

# Screening van zinktolerantie en verdere karakterisering van de *SlZnT2* transporter in isolaten van de ectomycorrhizaschimmel *Suillus luteus*

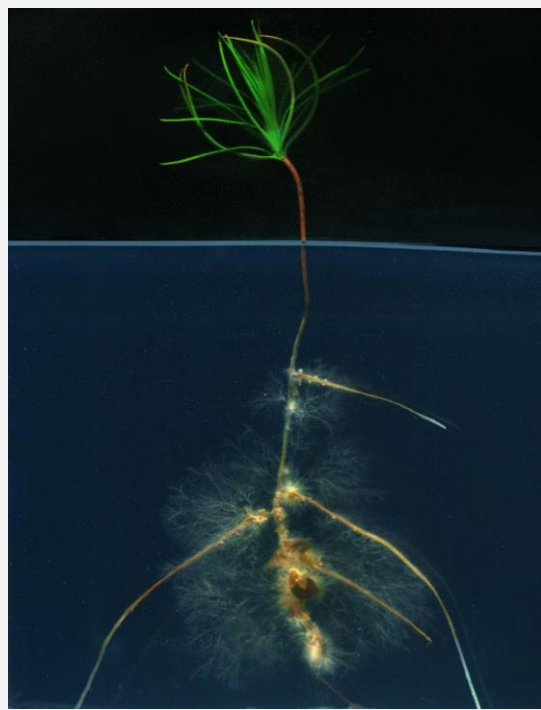
Van Loy Marnix

Master IW Biochemie

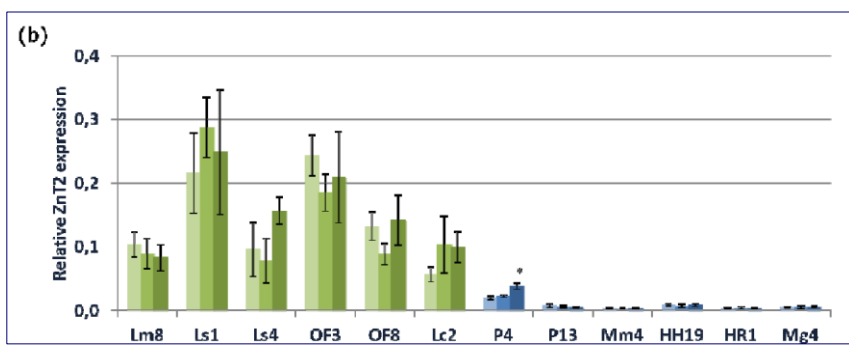
## Inleiding

Het Centrum voor Milieukunde aan de UHasselt onderzoekt onder andere fytostabilisatie met behulp van de grove den (*Pinus sylvestris*) teneinde zink(Zn)vervuilde bodems te stabiliseren. Voor deze toepassing is de ectomycorrhizaschimmel *Suillus luteus* essentieel aangezien Zn-tolerante isolaten van deze schimmel de grove den beschermen tegen Zn-vervuiling (figuur 2). Dit onderzoek focust daarom op het tolerantiemechanisme van *S. luteus*.

Om een fytostabilisatietoepassing verder te optimaliseren moet er meer geweten zijn over het Zn-exclusietolerantiemechanisme. In een vorig onderzoek werd reeds een CDF-transporter *SlZnT2*, met meerdere genkopieën, geïdentificeerd die waarschijnlijk een rol speelt in het tolerantiemechanisme (figuur 1) (1). Een weloverwogen keuze moet gemaakt worden bij de selectie van isolaten voor dit onderzoek, aangezien vorige data suggereren dat er nog een ander Zn-tolerantiemechanisme in de populatie is, wat niet bruikbaar is voor een fytostabilisatietoepassing (2).



Figuur 2: Voorbeeld van *Pinus sylvestris* gemycorrhizeerd met *Suillus luteus*. De schimmel helpt de plant voedingsstoffen te verzamelen en krijgt in ruil suikers.

