



# Specifik mutation med nålestiksoperation

Mutanter af byg er vigtige i forskningen og benyttes også, når der forædles nye sorter til dyrkning. Hidtil har det kun været muligt at inducere mutationer tilfældige steder i genomet. Med helt ny teknologi benyttes proteiner med betegnelsen TALENs til at inducere mutationer i helt specifikke områder af genomet i byg.

*Af Inger Bæksted Holme, Toni Wendt, Henrik Brinch-Pedersen, Aarhus Universitet og Inga Christensen Bach, Planteforskning.dk*

At kunne inducere mutationer i specifikke områder i planters DNA har længe været en drøm for både forskere og planteforædlere. I forskningen er planter med mutationer meget nyttige, når specifikke geners funktion og deres sammenhæng med plantens fænotype skal klarlægges. For planteforædlerne vil muligheden for at kunne inducere mutationer i specifikke gener i afgrødearterne give nye sorter med bedre egenskaber samt en meget stor effektiviseringsgevinst (Boks 1).

Drømmen om at kunne lave små og præcise ændringer i planters DNA-sekvens er blevet til virkelighed. Her beskrives en helt ny metode til målrettet induktion af mutationer i specifikke gener i planter. Metoden er udviklet på baggrund af viden om en bakteries evne til at genkende og binde til specifikke DNA-sekvenser i planter, en anden bakteries evne til at klippe dobbeltstrenget DNA over samt planters evne til at reparere skader på deres DNA.

## Upræcis reparation af DNA

Brud på DNA-strengene er fatalt for en celle. Derfor findes der effektive reparationsmekanismer i alle levende organismer. Det er en udfordring for en celle at foretage en perfekt reparation, hvis der er brud på begge DNAstrengene på samme tid. Hvis der kun er brud på den ene streng, bruger cellen den intakte komplementære streng som skabelon, men ved brud på begge strengene bliver reparationen ofte lidt upræcis, så der indsættes eller tabes enkelte basepar. Sådanne små unøjagtigheder er netop det, som forskere og planteforædlere drømmer om, fordi der er mulighed for, at planten har lavet præcis den mutation, som de har brug for.

Siden 1940'erne har forskere og forædlere kunnet fremprovokere brud på planters DNA, men først nu er det blevet muligt at gå målrettet til værks.

## Bakterier leverer håndtag og saks

Det er nu blevet muligt at designe og producere en særlig type nukleaser, der virker som håndtag, der binder til DNA, og en saks, der klipper begge DNA-strengene over. Sådanne nukleaser kaldes TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), og ved hjælp af TALENs er det blevet muligt at lave et brud på begge DNA-strengene i en plante - som en nålestiksoperation - præcist på det sted i plantens genom, hvor man ønsker en mutation.

En TALEN er et sammensat protein, hvor de enkelte dele har forskellig oprindelse og forskellige funktion. Den ene del, TALE (Transcription Activator-Like Effector), findes i bakterier fra slægten *Xanthomonas*. Den anden del af en TALEN, Nukleasen (N), er en del af et restriktionsenzymet *FokI*, som findes i bakterien *Flavobacterium okeanoikoites*. For at kunne virke skal to nukleaser samles som to halvdele af en saks (Figur 1).

Bakterier fra slægten *Xanthomonas* kan inficere planter og gøre dem syge. Angrebet på en plante begynder med, at bakterierne injicerer deres TALEs i en eller flere af plantens celler. Bakteriernes TALEs indeholder et signal, som får dem til at trænge ind i cellekernen, hvor proteinet binder sig til specifikke geners DNA-sekvens. Binding af en TALE påvirker transkriptionen af det pågældende gen. Bakteriernes TALEs virker således som transkriptionsfaktorer. Injektion af TALEs og påvirkning af transkriptionen af nogle af plantens gener er de første trin i





## Boks 1. Hvad skal vi med bygmutanter?

Mange af de kulturplanter, som forsyner os med fødevarer og foder til vores husdyr, har været udsat for menneskets påvirkning i årtusinder. Udvælgelse af planter med særligt nyttige egenskaber og udbredelse af arter til områder, hvor de ikke har mulighed for at udveksle gener med vilde slægtninge har gjort at kulturplanterne har været igennem en genetisk flaskehals. Derfor har kulturplanter generelt langt mindre genetisk diversitet end de vilde forfædre.

