

# VU Research Portal

## The role of HKT transporters in salinity tolerance of tomato

Fidalgo de Almeida, P.M.

2014

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Fidalgo de Almeida, P. M. (2014). *The role of HKT transporters in salinity tolerance of tomato*.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Nederlandse samenvatting

### **De Rol van HKT Transporters in de Zouttolerantie van Tomaat.**

Verzilting is wereldwijd de meest algemene en ernstigste abiotische stress waar planten mee te maken hebben. Meer dan 800 miljoen hectare, wat overeenkomt met 6% van de totale aardoppervlakte, is wereldwijd beïnvloed door zout. Tomaat is een erg belangrijk gewas. Door de wereldwijde toenemende verzilting van het landbouwareaal worden de gebieden die optimaal zijn voor de groei van tomaten steeds kleiner. Om dit probleem te reduceren, zijn er pogingen ondernomen om de zouttolerantie van tomaten te verhogen met behulp van wilde tomatensoorten. Deze wilde tomatensoorten hebben vaak een hogere zouttolerantie dan de gecultiveerde tomatensoorten en kunnen daardoor dienen als nuttige genenbron om de zouttolerantie van gecultiveerde tomatensoorten te verhogen.

In hoofdstuk twee beschrijven we hoe we, om tomatensoorten te identificeren die gebruikt kunnen worden in veredelingsprogramma's, 93 verschillende tomatenvariëteiten blootgesteld hebben aan verschillende zoutconcentraties in hun wortelmilieu en het gehalte aan  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  in hun weefsels hebben geanalyseerd. Onze resultaten lieten een grote variatie aan zoutaccumulatie tussen de verschillende variëteiten zien. Op basis van deze data hebben we 24 variëteiten geselecteerd - met een hele hoge  $\text{Na}^+$ -accumulatie of juist een hele lage  $\text{Na}^+$ -accumulatie - om een meer diepgaande analyse op uit te voeren.

In hoofdstuk drie beschrijven we deze diepgaande analyse naar een eigenschap of gen in tomaten die van nut zou kunnen zijn in nieuwe veredelingsprogramma's met als doel het zouttoleranter maken van de tomaat. We hopen met deze analyse een verband te vinden tussen accumulatie van ionen of bepaalde organische moleculen en genexpressie. We analyseerden de expressie van meerdere genen waarvan bekend was dat ze op een directe of indirecte manier te maken hebben met  $\text{Na}^+$ -homeostase in planten. Deze genen waren onder andere *HKT*, *SOS*, *NHX*, *LHA* en *AVP*. We analyseerden ook de expressie van *P5CS*, een essentieel gen voor de productie van proline. Onze resultaten lieten zien dat  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ , proline- en sucroseconcentraties niet verschilden tussen zoutgevoelige en zouttolerante tomatenvariëteiten. Desalniettemin vonden we verschillende significante verbanden tussen de expressie

van bepaalde genen en Na<sup>+</sup>-concentraties in de plant. Bijvoorbeeld, Na<sup>+</sup>-concentraties in de stengel en in de bladeren waren positief gecorreleerd met de expressie van *SIHKT1;2* in de wortel, en Na<sup>+</sup>-concentraties in de wortel waren positief gecorreleerd met *SIHKT1;1* in de wortel. Deze resultaten suggereren dat Na<sup>+</sup>-exclusie of -inclusie en weefseltolerantie onafhankelijk van elkaar zijn geëvolueerd in tomaten. Dit betekent dat zouttolerantie in tomaten kan worden bereikt door verschillende combinaties van cellulaire Na<sup>+</sup>-concentraties en weefseltoleranties.

