

## Afrapportering af følgende KAF projekt:

### Titel

Udvikling af kartoffelplanter med øget sygdomsresistens ved brug af bioteknologi inspireret af traditionel Andes kartoffeldyrkning.

### Deltagere

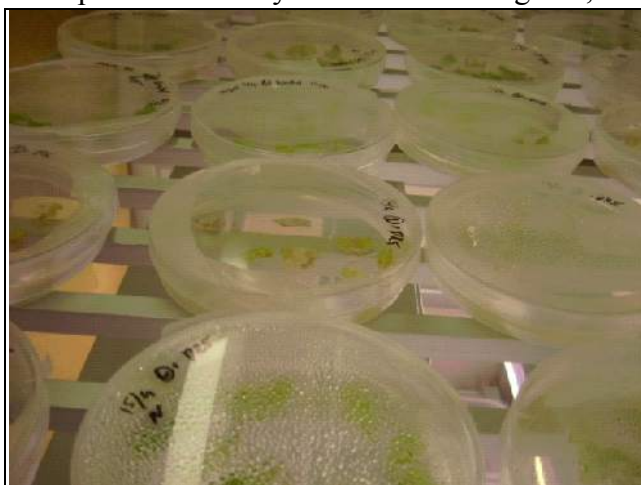
Lektor Barbara Halkier (projektansvarlig)  
Laborant Lis Byrsting Møller og laborant Eva Søegaard  
PhD studerende Fernando Geu-Flores  
Specialestuderende Morten Thrane Nielsen

### Samarbejdspartnere

Dr. Marc Ghislain, Centro International Potato, Lima, Peru

### Resumé

Projektets formål er fremstilling af kartoffelplanter med øget sygdomsresistens ved metabolisk engineering af biosyntesevejen for naturstoffet benzylglucosinolat ind i kartoffelplanten. Projektet forløber særdeles godt og spændende resultater er opnået, idet det er lykkedes at få den beslægtede tobaksplante til at producere benzylglucosinolat ved transient, dvs kortvarigt, at udtrykke 5 biosyntesegener i syntesevejen af benzylglucosinolat. Dette resultat har ført til at vi er begyndt at udvikle transgene tobaksplanter linier som permanent udtrykker de samme 5 gener, altså ikke kun transient. Vi er startet med at introducere de 'bageste' 3 af de 5 gener. Dette kræver at man gennem vævskulturarbejde udfører Agrobacterium-medieret transformation af bladskiver fra tobaksplanten. Efterfølgende har vi ved tilsætning af balancerede doser af plantehormoner til induktion af henholdsvis rødder og blade fået regenereret hele tobaksplanter. Disse planter er blevet undersøgt for om det er lykkedes at introducere biosyntesegenerne i tobaksplanten ved PCR teknologi. Derved analyserer vi for hvilke af de regenererede planter, som er transgene, dvs. har fået de nye biosyntesegener indsat i genomet.



Figur. Selektion af transformerede tobaksplanter

Fodring af substrater for biosynteseenzymene til blade fra transgene tobaksplante viste, at enzymerne var aktive og udførte de reaktioner som vi forventede af dem. Dette betød i praksis at vi ved tilsætning af substrater for de forskellige enzymer kunne få planten til at producere benzylglucosinolat. Ved hjælp af DNA teknologi har vi efterfølgende udvalgt en transgen plant, hvor generne kun er sat ind én gang i genomet, da dette genetisk set er nemmere at arbejde med i det videre forløb, hvor de resterende to biosyntesegener vil blive transformeret ind i den allerede én gang transformerede tobaksplante.

Sideløbende med at erfaringer fra ovennævnte tobaksarbejde blev opnået, er de samme gener sat ind i kartoffelplanten, og de samme lovende resultater er opnået.

### **Vurdering af resultater i forhold til opstillede mål.**

De opnåede resultater passer meget fint med de opstillede mål, således at vi er godt på vej mod

Ved introduktion af glucosinolatsyntesen i kartofflens blade og stængler (men ikke i knoldene), forventes det at de flygtige nedbrydningsprodukter fra glucosinolatet vil udvise den samme hæmmende effekt over for kartoffelskimmelsvampen som den peruvianske mashuaplante, og derved nedsætte behovet for sprøjtning. Det langsigtede formål er at finde alternative metoder til at kontrollere kartoffelpatogener for derved at reducere pesticidforbruget og fremme bæredygtigt landbrug.

I det kommende år vil det andet og sidste ekspressionskonstrukt transformeres ind i tobaksplanter, med henblik på at lave stabile transgene tobaksplanter, der syntetiserer benzylglucosinolat.