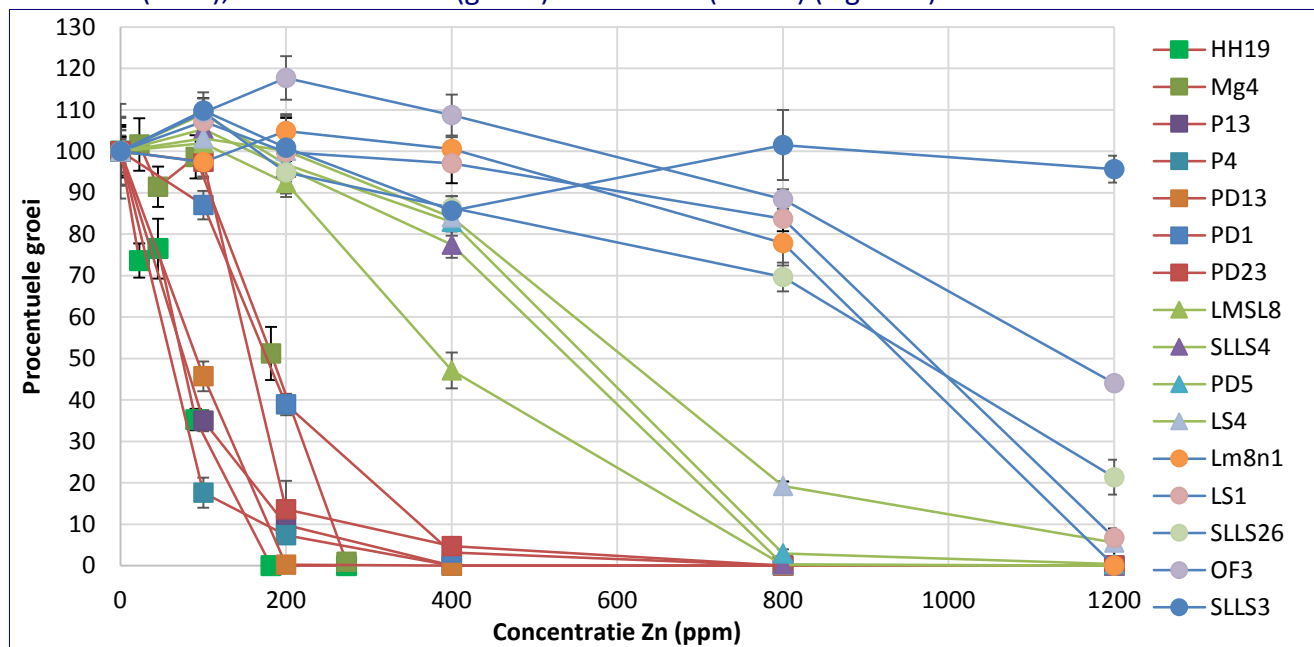


Figuur 1: Relatief expressieniveau van het *SlZnT2* gen voor tolerante (groen) en sensitieve (blauw) *S. luteus* isolaten na 48u blootstelling aan verschillende concentraties Zn (20, 200 en 1000 μM).

## Resultaten

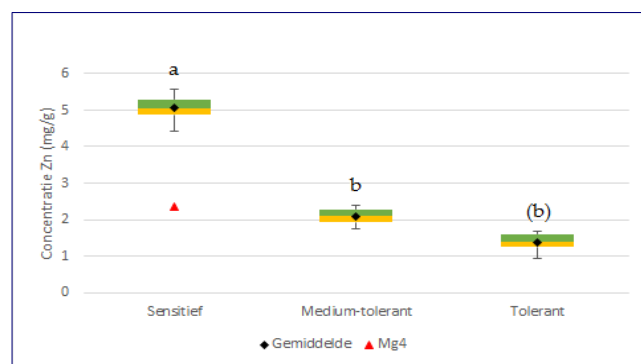
### Zn-tolerantie

1. Van 16 isolaten is de EC50-waarde bepaald. Er kunnen drie fenotypes onderscheiden worden: Sensitief (rood), mediumtolerant (groen) en tolerant (blauw) (Figuur 4).



Figuur 4: Procentuele groei van alle isolaten waarvan een EC50-waarde is bepaald. Drie groepen zijn te onderscheiden: (1) sensitief (rood), (2) mediumtolerant (groenen) (3) tolerant (blauw).

