

Planter og gensplejsning

Bioteknologi

Gensplejsning er en teknologi, som har mange muligheder. Men samtidig er det en teknologi, som giver anledning til udbredt bekymring. Vi tager hermed hul på en artikelserie om gensplejsning på planter. Denne første artikel handler om den tekniske baggrund.

Vi står i øjeblikket midt i en af naturvidenskabens store revolutioner, som kan åbne op for uanede muligheder, men som samtidig giver anledning til udbredt bekymring og skepsis. Der er selvfølgelig tale om genteknologien, som har været flittigt debatteret i den sidste tid.

I kølvandet på udviklingen af den nye teknologi følger nemlig en lang række praktiske og etiske spørgsmål. Og den stigende skepsis i befolkningen overfor genmanipulering har medført, at politikerne for nylig slog bremserne i og dømte en 3-årig "tænkepause" for tilladelser til udsætning og markedsføring af genmanipulerede planter.

Denne artikel handler om teknikken bag gensplejsning på planter. I kommende numre vil vi tage andre aspekter af gensplejsning op f.eks. det etiske.

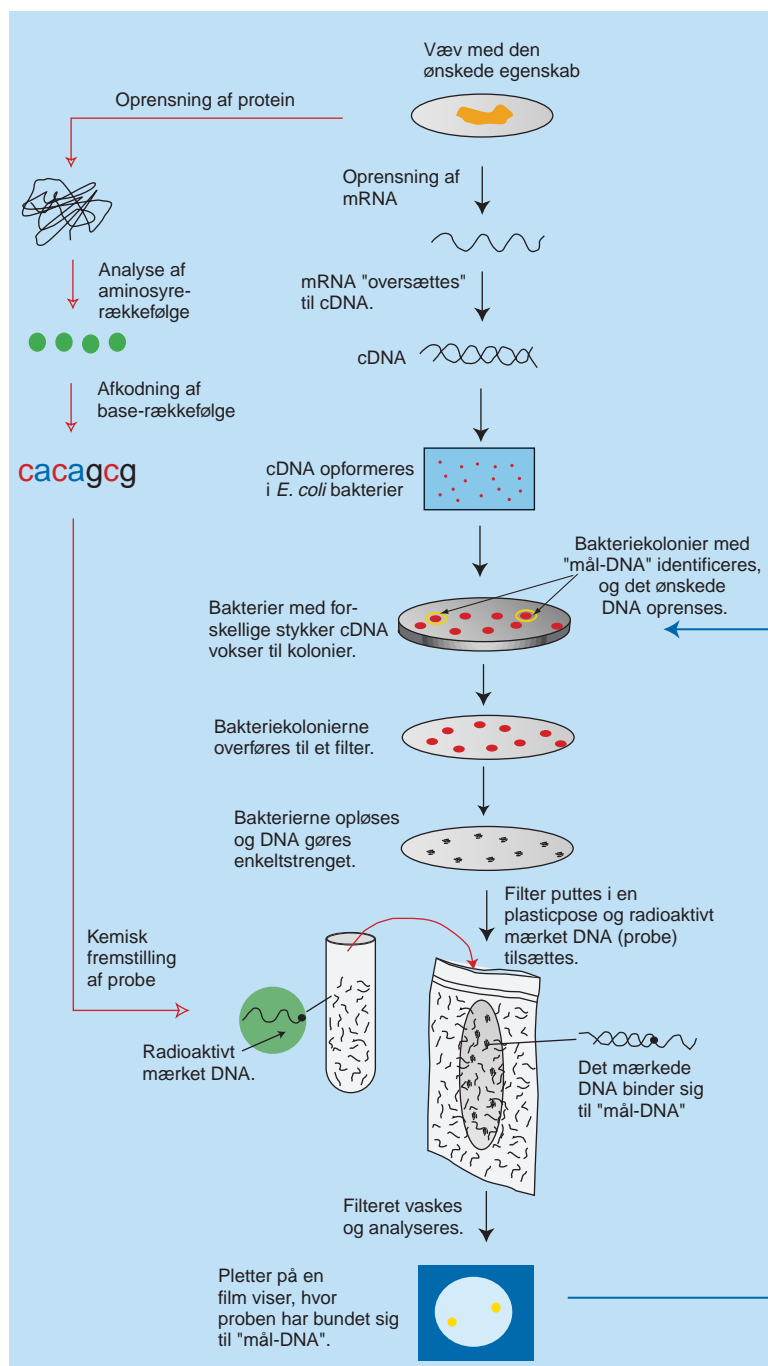
Gensplejsning

Den teknik, hvor forskerne ændrer på arveanlæggene, kaldes gensplejsning. Man kan fjerne gener, eller man kan indsætte gener fra en organisme i en anden organisme. Det er på den måde muligt at blande gener fra forskellige arter. Hvis en organisme har modtaget et gen fra en fremmed organisme kaldes den *transgen*. Når man ændrer på generne, vil ændringerne også nedarves til kommende generationer.