Der er et konstant krav om nye sorter af vores vigtigste kulturplanter, og dermed et behov for at kunne finde nye varianter af gener, som findes i eksisterende sorter. Nye afgrødesorter skal modstå plantesygdomme og skadedyr; de skal have bedre konkurrenceevne overfor ukrudt; de skal give et højere udbytte med mindre input af gødning og vand, og kvaliteten skal være bedre. For eksempel er der et stort behov for at øge biotilgængeligheden af fosfat i kornarternes kerner.

Hvis der findes tilstrækkelig genetisk diversitet inden for arten eller hos beslægtede arter, som afgrødearten kan få fertile afkomsplanter med, kan planteavlere lave nye sorter med de ønskede egenskaber ved hjælp af krydsning og selektion. Hvis der ikke er tilstrækkelig genetisk variation, kan de induceres mutationer i arvemassen og håbe på at finde en mutant, som har den eftertragtede egenskab.

Naturligt opståede mutationer har spillet en vigtig rolle i evolutionen af alle de levende organismer, som vi kender i dag. Der opstår fortsat nye mutationer som følge af UV-stråling fra solen eller den naturlige baggrundsstråling, eller ved at der sker fejl under DNA replikationen.



Klorofylmutanter af byg har ingen dyrkningsmæssig relevans, men de har mange år været benyttet i forbindelse med undervisning i gens udspaltning.

Mutationer har oftest negativ effekt, så mutanterne klarer sig dårligt i den naturlige selektionsproces, men nogle mutationer giver en konkurrencefordel, f.eks. ved at gøre planten resistent overfor en sygdom.

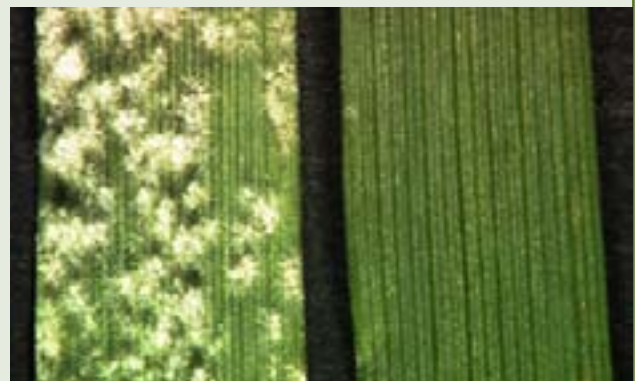
Siden 1940'erne har forskere og forældre induceret mutationer ved hjælp af bestråling eller kemiske stoffer for at øge den genetiske variation. Ligesom naturlige mutationer opstår de inducerede mutationer tilfældige steder i genomet.

Hvis forælderen ønsker at finde en plante med en mutation et bestemt sted i et bestemt gen, er der ingen garanti for at finde en mutant med de ønskede ændringer i DNA-sekvensen, selvom der screenes flere hundrede tusinde mutanter.

På trods af at mutationsforædling er som at lede efter en nål i en høstak, indgår inducerede mutationer ofte i planteavlernes avlsprogrammer. Eksempelvis vil det være svært at finde moderne sorter af byg og hvede, der ikke har en forfader, som har været igennem et mutationsprogram.

