

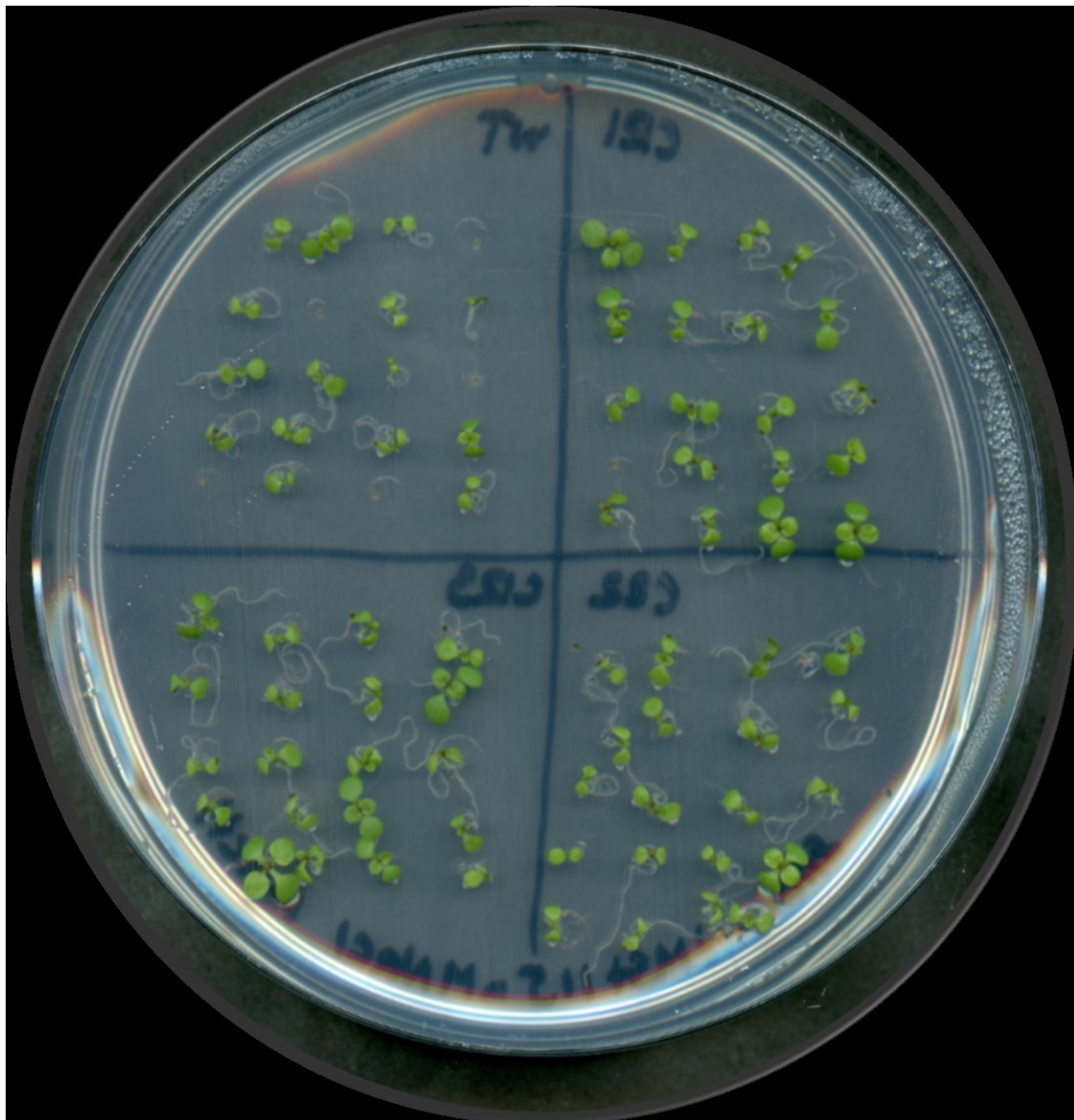
Projekt forskerspirer 2020

Udvikling af salttolerante afgrøder

Spirer: Lenore Schøth Bechmann, Frederikssund Gymnasium

Kategori: NAT

Forskerkontakt(er): Henrik Brinch Petersen professor på Aarhus Universitet og Michael Brobjerg Palmgren, professor på Københavns Universitet



Indhold

Projekt forskerspirer 2020.....	1
Indledning	1
Problemformulering, formål og relevans	1
Afgrænsning.....	1
Teori.....	2
Ion-homøostase og saltoptag i planter	2
H ⁺ -ATPaser og SOS-systemet	3
Metode	3
CRISPR/Cas-9	3
Bestemmelse af saltkoncentration, der skal modstås når der vandes med havvand	4
Udførsel og fremgangsmåde	4
Bestemmelse af saltkoncentration i jord vandet med havvand	4
Dyrkning af planterne	5
Udførsel af forsøget	6
Budget og tidsramme	6
Budget	6
Tidsramme	7
Konklusion og perspektivering	7
Tak	7
Litteratur.....	8
Bilag 1: Relevante figurer til SOS-systemet	10
Bilag 2: Fremgangsmåde til fældningstitreringsforsøget samt analyse	11
Bilag 3: Materialer og fremgangsmåde til opløsningerne til petriskålene	12

