

---

**Improvement of osmotic and salt tolerance in potato  
(*Solanum tuberosum* L.) by homologous protein  
overexpression**

**Von der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
-Dr. rer. nat.-**

**genehmigte Dissertation  
von**

**M.Sc. Antar Nasr Salem El-Banna**

**Geboren am 15.10.1969**

**in Behera- Ägypten**

**2008**

## SUMMARY

Osmotic and/or salt stress tolerance is of pivotal interest for crop improvement through conventional breeding as well as through genetic engineering. Especially for improved osmotic/salt stress tolerance in economically relevant crop plants genetic engineering could be a useful tool because it may allow the overexpression of genes which are in nature expressed on demand. In agricultural systems some environmental factors are predictable e.g. the increase of soil salinity and drought. Therefore a pre-adaptation of plants through constitutive gene expression of certain proteins in transgenic plants may help to stabilize the yield.

In this work a strategy should be developed to improve the salt and/or osmotic tolerance of potato cell cultures and plants by homologous overexpression of a specific protein. Output of the work should be a deeper insight into cellular mechanisms of osmotic stress tolerance which may help to get a better understanding of osmotic stress tolerance in entire plants.

The cellular mechanisms of osmotic/salt stress tolerance are the basis of a coordinated stress response of differentiated cells in entire plants. Based on previous literature, after initial studies with *in vitro* plants and already known differences in cryopreservation experiments, undifferentiated cell cultures of the cultivars (Desiree, Unicopa, and Ijsselster) were selected as a model system for further comparison of osmotic and salt tolerance. Osmotic and salt tolerance of these cell cultures was characterized by growth tests and the study of biochemical key reactions against osmotic and salt stress including proline, free sugar and amino acid accumulation as well as biochemical protection against oxidative stress. It could be shown that differences concerning these aspects exist between the different cell cultures.

By comparison of the proteome pattern of the cell culture of cultivar 'Desiree' under normal and osmotic/salt stress conditions several de novo induced proteins could be detected and identified by mass spectrometry. One of the proteins PR10a (STH2) was selected for overexpression. On the basis of sequence information obtained from data bases the corresponding gene (gDNA as well as cDNA) was amplified from potato, inserted into specific dicistronic transformation vectors and overexpressed in tobacco as a model system and finally in potato cell cultures and plants.

A characterization of osmotic and salt tolerance of the transgenic plants and cell cultures based on growth and biochemical tests, confirmed that the homologous overexpression of the *pr10a (sth2)* gene leads to improved salt and osmotic tolerance. It further demonstrated that constitutive PR10a overexpression influences other stress reactions and the proteome pattern of cell cultures grown under normal non-stress conditions.

Finally it was demonstrated that increased osmotic tolerance conferred by PR10a overexpression also improves cryotolerance under standard freezing conditions.

**Keywords:** potato, *Agrobacterium*, PR10a, cell suspension, osmotolerance, salt tolerance

## Kurzfassung

Die Salz- und die Trockentoleranz von Pflanzen sind von steigender ökonomischer Bedeutung. Ihre Verbesserung kann sowohl durch Züchtung als auch mit Hilfe molekularbiologischer Methoden erreicht werden. Eine mögliche Strategie zur Verminderung von Ernteverlusten bei vorübergehender Trockenheit kann die Präadaptation von Pflanzen durch konstitutive Überexpression von stressinduzierten Proteinen sein.

In dieser Arbeit soll versucht werden, durch die homologe Überexpression eines stressinduzierten Proteins eine Erhöhung der Trocken- beziehungsweise der Salztoleranz bei Kartoffelpflanzen und Kartoffelzellkulturen zu erreichen. Ziel der Arbeit ist es dabei auch ein tieferes Verständnis der biochemischen Mechanismen zu erreichen, die bei Kartoffelpflanzen und Zellkulturen zu einer erhöhten Salz- bzw. Trockentoleranz führen.

Als Modellsysteme für die Arbeit wurden Zellkulturen der Kartoffelsorten 'Unicopa', 'Desiree' und 'Ijsselster' verwendet. Die Auswahl der Sorten beruhte auf Literaturdaten und bekannten Resultaten von Kryokonservierungsexperimenten. Da die Kryotoleranz zumeist auch eine Funktion der Osmotoleranz ist, waren unterschiedliche Grade der Osmotoleranz bei den verwendeten Kartoffelsorten wahrscheinlich. Zunächst wurde die Osmo und Salztoleranz der verschiedenen Zellkulturen auf der Basis von Wuchsstudien und biochemischen Tests charakterisiert. Als biochemische Parameter wurden die Bildung von Prolin, löslichen Zuckern und freien Aminosäuren sowie die Reaktion gegen oxidativen Stress untersucht. Unter geeigneten Testbedingungen wurden Proteomunterschiede zwischen Zellkulturen der Sorte 'Desiree' unter Einfluss von osmotischem und Salzstress untersucht. Unter Stressbedingungen induzierte Proteine wurden mit Hilfe von Massenspektrometrie und Datenbankvergleichen identifiziert. Für eine homologe Überexpression wurde das PR10a (STH2) Protein ausgewählt.

Die aus Datenbanken ermittelte Sequenzinformation wurde zur Amplifikation des Gens (gDNA und cDNA) aus Kartoffeln genutzt und die erhaltenen Sequenzen in besondere dicistrinische Transformationsvektoren eingebaut. Durch Transformation mit diesen Vektoren wurden transgene Tabakpflanzen, Kartoffelzellkulturen und Kartoffelpflanzen

erhalten. Die osmotische und Salztoleranz der erhaltenen Zellkulturen und Pflanzen wurde wieder durch Wuchs- und biochemische Test untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Überexpression des PR10a (STH2) Proteins in allen Fällen zu einer Steigerung der Salz- bzw. osmotischen Toleranz der Kulturen und Pflanzen führt. Darüberhinaus wurden wichtige Indizien dafür gefunden, dass die Überexpression des PR10a Proteins andere Stoffwechselwege beeinflusst und das Protein daher vermutlich regulatorische Funktion hat. Schließlich konnte gezeigt werden, daß die durch PR10a Überexpression erhöhte Salz- und osmotische Toleranz auch zu einer Erhöhung der Kryotoleranz unter Standardbedingungen führt.

**Keywords:** Kartoffel, Agrobakterium, Suspensionszellen, Osmotoleranz, Salztoleranz