

Domestication of *Lepidium campestre* with genome editing CRISPR/Cas9

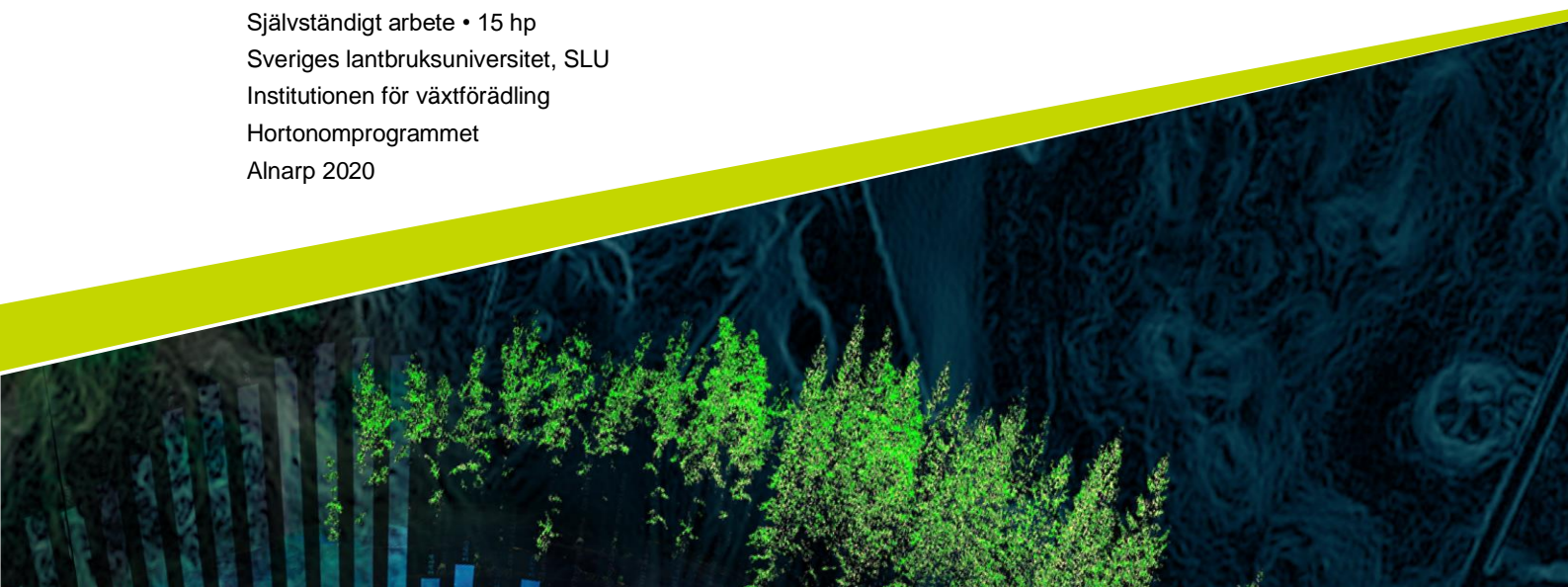
– Analysis whether the genome editing
CRISPR/Cas9 can be utilized in the
domestication work of *Lepidium campestre*

Domesticering av *Lepidium campestre* med genomediteringstekniken
CRISPR/Cas9

Analys huruvida genomediteringstekniken CRISPR/Cas9 kan användas i
domesticeringen av *Lepidium campestre*

Ibrahim Issa

Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för växtförädling
Hortonomprogrammet
Alnarp 2020



Domesticering av *Lepidium campestre* med genomediteringstekniken CRISPR/Cas9 – Analys huruvida genomediteringstekniken CRISPR/Cas9 kan användas i domesticering av *Lepidium campestre*

Domestication of Lepidium campestre with genome editing technique CRISPR/CAS9– Analysis if it's possible to domesticate Lepidium campestre to a new oilseed crop with CRISPR/CAS9 method.

Ibrahim Issa

Handledare: Emelie Ivarson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtförädling
Examinator: Ida Lager, Sveriges lantbruksuniversitet, Institution för växtförädling

Omfattning: 15 hp
Nivå och fördjupning: G2E
Kurstitel: Självständigt arbete i Biologi
Kurskod: EX0855
Program/utbildning: Hortonomprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för biosystem och teknologi

Utgivningsort: Alnarp
Utgivningsår: 2020
Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>
Nyckelord: *Lepidium campestre*, domesticering, CRISPR/Cas9,

Sammanfattning

Dagens samhälle är helt beroende utav fossila bränslen. Då vi ser hur tillgängligheten på dessa blir allt mindre parallellt med ökning av världspopulationen kräver detta nya innovationer. Ett bra alternativ till att lösa dessa utmaningar kan vara oljegrödor. Detta kräver dock framställandet av nya oljegrödor vilka förädlats fram för att passa dessa behov bättre än de sorter som finns etablerade redan idag. *Lepidium campestre* (Fältkrassing) är en vildväxande *Brassica* art. Den utgör en bra kandidat att fungera som grund vid domesticering av en ny oljeväxt. Detta som en följd av dess goda egenskaper som vinterhärdighet, bildandet av sidoskott på den adaxiala delen av sidoskotten och hög avkastningspotential. Dessutom är den bienn och kan fungera som fånggröda. Som ett ytterligare tillägg till detta erbjuder grödan ett flertal mervärden då den exempelvis kan fungera som biobränsle och djurfoder. Dock krävs domesticering av *Lepidium* för att växten ska få de agronomiska egenskaper som den har potential till att bära, för att den ska bli en lönsam oljegröda. För att förädla fram dessa egenskaper kan genomediteringstekniken CRISPR/Cas9 användas. Målet med arbetet är att undersöka om CRISPR/Cas9 är ett lämpligt verktyg för att ge *Lepidium* de egenskaper som eftersöks. För att undersöka detta användes ett CRISPR-konstrukt för att minska glukosinolathalten, detta genom att mutera transportgenerna kopplade till frökakan. Resultatet visar att gen X har muterats i båda alleler vilket troligtvis resulterar i en blockering av transporter för glukosinolater. Utifrån detta drogs slutsatsen att CRISPR-tekniken med fördel kan användas för att domesticera *Lepidium*.

