

Danmarks JordbrugsForskning  
Biblioteket  
Forskningscenter Flakkebjerg  
4200 Slagelse



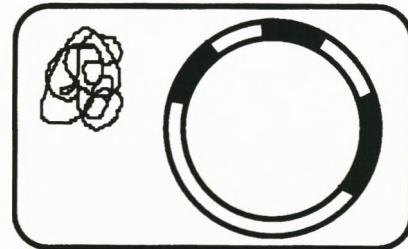
---

Januar 1998

# DJF rapport

---

Nr. 1 • Havebrug



Kirsten Brandt (red.)

Forskningsdag om  
Planteforædling og Bioteknologi 1998

**Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri**  
**Danmarks JordbrugsForskning**



# Forskningsdag om Planteforædling og Bioteknologi 1998

**Danmarks JordbrugsForskning  
Biblioteket  
Forskningscenter Flakkebjerg  
4200 Slagelse**

Forskningsdagen er afholdt af:  
Danmarks JordbrugsForskning, Den Kgl. Veterinær-  
og Landbohøjskole og Aarhus Universitet.

#### Organisationskomité:

Lektor Jens Stougaard, Aarhus Universitet  
Lektor Sven Bode Andersen, Den kgl. Veterinær-  
og Landbohøjskole  
Forsker Gorm Palmgren, DLF Trifolium  
Seniorforsker Kirsten Brandt, Danmarks JordbrugsForskning

#### Redaktion og sats:

Seniorforsker Kirsten Brandt  
Overassistent Krestine Høgh  
Afdeling for Prydplanter  
Kirstinebjergvej 10  
5792 Årslev

#### DJF rapport nr. 1 • januar 1998 • 1. årgang

Udgivelse:	Danmarks JordbrugsForskning Forskningscenter Foulum Postboks 50 8830 Tjele	Tlf. 89 99 19 00 Fax 89 99 19 19
------------	---	-------------------------------------

Løssalg:	t.o.m. 50 sider t.o.m. 100 sider over 100 sider	50,- kr. 75,- kr. 100,- kr.
----------	---	-----------------------------------

Abonnement: Afhænger af antallet af tilsendte rapporter,  
men svarer til 75% af løssalgsprisen.

## **Forord**

Dette er tredje gang, der afholdes Forskningsdag om Planteforædling og Bioteknologi. Det er glædeligt at kunne konstatere at den store interesse for at bidrage med foredrag fortsætter i år. Vi har bedt studerende og yngre forskere holde korte foredrag om de projekter, de er i gang med eller netop har afsluttet. Derved opnås to ting: At de nyeste forskningsresultater bliver præsenteret for erhvervet og for andre forskere, og at alle får lejlighed til at udveksle erfaringer og ideer med andre fagområder. For de studerende ligger der også et uddannelsesaspekt i at fremlægge sine resultater for en bred kreds.

Baggrunden er udarbejdelsen af den Nationale Strategi for Jordbrugsforskningen, specielt det påpegede behov for at styrke forskeruddannelsen på området, og for at sikre kontakt til og samarbejde mellem de forskellige aktører på området: Universiteterne, sektorforskningen og forædlingsvirksomhederne. Specielt er der behov for kontakt mellem de forskere, der arbejder med at løse sammenlignelige problemstillinger i forskellige kulturer, eller arbejder med samme metoder i relation til forskellige problemstillinger.

Derfor har vi bestræbt os på at lægge et bredt program: Foredragene omfatter landbrugs- og havebrugsafgrøder samt modelplanter, og drejer sig om emner fra genetik og taksonomi over moderne forædlingsmetoder, herunder transformering, til basal molekylær biologisk forskning. Foredragsholderne repræsenterer tre universiteter (KVL, KU og AAU) og to sektorforskningsinstitutioner (DJF og Risø), og flere projekter er gennemført i tilknytning til forædlingsvirksomheder. Det gennemgående tema, som også fremgår af overskriften, er forbedring af det genetiske materiale, der benyttes i planteproduktionen.

Vi håber dagen bliver en god og udbyttelig oplevelse for alle deltagere, og at der knyttes nogle kontakter, som kan udvikles videre i fremtiden. Det er vanskeligt at spå, særligt om fremtiden, men så længe der er basis for det, vil vi bestræbe os på at gentage tilsvarende arrangementer.

Kirsten Brandt

# Indhold

	Side
<b><u>Genetik, indholdsstoffer:</u></b>	
<i>Stine Bukh Madsen:</i> Racespecifik resistens mod spinatskimmel . . . . .	4
<i>Helle Hestbjerg:</i> Karakterisering af <i>Fusarium culmorum</i> - hvilke egenskaber betinger dens patogenitet . . . . .	6
<i>Rikke Nørbaek:</i> Identifikation af anthocyaniner fra <i>Crocus</i> blomster og deres brug som kemiske markører til belysning af sorters slægtsskabsforhold . . . . .	8
<i>Line Sandager:</i> Biosyntesen af usedvanlige fedtsyrer i frø fra <i>Limnanthes douglasii</i> . . . . .	10
<b><u>Metoder til transformering og forædling:</u></b>	
<i>Klaus Petersen:</i> The role of MARs in enhancing transformation efficiency . . . . .	12
<i>Inger Holme:</i> Haploid fremstilling i hvede fra forskellige dele af Europa . . . . .	14
<i>Marianne Folling:</i> Protoplastbaseret transformation af rajgræs . . . . .	16
<i>Malene D. Nielsen:</i> Histologiske undersøgelser af adventiv skuddannelse fra stængler af julestjerne ( <i>Euphorbia pulcherrima</i> ) . . . . .	18
<b><u>Molekylærbiologi:</u></b>	
<i>Cristina Cvitanich:</i> Isolering og karakterisering af en ny type transkriptionsfaktor, LAF1, mulig aktivator af leghæmoglobin transkription . . . . .	20
<i>Mette Grønlund:</i> Karakterisering af et nyt homeobox gen "ndx" der udtrykkes i symbiotiske rodknolde . . . . .	22
<i>Morten Petersen:</i> Gene tagging in <i>Arabidopsis</i> . . . . .	25
<b><u>Molekylær forædling:</u></b>	
<i>Lone Bæk:</i> Kloning og karakterisering af cellulase, endo- $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) fra tobak . . . . .	27
<i>Solveig Lind-Iversen:</i> Cellulase- og ætylen-forårsaget kronbladsabscission i pelargonier . . . . .	29
<i>Marianne Gellert Møller:</i> Isolering og karakterisering af gener involveret i syntese og nedbrydning af asparagin . . . . .	31

# Racespecifik resistens mod spinatskimmel

*Stine Bukh Madsen, Cand. hort., Sektion for Planteforædling og Bioteknologi, Institut for Jordbrugsvidenskab, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole*

## Baggrund

Spinatskimmel er en af de mest udbredte og skadevoldende sygdomme i spinat (*Spinacia oleracea* L.). Sygdommen forårsages af patogenet *Peronospora farinosa* (Fr.) Fr. f. sp. *spinaciae* Byford [=*P. effusa* (Grev.) Ces] (Brandenberger et al., 1991a). Til bekämpelse af spinatskimmel udnyttes i stor udstrækning racespecifikke resistensgener inkorporeret i spinatsorter, da brug af fungicider kun er acceptabelt i begrænset omfang.

Der er identificeret fire fysiologisk forskellige racer af patogenet, som adskilles på baggrund af deres evne til at inficere forskellige genotyper af spinat. (Brandenberger et al., 1991b). Høj grad af resistens er identificeret overfor hhv. race 1, race 2 og race 3 af patogenet. Undersøgelser af disse tre forskellige resistenskilder viser, at resistensegenskaben nedarves dominant og monogent. Endvidere antages det, at loci, der betinger resistens mod race 1 og race 2 er tæt koblede, samt at alleler for race 2 og race 3 sidder i samme locus (Smith, 1950; Eenink 1976; Eenink et al., 1976).

Race 4 af spinatskimmel er virulent overfor de tre resistensgener, og kilder til resistens mod race 4 er identificeret og inkorporeret i nogle spinatsorter, der resulterer i en høj grad af resistens overfor hele patogenpopulationen. Da denne type af resistens yder beskyttelse mod både race 1, race 2, race 3 og race 4 må det overvejes om flere gener kan være involveret. En nedarvningsundersøgelse af resistens blev baseret på tre resistenskilder. For hver af de tre resistenskilder blev seks populationer testet overfor patogenet: P<sub>1</sub> (resistant overfor race 4) og P<sub>2</sub> (modtagelig overfor race 4), deres krydsningsafkom - F<sub>1</sub>, tilbagekrydsninger med parentale populationer - B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub> samt selvbestøvning af afkom - F<sub>2</sub>. Endvidere blev koblingsforholdet til øvrige gener for resistens mod spinatskimmel i spinat undersøgt.

## Resultater

Alle F<sub>1</sub> hybrider, der var afkom af krydsningen resistant x modtagelig, var resistant overfor race 4 isolatet. Kontrolinokulation af forælderpopulationer udviste forventede reaktioner overfor svampen, og tilbagekrydsninger (B<sub>1</sub>) mellem F<sub>1</sub> og resistant forælder udviste resistens. Den alternative tilbagekrydsning (B<sub>2</sub>) mellem F<sub>1</sub> og modtagelig forælder udspaltede i de tre populationer i et forhold mellem 59 resistente og 61 modtagelige planter, der ifølge en +<sup>2</sup>- test stemmer med en 1:1 ratio ( $P=0,86$ ). I de tre F<sub>2</sub> populationer var alt i alt 88 planter resistente og 32 planter modtagelige, hvilket ligger tæt på den forventede 3:1 udspaltnings for nedarvning af et locus, hvor allel for resistens dominerer over allel for modtagelighed ( $P=0,67$ ). Tilsammen giver disse resultater stærke indikationer for, at resistens mod race 4 af spinatskimmel, i de tre undersøgte resistenskilder, nedarves i et enkelt locus med stærk dominans af resistens over modtagelighed.