2. Van deze isolaten is de Zn-concentratie in het mycelium bepaald. Statistische analyse wees uit dat er significant verschil is gevonden tussen de sensitieve en mediumtolerante isolaten ( $p < 0,01$ ) en tussen de sensitieve en tolerante isolaten ( $p < 0,01$ ). Een borderline verschil is gevonden tussen de mediumtolerante en tolerante isolaten ( $p = 0,051$ ). (Figuur 5)

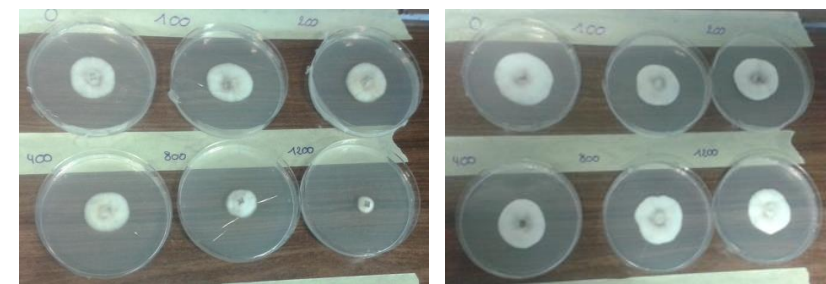


Figuur 5: Boxplots van Zn-concentraties in het mycelium. Significante verschillen zijn aangeduid met verschillende letters.

## Doelstelling en methoden

### Zn-tolerantie

- Isolaten van *S. luteus* screenen op Zn-tolerantie aan de hand van een dosisrespons experiment.
  - Isolaten twee weken opkweken op 0, 100, 200, 400, 800 en 1200 ppm Zn. Nadien lyofilisatie, massabepaling en berekening van de EC50-waarde (effect concentration), de Zn-concentratie waarbij een isolaat 50% minder biomassa produceert binnen een tijdsspanne.



Figuur 3: opkweek van (links) een sensitief isolaat en (rechts) een tolerant isolaat.

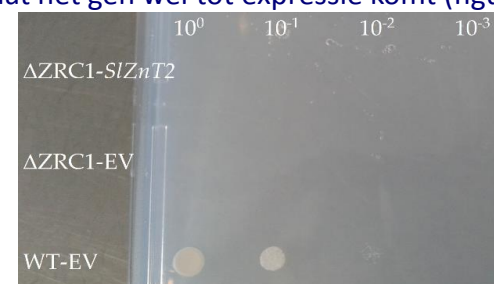
- Isolaten screenen op Zn-exclusiemechanisme door analyse van de interne Zn-concentraties in het mycelium.
  - Isolaten opkweken op 100 ppm Zn, lyofiliseren, zuurdigestie en nadien analyse met ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry).

### SlZnT2-gen

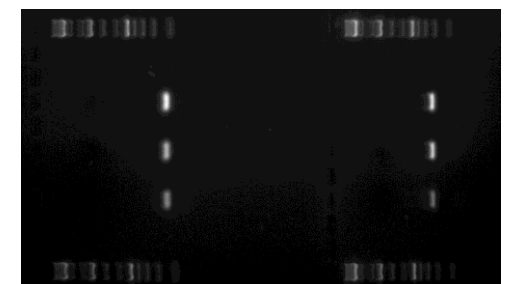
- Het *SlZnT2*-gen transformeren in *Saccharomyces cerevisiae* (bakkersgist).
  - Met behulp van een aangemaakte destination vector (*pYES-DEST52 + SlZnT2*) transformatie in de Zn-sensitieve mutant  $\Delta ZRC1$ .
- Analyse van drie kandidaat promotorvarianten, die in een vorig genomewalkingexperiment teruggevonden zijn.
  - PCR met verschillende ontwikkelde primers, sommige met forward primer voor en reverse primer achter het startcodon van het *SlZnT2*-gen, voor validatie dat promotorsequentie voor het gen gelegen is.

### SlZnT2-gen

- Het fenotype van de Zn-gevoelige mutant is niet succesvol gecomplementeerd (figuur 6). Een PCR-reactie met cDNA toont aan dat het gen wel tot expressie komt (figuur 7).