Nyckelord: Lepidium campestre, domesticering, CRISPR/Cas9, glukosinolat

Abstract

Today's society is completely dependent on fossil fuels. As we see how the availability of these is becoming less and less parallel to the increase in the world population, this requires new innovations. An alternative to solving these challenges might be oil crops and can be seen as a good alternative. However, this requires the production of new oil crops which have been refined to better suit the needs as opposed to the varieties already established. *Lepidium campestre* (field cress) is a wild *Brassica* specie. It is a good candidate to serve as the basis for the domestication of a new oil plant. This is due to its good properties such as winter hardiness, the formation of lateral shoots on the adaxial part of the lateral shoots and high yield potential. In addition, it is a biennial plant and can serve as a catch crop. As a further addition, the plant offers a number of added values since it could function as both biofuel, producer of oilseeds and as animal feed. However, the domestication of *Lepidium* is required to establish the agronomic properties that it has the potential to carry, in order to make it a profitable oil crop. To refine these properties, the CRISPR/Cas9 genome editing technique can be used. The aim of the work is to investigate whether CRISPR/Cas9 is a suitable tool for giving *Lepidium* the properties sought. To investigate this a CRISPR construct was used to reduce the glucosinolate content, by mutating the transport genes linked to the seed cake. The result shows that gene X has been mutated in both alleles which is likely to result in a blockage of transport for glucosinolates. From this, it was concluded that CRISPR technique can be advantageously used to domesticate *Lepidium*.

Keywords: Lepidium campestre, domestication, CRISPR/Cas9, glucosinolate

Förord

Jag skulle vilja tacka Emelie Ivarson för chansen att arbeta med henne. Jag uppskattar all hjälp och support som jag har fått under mitt arbete, utan hennes input skulle det inte ha varit detsamma arbete.

Stort tack till Helle Turesson och Niklas Olsson för att köra fragment analys och tillhandahålla den slutgiltiga data.

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	6
Figurförteckning	6
Förkortningar	7
1. Inledning	9
2. Bakgrund	10
2.1 <i>Lipidium Campestre</i> (Fältkrassing).....	10
2.1.1. Glukosinolater	12
2.1.2. Tidigare forskning på <i>L. Campestre</i>	12
2.2. CRISPR/CAS9.....	13
2.3. Domesticering.....	14
2.4. Juridisk perspektiv	14
3. Syfte	16
3.1. Målet med experimentet	16
4. Material & Metod	17
4.1. Växtmaterial	17
4.2. Sterilisering av fröer	17
4.3. Transformerings	17
4.4. DNA extraktion, PCR-analys & fragmentanalys	18
4.4.1. DNA extraktion	18
4.4.2. PCR-analys & gelelektrofores	18
4.4.3. Fragmentanalys	19
5. Resultat	20
5.1. Gelelektrofores	20
5.2. Kapillärelektrofores.....	20
6. Diskussion	22
Referenser	24

Tabellförteckning

Tabell 1. Sammansättning av de respektive medium.....	18
Tabell 2. Komponenter i PCR-analysen.....	19

Figurförteckning

Figur 1. Resultat från gelelektrofores	20
Figur 2. Resultat från kapillärelektrofores, den vilda sorten.....	21
Figur 3. Resultat från kapillärelektrofores, mutationslinjen.....	21

Förkortningar

<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Camelina</i>	<i>Camelina sativa</i>
Cas9	CRISPR associated protein 9
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTK	Cytokinin
DNA	Deoxiribonukleinsyra
EU	Europeiska unionen
FAD2	Fettsyra desaturas 2 (fatty acid desaturase 2)
GM	Genetiskt modifierad
gRNA	Guideribonukleinsyra
GTR1	Glukosinolat transporter 1 (glucosinolate transporter 1)
GTR2	Glukosinolat transporter 2 (glucosinolate transporter 2)
HDR	Homolog rekombination (homology-directed repair)
<i>Lepidium</i>	<i>Lepidium campestre</i>
NHEJ	Icke homolog sammanfogning (non-homologous end joining)
PAM	Protospacer adjacent motif
PCR	Polymerase chain reaction
RNAi	Ribonukleinsyra interferens (Ribonucleic Acid Interference)
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
2,4-D	2,4-Diklorfenoxiättiksyra

1. Inledning

När den gröna revolutionen svepte över världen, gav det samhället möjligheten att producera mer föda genom användningen av gödselmedel, fossila bränslen, nya odlingstekniker och nya domesticerade grödor. Som ett resultat av den ökade födotillgången, ökade populationen och idag står vi inför stora utmaningar för att kunna upprätthålla vårt samhälle (Jones & Mayfield 2016). I dagens samhälle beräknas världspopulationen växa till 9.1 miljarder människor år 2050. Med det kommer samhället möta flera olika utmaningar såsom att producera tillräckligt med föda för populationen. Produktionen av föda är beroende av fossila bränslen och tillgängligheten kommer att minska (FAO,2009). Därför kan oljeväxter ses som ett förnybart bränslemedel för framtiden, men de behöver förädlas för att få en bra oljekvalitet (Nilsson *et al.* 1998). I en rapport från 2013 beskrivs hur *Lepidium campestre* (*Lepidium*) är en möjlig kandidat att utgå ifrån vid domesticerandet av en ny oljegröda, både till foder och industriell användning. För att den ska uppnå de egenskaper gällande den producerade oljans kvalitet och kvantitet som eftersöks krävs dock modifiering av gensekvensen i arvsmassan (Ivarson *et al.* 2013). *Lepidium* har dessutom potentialen att användas som djurfoder (Arefaine *et al.* 2019) eller som en fånggröda med värdefulla ekosystemtjänster. *Lepidium* är väldigt nära besläktad med *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), där *Arabidopsis* har ett av de mest välkända genomen i florariket. Forskare vid SLU har påvisat att *Lepidium* och *Arabidopsis* har 30 homologa gener som kontrollerar oljeinnehållet, blomningstid, vernalisering och frödråsning. Dessutom finns det en variation inom *Lepidium* där dessa 30 gener har olika sekvenser som på olika sätt påverkar fenotypen. Genom att ha en stor variation i genomet så kan domesticeringen av *Lepidium* påskyndas (Gustafsson *et al.* 2018).

