

Gensplejsning af byg uden brug af selektionsgener

Genetisk modificerede planter indeholder som regel gener, som gør planten modstandsdygtig overfor enten et ukrudtsmiddel eller et antibiotikum. Disse gener, som benyttes i forbindelse med selektion af genetisk modificerede celler, er generelt uønskede i planter, som skal dyrkes kommercielt. En ny metode gør det muligt at fremstille genetisk modificerede bygplanter uden brug af selektionsgener.

Af Inger B. Holme, Henrik Brinch-Pedersen, Mette Lange og Preben Bach Holm, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet og Inga C. Bach, Planteforskning.dk

De mest anvendte metoder til at få DNA ind i planteceller er via infektion med **Agrobacterium** eller ved beskydning med en **genkanon**. For at få integreret et nyt DNA-fragment i en plantes arvemasse, skal det først passere cellevæg og plasmamembran i en enkelt celle, uden at cellen dør undervejs. Under infektionen med *Agrobacterium* sker der en aktiv overførsel af en bestemt del (**T-DNA**) fra et **plasmid** i bakterien til plantecellen. Benyttes en genkanon, kommer DNA'et ind i plantecellen på overfladen af en metalpartikel.

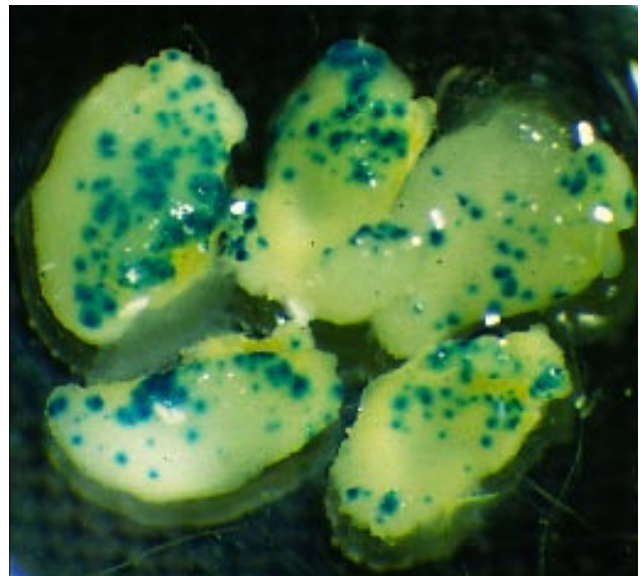
Når DNA-fragmentet er kommet ind i cytoplasmaet, skal det transporteres over kernemembranen, og det skal integreres i et af plantecellens kromosomer. Derefter skal cellen dele sig til en gruppe af celler, som efterfølgende skal udvikle sig til en ny plante, der kan vokse til modenhed og sætte de frø, som udgør den næste generation.

Uanset om man bruger *Agrobacterium* eller en genkanon til **transformation** af planteceller, benyttes som regel væv indeholdende mange celler. Til transformation af byg og hvede anvendes ofte kim (**embryoer**) fra umodne kerner. Disse kim indeholder mange celler, men det nye DNA-fragment vil kun være integreret i kromosomerne hos ganske få af cellerne (**Figur 1**).

Selektion af transformerede celler

Man er nødt til at udvælge (**selektere**) og **regenerere** netop de celler, hvor et nyt DNA-fragment er blevet sat ind. Hvis man blot uden selektion regenererede planter fra transformerede umodne embryoer, ville transgenet kun findes i en ganske lille andel af planterne.

For at kunne udvælge de få transformerede planteceller, indsættes et **selektionsgen** sammen med det stykke DNA, som man ønsker at sætte ind (interessegenet). I genteknologiens barndom indsatte man som regel et gen for **antibiotikaresistens**, f.eks. **nptII**. Dette selektionsgen



Figur 1. Umodne embryoer er blevet beskydt med GUS-genet. Efter nogle dage er embryoerne blevet farvet, så man kan se hvilke celler, som udtrykker genet. Kun i en lille del af de celler, som udtrykker genet, er genet blevet integreret stabilt i et kromosom. De øvrige celler har kun transient ekspression og genet nedarves ikke til næste generation. Foto: Henrik Brinch-Pedersen.

gør plantecellen resistent overfor **kanamycin**, og for at selekere de transgene planteceller tilsatte man kanamycin til dyrkningsmediet. Planteceller med *nptII*-genet vokser og deler sig, mens planteceller uden dette gen hæmmes i vækst, når der er kanamycin i **dyrkningssubstratet**.

