

Regeneration af glykoalkaloid-fri *Solanum tuberosum* og dennes modstandsdygtighed overfor *Streptomyces scabies*

Projekt Forskerspirer 2018 - NAT

Selina Mølgaard Sønderby
ODENSE KATEDRALSKOLE

Indhold

Indledning.....	2
Afgrænsning og problemformulering.....	3
Teori og metode	3
<i>Glykoalkaloider</i>	3
<i>Streptomyces scabies</i>	4
<i>Metode</i>	4
Projektets udførelse	5
<i>Regeneration</i>	5
<i>Udsættelse af den regulerede plante for bakterien Streptomyces scabies</i>	6
<i>Hairy roots og kontrolanalyse af glykoalkaloider</i>	6
<i>Tidsramme</i>	6
<i>Budget</i>	7
Konklusion og perspektivering	7
Kontakter og tak til	8
Litteratur.....	8

Indledning

En øget velstand i store dele af verden har resulteret i, at jordens ressourcer bruges op hurtigere end nogensinde før. Dette inkluderer også madressourcerne, og derfor vil det fremadrettet være væsentligt at se på, hvordan disse ressourcer kan udnyttes bedre. En afgrøde med stort potentiale for dette er kartoffelplanten *Solanum tuberosum*, som nationalt i Danmark og på verdensplan er en af de vigtigste afgrøder overhovedet og har været medvirkende til at højne sundhedstilstanden i specielt den vestlige verden. Dog er det ikke hele planten, som udnyttes, da den, som andre af natskyggefamiliens planter, indeholder stoffer af typen glykoalkaloider (i kartofflen primært α -solanin og α -chaconin). Glykoalkaloider er naturlige pesticider, der findes i alle plantens dele. I små koncentrationer bidrager de til kartofflens smag, men i større mængder kan de være skadelige for de individer, som indtager disse. Koncentrationen af glykoalkaloider er i de fleste af plantens dele for høje til, at dyr og mennesker kan indtage dem uden at blive forgiftet, og det er derfor kun knolden, der bruges som føde (Mariot et al., 2016; Nakayasu et al., 2018)

I de seneste år har man gennem forædling og genmanipulering forsøgt at reducere koncentrationen af glykoalkaloider i kartoffelplanten, og for nylig fandt et japansk forskningsteam frem til at regulere genet "St16DOX", som gør det muligt helt at stoppe biosyntesen af glykoalkaloider. Genet koder for katalyseringen af 16α -hydroxylering af (22S)-22,26-dihydroxycholesterol, som er et af de sidste trin i biosyntesen af glykoalkaloider i kartoffelplanten (Nakayasu et al., 2018).

Jeg vil i mit projekt undersøge muligheden for at regenerere en kartoffelplante, hvor St16DOX genet er muteret.. Dette gøres ved at inducere hairy roots med *A. Rhizogenes*, hvorefter planten regenereres. En nedsat produktion medfører nedsat evne til forsvar mod insektangreb og sygdomme. Jeg vil derfor også undersøge, hvorledes de manglende glykoalkaloider påvirker kartoffelplantens modstandsdygtighed overfor bakterien *Streptomyces scabies*, som forårsager kartoffelskurv.

Afgrænsning og problemformulering

Mit projekt tager udgangspunkt i (Nakayasu et al., 2018)'s konklusioner, og ud fra denne samt anden litteratur blev følgende problemformulering opstillet.

Er det muligt at regenerere Solanum tuberosum af en vævskultur fra transformerede hairy roots, og kan S. tuberosum overleve et angreb fra bakterien Streptomyces scabies, når der er slukket for biosyntesen af glykoalkaloider i planten?

Der ses altså på bakterien *S. scabies*, som blot er én af mange bakterier, som *S. tuberosum* angribes af i naturen. Dog var det denne bakterie, der blev valgt, fordi *S. scabies* er skyld i sygdommen kartoffelskurv, som er nem at vurdere visuelt, hvor meget skade bakterien har forvoldt kartofflen.