Koblingsforhold blev undersøgt ved inokulation af F<sub>2</sub> populationer fra to resistenskilder med race 4 og race 1 isolater af spinatskimmel. Begge F<sub>2</sub> populationer udspaltede i tre fænotyper (R4-: M4R1:M4M1). Gruppen R4-, der var resistant overfor begge racer, inkluderer både genotyper med alleler for resistens og modtagelighed overfor race 1. Den anden gruppe M4R1 viste kun resistens overfor race 1, og den sidste gruppe M4M1 var modtagelig overfor

begge racer. Forekomsten af sidstnævnte planter i begge F<sub>2</sub> populationer indikerer udspaltninger af to forskellige loci. En 12:3:1 udspaltningsforhold mellem de observerede fænotyper er forventet for to ukoblede loci. En  $\chi^2$ -test for rigtigheden af denne udspaltning var nonsignifikant i den ene F<sub>2</sub> population, men svagt signifikant i den anden F<sub>2</sub> population ( $P=0,0187$ ). Dog er der gode indikationer for, at de to typer af resistens nedarves i to ukoblede eller kun svagt koblede loci.

Den monogene og dominant betingede resistens mod race 4 af spinatskimmel forenkler forædlingen for resistens mod sygdommen. Resistensen beskytter mod alle fire racer af patogenet, og den vil være effektiv i både liniesorter og hybrider.

## Referencer

- Brandenberger, L. P., Correll, J. C. & Morelock, T. E. 1991a. Nomenclature of the downy mildew fungus on spinach. *Mycotaxon* XLI 1:157-160.
- Brandenberger, L. P., Correll, J. C. & Morelock, T. E. 1991b. Identification of and cultivar reactions to a new race (Race 4) of *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* on spinach in the United States. *Plant Disease* 75(6):630-634.
- Eenink, A. H. 1976. Linkage in *Spinacia oleracea* L. of two race-specific genes for resistance to downy mildew *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* Byford. *Euphytica* 25:713-715.
- Eenink, A. H., Groenwold, R. & Van Raalten, W.J. 1976. Resistentie in spinazie (*Spinacia oleracea* L.) tegen valse meeldauw (*Peronospora spinaciae* Laub.). *Zaadbelangen* 4:101-103.
- Smith, P. G. 1950. Downy mildew immunity in spinach. *Phytopathology* 40:65-68.

# Karakterisering af *Fusarium culmorum* - hvilke egenskaber betinger dens patogenitet?

Helle Hestbjerg, Ph.D. stud., Københavns Universitet og Afd. f. Plantevækstfaktorer, Danmarks Jordbruksforskning

## Baggrund

*Fusarium* er en svampeslægt med mange kosmopolitiske arter. Adskillige optræder i forbindelse med værtplanter, f. eks. findes 18 arter af *Fusarium* på hvede (Nirenberg, 1981). Nogle er alvorlige patogener med et bredt værtspektrum, der omfatter flere kulturplanter. *F. culmorum* er en af disse. På korn forårsager den både rodråd, fodsyge og aksfusariose (Jenkins et al., 1988). Arten er dog ikke obligat parasit, men klarer sig konkurrencemæssigt glimrende som saprofyt, dvs. på dødt organisk materiale (Domsch et al., 1993).

Udover at være patogene er adskillige *Fusarium* arter skadefordgende ved deres produktion af mykotoksiner (Marasas et al., 1984). *F. culmorum* er i det nordlige Europa en vigtig producent af stoffene deoxynivalenol (DON) og zearalenon (ZEA) (Mills, 1989). Begge mykotoksiner optræder i korn og majs og dermed både i fødevarer og i foder. I svineproduktionen har mindsket ædelyst og opkast været relateret til DON, som er almindeligt forekommende, men heldigvis sjældent i så store mængder, at det giver problemer. ZEA har østrogenlignende egenskaber og er kendt som årsag til fertilitetsproblemer hos svin. Der hersker usikkerhed omkring mykotoksinernes betydning for den humane sundhed, idet årsagssammenhængen de her er svære at afklare.

Når et svampeisolat besidder det genetiske potentiale for at optræde som plantepatogen vil fysiske, kemiske såvel som biologiske parametre have betydning for graden af sygdom.

For rodinfektion med *F. culmorum* er jordens vandpotentiale og temperatur samt inokulummængden af afgørende betydning (Jenkins et al., 1988). Fysisk kan svamphen vokse direkte ind i roden hos bl.a. byg og hvede (Kamula et al., 1994) og systemisk vækst er påvist i hvedestængler (Snijders, 1990). Smitte af aksene menes dog at ske med vind og regn (Parry et al., 1995).

Mange svampe kan producere et enormt udvalg af sekundære metabolitter - herunder mykotoksiner (e.g. Frisvad & Thrane, 1987). Disse metabolitters økologiske betydning ved vi meget lidt om, bl.a. fordi vi mangler analysemetoder til at detektere metabolitterne f. eks. under markforhold.

Mykotoksiner er defineret ud fra deres toksiske virkning på mennesker og dyr. Flere mykotoksiner har dog sig også at være fytotoxiske og undersøgelser angiver en sammenhæng mellem produktion af mykotoksiner og aggressivitet i patogenitetstest (Miller & Greenhalgh, 1988; Snijders & Krechting, 1992). Resultaterne peger på muligheden for at anvende mykotoksinbaserede assays til selection for *Fusarium* resistente kornsorger (Lemmens et al., 1994).

Et aspekt i ph.d.- projektet er økologien bag denne sammenhæng mellem patogenitet og toksinproduktion. I projektet søges indirekte at finde sammenhænge mellem metabolitproduktion, vækststrategi og patogenitet.

## Resultater

Fra 12 hvedemarker (fra Østrig, Tyskland, Norge og Danmark) er rendyrket 108 isolater af *F. culmorum* og 58 isolater af *F. equiseti*. Sidstnævnte skal ikke omtales yderligere her. Arterne er identificeret ifølge Nirenberg (1981) og Domsch et al. (1993) efter podning på "Spezieller Nährstofffarmer Agar" (SNA, Nirenberg, 1976) og "Potato Sucrose Agar" (PSA, Booth, 1977). En basalkarakteristik er udført på *F. culmorum* fra disse jorde: morfologisk mht. kolonivækst, sporestørrelse og -form og fysiologisk mht. væksthastighed og kvantitativ sporeproduktion. Resultater fra dette arbejde vil blive præsenteret på Forskningsdagen. Nuværende arbejde omfatter undersøgelse af sekundære metabolitprofiler ved HPLC analyse for et udvalg af isolaterne. En verificering af DON-produktion og et patogenitets-test for spiringsfusariose på byg er planlagt til udførelse i begyndelsen af 1998.

## Referencer

- Booth, C. 1977. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.-H. 1993. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag.
- Frisvad, J.C. & Thrane, U. 1987. Standardized High-Performance Liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-vis spectra (diode array detection). *J. Chromatography* 404: 195-214.
- Jenkins, J.E.E., Clark, W.S. & Buckle, A.E. 1988. *Fusarium* diseases of cereals. HGCA review no. 4. Home-Grown Cereals Authority, London.
- Kamula, S.A., Peterson, C.A. & Mayfield, C.I. 1994. Impact of the exodermis on infection of roots by *Fusarium culmorum*. *Plant and Soil* 167: 121-126.
- Lemmens, M., Reisinger, H., Bürstmayr, H. & Ruckenbauer, P. 1994. Breeding for head blight (*Fusarium* spp.) resistance in wheat: Development of a mycotoxin-based selection method of seedlings. *Acta Horticulturae* 355: 223-232.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. & Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press.
- Miller, J.D. & Greenhalgh, R. 1988. Metabolites of fungal pathogens and plant resistance. In: Hedin, P.-A., Menn, J.-J., Hollingworth, R.-M. (eds.) Biotechnology for crop protection. ACS symposium series. pp 117-129.
- Mills, J.T. 1989. Ecology of mycotoxicogenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J. of Food Protection* 52: 737-742.
- Nirenberg, H.I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-sektion Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. LandForstsirtsch.* 169: 1-117.
- Nirenberg, H.I. 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can. J. Bot.* 59: 1599-1609.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. & McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight /scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* 44: 207-238.
- Snijders, C.H.A. 1990. Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. *J. Phytopathology* 129: 133-140.
- Snijders, C.H.A. & Krechting, C.F. 1992. Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat. *Can. J. Bot.* 70: 1570-1576.

# **Identifikation af anthocyaniner fra *Crocus* blomster og deres brug som kemiske markører til belysning af sorters slægtskabsforhold**

Rikke Nørbaek, Ph.D. stud., Kemisk Institut, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole og Afd. for Prydplanter, Danmarks JordbruksForskning

## **Baggrund**

Af de ca. 300 *Crocus* sorter (Iridaceae), som er beskrevet gennem det sidste århundrede, eksisterer nu 100, som er selekteret ved hybridisering mellem relativt få arter. Cytologiske undersøgelser har bidraget til klassifikation af *Crocus* sorter (Brighton et al., 1973, 1980, Ørgaard et al., 1995), men stadig er der tvivl om nogle af disse hybriders oprindelse og hvor vidt der er forskelle indenfor eksempelvis Biflori serien.

Ved brug af kemiske markører er det muligt nærmere at beskrive slægtskabsforhold i *Crocus*.

## **Resultater**

Blomsterfarven på de forskellige *Crocus* sorter varierer fra hvide, gule, svagt brune til forskellige lilla nuancer. Kemiske markører, der har betydning for denne farvevariation, var derfor et oplagt emne at undersøge. Anthocyaniner giver anledninger til de lilla og svagt brune farver, medens de gule nuancer hovedsageligt skyldes carotenoider og i mindre grad flavonoider.

