

Gentechnologie maakt duurzame leliecultivars mogelijk

• TEKST : FRANS KRENS, BU BIODIVERSITEIT EN VEREDLING, PLANT RESEARCH INTERNATIONAL (PRI)
 • FOTOS: PRI

In de gentechnologie, het inbrengen van nieuwe eigenschappen op het celniveau van de plant, is het mogelijk om planten te ontwikkelen die niet of minder vatbaar zijn voor ziekten. Bij de ontwikkeling van nieuwe leliecultivars zijn de ontwikkelingen al in een vergevorderd stadium. Inmiddels is het mogelijk om met de zogenaamde merkervrije gentech-methode cultivars te ontwikkelen met gunstige eigenschappen. Deze lelies voldoen aan de regels van de Nederlandse en Europese overheid.



Links: schubje; midden: blad; rechts: wortel; boven: transgene lelie voor uitknippen; onder: merkervrije transgene na uitknippen. Het gen wat blauwkleuring geeft, kan pas actief worden nadat met succes ongewenste stukken DNA zijn verwijderd

Vanuit de consumenten bestaat nogal wat reserve tegen de ontwikkelingen op het gebied van de gentechnologie, vooral vanwege de onduidelijkheid over het nut ervan voor henzelf of hun omgeving. Deze technologie zou juist positief kunnen werken, omdat de kunstmatig ingebrachte eigenschappen kunnen bijdragen aan een duurzame teelt met minder gewasbeschermingsmiddelen. Op termijn kunnen er mogelijkheden ontstaan voor het telen en vermarkten van dit type gentech-siergewassen. Genetische modificatie van monocotyle siergewassen, waaronder lelie, bleek in het verleden niet altijd even gemakkelijk. Daarbij moeten gentechnologie-gewassen die men in

Nederland zou willen telen en vermarkten vrij zijn van ongewenste genen, en dit geldt dus ook voor de nieuwe generatie transgene lelies. Er is nu een methode ontwikkeld om zogeheten 'merkervrije' gentech-lijes te produceren. Genen, verantwoordelijk voor interessante eigenschappen, zijn in toenemende mate beschikbaar, en problemen in de gangbare teelt zijn er genoeg. De discussie over de acceptatie van gentechnologie is in gang. Maar wie durft een oplossing te zoeken in deze nieuwe gentech-richting?

BACTERIE ALS HULPMIDDEL
 Grofweg zijn er twee methoden om

planten te transformeren. Eén is een mechanische methode waarbij kleine bolletjes gecoat met DNA in plantencellen worden geschoten onder hoge heliumdruk. Deze methode is gebruikt om Longiflorumlelies genetisch te modificeren. Evaluatie leerde echter dat deze methode voor het maken van merkervrije gentech-lijes niet voldeed. Hierbij is het namelijk nodig om naast het gewenste gen en het in eerste instantie noodzakelijke selectiegeen ook de genen in te brengen die het mogelijk maken om ongewenste genen later te kunnen verwijderen. Hiervoor moeten netjes in één aaneengesloten stuk DNA tenminste vier genen in de plant ingebracht worden. Dit bleek voor deze mechanische methode een onmogelijke opgave. Dus richtten de medewerkers van PRI (het betrokken onderdeel van PPO-Lisse is in 2005 onderdeel van PRI geworden) zich in het tweede deel van het project op een andere methode. De andere methode is biologisch en maakt gebruik van de bodembacterie *Agrobacterium tumefaciens*, die op natuurlijke wijze nieuwe genen, dus nieuwe eigenschappen in planten inbrengt. Deze bacterie wordt nu gebruikt om niet langer de door hem gewenste genen in te brengen, maar de genen die wij als mensen graag in planten ingebracht zien. Vanwege de recent ontdekte mogelijkheden bij monocotylen zoals lelies richtten de medewerkers van PRI zich op deze *Agrobacterium*.

VERSCHILLEN IN CULTIVARS
 Het ontwikkelen van een transformatiemethode met *Agrobacterium* begint met het speuren naar het meest ge-