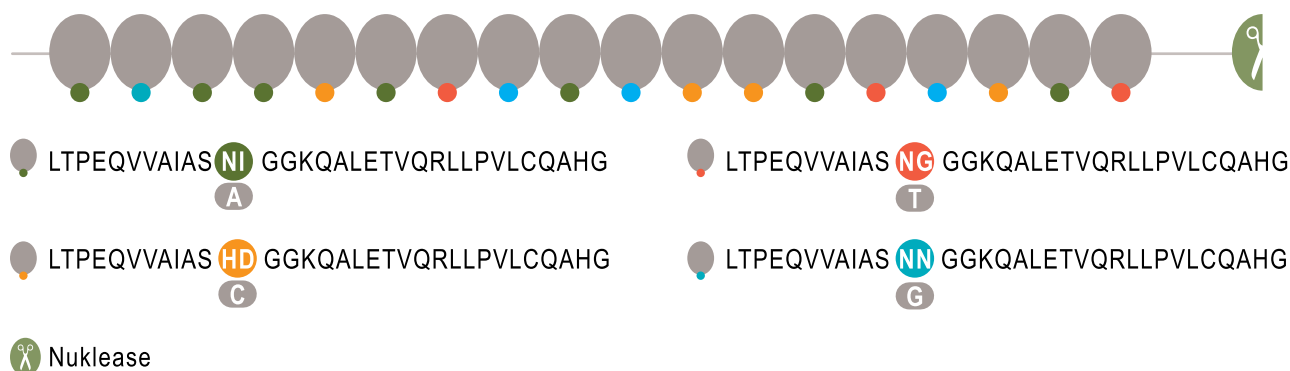
Nogle af de vigtigste afgrødearter har enormt store genomer, og det gør det meget arbejdskrævende og omkostningstungt at finde den rette mutant, hvis man skal lede efter den i en stor population med tilfældigt placerede mutationer.

Implementering af en effektiv metode til at inducere præcist placerede mutationer i vigtige afgrødearter vil gøre det meget billigere at fremavle nye sorter, som kan bidrage til at forøge produktiviteten og forbedre foder- og fødevarer kvaliteten.



En meget varig resistens mod meldug er opnået ved hjælp af mutagen behandling. Her ses blade fra to bygplanter, som er inkuleret med meldug. Bladet til højre er fra en mutant (*mlo*) som er resistent.





**Figur 1.** En TALEN med 18 aminosyregentagelser og én enhed af nukleasen, FOKI (den halve saks). Aminosyrerne i position 12 og 13 i hver gentagelse er afgørende for binding til specifikke nukleotider. FOKI har kun nuklease-aktivitet, når to enheder er forbundet.

et kompliceret infektionsforløb.

Den centrale del af en TALE består af et antal næsten identiske gentagelser (repeats), som er sammensat af 33-34 aminosyrer, hvoraf kun aminosyrerne i position 12 og 13 varierer. Resten af aminosyrerne i en gentagelse er identiske med de tilsvarende aminosyrerne i de øvrige gentagelser.

Når man vil fremstille en TALEN - altså et protein, hvor den ene del svarer til en TALE fra *Xanthomonas*, og den anden del svarer til nukleasen FOKI fra *Flavobacterium okeanoikoites* - laves først en genkonstruktion, hvorfra det sammensatte protein kan udtrykkes. Ved hjælp af avancerede molekylærbioologiske teknikker, er det muligt at sammensætte DNA-fragmenter, der svarer aminosyregentagelserne, med de variable aminosyrer i netop den ønskede rækkefølge. DNA-sekvensen for nukleasedelen af FokI, sættes på i forlængelse af DNA-sekvensen for alle gentagelserne. Når hele det konstruerede gen er samlet, består det af en promotor, DNA-sekvenser for to TALENs med et adskillelsesfragment imellem samt en terminator, dvs. en DNA-sekvens som afslutter genet (Figur 2).

Det er de variable aminosyrer i position 12 og 13 i de mange gentagelser, der bestemmer, hvilken DNA-sekvens en TALE binder til. Se forkortelser for alle aminosyrer i Tabel 1. Histidin og asparaginsyre (forkortet HD) i position 12 og 13 i en gentagelse, binder til nukleotidet cytosin (C). Asparagin og isoleucin (NI) binder til adenin (A), Asparagin og glycin (NG) binder til thymin (T) og to asparagin (NN)

**Tabel 1:** Aminosyres forkortelser. I mange sammenhænge anvendes 3-bogstavforkortelse for aminosyrer, men ved angivelse af aminosyresekvenser benyttes oftest 1-bogstavforkortelse.

