

# Afrapportering for projektet ”Helt nye stivelseskartofler genereret ved Præcis Genom-Editering”

## Projektperiode

Januar – December 2017

## Deltagere

Andreas Blennow (projektleder), Bent Larsen Petersen, Elisabeth Johansen  
Københavns Universitet, Ole Bandsholm: KMC amba.

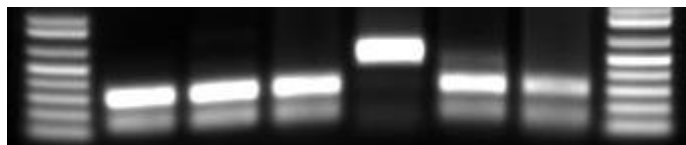
## Resumé

Projektets centrale mål, er at udvikle bæredygtige kartoffellinier med helt nye stivelsesegenskaber med øget industriel og sundhedsmæssig værdi. Disse egenskaber omfatter processtabil amylopektinstivelse og sundhedsfremmende høj-amylose stivelser samt lav fosfat stivelse/lav sukker kartofler. Med dette projekt er nu teknologi for Præcis Genom-Editering (PGE) blevet etableret for kartofler i Danmark. Vi har fortrinsvis brugt den Danske kartoffel Wotan, introduceret mutationer i genet for Granule Bound Starch Synthase (GBSS1) i denne sort og produceret et antal skud med fuldt muteret GBSS1 for processtabil høj-amylopektin stivelse. Dette er blevet muliggjort sfa omfattende effektivisering af PGE teknologien. Vi vil etablere disse nye planter på jord og producere knolde og analysere stivelsen funktionelt. Arbejdet med høj-amylose stivelse og lav fosfat stivelse/lav sukker kartofler er igangsat. Metoden forventes at klassificeres inden for mutagenese som ikke betragtes som GMO. Etablering af PGE i kartofler kan nu erstatte og gøre den gængse GMO-strategi overflødig.

## Projektets faglige forløb

De centrale delmål for produktion af fuldt editeret kartoffelskud er nået i projektperioden. Der er blevet produceret skud af den danske stivelseskartoffel Wotan fra protoplaster, der er fuldt editeret i GBSS genet. Dette er muliggjort sfa omfattende effektivisering af teknologien, med fokus på screening og ekspression. De muterede skud er genereret med helt nye og mere effektive regulerende DNA sekvenser, vi har isoleret fra kartofler. Vi har påvist at, editeringen ligger på samme høje niveau, når de regenererede planter analyseres. Det betyder, at vævskulturarbejdet kan fokuseres på forsøg, hvor man allerede en uge efter transformationen kan se, om der kan forventes god editering i de skud, som fremkommer flere måneder senere. I den kommende projektperiode vil der blive etableret planter fra første skud med GBSS editeret i alle fire alleler. Disse vil blive analyseret for stivelse med højt amylopektin indhold. I perioden er der også fremstillet editerings vektorer for generne SBEII og GWD i hhv. Wotan og Royal for høj-amylose stivelse samt lav fosfat stivelse/lav sukker kartofler.

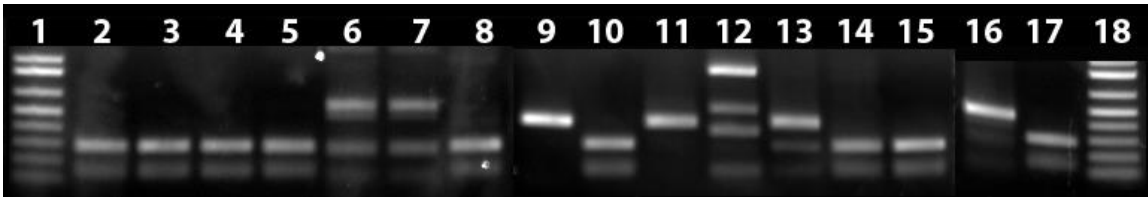
**Editering af GBSS i regenererede skud af Wotan.** Vi har etableret en metode til hurtig analyse af væv fra kartofler. Resultater fra to kontroller og fire editerede skud er vist i Figur 1. Bane 5 viser et skud, som er editeret i alle fire alleler dvs. er en