Indledning

Klimaforandringerne på jorden er ikke et nyt fænomen. Vi kender til dem, og mange frygter dem. De udvikler sig, og med sig har de blandt andet stigende vandstandene i verdenshavene [1]. For mit vedkommende forbliver de mest fremtrædende spørgsmål: Hvordan kan vi udnytte de stigende vandstande? Hvorfor har nogle mennesker ikke adgang til rent drikkevand, når vi hælder rent vand på markerne hvert år?

Jeg vil med dette projekt undersøge en mulighed for at udnytte de stigende vandstande, der vil indfinde sig, til noget positivt. Jeg vil undersøge, om det er muligt at udvikle en afgrøde, der er tolerant over for den saltkoncentration, der findes i havvand, og dermed gøre det muligt at benytte det overskydende vand i havene til vanding i landbruget, så det bliver muligt at forhindre de ødelæggelser, som de stigende vandstande ellers bringer med sig.

Problemformulering, formål og relevans

Jeg har her opstillet en problemstilling, redegjort for formålet, samt den relevans jeg mener forskningen har.

Jeg vil i denne synopsis undersøge følgende problemstilling:

*Hvordan kan man udvikle salttolerance i planter, så de kan gro ved vanding med havvand?
Hvordan kan dette bruges i landbruget?*

Formålet med mit forsøg er at undersøge væksten af frø af arten *Arabidopsis thaliana*¹, omtalt som *Arabidopsis* gennem synopsis, hvor dele af autoinhiberingsdomænet i C-terminalen klippes af. Væksten skal undersøges på baggrund af, om de kan gro og udføre deres livscyklus i saltkoncentrationer, der svarer til den, der findes, hvis planterne skulle vandes med havvand.

Relevansen af mit projekt består i, at udviklingen af en salttolerant plante ville betyde, at man vil kunne udnytte de stigende vandstande, vi får grundet klimaforandringer, i landbruget. Mit projekt fremlægger en metode, hvorpå man kan øge salttolerancen i den simple plante *Arabidopsis*, men metoden vil med tiden kunne overføres til planter med større og mere komplekse genomer, svarende til dem, der dyrkes i landbruget.

Afgrænsning

Jeg vil her redegøre for de relevante afgrænsninger jeg har valgt til mit projekt, og argumentere for, hvordan disse vil gøre sig gældende i praksis.

Jeg vil i mit forsøg arbejde med H⁺-ATPaser i *Arabidopsis*. *Arabidopsis* fungerer godt som model til genmodificering i planter, da den har en kort livscyklus samt et lille og simpelt genom [2].

Projektet fokuserer på, at saltoptaget skal reguleres på baggrund af vanding med havvand. Derfor fokuserer projektet på at udvikle en plante, der kan modstå saltstress svarende til den, der findes i jorden, når der vandes med havvand. Jeg vil undersøge jordprøver, fra områder vandet med havvand og finde saltindholdet i disse. Mit indledende forsøg omkring saltindholdet i jorden efter vanding med saltvand vil vise, hvilken koncentration af NaCl planterne skal kunne modstå.

¹ Alm. gåsemad

Det salt, der findes mest af i havet, er NaCl [3]. Det er derfor dette salt der vil blive udgangspunktet for forsøget. Havvand har en salinitet på:

ca. 35 promille NaCl [4]: $= \frac{35‰}{1000} = 0,035 = 3,5\%$, i mL er dette: $1000\text{ml} * 0,035 = 35\text{ml}$

Densiteten af vand er ca. 1g/cm^3 , derfor er $35\text{ml} * 1\text{g/cm}^3 = 35\text{g}$. I havvand er der ca. 35g NaCl pr. liter. Koncentration bliver:

$$n = \frac{m}{M} = \frac{35\text{g}}{22,990\left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) + 35,45\left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} = 0,60\text{mol}.$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{0,60\text{mol}}{1\text{L}} = 0,60\text{M}.$$

$$0,60\text{M} * 1000 = 600\text{mM}^2$$

Jeg opstiller i synopsen et forsøg, der skal vise, hvor meget salt planten reelt skal kunne modstå, da noget salt udvaskes, og jorden også i forvejen indeholder NaCl.

Saltoptaget skal reguleres på baggrund af ion homøostase, så det bliver muligt at forhindre apoptose³ i forbindelse med saltstress i saltholdige miljøer, for planter, der ikke er tolerante over for salt [6].