I problemformuleringen ligger der en hypotese indbygget, eftersom at anden del af problemformuleringen afhænger af, at planten kan regenereres fra de hairy roots, som er opstået efter inficering af *A. rhizogenes*. Regenerationen afhænger dog af, om St16DOX genet også koder for livsvigtige funktioner.

Teori og metode

Glykoalkaloider

Glykoalkaloider er sekundære metabolitter, der bl.a. findes i *S. tuberosum*. Glykoalkaloider er ved passende mængder giftige for bakterier, fungi, vira, insekter, dyr samt mennesker (Friedman, 2006). At glykoalkaloider er giftige for dyr og mennesker er netop grunden til, at det kun er kartoffelknolden, som bruges. I Fødevarestyrelsens retningslinjer fra april 2018 er der blevet sat en øvre grænse på 200mg glykoalkaloider pr. kg (Fødevarestyrelsen, 2016), og forsøg peger på, at dyr bliver syge ved lignende koncentrationer (Friedman, 2006). Indholdet af glykoalkaloider varierer meget mellem forskellige kartoffelplanter og forskellige dele af kartoffelplanten, men generelt gælder der, at indholdet af glykoalkaloider er lavest i kartoffelknoldene, hvorfor det altså er disse, som bruges som føde. Hvis andre dele af kartoffelplanten skal kunne bruges som føde, enten for os mennesker eller for landbrugsdyr, skal glykoalkaloid-indholdet altså enten sænkes til et niveau, som mennesker eller landbrugsdyr kan tolerere, eller der skal genereres en glykoalkaloid-fri kartoffelplante. At generere en glykoalkaloid-fri kartoffelplante vil være optimalt, idet der i kartoffelplanter selv med mindre

indhold af glykoalkaloider kan ske uhensigtsmæssige stigninger i indholdet grundet biotiske faktorer, såsom coloradobiller eller fungi infektion. Derudover kan der også ske stigninger i glykoalkaloidindholdet efter høstning ved for meget lys, ved skader på kartoflen eller ved forkert opbevaring (Friedman, 2006). Da glykoalkaloider i mindre mængder også giver kartoflen smag, vil en kartoffel helt fri for glykoalkaloider muligvis give en ikke-ønsket smag til kartoffelknolden, men i et sådan tilfælde, vil kartoffelknolden kunne bruges som føde til landbrugsdyr. Da de andre af kartoffelplantens dele indeholder for store mængder glykoalkaloider til, at mennesker eller for den sags skyld dyr kan spise dem, vides det dog ikke om der ligger et potentielt marked for salg af disse dele som en fødevare.

Streptomyces scabies

Bakterien *S. scabies* er en jordlevende bakterie og er én af flere bakterier, som forårsager sygdomme i forskellige planter herunder *S. tuberosum*, hvor sygdommen går under navnet kartoffelskurv. Kartoffelskurv dræber, modsat mange andre sygdomme, ikke kartoffelplanten, men er derimod skyld i læderinger på kartoffelknolden, som gør, at kvaliteten af kartoflen formindskes. Læderingerne kan både være overfladiske eller op til 10 mm dybe og de inficerede områder varierer i farve fra gyldenbrun til brun. Sygdommen forekommer ikke i kartoffelplantens dele over jorden, og knolde med veludviklet periderm er ikke modtagelig overfor sygdommen, dog kan *S. scabies* komme ind gennem eventuelle læsioner. Kartoffelskurv har optimale forhold når jorden er tør, temperaturer mellem 5 og 40°C og ved pH omkring 7 (Osborn, R, 1995; Hooker, W. J., 1981)

