

S. Roest en H.G.M.J. Brueren Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek, en
P.W. Evers en E. Vermeer Instituut voor Bosbouw en Groenbeheer "De Dorschkamp"

Transformatie van de zomereik (*Quercus robur* L.)

Sinds 1983 treedt in Nederland een sterk verminderde vitaliteit op en vindt afsterving van de zomereik (*Quercus robur* L.) plaats t.g.v. een complex van oorzaken, zoals ongunstige weersomstandigheden in 1982 en 1983, de strenge winter van 1984/1985, herhaalde kaalvraat door insekten in de periode 1983 tot 1987, gevolgd door aantasting door pathogenen. In hoeverre lucht- en bodemverontreiniging aan dit proces hebben bijgedragen is niet duidelijk. Ook is onbekend hoe lang deze problemen zullen aanhouden. Kaalvraat in het voorjaar wordt veroorzaakt door larven van verschillende insekten, zoals de groene eikebladroller (*Tortrix viridana*) en de kleine wintervlinder (*Operophtera brumata*). Volgens onderzoek uitgevoerd op het Instituut voor Bosbouw en Groenbeheer 'De Dorschkamp' zijn vermoedelijk drie factoren van grote invloed op de insectenaantasting, nl. de grootte van de insectenpopulatie in het voorgaande jaar, de strengheid van de winter en de synchronisatie tussen het uitkomen van de eieren en het uitlopen

Summary

Transformation of *Quercus robur* L.

After infection of nodal stem explants of different clones of oak (*Quercus robur* L.) with a strain of *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens*, both carrying the β -glucuronidase (GUS) gene, and culture on hormone-free WPM medium, roots and calli were formed at the base of the explants. The histochemical assay revealed GUS activity in some root clones and calli. The expression of the GUS gene suggests successful transformation of oak, which makes this plant species amenable for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. The regeneration of transgenic plants has still to be achieved through the development of an appropriate regeneration procedure.

van de knoppen. In Nederland vindt geen bestrijding plaats van deze bladvreterende rupsen, terwijl in Midden Europa soms een bespuiting wordt uitgevoerd met een bacteriesuspensie van *Bacillus thuringiensis*, waarbij de rupsen worden gedood door een toxine dat door de bacterie wordt afgescheiden.

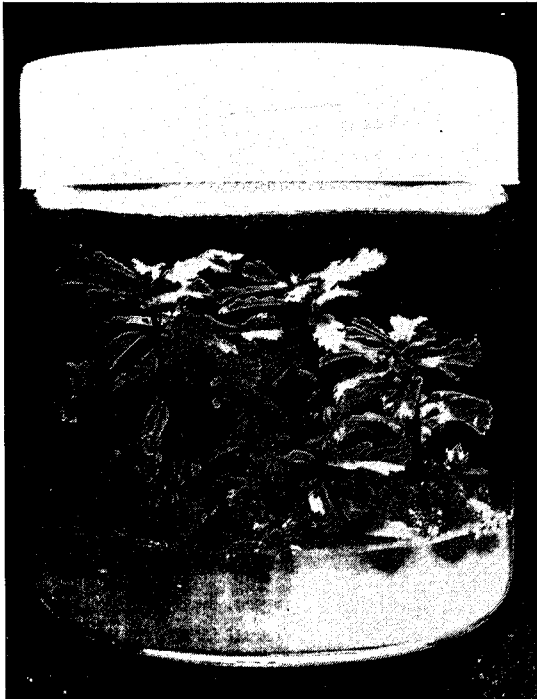
Transformatie

Door het toxine-gen van *Bacillus thuringiensis* (Bt) in te bouwen in de eik, zou het voor de rupsen minder aantrekkelijk kunnen worden, of zelfs dodelijk, de bladeren aan te vreten. Een aantal jaren geleden is op het Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek (CPRO) in samenwerking met 'De Dorschkamp', een onderzoek gestart naar de mogelijkheid om overdracht van genen (transformatie) en regeneratie bij de zomereik te realiseren.

Er zijn twee bacteriën die meestal gebruikt worden om overdracht van genen te bewerkstelligen, nl.

Agrobacterium tumefaciens, de veroorzaker van de kroongalziekte, die leidt tot tumorvorming bij vele waardplanten en *Agrobacterium rhizogenes*, de veroorzaker van de 'harige' wortelziekte, die aanleiding geeft tot wortelvorming bij een groot aantal waardplanten. Gebleken is dat de bacterie bij infectie een deel van het erfelijke materiaal (het zg. T(transfer)-DNA), overdraagt naar het chromosomale DNA van de plant. Door inbouw, via recombinant-DNA-technieken, van een genestukje DNA (het Bt-toxinegen), in het T-DNA van de bacterie, kan dit gen ook worden overgedragen en ingebouwd in de celkern van de plant. Wanneer dit gen op plantniveau tot expressie komt, kan de eik daardoor minder te lijden hebben van bladvraat door insektenlarven.