I dag findes forskellige typer selektionsgener, og ofte bruges et selektionsgen, som gør den transgene plante tolerant overfor et ukrudtsmiddel (herbicid). **Herbicidtolerance** hos den transgene plante er således et biprodukt af transformationsprocessen.

Til kommerciel dyrkning er selektionsgener ofte uønskede. Hvis selektionsgen og "interessegen" er blevet sat ind på hvert sit kromosom eller meget langt fra hinanden på samme kromosom, kan man fjerne selektionsgenet ved krydsning og udvælgelse af afkomstplanter, hvor selektionsgenet er spaltet ud. Ofte er generne blevet sat ind samme sted på kromosomet. Så nedarves selektionsgenet sammen med interessegenet, og det er meget vanskeligt at få det fjernet uden også at miste interessegenet.

Ny metode til transformation af byg

En ny metode til transformation af byg er udviklet ved Forskningscenter Flakkebjerg. I stedet for at bruge umodne embryoer, som indeholder mange hundrede celler, transformeres kun en enkelt celle, den befrugtede ægcelle (**zygoten**). Da der kun transformeres én celle, er det muligt at undlade brugen af selektionsgener.

Transformationen skal ske før den første deling af



Figur 2. Støvknapperne fjernes (emaskulering) fra alle blomster i et aks, inden de har bestøvet hunblomsterne. Hunblomsterne bestøves med pollen fra en anden bygplante 3-4 dage efter emaskulering. Ca. 45 minutter efter bestøvning er pollenrøret vokset ned gennem griflen og ægcellen befrugtes. Foto: Henny Rasmussen.



Figur 3. Udprepareret frugtknude med støvfang. Foto: Inger B. Holme.

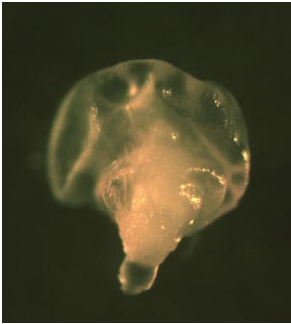
zygoten for at sikre, at alle celler i planten stammer fra den transformerede zygote. Tidspunktet for befrugtningen må derfor kontrolleres. Byg er normalt en selvbestøver, og det er derfor nødvendigt at fjerne støvknapperne fra blomsterne (**emaskulere**) nogle dage før pollenkornene modner (**Figur 2**).

Tre til fire dage senere håndbestøves akset med pollen fra en anden bygplante. Det tager 45 min for pollenspiren at nå ægcellen i **frøanlægget (ovulen)**, så befrugtningen kan ske. Kromosomfordoblingen forud for den første celledeling begynder ca. 12 timer efter befrugtningen. Integrationen af det nye gen i et af zygotens kromosomer skal være afsluttet, før der sker kromosomfordobling og deling af zygoten, da regenererede planter ellers kan blive **kimære**. **Frugtknuderne (Figur 3)** tages derfor ud af akset og frøanlæggene isoleres omkring en time efter håndbestøvningen. Frugtknuderne overfladesteriliseres efter at de er taget ud. Herefter foregår alt håndtering sterilt i en sterilbænk. Frøanlæggene isoleres fra frugtknuderne med finspidsede pincetter. Straks herefter inficeres frøanlæggene med *Agrobacterium*, for at T-DNA'et kan nå at blive overført indenfor de 12 timer.

Ved hjælp af en lille injektionssprøjte inficeres de nyisolerede frøanlæg (**Figur 4**). *Agrobacterium* og frøanlæg dyrkes sammen i 24 timer. Frøanlæggene flyttes herefter til et dyrkningsmedium tilsat et antibiotikum (timentin), som specifikt dræber bakterierne, men ikke plantecellerne.



Figur 4. Frøanlæggene perforeres ved hjælp af en lille injektionssprøjte og inokuleres med *Agrobacterium*. Bakterier og frøanlæg dyrkes sammen i 24 timer. Frøanlæggene flyttes herefter til et dyrkningsmedium tilsat et antibiotikum, som dræber bakterien. Øverst ses et frøanlæg. Foto: Inga C. Bach.



