

Fremskridt i forskningen i symbiose mellem bælgplanter og *Rhizobium*-bakterier

Verdens fødevarerproduktion ville revolutioneres, hvis man kunne overføre bælgplanters evne til symbiose med kvælstoffikserende bakterier til basisafgrøder som ris, hvede og majs, men symbiose er en kompliceret proces, der ikke umiddelbart kan flyttes. Væsentlige dele af symbiosens mange trin er opklaret af forskere fra Aarhus Universitet. For nyligt identificerede de et protein, som er afgørende for bælgplanters evne til at danne rodknolde. Disse resultater er netop publiceret i Nature.

Af Inga C. Bach, *Planteforskning.dk* og Niels Sandal, Aarhus Universitet

Luftens kvælstof, N_2 , kan ikke optages af planter, og derfor er de afhængige af, at det omdannes til plantetilgængelig form af andre organismer eller via kemiske processer. Omdannelsen af N_2 til ammoniak (NH_3) kræver tilførsel af store mængder energi. Processen kan forekomme i atmosfæren i tordenvejr, eller den kan ske på gødningsfabrikker, hvor ammoniak fremstilles ud fra N_2 og brint ved den såkaldte Haber-process.

Der fremstilles store mængder kunstgødning på verdensplan, men langt størstedelen af omdannelsen af N_2 sker i bælgplanters rødder ved hjælp af symbiose med kvælstoffikserende bakterier. En særlig gruppe bakterier som kollektivt kaldes ***Rhizobium*** lever i små knolde på bælgplanternes rødder. Her forsynes de med sukkerstoffer, som dannes ved plantens fotosyntese, og til gengæld fikserer de kvælstof til gavn for planten.

Kemisk dialog mellem planter og bakterier

Symbiose mellem bælgplante og bakterie kræver en kompliceret kemisk dialog mellem de to organismer. Dialogen begynder med, at planten udskiller stoffer, en type flavonoider, som genkendes af specifikke arter af *Rhizobium*-bakterier. Derefter udskiller bakterien et kemisk signal, en såkaldt **Nod-faktor**, som bindes til modtagerproteiner – **receptorer** – i cellemembraner i plantens rodhår. Differentierede rodceller omdannes til en

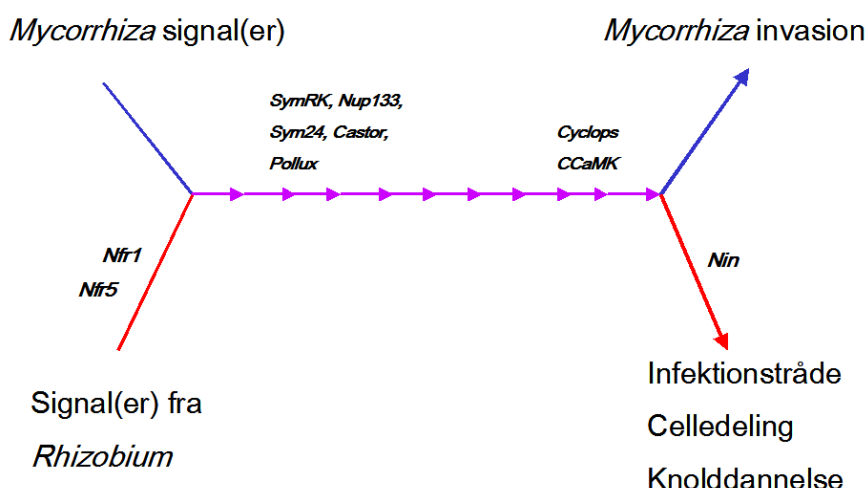
slags stamceller, som udvikles til nye organer – rodknolde – som bakterierne koloniserer. Dannelse af rodknolde er en omfattende proces, og binding af bakteriens signalstof til plantens receptorer medfører, at en kaskade af plantens gener aktiveres. En del af de proteiner, som generne koder for, er også involveret i andre processer i planten.