Med hjälp av genediteringstekniker kan domesticeringen av *Lepidium* påskyndas (Østerberg *et al.* 2017). Genediteringstekniken CRISPR/Cas9 kan förkorta tiden för växtförädlingsprocessen och effektivare påverka den genotyp som eftersöks, genom precisa mutationer i målgener (Chen *et al.* 2019). I det här experimentet undersöks om CRISPR/Cas9 kan utgöra ett verktyg i domesticeringen av *Lepidium*.

2. Bakgrund

2.1 *Lepidium campestre*

Lepidium är en diploid art ($2n=16$) som är självpollinerande, vildväxande och tillhör familjen *Brassicaceae*. Den har goda egenskaper såsom extremt hög vinterhärdighet (Merker A *et al.* 1995; Al-Shehbaz *et al.* 2006), sidokott bildas på överdelen av stammen och resistens mot pollenskalbaggen. *Lepidium* har stor potential att bli en ny oljegröda och kan odlas i norra regioner där höstraps inte är härdig (Ivarson *et al.* 2013). Den har en hög avkastningspotential på upp emot fem ton per hektar vilket är cirka 30 % mer än den genomsnittliga höstrapsen (Merker *et al.* 2010)

Ett av grödans mervärden är att den kan användas som biobränsle vilket delvis kan ersätta fossila bränslen. Frökakan kan dessutom nyttjas som djurfoder för grisar istället för de proteingrödor som används idag, vilket bidrar till en mer hållbar djurproduktion. I dagsläget innehåller dock frökakan för höga halter av glukosinolater vilket bidrar till en mindre effektiv matsmältning för grisar (Arefaine *et al.* 2019). *Lepidium* kan etablera sig i kyligare regioner där andra fånggrödor inte kan. (Ulén & Aronsson 2018). Dessutom är den bienn sort som gör den mer lämplig som fånggröda. Om *Lepidium* samodlas med vårkorn har den möjligheten till att öka avkastningen av vårkorn. Det ger en positiv ökad avkastning och effektivisering per ha, där *Lepidium* används som en fånggröda (Merker *et al.* 2010). Genom att odla båda grödor samtidigt sparas energi, på samma gång som ingen jordbearbetning sker. Detta minskar dessutom urlakning av näringsämnen genom att *Lepidium* täcker marken under vintern och genom ackumulering av biomassan av *Lepidium*. *Lepidium* har en relativt låg fröoljehalt, runt 20 %, men den har en fiberhalt på 40 % och en proteinhalt på runt 20 %, vilket gör frökakan till ett värdefullt material som djurföda (Andersson *et al.* 1999).

Lepidium kan dessutom användas som en kommersiell gröda. För att det ska bli möjligt att använda *Lepidium* som en kommersiell gröda krävs det att dess agronomiska egenskaper förbättras, en av dessa egenskaper är oljesammansättningen. Fettsyrorna linolsyra, linolensyra och erukasyra är för höga. Därför behövs det att förändra oljesammansättningen för att göra oljan hälsosam och stabil i höga temperaturer (Ivarson *et al.* 2016). Mer än 5% erukasyra anses vara giftigt för människan och det tillåts inte utgöra mer än 5% om det ska användas som råvara inom matindustrin enligt den

allmänna livsmedelslagstiftningen i Europeiska unionen (EU). Linolensyra är nyttigt men på grund av sina dubbelbindningar är den ostabil i höga temperaturer (Graef *et al.* 2009). Men oljesyra är nyttig och tål höga temperaturer, därför eftersöks det att halten oljesyra höjs. Genom att använda RNAi nedreglering har det visat sig att oljesyrhalten kan ökas ifrån 11 % till 80 % i *Lepidium*. Dessutom sänktes linolensyran från 40,4 % till 2,6 % och erukasyran sänktes från 20,3 % till 0,1 %. Den höga oljesyrhalten var stabil i tre generationer (Ivarson *et al.* 2016).

Alla dessa exempel ger ett flertal mervärden för vilket *Lepidium* kan användas, och gör den till en bra kandidat för att domesticeras till en ny gröda.

2.1.1 Glukosinolater

Glukosinolater är försvarskomponenter som är närvarande i *Brassicales* (Halkier & Gershenzon 2006). Dessa komponenter är metaboliskt kostsamma att producera och ackumuleras till den högsta halten i vävnader som har högst sannolikhet till att bli attackerade (Ohnmeiss & Baldwin 2000; Züst *et al.* 2011). De ackumuleras i höga koncentrationer i fröer av *Brassica*-växter och reducerar näringen av proteiner (Tayo *et al.* 2012). I *Arabidopsis* har en minskning av glukosinolater i bladen resulterat att de har ackumulerats höga halter i fröerna (Brown *et al.* 2003). På grund av att de kan inte syntetiseras i fröerna måste transporter till vävnaden ske (Brown *et al.* 2003; Nour-Eldin & Halkier 2009) eftersom de har högst sannolikhet att bli attackerade.

Lepidiums frökaka innehåller det glukosinolater vilket i för höga halter är toxiska för djur. Glukosinolat innehåll i *Lepidium* fröer är 123 till > 138 $\mu\text{mol g}^{-1}$ jämfört med sorter av rapsfröer som innehåller 30 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Om *Lepidium* frökakan ska användas som föda för människor så behöver den minskas, i EU måste nivån ligga under 18 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Andersson *et al.* 1999).