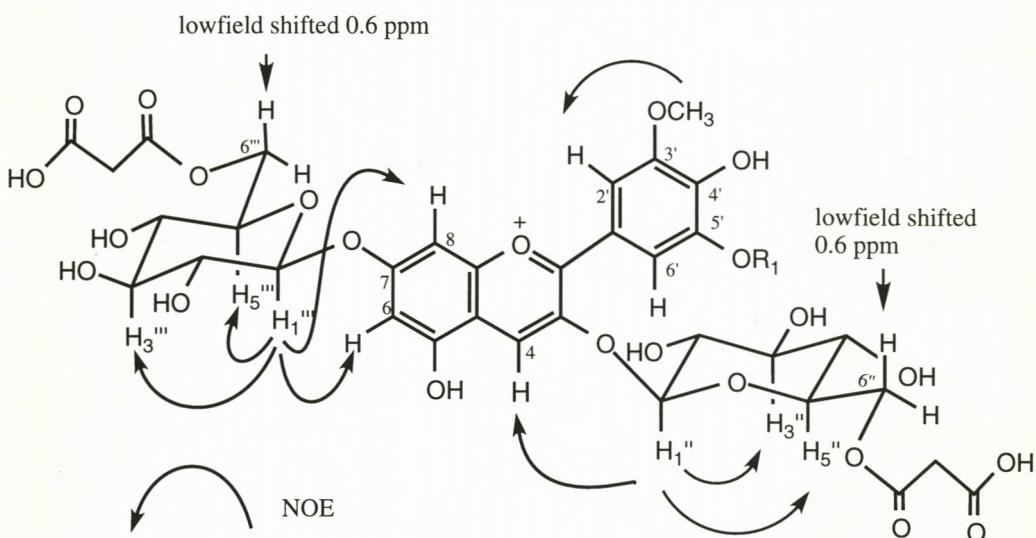
Indhold af anthocyaniner og andre flavonoider i kronblade fra de eksisterende sorter og arter af *Crocus* blev undersøgt ved analytisk HPLC. Der var tale om både kvantitativ og kvalitativ variation af 10 anthocyaniner og adskillige flavonoider i de forskellige *Crocus*. Stofferne blev isoleret vha. søjlechromatografi (XAD-7 og præparativ HPLC) og identificeret ved spektroskopiske metoder (1D-NMR, 2D-NMR, FAB-MS, UV).

Tre anthocyaniner acyleret med malonylsyre blev identificeret som hhv. petunidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl- $\beta$ -D-glucoside)-7-(6-*O*-malonyl- $\beta$ -D-glucoside), malvidin 3-*O*-(6-*O*-malonyl- $\beta$ -D-glucoside)-7-(6-*O*-malonyl- $\beta$ -D-glucoside) og delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside-5-(6-*O*-malonyl- $\beta$ -D-glucoside), hvoraf de to førstnævnte ikke før var isoleret fra andre blomster. Derudover blev 3,5-*O*- $\beta$ -D-diglucosider, 3,7-*O*- $\beta$ -D-diglucosider og 3-*O*- $\beta$ -rutinosider af hhv. delphinidin og petunidin bestemt (Nørbaek and Kondo, 1997). Det tiende anthocyanin er endnu ikke bestemt.

En serie på 15 flavonoider blev identificeret heriblandt mono, di, tri-glucosider og acylerede triglycerider af kaempferol, quercetin, myricetin ogisorhamnetin.

Under udarbejdelse af en chemotaksonomisk oversigt for *Crocus* ved brug af anthocyaniner og andre flavonoider som kemiske markører anvendes clusteranalyse til at lave en statistisk korrekt opdeling. Videre vil det så være muligt vha. denne opdeling at belyse sorternes slægtskabs-forhold.

$R_1 = H$ : petunidin 3-O-(6-O-malonyl- $\beta$ -D-glucoside)-7-O-(6-O-malonyl- $\beta$ -D-glu  
 $R_1 = CH_3$ : malvidin 3-O-(6-O-malonyl- $\beta$ -D-glucoside)-7-O-(6-O-malonyl- $\beta$ -D-glu



Figur 1. Identifikation af nye anthocyaniner fra *Crocus* blomster

## Referencer

- Brighton, C. A., Mathew, B. & Marchant, C. J. 1973. Chromosome counts in the genus *Crocus* (Iridaceae). Kew Bull. 28:451-464.
- Brighton, C. A., Scarlett, C. J. & Mathew, B. 1980. Cytological studies and origins of some *Crocus* cultivars. In: Petaloid Monocotyledons, C. D. Brickell, D. F. Cutler and M. Gregory, eds., 139-162.
- Ørgaard, M., Jacobsen, N. & Heslop-Harrison, J.S. 1995. Molecular cytogenetics in the genus *Crocus* L. In: P. E. Brandham and M. D. Bennett (editors). Kew Chromosome Conference IV, 291-299. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Nørbæk, R. & Kondo, T. 1997. Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae). *Phytochemistry* 3946. In press.

# Biosyntesen af usædvanlige fedtsyrer i frø fra *Limnanthes douglasii*

Line Sandager, Ph.D. stud., Institut for Medicinalkemi, Danmarks Farmaceutiske Højskole og Afd. for Korn-, Frø- og Industriagrøder, Danmarks JordbruksForskning

## Baggrund

Planteriget som helhed udviser en mangfoldighed af fedtsyrer i oliefrø. Over 500 forskellige fedtsyrer er rapporteret (Gunstone et al., 1994), men kun i en håndfuld kender man til de enzymssystemer, som styrer biosyntesen af disse fedtsyrer.

*Limnanthes douglasii* er en plante hvis frø indeholder specielle fedtsyrer. Over 90% af fedtsyrerne er meget langkædede; over 18 kulstofbindinger. Den dominerende dobbeltbinding, som udgør 85%, er en delta-5 binding (Ucciani, 1995). Dette medfører en meget stabil olie, som samtidig ikke er toksisk, og derfor er af industriel interesse til bl.a. kosmetik (Dworak, 1994).

## Resultater

Ud fra de biokemiske assays vi har foretaget, kan det konkluderes at acyl-ACP thioesterasen fra *Limnanthes douglasii* frø under udvikling har en høj aktivitet mod 14:0-ACP. Derfor kan det antages at *Limnanthes douglasii* besidder en thioesterase med specificitet mod mellem-lange fedtsyre kæder, og at det kodende gen er af FatB2 typen (Dehesh et al., 1996). Det vil sige, at der i plastiderne produceres myresyre (14:0), den eksporteres derefter ud i cytoplasmaet, hvor den elongeres til eicosensyre (20:0), og desatureres af et cytoplasmisk delta-5 desaturase enzym til en cis-5-eicosensyre (20:1).

Det var forventet at elongeringen skete på et system bundet til det endoplasmatiske reticulum, men ved *in vitro* assay på microsomer kunne vi kun opnå lav elongerings aktivitet. Det samme gælder ved assays på olielegemer. Derimod fik vi meget høj elongerings aktivitet ved assay direkte på råekstraktet.

Hvis delta-5 desaturase enzymet er aktivt i cytoplasmaet, bliver dette det første enzym fra en plante, der syntiserer enkeltumættede fedtsyrer uden for plastiderne. Resultaterne fra de biokemiske assays tyder alle på, at delta-5 desaturasen fra *Limnanthes douglasii* er et Co-A desaturase enzym, som er aktivt i cytoplasmaet. Disse enzymer er indtil nu kun kendt fra svampe og dyr, hvor de desaturerer palmesyre (16:0) og stearinsyre (18:0) på delta-9 positionen (Pollard & Stumpf, 1980).

## Referencer

- Dehesh, K., Edwards, P., Hayes, T., Cranmer, A.M. & Fillati, J.A. 1996. Two Novel Thioesterases Are Key Determinants of the Bimodal Distribution of Acyl Chain Length of *Cuphea palustris* Seed Oil. *Plant Physiol.* 110:203-210
- Dworak, J. 1994. Meadowfoam Triglyceride. A unique extract for 'functionally enhanced' personal care products (skin and hair). *Agro-Food-Industry Hi-Tech* July/August 1994 19-21
- Gunstone, F.D., Harwood J.L. & Padley, F.B. 1994. The Lipid Handbook. Dictionary Section-Chapman and Hall Chemical Data Base. Chapman and Hall, London

- Pollard, M.R. & Stumpf, P.K. 1980. Biosynthesis of C20 and C22 Fatty Acids by Developing Seeds of *Limnanthes alba*. Plant Physiol. 66, 649-655
- Ucciani, E. 1995. Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales -compositions en acides gras. Techniques & Documentation Lavoisier, Paris

# The role of MARs in enhancing transformation efficiency

Klaus Petersen, Stud. scient. and Robert Leah, Dr. Ph.D., Carlsberg Research Laboratory

## Introduction

The eukaryotic nucleus is a highly organized structure in which the entire genetic information has to be accessible for replication, transcription and other cellular events. Therefore the genome must be arranged in a highly ordered way. The DNA is packed around histones to form 30-nm chromatin fibers which are organized in chromatin loops that are attached to a proteinaceous nuclear matrix or scaffold that is believed to exist. The attachment of the DNA to the nuclear matrix is mediated by specific DNA sequences known as matrix/scaffold attachment regions (MARs/SARs) (Gasser and Laemmli, 1987; for review). Different MARs/SARs do not contain well defined sequence motifs, although they all are AT-rich sequences of several hundred base pairs and they appear frequently throughout the genome every 5 to 200 kb (Gasser and Laemmli 1986; Jackson et al., 1990). MARs/SARs are located in untranslated regions and are thought to form the physical boundaries of DNA loops and to play a role in regulating in *cis* the unfolding/folding of the chromatin fiber. Inclusion of MARs/SARs in transgene designs have shown to possess positive effects on the levels of gene expression and to reduce position effect variations (Stief et al., 1989; Breyne et al., 1992).

In order to improve and enhance the transformation efficiency of barley plants using microprojectile bombardment, we flanked a chimeric  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene construct with two different MARs/SARs; a TBS-MAR isolated from petunia (Galliano et al., 1995) and a P1-MAR isolated from soybean (Breyne et al., 1992). We also screened different barley genomic clones for putative barley MARs/SARs using an *in vitro* DNA binding assay (Hall et al., 1991) on extracted matrices from isolated barley nuclei (Green et al., 1989).

## Results

The two MARs/SARs (TBS-MAR and P1-MAR) were inserted 5' to, or 5' and 3' to a GUS-reporter gene construct respectively. Constructs with and without MARs/SARs were co-bombarded with a selectable *bar*-construct into immature barley embryos using the particle gun. Independent transgenic lines growing on selectable medium were tested for the presence of the transgenes using PCR-amplification. From a total of 2600 bombarded barley embryos we have obtained 180 independent transformed lines (7 lines per 100 bombarded embryos) and about 65% of these lines were transformed with both the selectable *bar*-gene and the GUS-reporter gene. The transgenic lines transformed with both the *bar*- and GUS-construct were also tested for GUS-activity using a fluorometric GUS-assay. The chimeric constructs were also used in transient expression assays in barley seeds to verify that the MARs/SARs had no enhancer-like effect on gene expression transiently but requires stable chromosomal integration.