Aminosyre	3-bogstav	1-bogstav
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsyre	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsyre	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Fenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V



**Figur 2.** T-DNA fra plasmid til transformation af byg. For at få en bygplante til selv at danne de to TALENs, som skal inducere mutation i et af plantens gener, bygges en genkonstruktion, som indeholder en promotor fra blomkålsmosaikvirus (35S), DNA-sekvenser, der koder for de genspecifikke TALENs (gentagelser, som koder for TALE-delen er markeret som lodrette linier, og DNA-sekvens, som koder for nukleasen, er markeret som en cirkel) og en terminatorregion (T35S) fra blomkålsmosaikvirus. Der er placeret en DNA-sekvens for et såkaldt skipping-peptid (mørk markering) imellem de to TALEN-sekvenser. Hele det kimære gen, hvis transkription styres af 35S promotor og terminator, transkriberes i ét stykke til et samlet mRNA, men proteinsyntesen (translationen) afbrydes ved skipping-peptidet, så der dannes to separate TALENs. T-DNAet indeholder også selektionsgenet *hygR*, som gør transformerede planteceller resistente over for hygromycin.





binder til guanin (G).

Når målet er at inducere en mutation et bestemt sted i en plantes genom, designes to TALEs, der binder til DNA-sekvenserne på hver sin side af det sted, hvor mutationen skal induceres. De to TALEs designes, så de binder til en helt specifik serie nukleotider på hver sin DNA-streng, hhv. sense og non-sense.

For at få induceret et brud på DNA-strengen mellem de to bindingssteder og kun dér, skal hver TALE være bundet til nukleasen FOKI, som kun er aktiv, hvis to enheder er sat sammen (Figur 3). Således kan de to TALENs ikke inducere brud på dobbeltstrengt DNA hver for sig. De skal være forbundet med hinanden via de to halvdele af en funktionel nuklease for at kunne inducere brud på dobbeltstrengt DNA.

Når bakterier fra slægten *Xanthomonas* angriber planter, injicerer de deres TALEs i plantens celler. Der er endnu ikke udviklet laboriemetoder til at injicere proteiner i planteceller, hvis cellerne skal overleve operationen. I stedet for at injicere TALENs i planteceller, indsættes den genkonstruktion, som får planten til selv at producere de to TALENs, som skal inducere mutation i planten genom (Figur 3).

### Brug af TALEN til studier af fytasegen i byg

På Forskningscenter Flakkebjerg har studier af fosfatomsætningen i kornkerner været et centralt forskningsområde i en årrække. Der oplagres store mængder fosfat i kornkerner, hvor det bindes stabilt i fytat. Især under spiring af kernerne, dannes der fytaser, dvs. enzymer som nedbryder fytat og frigiver fosfat.

Hos alle kornarterne er der høj fytaseaktivitet, når kernerne spirer, men byg og hvede har allerede relativt høj fytaseaktivitet i modne kerner. Rug har endnu højere fytaseaktivitet i modne kerner, og det betyder, at rugkerne indeholder meget frit fosfat, som i modsætning til fytat kan optages i tarmen hos af mennesker eller husdyr (Figur 4). I ris, majs og sorghum er der ingen fytaseaktivitet, før kernerne spirer. Det betyder, at der kun er lidt biotilgængeligt fosfat i modne kerner af ris, majs og sorghum.

Variationen i fytaseaktivitet i modne kerner i de forskellige kornarter skyldes dels forskelle mht. antallet af fytasegener, dels forskelle i ekspressionsmønstrene, dvs. hvor og hvornår generne er aktive. I byg, hvede og rug findes to typer fytaser. Den ene (PAPhy\_a) dannes under udvikling af kernen. Den anden (PAPhy\_b) dannes først, når kernen spirer. Rug har to udgaver af PAPhy\_a og en PAPhy\_b, og det er en del af årsagen til, at der er markant højere fytaseaktivitet i kerner af rug end i andre kornkerner. I ris, majs og sorghum findes kun fytaser af typen PAPhy\_b, som dannes under spiring.

Bygplanter med mutationer i fytasegenerne er meget vigtige i de fortsatte studier af fosfatomsætningen i kornkerner. Derfor var det målet at udvikle en metode til specifik mutagenese af fytasegener i byg ved hjælp af TALENs.

I første omgang var målet at undersøge, om TALENs er aktive i byg og kan fremprovokere mutationer på tilsigtede steder på bygplantens kromosomer ved at inducere brud på begge DNA-streng. Næste mål er at benytte TALENs til at undersøge betydningen af regulatoriske elementer i fytasegener, der er aktive i modne bygkerner.

