

# Schimmelbarcoding en screening van metaaltolerantie in isolaten van *Suillus luteus*

Ruben Monette

Master IW biochemie

## Inleiding

De onderzoeksgroep Milieubiologie van het Centrum voor Milieukunde aan de Universiteit Hasselt focust zich op de studie van de toxiciteit van abiotische stress-factoren in allerlei organismen. Deze kennis wordt onder meer toegepast voor de ontwikkeling van saneringstechnieken. Zo wordt er onderzocht of Zn-vervuilde bodems in Noord-Limburg gestabiliseerd kunnen worden met behulp van ectomycorrhiza (ECM) schimmels.

*S. luteus* is een basidiomycet die symbiotische associaties vormt met bomen van het geslacht *Pinus* zoals *Pinus sylvestris* (grove den) (Figuur 1 en Figuur 2).



Figuur 2: Vruchtlichamen van *Suillus luteus*

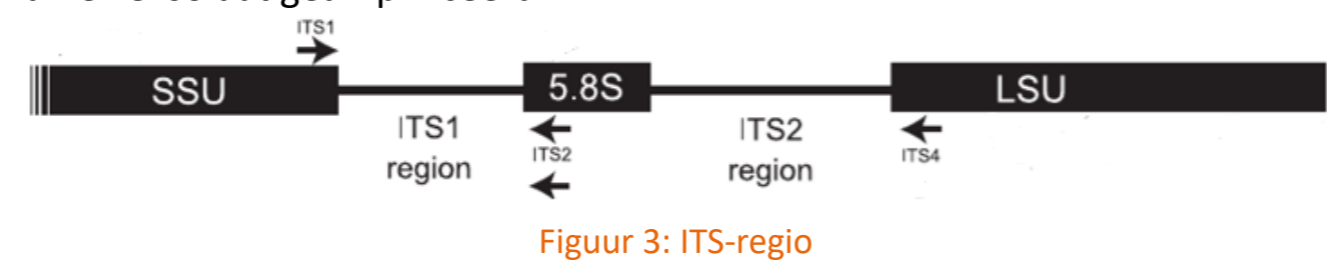
Figuur 1: *Suillus luteus*-*Pinus sylvestris*-symbiose (zowel vrij levend mycelium als ECM-structuren zijn zichtbaar)

Zn-tolerante stammen van *S. luteus* zijn geïsoleerd uit het veld. Onderzoek heeft aangetoond dat deze Zn-tolerante stammen in staat zijn om hun gastheerplanten tegen Zn-vervuiling te beschermen en hun groei te verbeteren bij blootstelling aan Zn. Hierdoor zijn de Zn-tolerante stammen van *S. luteus* interessant voor de ontwikkeling van een fytostabilisatietoepassing [1].

## Doelstellingen

### 1. Schimmelbarcoding

Voor 9 isolaten moet er een soortbepaling worden uitgevoerd om te bepalen of de isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn. Hiervoor wordt de soortspecifieke ITS-regio (Figuur 3) van elke isolaat geamplificeerd.