In these experiments outlined above there is a significant reduction in the variation of expression between individual lines by using the P1-MAR in a chimeric gene construct, although there is no increase in GUS activity. Further we want to determine the GUS gene copy number from each independent line by Southern hybridization in order to determine the GUS-activity per transgene copy number in lines with and without the MARs/SARs. Thereby it is possible that there is an increased per-copy expression level using MARs/SARs.

To verify that the two MARs/SARs were binding to the nuclear matrix of barley, they were tested for their affinity to the nuclear matrix using an *in vitro* DNA binding assay. Nuclear barley matrices are extracted from isolated barley leaves and incubated with the labeled MARs/SARs clones. Fragments that bind the nuclear matrix/scaffold are identified as active MARs/SARs sequences while not-binding DNA sequence are not. Using this procedure we found that the P1-MAR was binding tightly to barley matrices, but the TBS-MAR was not binding at all.

We have also isolated several putative barley MARs/SARs using the *in vitro* DNA binding assay and they are being used for further analyses.

## References

- Breyne, P., Montagu, M., van, Depicker, A. & Gheysen, G. 1992. Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *Plant Cell* 4:463-71.
- Galliano, H., Müller, A.E., Lucht, J.M. & Meyer, P. 1995. The transformation booster sequence from *Petunia hybrida* is a retrotransposon derivative that binds to the nuclear scaffold. *Mol. Gen. Genet.* 247:614-22.
- Gasser, S.M. & Laemmli, U.K. 1986. The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* 5:511-8.
- Gasser, S.M. & Laemmli, U.K. (1987) A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet.* 3: 16-22
- Green, P.J., Kay, S.A., Lam, E. & Chua, N. 1989. *In vitro* DNA footprinting. *Plant Mole. Biol. Manual* B11:1-22.
- Hall, G.Jr., Allen, G.C., Loer, D.S., Thompson, W.F. & Spiker, S. 1991. Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc. Natl Acad. Sci.* 88:9320-4.
- Jackson, D.A. 1990. The organization of replication centers in higher eukaryotes. *BioEssays* 12:503-9.
- Stief, A., Winter, D.M., Sträling, W.H. & Sippel, A.E. 1989. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341:343-5.

# Haploid fremstilling i hvede fra forskellige dele af Europa

Inger Bæksted Holme, Ph.D., Sektion for Planteforædling og Plantekultur, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole

## Baggrund

Haploid fremstilling med efterfølgende kromosomfordobling er et meget effektivt redskab til at afkorte og effektivisere forædlingsprogrammer, specielt når det gælder 'toårige' arter som vinterhvede. Metoder til haploid fremstilling fra mikrosporer har potentiale for regenerering af et stort antal dobbelt haploide (DH) planter, og metoderne anvendes i dag i dansk bygforædling. Haploid produktionen fra hvedemikrosporer har dog endnu ikke vundet indpas i dansk hvedeforædling. Dette skyldes til dels at tidligere undersøgelser har vist, at regenereringen af DH-planter fra mikrosporekultur er lav i dansk vinterhvedeforædlingsmateriale (Andersen et al., 1988). Metoderne anvendes dog i hvedeforædlingsprogrammer i flere østeuropæiske lande (Pauk et al., 1995), hvor der også rapporteres om et højere regenererings-niveau af DH-planter sammenlignet med resultater fra dansk forædlingsmateriale. Den bedre regenererings-frekvens kan skyldes genetiske forskelle mellem det danske og det østeuropæiske forædlingsmateriale. Den kan dog også skyldes en manglende tilpasning af metoderne til det danske materiale.

For at få et overblik over den relative betydning af hhv. genetisk baggrund og miljø blev regenererings-niveauet i et bredt udvalg af dansk hvedeforædlingsmateriale og materiale hjembragt fra forskellige forædlingsstationer i Bulgarien og Ungarn sammenlignet. To metoder til haploid fremstilling blev anvendt og sammenlignet i forsøget, hhv. støvknapkultur efter en protokol af Karsai et al. (1994) og isoleret mikrosporekultur efter en sammensat protokol af Puolimatka et al. (1996) og Hansen & Andersen (1997).

## Resultater

Screeningen af regenererings-niveauet i støvknapkultur blev udført på 147 danske forædlingssorter og 27 bulgarske og ungarske sorter. Sammenligningen mellem det danske og det østeuropæiske materiale viste en statistisk signifikant forskel mellem de to grupper af sorter. En større del af de østeuropæiske sorter gav et højere udbytte af grønne planter per støvknap end det danske og i gennemsnit blev der opnået 5 grønne planter per 100 støvknapper fra det østeuropæiske materiale og kun 0.4 grønne planter per 100 støvknapper fra det danske forædlingsmateriale. Resultaterne fra isoleret mikrosporekultur viste samme forholdsmaessige forskel mellem det danske og østeuropæiske materiale. Isoleret mikrosporekultur udviste dog generelt et højere udbytte af grønne planter per støvknap end støvknapkultur.

Resultaterne fra sammenligningen mellem det danske og det østeuropæiske materiale indikerer, at en del af det højere udbytte fra det østeuropæiske materiale skyldes genetiske forskelle. Hvor store genetiske forskelle, der i virkeligheden eksisterer indenfor og mellem vinterhvedesorterne i Nordeuropa og Østeuropa, er dog vanskeligt at bestemme ud fra de pedigree optegnelser/stamtavler, der findes i litteraturen. En metode til sikker påvisning af genetisk beslægtethed mellem sorter er anvendelsen af mikrosatellit-markører (Plaschke et al., 1995). En undersøgelse af slægtskabsforholdet ved hjælp af mikrosatellit-markører i det afprøvede materiale er derfor påbegyndt for at undersøge om slægtskabsforholdene kan forklare forskellene i regenererings-niveauet fra støvknapkultur/isoleret mikrosporekultur.

## Referencer

- Andersen, S.B., Due, I.K. & Olesen, A. 1988. Results with anther culture in some important scandinavian varieties of winter wheat. *Acta Agric. Scand.* 38:289-292
- Hansen, N.J.P. & Andersen, S.B. 1997. In vitro chromosome doubling with colchicine during isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Euphytica* (submitted)
- Karsai, I., Bedö, Z. & Hayes, P.M. 1994. Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:49-53
- Pauk, J., Kertész, Z., Beke, B., Bona, L., Csosz, M. & Matuz, J. 1995. New winter wheat variety: 'GK Delibab' developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Res. Commun.* 23:251-256
- Plaschke, J., Ganal, M.W. & Röder, M.S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *TAG*:1001-1007
- Puolimatka, M., Laine, S. & Pauk, J. 1996. Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. *Cereal Res. Commun.* 24:393-400

# **Protoplastbaseret transformation af rajgræs**

*Marianne Folling, Ph.D. stud., DLF-Trifolium A/S, og Inst. for Jordbrugsvideneskab, Sektion for Planteforædling og Bioteknologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole*

## **Baggrund**

Der har i de senere år været stor interesse i at supplere den traditionelle forædling af rajgræs med anvendelsen af forskellige bioteknologiske metoder. Vækstkultur og genetiske molekulær teknikker vil som supplement til traditionel forædling kunne øge forædlerens muligheder, samt medvirke til at løse specifikke problemer (svampe-, virussygdomme o.s.v.). En forudsætning for at få succes med genoverførelsес teknikkerne er imidlertid et effektivt embryogent vækstkultursystem, hvorfra der kan regenereres grønne planter. Det er nu lykkedes at etablere et effektivt protoplast regenereringssystem i rajgræs, hvor op til 59.000 grønne planter kan blive regenereret fra 1 ml suspensions celler (Folling et al., 1995). Direkte genoverførelse til rajgræs protoplasster har hidtil kun medført transgene kalli i Italiensk rajgræs, *L. multiflorum* (Potrykus et al., 1985). Fornyligt er det dog lykkedes at opnå transgene planter af alm. rajgræs (*L. perenne*) (Spangenberg et al., 1995) og italiensk rajgræs (Ye et al., 1997) med mikroprojektil bombardment af suspensions kulturer.

Biolistik er blevet meget populært de senere år og der er på kort tid opnået gode resultater i mange plantearter som traditionelt er vanskelige at arbejde med på protoplast niveau. Protoplast transformationen har dog stadig nogle fordele, idet et godt regeneringssystem gør det muligt at opnå mange transformanter, man undgår kimære transgene planter, ligesom protoplastsystemet giver mulighed for at indsætte større DNA stykker.

Formålet med dette projekt er at udvikle en effektiv metode til transformation af rajgræs-protoplasster isoleret fra embryogene suspensioner.

## **Resultater**

Forsøgene er fortrinsvis udført med suspensioner af *L. perenne*, men en del *L. multiflorum* suspensionser har også været anvendt. Plasmidet, pDM803, benyttet til disse forsøg indeholder reportergenet *UidA* (GUS) under kontrol af den konstitutive promotor Actin 1 fra ris og det selektive *Bar* gen reguleret af ubiquitin promotoren fra majs.

En PEG-transformations procedure beskrevet af Kuai & Morris (1995) resulterede i transient expression og transgene Bialaphos resistente kalli blev opnået. Frekvensen af resistente kalli var dog stadig forholdsvis lav og det blev fundet at nucleaser udskilt fra protoplassterne under transformationen var årsagen, idet de i løbet af 30 min. klippede det meste af plasmid DNA'et i småstykker. I eksperimenter, udført for at inhibere nuclease aktiviteten, blev det fundet at høj pH i transformationsbufferen og udførelse af transformationen ved lav temperatur, reducerede nuclease aktiviteten.

