

Introductie van virusresistentie in lelie

Dr. S.A. Langeveld (af ronding verslag door Dr. G.J. de Klerk

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Juni 2004
PPO nr. 320438

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.



Projectnummer: 320438

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bloembollen

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 – 46 21 21

Fax : 0252 – 46 21 00

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Samenvatting	5
1 Inleiding.....	7
2 Materiaal en methode.....	9
3 Resultaten	11
3.1 Transformatie van de longiflorum 'Snow Queen' (samenvatting eerder onderzoek)	11
3.2 Transformatie van Aziatische hybriden en Orientals	13
3.3 DNA-constructen.....	14
3.4 Toetsing van Snow Queen: kasproeven.....	15
3.5 Toetsing van Snow Queen: veldproef.....	17
4 Conclusie en discussie	19
5 Producten opgeleverd gedurende de gehele looptijd.....	21

Samenvatting

Door middel van transformatie via de *particle gun* methode was in een voorgaand project resistentie tegen LSV geïntroduceerd in lelie (*Lilium longiflorum* 'Snow Queen'). In het huidige project werd de resistentie verder onderzocht. De resistentie bleek niet absoluut en niet altijd stabiel (lijnverschillen). Resistentie werd gevonden in de kas en ook in het veld. De twee meest resistente lijnen hadden wat minder groeikracht. Een kastoets gaf goede selectiemogelijkheden. Omdat door strengere regelgeving de aanwezigheid van antibioticumresistentie in de geproduceerde transgene planten marktintroductie onmogelijk maakt, moet het beschikbare manteleiwitgen middels een merkervrije techniek ingebouwd worden. Onderzoek om de resistentie in te bouwen in andere lelies gebruik makend van de *L. longiflorum* procedure is daarom gestaakt.

1 Inleiding

Genetische modificatie biedt de mogelijkheid om een gen aan een bestaand genotype toe te voegen. Dit nieuwe gen kan zorgen voor bijv. ziekteresistentie, langere houdbaarheid of een andere bloemkleur. Er zijn twee verschillende manieren om het nieuwe gen toe te voegen. Er kan gebruik gemaakt worden van de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*. Deze bacterie heeft van nature de capaciteit om een stukje van zijn DNA naar het DNA van een gastheer-plant over te brengen. Middels moleculaire technieken is het relatief eenvoudig een gewenst stukje DNA in de bacterie te zetten die er vervolgens voor zorgt dat dit stukje ingebouwd wordt in individuele cellen in een gastheer-plant. In weefselkweek kan uit deze individuele cellen een complete plant gegenereerd worden die het ingebrachte stukje DNA in al zijn cellen heeft. De tweede weg is via beschieting met kleine kogeltjes die *gecoat* zijn met het in-te-brengen DNA. Dit DNA kan dan ook weer in het DNA van individuele cellen ingebouwd worden waarna in weefselkweek uit de getransformeerde cellen complete planten kunnen worden gegenereerd. Deze tweede methode staat bekend onder de naam *particle-gun* methode.

In voorgaand onderzoek (Langeveld, 1996) is voor de *Lilium longiflorum* cultivar 'Snow Queen' een protocol voor genetisch modificatie ontwikkeld met behulp van de *particle-gun* methode. Het voor de praktijk belangrijke ingebrachte gen was het gen dat codeert voor het manteleiwit van LSV. De transformatie zorgt dus voor resistentie tegen dit virus en bij gevolg wordt de opbrengstschade veroorzaakt door LSV gereduceerd. Evenals andere monocotylen is lelie moeilijk te transformeren via *A. tumefaciens*. Het grootste segment in de leliemarkt wordt ingenomen door cultivars uit de groep van de Aziaten, de Orientals en de LA-hybriden. Veredeling van deze lelies wordt op grote schaal uitgevoerd en er is een wens van de veredelaars om pathogeen-resistenties in de kruisingsveredeling toe te passen. Het protocol dat voor genetische modificatie van *longiflorum* lelies is ontwikkeld, is ook toepasbaar voor andere lelies. Wel zijn naar verwachting aanpassingen noodzakelijk om tot hetzelfde resultaat te komen. Het aanvankelijk doel van dit project was de ontwikkeling van een transformatie-protocol voor Aziatische lelies, Orientals en LA-hybriden waarbij virusresistentie wordt ingebouwd. Daarnaast werden DNA-constructen geproduceerd en werd de resistentie in de eerder verkregen transgene 'Snow Queen' in kasproeven en in een veldproef onderzocht.