Gebaseerd op de resultaten van de genexpressie studies, verkregen in hoofdstuk drie, besloten we om de transport karakteristieken van de HKT transporters in tomaten verder te onderzoeken. In hoofdstuk vier beschrijven we de eiwitstructuur van HKT1;2 van *Solanum lycopersicum* en *Solanum pennellii* en dragen we bewijs aan dat zowel SIHKT1;2 en SpHKT1;2 Na<sup>+</sup>-transporters zijn. Onze enzym-kinetische experimenten lieten zien dat SpHKT1;2, in vergelijking met SIHKT1;2, een lagere affiniteit voor Na<sup>+</sup> heeft. Deze lagere affiniteit van SpHKT1;2 correleerde met een verhoogde Na<sup>+</sup>-concentratie in het xyleem en een verhoogde Na<sup>+</sup>-accumulatie in de stengels en bladeren van *S. pennellii*. Onze resultaten laten zien dat de studie van transportkarakteristieken van de HKT1;2 transporters een belangrijk onderdeel zijn van ons begrip van Na<sup>+</sup>-homeostase in planten.

In hoofdstuk vijf onderzochten we of er single nucleotide polymorphisms (SNPs) aanwezig zijn in bepaalde codons van de HKT coding sequentie. Er bestaan bepaalde SNPs in de HKT coding sequentie waarvan bekend is dat ze een belangrijk effect hebben op het functioneren van deze transporter. Sequencing resultaten lieten zien dat alle regio's die we analyseerden geconserveerde sequenties hadden en dat er geen SNPs waren in belangrijke aminozuren. We bestudeerden ook het effect van mutaties in de HKT coding sequentie op de transportkarakteristieken van deze transporter wanneer we deze tot expressie brachten in *Xenopus leavis* oocyten. Analyse van de mutaties die we introduceerden in het *SIHKT1;2* gen lieten zien dat de vervanging van S70 door een G resulteerde in het transport van K<sup>+</sup> door SIHKT2;1, en in een sterke reductie van Na<sup>+</sup> en K<sup>+</sup> gedragen elektrische stroom. Het stapelen van mutaties in positief geladen aminozuren in het M2<sub>D</sub> domein van SIHKT2;1 veroorzaakte een reductie in Na<sup>+</sup> gerelateerde elektrische stromen en leidde uiteindelijk tot het complete functieverlies van de transporter. Een interessante dubbelmutant die wij genereerden was de *SIHKT2;1-S70G-K477Q* mutant. Deze mutant is in staat om met een redelijke snelheid zowel Na<sup>+</sup>-ionen en K<sup>+</sup>-ionen te transporteren.

Om te onderzoeken of de resultaten die we verkregen met de *Xenopus* oocyten ook een fysiologische betekenis hebben *in planta*, transformeerden we *Arabidopsis athkt1;1* mutant met de verschillende gemuteerde *HKT* constructen die we ook gebruikten in hoofdstuk vijf. De resultaten van de transformatiestudies staan beschreven in hoofdstuk 6. De *AtHKT1;1* en *SlHKT1;2* wild-type genen complementeerden het groei fenotype van de *athkt1;1* mutant. Deze genen herstelden ook de accumulatie van  $K^+$  in de scheut, maar herstelden maar gedeeltelijk de lage accumulatie van  $Na^+$ . Uit onze observatie dat de complementatie van de *athkt1;1* mutant met *HKT* genen met een puntmutatie in het eerste transmembraandomein geen effect heeft op de verhoogde  $Na^+$ -accumulatie en verlaagde  $K^+$ -accumulatie in de scheut, concludeerden we dat het AtHKT1;1 eiwit een effect heeft op de  $K^+$ -lading van het xyleem door membraandepolarisatie en niet door een direct effect op de  $K^+$ -transporter.

In hoofdstuk zeven geven we een overzicht van de literatuur van de huidige kennis van HKT transporters. In dit hoofdstuk beschrijven we de laatste ontwikkelingen op het gebied van HKT onderzoek en bediscussiëren we een aantal interessante onderzoeksvragen.

Samengevat, dit proefschrift beschrijft de noodzaak van het onderzoek naar plantmembraantransporters om onze kennis van zouttolerantie in planten te vergroten met als doel om de zouttolerantie in planten uiteindelijk te kunnen verhogen.