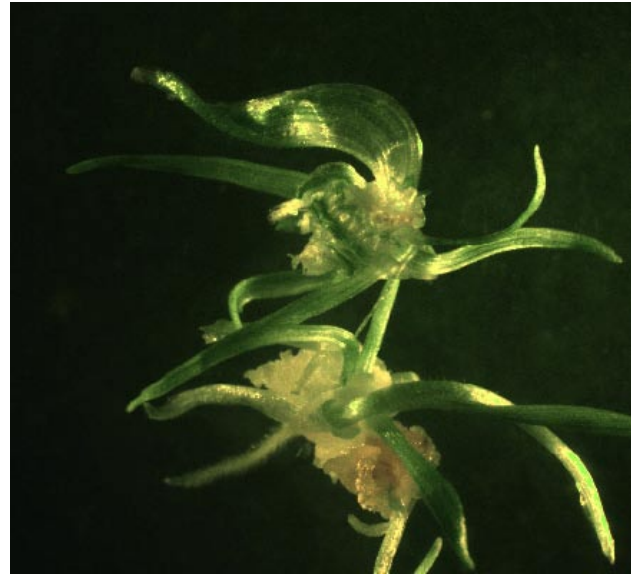
Figur 5. Frøanlæg 10 dage efter befrugtning. Zygoten har gennemgået celledeling og er ved at udvikle sig til et embryo. Foto: Inger B. Holme.

Bakterier er generelt mere følsomme overfor antibiotika end planteceller. Kulturerne dyrkes ved 23°C i mørke (**Figur 5**). Efter 3 uger er embryoerne store nok til at blive overflyttet til regenerationsmedie. Her vil embryoerne spire til hele bygplanter (**Figur 6**).

Til optimering af transformationsmetoden blev **reportergen**, som koder for et grønt fluorescerende protein GFP (**Green Fluorescent Protein**), anvendt. Dermed kunne processen følges uden at ødelægge plantecellerne (**Boks 1**).

Fordele ved transformation af zygoter

Den nye transformationsmetode er arbejdskrævende og kræver stor fingerfærdighed, men der er store fordele ved at transformere zygoter frem for embryoer. En af fordelene er at man kan fremstille transgene planter uden brug af selektionsgener. Med den nye metode inficeres kun en enkelt celle med *Agrobacterium*. Behovet for at selekttere bliver dermed langt mindre, end hvis man inficerer et embryo, hvor hver eneste af embryoets mange hundrede



Figur 6. Transgene embryoer er spiret og har udviklet sig til små planter. Planterne på billedet er 8 uger gamle. Foto: Inger B. Holme.

celler i teorien kan udvikle sig til en ny plante.

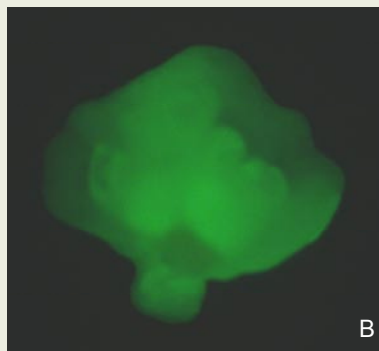
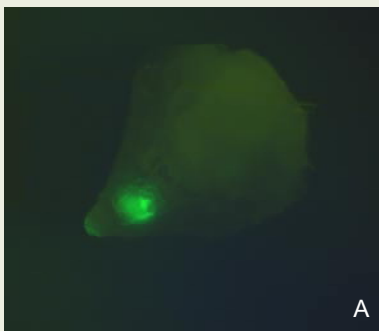
En anden fordel er, at risikoen for at der sker mutationer er mindre. Cellerne i umodne embryoer er begyndt at **differentiere**, og før de kan danne embryoer, skal de gennemgå en fase, hvor de vokser og deler sig som udifferentierede celler (**kallus**). Når man i stedet transformerer zygoten, kan den transformerede celle fortsætte sin naturlige udvikling til et embryo. Man undgår dermed kallusfasen, hvor der kan ske mutationer.

Evnen til at danne embryoer ud fra vegetative celler er

Boks 1. Green fluorescent protein

Til udvikling og optimering af en ny transformationsmetode er reportergener vigtige redskaber. Traditionelt har man brugt GUS-genet, men for at se, om GUS-genet er kommet ind og udtrykkes i cellerne, skal plantevævet farves. Det ødelægger cellerne. Den nye transformationsmetode til byg er udviklet ved hjælp af GFP-genet, der koder for et grønt fluorescerende protein. GFP-proteinet lyser grønt, når det belyses med ultraviolet lys. Man kan dermed følge udviklingen af transformerede celler ved at se på dem i et fluorescensmikroskop. Herunder vises eksempler på, hvordan GFP-ekspressionen i de transformerede celler kan følges først i vævskultur og i pollen fra transgene planter.