schikte uitgangsmateriaal van de plant om aan de bacterie bloot te stellen. De bacterie kan dan het DNA overdragen en daarna moeten uit de getransformeerde cellen weer intacte planten geregenereerd kunnen worden. Wortels, bolschubben, stengels en bladeren werden getest, maar zonder succes. Regeneratie was soms wel mogelijk, maar van genoverdracht was geen sprake. Uiteindelijk bleek callus (een soort wildgroei van cellen zonder structuur), opgewekt op meeldraadsteeltjes (filamenten) of op de stijl, geschikt mits de bacterie tijdens de samengroei met de plantencellen maar niet teveel ammonium in de voeding kreeg. De benodigde periode van samengroei was ook enkele dagen langer dan bij andere gewassen. Het zo geoptimaliseerde protocol bleek vervolgens ook te werken bij callus dat op bolschubjes opgewekt kan worden. Dat laatste type callus is wat makkelijker beschikbaar. Met het protocol zijn de cultivars 'Snow Queen' en 'White Fox' (Longiflorums) en 'Barbados' en 'Marrero' (Orientals) met succes getransformeerd. Omdat uit verschillende onafhankelijke experimenten diverse transgene individuen zijn verkregen, kan de methode herhaalbaar en dus een succes genoemd worden. Bij Aziaten is echter geen resultaat verkregen en de efficiëntie hangt nog steeds af van de cultivar. Zo zijn Longiflorums veel mak-



Vijf individuele, transgene lelies in reageerbuis; beide buitenste twee Longiflorum 'Snow Queen' (aangeduid als SQ) en in het midden de Oriental 'Barbados' (aangeduid als BAR)

kelijker dan Orientals, en 'Barbados' weer makkelijker dan 'Marrero'.

MERKERVRIJ

Agrobacterium heeft voor ons DNA in lelie ingebracht bestaande uit een gewenst gen, een antibioticum resistentiegen (negatieve selectie), een uitknippen en een positief selectiegeen. Als voorbeeld voor een gewenst gen is het 'reporter'-gen GUS ingebouwd, en wel op zo'n manier dat we de door het gen geproduceerde blauwkleuring (indicator of reporter) pas kunnen zien als met succes de ongewenste genen zijn uitgeknipt. Het antibioticum resistentiegen maakte het mogelijk transgene cellen te selecteren door groei op hygromycine.

Het uitknippen werd geactiveerd zodra er transgene plantjes waren en het positieve selectiegeen maakte het mogelijk om op regeneratiemedium alleen scheutjes te laten regenereren die kwijt zijn wat zij kwijt moeten zijn. In het regeneratiemedium zit een stofje dat niet schadelijk is, behalve voor cellen met het positieve selectiegeen. Na uitknippen moet dat gen ook weg zijn, anders gaan de cellen alsnog dood. Met behulp van dit trucje kan voor merkervrije gentech-scheuten geselecteerd worden. Kleuring op GUS laat dan zien of alles gelukt is, en dit bleek het geval (zie foto).

Het onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.

GENETISCH MODIFICEREN: OP WEG NAAR DE IDEALE LELIE

In vegetatief vermeerderde gewassen of gewassen met een lange generatietijd kan veredeling via kruisen moeilijk of zelfs onmogelijk zijn. Genetische modificatie, het direct in een plant inbrengen van een nieuwe eigenschap door het kunstmatig inbrengen van het DNA, biedt dan mogelijkheden. Genetisch gemodificeerde gewassen worden ook wel transgene of gentech gewassen genoemd. Wereldwijd worden jaarlijks op zo'n 100 miljoen hectare (= 25 maal oppervlakte van Nederland) transgene gewassen geteeld. In de siergewassen gaat het om transgene rozen en anjers van Florigene met een veranderde bloemkleur. In de bolgewassen, zoals lelie en tulp, bleek het ontwikkelen van een protocol een stuk moeilijker, maar niet onmogelijk. Hiervoor is een middel nodig om de cellen met de nieuwe eigenschappen een voorsprong te geven bij hun verdere ontwikkeling tot hele plant. Meestal worden hier antibioticum resistentiegen voor gebruikt. Cellen zonder resistentiegen kunnen niet groeien op voedingsmedium met een antibioticum; cellen met zo'n resistentiegen, samen met het gen voor de gewenste eigenschap, wel. De Nederlandse regering heeft bepaald dat teelt van gewassen met zulke antibioticum resistentiegen vanaf 2004 verboden is; voor veldproeven geldt als datum voor ingaan van het verbod 1 januari 2009. De transgene lelies moeten dus vrij zijn van ongewenste genen en alleen maar de gewenste nieuwe eigenschap bevatten. Dit wordt 'merkervrij' genoemd. Transformeren (= genetisch modificeren) zonder selectiegeen of het later uitkruisen van apart ingebrachte selectiegeenen is bij veel bolgewassen geen alternatief, omdat de transformatiefrequentie te laag is of omdat de generatietijd te lang is. Er bestaat echter een techniek om in eerste instantie genen in te brengen en te benutten (zoals selectiegeenen) en die dan later weer uit de plant te verwijderen als ze niet langer nodig zijn. Deze techniek is gebruikt om merkervrije transgene lelies te produceren.