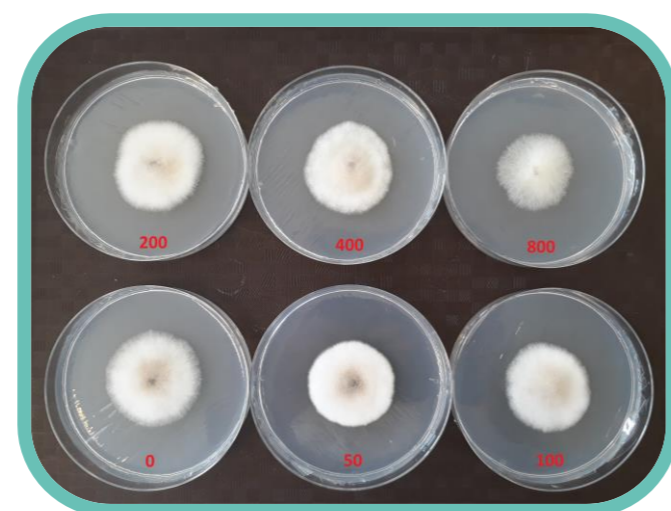
Figuur 3: ITS-regio

### 2. Zn-tolerantie en Zn-fenotypebepaling

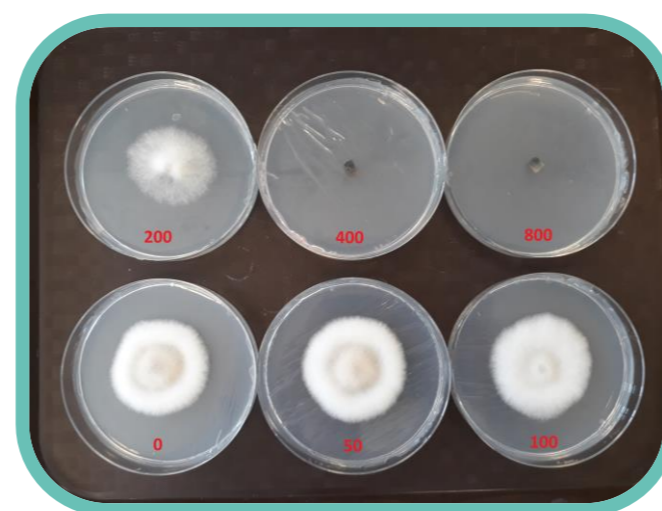
Voor 11 isolaten moeten de EC50-waarden (een maat voor de tolerantie) bepaald worden. Deze waarden geven weer of een isolaat Zn-tolerant of Zn-sensitief is en laten toe om isolaten op vlak van Zn-tolerantie met elkaar te vergelijken.

Bijkomend moeten de interne Zn-concentraties via ICP-OES-analyse worden bepaald. Hierdoor kan het Zn-fenotype van iedere isolaat worden bepaald. Er zijn 3 verschillende fenotypes:

1. Zn-sensitieve isolaten met relatief veel Zn in de cellen
2. Zn-tolerante isolaten met relatief weinig Zn in de cellen
3. Zn-tolerante isolaten met relatief veel Zn in de cellen