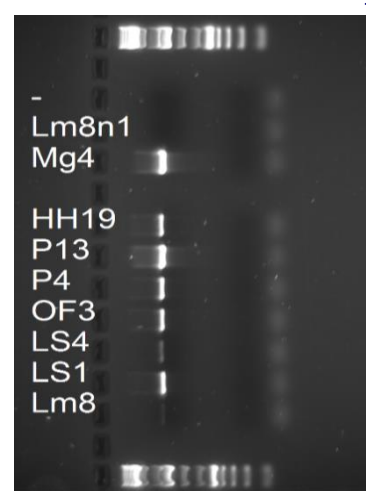


Figuur 6: Groei van getransformeerde gistmutant met *SlZnT2* en empty vector en van getransformeerd wild type met empty vector op SC-URA medium met galactose en 10 mM Zn.

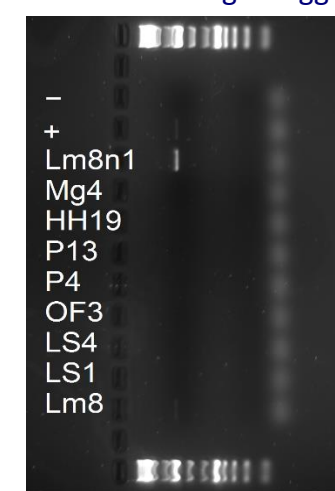


Figuur 7: Resultaten van de PCR-reacties met cDNA van de getransformeerde gist. Links en rechts de Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder en drie herhalingen voor twee verschillende *SlZnT2* primerparen.

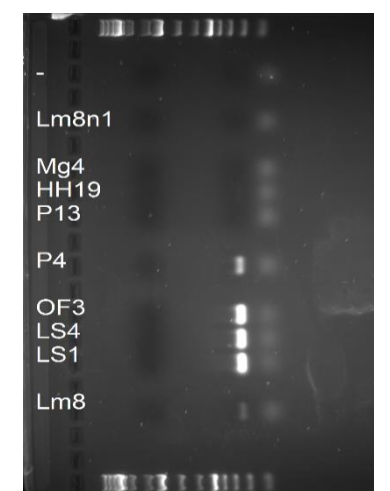
- Van promotorvariant 1 is vastgesteld dat deze bij zowel tolerante als sensitieve isolaten terugkomt (figuur 8). Promotorvariant 3 is enkel terug te vinden bij tolerante isolaten (figuur 10), met uitzondering van sensitief isolaat P4. Dit isolaat heeft echter een iets hogere expressie voor *SlZnT2* dan de andere sensitieve isolaten (figuur 1). Promotor 3 lijkt zo geassocieerd te zijn met een hogere expressie van *SlZnT2*, maar dit moet verder onderzocht worden. Promotorvariant 2 wordt enkel bij 3 isolaten in deze screening teruggevonden en meer onderzoek is vereist.



Figuur 8: Resultaten van een PCR-reactie voor promotorvariant 1.



Figuur 9: Resultaten van een PCR-reactie voor promotorvariant 2.



Figuur 10: Resultaten van een PCR-reactie voor promotorvariant 3.

Figuur 8-10: Links en rechts de Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

## Conclusie

Van 16 isolaten is de tolerantie gescreend door EC50-waarden en interne Zn-concentraties te bepalen. Drie fenotypes zijn onderscheiden: sensitief (0-200 ppm), mediumtolerant (350-700 ppm) en tolerant (>900 ppm). Na statistische analyse blijkt dat hun interne Zn-concentraties significant verschillen. Het fenotype van de  $\Delta ZRC1$  gemuteerde *S. cerevisiae* is niet succesvol gecomplementeerd, maar het gen komt wel tot expressie. Meer onderzoek is nodig om de functie van *SlZnT2* te bepalen. Promotorvariant 1 is teruggevonden bij alle gescreende isolaten, promotorvariant 3 enkel bij tolerante isolaten. Meer onderzoek is nodig om promotorvariant 2 te karakteriseren.

Promotoren / Copromotoren: Ing. Pauls Liesbet  
Prof. Dr. Colpaert Jan

- Bronnen: 1. J. Ruytinx, *Mechanisms of metal homeostasis and detoxification in metal sensitive and tolerant isolates of Suillus luteus, an ectomycorrhizal fungus* (PhD Thesis), 2013.  
2. M. Op De Beeck, *Heredity of zinc tolerance in Suillus luteus and impact of metal pollution on ectomycorrhizal fungal communities* (PhD Thesis), 2014.