I *Arabidopsis* har det identifierats två specifika transportgener för glukosinolater, vid namn glukosinolat transporter 1 och 2 (GTR1 och GTR2). Analys av glukosinolat innehåll i fröerna med GTR1- och GTR2-mutationer, visar en 48 ± 11 % reduktion i totala glukosinolat innehåll i fröer med mutation av GTR2, medan innehållet av glukosinolater i GTR1-mutanter visade ingen signifikant skillnad ifrån vildtypen.

Men glukosinolatinnehåll var under detektionsgränsen för de fröer som hade dubbelmutation, både GTR1 och GTR2 (Nour-Eldin *et al.* 2012).

2.1.2 Tidigare forskning på *Lepidium campestre*

Det har tagits fram en genetisk kopplingskarta för *Lepidium*, där den slutgiltiga kopplingskartan bestod av åtta kopplingsgrupper. Denna analys visar att sekvensen av *Lepidiums* åtta kopplingsgrupper har minst en 66 % hög kollinearitet med fem av *Arabidopsis* kromosomer. Kartpositionerna av *Lepidiums* kopplingsgrupper visar 24 gener som reglerar olika egenskaper, dessutom har dessa gener identifierats i *Arabidopsis* (Geleta *et al.* 2020). Denna forskning gör det möjligt att se att det finns en korrelation mellan vissa gener i *Arabidopsis* och *Lepidium*, som kan resultera i att forskning som har gjorts på *Arabidopsis* egenskaper kan användas för *Lepidium*.

Forskare på SLU har visat att *Lepidiums* protein har en bra aminosyrasammansättning enligt referensmönstret för människor, men att det domineras av den ostabila linolensyran i fettsyresammansättningen. Den kemiska sammansättningen av rapsfröerna är 40 % - 50 % olja och en protein halt på 25 % *Lepidium* har en lägre innehåll olje- och proteinhalt än raps. Olja och protein är värdefulla egenskaper hos en oljegröda. För att *Lepidium* ska bli en värdefull oljegröda så behöver oljehalten ökas. Genom att förbättra värdefulla egenskaper med geneditering så har *Lepidium* en stor chans till att bli en lyckad oljegröda (Andersson *et al.* 1999).

Ivarson *et al.* (2013) har utvecklat ett protokoll för Agrobakterium-transformering av *Lepidium*. Med hjälp av en stabil Agrobakterium-transformering har transgena linjer av *Lepidium* med minskad frödråsning (Ivarson *et al.* 2016), förbättrad oljesammansättning (Ivarson *et al.* 2017), vax ester-syntes (Ivarson *et al.* 2017) samt ökad oljehalt tagits fram (Ivarson *et al.* 2013).

Det har visats att *Lepidium* som är en bienn växt kan öka lönsamheten för jordbrukare till exempel i norra Skandinavien som har begränsade grödoalternativ på grund av korta odlingsperioden och kalla vintrar. Utvecklingen av bienna grödor kommer också att ge en mer hållbar hantering av ekosystem på grund av hantering av lägre tillförsel av gödning (Ortiz *et al.* 2020)

2.2 CRISPR/Cas9

Genomeditering innebär mestadels att DNA modifieras i en levande organism i form av till exempel att baspar ersätts (Baltes *et al.* 2017). *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) och CRISPR associated protein 9 (Cas9) är en genomediteringsmetod som används för att modifiera DNA (Belhaj *et al.* 2015). CRISPR har palindromiska frekvenser som återupprepas i den långa deoxiribonukleinsyra (DNA)-kedjan (Belhaj *et al.* 2015) och Cas9 är ett enzym som har funktionen att klippa dubbelsträngat DNA. För att klippa en DNA-kedja på en specifik plats i genomet, så designas en syntetisk guideribonukleinsyra (gRNA) för att vara komplementärt till DNAt hos genen som ska muteras. gRNA binder in till Cas9, med funktionen att känna igen en protospacer adjacent motif (PAM)-sekvens och en DNA-sekvens som är lokaliserad bredvid PAM-sekvensen. Cas9 skannar genomet för att identifiera en PAM sekvens och en DNA sekvens intill PAM som matchar gRNA. Om DNAt är komplementärt till gRNA så kommer Cas9 klippa DNA-strängarna (Kato-Inui *et al.* 2018). Detta kommer att aktivera två endogena reparationsvägar i en cell. Antingen en icke homolog sammanfogning (NHEJ) eller homolog rekombination (HDR). NHEJ är en reparationsmekanism i vilken de klippta ändarna i DNAt förs samman och leder ofta till randomiserade borttagningar eller infogningar i form av frameshift-mutation. HDR är en reparationsmekanism som reparerar dubbelsträng DNA genom att en DNA rekombination sker mellan DNA genomet och ett homologt templat-DNA, vilket leder till en exakt genomeditering om en extern donator DNA finns tillgänglig i cellen (Moore & Haber 1996).

Arabidopsis är närbesläktad med *Lepidium* och flera fenotypiska egenskaper har upptäckts i *Arabidopsis* i form av förlust-av-funktion mutationer. Närbesläktade arter har lösare artbarriärer mellan varandra vilket förenklar överförandet av genetisk information emellan dessa (Østerberg *et al.* 2017). Domesticeringen av *Lepidium* kan dra nytta av kunskapen som finns om *Arabidopsis*.

I ett försök användes CRISPR för att modifiera *Arabidopsis* och *Camelina sativa* (*C.sativa*) för att öka halten oljesyra i fröerna. Syftet var att slå ut några eller alla sex fettsyradesatureras 2 (FAD2) generna i genomet. Oljesyran ökade från 16 % till > 50 %. Denna ökning var associerad med att linolsyra (från 16 % till <4 %) och linolensyran

(från 25 % till <10 %) sänktes signifikant. Det visade sig att modifieringen i genomet följde med i både generation 2 och 3 för *Arabidopsis* och *Camelina* (Jiang *et al.* 2017).