Bæredygtighed bruger jeg som defineret i Den Danske Ordbog [7]. Jeg mener, at det med mit projekt bliver muligt at vende klimaforandringernes udfordringer til noget positivt. Ordet bruges ikke direkte i synopsen, men ligger til baggrund for motivationen til projektet.

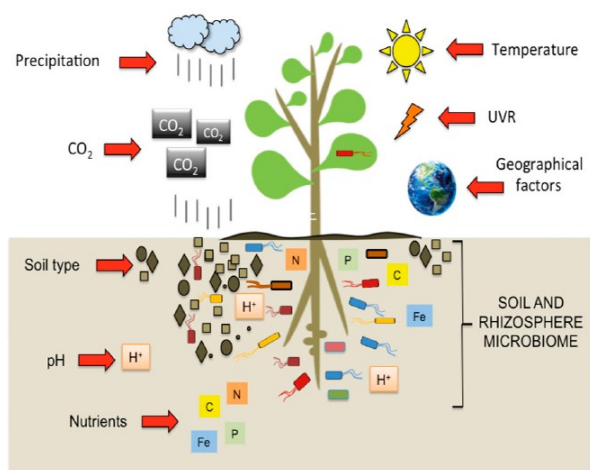
Teori

I dette afsnit vil jeg redegøre for den relevante teori, der skal give en forståelse for baggrunden af forskningsprojektet.

Ion-homøostase og saltoptag i planter

Her svarer jeg på to væsentlige spørgsmål: Hvorfor er ion homøostase vigtig for planten, og hvilken betydning har homøostase for plantens salttolerance?

Planter er afhængige af en række abiotiske faktorer for at overleve bedst muligt. Herunder er næringsindholdet i jorden vigtigt for planterne (figur 1) [8]. Udviklingen af de salttolerante planter kommer til at foregå på baggrund af regulering af ion homøostase. Det væsentlige er, hvordan vanding med havvand har indflydelse på dyrkningsjorden og derved plantens vækst.



Figur 1 Abiotiske faktorer, der regulerer jorden og det rhizosfæriske mikrobiom. [14]

² Egne udregninger. Molarmasse for Na⁺ og Cl⁻ fra [5]

³ Programmeret celledød

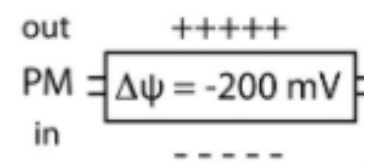
Celler kan begå apoptose, og dø. Dette sker, hvis cellen ikke længere kan opretholde homøostase. Celler, der ikke har udviklet tolerance over for salt, dør, hvis de bliver sat under et saltstress de ikke er udviklede til at kunne tolerere.⁴

Hvis det er muligt at fjerne de indstrømmede Na^+ ioner, eller hvis indstrømningen kan balanceres, så kan man forhindre en plantecelle i at begå apoptose i forbindelse med saltstress, og dermed udvikle salttolerance. Hvordan plantecellen kommer af med Na^+ -ioner i bedst muligt omfang, vil jeg redegøre for i næste afsnit.

H⁺-ATPaser og SOS-systemet

Jeg redegør her for samspillet mellem SOS1 og H⁺-ATPaser i *Arabidopsis*, samt hvordan ændringer af H⁺-ATPasen kan føre til salttolerance.

Da planter er stationære, er deres vækst i høj grad afhængig af deres evne til at tiltrække mineraler og vand fra deres umiddelbare miljø [9]. Membranpotentialer i cellerne er vigtigt for tiltrækningen af ioner, pga. den elektriske forskel mellem det indre og det ydre af cellen (se figur 2 for membranpotentialer). Plantecellerne i rødderne i *Arabidopsis* har et membranpotentialer på omkring 200 mV [10]⁵. Membranpotentialer opretholdes i *Arabidopsis* af 11 transmembrane protonpumper (H⁺-ATPaser) kaldet AHA (Nummereret med tallene 1-11). Det er de to isoformer AHA 1 og AHA 2, der udtrykkes mest i cellerne, og står for 80% af ATPase aktiviteten i *Arabidopsis* frøplanter, og i vegetativt væv i voksne planter [9]. Jeg har valgt at arbejde med AHA2 [9].



Figur 2 På figuren fremgår det, hvordan membranpotentialer er fordelt. Cellens indre er negativt ladet, mens det ydre er positivt ladet. Forskellen i ladning svarer til -200mV [9]

H⁺-ATPaser arbejder sammen med SOS⁶ systemet. I dette projekt er det SOS1, der arbejdes med. SOS1 er et transmembranprotein, der er antiporter for Na^+ , hvilket betyder, at den transporterer Na^+ ud af cellen ved at trække en H^+ ind [11]. (Se bilag 2, hvor det fremgår). H⁺-ATPaser er de primære aktive transportere af protoner (H^+) ud og ind af cellen ved forbrug af ATP [12]. H⁺-ATPasen leverer protoner til SOS1. En H⁺-ATPase, der er aktiv hele tiden, beskytter mod NaCl, da denne leverer energi til SOS1. H⁺-ATPaserne har et autoinhiberings site [13] i C-terminalen, der nedsætter enzymaktiviteten. Dette betyder, at H⁺-ATPasen ikke er aktiv hele tiden. Det er formodet, at C-terminalen binder til et funktionelt domæne [14][12].