**Figur 1.** PCR-restriktions analyse på kartoffel væv fra Wotan. Bane 1 og 8: DNA markør. Bane 2-3: Kontroller med ikke editeret blade. Bane 4-7: Skud fra editerede protoplaster.

fuldt muteret plante. Bane 6 et skud som er editeret i 1 allel og som muligvis er en kimær af editerede og ikke editerede celler. Sekvens analyse viste, at skuddet i bane 5 havde en 100 bp insertion i GBSS-genet. Insertionen stammer fra det plasmid, som protoplasterne transformeres med. Det editerede allel fra skuddet i bane 6 havde en 4 basepar deletion.

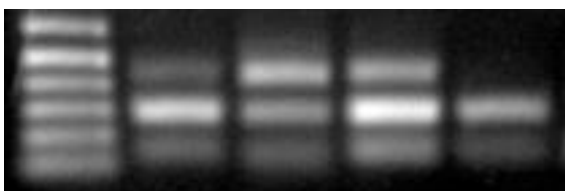
Yderligere 16 skud blev analyseret og resultatet er vist i Figur 2.



**Figur 2.** PCR-restriktions analyse på 16 regenererede skud. Bane 1 og 18: DNA markør. Bane 2: Kontrol med ikke editeret skud. Bane 3-17: Skud fra forskellige pools af editerede protoplaster.

Bane 9 og 11 i Figur 2 viser et enkelt bånd som er resistent og kommer derfor fra skud, som er editeret i alle fire alleler. Disse planter er altså fuldt muteret i GBSS. Bane 13 og 16 viser skud som er editeret i 3 af fire alleler og er altså kun delvist muteret. Skud i bane 3, 4, 5, 8, 10, 14, 15, 17 viser identiske bånd med kontrolplanterne og er altså ikke editerede. Skuddene i bane 6, 7, 12 skal analyseres yderligere. Vi er nu i gang og analyserer sekvenserne. Resultaterne peger på, at der er editering i syv af 15 skud og i to af disse er alle fire alleler editeret. Det svarer til ca 50 % skud med editering og mere end 10% skud med editering i alle fire alleler. Det er fem gange bedre end det bedste resultat i Andersson et al 2016: *"In the most successful experiment, with GT4 driven by the potato promoter in the 25% PEG experimental setup, approximately 2% of regenerated lines had mutation in all four alleles (Table 1; Fig. 4)."*

Editeringen i de regenererede skud svarer godt til den editering vi på protoplast niveau 24 timer efter transformationen i Figur 3. Skuddene i Figur 1 og 2 stammer fra protoplasterne i figur 3 bane 3.



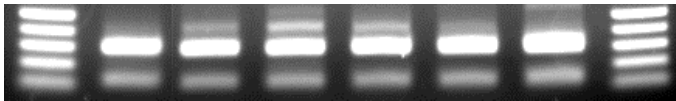
**Figur 3.** PCR-restriktions analyse på protoplaster. Bane 1: DNA markør. Bane 2-4: protoplaster fra tre separate transformationer. Bane 5: Ikke editeret kontrol

Vores mål om at øge editerings effektiviteten er nået. For det fremtidige arbejde betyder det, at vi kan finde det nødvendige antal linjer med mutationer i alle fire alleler uden at skulle teste hundredevis af skud. Desuden betyder korrelationen mellem editering i protoplaster, som er analyseret 24 timer efter transformationen, og editering i regenererede skud, at vi kan evaluere editerings-effektiviteten i løbet af en uge. Vi undgår derfor at bruge resurser på vævskultur på protoplaster, som ikke vil give en tilfredsstillende andel editerede skud.