Med CRISPR-tekniken går det att ändra ett flertal egenskaper samtidigt i en generation för att få det genom som eftersöks. Det skulle annars tagit flera generationer för att uppnå det. Ett exempel är ett försök med vild tomat *Solanum. pimpinellifolium*, där både större frukter och 10 gånger högre avkastning per planta uppnåddes efter endast en generation. Det påvisar att en växt kan gå från en vildväxande till en domesticerad gröda i endast en generation, och är därför en snabb växtförädlingsmetod (Schindele *et al.* 2020)

2.3 Domesticering

Domesticering innebär att en växt tas från det vilda och förädlas till en gröda som kan användas och brukas av människan. Detta sker under flera generationer för att få de morfologiska och fysiologiska egenskaper som eftertraktas (*Plant Domestication* 2012). Under 1960-talet kom den gröna revolutionen som drevs av högintensivt lantbruk med fokus att producera sorter med hög avkastning. Dessutom nya möjligheter för användning av bekämpningsmedel, gödsel, nya växtförädlings- och -odlingsmetoder. Resultatet blev övergödning, förlust av botanisk diversitet och en påverkan på miljön. Idag står vi inför stora utmaningar på grund av vad som har gjorts (Pingali 2012).

Det finns ca 200 kommersiella grödor och majoriteten av odlingsarealen utgörs av ett fåtal olika grödor, huvudsakligen vete, majs och ris. Domesticeringen av nya grödor kan bidra till att lösa de problem som dagens jordbruk står inför och de baksidor som den gröna revolutionen medförde. Med genomeditingstekniken CRISPR möjliggörs det att accelerera processen för domesticering, till exempel går det att införa en domesticeringsgen i genomet (Østerberg *et al.* 2017).

2.4 Juridiskt perspektiv

Om en ny gröda ska introduceras till den kommersiella marknaden och egenskaper har förändrats med hjälp av CRISPR stämplas grödan som en genetiskt modifierad (GM) gröda enligt EUs lagstiftningar (Bruetschy 2019). Det finns fall där mutationslinjer utan främmande DNA har tagits fram med hjälp av CRISPR. BSV (banana streak virus) i kokbananens arvs massa slogs ut med hjälp CRISPR (Tripathi *et al.* 2019) och borde inte regleras som GM-gröda i framtiden.

Det är förbjudet att odla GM-grödor i EU idag, med undantag för en gröda. Fodermajs är den enda GM-gröda som är tillåten att odla i EU (*Genteknikensutveckling,2019*), men det är tillåtet att importera GM-grödor till EU som djurfoder. Detta resulterar i att det går stora kostnader för att få in en GM-gröda i den europeiska marknaden (Bruetschy 2019). Den höga kostnaden när det gäller tid och pengar brukar vara en begränsande faktor till att det inte införs nya GM-grödor. Det visar sig att det kostade företaget 136 miljoner dollar för att introducera en GM-gröda mellan 2008-2012 (McDougall 2011).

3. Syfte

Syftet är att undersöka ifall CRISPR/Cas9 kan användas som ett verktyg i domestieringsarbetet av *Lepidium*. Experimentet kommer undersöka om det är möjligt att mutera gener som är involverade i frökakans sammansättning genom stabil transformering av *Lepidium* med ett CRISPR-konstrukt. Detta kommer verifieras med hjälp av polymerase chain reaction (PCR), gelelektrofores och fragmentanalys. Tiden för experimentet är för kort för att hinna regenerera skott från denna transformationen. Skott regenererade vid tidigare försök gjorda på institutionen för växtförädling SLU, kommer utgöra material för analyser.

3.1 Målet med experimentet

Resultatet av denna studie förväntas visa ifall CRISPR kan vara ett verktyg i förädlingsarbetet med *Lepidium*.

4. Material & metod

4.1 Växtmaterial

Under det här experimentet användes frön av *Lepidium* som härstammar från nr NO94-7, samlad av den avlidne Professorn Arnulf Merker på Öland, Sverige, som odlades i växthus eller biotron.

4.2 Sterilisering av fröer

Dag 1 steriliseras fröerna i 70 % etanol och sköljs i sterilt vatten. Därefter steriliseras fröerna ytterligare med 15 % kalciumhypoklorit och Tween 20 med skakning under 15 minuter. Fröerna placeras på ett groningsmedium (se tabell 1) i en odlingskammare med en fotoperiod av 16h vid $33\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ och en temperatur av 21/18 °C (dag/natt) under fem dagar.

4.3 Transformer

Dag 5 skärs explantat med hjälp av en skalpell. Skott och rotmeristem avlägsnas, och hypokotylen används som explantat. Därefter placeras ett sterilt filterpapper på ett förkulturmedium (tabell 1) och explantaten placeras på mediet och förkultiveras under 2 dagar i odlingskammare. Dag 6 odlas bakterien *Agrobacterium* med LB-medium med tillsatts av antibiotika (50mg/L Kanamycin, 50mg/L Rifampicillin). Dag 7 centrifugeras bakterien under 15 min på 3500rpm. Supernatanten avlägsnas, och bakteriepelleten löses i MS20 (Murashige & Skoog 1962) som späddes till OD omkring 0,6. Explantaten placeras i bakterielösning under 5 min och placeras sedan på samodlingsmedium (tabell 1) på sterilt filterpapper. Explantaten placeras i en odlingskammare med en fotoperiod av 16h vid $33\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ och en temperatur av 21/18 °C (dag/natt) under fyra dagar. Explantaten tvättas i MS20 innan de placeras på ett selektionsmedium (tabell 1). Därefter placeras Petriskålarna i odlingskammare som sedan flyttas till nytt medium efter 2 veckor och halten kanamycin höjs ifrån 15 till 25mg/L.