Hermed er den relevante teori opstillet. Der vil herunder forekomme en kort redegørelse for de vigtigste metoder, der bruges i forsøget. Der redegøres for de frø, der bruges. Derudover henvises der til relevant baggrundviden.

Metode

CRISPR/Cas-9

CRISPR/Cas9 er en genmodificeringsteknologi udviklet fra bakterien *Streptococcus pyogenes* [15]. Jeg vil ikke direkte arbejde med CRISPR i mit forsøgsdesign, men jeg vil benytte mig af nogle *Arabidopsis* frø, der er muteret vha. CRISPR/Cas9. I frøene er der lavet forskellige klip i

⁴ Se apoptoses forløb under saltstress i [6], side 276

⁵ Membranpotentialer i dyreceller er 60 mV [10]

⁶ SOS er en forkortelse for "Salt overly sensitive"

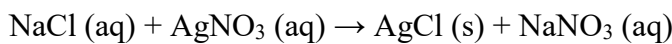
autoinhibitoren i C-terminalen i H⁺-ATPasen AHA2, hvilket betyder, at AHA2's transport af H⁺ ioner aldrig er hæmmet. Der er lavet tre forskellige klip og frøene er navngivet CR1, CR2, CR3 alt afhængigt klippets lokation. CR1 indeholder en deletion af 30 aminosyrer (aha2 Δ30), CR2 har en deletion på 44 aminosyrer (aha2Δ44) og sidst indeholder CR3 den største deletion på 57 aminosyrer (aha2Δ57).⁷

Bestemmelse af saltkoncentration, der skal modstås når der vandes med havvand

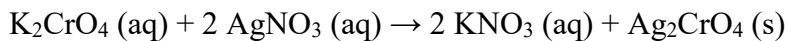
Som beskrevet i afgrænsningen har havvand en saltkoncentration på ca. 600 mM, under forudsætning af, at der er 35g salt pr liter vand. Jeg mener, at det er relevant at undersøge, hvor meget saltstress planten egentlig skal kunne modstå for at kunne udføre sin livscyklus under vanding med havvand. Dette vil jeg gøre med mit indledende forsøg.

Jeg vil undersøge dette ved brug af en fældningsreaktion, hvor jeg med AgNO₃ vil udfælde Cl⁻ ionerne og dermed bestemme indholdet af NaCl.

Pågældende fældningsreaktion (afstemt) vil se ud således:



Som indikator benyttes en opløsning af kaliumchromat (gult), der danner rødt bundfald af sølv(+1)chromat, når der ikke er flere Cl⁻ ioner i saltopløsningen. Den reaktion, der sker, foregår således:



Ved ækvivalenspunktet har opløsningen en orange farve.

Se bilag 2 for metode til analyse af fældningsreaktionen.

Udførsel og fremgangsmåde

De opstillede metoder og teorien vil nu, i samspil med andre overvejelser, bruges til at opstille mit forsøgsdesign.

Bestemmelse af saltkoncentration i jord vandet med havvand

Denne første del af forskningen bliver et forsøg udført som feltarbejde, da bestemmelsen af saltkoncentrationerne skal udføres, så der fås de mest nøjagtige resultater. Jeg forsøger at simulere virkeligheden.

Relevante jordprøver

For at bestemme, hvor meget salt der er i jorden, når den er vandet med havvand, skal der først laves nogle relevante jordprøver. Jeg vil leje forskellige dele à 1m² af en mark. Disse områder på marken skal være nogle, der ellers skulle være brugt til afgrøder i perioden fra vækstsæsonens begyndelse til høst det pågældende år. Områderne vil blive vandet som på normal vis, bare med havvand. Når høstsæsonen indtræffer, vil der blive taget jordprøver af områderne. Se [17] for hvordan jordprøverne udtages. I denne beskrivelse og i budgettet arbejdes der kun med ét eksempel, men ideelt ville der være tale om flere for at sikre kvantitative data.

⁷ Dette kan der læses mere om i [16]

Hvor meget, der skal vandes kommer til at afhænge af vejrforholdene, og jeg kan derfor ikke redegøre for en præcis mængde vand. I analysen vil jeg tage højde for, at mængden hvormed der skal vandes kan og vil variere fra år til år.