Evolutionært er bælgplanters symbiose med *Rhizobium*-bakterier et relativt nyt fænomen, men udvikling af systemet bygger på egenskaber, som allerede fandtes i forvejen hos planter. En del af de planteproteiner, som er nødvendige for symbiose med *Rhizobium*-bakterier, har funktioner i planternes symbiose med *Mycorrhiza*-svampe.

Symbiose med *Mycorrhiza*-svampe er udviklet langt tidligere end symbiose med *Rhizobium*-bakterier, og mens næsten alle højere planter er i stand til at gå i symbiose med *Mycorrhiza*-svampe, er det kun bælgplanter, der kan danne partnerskab med *Rhizobium*-bakterier.

Mycorrhiza-svampes signaler genkendes ikke af de samme receptorer som signalerne fra *Rhizobium*-bakterier. Der er også stor forskel på slutresultaterne – svamperødder versus rodknolde – men der er sammenfald en del af vejen i de to processer. Se figur 1.

Mycorrhiza-svampe kan ikke fikserer kvælstof, men planterne har alligevel stor gavn af at forsyne dem med kulhydrater. Svampene bidrager med mineralske næringsstoffer, f.eks. fosfat, som optages via myceliet, der har en langt større overflade end planternes rodnet.



Figur 1. Model for plantegener, der er involveret i symbiose.

Nod-faktorerne fra *Rhizobium*-bakterier genkendes af receptorerne Nfr1 og Nfr5. Derefter aktiveres gener, som også er involveret i symbiose med *Mycorrhiza*-svampe. Man kender endnu ikke den eller de receptorer, som genkender de kemiske signaler fra *Mycorrhiza*-svampe. Indtil videre har forskerne identificeret 7 gener (common pathway), bl.a. ved hjælp af mutanter, som hverken kan lave symbiose med *Rhizobium*-bakterier eller med *Mycorrhiza*-svampe. Til højre i figuren adskilles de to symbiosesystemer igen. Den ene gren giver rodknolde, og den anden giver symbiose med *Mycorrhiza*-svampe.

Spontan dannelse af rodknolde i visse sorter af lucerne og kløver

Normalt induceres dannelsen af rodknolde kun, når planten opfanger de kemiske signaler fra *Rhizobium*-bakterier. Visse sorter af lucerne og kløver er dog i stand til at danne rodknolde, uden at der er *Rhizobium* tilstede. Disse planter har formentlig en **mutation** (ændring i DNA-sekvensen) i enten et regulatorisk gen eller et gen, som er direkte involveret i initiering af rodknold-dannelse. Identifikation af disse gener ville bidrage til opklaring af et meget vigtigt trin i dannelsen af rodknolde. Imidlertid egner hverken lucerne eller kløver sig til grundvidenskabelige studier. Begge arter er **tetraploide** (fire kopier af hvert gen), og både genetiske og molekylærbiologiske undersøgelser foretages så vidt muligt i **diploide** planter, som kun har to kopier af hvert gen.

Lotus japonicus (Japansk kællingetand) er diploid og bruges som modelplante for de mange andre bælgplanter. Se figur 2. Den tilhører samme slægt som ***Lotus corniculatus*** (Almindelig kællingetand), som vokser vildt Danmark og dyrkes i Sydamerika. Se figur 3 og 4.

Forskning på Aarhus Universitet

En forskergruppe fra Molekylærbiologisk Institut på Aarhus Universitet har i en årrække beskæftiget sig med symbiose under ledelse af Jens Stougaard. De har klarlagt flere trin i den kemiske dialog mellem bælgplanter og *Rhizobium* og har bl.a. identificeret de receptorer, som genkender signaler fra *Rhizobium*-bakterierne.