Tabell 1 Sammansättning av respektive medium

Preparat	Groningsmedium	Förkulturmedium	Samodlingsmedium	Selektionsmedium
MS (g/L)	2.45	4.9	4.9	4.9
Sucrose (g/L)	10 g	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Bacto agar (g/L)	7			
Gelrite (g/L)		2.5	2.5	2.5
2,4-D (mg/L)		0.5		
TDZ (mg/L)			1.1	1.2
Tiacarcillin (mg/L)				150
Kanamycin (mg/L)				15/25

4.4 DNA extraktion, PCR-analys & fragmentanalys

DNA-extraktion, PCR-analys, gelelektrofores samt fragmentanalys utförs på skott som regenererats vid tidigare försök, eftersom tiden inte är tillräcklig för att regenerera skott från explantat transformerade i detta projekt. PCR-analys används för att se om skotten är transgena, genom analys av markörgenen *nptII*. Därefter körs en fragmentanalys för att ta reda på om det har skett en mutation i genen som är intressant.

4.4.1 DNA extraktion

Bitar (0.5*-1.0cm) av juvenila blad tas ifrån sex olika skott och placeras i PCR-rör med 40µL spädningsbuffert. Bladen krossas med en pipettspets tills lösningen blir grönaktig. Lösningen centrifugeras och supernatanten överförs till ett nytt rör.

4.4.2 PCR & Gelelektrofores

En mastermix med Phusion high-fidelity PCR mastermix samt primers för *nptII* gjordes och tilldelades till de åtta PCR-rören. DNA respektive vatten tillsattes till de olika rören enligt tabell 2.

Tabell 2. *Komponenter i PCR-analysen. 20 μ l reaktioner.*

<i>Material</i>	<i>μL</i>	<i>X8</i>
DNA	2	16
Primer 1	1	8
Primer 2	1	8
Phusion high-fidelity PCR master mix	10	80
H ₂ O	6	48

Därefter körs ett PCR-program på proverna. Programmet består av upprepade temperaturförändringar för att amplifiera DNA sekvenserna. Proverna laddas på 1 % agarosgel och analyseras med hjälp av gelelektrofores.

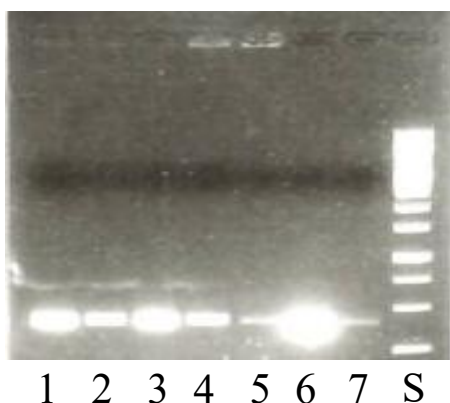
4.4.3 Fragmentanalys

Slutanalysen för bestämningen av DNA-fragmenten utförs med användningen av en kapillärelektrofores med Genetic Analyzer 3500 (Thermo Fisher Scientific) med åtta kapillärer. DNA-fragmenten amplifieras genom ett PCR-program med användning av en fluorescerade primer. De fluorescerande PCR-produkterna tillsätts med en storleksmarkör (GeneScan LIZ 600), vilket är DNA-fragment med kända storlekar som tillsätts med en annan fluorescent än PCR-produkterna och denatureras innan elektrofores. Resultaten analyseras med hjälp av Genemapper från Thermo Fisher.

5. Resultat

5.1 Gelelektrofores

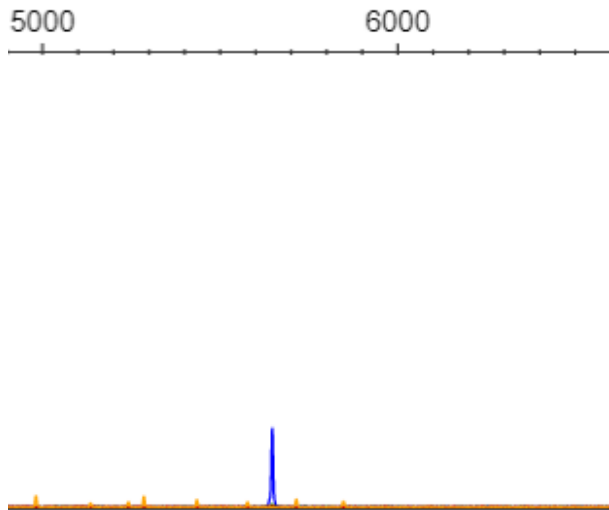
PCR-produkter från 5 möjliga transgena linjer samt en positiv kontroll och ett vattenprov analyseras på gelelektrofores. Resultatet (se Fig. 1) visar att samtliga 6 linjer var transgena, det vill säga, uppvisar amplifiering av *nptII*-genen. Detta indikerar på att plasmiden har integrerats i arvsmassan. Dock visar även vattenprovet amplifiering av *nptII*, vilket tyder på kontaminering av vattnet, vilket gör det svårt att dra säkra slutsatser utifrån de resultat som noterats (se Fig. 1).



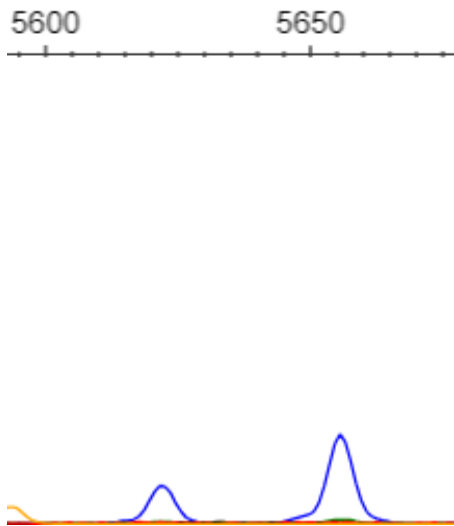
Figur 1 Resultat från gelelektrofores. Nummer 1–5 är möjliga transgena linjer, 6 är positiv kontroll med *nptII*. 7 är vattenkontroll och 8 är stege.