Ekstraktion af salt fra jorden

Der udtages nu endnu mindre mængder jord fra jordprøverne (ca. 0,5g). Der tilsættes 10mL ionbyttet vand og det blandes så saltet opløses. I en 25 mL kolbe filtreres blandingen gennem et filterpapir. Spatel, bæreglas og filterpapiret med jord skylles med milliQ vand. Når alt vandet er dryppet ned i målekolben, fjernes tragten og der fortyndes op til 25 mL med milliQ vand.

Nu laves fældningstitreringen. Se bilag 2 for fremgangsmåde.

Gentag med samme mængder så mange gange som muligt for at få kvantitative resultater.

Analyser data og find gennemsnittet for saltindholdet i jorden. Se bilag 2.

Når jordprøverne er lavet og analyserede, bruges den saltkoncentration, der blev bestemt, i forsøget, hvor planteren skal dyrkes. Fremgangsmåden til dette forsøg er beskrevet herunder.

Dyrkning af planterne

Pladerne, hvorpå frøene skal gro

Til forsøget, der skal vise, om de muterede frø har øget salttolerancen, skal pladerne hvorpå frøene skal gro først laves. Pladerne er petriskåle med næringsmedier, der indeholder det essentielle næringsindhold for planter. Der skal først laves 1 L half MS (Murashige and Skoog [18]) Se bilag 3 for, hvordan man laver opløsningen samt opdeler den i fem forskellige flasker, en kontrol og resten med fire forskellige koncentrationer af NaCl. Der laves fire forskellige saltopløsninger, for at undersøge salttolerancens fulde potentiale.

Efter opløsningerne til pladerne er lavet skal de steriliseres vha. en autoklave.

Derefter skal opløsningen hældes på petriskåle. Dette gøres i et sterilt kabinet for at undgå kontaminering af prøverne. Der hældes ca. 30 mL af opløsningerne i hver skål.

De skal hærde inden man kan gå videre med forsøget.

Såning af frø

Frøene skal sås på de hærdede plader. Frøene skal først desinficeres for at undgå kontaminering af prøverne. Dette skal foregå således:

1. Marker 4 eppendorfrør med hhv. WT, CR1, CR2, CR3
2. Hæld ca. 100 frø fra hver af de genmodificerede frø i hver deres eppendorfrør. Hæld ca. 200 vildtype frø i det sidste eppendorfrør. 4 rør med frø i alt.
3. Vask med 70% ethanol i 15 min. Fjern ethanol
4. Vask med 96% ethanol i 20 min. Fjern ethanol.

Frøene kan nu flyttes til det sterile kabinet, hvor de skal vaskes med vand. Vandet fjernes igen umiddelbart efter. Der hældes nu en opløsning af vand og agar på frøene, så de separeres og det bliver nemmere at flytte dem fra eppendorfrør til petriskål vha. pipette.

Petriskålene opdeles som på tegningen til højre og frøene placeres i det markerede område der er navngivet med samme navn som eppendorfrøene. Der placeres ca. 20 af de pågældende frø i hvert markeret område.

Når frøene er placeret i hver af de fem petriskåle, lukkes de med malertape og overføres til et køleskab, hvor der er ca. 4°C og mørkt. Dette skal imitere vinterperioden og sørge for, at alle frøene spirer samtidigt.

De overføres efter to dage i køleskabet til et vækstkammer med ideelle forhold for planter. Her er de i 12 dage, hvor der følges op og tages billeder af dem efter 5, 7, 10 og 12 dage. Dette gøres for at sammenholde til sidst, og se, om der har været forskel på vækstraten af de forskellige frø på bestemte tidspunkter i vækstperioden.

Analyse af petriskålene

Efter 12 dage fjernes petriskålene fra vækstkammeret og resultaterne analyseres. Der kigges først på, om der er uønsket bakterie- eller svampevækst, der indikerer ikke-sterilt arbejde.

Hvis prøverne ikke er kontaminerede, sammenholdes resultaterne af væksten af de forskellige frø i medierne. Der kigges efter, hvilke frø, der har groet bedst i de forskellige koncentrationer, og der sammenholdes med kontrollen. Der kigges på, hvor godt de genmodificerede frø har klaret sig i kontrollen uden salt, samt hvordan de har klaret sig i forhold til vildtype frøene i saltmedierne.

Dermed er forsøget afsluttet.

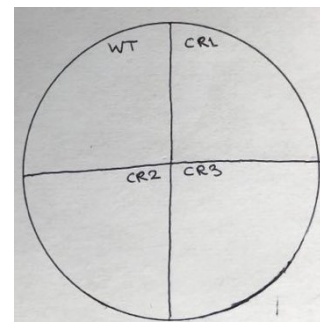
Udførsel af forsøget

Det beskrevne forsøg kan udføres på Institut for Plante- og Miljøvidenskab på KU Life, hvor de har alle nødvendige materialer. Der forekommer et estimat for udgifterne på trods af dette. Materialer, der ikke indgår i budgettet, vil blive stillet til rådighed af Institut for Plante- og Miljøvidenskab, og der er derfor ingen udgifter forbundet med disse.