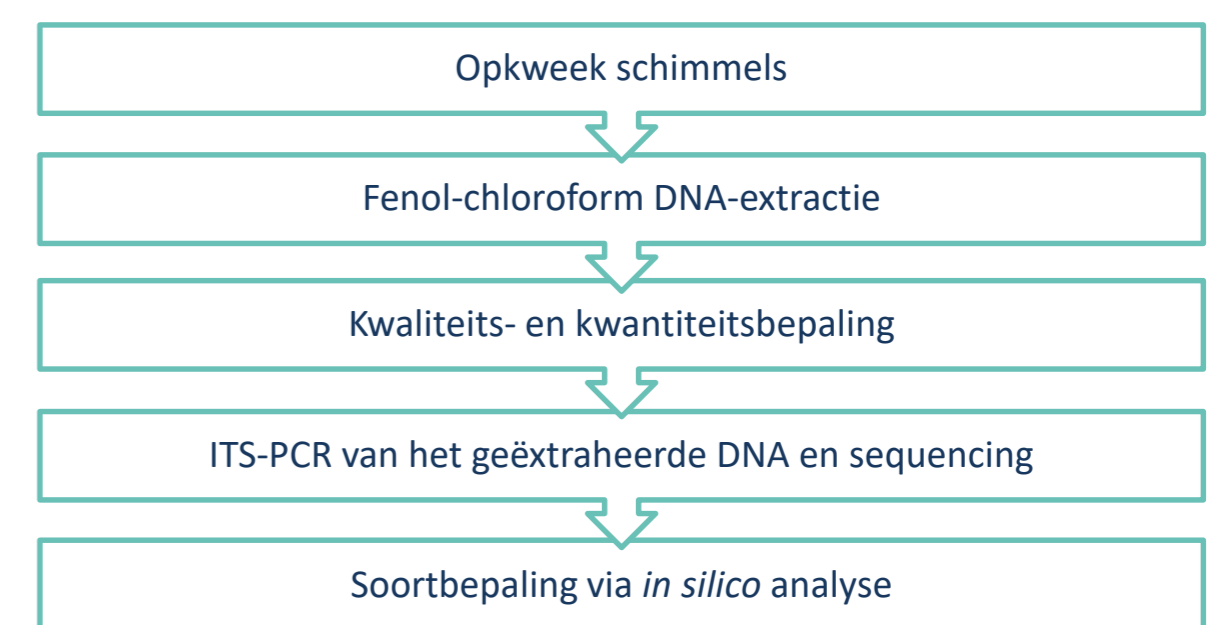
Figuur 4: Zn-tolerante isolaat



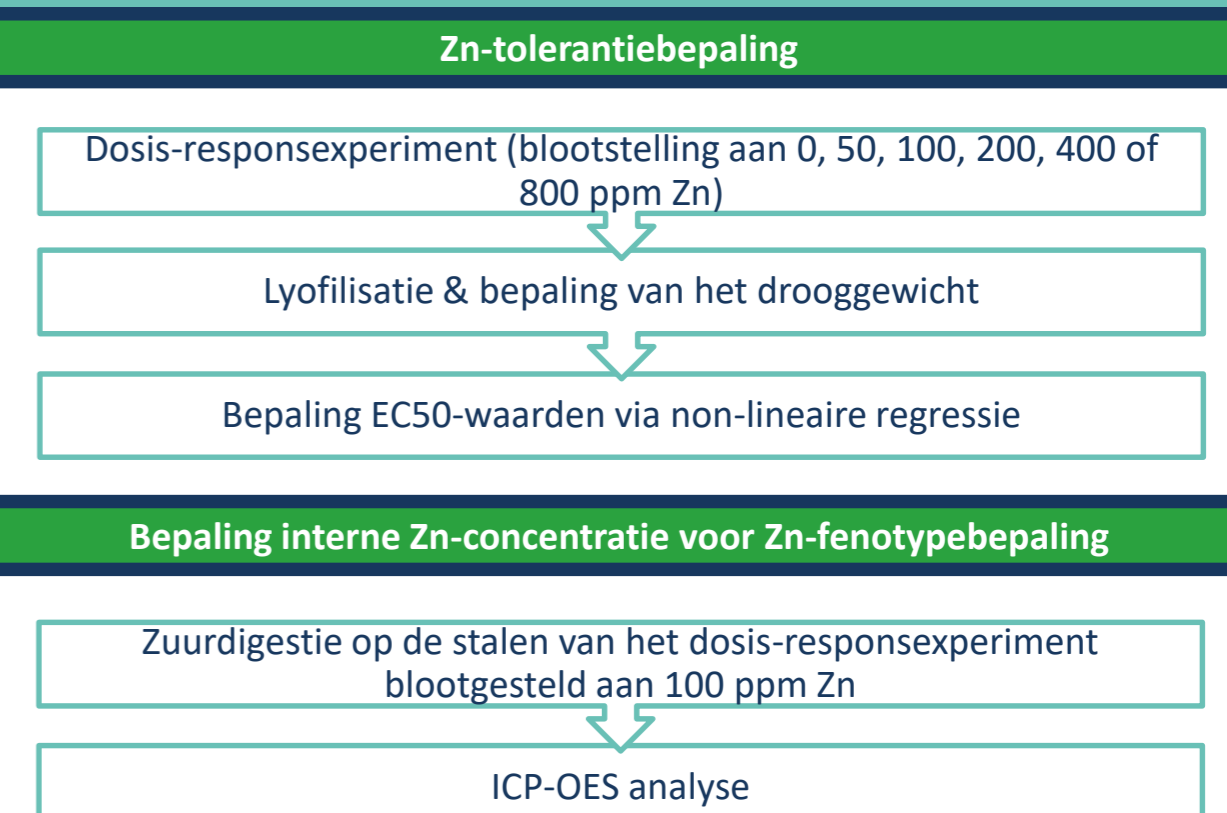
Figuur 5: Zn-tolerante isolaat

## Methoden

### 1. Schimmelbarcoding



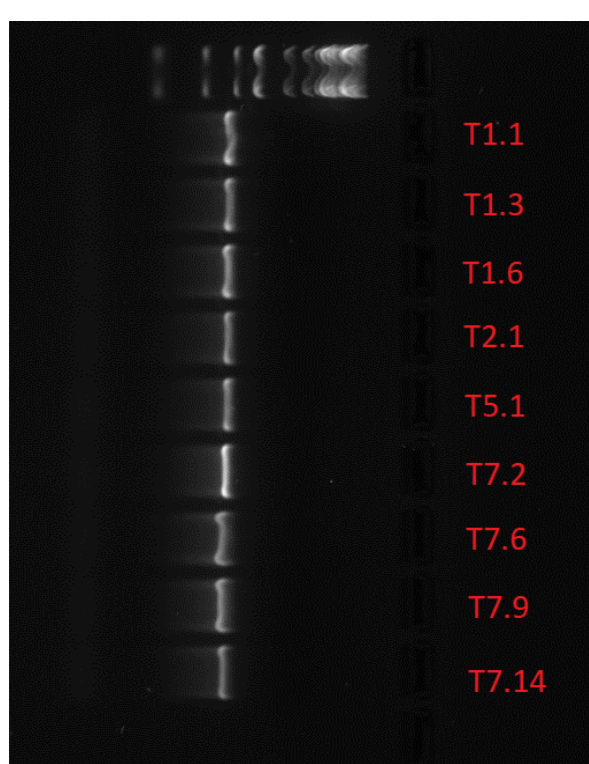
### 2. Zn-tolerantie en Zn-fenotypebepaling



## Resultaten en Discussie

### 1. Schimmelbarcoding

Voor 9 isolaten is een soortbepaling uitgevoerd aan de hand van ITS-PCR. Hiervoor werden de universele primers ITS1 en ITS4 gebruikt. In Figuur 6 worden de geamplificeerde PCR-producten op een 1,5% agarosegel weergegeven.