Mutanter er meget vigtige for molekylærbiologisk forskning. Flere forskellige *Lotus japonicus* symbiose-mutanter er blevet undersøgt nøje, heriblandt nogle, som

har mistet evnen til at danne rodknolde. Se figur 5. Studier af mutanterne har ført til identifikationen af flere gener, der er involveret i symbiose, men der mangler stadig vigtige brikker i puslespillet.

En muteret *Lotus japonicus* plante, der kan danne rodknolde spontant ligesom de omtalte sorter af kløver og lucerne, kunne vise vejen til en af de manglende brikker i bælgplanternes unikke symbiosesystem, men en mutant med denne **fænotype** (individets synlige træk) fandtes ikke i samlingen af mutanter.



Figur 2. *Lotus japonicus*, model for andre bælgplanter.

Grundlæggende genetiske analyser udføres som regel i modelplanter, som bl.a. er karakteriseret ved at være diploide med et forholdsvis lille genom og ved at være let at arbejde med i laboratoriet. Jens Stougaard fra Aarhus Universitet foreslog i 1992 at bruge *Lotus japonicus* (Japansk kællingetand) som modelplante for de mange vigtige afgrøder fra bælgplantefamilien, og det har vundet genklang i mange laboratorier verden over.



Figur 3. *Lotus corniculatus* (Almindelig kællingetand).

Lotus corniculatus er vildtvoksende i Danmark.

Mutant af modelplanten *Lotus japonicus* eftersøges

Det blev Leïla Tirichine fra Aarhus Universitet, som kom til at stå i spidsen for eftersøgningen af en *Lotus japonicus*-plante med evnen til at danne rodknolde, uden at der er *Rhizobium* tilstede. Det faktum, at spontan dannelse af rodknolde aldrig var blevet observeret hos denne art, tydede på, at mutationen ville være meget sjælden, hvis den overhovedet kunne forekomme. Leïla Tirichine og hendes kolleger satsede stort og satte eftersøgningen i gang. De ledte blandt mere end 500.000 individer af *Lotus japonicus*, som havde været udsat for en kemisk behandling, som **inducerer mutationer** (forårsager ændringer i DNA-sekvensen).

For at sikre, at der ikke fandtes *Rhizobium*-bakterier i dyrkningsmediet eller på overfladen af frøene, blev alt materiale, som skulle i kontakt med planterne, steriliseret. Af samme grund blev de mange frø overfladesteriliseret.

Kvælstof hæmmer dannelsen af rodknolde, og derfor blev frøene sået i dyrkningsmedium uden kvælstof, så planterne måtte klare sig med den smule kvælstof, som var i frøet. Efter fem uger blev planterne taget forsigtigt op, og rødderne blev undersøgt for rodknolde.



Figur 4. Frøproduktionsmarken i Uruguay

Lotus forskere studerer rodknolde af *Lotus corniculatus*.

Leïla Tirichine og hendes kolleger blev belønnet for deres satsning og det store arbejde. De fandt seks planter, som havde dannet rodknolde uden at være blevet stimuleret af *Rhizobium*-bakterier. Disse planter blev omhyggeligt plantet igen; denne gang i jord med kvælstof, så de kunne overleve og sætte frø. De muterede gener i planterne blev kaldt *snf-1* til *snf-6* (*snf* = spontan nodule formation), og de muterede planter og deres afkom blev karakteriseret.

Karakterisering af mutanter

Først blev mutanternes fænotype beskrevet. Med *Rhizobium*-bakterier i dyrkningsmediet dannede mutanterne helt normale rodknolde med *Rhizobium*-bakterier, som omdanner luftens kvælstof (N_2) til ammoniak (NH_3). De spontant dannede rodknolde blev undersøgt i detaljer og sammenlignet med normale rodknolde. Mikroskopistudier afslørede ingen forskelle, og ligesom for de normale rodknolde blev dannelsen af de spontane rodknolde hæmmet af kvælstof i dyrkningsmediet. Alt i alt viste de mange analyser, at de spontant dannede rodknolde lignede de normale, bortset fra den manglende tilstedeværelse af *Rhizobium*-bakterier.