Budget og tidsramme

Budget

Materialer	Pris (DKK)
CRISPR/cas9 modificerede <i>arabidopsis</i>-frø <i>Købes gennem KU</i>	10
Vildtype <i>arabidopsis</i> frø <i>Købes gennem KU</i>	10
Materialer til half MS-plader MS-salt u. Fe, Fe opløsning, sukrose, MES, agar <i>Købes gennem KU</i>	500
Leje af områderne på marker <i>Gennem Naturstyrelsen eller privat</i>	Max 17845
Tank til havvand <i>Fra vvs-eksperter</i>	1635 pr. styk
I alt	20000



Figur 3 Tegning (lavet i hånden) over hvordan petriskålene skal opdeles.

Tidsramme

Procedure	Forventet tid
Blande opløsning til petriskålene samt autoklave	½ dag(e)
Hælde opløsning på pladerne	½ dag(e)
Klargørelse af frø og såning	1 dag(e)
Frø i køleskab	2 dag(e)
Frø i vækstkammer	12 dag(e)
Analyse af prøverne	1 dag(e)
I alt	17 dag(e)

Konklusion og perspektivering

Jeg forventer at have fundet ud af, om de CRISPR/Cas9 muterede frø har udviklet øget salttolerance.

Uanset resultatet af projektet er der lagt op til yderligere forskning.

Hvis ikke der ses en effekt hos de CRISPR/Cas9 muterede frø vil det være oplagt at undersøge, hvorfor effekten udebliver. Videreudvikling af denne metode, f.eks. ved at indsætte en CaMV 35S promotor i H⁺-ATPasen og derved overudtrykke den [15], ville også være oplagt, da det har vist sig effektivt i tobaksplanten.

Hvis der ses en effekt af mutationen, vil det være oplagt at arbejde videre med denne metode i afgrøder, der bruges i landbruget, så vi kan udnytte de stigende vandstande. Det kan i sidste ende være med til at stoppe oversvømmelser af store landområder. Det kan sikre rent drikkevand til flere mennesker, og en ny, holdbar måde, hvorpå man kan udnytte havvand. Jeg mener altså, at det ville vise sig yderst relevant at benytte udbyttet af denne forskning i landbruget til udvikling af salttolerante afgrøder.

Tak

Tak til mine forskerkontakter Henrik Brinch Petersen og Michael Brobjerg Palmgren for vejledning gennem processen.

En stor tak til Anett, Master studerende og Maki, postdoc på Københavns Universitet, der hjalp mig med at udforme forsøgsdesignet.

Tak til min bioteknologilærer på Frederikssund Gymnasium Kira Ekberg for inspiration til forsøget omkring fældningsreaktion, samt vejledning.

Tak til KU og koordinatore fra projekt forskerspirer for professionel vejledning.

Litteratur

- [1]: **Cazenave, A., and G. Le Cozannet** (2013), Sea level rise and its coastal impacts. *Earth's Future*, 2, 15–34, doi:10.1002/2013EF000188.
- [2]: **Howard M. Goodman, Joseph R. Ecker, Caroline Dean**. The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 92, pp. 10831-10835, November 1995
- [3]: Projekter.au.dk: Hovedet i Havet. Findes gennem linket: <https://projekter.au.dk/havet/forloeb/forloebsoversigt/den-sidste-fisk/oekologisk-sammenhaeng/fysiske-og-kemiske-forhold/>
- [4]: **Den Store Danske**. Saltvand. 2016. Findes gennem linket: <https://denstoredanske.lex.dk/saltvand>
- [5]: **P-table**: Det Periodiske System. Findes gennem linket: <https://www.ptable.com/?lang=da>
- [6]: **Rajesh Kumar Jha, Jaykumar Patel, Avinash Mishra, Bhavanath Jha**. Introgression of Halophytic Salt Stress-responsive Genes for Developing Stress Tolerance in Crop Plants. © CAB international 2019. *Halophytes and Climate Change: Adaptive Mechanisms and Potential Uses* (eds. M Hasanuzzaman, S. Shabala and M. Fujita)
- [7]: Den Danske Ordbog: Bæredygtighed. Findes gennem linket: <https://ordnet.dk/ddo/ordbog?aselect=b%C3%A6redygtighed&query=b%C3%A6redygtig>
- [8]: **Gustavo Santoyo, Claudia Hernández-Pacheco, Julie Hernández-Salmerón, and Rocio Hernández-León**. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Volume 15, Issue 1, e03R01.
- [9]: **Miyoshi Haruta, Michael R. Sussman**. The Effect of a Genetically Reduced Plasma Membrane Protonmotive Force on Vegetative Growth of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, March 2012, Vol. 158, pp. 1158–1171.
- [10]: **Jesper T. Pedersen, Michael Palmgren**. Why do plants lack sodium pumps and would they benefit from having one? *Functional Plant Biology*, 2017
- [11]: **Yafei Fan, Shumin Wan, Yingshou Jiang, youquan Xia, Xiaohui Chen, Mengze Gao, Yuxin Cao, Yuehua Luo, Yang Zhou, Xingyu Jiang**. Over-expression of a plasma membrane H⁺-ATPase SpAHA1 conferred salt tolerance to transgenic *Arabidopsis*. *Protoplasma* (2018)
- [12]: **Michael G. Palmgren, Marianne Sommarin, Ramon Serrano, Christer Larsson**. Identification of an Autoinhibitory Domain in the C-terminal Region of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase*. Vol. 266, No. 30, Issue of October 25, pp. 20470-20475, 1991.
- [13]: **Miles A. Pufall, Barbara J. Graves**. Autoinhibitory Domains: Modular Effectors of Cellular Regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2002. 18:421–62
- [14]: **Frédéric Gévaudant, Geoffrey Duby, Erik von Stedingk, Rongmin Zhao, Pierre Morsomme, and Marc Boutry**. Expression of a Constitutively Activated Plasma Membrane H⁺-