Ved gensplejsningsteknikken udklippes det ønskede gen og overføres til en bakterie, hvor det opformeres. Gensplejsning og opformering af gener (kloning) er grundlaget for al genteknologi.

For at kunne lave gensplejsning på planter er der fire ting, der er nødvendige:

1. En metode til at få fat i de ønskede gener.
2. En metode til at indsætte genet i en fremmed DNA-struktur, der kan kopiere sig selv i en bakterie
3. En metode til at indsætte dette DNA i en plantecelle, der kan blive til en hel plante.
4. En metode til at udvælge de celler, der har modtaget det fremmede gen.



Udvælgelse og isolering af interessante gener

Der er for tiden store programmer i gang, hvor man bestemmer sekvensen – dvs. baserækkefølgen for alle generne hos forskellige organismer. Det sker f. eks. i tarmbakterien *E. coli*, zebrafisk, mus, menneske, planten gåsemad, ris, tomat, sojabønne og majs. Selvom man på denne måde kan få kortlagt baserækkefølgen for alle gener, er det ikke det samme som, at vi dermed også kender funktionen af generne.

Fra disse sekventeringsprojekter er det dog let at få fat på en bestemt gensækvens og

anvende den i gensplejsning. Men ofte findes de ønskede egenskaber, som man gerne vil overføre til en bestemt plante, i bakterier, svampe eller i vilde planter. Det kan være egenskaber som modstandsdygtighed overfor tørke, kulde, svampe eller plantemidler – eller det kan være evne til at producere plastic. Der er adskillige metoder til isolering af bestemte gener. En af de meget anvendte metoder er screening af et *c-DNA*-bibliotek. Denne metode er skitseret i boksen.