Ovennævnte modifikationer af transformations proceduren medførte at transformations frekvensen blev øget markant og i 2 eksperimenter blev der opnået 273 transgene kalli (kan ikke regenerere) med en transformations frekvens på 1,7/100000 protoplaster. I øjeblikket er der forsøg igang med kulture der regenerere og der er indtil videre opnået omkring 250 Bialaphos resistente kalli fra disse forsøg. De første transgene kalli er begyndt at regenerere og transgene planter er opnået. Resultater af disse forsøg og molekulære undersøgelser (PCR og Southern blot af transformanter) vil blive præsenteret på forskningsdagen.

## Referencer

- Folling, M., Madsen, S. & Olesen, A. 1995. Effect of nurse culture and conditioned medium on colony formation and plant regeneration from *Lolium perenne* protoplasts. Plant Science 108: 229-239.
- Kuai, B. & Morris, P. 1995. The physiological state of suspension cultured cells affects the expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene following transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea*) protoplasts. Plant Science 110: 235-247.
- Spangenberg, G., Wang, Z.Y., Wu, X.L., Nagel, J., & Potrykus, I. 1995. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Science 108: 209-217.
- Potrykus, I., Saul, M.W., Petruska, J., Paszkowski, J. & Shillito, R. 1985. Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. Mol. Gen. Genet. 199: 183-188.
- Ye, X., Wang, Z.Y., Wu, X., Potrykus, I., & Spangenberg, G. 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Cell Reports 16: 379-384.

# Histologiske undersøgelser af adventiv skuddannelse fra stængler af julestjerne (*Euphorbia pulcherrima*)

Malene D. Nielsen, Ph.D. stud. Institut for Jordbrugsvidenskab. Sektion for Planteforædling, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole.

## Baggrund

Metoder baseret på adventiv skuddannelse har en stor udbredelse indenfor plantevidenskaben, specielt ved *in vitro*-forsøg og -produktion af planter, hvor adventive skud i stor udstækning har oprindelse i kallus. Adventive skud kan også dannes på organiseret plantevæv, nok mest velkendt er *in vivo* bladstiklinger fra *Saintpaulia* og *Begonia* eller *in vitro*-dannede adventive skud fra bladstykke af planter f.eks. fra familien *Gesneriaceae*.

Det antages ofte, at adventive skud har oprindelse i én celle. De dannede skud vil dermed være homohistonte. I modsætning hertil kan adventive skud have kimært struktur, hvis skuddet er dannet fra flere celler. Der foreligger observationer indenfor såvel *Begonia* og *Saintpaulia*, der tyder på, at adventive skud kan have oprindelse i flere celler. Når der laves bladstiklinger af en bestemt ferskenfarvet *Begonia*-sort observeres ofte gulfarvede blomster på de dannede skud. Fra bladstiklinger af den gulfarvede type observeres ofte en anden gul type og væsentlig mere kompakt plante. Såfremt den første gule type havde oprindelse i én celle, ville den anden gule type ikke optræde som bladstiklinger.

Adventive skud fra rødder er ofte dannet fra korpus (LIII) (Tilney-Bassett, 1986), mens adventive skud dannet på blade angives at være dannet fra epidermis (LI eller ydre tunica). Ved direkte adventiv skuddannelse *in vitro* på blade af *Saintpaulia*, observeres de første celle-delinger 5 dage efter opstart af kulturen, mens meristematiske domes er dannet efter 15 dage. De adventive skud dannes i epidermisceller, der omgiver den basale celle hos kirtelhår (Ohki, 1994).

I modsætning til teorien om en-celle oprindelse, skulle adventive skud fra *Chrysanthemum* og julestjerne have oprindelse i mere end en celle (Tilney-Bassett, 1986).

Som led i udviklingen af en forædlingsmetode til julestjerne, undersøges den histologiske oprindelse af adventive skud *in vivo* og *in vitro*. Formålet er at undersøge hvor mange celler samt hvilke cellelag der indgår i dannelsen af de adventive skud.

## Resultater

Adventive skud med oprindelse i stængler fra julestjerner er etableret i jord og blomsterinduceret ved kortdagsbehandling. Der 'høstes' adventive skud fra to typer planter af sorten Lilo: Marble Lilo og pink Lilo, som begge er kimære typer. Marble Lilo er karakteriseret ved i brakteer (højbladene) at danne rød anthocyanin i korpus (LIII), men ikke i indre og ydre tunica (hhv. LII og LI), mens pink Lilo er karakteriseret ved at danne rød anthocyanin i korpus (LIII) og indre tunica (LII), men ikke i ydre tunica (LI). Brakteernes farve dannes som en kombination af farverne i de forskellige cellelag, og er således ikke udelukkende bestemt af farven i yderste tunica (LI), som det ofte er gældende i andre kimære planter.

Blandt de første blomstrende planter af adventiv oprindelse har en overvejende del af planterne røde brakteer, mens ganske få har hvide brakteer, hvilket indikerer at skuddene er dannet fra enkelte celler eller fra flere celler i samme cellelag evt. fra flere celler fra forskel-

lige cellelag, hvor cellelagene koder for samme farve anthocyanin. Det store antal regenererede planter med røde brakteer tyder på, at de adventive skud dannes fra korpus (LIII).

Ved histologiske undersøgelser er der udtaget vævsprøver fra stængelstykkerne. Disse vævsprøver er indstøbt i paraffin og skåret på mikrotom. Ved mikroskopi vil det være muligt at beskrive udviklingsforløbet af de adventive skud, herunder fastlægge hvor mange initialceller, der indgår i dannelsen af de adventive skud, hvilken placering disse initialceller har i plantevævet og hvor lang tid der går fra planterne er skåret tilbage til de adventive skuds udvikling starter.

## Referencer

- Ohki, S. 1994. Scanning electron microscopy of shoot differentiation *in vitro* from leaf explants of the African violet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:157-162.  
Tilney-Bassett, R.A.E. 1986. Plant Chimeras. Edward Arnold Publishers Ltd. 199 pp.

# **Isolering og karakterisering af en ny type transkriptionsfaktor, LAF1, mulig aktivator af leghæmoglobin transkription**

*Cristina Cvitanich, Kjeld A. Marker og Erik Østergaard Jensen. Laboratorium for Genekspression, Institut for Molekylær og Strukturel Biologi, Aarhus Universitet*

## **Baggrund**

Symbiosen mellem Rhizobium bakterien og bælgplanten resulterer i dannelsen af et nyt plante organ "rodknolde". I dette organ er bakterien i stand til at fiksere atmosfærisk kvælstof til ammonium.

Ved symbiosen induceres en lang række specifikke gener både i bakterien og i planten. I planten bliver der først induceret Enod (Early nodulin) generne som er involveret i bakteriens infektion og rodknoldens udvikling (Mylone et al., 1995). Senere bliver de gener som er involveret i dannelsen af en funktionsdygtig rodknold udtrykt. Blandt de sidste findes de gener som koder for det hæmprotein, leghæmoglobin, som sikrer det rette ilt miljø for bakterium nitrogenase (Nap & Bisseling, 1990).

Sojabønnes (*Glycine max*) leghæmoglobin (*lbc3*) promoter regionen er blevet undersøgt af Stougaard et al. (1990) og Jensen et al. (1988). Den første gruppe har identificeret fire *cis*-elementer: SPE (strong enhancer lignende element, organ specifikt), WPE (weak positive element), OSE (organ specifikt element) og NE (negativ element). Mens Jensen et al. (1988) fandt to forskellige "trans-aktivierende" DNA elementer i den 5' region af *lbc3* genet.

Ved en South Western screening af et >11 ekspression bibliotek med 10 oligonukleotider som dækker *lbc3* promoter regionen (-262 til -13), har Pallisgaard et al. isoleret 10 forskellige kloner som koder for DNA bindende proteiner. Et af dem, LAF1, udviste en høj grad af sekvens specifitet til *lb*-promotoren og er derfor en stærk kandidat til at regulere ekspressionen af *lb*.

## **Resultater**

Sojabønnes (*Gm*) *laf1* cDNA er blevet sekventeret, sekvensen indeholder en åben læseramme svarende til 896 aminosyrer. LAF1 indeholder to cysteinrige områder, C1 og C2. I disse områder danner cysteinerne følgende motiver:

**C1: CX<sub>2</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>2</sub>**

**C2: .....C**

**CX<sub>1</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>2</sub>**

hvor X står for en vilkårlig aminosyre.

Motiverne er placeret i positionerne 473 til 506 (C1) og 563 til 593 (C2) i forhold til den foreslæede startposition.

Filter binding assays viser at fusion proteiner indeholdende begge cystein motiver har stærk bindings affinitet overfor *lb*-promotoren, mens proteiner, som kun indeholder et af de nævnte motiver, viste en reduceret, men betydelig affinitet.

For at undersøge LAF1 funktionen *in vivo* ønskes modelplanten *Lotus japonicus* (kæl-lingetand) anvendt. Til dette formål er *L. japonicus* (*Lj*) *laf1* DNA blevet isoleret fra et λ-FIX genomisk bibliotek og ved brug af RT-PCR teknikken er størstedelen af den tilsvarende cDNA blevet klonet.

*LjLAF1* sekvenser indeholder de to cysteinmotiver som blev fundet i *GmLAF1*. Ved sammenligning af *L. japonicus* genomisk DNA og cDNA blev der fundet en intron i både C1 og C2, de nævnte introns er placeret i forskellige positioner inde i motiverne. I C1 blev der fundet en intron på 84 bp placeret 41 bp efter motivets begyndelse mens der i C2 blev fundet en intron på 93 bp placeret 51 bp efter motivets begyndelse. Disse resultater indikerer at motiverne ikke er opstået ved duplikering.

Ved homologisøgninger i GenBank er der fundet to arabidopsis EST sekvenser med ukendt funktion, den ene er et cDNA fragment (R90198) og den anden er et genomisk DNA fragment (Z97337). Begge disse sekvenser indeholder C1 motivet og Z97337 indeholder også C2. Alle de fem nævnte sekvenser indeholder motivet "RNPL/IAFAPK" imellem C1 og C2. De to arabidopsis gener er forskellige fra hinanden, men R90198 er trunkeret og derfor kan der ikke udelukkes at den også kan indeholde C2. Afstanden mellem C1 og C2 er konserveret i både *LjLAF1*, *GmLAF1* og i arabidopsis EST klon Z97337.