5.2 Kapillärelektrofores

Kapillärelektrofores används för att ta reda på om det har skett en mutation i genen av intresse i de möjliga transgena linjerna. Resultatet från kapillärelektroforesen visar två olika toppar för gen X (se Fig. 3) i jämförelse med vildtypen som endast visar en stor topp (se Fig. 2). Detta indikerar att det har skett en mutation. Toppen för gen X i vildtyp representerar båda allelerna, medan två toppar för gen X i mutationslinjen representerar en mutation. Då ingen av de två topparna uppvisar lika många baspar som vildtypen kan slutsatsen dras att en mutation skett i båda alleler. Det förmodas att en mutation i båda alleler har större påverkan på fenotypen jämfört med en mutation i enbart ena allel. För att kunna dra slutsatser gällande huruvida mutationerna i *Lepidium* resulterat i förändring av sammansättningen i frökakan krävs vidare odling av dessa linjer samt en efterföljande analys av glukosinolathalten i frökakan.



Figur 2 Resultat från kapillärelektrofores. Toppen visar gen X hos den vildtypen.



Figur 3 Resultat från kapillärelektrofores. Topparna visar gen X i en mutationslinje.

6. Diskussion

Resultatet från gelelektrofores visar att plasmiden har interagerats i arvsmassan. Men eftersom vattenprovet är kontaminerat, går det inte med säkert säga att det har skett. Därför körs en kapillärelektrofores för att ta reda på om en mutation har skett i genen av intresse. I det här experimentet framtogs mutationer i båda alleler för *Lepidium*, som kan resultera i att dess frökaka får en lägre glukosinolathalt. För att kunna dra slutsatser gällande sammansättningen av frökakan krävs att dessa linjer odlas vidare och tillåts sätta fröer, som sedan kan analyseras. Resultatet från kapillärelektrofores visar däremot att det är möjligt att använda CRISPR-konstruktet för att få den önskvärda genotypen.

I och med att *Lepidium* har flera goda egenskaper som att den är köldtålig, sidoskott bildas på överdelen av stammen och resistens mot pollenskalbaggen. Gör det till en bra gröda att använda för odlare som eftersöker dessa egenskaper. Dessutom går det att använda *Lepidium* för flera olika ändamål, exempelvis som biobränsle, djurfoder, fånggröda samt som en oljegröda.

CRISPR kan vara ett bra verktyg för att domesticera *Lepidium*. CRISPR möjliggör specifika ändringar i genomet. Detta i kontrast mot traditionellt växtförädlingsarbete där korsning sker över flera generationer för att nå önskvärda egenskaper. Dessutom kan fördelaktiga egenskaper förloras på vägen vid traditionell förädling och det tillkommer svårigheter gällande att spåra ifrån vilken förälder genomet härstammar (Breseghello & Coelho 2013).

Då det redan finns mycket kunskap att tillgå gällande *Lepidium* underlättar detta för att få fram de egenskaper som eftersträvas. Det finns dessutom mycket information som berör *Arabidopsis* och med tanke på de lösa artbarriärerna emellan närbesläktade arter som *Lepidium* och *Arabidopsis* möjliggörs användandet av den genetiska informationen som finns tillgänglig om *Arabidopsis* för *Lepidium*.

Normalt sett när CRISPR/Cas9 används i växtförädlings syfte kategoriseras växtmaterialet som en GM-gröda. Dessutom är det en väldigt kostsam process då den kräver mycket resurser. I detta arbete integrerades främmande DNA vid transformeringen av *Lepidium*, men det främmande DNA:t kan förädlas ut ur genomet

med hjälp av traditionell växtförädling, vilket borde resultera i att det inte klassificeras som en GM-gröda. Men i dagsläget klassificeras det ändå som en GM-gröda eftersom CRISPR/Cas9 användes. Förhoppningsvis ändras regleringarna kring CRISPR/Cas9 i framtiden och bli mindre restriktiva. Detta skulle vara en fördelaktig riktning för framtiden vilket skulle lösa en del av de problem samhället står för idag med hjälp av dessa grödor.

Sammanfattningsvis är CRISPR en metod som lämpar sig som ett verktyg för att domesticera *Lepidium*. Dock krävs en förändrad lagstiftning för att mutationslinjer framtagna med hjälp av CRISPR-tekniken ska kunna odlas i Europa.

Referenser

- Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A. & Kellogg, E.A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, vol. 259 (2/4), pp. 89–120 Springer.
- Andersson, A.A.M., Merker, A., Nilsson, P., Sørensen, H. & Åman, P. (1999). Chemical composition of the potential new oilseed crops *Barbarea vulgaris*, *Barbarea verna* and *Lepidium campestre*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79 (2), pp. 179–186
- Arefaine, H., Rydhmer, L., Andersson, R. & Ivarsson, E. (2019). *Lepidium* cake as a feedstuff for pigs. *Livestock Science*, vol. 225, pp. 47–52
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J. & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 32, pp. 76–84 (Food Biotechnology • Plant Biotechnology)
- Breseghele, F. & Coelho, A.S.G. (2013). Traditional and Modern Plant Breeding Methods with Examples in Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61 (35), pp. 8277–8286
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M. & Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, vol. 62 (3), pp. 471–481 Elsevier Ltd.
- Bruetschy, C. (2019). The EU regulatory framework on genetically modified organisms (GMOs). *Transgenic Research*, vol. 28 (S2), pp. 169–174
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 70 (1), pp. 667–697 Annual Reviews.
- Geleta, M., Gustafsson, C., Glaubitz, J.C. & Ortiz, R. (2020). High-Density Genetic Linkage Mapping of *Lepidium* Based on Genotyping-by-Sequencing SNPs and Segregating Contig Tag Haplotypes. *Frontiers in Plant Science*, vol. 11 Frontiers. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00448>
- Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Challenges | Elsevier Enhanced Reader*. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.011>
- Genteknikens-utveckling-2019-red.pdf. Available at: <https://www.genteknik.se/wp-content/uploads/2020/02/Genteknikens-utveckling-2019-red.pdf> [2020-05-13]
- Graef, G., LaVallee, B.J., Tenopir, P., Tat, M., Schweiger, B., Kinney, A.J., Gerpen, J.H.V. & Clemente, T.E. (2009). A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 7 (5), pp. 411–421
- Gustafsson, C., Willforss, J., Lopes-Pinto, F., Ortiz, R. & Geleta, M. (2018). Identification of genes regulating traits targeted for domestication of field cress (*Lepidium campestre*) as a biennial and perennial oilseed crop. *BMC Genetics*, vol. 19 (1), p. 36
- Halkier, B.A. & Gershenzon, J. (2006). Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual review of plant biology*, vol. 57, pp. 303–333
- FAO, (2009). How to Feed the World in 2050. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf [2020-04-07]
- Ivarson, E., Ahlman, A., Lager, I. & Zhu, L.-H. (2016). Significant increase of oleic acid level in the wild species *Lepidium campestre* through direct gene silencing. *Plant Cell Reports*, vol. 35 (10), pp. 2055–2063