2 Materiaal en methode

De aanpak is beschreven samen met de resultaten in sectie 3 en omvat weefselkweek- en transformatietechnieken en moleculaire en virologische technieken.

Weefselkweek

Er werden weefselkweekbolletjes geproduceerd via standaard procedures (Langens-Gerrits & de Klerk, 1999). Van schubjes van deze bolletjes werden plakjes van 1 mm gesneden met behulp van scheermesjes. De schijfjes werden geënt op medium met benzylaminopurine (BAP) + picloram waardoor callus werd gevormd. Na beschieting en selectie van het getransformeerde callus werd het overgebracht naar medium zonder BAP en picloram maar met naphthaleneazijnzuur (NAA).

Transformatie

Er werd gebruik gemaakt van de He200 BioRad particle gun. De parameters bij de beschieting zijn tijdens het Urgentie-programma bepaald en worden in de Resultaten-sectie aangegeven.

Toetsen

Transgene bolletjes werden uitgeplant in de kas en mechanisch geïnoculeerd. De planten werden na een groeiseizoen getoetst met ELISA en met PCR. Dit werd gedurende drie opeenvolgende jaren gedaan waarbij niet-resistente en weinig-resistente lijnen werden verwijderd. De veldproef werd verricht in België waarbij alle veiligheidsvoorschriften nauwkeurig in acht werden genomen. Het materiaal werd geoogst en getoetst in Lisse.

Ter controle werden in de experimenten niet-transgene lijnen meegenomen.

3 Resultaten

3.1 Transformatie van de longiflorum 'Snow Queen' (samenvatting eerder onderzoek)

De ingebrachte eigenschap was een LSV-mantelwitgen dat ingebouwd in het chromosomale DNA van lelieplanten resistentie geeft tegen LSV. Er werd bovendien gebruik gemaakt van kanamycine- en hygromycine-resistentiegenen. Dit zijn genen waarvan de eiwitproducten de antibiotica kanamycine en hygromycine onwerkzaam maken. Met deze antibiotica in het medium kunnen getransformeerde weefsels worden geselecteerd: alleen het getransformeerde weefsel groeit goed op media met deze antibiotica. Voor de introductie van het DNA is de *particle-gun* methode toegepast omdat in een in het kader van het Urgentie-programma uitgevoerde studie gebleken was dat de overdracht van eigenschappen naar lelie met *Agrobacterium* inefficiënt verloopt. (Langeveld, 1996)

Weefselweek uitgangsmateriaal

Bollen van *Lilium longiflorum* cv 'Snow Queen' uit een SE-gecertificeerde handelspartij (maat 9/10) werden ingezet op standaard lelie-weefselweek medium met NAA (0.05 mg/l). In de experimenten zijn de 'eerste generatie' weefselweekbolletjes gebruikt na een controle op de afwezigheid van de virussen LSV, LVX en LMoV met PCR. De schubben van deze bolletjes werden in 1-mm schijfjes gesneden en overgezet op callus-inductiemedium met BAP (0.1 mg/l) en picloram (1.24 mg/l). Beschieting van de schijfjes bleek optimaal na 7 dagen op callus-inductiemedium. Voor beschieting werd een osmotische behandeling (30 - 60 min. 7% sucrose) gegeven. Het optimum van de osmotische behandeling was op leliecallus uitgetest met anthocyaansynthese reporters Cl en B-peru uit mais [LJ013095-020295] afkomstig van Simon Goff. Het ingezette bolweefsel bleek op callusinductie-medium vaak geïnfecteerd te zijn. Deze infecties konden doelmatig bestreden worden door de antibiotica cefotaxime (100mg/l) en vancomycine (100mg/l) aan het medium toe te voegen.