Figur 5. Symbiosemutanter og normale planter

De to planter til venstre har en mutation i symbiosegenet *nfr5*. Ligesom flere andre mutanter, har de mistet evnen til at danne rodknolde, og når planterne dyrkes uden kvælstof, bliver de små og kvælstofsultne med lysegrønne blade og rødlig stængler. Til højre ses to normale (vildtype) planter, der danner rodknolde med kvælstoffikserende *Rhizobium*-bakterier og derfor gror fint i en næringsopløsning uden kvælstof.

Genetisk kortlægning af mutationer

Man kan ikke afgøre, hvilke ændringer i planternes DNA, der er årsag til afvigelserne fra vildtypen, på grundlag af mutanters fænotype. Det næste skridt på vejen mod identifikation af de muterede gener var derfor lokalisering af de beskrevne mutationer på planternes kromosomer.

Kortlægning af gener, som er involveret i symbiose, har været i fokus i en årrække både på Aarhus Universitet og i mange andre laboratorier verden over. For at bestemme den præcise position af bestemte funktionelle gener, har man også kortlagt mange hundrede DNA-markører i *Lotus japonicus*.

Genetiske markører (kendte forskelle i DNA-sekvensen) fungerer som en slags pejlemærker, når symbiose-gener og andre interessante gener skal placeres i forhold til hinanden. Jo tættere på hinanden et gen og en markør er placeret, jo oftere nedarves de sammen.

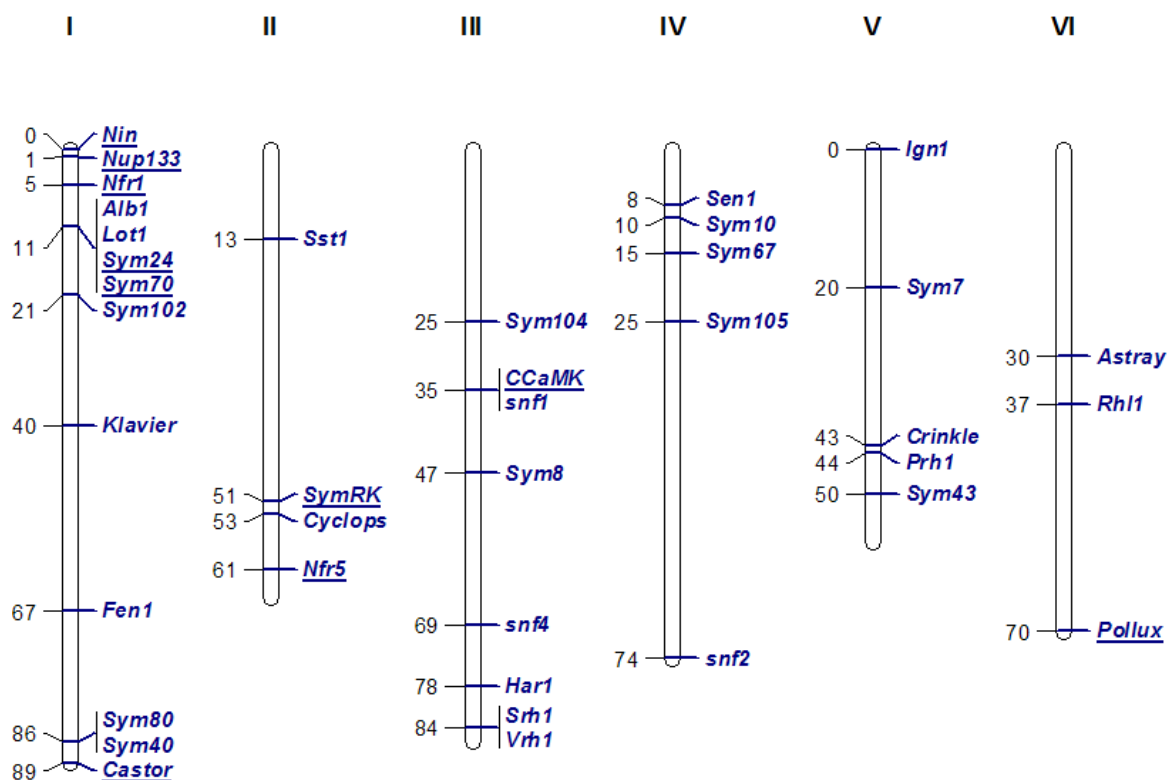
Afstanden mellem en genetisk markør og et gen kan beregnes ved hjælp af udspaltningsforhold, og måleenheden er **centimorgan (cM)**. Ved genetisk kortlægning beregnes den indbyrdes afstand mellem mange genetiske markører,