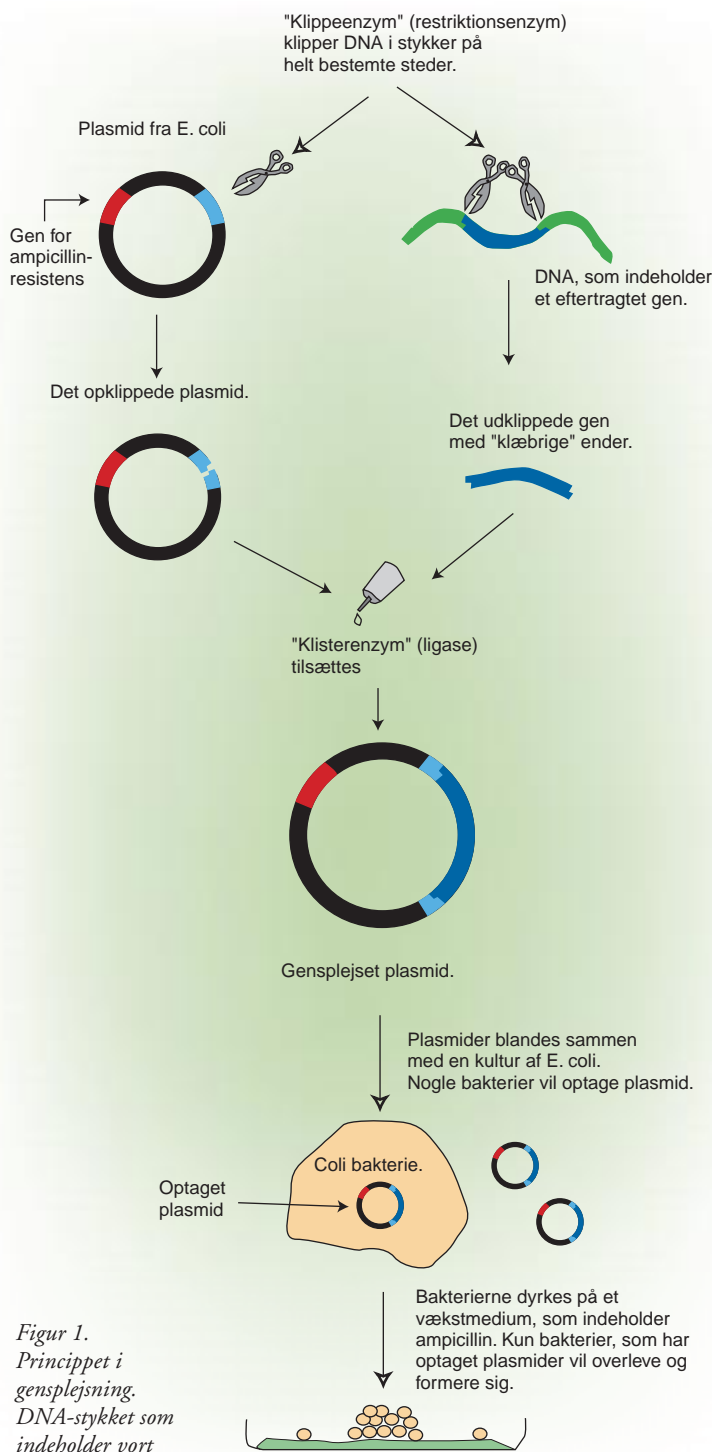
Gensplejsning og kloning

Selve gensplejsningen (se figur 1) foregår ved, at det ønskede gen "klippes" ud af det arvemateriale, hvor genet egentligt hører til, og indsættes i et såkaldt *plasmid*. Plasmider er små cirkelformede DNA-molekyler, som findes hos visse bakterier udover det almindelige kromosom. Plasmider er i stand til at kopiere sig selv, og de kan nemt overføres fra bakterie til bakterie og fører dermed arveanlæg med sig.

Opklipningen af DNA sker vha. et "klippeenzym" (*restriktionsenzym*). Det specielle ved klippeenzymene er, at de kan genkende helt bestemte rækkefølger af baser, og de kan kun klippe de pågældende steder. Dvs. ét bestemt klippeenzym klipper kun i én bestemt basesækvens. Mange af klippeenzymene klipper således, at der i det opklippede DNA-materiale fremkommer nogle uparrede baser.

Ved gensplejsning benytter man de samme klippeenzymet både til at klippe genet ud og til at klippe plasmidet op. Derved opnår man, at der på det udklippede gen og på plasmidet fås nogle sekvenser af uparrede baser, som passer sammen, altså er komplementære. Derved kan genets uparrede baser finde sammen med plasmidets uparrede baser. Til at samle det overklippede DNA benyttes nogle "klisterenzym", der hedder *ligaser*.

Når plasmidet har fået indsplejset det fremmede gen, indsættes det i en bakterie, hvor det vil blive duplikeret (klonet)



Figur 1. Princippet i gensplejsning. DNA-stykket som indeholder vort eftertragtede gen klippes op af et klippeenzym. Det udklippede gen indsættes i et plasmid, som er åbnet vha. samme klippeenzym. Plasmidet med det indsatte gen optages af en *E. coli* bakterie, og bakterierne dyrkes på et vækstmedium med ampicillin. Plasmidet, som benyttes til transport af genet ind i bakterien, bærer i dette tilfælde et gen for ampicillin resistens. Derfor vil kun bakterier, der har optaget plasmid overleve.

ved celledeling som resten af bakteriens arvmasse og derved gå i arv fra generation til generation. På denne måde vil en hurtig voksende mængde af bakterier producere en stor mængde plasmider. Disse plasmider kan forholdsvis nemt

oprenses fra bakterien og føres ind i andre bakterier f.eks. jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Denne bakterie sørger så for at overføre genet til den plante, som skal have den ønskede egenskab.

Isolering af et gen

Der findes flere metoder til at isolere et interessant gen. En af metoderne er screening af *cDNA*-bibliotek. Metoden er skitseret i figuren, og udgangspunktet er, at man isolerer mRNA (dvs. budbringer RNA) fra det væv, hvorfra genet ønskes isoleret.

Ud fra dette mRNA kan man fremstille en kopi af det tilsvarende DNA (derfor kaldes det for *cDNA*-metoden fra det engelske copy eller complementær). De forskellige stykker *cDNA* klones og opformeres i *E. coli* bakterier og bakterierne fordeles på en agar-plade. Hermed er der fremstillet et bibliotek over DNA (et såkaldt *cDNA*-bibliotek), som er komplementært til den samlede mængde mRNA. Bakterierne med *cDNA*-biblioteket vil vokse til kolonier og kolonierne overføres til et filter. Filteret tilsættes en radioaktiv *probe*.