Voor het overdragen van genen moet een transformatieprocedure beschikbaar zijn. Voor een beperkt aantal houtige gewassen zijn transformatieprocedures ontwikkeld en bij slechts enkele soorten zijn transgene planten verkregen, zoals bij *Juglans regia*, *Malus pumila*, *Populus* spp, *Ribes nigrum*, *Rubus* spp. en *Vitis* spp.



■ Fig. 1 Axillaire scheutontwikkeling van stengelknoopexplantaten van kloon 7/72, 4 weken na enten op een WPM medium met agar 0,7%, sucrose 2%, BA 0,5 mg/l en myo-inositol 100 mg/l.

■ Fig. 1 Axillary shoot development of nodal stem explants of clone 7/72 after 4 weeks of culture on WPM medium, supplemented with agar 0.7%, sucrose 2%, BA 0.5 mg/l and myo-inositol 100 mg/l.

Pogingen om in vivo transformatie bij de eik te realiseren, waarbij de stam werd geïnfecteerd met *A. tumefaciens*, hebben niet geleid tot tumorvorming.

Op het CPRO is voorbereidend onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik werd gemaakt van in vitro gekweekte scheutjes. Stengelknoopexplantaten werden geïnfecteerd met een stam van *A. rhizogenes*. Op een hormoonvrij medium vormden twee van de 27 explantaten wortels, terwijl geen wortelvorming werd waargenomen aan ongeïnfecteerde explantaten. Het transgene karakter van de gevormde wortels kon evenwel niet worden aangetoond. Regeneratie van scheutjes uit explantaten van de zomereik wordt

incidenteel in de literatuur gemeld en is een essentiële voorwaarde om naderhand vanuit transgeen weefsel volledige transgene planten te regenereren.

In dit artikel zal aandacht worden geschonken aan nader onderzoek naar transformatie en regeneratie van de zomereik.

Materiaal en methode

Plantenmateriaal

Het onderzoek is uitgevoerd met drie klonen van eik (*Quercus ro-*

bur L.). Het materiaal wordt in vitro vermeerderd door stengelknoopexplantaten (met een lengte van 1-1,5 cm en met meerdere knopen per explantaat), te enten op een WPM medium. Op dit medium ontwikkelen zich uit de okselknoppen, die in de oksels van de blaadjes aanwezig zijn, gemiddeld drie axillaire scheutjes per explantaat, die na 1-1,5 maand zijn uitgegroeid tot een lengte van 3-5 cm (Fig. 1). De scheutjes worden dan opgedeeld in stengelknoopexplantaten, die worden gebruikt voor verdere vermeerdering via axillaire scheutvorming en voor transformatie. De scheuttopjes (1-1,5 cm) worden gebruikt voor beworteling op een MS medium. Na enkele weken is ongeveer 90% van de scheutjes beworteld (Fig. 2). De bewortelde scheutjes kunnen vervolgens naar grond worden overgebracht en tot planten worden opgekweekt.

Transformatie

Van 1-1,5 maand oude in vitro gekweekte scheutjes worden de top en de blaadjes afgesneden. Uit

■ Fig. 2 Wortelvorming van scheutjes van kloon 7/72, 4 weken na enten op een 0,5MS medium met agar 0,5%, sucrose 1% en IBA 0,3 mg/l.

■ Fig. 2 Root formation of shoots of clone 7/72 after 4 weeks of culture on 0,5MS medium, supplemented with agar 0.5%, sucrose 1% and IBA 0.3 mg/l.



de stengel worden knoopexplantaten (ca. 1 cm) gesneden die meteen na het snijden naar steriel water worden overgebracht om uitdrogen te voorkomen. Vervolgens wordt het water afgezogen en worden de explantaten gedurende een half uur geïnfecteerd in een suspensie van de betreffende bacteriestam. Daarna worden de explantaten horizontaal uitgelegd op een WPM medium in afwezigheid van zowel groeiregulatoren (hormonen) als een antibioticum. Na één dag worden de explantaten overgeënt op een hormoonvrij WPM medium, waaraan voor het afdoden van de bacteriën een antibioticum is toegevoegd.