og kortlagte markører og gener placeres i rækkefølge på plantens kromosomer.

Meget store datamængder er blevet produceret i forbindelse med kortlægning af forskellige gener i *Lotus japonicus*. Imidlertid volder det problemer at overføre data fra det ene kortlægningsarbejde til det andet. Data skal "synkroniseres", før man kan kombinere dem.

Niels Sandal fra Aarhus Universitet har stået i spidsen for et internationalt samarbejdsprojekt, hvor kortlægningsdata fra 17 forskellige forskergrupper blev samlet til et overordnet genetisk kort over de seks kromosomer i *Lotus japonicus*. Da disse data blev publiceret Molecular Plant Microbe Interactions i januar 2006 var den genetiske position for 35 symbiose-mutationer blevet bestemt. Siden er endnu et symbiose-gen kommet på kortet, så antallet er nu oppe på 36. Se figur 6.

Mutationen i tre af de seks linier af *Lotus japonicus* med spontan dannelse af rodknolde (*snf1*, *snf2* og *snf4*) blev kortlagt i forhold til genetiske markører. Mutationerne *snf1*, *snf4* og *snf2* blev kortlagt til hhv. position 35,3 og 69,4 cM på kromosom III og ved 73,9 cM på kromosom IV.



Figur 6. Kort over kromosomerne

Genetisk kort over de 6 kromosomer i *Lotus japonicus*. De 36 forskellige symbiose-mutationer er placeret på kortet. Desuden er positionen af CCaMK-genet vist. I-VI angiver kromosomernes nummer og tallene til venstre for hvert kromosom angiver positionen i cM. De 36 mutationer forårsager forskellige fænotypiske ændringer. Fælles for mange af mutanterne er, at de har reduceret eller helt mangler evnen til at fiksere kvælstof, men årsagerne varierer. Nogle mutanter har mistet evnen til at danne rodknolde. Mutationer, hvor planten helt mangler tegn på rodknolde, er understregede. Andre mutanter laver flere rodknolde end vildtypen (*har1*, *klavier*, *astray*), dog uden at det giver øget kvælstoffiksering. De senest identificerede mutanter laver spontane rodknolde (*snf*-mutanterne). Der fikseres kun kvælstof i disse rodknolde, hvis de indeholder *Rhizobium*-bakterier.

Fra genetisk position til kloning af det muterede gen

At komme fra genetisk kortlægning af en mutation til identifikation og kloning af netop de ændringer i DNA sekvensen, som er årsag til en ændret fænotype - selve det muterede gen kan være en meget lang proces, der kræver et større detektivarbejde. Afstanden mellem en genetisk markør og et ukendt gen kan være kort målt i cM, men målt i basepar (bp) kan den samme afstand omfatte flere hundrede tusinde bp af kromosomets DNA-sekvens. Det er derfor en meget stor hjælp, hvis man har en ide om, hvilke gener, der evt. kunne være muteret.