ATPase Alters Plant Development and Increases Salt Tolerance¹[C][OA]. *Plant Physiology*, August 2007.

[15]: **Biotech Academy: Marcus Deichmann, Rasmus Otkjær Bak, Uffe Hasbro Mortensen.** CRISPR/Cas9 - Den Genteknologiske Revolution. 2018. Findes gennem linket:
<https://www.biotechacademy.dk/undervisning/gymnasiale-projekter/crispr-cas9/>

[16]: **Emil Waceni Lauritzen.** Structure-function relationship in the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 related to regulation of protein activity. May 2019, *Department of Plant and Environmental Science. Master thesis in Biology-Biotechnology.*

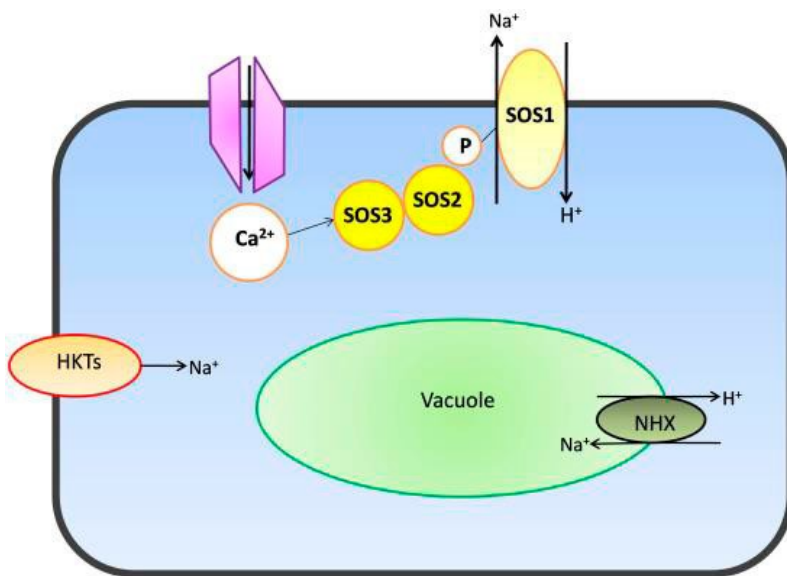
[17]: Seges landbrugsinfo. Findes gennem linker:
https://www.landbrugsinfo.dk/public/5/e/9/vejledning_i_udtagning_af_jordproever_pa

[18]: **Toshio Murashige, Folke Skoog.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Department of Botany, University of Wisconsin, Madison 6, Wisconsin.* Received for publication April 1, 1962.