GFP-ekspression i den delende zygote kan identificeres få dage efter infektion med *Agrobacterium* (A). Efter 3 uger har zygoten udviklet sig til et embryo (B), som kan spire (C). Foto: Inger B. Holme.



meget afhængig af genotypen. Derfor benyttes som regel specielle sorter med høj embryodannelse, når man vil lave transgene planter. Sorter, som egner sig godt til dyrkning i vævskultur har ikke nødvendigvis særlig høj dyrkningsværdi. Derfor skal det indsatte gen krydses ind i moderne sorter ved hjælp af et almindeligt krydsningsprogram. Det tager flere år, og derfor er der et stort behov for at få udviklet transformations- og vævskulturmetoder med mindre genotype-afhængighed. Zygoten er det naturlige forstadium til embryoet. Derfor er dens evne til at danne embryoer uafhængig af genotypen. Uafhængighed af genotypen vil betyde, at også moderne sorter med høj dyrkningsværdi vil kunne transformeres.

GM-byg på vej

De genetisk modificerede planter, som er på markedet i dag indeholder DNA fra forskellige typer af organismer, f.eks. bakterier og svampe. Det øgede kendskab til planters arvemateriale og forbedrede molekylærbiologiske teknikker gør det nu muligt at udvikle gensplejsede planter, som kun indeholder plantens eget genetiske materiale.

Et eller flere af plantens egne gener kan sættes ind i ekstra kopier, eller man kan slukke for et specifikt gen. Gensplejsede planter, som kun har fået tilført et ekstra DNA-fragment fra samme art eller fra nært beslægtede arter, som kan krydses med afgrødearten, kaldes **cisgene planter**. Udvikling af metoder til transformation uden brug af selektionsgener, som ofte stammer fra bakterier eller svampe, er essentielt for fremstilling af cisgene planter.

Blandt de egenskaber, som man ønsker at tilføre til bygsorter er forbedret ernæringsværdi, f.eks. i form af øget fordøjelighed af fytinsyre og forbedret aminosyresammensætning i kernerne. Som eksempel på dyrkningsmæssige egenskaber kan nævnes øget kvælstofoptagelse, stresstolerance og sygdomsresistens.

Reference

Holme IB, Brinch-Pedersen H, Lange M, Holm PB (2006) Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. Plant Cell Rep 25: 1325-1335.

Ordforklaring

Agrobacterium - Bakterieslægt, som under naturlige forhold kan inficere planteceller og indsætte et DNA-fragment (T-DNA) i plantecellens arvemasse.

Antibiotikaresistens - Modstandsdygtighed overfor et antibiotikum, f.eks. kanamycin.

Cisgenese - Genetisk modifikation af planter ved brug af DNA, som stammer fra samme eller meget nært beslægtede plantearter.

Differentiere - Specialisering af celler til væv, som f.eks. blad eller rod.

Dyrkningssubstrat - Flydende eller fast næringssubstrat, som bruges til dyrkning af planteceller i vævskultur. Det indeholder makro og mikronæringsstoffer, kulhydrater og evt. plantehormoner.

Emaskulere - Fjerne støvknapper fra blomst før de har frigivet pollen.

Embryo - Kim.

Frugtknude - Organ i blomst, som indeholder frøanlæg. Betegnes også ovarie.

Frøanlæg - Organ i blomst, som indeholder kimsæk med ægcelle. Betegnes også ovule.

Genkanon - Apparat til beskydning med metalpartikler, som bærer DNA.

Gensplejsning - Begrebet bruges både om splejsning af DNA-molekyler udenfor en levende organisme og om overførsel og integration af DNA-fragmenter i en levende organismes genom. Se også transformation.

GFP-genet - Et almindelig brugt reporter-gen, som koder for et fluorescerende protein (Green fluorescent protein; GFP). GFP-genet stammer fra en vandmand.

GUS-genet - Et almindelig brugt reporter-gen, som koder for enzymet beta-glucuronidase (GUS). GUS-genet stammer fra *E. coli*.