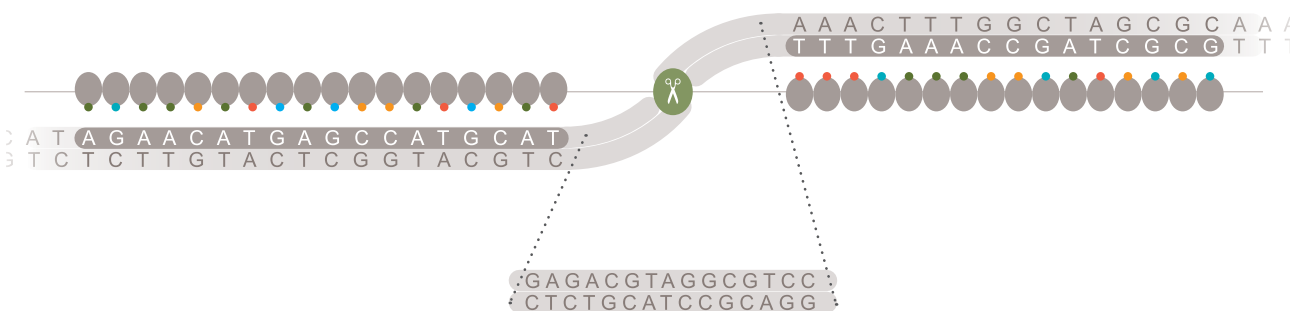
### TALENs designes til HvPAPhy\_a

På Aarhus Universitet har vi designet TALENs til et specifikt sted i promotoren af et fytasegen med navnet HvPAPhy\_a (*Hordeum vulgare* Purple Acid Phosphatase a). Dette gen er ansvarlig for det meste af den phytaseaktivitet, der er til stede i modne kerner af byg.

Computeranalyser af fytasegenernes DNA-sekvenser tyder på, at et motiv (en sekvens som har en bestemt biologisk funktion) i promotoren i fytasegener af typen PAPhy\_a er årsagen til, at disse gener er aktive i modne kerner. For at teste denne hypotese, anvendes TALENs til at inducere mutationer, som specifikt rammer motivet i promotoren i fytasegenet HvPAPhy\_a i byg. Hvis det viser sig, at mutationer i dette motiv resulterer i reduceret phytase ekspression i modne bygkorn, bekræftes hypotesen.

### Transformation og test af transgen byg

Vi benyttede *Agrobacterium* til at transformere umodne



**Figur 3.** To specialdesignede TALENs binder på hver side af målet for mutation i fytasegenet HvPAPhy\_a. Når begge TALENs er bundet til DNA-sekvensen forbindes de to nukleaseenheder. De danner dermed en funktionel nuklease, som inducerer brud begge streng af DNA-sekvensen.







**Figur 4.** En stor del af verdens kornproduktion anvendes som foder. Fytaseaktiviteten er afgørende for, hvor biotilgængeligt kornernes fosfat er. Byg og hvede har relativt høj fytaseaktivitet i modne kerner, og omkring 30% af de modne korners fosfat er biotilgængeligt. Rug har endnu højere fytaseaktivitet og dermed mere biotilgængeligt fosfat. I ris, majs og sorghum er der ingen fytaseaktivitet, før kernerne spirer. Det betyder, at der kun er lidt biotilgængeligt fosfat i modne kerner af disse kornarter-

embryoer fra byg. Der blev indsat et T-DNA indeholdende TALEN-gen og *HygR* som selektionsgen (Figur 2), og der blev selekteret over 100 planter, som kunne regenerere og vokse på trods af hygromycin i dyrkningsmediet. Næste skridt var at undersøge, om der var blevet induceret mutationer i promotoren i fytasegenet *PAPhy\_a* i nogle af disse planter.

#### Analyse af mutationer

Første trin i analysen af de ca. 100 transgene bygplanter var at oprense genomisk DNA fra dem og derefter opformere et DNA-fragment fra netop det område i genomet, promotoren i fytasegenet *PAPhy\_a*, hvor det var målet at inducere mutationer. For hver plante blev der ved hjælp af PCR opformet et DNA-fragment indeholdende bindingsstederne for begge TALENs. Derefter blev disse DNA-fragmenter fordøjet med et restriktionsenzym, som genkender og skærer midt i mellem bindingsstederne for de to TALEN, og analyseret ved agarosegelelektroforese (Figur 5).