Bij de keuze van de bacteriestammen is rekening gehouden met de mogelijkheid om op verschillende manieren te kunnen controleren of transformatie heeft plaatsgevonden. Na infectie met stammen van *A. tumefaciens* en *A. rhizogenes* kan dit in de eerste plaats gecontroleerd worden aan de hand van de vorming en door-groei van resp. tumoren en wortels op hormoonvrij medium. Als daarin tevens de productie van specifieke stoffen (opinen) kan worden aangetoond, is daarmee transformatie gerealiseerd.

Daarnaast kan voor controle gebruik worden gemaakt van zogenoemde 'merker genen'. In de gebruikte stammen van *A. rhizogenes* en *A. tumefaciens* zijn als merker genen het NPTII-gen en het GUS-gen aanwezig. Het NPTII-gen leidt tot resistentie van het transgene planteweefsel tegen het antibioticum kanamycine. Het GUS-gen zorgt voor de productie van β -glucuronidase in het transgene planteweefsel, dat histochemisch met een blauwkleuring kan worden aangetoond.

Resultaten

Dertien dagen na infectie van stengelknoopexplantaten met de *A. tumefaciens* stam A281 (pGU-



■ Fig. 3 Wortelvorming aan de basis van een stengelknoopexplantaat van kloon 7172, 16 dagen na infectie met de *A. rhizogenes* stam 9402 (pBI121) op hormoonvrij WPM medium met agar 0,8%, sucrose 2% en cefotaxime 300 mg/l.

■ Fig. 3 Root formation at the base of a nodal stem explant of clone 7172, 16 days after infection with the *A. rhizogenes* strain 9402 (pBI121) on hormone-free WPM medium, supplemented with agar 0.8%, sucrose 2% and cefotaxime 300 mg/l.

Sint) en uitleggen op een hormoonvrij WPM medium, hebben vier van de 25 explantaten tumoren gevormd aan de basis van het explantaat en wordt GUS-activiteit (blauwkleuring) waargenomen in het ontstane tumorweefsel. Ook na 27 dagen is GUS-activiteit aangetoond in de hierna ontstane tumoren. In controle calli, ontstaan op ongeïnfecteerde stengelknoopexplantaten, kon zoals verwacht geen GUS-activiteit worden aangetoond.

Na infectie van stengelknoopex-

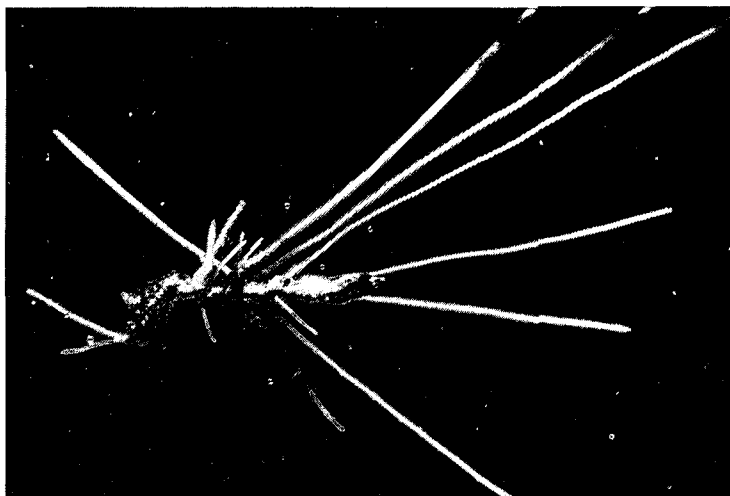
plantaten met de *A. rhizogenes* stam 9402 (pBI121) worden de eerste wortels gevormd aan de basis van de explantaten twee weken na infectie (Fig. 3). Uiteindelijk worden wortels gevormd die niet 'harig' zijn, aan 10-20% van de geïnfecteerde explantaten. Aan ongeïnfecteerde stengelknoopexplantaten die op een hormoonvrij medium zijn uitgelegd, treedt geen wortelvorming op of worden wortels gevormd op een later tijdstip en in een veel lagere frequentie.

Voor verdere controle op transformatie worden de meest gestrekte wortels van de explantaten afgesneden en in eerste instantie doorgeweekt op een WPM medium waaraan een antibioticum is toegevoegd (Fig. 4). Naderhand worden de wortels doorgeweekt op eenzelfde medium zonder antibioticum (Fig. 5). Op deze wijze zijn 11 steriele wortelklonen verkregen, waarvan vijf bij herhaling GUS-activiteit vertonen in de worteltopjes en het aangrenzende vaatgedeelte. In wortels ontstaan aan ongeïnfecteerde explantaten, kon zoals verwacht geen GUS-activiteit worden aangetoond.

