,849597	0,866989
F 8	1	1,063924	0,923247	0,658704	0,86242
F 10	1	1,055278	1,16704	0,934734	0,653349
F 11	1	0,859343	0,935775	0,687512	0,700094
F 12	1	0,551671	1,097943	0,846272	0,819537
F 13	1	0,887017	1,448959	0,988437	0,68781
F 16	1	0,714503	1,209686	0,743154	1,003043
F 19	1	0,911232	1,396479	0,838582	0,979172
F 20	1	1,069674	1,248401	0,836419	1,173342

Tabel 7.2 (vervolg): Relatieve biomassa van het wild type Lm10 n26 en de transformanten afkomstig van dit wild type, na 14 dagen groei op medium met 20  $\mu$ M, 5 mM, 10 mM, 15 mM en 20 mM zink.

Isolaat	20 $\mu$ M	5mM	10mM	15mM	20mM
F 21	1	0,774684	1,314684	0,817215	0,736962
F 22	1	0,825478	1,077418	0,960818	0,578648
F 23	1	0,791259	1,014752	0,908538	0,752351
F 24	1	0,91959	0,982363	0,796131	1,103926
G 1	1	0,843986	1,087304	0,942766	0,723126
G 7	1	1,086403	0,877899	1,165757	0,927012
G 10	1	0,964395	1,097494	0,82717	0,77934
G 18	1	1,964702	2,138016	1,942817	1,643134
G 35	1	1,068057	0,921512	0,886799	0,988714
G 36	1	1,109561	1,106625	0,892824	1,005873
G 44	1	1,028481	1,012574	0,735798	0,966369
G 46	1	0,638642	0,594119	0,744253	0,527231
G 47	1	1,287341	1,280643	0,311788	0,267582
G 48	1	0,506424	0,069593	0,474839	0,463062
G 50	1	1,323074	1,171828	0,782477	0,983195
G 51	1	1,049538	0,913134	0,986569	1,066283
G 55	1	0,371477	1,136577	0,905369	1,083557
G 65	1	0,925958	0,921909	0,95705	0,809978
G 68	1	0,852566	1,153655	0,279316	0,054432
G 69	1	0,302271	2,264683	2,719655	0,140172
G 70	1	2,285714	1,488258	3,958904	0,159491
G 77	1	1,27889	0,733414	1,085163	0,172979
G 80	1	0,734177	0,39557	0,318038	0,381329
G 82	1	0,903974	0,666391	0,568709	0,124172
G 92	1	0,334141	0,046955	0,053317	0,064223
G 120	1	1,163618	1,179423	0,994433	1,148111
G 132	1	1,375665	1,40891	1,24867	0,124335
G 133	1	1,03931	0,816176	0,308541	1,106335
G 134	1	3,488479	4,384025	6,540707	6,609831
G 135	1	1,004917	0,530621	0,402101	0,037327
G 136	1	1,15478	0,673315	0,690223	0,685454
H 222	1	0,87384	0,873997	0,888627	0,916155
H 319	1	0,99222	0,740898	0,866853	0,703905
H 347	1	0,762126	0,824252	0,738372	0,844186

## **Auteursrechtelijke overeenkomst**

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

**Zinktolerantie in *Suillus luteus*: een 'genetics forward' studie**

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-milieu en gezondheid**

Jaar: **2011**

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,

**Gregoor, Mieke**

Datum: **19/08/2011**