Restriktionsenzymet *DrdI* genkender netop det sted i

promoteren i fytasegenet *HvPAPhy\_a*, hvor de to TALENs er designet til at inducere brud på plantens DNA. Hvis de to TALENs har virket, og hvis bygplanten har lavet små unøjagtigheder under reparationen af sit DNA, vil det medføre ændringer i DNA sekvensen, så *DrdI* ikke længere genkender DNA-sekvensen på det pågældende sted.

Planter med inducerede specifikke mutationer i promotoren i *HvPAPhy\_a* kan således identificeres ved at PCR-amplificere det genomiske DNA omkring genkendelsesstedet for de to TALENs, fordøje PCR-fragmentet med restriktionsenzymet *DrdI*, køre prøverne på agarosegelelektroforese og derefter se på antal og størrelse af DNA-fragmenterne på gelen. For planter uden mutation ses to bånd svarende til korte DNA-fragmenter. For planter med mutation på det pågældende sted i genomet ses et bånd svarende til det ufordøjede PCR-fragment på agarosegelen (Figur 6).

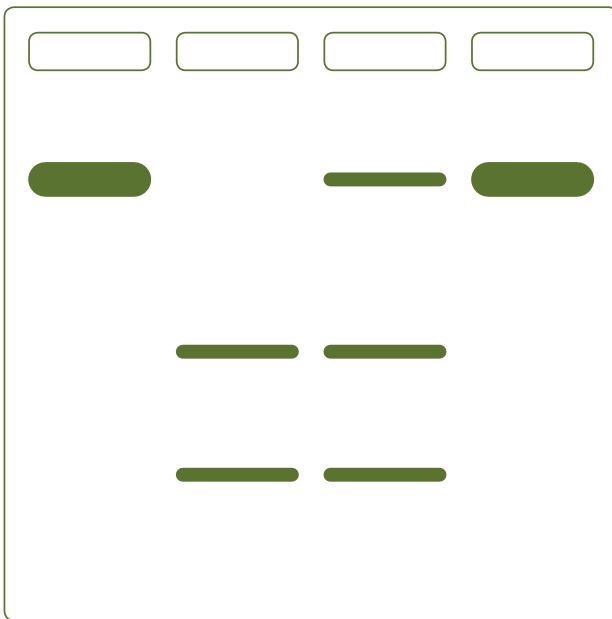
#### Sekventering af fragmenter med potentielle mutationer

Der var ufordøjede PCR-fragmenter i prøver fra 31 af de godt 100 planter, som var transformeret med TALEN-



**Figur 5.** Restriktionsenzymet *DrdI* genkender sekvensen mellem bindingsstederne for TALENs. Hvis der er sket mutation er *DrdI*-sitet forsvundet. Ved hjælp af PCR-primere, som binder på hver side af området opformeres et DNA-fragment, som fordøjes med *DrdI* og separeres ved gelelektroforese.





**Figur 6.** Analyse af PCR-fragmenter. Ufordøjet DNA fra vildtype (bane 1), fordøjet DNA fra vildtype (bane 2), fordøjet DNA fra primær transformant, som enten er kimær eller heterozygotisk mht. mutation og fordøjet DNA fra afkomsplante, som er homozygotisk mht. mutation.

konstruktionen. Disse ufordøjede PCR-fragmenter blev klonet og sekventeret. Sekvensanalyserne viste en række mindre delektioner (Figur 7).

Det viser, at TALEN-konstruktionen bliver udtrykt, at de TALENs, som planten danner, kan binde til de specifikke DNA-sekvenser, som de er designet til, og at de kan inducere mutationer på det tilsigtede sted i genomet i byg.

#### Primære transformater er kimærer

Når TALENs produceres direkte i planten, i stedet for at blive injiceret, vil der kunne ske brud på DNA-strengene og induceres mutationer i alle plantens celler. Derfor kan der komme mange forskellige mutationer i den samme plante. De primære transformater forventes altså at være kimærer, og det blev bekræftet ved at sekventere prøver fra forskellige blade fra den samme transformant (Figur 8).