Planter med spontan dannelse af rodknolde havde aldrig tidligere været undersøgt i detaljer, og forskerne havde ingen viden om, hvilken type protein, der kunne spille så central en rolle for symbiose. For at opklare mysteriet brugte forskerne forskellige strategier. Blandt dem var studier af kendte DNA-sekvenser, analyse af nedarvningsmønstre og sammenligning med andre symbiose-mutanter. Studierne var omfattende, og derfor udvalgte forskerne *snf1*-mutanten og fokuserede på at finde det ændrede gen. Se figur 7.

Kendskab til hele DNA-sekvensen i det område af kromosomet, som mutationen er kortlagt til, er en stor hjælp. Kazusa DNA Research Institute i Japan er i dag kommet langt med at sekventere hele genomet af *Lotus japonicus*, og det letter arbejdet med at identificere selve mutationen. Der kan dog være mange gener i det udpegede område, og det er derfor meget vanskeligt at udpege netop det gen, som er årsag til den anderledes fænotype i mutanten. Studier af DNA-sekvenserne gav derfor ikke brugbare resultater i eftersøgningen af *snf1* genet i første omgang.

Udspaltningsforholdet i afkomshold fra *snf1*- og *snf4*-mutanterne viste, at disse mutationer er **recessive** (vigende). *Snf2*-mutationen er derimod dominant. Heterozygotiske planter med *snf1*- eller *snf4*-mutationen kunne altså ikke danne rodknolde uden hjælp fra *Rhizobium*-bakterier. Ud fra disse data kan man udlede, at tilstedeværelse af vildtype-proteiner forhindrer spontan dannelse af rodknolde.

snf1-mutationens placering

Mutationen *snf1* blev kortlagt til den region på kromosom III, hvor et gen, som koder for et enzym ved navn CCaMK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase), tidligere var blevet lokaliseret. Se figur 8. CCaMK er en proteinkinase, der regulerer andre enzyms aktivitet ved at tilføre en fosfatgruppe. CCaMK er fundet i mange forskellige plantearter og medvirker bl.a. til signaloverførselsprocesser, der fører til genaktivering

CCaMK-genet er ændret hos en af de mutanter (*ccamk-2* mutanten), som ikke danner rodknolde, selvom der er *Rhizobium*-bakterier til stede. I tidligere undersøgelser er det påvist, at netop denne ændring er årsag til, at planten mister evnen til at danne rodknolde. Selvom *snf1*-mutanten har den modsatte fænotype (rodknolde selv uden *Rhizobium*) i forhold til disse mutanter, undersøgte Leïla Tirichine CCaMK-genet fra *snf1*-mutanten.



Figur 7. Rodknolde

Rhizobium-inducerede rodknolde fra vildtypen af *Lotus japonicus* (t.v.) og hvide spontane rodknolde fra *snf1* mutanten. Den røde farve hos vildtypen skyldes proteinet læghæmoglobin, som transporterer ilt i rodknolden. Leghæmoglobin er beslægtet med iltransporterende proteiner (hæmoglobin og myoglobin) i blod.

Sekventering af CCaMK-genet fra den muterede *snf1* plante afslørede to **punktmutationer** (ændring af en enkelt base). Se figur 8. I den del af den kodende region, som koder for kinasedomænet, er et cytosin (C) ændret til et thymin (T). Det medfører, at aminosyren threonin (T) i position 265 erstattes af isoleucin (I). Mutationen betegnes T265I. Den anden ændring ligger i et intron og påvirker derfor ikke enzymets aminosyresekvens.