**Figur 4.** viser fire editerede planter, som er regenereret fra protoplaster. Disse planter vil blive analyseret for stivelses-sammensætning. Editerede planter med rod svarende til skuddene i figur 2 bane 6, 7, 9, 11.

**Editering i yderligere målsekvens i GBSS.** For at sikre at planterne er stabilt muteret og at fænotypen er tydelig, skal editering af GBSS genet laves på yderligere et eller flere målsekvenser. De foreløbige resultater viser lavere editerings frekvens, end det første målsekvens. Som det ses i Figur 5 er det editerede bånd, som ikke skæres med restriktionsenzymet meget svagt. Editeringen i det resistente bånd er bekræftet ved sekvensanalyse.



**Figur 5.** PCR-restriktions analyse på protoplaster. Bane 1 og 8: DNA markør. Bane 2: Ikke editeret kontrol. Bane 3: AtU6 promoter. Bane 4-7 StU6 promotorer.

Dette uventede resultat betyder, at vi kommer til at lave yderligere undersøgelser. Er det blot dette guide-RNA, som ikke virker, eller er der en anden forklaring. Metoden skal være generel.

#### **Projektplan for den kommende periode.**

- Regenerering og analyse af flere skud fra Wotan editeret i GBSS for at sikre at der ikke er så kaldt somaklonal variation.
- Opformering af planter med editering i alle fire alleler til mikrotuber dannelse og stivelsesanalyse.
- Undersøgelse af editeringen i det andet målsekvens i GBSS genot. Mindre justeringer i vektorkonstruktionen er måske årsagen. Der efter vil der besluttes, om vi skal finde et andet målsekvens.
- Editering af protoplaster i SBEII genot. Nå så langt som muligt i processen at regenerere skud og mikroknolde med editering i alle fire alleler.
- Editering af protoplaster i GWD genot rettet mod det aktive site. Afprøve brug af så kaldt "proxy-CRISPR/paired guide RNA editering" (Chen et al 2016, Schmieder et al 2017) for at øge sandsynligheden for editering. Nå så langt som muligt i processen at regenerere skud og mikroknolde med editering i alle fire alleler i GWD genot.
- Etablering af editerings analyse af GWD vha *in vitro* Cas9-RNP assays (LeBlanc et al 2017). Denne teknologi vil give større frihed til at vælge positionen for editeringen, gøre os uafhængige af restriktions sites, og minimere DNA transfer til kartofflen. Undersøge brug af mere effektive så kaldt IDAA eller HFRA analyser for hurtigere overblik over, hvilke mutationer editeringen har givet.

### **Ændring af forskningsplanen**

Alle centrale mål er opfyldt i projektperioden. Vi har lagt meget vægt ved at effektivisere screenings og editering-teknologierne for at mindske tidskrævende screeningsprocedurer frem over. Derfor vil del-opgaver blive påbegyndt senere. Vi forventer os imidlertid at vores effektivisering vil påskynde arbejdet frem over og at alle mål bliver opnået i 2018. Målsekvenser for SBEII og GWD1 er blevet identificeret, plasmidkonstruktioner til PGE gjort klar og transformation af protoplaster startet. Bekræftede editeringer i SBE og GWD er planlagt til medio 2018. Fænotypisk iodfarvning vil nu gøres på blade i stedet for på kallus.

### **Konklusion**

Vi har fuldt etableret ikke integreret (ikke-GMO) PGE i GBSS1 genen (processtabil høj-amylopektin) i Wotan. Fuldstændig (4 alleler) mutationer er blevet påvist for to linier, og skud er blevet regenereret.

### **Offentliggørelse**

Resultaterne er blevet præsenteret på interne workshops og vil også blive publiceret i form af en videnskabelig artikel i 2018.

Frederiksberg C, 2018-03-08



Andreas Blennow (bevillingshaver)