Figuur 6: 1,5% agarosegel. Slot 1: 1kb DNA-ladder; Slot 2-10 PCR-producten. Slot 11: Negatieve controle

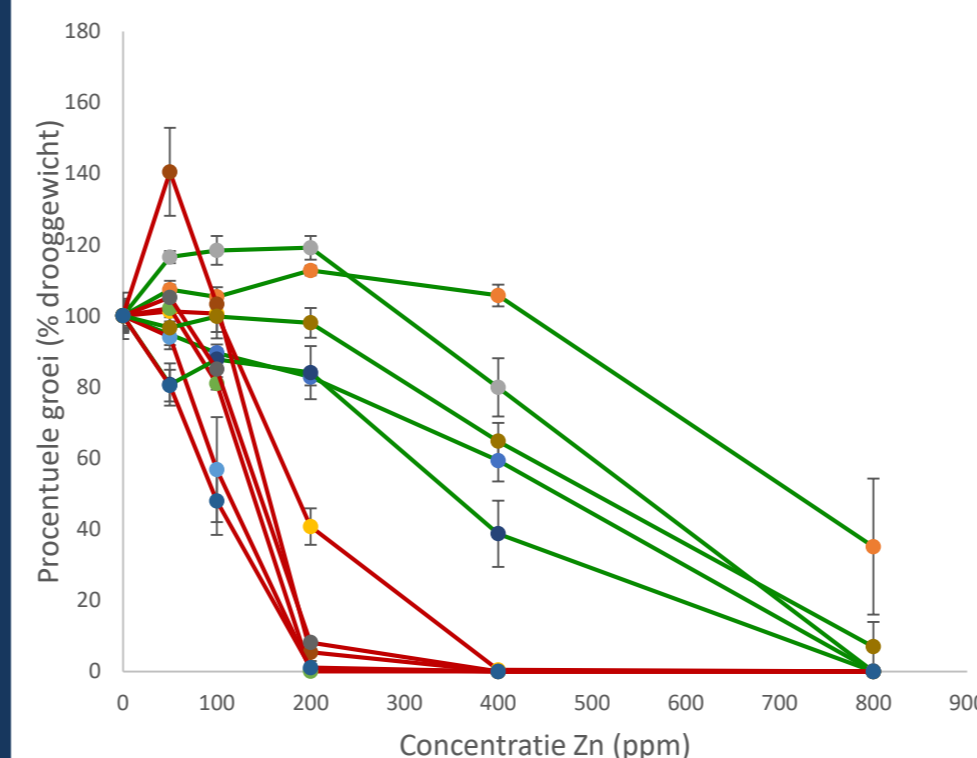
De sequencingresultaten werden verkregen van Macrogen Europe. Deze werden via BLAST geanalyseerd en hieruit kon besloten worden dat alle 9 isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn. De resultaten van de identificatie worden in Tabel 1 weergegeven.

Tabel 1: Resultaten van de ITS-analyse. Het PCR-product werd in tweevoud gesequenced: zowel met ITS1-primer (forward), als met de ITS4-primer (reverse). (OK: isolaat is *S. luteus*)

Schimmel	Resultaat ITS1	Resultaat ITS4
T1.1	OK	OK
T1.3	OK	OK
T1.6	OK	OK
T2.1	OK	OK
T5.1	OK	OK
T7.2	OK	OK
T7.6	OK	OK
T7.9	OK	OK
T7.14	OK	OK

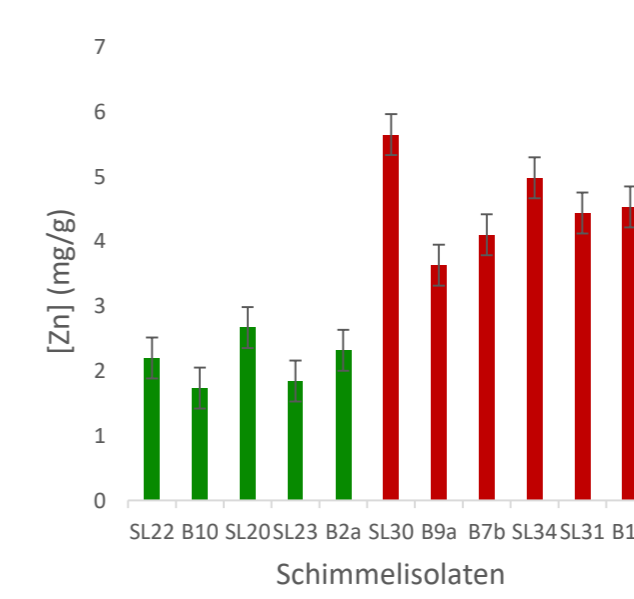
### 2. Zn-tolerantie en Zn-fenotypebepaling