- Ivarson, E., Ahlman, A., Li, X. & Zhu, L.-H. (2013). Development of an efficient regeneration and transformation method for the new potential oilseed crop *Lepidium campestre*. *BMC Plant Biology*, vol. 13, p. 115
- Ivarson, E., Iven, T., Sturtevant, D., Ahlman, A., Cai, Y., Chapman, K., Feussner, I. & Zhu, L.-H. (2017). Production of wax esters in the wild oil species *Lepidium campestre*. *Industrial Crops and Products*, vol. 108, pp. 535–542
- Jiang, W.Z., Henry, I.M., Lynagh, P.G., Comai, L., Cahoon, E.B. & Weeks, D.P. (2017). Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 15 (5), pp. 648–657 John Wiley & Sons, Ltd.
- Jones, C.S. & Mayfield, S.P. (2016). *Our Energy Future: Introduction to Renewable Energy and Biofuels*. Berkeley, UNITED STATES: University of California Press. Available at: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=4068967> [2020-04-07]
- Kato-Inui, T., Takahashi, G., Hsu, S. & Miyaoka, Y. (2018). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. *Nucleic Acids Research*, vol. 46 (9), pp. 4677–4688
- McDougall, P. (2011). The cost and time involved in the discovery, development and authorisation of a new plant biotechnology derived trait. p. 24
- Merker, A., Eriksson, D. & Bertholdsson, N.-O. (2010). Barley yield increases with undersown *Lepidium campestre*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, vol. 60 (3), pp. 269–273 Taylor & Francis.
- Merker A, Nilsson P, Sveriges Lantbruksuniv., U. (Sweden) I.F.V. & Sutton Bridge Experimental Station, S. (1995). Some oil crop properties in wild *Barbarea* and *Lepidium* species. *Swedish Journal of Agricultural Research*, vol. 25 (4), pp. 173–178 (Swedish-Journal-of-Agricultural-Research (Sweden). (1995). v. 25(4) p. 173-178.)
- Moore, J.K. & Haber, J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16 (5), pp. 2164–2173
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15 (3), pp. 473–497
- Nilsson, P., Johansson, S.-Å. & Merker, A. (1998). Variation in seed oil composition of species from the genera *Barbarea* and *Lepidium*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, vol. 48 (3), pp. 159–164 Taylor & Francis.
- Nour-Eldin, H. & Halkier, B. (2009). Piecing together the transport pathway of aliphatic glucosinolates. *Phytochemistry Reviews*, vol. 8 (1), pp. 53–67 Dordrecht: Springer Netherlands.
- Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, S.R., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D. & Halkier, B.A. (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature*, vol. 488 (7412), pp. 531–534
- Ohnmeiss, T.E. & Baldwin, I.T. (2000). OPTIMAL DEFENSE THEORY PREDICTS THE ONTOGENY OF AN INDUCED NICOTINE DEFENSE. *Ecology*, vol. 81 (7), pp. 1765–1783 Ecological Society of America.
- Ortiz, R., Geleta, M., Gustafsson, C., Lager, I., Hofvander, P., Löfstedt, C., Cahoon, E.B., Minina, E., Bozhkov, P. & Stymne, S. (2020). Oil crops for the future. *Current Opinion in Plant Biology*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.12.003>
- Østerberg, J.T., Xiang, W., Olsen, L.I., Edenbrandt, A.K., Vedel, S.E., Christiansen, A., Landes, X., Andersen, M.M., Pagh, P., Sandøe, P., Nielsen, J., Christensen, S.B.,

- Thorsen, B.J., Kappel, K., Gamborg, C. & Palmgren, M. (2017). Accelerating the Domestication of New Crops: Feasibility and Approaches. *Trends in Plant Science*, vol. 22 (5), pp. 373–384
- Pingali, P.L. (2012). Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109 (31), pp. 12302–12308 National Academy of Sciences.
- Plant Domestication (2012). *Principles of Plant Genetics and Breeding*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 185–198.
- Schindele, A., Dorn, A. & Puchta, H. (2020). CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 61, pp. 7–14 (Plant Biotechnology • Food Biotechnology)
- Tayo, T., Dutta, N. & Sharma, K. EFFECT OF FEEDING CANOLA QUALITY RAPESEED MUSTARD MEAL ON ANIMAL PRODUCTION - A REVIEW. *Agricultural Reviews*, vol. 33 (2), pp. 114–121
- Tripathi, J.N., Ntui, V.O., Ron, M., Muiruri, S.K., Britt, A. & Tripathi, L. (2019). CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Communications Biology*, vol. 2 (1), pp. 1–11 Nature Publishing Group.
- Ulén, B. & Aronsson, H. (2018). Nitrogen and phosphorus leaching under the potential biennial oilseed plant *Lepidium campestre* L. in a field trial. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, vol. 68 (6), pp. 555–561 Taylor & Francis.
- Züst, T., Joseph, B., Shimizu, K.K., Kliebenstein, D.J. & Turnbull, L.A. (2011). Using knockout mutants to reveal the growth costs of defensive traits. *Proceedings of the Royal Society B*, vol. 278 (1718), pp. 2598–2603 The Royal Society.