Particle gun

Voor de introductie van DNA is gebruik gemaakt van de He200 BioRad particle gun. De parameters voor de beschietingen zijn in een Urgentie-programma studie bepaald voor verschillende weefseltypen van lelie. De in deze experimenten gebruikte He-druk bedroeg 2000-2200 psi, de afstand van het weefsel tot de membraanhouder was 8 cm, geschoten werd bij een vacuüm van 150 mBar, en de grootte van de gouddeeltjes was 1.6-3.0 micron (Aldrich). De hoeveelheid gebonden DNA was ongeveer 30 µg per 2.5 mg gouddeeltjes. Per beschieting werd met 0.1 mg goud op het weefsel geschoten.

DNA-construct

Ontwikkeling van de DNA constructen heeft plaatsgevonden tijdens het Urgentie-programma. Het eerste construct waarin het LSV-mantelwitgen was ingebouwd is een pBIN19 afgeleide met het hygromycine gen als selectie marker en het GUS-gen als reporter gen. Dit construct was gelinieerd met BgIII voordat het ingeschoten werd. Het tweede construct bestond uit pBIN19 zelf dat het kanamycine resistentiegen bevatte met daarin GUS-intron reporter gen. Dit construct was niet gelinieerd voor beschieting. Het hygromycine construct is nogmaals gecontroleerd op juistheid voor het definitieve experiment.

Transformatie-experimenten

- Bolschubben werden opgesneden in 1-mm schijfjes en op callus-inductiemedium geplaatst in een 25 °C licht-incubator. Het aantal ingezette platen bedroeg 50 met 25-30 schijfjes/plaat.
- Na 1 week incubatie op callus-inductiemedium werden 12 platen tweemaal beschoten met

pIC20H:LSVcp:GUSINT:Hyg en werden 10 platen tweemaal met pBIN19:GUSINT beschoten. Er werden bovendien twee controleplaten beschoten met goud zonder DNA. Na 12 dagen incubatie op callus-inductiemedium werden nog eens 12 platen met pIC20H:GUSINT:LSVcp:Hyg en 6 platen met pBIN19:GUSINT beschoten. Vlak voor beschieting werd het weefsel gedurende 30-60 minuten geïncubeerd in een MS-medium oplossing met 7% sucrose.

- Twee dagen na de beschieting werd het weefsel op vers callusinductie-medium overgezet. Het weefsel beschoten met pBIN19:GUSINT werd overgezet op medium met 50 µg/ml kanamycine. Het weefsel beschoten met pIC20H:GUSINT:LSVcp:Hyg werd op callus-inductiemedium zonder antibioticum overgezet. Twee platen beschoten met pBIN19:GUSINT en 2 platen beschoten met pIC20H:GUSINT:LSVcp:Hyg werden met X-Gluc gekleurd.
- Een week na beschieting werden alle beschoten weefsels overgezet op vers callus-inductiemedium met hygromycine (25 µg/ml) of kanamycine (50 µg/ml). De handelingen die tijdens de selectie-procedure op het materiaal werden uitgevoerd zijn : GUS-kleuring 5 weken na beschieting; GUS-kleuring 17 weken na beschieting; al het callus dat zich op dat moment gevormd had was GUS-positief; en was dus transgeen.
- Overzettingen op vers medium: 6 weken na beschieting overzetting op callus-inductiemedium met 25 mg/l hygromycine + 100 mg/l cefotaxime + 100 mg/l vancomycine; 12 weken na beschieting werd het materiaal wederom overgezet op dit medium; vanaf 5 maanden na beschieting is een deel van elk callus op regeneratie-medium overgezet (medium met NAA ipv BAP en picloram en met 10 mg/l hygromycine); overzetting van kanamycine-'resistente' calli 4 maanden na beschieting.
- Zes maanden na beschieting zijn 58 hygromycine-resistente calluslijnen geselecteerd. Uit het weefsel dat met pBIN19:GUSINT beschoten was zijn geen GUS-positieve calluslijnen ontstaan; De bollen werden opgeplant in pKII-kas voor controle op soortechtheid en productie. Een beperkte set planten in roset-stadium voor steelvorming werd geïnoculeerd met LSV.