Voor 11 isolaten zijn de EC50-waarden en de interne Zn-concentraties bepaald. Op basis van de resultaten die in Figuur 7 worden weergegeven kan er een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen de meer Zn-tolerante en de meer Zn-sensitieve isolaten.

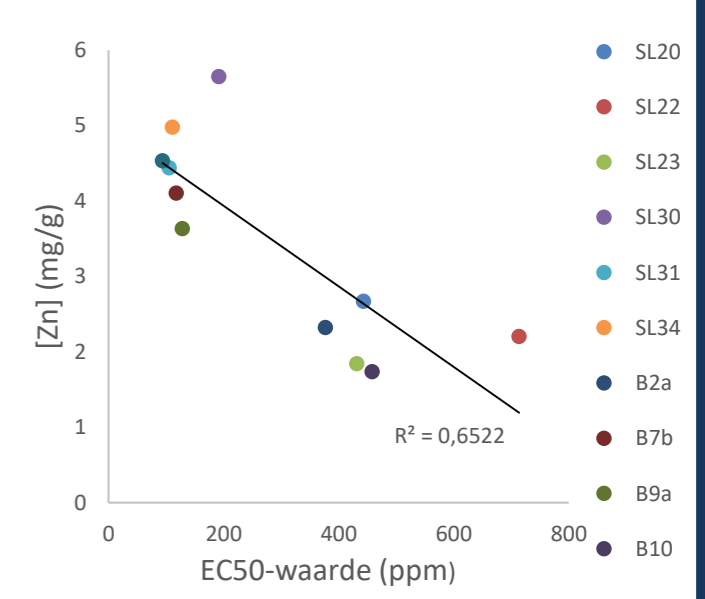


Figuur 7: Overzicht van de procentuele groei van alle geanalyseerde isolaten bij blootstelling aan extra Zn in het standaard groeimedium. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen (1) de meer Zn-tolerante isolaten (groen) en (2) de meer Zn-sensitieve isolaten (rood). Foutenbalken geven de standaardfout weer.

Op basis van de interne Zn-concentraties (Figuur 8) kunnen opnieuw dezelfde groepen worden onderscheiden. Tussen de EC50-waarden en de interne Zn-concentraties is er een negatief verband aanwezig (Figuur 9). Een mogelijke verklaring hiervoor is het voorkomen van een Zn-exclusiemechanisme in de Zn-tolerante isolaten. Bijkomende data ([1]; Coninx, ongepubliceerd) wijzen erop dat een transporter hoogstwaarschijnlijk verantwoordelijk is voor de geobserveerde Zn-exclusie in tolerante *S. luteus* isolaten.



Figuur 8: Interne Zn-concentratie per isolaat. De meer Zn-tolerante isolaten zijn in het rood aangeduid, de meer Zn-sensitieve in het groen. Foutenbalken geven de standaardfout weer



Figuur 9: Verband tussen de interne Zn-concentraties en de EC50-waarden

## Besluit

Uit de soortbepaling kan geconcludeerd worden dat alle geanalyseerde isolaten weldegelijk *S. luteus* zijn en dus verder gescreend kunnen worden naar hun zinktolerantie en zinkfenotype. Voor de 11 andere isolaten waarvan de EC50-waarden en de interne Zn-concentraties zijn bepaald, kan besloten worden dat twee van de drie Zn-fenotypen werden teruggevonden, namelijk 5 Zn-tolerante isolaten met een lage interne Zn-concentratie en 6 Zn-sensitieve isolaten met een hoge interne Zn-concentratie. De Zn-tolerante isolaten zijn waarschijnlijk in het bezit zijn van een Zn-exclusiemechanisme en kunnen hiernaar verder gescreend worden.

Promotoren / Copromotoren: Dr. ir. Kristel Sniegowski  
Prof. dr. Jan Colpaert

Bronnen:  
[1] J. Ruytinx and J. Colpaert, "Mechanisms of metal homeostasis and detoxification in metal sensitive and tolerant isolates of *Suillus luteus*, an ectomycorrhizal fungus," p. 155, 2013.