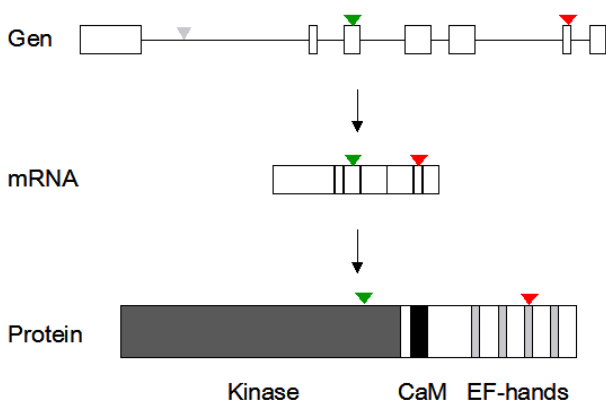
De fleste proteiner findes i flere forskellige udgaver, som produceres ud fra forskellige **alleler** (varianter af det samme gen). Derfor var der behov for konkrete beviser på, at en enkelt aminosyreændring kunne få *Lotus*-planter til at danne rodknolde spontant.

Bevisførelsen

Det endelige bevis på, at T265I mutationen i CCaMK-genet er den eneste ændring, der er nødvendig for, at *Lotus japonicus* kan danne rodknolde spontant, fik forskerne ved at indsætte et ekstra CCaMK-gen med T265I-mutationen i mutanter, hvor det oprindelige CCaMK-gen er ødelagt. I planter med mutationen *ccamk-2* er et **codon** (triplet som oversættes til en aminosyre) ændret fra GAA til TAA. Se figur 8. Det medfører, at der i stedet for aminosyren glutaminsyre i position 453 indsættes et stopcodon, så proteinet mangler den sidste del.

Planter, der er homozygotiske for *ccamk-2* mutationen kan ikke danne rodknolde, selvom der er *Rhizobium*-bakterier til stede. Indsættelse af et CCaMK-gen med T265I mutationen i *ccamk-2* planterne bevirkede, at de fik evnen til at danne rodknolde – både spontant og med hjælp fra *Rhizobium*-bakterier.

En enkelt punktmutation er altså tilstrækkeligt til, at dannelsen af rodknolde initieres, og at processen føres til ende helt uafhængigt af de receptorer, der normalt opfanger



Figur 8. CCaMK-genet med mutationer

CCaMK-genet i *Lotus japonicus* består af 7 exons (vist med kasser), som tilsammen danner et mRNA med en kodende region på 1554 baser. mRNA'et oversættes (translateres) til proteinet CCaMK, som består af 518 aminosyrer. CCaMK er en proteinkinase – et enzym, som regulerer andre enzyms aktivitet ved at tilføje en fosfatgruppe. CCaMK's egen aktivitet reguleres både af et protein ved navn calmodulin og af Ca^{2+} . Calmodulin og Ca^{2+} bindes til bestemte regioner i CCaMK, hhv. CaM (vist med sort) og de såkaldte EF-hands (lysegrå). Det er CCaMK's kinase-domæne, der aktiverer andre enzymer ved at sætte fosfatgrupper på, men det er koncentrationen af Ca^{2+} og calmodulin, der regulerer processen.

▼ Punktmutation i det første intron i *snf1* mutanten. Denne baseændring er uden betydning, da introns skæres ud, når det primære transkript processeres til mRNA.

▼ *snf1* mutationen. Baseændring i position 794 i den kodende region i mutanten, så codon nummer 265 ændres fra TCA til TTA. Dermed indsættes isoleucin i stedet for threonin i proteinets aminosyresekvens (T265I).

▼ *ccamk-2* mutationen. Baseændring i position 1357, så codon nummer 453 ændres fra GAA, der koder for glutaminsyre, til TAA. TAA er et stopcodon, og derfor translateres mRNA i *ccamk-2* mutanten til et afkortet (trunkeret) protein med 452 aminosyrer.

kemiske signaler fra bakterierne. Det var overraskende, at et protein, som findes i mange forskellige plantearter, spiller så central en rolle for udvikling af rodknolde til kvælstoffixering – en proces, som kun forekommer i bælgplanter.