Overerfbaarheid Pollen zijn door J van Tuyl gekruist met *Lilium longiflorum* cv 'Gelria'. Het resulterende materiaal werd getoetst en transgeen bevonden.

3.2 Transformatie van Aziatische hybriden en Orientals

Er is gestart met de selectie van virusvrij uitgangsmateriaal van cv 'Star Gazer' en cv 'Connecticut King' voor transformatie-experimenten. De eerste fase van het project, de inductie van callusgroei in een bepaald stadium van de weefselkweek, was al voorbereid in het kader van een stage-onderzoek (J. Wood, COWT).

Door de toegepaste transformatietechniek is naast virusresistentie ook antibioticumresistentie aanwezig. Vanwege aangescherpte regelgeving is uitvoer van een veldproef of vermarkting van transgene gewassen met een antibioticumresistentie in Nederland niet meer toegestaan. Er is momenteel geen transformatietechniek beschikbaar die met zekerheid leidt tot een commercieel bruikbaar product. In overleg met het bedrijfsleven is besloten om daarom geen andere lelies te gaan transformeren.

3.3 DNA-constructen

De DNA-constructen met combinaties van de manteleiwitgenen van LMoV en LSV en de beide selectie-genen hygromycine en BASTA zijn voltooid en gecontroleerd op juistheid. Er is een verbetering in de DNA-constructen doorgevoerd die het mogelijk maakt om bij siergewassen met grote chromosomen inzicht te krijgen in het aantal kopieën dat van de nieuwe eigenschap in het chromosoom aanwezig is. Voor de detectie van de nieuwe eigenschappen in de LSV-resistente lelie-lijnen bleek een Southern blot alleen onder bepaalde condities resultaat te geven. Echter, een Southern blot uitgevoerd onder deze condities, levert slechts gedeeltelijke informatie over de inbouw van de nieuwe eigenschap in het chromosomale DNA van getransformeerde planten.

De selectie op virusresistentie van nieuwe planten die uit kruisingen tussen transgene en niet-transgene ouders ontstaan zijn kan sterk versneld worden wanneer de nieuwe eigenschap in een vroeg stadium in deze planten gedetecteerd kan worden. De moleculaire detectiemethode moet dan wel elke insertie van deze eigenschap in het chromosoom zichtbaar kunnen maken. Er is daarom een plasmide geconstrueerd waarmee het bacteriële *lac*-eiwit als fusie-eiwit in bacteriën geproduceerd kan worden. Dit *lac*-fusie-eiwit kan enerzijds binden aan de *lac*-operator DNA-sequentie welke met de LSV-resistentie-eigenschap in de nieuwe transgene planten werd ingeschoten en kan anderzijds binden aan een calmoduline-ligande die het mogelijk maakt het fusie-eiwit snel op te zuiveren.

Door gebruik te maken van dit nieuwe eiwit kunnen DNA-fragmenten van LSV-resistente planten, die de nieuwe eigenschap bevatten alsnog op een Southern blot met een veel hogere gevoeligheid dan tot dusver aangetoond worden. Op deze wijze is het naar alle waarschijnlijkheid mogelijk de afzonderlijke integraties van de nieuwe LSV-resistentie-eigenschap in de chromosomen van 'Snow Queen' aan te tonen.