Daarnaast is onderzoek uitgevoerd naar regeneratie van scheuten uit explantaten van de stengel (knopen en internodiën), het blad en de wortel en uit callusweefsel. Gebruikmakende van diverse concentraties en combinaties van groeiregulatoren (BA en NAA (naftylazijnzuur)) heeft dit bij geen van de klonen geleid tot scheutregeneratie. Wel werd regelmatig wortelvorming waargenomen (Fig. 6).

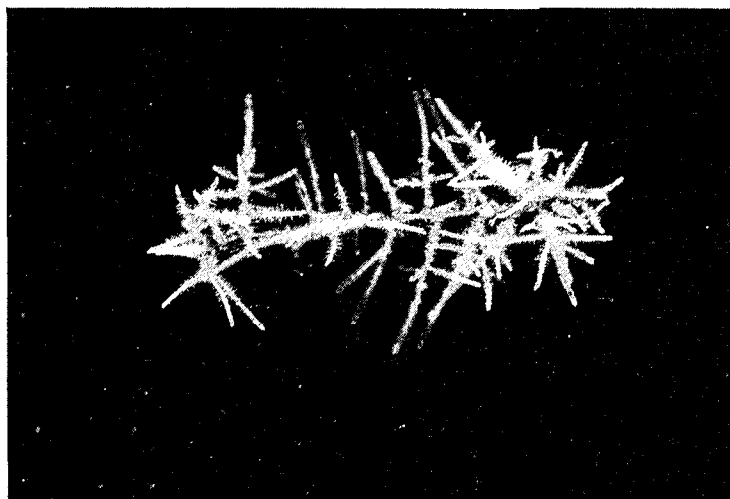
Samenvatting en conclusies

Na infectie van stengelknoopexplantaten van de eik met de *A. tumefaciens* stam A281 (pGU-Sint) en de *A. rhizogenes* stam 9402 (pBI121) worden op hormoonvrij medium resp. tumoren en wortels gevormd, waarbij in alle tumoren en een aantal wortelklonen bij herhaling GUS-activiteit kon worden aangetoond. Callus en wortels ontstaan aan ongeïnfecteerde explantaten vertoonden geen GUS-activiteit. Hiermee is op dit niveau aangetoond dat transformatie bij eik is gerealiseerd, hetgeen geleid heeft tot de vorming van transgeen tumor- en wortelweefsel. Dit betekent een eerste maar belangrijke stap om overdracht van gewenste genen via *Agrobacte-*



■ Fig 4 Subcultuur van een wortelkloon van kloon 85-3 op een WPM medium met agar 0,6%, sucrose 2,5%, IBA 0,3 mg/l, myo-inositol 100 mg/l en cefotaxime 300 mg/l.

■ Fig. 4 Root clone of 85-3 subcultured on WPM medium, supplemented with agar 0.6%, sucrose 2.5%, IBA 0.3 mg/l, myo-inositol 100 mg/l and cefotaxime 300 mg/l.



■ Fig. 5 Subcultuur van een wortelkloon van kloon 85-3 op een cefotaximevrij WPM medium met agar 0,6%, sucrose 2,5%, IBA 0,3 mg/l en myo-inositol 100 mg/l.

■ Fig. 5 Root clone of 85-3 subcultured on cefotaxime-free WPM medium, supplemented with agar 0.6%, sucrose 2.5%, IBA 0.3 mg/l and myo-inositol 100 mg/l.



rium tot stand te brengen. De regeneratie van scheutjes of embryoiden uit (on)getransformeerd weefsel, een essentiële voorwaarde om transgene planten te verkrijgen, vormt vooralsnog een groot probleem. Wanneer dit regeneratieprobleem is opgelost kan getracht worden om het gewenste Bt-toxine-gen naar eik over te brengen.

Bij de auteurs kan een meer uitgebreide versie van dit artikel met referenties en literatuurlijst worden opgevraagd.

■ Fig. 6 Wortelvorming aan de basis van een bladexplantaat van kloon 7/72, 7 weken na enten op een WPM medium met agar 0,7%, sucrose 2%, BA 10 mg/l en NAA 2 mg/l.

■ Fig. 6 Root formation at the base of a leaf explant of clone 7/72 after 7 weeks of culture on WPM medium, supplemented with agar 0.7%, sucrose 2%, BA 10 mg/l and NAA 2 mg/l.



Boomkwekerijen
ZUNDERT BV

Meirseweg 45
4881 MJ Zundert
Telefoon 01696-72250
Telefax 01696-75832

**Planten
voor bosaanleg en
landschapsbeplantingen**

Loofhout • Naaldhout • Populieren • Bomen
in plug en volle grond

Voor de modernste teelten - Geworteld in traditie