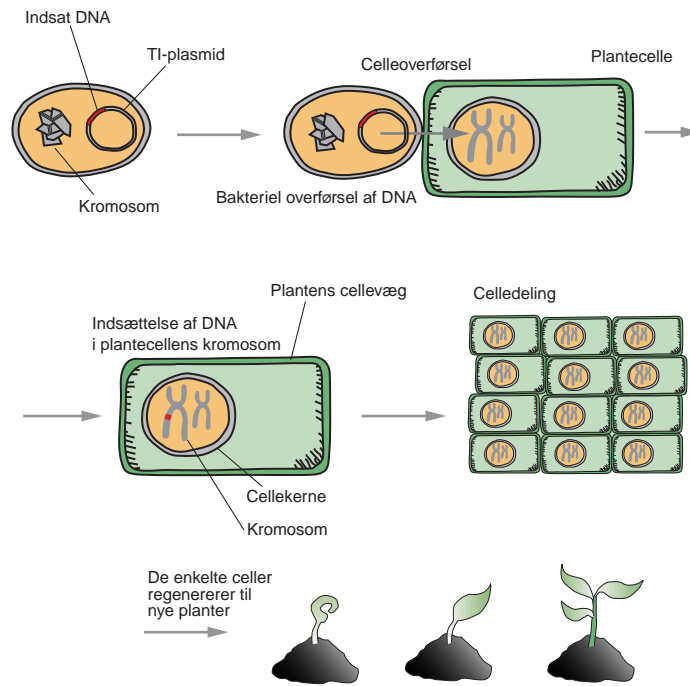
En *probe* er et lille stykke DNA med en baserækkefølge, som svarer til en del af det gen, man søger efter. Proben vil spontant binde sig til sin komplementære sekvens, hvis denne findes i en forelagt prøve af DNA. Venstre side af figuren viser, hvordan man via oprensning af protein fra vævet har fundet frem til den baserækkefølge, som proben består af.

Filteret vaskes og placeres på en røntgenfilm. Der, hvor proben har bundet sig til sit "mål-DNA" vil der fremkomme en plet og den tilsvarende bakteriekoloni kan findes og genet oprenses.

Gensplejsning af planter

Før det ønskede gen kan overføres til planten skal det forbindes med et andet stykke DNA kaldet en *promoter* og en *terminator*, som bestemmer, hvor og hvordan genet skal udtrykkes i planten.

Det samlede stykke DNA indsættes nu i en plantecelle, hvilket kan gøres på flere måder. Den mest anvendte metode ved gensplejsning af planter er at bruge en variant af jordbakterien, *Agrobacterium tumefaciens*, som også kaldes naturens egen gensplejser. Disse bakterier indeholder foruden deres eget genom et særligt plasmid (*Ti plasmid*), som sørger for, at et stykke af dets eget



Figur 2. Skematisk tegning over hvordan gensplejsning med *Agrobacterium* fungerer. Det ønskede gen sættes ind i en bestemt del af *Agrobacterium*s *Ti*-plasmid (*T-DNA*'t), som *Agrobacterium* indsplejser i plantecellens kromosom.

eller plantemiddel.

For at imødekomme ønsker fra forbrugerne om at undgå sådanne resistensgener er der nu udviklet nye selektions-systemer baseret på gensplejsede plantecellers evne til at udnytte bestemte sukkerstoffer.



Figur 4. Transformation af tobak. Bladskiver af tobaksplanter lægges i en "*Agrobacterium*-opløsning" i 30 minutter. Nogle planteceller vil herved modtage *T-DNA* fra *Agrobacterium* og blive gensplejset. Små gensplejsede skud dannes ud fra planteceller i bladskiven.

DNA (kaldet *T-DNA*) splejser ind i plantens genom (figur 2, 3 og 4). Generne, på det indsatte stykke DNA bliver derefter udtrykt af planten.