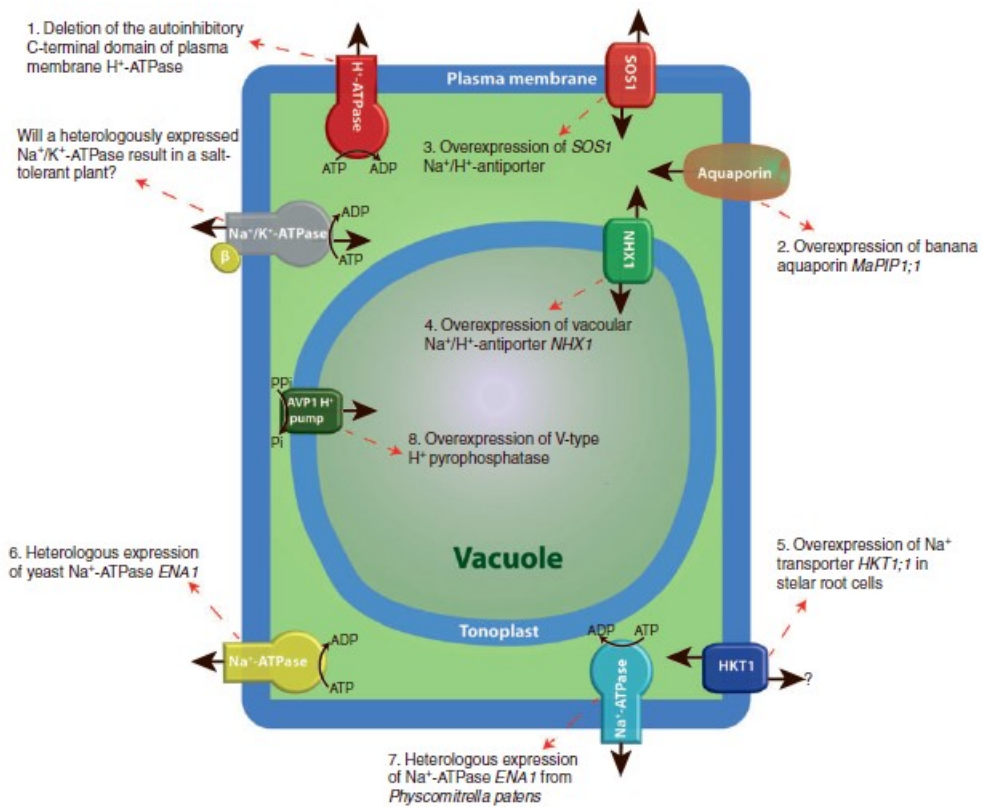
[19]: **Tarun Bhatt, Aditi Sharma, Sanjeev Puri, Anu Priya Minhas.** Salt Tolerance Mechanisms and Approaches: Future Scope of Halotolerant Genes and Rice Landraces. *Department of Biotechnology, University Institute of Engineering and Technology, Sector-25, Panjab University, Chandigarh 160014, India.* Rice Science, 2020.

[20]: **Elke Barbez, Kai Dünser, Angelika Gaidora, Thomas Lendl, Wolfgang Busch (2017)** 'Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24), pp. E4884–E4893. doi: 10.1073/pnas.1613499114.

Bilag 1: Relevante figurer til SOS-systemet



Fra [19]



Fra [10]

Bilag 2: Fremgangsmåde til fældningstitreringsforsøget samt analyse

Fremgangsmåde til fældningstitreringen

1,0mL saltopløsningen overføres til en brønd i en brøndplade

Tilsæt 1 dråbe 0,1M kaliumchromat-opløsning til samme brønd

Pipette fyldes med 1,0 mL $\text{AgNO}_3(\text{aq})$ (ingen luftbobler)

$\text{AgNO}_3(\text{aq})$ tilføres dråbevis til saltopløsningen i brønden.

Det tilsatte volumen af $\text{AgNO}_3(\text{aq})$ noteres, når opløsningen skifter farve fra gul til orange.

Titreringen gentages mindst 3 gange. Hvis forskellen i resultaterne er mere end 0,02mL gentages forsøget, så man ikke har denne forskel mere. Resultaterne skrives i et skema, der ser således ud:

Jordprøve #	Forsøg 1	Forsøg 2	Forsøg 3	Gennemsnit
<i>V(AgNO₃)</i>				

Analyse af resultaterne

Vil foregå med relevante mængdeberegninger, der vil vise, hvor meget Cl^- og derfor også, hvor meget Na^+ .

Bilag 3: Materialer og fremgangsmåde til opløsningerne til petriskålene 1L half MS:

MS-salt uden Fe	5,335 g
Fe opløsning	3,125 mL
1% sucrose	25 g
MES buffer	1,25 g

pH sættes derefter med NaOH til 5,7

(pH i cellen er under normale omstændigheder omkring 7, mens pH i apoplast er omkring 5-6 [20])

Derefter opdeles opløsningen i fem forskellige bæreglas á 200mL hver

I bæreglassene fyldes der 300 mL miliQ vand i, så der er 500 mL i hver.

Der tilføjes derefter de relevante koncentrationer af NaCl til hvert bæreglas undtagen kontrolglasset, der kun indeholder næringsmediet half MS. (Disse koncentrationer fastlægges når resultaterne efter hvor meget salt, der oplagres i jorden, er fundet, og dermed hvor meget saltstress de skal kunne klare)

Vægten af NaCl, der svarer til den rette koncentration findes således:

Først bestemmes stofmængden i de 500mL opløsning $n = c * V$

Derefter bestemmes vægten i gram: $m = M * n$, hvor $M = 22,990 \frac{g}{mol} + 35,45 \frac{g}{mol} = 58,44 \frac{g}{mol}$

(Molarmasse for Na og Cl fra [5])

Når NaCl er afvejet tilføres 8% plante agar, hvilket svarer til 4g/500mL