### **Resume**

Projektet er et ambitiøst bioteknologisk projekt, som tager sit udgangspunkt i traditionel Andes kartoffeldyrkning, hvor udbyttet sikres ved dyrkning af kartoffelplanten sammen med den benzylglucosinolatproducerende mashua-plante, som afgiver flygtige benzylglucosinolat-nedbrydningsprodukter, som hæmmer væksten af flere af kartofflens sygdomsfremkaldende patogener.

### **Baggrund for projektet**

På verdensplan er kartofflen den fjerde mest vigtige afgrøde og den repræsenterer omtrent halvdelen af verdens årlige produktion af rodfrugter, hvilket gør den til den største non-cereale afgrøde. En signifikant stigning i verdens kartoffelproduktion kunne opnås hvis bredspektrede forbedringer kunne tilvejebringes som var effektive mod de primære skadevoldere, så som f.eks. kartoffelskimmel. Verdens kartoffelproduktion er afhængig af stort forbrug af kemiske pesticider for at sikre stabile udbytter.

Sædskifte og co-kultiveringssystemer er en integreret del af traditionel, landbrugspraksis i verden. Disse er opstået som en måde at oppebære stabile udbytter baseret på empiriske observationer samlet gennem århundreder. Det centrale Andes har en rig tradition for udvikling af landbrugssystemer tilpasset de forskellige miljøer. En sådant co-kultiveringssystem i højlandet (2500-3000 m over havet) er det med kartoffel og *Tropaeolum tuberosum*. Denne plante indeholder en signifikant mængde af naturstofferne glucosinolater, hvilket synes at spille en rolle for plantens beskyttelse af kartoffelplanterne. Analyse af mashua-planten har vist at nedbrydningsprodukter fra glucosinolater har en hæmmende effekt på kartoffelpatogener som f.eks. kartoffelskimmel.

### **Målsætning**

Formålet med projektet er at udvikle en bioteknologisk metode til fremstilling af sygdomsresistente kartoffelplanter baseret på den traditionelle kartoffeldyrkning i Andesbjergene, hvor den glucosinolatproducerende mashua-plante dyrkes sammen med kartofflen på grund af sin beskyttende funktion mod kartoffelplantens patogener.

Ved introduktion af glucosinolatbiosyntesevejen i kartofflens blade og stængler (men ikke i knoldene), forventes det at de flygtige nedbrydningsprodukter fra glucosinolatet vil udvise den samme hæmmende effekt som mashuaplanten, og derved nedsætte behovet for sprøjtning. Det langsigtede formål er at finde alternative metoder til at kontrollere kartoffelpatogener for derved at reducere pesticidforbruget og fremme bæredygtigt landbrug.

### **Beskrivelse af projektet**

I 2005 blev der af DANIDA etableret et samarbejde mellem KVL (nu det biovidenskabelige fakultet, Københavns Universitet) og CIP (Centro International Potatis) om at udvikle benzylglucosinolatproducerende kartoffelplanter, dvs kartoffelplanter som producerede benzylglucosinolater i blade og stængler. En særdeles kompetent peruviansk PhD-studerende, Fernando Geu-Flores, er blevet ansat til at udføre den molekylærbiologiske side i form af projektet, hvilket indebar at designe og konstruere ekspressionskonstrukter til at transformere ind i planter. Sideløbende med at CIP skulle transformere kartoffelplanter blev det fundet hensigtsmæssigt og nødvendigt også udføre transformationerne på KVL, således at Fernando Geu-Flores kunne udvikle de enzymatiske analyser for biosynteseaktiviteten på Institut for Plantebiologi, hvor ekspertisen til dette er til stede. Vi valgte til dette formål at introducere glucosinolatbiosyntesevejen i tobaksplanten, som er en modelplante for natskyggefamilien. Således vil Fernando Geu-Flores være i stand til at arbejde med allerede udviklede metoder, når han senere i projektet rejser til CIP for at udføre disse test på transgene kartoffelplanter.

### **Offentliggørelser vedrørende projektet.**

På nuværende tidspunkt har specialestuderende Morten Thrane Nielsen skrevet en populærvidenskabelig artikel til Aktuel Naturvidenskab (vedlagt), og PhD studerende Fernando Geu-Flores er ved at skrive ovennævnte resultater sammen til en artikel der vil blive trykt i et internationalt videnskabeligt tidsskrift. Resultaterne vil blive præsenteret Plantekongressen i 2009.

Med venlig hilsen

Barbara Ann Halkier, lektor dr.scient.  
Projektansvarlig

13. marts, 2008, Frederiksberg