Selektion af gensplejsede planter

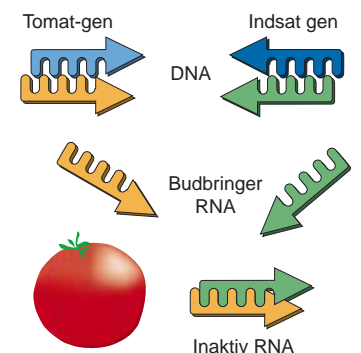
For at kunne øge antallet af de planteceller, som er blevet gensplejset, bliver der sammen med det "nyttige" gen indsplejset et såkaldt *selektionsgen*. Dette er typisk et gen, der gør plantecellen modstandsdygtig overfor antibiotika eller et bestemt plantemiddel. Derved sørger selektionsgenet for, at kun planteceller, der er blevet gensplejset overlever på et vækstmedium, som indeholder det pågældende antibiotika



Figur 3. 3A: En *Agrobacterium*-opløsning og en blomstrende gæsemad (*Arabidopsis thaliana*). På billedet 3B ses gæsemad vendt med blomsterne nedad i *Agrobacterium*-opløsningen. På 5 minutter vil *Agrobacterium* trænge ind i plantecellerne og overføre *T-DNA*'et til plantens kromosom. Her vil nogle af blomsterne og dermed frøene blive gensplejsede. Gensplejsede planter fås ved at udså disse frø på selektionsmedie.



ning af plantens eget gen. Dette er f.eks. gjort ved FlavrSavr tomaten, der er den første godkendte gensplejsede fødevarer fra 1994. Når normale tomater modner, bliver skindet blødt på grund af et bestemt enzym, der blødgør tomatens cellevæg. Derfor skades tomater let ved transport. I 1989 lykkedes det firmaet Calgene at blokere det arveanlæg, der danner enzymet. Derved får man i stedet tomater, der forbliver faste. Rent teknisk er det gjort ved, at man indsplejser arveanlægget for det relevante enzym (polygalac-



Figur 5. Skitse af Antisense-teknikken. Budbringer-RNA fra tomatens eget gen bliver blokeret af budbringer-RNA fra et indsat gen.

turonase) i planten, men som vender modsat plantens eget polygalacturonase-gen (se figur 5). Dette stykke DNA læses som normalt til mRNA. Det nydannede mRNA passer præcis sammen med et stykke af plantens eget mRNA, som polygalacturonase-enzymets DNA har læst. De to stykker mRNA danner tilsammen en mRNA duplex, som ikke kan oversættes, da de nu sidder fast sammen. Det medfører, at genet blokeres og ikke kommer til udtryk.

På samme måde forsøger man nu på Landbohøjskolen at fremstille giftfri cassava ved at blokere genet, der koder for det enzym, der indleder processen med at danne de såkaldte *cyanogene glucosider*. Problemet er nemlig, at når cassava spises kan cyanogene glucosider omdannes til giftstoffet cyanid (blåsyre).

Hvilke planter gensplejses

Til forskningsformål anvendes ofte tobak eller gåsemad (*Arabidopsis Thaliana*). Disse planter er nemme at gensplejse og nemme at få til at regenerere. Gåsemad har desuden den fordel, at den har et lille genom, og at hele genomet næsten er kortlagt, så man fra en genbank kan bestille et hvilket som helst gen, man skulle ønske sig. Dette betyder, at man er fri for den ofte besværlige og usikre vej, hvor man først skal isolere genet inden det kan anvendes til gensplejsning.

Risiko

Siden starten på gensplejsningen har man været opmærksom på, at den nye teknik kunne rumme en vis risiko. Risikoen for at en afgrøde spreder sine gener til andre planter er den samme, uanset om generne er indsat vha. gensplejsning eller er et resultat af almindelig forædling. Forskellen kan være, at et indspejset gen, kan stamme fra helt andre organismer som f.eks. bakterier.

Ved gensplejsning afhænger risikoen for spredning bl.a. af:

1. Egenskaben (genet)
2. Modtageren (hvilken afgrøde/vilde slægtninge)
3. Dyrkningsområdet (miljøet)

Risikoen skal vurderes for hver enkelt gensplejset plante. Kan genet – dvs. egenskaben – være til skade i naturen? Kan genet spredes til vilde slægtninge og derved gøre disse bedre i stand til at overleve i forhold til andre vilde slægtninge, der ikke har fået genet?

Spredning af gener kan ske via afgrøden, hvis afgrøden kan



Disse to roeplanter er blevet sprøjtet med RoundUp. Roen til venstre, som er gensplejset, har overlevet sprøjtningen, mens roen til højre, som ikke er gensplejset, er visnet og død. Fotoet er taget 14 dage efter sprøjtning.

overleve uden for marken, eller ved krydsning med nært beslægtede arter. Når det drejer sig om sukkerroer og raps findes der vilde slægtninge i Danmark.