Den genomiske DNA sekvens fra arabidopsis (Z97337) indeholder introns i både C1 og C2 i positioner som svarer til de fundne i *Ljlaf1*.

Motiver homologe til C1 og C2 er ikke blevet fundet i andre gener/proteiner. C1 og C2 er væsentlige forskellige fra andre kendte metalbindende domæner som f.eks. "zinc fingers".

De opnåede resultater indikerer at det område som indeholder C1 og C2 udgør et nyt type DNA bindende domæne.

*laf1* genet bliver udtrykt kort før leghæmoglobin generne i knoldudviklingen og foreløbige transaktiveringsforsøg tyder på at LAF1 kan transaktivere *lbc3* promotoren. Det er derfor sandsynligt at LAF1 regulerer udtrykket af *lb* gener i rodknolen.

For at undersøge LAF1 funktionen *in vivo* vil der blive forsøgt at overudtrykke eller nedregulere LAF1 i *L. japonicus* ved hjælp af sense og antisense konstruktioner.

Strukturen af det DNA bindende domæne vil også blive forsøgt undersøgt ved røntgen krystallografi.

## Referencer

- Jensen, E. Ø., Marker, K. A., Schell, J. & Bruijn, F. J. 1988. The EMBO Journal, vol.7, No. 5: 1265-1271.  
Mylone, P., Pawlowski, K. & Bisseling, T. 1995. The Plant Cell, vol.7:869-885  
Nap, J.-P. & Bisseling, T. 1990. Science, vol. 250:948-954.  
Pallisgaard, N., Cvitanich C., Fayez, S., Hansen, A. C., Larsen, K., Nielsen, K. A., Pihakaski-Maunsbach, K., Marker, K. A. & Jensen, E. Ø. (*in preparation*)  
Stougaard, J., Jørgensen, J.-E., Christensen, T., Kühle, A. & Marker, K.A. 1990. Mol. Gen. Genet. 220:353-360.

# Karakterisering af et nyt homeobox gen “ndx” der udtrykkes i symbiotiske rodknolde

Mette Grønlund, Jan-Elo Jørgensen, Niels Pallisgaard, Knud Larsen, Kjeld A. Marcker og Erik Østergaard Jensen. Laboratorium for Genekspression, Institut for Molekylær og Strukturel Biologi, Aarhus universitet

## Baggrund

Der bliver på Laboratorium for Genekspression arbejdet med N<sub>2</sub>-fixerende planter, udfra en interesse i at finde elementer i den signaltransduktionsvej, der fører til etablering af symbiose mellem planten og de N<sub>2</sub>-fixerende *Rhizobium* bakterier. Denne symbiose giver ophav til dannelsen af et nyt organ i planten, rodknolden, hvori bakterierne lever beskyttet og modtager energi fra planten, der i stedet modtager reduceret N. Bakterierne genkender flavonoider udskilt af værtsplanten, herved induceres syntesen af Nod faktoren, der i sig selv er nok til at igangsætte planterespons typiske for symbiose processen. Sådanne planterespons er blandt andet reaktivering af celler i rodortex der fører til dannelsen af et knoldprimordium samt induktion af plantegener, noduliner der udtrykkes specifikt i forbindelse med knolddannelsen. Et af nodulinerne er Leghæmoglobin (Lb). Lb ses svagt udtrykt i responderende rodhår allerede 1 time efter tilsætning af Nod faktor, men det største udtryk af Lb findes i de modne knolde. Lb er med til at sikre et optimalt ilttryk i rodknolden, hvor der er stort behov for ilt til de aktive bakteriers respiration, men hvor selve nitrogenase enzymet (der katalyserer N<sub>2</sub> reduktionen) er meget ilt sensitivt. Faktorer i den signaltransduktion som Nod faktoren aktiverer er endnu ikke kendt, men det har stor interesse at finde ud af hvilke signaler og gener der er involveret i dannelsen af de symbiotiske organer, fordi det formodentlig vil give bedre forståelse af planters celle-udvikling og celle-differentiering generelt.

## Resultater

Der er tidligere på laboratoriet blevet isoleret 5 proteiner der formodes at deltage i denne signaltransduktion, idet de er isoleret ved en South-Western screening af et cDNA ekspressionsbibliotek fra sojabønne rodknolde hvor oligonukleotider afledt fra *lbc3* promotoren er brugt som prober.

Jeg arbejder med et af disse proteiner, kaldet Ndx, for at prøve at klarlægge dets funktion i planten.

Ved “RNase protection” blev det fundet, at *Gmnndx* er udtrykt allerede 1 dag efter infektion (første måle ”punkt”), at der er en svag nedgang i transkript mængde mellem dag 3-7 som stiger igen, indtil der er fuldt udtryk efter 13 dage, - hvilket stemmer meget overens med udtryksmønstret af Lb.

Det DNA bindende domæne i det isolerede sojabønne protein blev fundet ved hjælp af 3’deletioner af cDNA’et, der blev udtrykt som trunkerede fusionsproteiner i *E.coli* og undersøgt for deres bindingsegenskaber ved filter bindings assay med et af *lbc3* oligonukleotiderne som probe. Homologisøgninger med det afgrænsede DNA-bindende domæne identificerede NDX som et homeodomæne protein. Disse proteiner virker generelt som transkriptionsfaktorer, der regulerer gener som er involverede i celle udvikling og celle differentiering, så det kunne tyde på at Ndx har en regulerende rolle under knoldudviklingen, og er derfor ret interes-

sant at få karakteriseret nærmere. Ydermere er centrale aminosyrer i domænet ændret i NDX proteinerne i forhold til konsensus, så det ser ud til, at NDX repræsenterer en ny klasse homeodomæne proteiner.

For at få undersøgt NDX's funktion er der igangsat under- og over ekspression af NDX i planter hvilket forhåbentlig fører til forklarende fænotyper i transformanterne. Eftersom der ikke findes noget transformationssystem for sojabønne bruges i stedet *Lotus japonicus* som modelplante, idet denne er velegnet til transformation (Stougaard et al, 1992). For at kunne arbejde med et homologt system er der screenet *L. japonicus* rodknolds cDNA bibliotek og *L. japonicus* genomisk bibliotek for at forsøge at isolere fuldlængde kloner af 3 *L. japonicus* cDNAer homologer til *Gmndx*.

*Ljndx1* og *Ljndx2* er homologe til *Gmndx* i både 3'- og 5' enden mens *Ljndx3* kun er homolog i 5' enden og helt mangler homeoboxen.

Det er ved screening af et random primed cDNA bibliotek og 5' race lykkedes at isolere cDNAer der tilsammen udgør et fuldlængde *Ljndx1* cDNA

Til antisense konstruktionerne er der benyttet partielle cDNAer for *Ljndx1* og *Ljndx2*, mens der til sense konstruktionerne skal benyttes fuldlængde cDNAet for *Ljndx1*.

Til plantetransformationerne benyttes et binært vektor-system: den T-DNA bærende vektor pGPTV-KAN (Becker et al, 1992), der er modificeret i polylinkeren.

Til de foreløbige antisense konstruktioner er der brugt følgende 3 promotorer: Den konstitutive CaMV 35S promotor, den knoldspecifikke *lbc3* promotor og den vævs specifikke *enod12* promotor, der er aktiv i knolde, rødder, blomster og stængler.

Foreløbige resultater med antisense planterne indikerer, at NDX kunne være involveret i knoldudviklingen, idet et par af planterne der er transformered med *enod12*-promotor-*ndx1* antisense konstruktionen henholdsvis *lbc3*-promotor-*ndx1* antisense konstruktionen er fix- og har meget få knolde i forhold til vildtype planter.

Desuden ses at hypokotyler transformered med 35S-*ndx2* konstruktionen dør efter et par indledende celledelinger, dvs de når aldrig at blive til kallus, hvilket kunne tyde på, at *ndx2* har en essentiell rolle også i forbindelse med mere generel planteudvikling!

På grund af ovennævnte effekt, er det meningen, at der skal laves antisense konstruktioner i et nyt inducerbart promotorsystem, GVG promotoren.(Aoyama og Chua, 1997).

Herved kan man så selv bestemme på hvilket tidspunkt man ønsker det indsatte gen udtrykt, og vil derved kunne undersøge effekten af *ndx* antisense i andre dele af planten. Udover undersøgelse af antisense planter skal fuldlængde cDNAet af *Ljndx1* bruges i sense konstruktioner efter de fire ovennævnte promotorer.

Fra de planter der udviser en fænotype høstes frø til brug i mere "kontrollerede studier". Først og fremmest skal det undersøges om antisense/sense planterne virkelig har henholdsvis nedsat og øget udtryk af *ndx*, dette undersøges ved RT-PCR. De planter der giver ændret *ndx* udtryk vokses parallelt med vild-type planter på specificeret medium, og undersøges for morfologiske ændringer i knoldene. Udtrykket af target genet leghæmoglobin og kendte noduliner såsom ENOD12, ENOD40 skal undersøges ved "RNase protection" og RT PCR.

Udover plante arbejdet er det meningen at hele NDX skal undersøges domæne vis i gært-to-hybrid screeninger.(Bartel et al, 1993). Dels for at se om der findes interessante vekselvirkende proteiner der kunne indikere noget om NDX's funktion, dels for at identificere det formodede transaktiverende domæne i NDX. Ved screening med det første domæne (N-terminalen) er der fundet en positiv klon, der er ved at blive analyseret nærmere.