Metode

Projektet tager som sagt udgangspunkt i Nakayasu et al., 2018, hvor første del blot er en gengivelse af dennes metoder. Man kan i princippet også se på, om der kunne være andre metoder som måske ville virke bedre, men ved blot at bruge Nakayasu et al., 2018's metode vil det forkorte projektets varighed og der vil heller ikke skulle bruges penge på at udvikle en evt. ny metode. Metoden til at regenerere tager udgangspunkt i Gustafson et al., 2006, som bl.a. har testet hvilke kombinationer, som virker bedst til at regenerere *S. tuberosum* L. cv. Sheapody. I dette projekt vil kombinationen, som virkede bedst, blive brugt, for selvfølgelig at opnå den bedst mulige succesrate. Lykkedes det at regenerere den genmodificerede plante, vil jeg se på, om de genmodificerede planter kan overleve at blive udsat for bakterien *S. Scabies*. Dette skal selvfølgelig foregå under kontrollerede forhold,

således at der ikke er andre stressfaktorer, som kan påvirke planterne negativt. Udover at de regenererede planter vil indgå, vil der også blive inddraget kontrolplanter, hvor generne ikke er blevet modificerede. Ved at sammenligne resultaterne fra de regenererede planter med resultaterne fra kontrolplanterne kvalitativt, vil det være muligt at bestemme i hvor stor en grad de regenererede planter kan bekæmpe bakterien på egen hånd. Den kvalitative sammenligning vil være en klassificering på en skala fra 0 til 10, hvor 0 = ingen synlig infektion mens 10 = de planter som synligt er hårdest ramt. Denne klassificering vil blive givet med udgangspunkt i både regenererede og kontrolplanter, således at skalaen er den samme for alle planter.

Projektets udførelse

Projektet består overordnet af tre dele, hhv. reguleringen af St16DOX genen med CRISPR/Cas9 vektoren pMgP237-2A-GFP samt en kontrolanalyse af glykoalkaloid-indholdet i de regulerede planter. Denne del er blot en gengivelse af Nakayasu et al., 2018. Den anden del er en regeneration af *S. tuberosum* fra hairy roots, mens tredje del består i at se på, hvordan disse planter vil reagere, når de udsættes for bakterien *S. scabies*.

Regeneration

Hvis det lykkes at generere glykoalkaloid-fri hairy roots, vil næste skridt være en regeneration af *S. tuberosum* fra de *A. rhizogenes* inficerede hairy roots. Her vil de længere hairy roots (>20mm) blive skåret af og plantevæv udtaget. Dette væv placeres på et callus induction medium (CIM) indeholdende De Block's S3 medium ved pH 5,7 i kombination med 1,0 mg l⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) samt 1,0 mg l⁻¹ trans-zeatin. Kulturer inkuberes ved 22,0±1,0°C med en fotoperiode på 16/8 timer lys/mørk givet ved kold-hvid fluorescerende lamper. Efter 4 uger på callus induction medium overføres de til et shoot generation medium indeholdende det samme som CIM blot med 1,0 mg l⁻¹ trans-zeatin. Efter yderligere 4 uger overføres de regenererede skud med 3-4 veludviklede blade til et plant growth medium med MSMO, 3% sukrose, konsolideret med 0,22% phytagar, pH 5,7, hvor de forbliver i 2-3 måneder hvorefter de kan overføres til potter, hvor de små kartoffelplanter vil få optimale vækstbetingelser.

*Udsættelse af den regulerede plante for bakterien *Streptomyces scabies**

Efter 70-90 dage i pletter med optimale vækstbetingelser, vil der blive lavet små læsioner i kartoffelknoldene, således at *S. scabies* har mulighed for at inficere knoldene. Herefter vil *S. scabies* blive tilsat jorden, som har optimale betingelser for *S. scabies* som angivet i teori afsnittet. Udover at de regenererede planter udsættes for *S. scabies*, vil kontrolplanter ligeledes indgå i forsøget, så det er muligt kvalitativt at sammenligne de regenererede planter med kontrolplanter.

Hairy roots og kontrolanalyse af glykoalkaloider

Denne del vil blive lavet jf. metoderne fra (Nakayasu et al., 2018). Her vil der dog blive fokuseret på knockouts i target sites T1, T2, T7, T8 samt T9, da det var her, der blev fundet glykoalkaloid-fri linjer. Der vil stadig ses på de andre target sites (T3, T4, T5 samt T6), eftersom resultaterne i Nakayasu et al., 2018 blot kan være et tilfælde, at det kun var i target sites T1, T2, T7, T8 samt T9, at der blev genereret glykoalkaloid-fri hairy roots.