Spredning af gener

Da der normalt ikke anvendes plantemidler i naturen vil transgene planter, der forvilder sig ud i naturen, ikke have en fordel frem for dens vilde naturlige slægtninge. I marken er der derimod risiko for, at resistensgener kan spredes til beslægtede ukrudtsarter, som dermed kan drage fordel heraf. Forskere på Forskningscenter Risø har vist, at genet for plantemiddel-resistens kan overføres fra raps til ukrudt som agerkål. Den umiddelbare konsekvens heraf er, at ukrudtet i marken ikke kan fjernes med det pågældende plantemiddel.

Ukrudtsplanterne skulle også nødig blive tolerante overfor f.eks. svampeangreb eller kulde, og dermed blive i stand til at "undslippe" deres natur-

lige begrænsninger.

Samtidig frygter man, at den meget effektive ukrudtsbekæmpelse, som evt. kan indledes, når man har en resistent afgrøde, vil føre til, at al ukrudt holdes meget effektivt nede. Hermed bliver der slet ingen føde til insekter, fugle og pattedyr i det dyrkede landskab - det bliver sterilt bortset fra selve afgrøden.

Ved dyrkning af gensplejede roer er der kun en yderst ringe risiko for spredning af gener. Dels vokser deres vilde slægtninge, strandroer, oftest langt væk fra roemarkerne, dels blomstrer roer i marken normalt ikke.

For at imødekomme lignende problemer med gensplejede græsser, er det danske firma, DLF-Trifolium i færd med at producere blomsterløse græsser. Denne anvendelse af genteknologi vil forhindre spredning af aktive gener samtidig med, at græsserne ikke vil give pollenallergi. Endelig vil kvaliteten af græsset som foderkilde være forbedret.

Risikoen ved gensplejsning ligger altså ikke i selve gensplejsningsteknikken, men i hvilke gener, der anvendes, og hvor de anvendes. Derfor er det naturligvis nødvendig med en grundig godkendelsesprocedure for hver enkelt gensplejset afgrøde. ☺



Om forfatteren

Anna Haldrup er lektor ved Plantebiokemisk Laboratorium, Institut for Plantebiologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole
Thorvaldsensvej 40
1871 Frederiksberg C
Tlf.: 35283335
E-mail: anna@plbio.kvl.dk

Hvor kan jeg få mere at vide

www.lr.dk/Planteavl/Informationsserier/GMOroer/gensplejs.htm
(Om den gensplejede foderroer samt love og regler for gensplejsning)

www.isaaa.cornell.edu/frbrief5.htm
(Om udbredelse af transgene afgrøder i verden)

<http://biotech.JRC.it>
(Om forsøgsmarker i EU)

www.plbio.kvl.dk/outreach/plbio.htm
(Om gensplejsningsprojekter på landbohøjskolen)

<http://www.fbr.dk/genmad>
(Forbrugerrådets hjemmeside, der fortæller om gensplejede fødevarer)

Uddybende litteratur

C. Damgaard, G. Kjellsson, C. Kjær, B. Strandberg (1998): *Gensplejede planter*. Tema-rapport fra Danmarks Miljøundersøgelser 1998

Haldrup, A., Søgaard, A. (2000): *Genteknologi*. Forlag Malling Beck, København.

Jensen, S.M. (1992): *Økologisk risikovurdering ved udsætning af genetisk modificerede planter*. Skov- og Naturstyrelsen, Miljøministeriet, København.

Teknologirådet (1996): *Gensplejede planter – regulering og anvendelse*. Teknologirådets rapporter 1996/1, Teknologirådet, København.

Terney, O. (1996): *20 år med genteknologi*. Foreningen af Bioteknologiske Industrier i Danmark, København.

Transgen afgrøde	Global Afgrøde areal Million hektarer	1998 Transgen areal Million hektarer	1998 Transgene afgrøder i % af totale areal
Herbicid tolerant sojabønne	67	15	22
Insektresistent majs	140	7	5
Insektresistent bomuld	34	1	3
Herbicid tolerant raps	25	2	8
Herbicid tolerant majs	140	2	1
Insektresistent kartoffel	18	< 1	< 6
Total	424	27	6

Tabel, som viser udbredelsen af transgene afgrøder i verden i 1998. Det skal nævnes, at tal fra Kina ikke er med i tabellen. Kilde: OECD.