Herbicidtolerance - Mange afgrøder er naturligt tolerante overfor visse herbicider, men der bliver også indsat mikrobielle gener i planter, som giver tolerance overfor f.eks. glyphosat.

Kallus - Udifferentierede planteceller, som dannes, når planten heler et sår eller når planteceller dyrkes i vævskultur.

Kanamycin - Antibiotikum, som hæmmer både bakteriers plantecellers vækst.

Kimær - Organismer, som består af celler eller hele vævsstykker med forskellig genetisk sammensætning.

nptII - Gen, som koder for enzymet neomycin phosphotransferase II. Dette protein inaktiverer kanamycin. Genet stammer fra *E. coli*.

Plasmid - Cirkulært DNA-molekyle. Vildtyper af *Agrobacterium* bærer et såkaldt Ti-plasmid (Tumor Inducing plasmid). Ti-plasmidet indeholder et T-DNA med gener, som inducerer dannelse af en tumor på det sted, som planten er blevet inficeret.

Reporter-gen - Et gen, hvis udtryk er let at følge, enten visuelt eller ved en simpel test.

Selektore - Udvælg.

Selektionsgen - Et gen, som gør det muligt at selekttere transformerede celler eller væv på et dyrkningssubstrat, som indeholder et selektionsmiddel. Ofte anvendes et antibiotikaresistensgen, f.eks. nptII eller et gen, som giver tolerance overfor et herbicid.

T-DNA - Den del af et plasmid, som overføres til en anden organismes genom ved *Agrobacterium*-transformation.

Transformation - Overførsel og integration af DNA-fragmenter i en levende organismes genom. Se også gensplejsning.

Zygote - Befrugtet ægcelle.

Relaterede forskningsprojekter

I Danmark er forskere fra flere forskellige institutioner igang med projekter som involverer genetisk modifikation af byg. Der er tradition for samarbejde på tværs af faggrænser, forskningsinstitutioner og nationale grænser. Følgende forskningsprojekter er igang ved Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet.

Ny metode til transformation af byg og hvede

Formålet med projektet "Development of novel transformation techniques for barley and wheat" var bl.a. at udvikle metoder til effektiv og genotype-uafhængig transformation af korn uden selektionsgener i planterne. Projektet blev uført ved Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Forskningscenter Flakkebjerg, Aarhus Universitet. Det blev påbegyndt i 2004 og afsluttet i 2007. Midlerne blev bevilget via Forskningsrådet SJVF. Kontaktpersoner: Preben Bach Holm og Inger B. Holme.

Udvikling af byg med forbedret aminosyresammensætning

Sammensætningen af aminosyrer i byg- og hvedekerner passer dårligt til de ernæringsmæssige behov hos forbrugerne – primært grise og kyllinger. Vi har vist at vi ved gensplejsning kan ændre proteinsammensætningen i byg, således vi får en mere optimal aminosyresammensætning til grisefoder. De gensplejsede bygplanter bliver nu dyrket i marklignende forhold og herfra vurderes, hvordan de klarer sig. Samtidig arbejdes der på genniveau for at identificere nogle overordnede reguleringsmekanismer (transkriptionsfaktorer), der kontrollerer aminosyresammensætning. Rollen for disse transkriptionsfaktorer bliver analyseret og transkriptionsfaktorer, der viser sig særlige nyttige ifm, reguleringen af aminosyresammensætningen vil kunne bruges til transformation. Projektet er finansieret af Forskningsrådet for Teknologi og Produktion startende januar 2006. Kontaktperson: Mette Lange.

Cisgen byg og hvede til foder

Formålet med projektet "Cisgenic barley and wheat for animal feed" er at vurdere og imødekomme to af befolkningens væsentligste indvendinger mod gensplejsede planter, nemlig brug af artsfremmede gener og spørgsmålet om nytteværdi. I den praktiske del af projektet benyttes cisgenese konceptet, hvor man kun gensplejser med plantens egne gener, til at udvikle byg og hvede med positive effekter på miljøet og optimal ernæring af husdyr. Projektet blev påbegyndt i 2007 og forventes afsluttet i 2010. Projektet har deltagere fra bl.a. Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet ved Aarhus Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet ved Københavns Universitet (Dels Institut for Jordbrugsvidenskab, dels Center for bioetik og Risikovurdering), Dansk Landbrugsrådgivning, og Sejet Planteforædling A/S. Midlerne blev bevilget af Direktoratet for FødevareErhverv. Kontaktperson: Preben Bach Holm.