## **Referencer**

- Stougaard, J., Sandal, N.N, Grøn, A., Kuhle, A. & Marcker, K.A. 1987. 5' Analysis of the soybean leghemoglobin lbc3 gene: regulatory elements required fpr promoter activity and organ specificity, EMBO J. vol. 6:3565-3569
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. & Masterson, R. 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border, Plant Mol. Biol. vol. 1195-1197
- Aoyama, T. & Chua, N.-H. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants, Plant Journal 11(3):605-612
- Bartel, P.L, Chien, C.-T., Sternglanz, R. & Fields, S. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions, In Cellular Interactions: A Practical Approach. Hartley D.A ed, (Oxford University Press) 153-179

## Gene tagging in *Arabidopsis*

Morten Petersen, Susanne Cirera, Anders B. Jensen and John Mundy. Dept. of Plant Physiology, Institute of Molecular Biology, Copenhagen University

### Introduction

We are using a Ac/Ds transposon-tagging system (Sundaresan et al. 1995 Genes Develop. 9, 1797-810) to study genes mediating physiological and developmental processes in the weed *Arabidopsis*, the model organism of plant biology (<http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis>). We have generated 1000 independent transposon lines and are continuously making more. 200 lines were initially screened for expression of reporter gene and mutant phenotypes to verify that the system was working well in our hands. One quarter of the transposants displayed expression of the reporter gene at a given state in development, further 3% showed mutant phenotypes. One of these mutants shows a recessive lethal phenotype at an early stage of development. Cloning of the flanking DNA revealed that the Ds element had disrupted the promoter of a gene having high homology to receptor like kinase proteins and falls into the leucine-rich repeat class (LRRs). In animals some receptor protein kinases, contain a single transmembrane domain and a cytoplasmic protein kinase domain, which is regulated by the extracellular ligand binding domain. This interaction produces a variety of cellular responses, such as cell proliferation, differentiation and survival. The biological function of most of the few plant receptor like kinases studied to date is unknown, though some have been shown to be somehow involved in resistance to specific pathogens, organogenesis and others are postulated to mediate self-recognition between pollen and stigma during pollination.

### Results

Screening for mutants revealed a recessive mutant, designated G20, which exhibited diffuse dispersed areas of chlorosis and bleached tissue without distinct margins. The bleaching initiated at the cotyledons on approximately 14 days old plant grown under continuous light, extending hereafter to the rest of the plant. After the appearance of bleached leaves, the plant died within a week.

By the means of anchor PCR the DNA flanking the Ds element was cloned and used to screen a genomic library. Sequencing revealed that the Ds had disrupted the promoter of a LRR receptor. Mapping identified the genomic location of G20 on chromosome 5 and indicated that the donor Ds had jumped to another chromosome.

To determine whether the observed phenotype was a specific response and not necrosis several experiments were carried out. First the expression of pathogenesis related genes (PRs) was investigated and showed that in G20 several PRs were ectopically expressed. Then we measured the presence of reactive oxygen species, and found that in G20 there was a massive oxidative burst compared to wild type. An oxidative burst is believed to be sufficient to trigger apoptosis (Pennell and Lamb 1997 Plant Cell 9, 1157-68), and therefore we looked for apoptosis in G20. Using a cell sorter on protoplast we determined that in G20 there was 25% apoptosis as compared to the control. This was also detected using TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling).

The recessive nature of the mutation suggests that the G20 LRRP functions as a negative regulator of cell death. If so, it may be involved in the same or an analogous pathway(s ) as that containing lsd1 leading to lesions symptomatic of disease (Dietrich et al. 1997 Cell, 88, 685-94). Epistasis analyses will be used to determine whether the G20 LRRP is in the same pathway as lsd1. Because the LRR is a protein/protein interaction domain (Kobe & Deisenhofer 1994 TIBS 19, 415-21) and the G20 LRRP is expressed in most vegetative tissues (above), the CD4-10 yeast two-hybrid library developed by J. Walker & associates is being used to attempt to identify G20 LRRP partners. Such partners may clarify the function of the G20 LRRP.

## Kloning og karakterisering af cellulase, endo- $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) fra tobak

Lone Bæk, Ph.D. stud. Laboratorium for Genekspression, Institut for Molekylær og Strukturel Biologi, Aarhus Universitet.

### Baggrund

Lave niveauer af cellulaseaktivitet findes stort set i alle plantedele, mens forøget aktivitet af cellulaser er forbundet med udviklingsmæssige begivenheder der involverer strukturelle modifikationer af cellevæggen. Forøget cellulaseaktivitet ses blandt andet i forbindelse med frugtmodning, abscission, differentiering af vaskulært væv og celleekspansion, og skyldes hormonkontrollerede ændringer i genekspression (Brummell et al., 1994).

Fra kallus af *Nicotiana tabacum*, Petit Havana SR1 er der oprenset en auxinreguleret cellulase, der hydrolyserer tobak xyloglucan samt vandopløselige, substituerede cellulosederivater som hydroxyethylcellulose og carboxymethylcellulose (Truelsen & Wyndaele, 1991).

Det har vist sig, at cellulaseaktiviteten i kallusvævet stiger, når det overføres til friskt kallusmedie. Ligeledes ser man en stigning i vævets cellulaseaktivitet, når der anvendes højere auxinkoncentrationer i kallusmediet. Når kallusvævet overføres til skudinducerende medium (uden auxin, eller med meget lille koncentration af auxin), sker der tilsvarende en reduktion af cellulaseaktiviteten.

Yderligere kan kallusværets cellulaseaktivitet reduceres med 50% hvis det inkuberes med antistof mod den oprensede cellulase, og ved tilsætning af dette antistof til kallusmedie, kan der reduceres skuddannelse på kallusvæv dyrket på dette medie (Truelsen & Ulvskov, 1993).

Ideen bag dette projekt er, at denne auxinregulerede cellulase har en funktion i forbindelse med de tidlige stadier af skudinduktion, og at der er en sammenhæng mellem nedregulering af cellulaseaktiviteten og starten af skudinduktionen.

Et redskab til undersøgelse af dette, er transgene planter, konstrueret på en sådan måde, at cellulaseaktiviteten kan reguleres under passende vækstbetegnelser.

### Resultater

Cellulasen er oprenset fra auxininduceret kallus. SDS-PAGE viser to cellulasebånd med forventet molekylvægt på hhv. 50 og 52 kDa. som følges ad under hele oprensningen. Sekvensering af de to peptidbånd har givet en række aminosyresekvenser med stor homologi til allerede kendte cellulaser. Med henblik på screening af cDNA bibliotek, fremstilles probe ved hjælp af PCR og primers designet dels udfra passende aminosyresekvenser fra tobakscellulosen, og dels konserverede regioner i kendte cellulaser.

## **Referencer**

- Brummell, D.A., Lashbrook, C.C., Bennett, A.B. 1994. Plant endo-1,4- $\beta$ -glucanases, Structure, properties and physiological function. In Himmel, M.E., Enzymatic conversion of biomass for fuel production Society, Denver, Colarado. 100-129.
- Truelsen, T.A., Wyndaele, R. 1991. Cellulase in tobacco callus: regulation and purification. *J. Plant Physiol.* 139:129-134.
- Truelsen, T.A., Ulvskov, P. 1995. The role of cellulase in hormonal regulation of shoot morphogenesis in tobacco callus. *Planta* 196:727-731.

# Cellulaser og ætylen-forårsaget kronbladsabscission i pelargonier

Solveig Lind-Iversen, Ph.D.stud., Sektion for Havebrug, Institut for Jordbruksvidenskab, Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole

## Baggrund

Abscission af blade, knopper og blomsterdele er et hyppigt forekommende problem hos prydplanter i postharvest- (efterproduktions)perioden, hvor planterne ofte udsættes for stress og dårlige vækstforhold. Forskellige signaler er involveret i inducering af abscission, men en fælles faktor for mange abscissions-typer er ætylen (Brown, 1997). Blandt ætylens virkninger er forøgelse af cellevæggsstrækning, som medfører mekanisk spænding mellem forstørrede celler og naboceller, og derved hjælper til separation af cellerne i abscissionslaget. Ætylen har også vist sig at have en inducerende/ forøgende effekt på udtryk af gener associeret med abscission. De enzymer, man i almindelighed korrelerer med abscission er cellulaser (endo- $\beta$ -1,4-glucanaser) og pectinaser (polygalacturonaser), der hydrolyserer komponenter i cellevæggene der derved svækkes.

Ætylens rolle i abscission er undersøgt i mange plantesystemer. I nogle af disse er ætylen blot én ud af adskillige regulerende faktorer, og der er stor forskel på hurtigheden hvormed processen forløber. I undersøgelser af bønneblade, fjernes abscissionzone-indeholdene sektioner fra moderplanten for at undgå den negative indflydelse som auxiner har på ætylen-responsen, og selv da tager abscissionen op til 3 dage (Addicott, 1982). Avocado-frugter abscisserer 10-20 dage efter sprøjtning med 2-chloroethylphosphonic acid (ethephon), en ætylen-afgivende forbindelse (Tonutti *et al.*, 1995).

Vi har valgt at undersøge kronbladsabscission i pelargonier (*Pelargonium zonale*), dels på grund af den hurtige respons blomsterne har på exogen ætylen, dels fordi der i litteraturen kun er ganske få henvisninger til kronbladsabscission. Udsættes pelargonie-blomster for lave koncentrationer af ætylen, abscisserer kronbladene indenfor 2 timer (Evensen *et al.*, 1993). Bestøvning af blomsterne resulterer i biosyntese af ætylen, der når et maximum efter 2-3 timer; kronbladsabscission er fuldt efter 4 timer (Clark *et al.*, 1997). Hastigheden og sensitiviteten hvormed abscissionen forløber i pelargonier indikerer, at processen er umiddelbar og direkte.

Mikroskopiundersøgelser af pelargonie-abscissionszoner demonstrerer nedbrydning af midt-lamellerne samt organisation af de primære cellevægge (Evensen *et al.*, 1993), ændringer svarende til dem, der forekommer i abscission af blade, frugter og blomster (Addicott, 1982). Disse ultrastrukturelle skift er i overenstemmelse med hypotesen, at enzymatisk nedbrydning af cellevægge, ligesom i bladabscission, udgør en vigtig del af kronbladsabscission (Evensen *et al.*, 1993). Forsøg indikerer, at i det mindste nogle aspekter af kronbladsabscissionen involverer gen-regulering, idet ætylen-induceret abscission inhiberes af cycloheximid og actinomycinD (inhibitorer af henholdsvis protein- og mRNA-syntese)(Evensen *et al.*, 1993).

## **Resultater**

Ved hjælp af RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) og degenererede primere er der blevet klonet seks partielle cellulase-cDNA. mRNA blev isoleret fra abscisserende blomster og cellulase-transkripter amplificeret med PCR-primere konstrueret på grundlag af to bevarede nukleotid-sekvenser fra plantecellulaser. Klonede PCR-produkter blev sekvenseret, og sammenligning af afledte aminosyre-sekvenser med andre plantecellulaser afslørerde, at hver klon indeholder de bevarede aminosyre-domæner, mens regionerne mellem disse domæner er meget forskellige.