Ook is een plasmide ontworpen waarin de *lac*-operator DNA-sequentie die door dit eiwit gebonden wordt in multimere vorm aanwezig is. Door dit multimeer te koppelen aan de virusresistentie-eigenschap in toekomstige transformatie-experimenten, neemt de gevoeligheid van de methode sterk toe en kan op vrij eenvoudige wijze de integratie van nieuwe eigenschappen reeds in getransformeerd callusweefsel van bolgewassen aangetoond en bewezen worden. De methode is in een andere vorm reeds toegepast bij het zichtbaar maken van gen-inserties in genetisch getransformeerde zoogdiercellen. De methode zoals die hierboven beschreven is, heeft echter een veel breder toepassingsgebied. Ze is met name geschikt voor de bolgewassen met grote chromosomen. Maar in aanvulling op het in kaart brengen van afzonderlijke gen-inserties met Southern blots kan de methode ook gebruikt worden voor het zichtbaar maken van de inserties in chromosoompreparaten voor microscopische analyse. Dit verschaft extra informatie over de verschillende chromosomale gebieden die ontvankelijk zijn voor insertie van vreemde DNA-sequenties.

3.4 Toetsing van Snow Queen: kasproeven

De transgene lelies van cv 'Snow Queen' zijn getoetst op virusresistentie tegen LSV. Het resultaat van deze toetsing gaf 9 resistente moederbollen waarvan geen enkele dochterbol na inoculatie geïnfecteerd raakte. Geen van de calluslijnen gaf een consistent beeld van resistentie te zien. Echter van de controle planten raakt 90% geïnfecteerd terwijl van de transgene planten slechts 50% geïnfecteerd raakte. Voor heropplanting is een selectie gemaakt waaronder alle resistentie bollen. Deze bollen zijn opnieuw opgeplant en geïnoculeerd met LSV. In 1998 is de genetisch gemodificeerde cv 'Snow Queen' getoetst op resistentie tegen LSV na mechanische inoculatie. Het resultaat van deze toetsing heeft planten opgeleverd die niet geïnfecteerd raakten. De bollen van deze planten zijn vervolgens weer opgeplant in de PKII-kas en voor de tweede keer mechanisch geïnoculeerd met LSV. De geïnoculeerde planten zijn vervolgens getoetst met ELISA . De planten die negatief reageerden in ELISA zijn vervolgens nog eens getoetst met PCR.

Het resultaat van deze toetsingen is weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Toetsing met ELISA na inoculatie van getransformeerde en controle lelies. Van de getransformeerde lelies werd een reeks lijnen getest

plant materiaal	gezonde planten/geïnoculeerde planten
1.13	3/5
5.15	1/4
5.38	2/3
11.2	3/3
20.1	6/7
20.2	5/6
22.2	1/1
22.7	6/7
27.3	1/3
30.3	4/4
30.8	2/4
31.1	3/4
36.3	1/3
36.5	1/2
36.6	1/1
36.10	1/1
39.4	3/4
39.5	2/4
44.12	2/4
47.39	7/7
49.5	2/4
50.5	3/4
56.21	1/3
56.13	2/3
56.18	2/3
56.23	9/10
totaal	74/104 (71%)
controle	14/27 (52%)

Een aantal planten werd in dit experiment voor de eerste keer getoetst wegens vertraagde groei (geen stengelvorming op moment van inoculatie) in het voorafgaande jaar. Niet alle controle planten zijn in dit

experiment ziek geworden. Het waargenomen lage infectiepercentage van de controle (48%) maakt het resultaat minder betrouwbaar.