Tidsramme

Inficering af <i>S. tuberosum</i> med <i>A. rhizogenes</i> samt kontrolanalyse af glykoalkaloider	ca. 10 uger
Regeneration	4-5 måneder
Udsættelse af den regenererede plante for bakterien <i>S. scabies</i>	1-2 måneder
I alt	7-10 måneder

Budget

Udgift	Beløb
DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)	1.500 kr.
RNase (TOYOBO)	2.500 kr.
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)	900 kr.
Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit for Sequencing, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> x 25	4.400 kr.
MS medium	100 kr.
<i>A. rhizogenes</i>	2.400 kr.
Kemikalier til regeneration	500 kr.
<i>S. Scabies</i>	2.000 kr.
Plastikvarer samt uforudsete udgifter	2.000 kr.
I alt	16.300 kr.

Konklusion og perspektivering

Ud fra den tidligere nævnte artikel (Nakayasu et al., 2018) om glykoalkaloid-fri hairy roots samt teorien om glykoalkaloider som *S. tuberosum*s forsvarsmekanisme forventes det, at det er muligt at opdyrke glykoalkaloid-fri planter, som dog ikke kan overleve at blive angrebet af bakterien *S. scabies*. Dette vil ligge op til enten af forske videre i, om der kan genereres en kartoffelplante med en anden forsvarsmekanisme end glykoalkaloider. Derudover ligger der også en mulighed i, at den kan dyrkes i sterilt miljø, eksempelvis i det såkaldte ”vertical farming”, hvor alt fra næringsstoffer og lys til sygdomme kan kontrolleres.

Hvis det lykkes at opdyrke glykoalkaloid-fri planter og disse planter kan overleve at blive udsat for bakterien *S. scabies*, så vil det ligge op til en videre forskning, hvor der kan ses på, hvordan planterne tolererer andre stressfaktorer, som kartoffelplanter normalt udsættes for på markerne. Kan de glykoalkaloid-fri planter slet ikke opdyrkes, kan det evt. skyldes, at St16DOX genet koder for en eller flere livsvigtige funktioner, og det vil derfor være væsentligt at se på, om der er andre gener, som

også kan slukke fuldstændigt for glykoalkaloid produktionen, men som ikke koder for livsvigtige funktioner i planten.

Kontakter og tak til

Hans Jørgen Lyngs Jørgensen, lektor ved Institut for Plante- og Miljøvidenskab på Københavns Universitet - Min forskerkontakt, som har svaret på mine mange spørgsmål samt fundet relevante artikler til projektet.

Litteratur

Fødevarestyrelsen (2016). Vejledning i kontrol af kemiske forureninger i fødevarer.

Friedman, M. (2006). Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8655–8681.

Government of Canada. Glycoalkaloids in Foods.

Gustafson, V., Mallubhotla, S., MacDonnell, J., Sanyal-Bagchi, M., Chakravarty, B., Wang-Pruski, G., Rothwell, C., Audy, P., De Koeyer, D., Siahbazi, M., et al. (2006). Transformation and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Solanum tuberosum* L. cv. 'Shepody.' *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85, 361–366.

Mariot, R.F., de Oliveira, L.A., Voorhuijzen, M.M., Staats, M., Hutten, R.C.B., van Dijk, J.P., Kok, E.J., and Frazzon, J. (2016). Characterization and Transcriptional Profile of Genes Involved in Glycoalkaloid Biosynthesis in New Varieties of *Solanum tuberosum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 988–996.

Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H.J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., Sugimoto, Y., Umemoto, N., Saito, K., Muranaka, T., et al. (2018). Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiology and Biochemistry* 131, 70–77.

Osborn, R. (1995). Common Scab of Potatoes.

Hooker, W. J. (1981). Compendium of potato diseases (St. Paul, Minn: American Phytopathological Society).