Beviserne for, at CCaMK-proteinet regulerer dannelsen af rodknolde, har ført forskningen i symbiose mellem bælgplanter og kvælstoffikserende *Rhizobium*-bakterier et stort skridt fremad. Resultaterne blev publiceret i Nature den 29. juni 2006. Der er dog stadig mange uopklarede mysterier. For eksempel giver *snf2*- og *snf4*-mutationerne samme fænotype som *snf1*-mutationen, selvom disse mutationer ligger helt andre steder i genomet. Der findes altså mere end ét centralt checkpoint for processen.

Fra grundforskning til forbedring af Afrikas fødevarerforsyning

Forskningen i symbiose på Aarhus Universitet er rendyrket grundforskning. Afgrødeplanter som ærter og kløver

er sjældne gæster i laboratorier og drivhuse, og det er modelplanten *Lotus Japonicus*, som er i fokus. At forskerne ikke udfører anvendt forskning betyder dog ikke, at de ikke tænker over, hvad deres opdagelser kan bruges til.

Mangel på kvælstof er en alvorlig hindring for tilstrækkelig fødevarerproduktion i mange fattige lande. Især Afrika er hårdt ramt, da elendig infrastruktur gør det vanskeligt og meget dyrt at transportere kunstgødning. Der forsvinder kvælstof fra markernes næringsstofkredsløb, hver gang der høstes afgrøder. Desuden tager denitrifikation (omdannelse af nitrat til N_2) og ammoniakfordampning fra husdyrgødning sin del.

For at bringe plantetilgængeligt kvælstof tilbage til markerne dyrkes en del bælgplanter, men der er både dyrkningsmæssige, ernæringsmæssige og kulturelle begrænsninger for, hvor stor andel bælgplanter har i sædskiftet. Planteforædlere har derfor i mange år drømt om at udvikle andre kvælstoffikserende basisafgrøder. Især udvikling af ris, hvede og majs med evne til at indgå i symbiose med kvælstoffikserende *Rhizobium*-bakterier ville revolutionere verdens fødevarerproduktion.

Under danske forhold er det ikke infrastruktur, men skrappe miljøregler, der begrænser brugen af kvælstof i jordbrugsproduktionen. Det sker primært af hensyn til vandmiljøet, og uanset om det plantetilgængelige kvælstof produceres på en gødningsfabrik eller i rodknolde, vil der fortsat være restriktioner på anvendelsen. Alligevel vil det være en stor fordel for både miljø og landmænd, hvis flere afgrødearter kunne gå i symbiose med *Rhizobium*-bakterier. Ved at lade bakterier omdanne N_2 fra luften frem for at gøre det på en gødningsfabrik kan der spares energi, både til fremstilling af gødningen og til transport.

Selvom man i en årrække har kunnet overføre gener mellem forskellige arter ved hjælp af genteknologi, vil det være en meget stor udfordring at overføre et så kompliceret system som evnen til at indgå i symbiose til en anden planteart. Identifikation af gener, der er involveret i processen, er et skridt på vejen. Opdagelsen af, at nogle af de gener, der er centrale for etablering af symbiose findes i mange andre organismer end bælgplanter, giver håb om, at det vil være lidt lettere at overføre evnen til symbiose med *Rhizobium* til vigtige afgrødearter.

Publikationer

Resultaterne af symbioserforskningen på Aarhus Universitet er blevet offentliggjort i en lang række videnskabelige publikationer. De seneste resultater om CCaMK proteinets rolle i symbiose med *Rhizobium* blev publiceret i Nature 2006 vol. 441, side 1153-1156. Det genetiske kortlægningsarbejde blev publiceret i Molecular Plant Microbe Interactions 2006 vol. 19, side 80-91.

Finansiering

Forskergruppen på Aarhus Universitet fået støtte til sin forskning i symbiose fra mange kilder i årenes løb. Projektet, som beskrives i denne artikel, har været støttet af en EU bevilling (RTN HPRN-CT-2000-00086 Lotus) samt af indlejrede bioteknologi midler.