Kimære planter er uønskede, hvis de skal indgå i et forædlingsprogram, men i forskningen er de nyttige, idet en enkelt transgen plante kan få afkom med forskellige mutationer i den del af genomes, som man vil undersøge.

De primære transformanter er heterozygotiske med hensyn til den indsatte genkonstruktion. Dermed vil der ske udspaltning, så en fjerdedel af afkomsplanterne vil være uden TALENs, såfremt der kun er indsat én kopi

```

VT  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAGGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT-GGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
2   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT-----CCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
3   CATT TTTGTAGAACATGAGCC-----GTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
4   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGAC--AGGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
5   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGA-----TTTGGCTAGCGCAGC
6   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTA--CGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
7   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAGGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
8   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT----GTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
9   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT-----CCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
10  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG----CGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
11  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG----CGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
12  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG---GCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
13  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAG-----GCTAGCGCAGC
14  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAG---TCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
15  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT-GGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
16  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT--GCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
17  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAGGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
18  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAG-----TCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
19  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAGG-GTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
20  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG----CGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
21  CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG--AGGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC

```

**Figur 7.** Sekventering af ufordøjelige PCR-fragmenter fra primære transformanter. Den øverste (VT) sekvens er ikke-muteret vildtype DNA. Linje 1-21 er DNA-sekvens fra 21 forskellige primære transformanter med mutation jf. restriktionsanalyse. Bindingssteder for de to TALENs er indikeret med farve. Som indikeret med bindestreger bestod de fleste mutation i korte delektioner.





```
VT   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAGGCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1a   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGTAGG--TCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1b   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG----CGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1c   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG----CGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1d   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT--GCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1e   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACGT--GCGTCCAAACTTTGGCTAGCGCAGC
1f   CATT TTTGTAGAACATGAGCCATGCATGAGACG-----CTTTGGCTAGCGCAGC
```

**Figur 8.** Sekventering af ufordøjelige PCR-fragmenter fra forskellige bladstykker (1a-1f) fra samme primære transformant. De forskellige mutationer i samme plante tyder på, at planterne fortsætter med at producere aktive TALENs. I en del af afkomplanterne fra en primær transformant vil genkonstruktionen, der koder for TALENs være spaltet ud. Dermed ventes mutationen at blive fikseret.

genkonstruktion i den primære transformant. Således er det muligt at fikserer specifikke mutationer i afkom af transformanterne.

### Perspektivering

DNA-sekvensen for næsten hele genomet i byg blev offentliggjort i 2012. Nu forestår omfattende analyser, der skal klarlægge de enkelte geners funktion. Her er inaktivering af specifikke gener ved hjælp af mutationer i deres DNA-sekvens et meget vigtigt værktøj.

Det er mere end 50 år siden, at danske forskere begyndte at inducere mutationer i byg ved hjælp af mutagene kemikalier eller beståling, og det er der kommet vigtige resultater ud af, både i form af bygsorter med nyttige egenskaber og i form af vigtige forskningsresultater. Ulempen ved de metoder, som hidtil er blevet anvendt er, at mutationerne rammer tilfældigt i genomet. Det indebærer et meget omfattende screeningsarbejde, når man skal finde en plante med en mutation i et specifikt gen.

Med implementering af specifik mutagenese ved hjælp af TALENs vil det fremover være betydeligt lettere og langt billigere at finde bygplanter med mutationer netop de steder i genomet, som man vil undersøge nærmere.

Byg er en vigtig afgrøde, og byg er også vigtig som modelplante for hvede, som har et meget større og mere komplekst genom end byg. Muligheden for at bruge TALENs til at inducere mutationer i specifikke områder af genomet i byg ventes derfor at få stor betydning fremover, og TALEN-teknologien ventes at blive brugt af både forskere og planteforædlere.

### Referencer

- Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333:1843-1846.  
Oversigtsartikel om TALEN
- Wendt T, Holm PB, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Brinch-Pedersen H, Holme IB (2013) TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology* 83: 279-285.  
Udvikling af TALEN-teknologi til byg.

### Om forfatterne

Inger Bæksted Holme, Toni Wendt og Henrik Brinch-Pedersen er forskere ved Forskningscenter Flakkebjerg, Aarhus Universitet.  
Inga Christensen Bach er tidligere forsker og skrivende redaktør af Planteforskning.dk.