For øjeblikket undersøges transkription af de seks kloner ved hjælp af kvantitativ RT-PCR. Transkriptene lokaliseres i planten, og mRNA niveauer sammenlignes i ikke-abscisserende (kontrol) og abscisserende (ætylenbehandlede) separationsvæv for at se, om cellulase-generne kontrolleres af ætylen på transkriptionsniveau.

## **Referencer**

- Addicott, F.T. 1982. *Abscission*. University of California Press, Berkley. 369 p.
- Brown, K.B. 1997. Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum*, 100:567-576
- Clark, D.G., Richards, C., Hilioti, Z., Lind-Iversen, S. & Brown, K.B. 1997. Effect of pollination on accumulation of ACC synthase and ACC oxidase transcripts, ethylene production and flower abscission in geranium (*Pelargonium x hortorum* L. H. Bailey), *Plant Molecular Biology*, 34:855-865
- Evensen, K.B., Page, A.M. & Stead, A.D. 1993. Anatomy of ethylene-induced petal abscission in *Pelargonium x hortorum*. *Annals of Botany*, 71:559-566
- Tonutti, P., Cass, L.G., Christoffersen, R.E. 1995. The expression of cellulase gene family members during induced avocado fruit abscission and ripening. *Plant Cell Environment*, 18:709-713

# Isolering og karakterisering af gener involveret i syntese og nedbrydning af asparagin

Marianne Gellert Møller, Ph.D. stud., Afdeling for Plantebiologi og Biogeokemi,  
Forskningscenter Risø

## Baggrund

En vigtig kvalitetsparameter for korn og fodergræsser er protein indholdet. I maltbyg og kiks-hvede ønskes et lavt protein indhold for at opnå hhv. højt maltekstraktudbytte og lav elasticitet, i brødhvede derimod ønskes et højere protein indhold. For fodergræsser ønskes optimal bladdannelse og reduceret stængel og frødannelse grundet disse vævs lavere næringsværdi. Ikke kun mængden af protein men også sammensætningen kan forbedre korn og fodergræssers kvalitet, det er derfor projektets langsigtede mål at ændre den relative fordeling af proteinreserverne i fodergræsser og korn samt disse reservers sammensætning. Ændringerne af protein indhold og sammensætning søges opnået gennem manipulering af kvælstof source-sink relationerne i planterne således at kvælstofudnyttelsen optimeres bl.a gennem øget transport af kvælstof til blade i fodergræs og kerner i cerealier.

I højere planter transporterer organisk bundet kvælstof næsten udelukkende i form af asparagin og glutamin. I planter som lupin og ært overføres næsten al kvælstof fra blade til frø via asparagin. Derimod er glutamin den vigtigste transportør i cerealier, dog får asparagin stigende betydning for kvælstof transporten under kernefyldningen. Asparagin har stor opløslighed, høj stabilitet og stor mobilitet i fysiologiske væsker, hvilket gør den til en effektiv transportform af kvælstof fra plantens rødder til de aktivt voksende dele. I 1806 blev asparagin som den første aminosyre isoleret fra asparges, men på trods af denne historiske baggrund er mekanismen bag og reguleringen af asparaginbiosyntesen i planter endnu ikke afklaret.

Syntesen af asparagin ud fra aspartat er en ATP krævende reaktion, som katalysers af enzymet asparagin synthetase (AS). Der eksisterer to former af AS enzymer, den ene bruger glutamin som ammonium donor mens den anden indsætter frit ammonium. I planter er det den glutamin-afhængige AS (EC 6.3.5.4) der er dominerende, og alle kendte sekvenser begynder med motivet (Met-Cys-Gly-Ile) der udgør en glutamin bindende region. AS aktiviteten er tilsyneladende reguleret af plantens udvikling, i tørre frø er der således ikke målbar aktivitet og først efter spiring måles aktivitet. Endvidere udover lys samt C:N forholdet i planten en regulerende rolle for enzymet på det transskriptionelle niveau. I mørke og ved lav C:N forhold om dirigerer asparagin synthetasen flowet af kvælstof til asparagin, der efterfølgende anvendes til kvælstof lagring og transport.

Asparagin synthetase gener er isoleret fra bl.a. *Pisum sativum* (Tsai og Corruzi, 1991), *Asparagus officinalis* (Davis og King, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Lam et al., 1994), *Brassica oleacea* (Downs et al., 1995), *Zea mays* (Chevalier et al., 1996) og *Oryza sativa* (Watanabe et al., 1996). Fra nogle planter er identificeret flere gener, som koder for AS isoenzymer, der udtrykkes i forskelligt væv og under forskellige vækstbetingelser. Således er i ært identificeret to gener, et udtrykt i rødder og et udtrykt i noduler. I *Arabidopsis* er fundet tre gener, i asparges to mens der i kål, majs og ris kun er identificeret et gen.

## **Resultater**

Det første skridt på vejen til at generere en større viden om transport, lagring og reallokering af kvælstof i planter er at identificere genet eller generne, som koder for asparagin synthetase i byg. Da der er stor homologi mellem aminosyre sekvenserne for AS-generne fra forskellige planter (70-80%) er der ud fra konserverede områder af de ovenfor nævnte AS-sekvenser designet degenererede primere. Via nested PCR på genomisk DNA fra byg er et stykke af sekvensen for asparagin synthetasen blevet opformeret. Sekventering af PCR produktet med efterfølgende analyse har vist, at der er tale om en del af genet for asparagin synthetase. Efterfølgende bestemmes cDNA sekvensen/sekvenserne og samtidig er det hensigten at studere genekspresjonen i udviklende planter samt at undersøge deres regulering og effekt på nitrogen assimilering, transport og lagring. Dette søges gennemført ved transiente genekspresions studier og generering af byg og rajgræs transformert med op- eller nedregulerende AS-genkonstruktioner.

## **Referencer**

- Chevalier, C., Bourgeois, E., Just, D. & Raymond, P. 1996. Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Jour.* 9:1-11.
- Davies, K.M. & King, G.A. 1993. Isolation and characterization of a cDNA clone for a harvest induced asparagine synthase from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol.* 102:1337-1340.
- Downs, C.G., Pogson, B.J., Davies, K.M. & Amira, E.C. 1995. An asparagine synthetase cDNA clone (Genbank X84448) from brioccoli (PCR95-016). *Plant Physiol.* 108:1342
- Lam, H.-M., Peng, S.S.-Y & Corruzzu, G.M. 1994. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine Synthethase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106:1347-1357.
- Tsai, F.-Y. & Corruzzu, G.M. 1991. Light represses the transcription of asparagine synthethase genes in photosynthetic and non-photosynthetic organs of plants. *Mol. Cell. Biol.* 11:4966-4972.
- Watanabe, K., Higuchi, T., Sakai, T. & Yamaya, T. 1996. Nucleotide sequence of cDNA encoding asparagine synthetase (accession no. D83378) from rice callus (PGR 96-020). *Plant Physiol.* 111:347-347.



## Danmarks JordbrugsForskning Foulum

Postboks 50, 8830 Tjele.  
Tlf. 89 99 19 00. Fax. 89 99 19 19.

Direktion  
Direktionssekretariat, Økonomisekretariat  
m.m.

Afdeling for Jordbrugssystemer og Landskab  
Afdeling for Husdyravl og Genetik  
Afdeling for Husdyrnæring og Fysiologi  
Afdeling for Plantevækstfaktorer  
Afdeling for Husdrysundhed og Velfærd  
Afdeling for Animalske Fødevarer

Centrallaboratoriet  
Afdeling for Stalddrift  
Afdeling for Markdrift

## Danmarks JordbrugsForskning Årslev

Kirstinebjergvej 6-10, 5792 Årslev  
Tlf. 65 99 17 66. Fax. 65 99 25 98.

Afdeling for Vegetabiliske Fødevarer  
Afdeling for Prydplanter

## Danmarks JordbrugsForskning Flakkebjerg

Flakkebjerg, 4200 Slagelse  
Tlf. 58 11 33 00. Fax. 58 11 33 01.

Afdeling for Plantebiologi  
Afdeling for Plantebeskyttelse

## Danmarks JordbrugsForskning Bygholm

Postboks 536, 8700 Horsens  
Tlf. 75 60 22 11. Fax. 75 62 48 80.

Afdeling for Jordbrugsteknik

## Enheder på andre lokaliteter

Afdeling for Sortsafprøvning,  
Teglværksvej 10, Tystofte, 4239 Skælskør.  
Tlf. 53 59 61 41. Fax. 53 59 01 66.

Askov Forsøgsstation,  
Vejenvej 55, 6600 Vejen.  
Tlf. 75 36 02 77. Fax. 75 36 62 77.

Bioteknologigruppen (Afd. f. Plantebiologi),  
Thorvaldsensvej 40, 1., 1871 Frederiksberg C  
Tlf. 35 28 25 88. Fax. 35 28 25 89.

Borris Forsøgsstation,  
Vestergade 46, 6900 Skjern.  
Tlf. 97 36 62 33. Fax. 97 36 65 43.

Den Økologiske Forsøgsstation,  
Rugballegård,  
Postboks 536, 8700 Horsens  
Tlf. 75 60 22 11. Fax. 75 62 48 80.

Foulumgård, Postboks 50, 8830 Tjele.  
Tlf. 89 99 19 00. Fax. 89 99 19 19.

Jyndevad Forsøgsstation,  
Flensborgvej 22, 6360 Tinglev.  
Tlf. 74 64 83 16. Fax. 74 64 84 89.

Rønhave Forsøgsstation,  
Hestehave 20, 6400 Sønderborg.  
Tlf. 74 42 38 97. Fax. 74 42 38 94.

Silstrup Forsøgsstation,  
Oddesundvej 65, 7700 Thisted.  
Tlf. 97 92 15 88. Fax. 97 91 16 96.

Tylstrup Forsøgsstation,  
Forsøgsvej 30, 9382 Tylstrup  
Tlf. 98 26 13 99. Fax. 98 26 02 11.