Toetsing van virusresistentie onder veldomstandigheden kan mogelijk aantonen of het resistentieniveau afdoende is voor bescherming tegen virusoverdracht door luizen. Hiertoe zijn alle in de tabel genoemde lijnen in weefselkweek gebracht. Ook zijn geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde niet-transgene bollen in weefselkweek gebracht. Op grond van de resultaten van de resistentie test van het jaar 1999 zijn er een aantal transgene lelies (nummers) geselecteerd en via weefselkweek vermeerderd. De bollen van deze nummers zijn vervolgens opgeplant in de PKII kas en getest op LSV-resistentie na infectie door bladluizen. Twee en vier maanden na inoculeren zijn de planten getoetst met Elisa. In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de kasproeven die in de afgelopen 3 jaar zijn uitgevoerd. In 1998 en 1999 is mechanisch geïnoculeerd. Elk jaar zijn niet-geïnfecteerde planten geselecteerd voor opplanting in het volgende jaar. De conclusies moeten met enige voorzichtigheid worden bekeken omdat er kleine aantallen (2-6) planten per lijn zijn getest.

Tabel 2. Een aantal transgene planten en controle planten werd geïnoculeerd m.b.v. bladluizen en na 2-4 maanden getoetst met ELISA. Dit experiment werd in drie opeenvolgende jaren gedaan.

	Controle planten	Transgene lijnen			
		aantal uitgeplant	lijnen* zonder zieke planten	lijnen met een lager percentage zieke planten dan de controle	aantal lijnen dat beter presteert dan de controle
	zieke planten (%)				
1998	97,1	88	11	63	74 (85%)
1999	18,5	44	4	3	7 (43%)
2000	78,9	26	1	10	11 (91%)

*lijn: bolletjes afkomstig van één bolletje dat uit transgeen callus is geregenereerd

In Tabel 3 staat het resultaat van toetsingen in drie opeenvolgende seizoenen van de nummers/lijnen die ook in de veldproef zijn gebruikt. Er zijn geen lijnen waarvan alle planten in alle testjaren nooit zijn aangetast. Er zijn 2 lijnen die gedurende drie jaar een lager percentage zieke planten hadden dan de niet-transgene controle.

Tabel 3. Resultaten van het experiment van Tabel 2 waarbij voor geselecteerde lijnen het resultaat wordt getoond. Deze lijnen zijn vervolgens voor de veldproef (3.5, Tabel 4) gebruikt.

Lijn	1998		1999		2000	
	# bollen	%ziek	# bollen	%ziek	# bollen	%ziek
T1 (5.38)	4	0	6	33	19	0
T2 (22.7)	4	0	4	50	37	5
T3 (36.10)	4	25-75	3	33	30	7
T4 (39.5)	4	25-75	6	67	45	7
T5 (49.5)	4	0	6	17	24	13
T6 (50.5)	4	0	6	50	28	4
T7 (36.3)	4	25-75	3	0	34	3

3.5 Toetsing van Snow Queen: veldproef

Door veranderende regelgeving (Beleidsnota Biotechnologie) kon geen toestemming worden verleend om de beschikbare transgene lelies te vermeerderen tot een vermarktbaar produkt. Ook mogen er in Nederland geen veldproeven worden gedaan met deze lelies. Dit heeft te maken met aanwezigheid van antibioticumresistenties in de transgene planten.

In overleg met de Sectie Lelie van Stiverbol is besloten om een veldproef in België te doen. Bolletjes werden vermeerderd en uitgeplant. Tijdens het groeiseizoen zijn tweemaal bladmonsters genomen die meegenomen zijn naar Nederland voor analyse. Bij de oogst zijn bollen met wortels en blad meegenomen naar Nederland voor analyse. De resultaten staan in Tabel 4.

De geogoste bollen met wortels worden gebruikt om te testen op aanwezigheid van het virus. Zoals verwacht, werden met een bladtoets lage aantallen geïnfecteerde planten gevonden. Het gaat in deze proef nl. om een primaire infectie. In dat geval is de aanwezigheid van virus in het blad moeilijk te testen vanwege een lage virusconcentratie.

Het aantal geïnfecteerde planten kan betrouwbaarder worden getoetst met een boltoets. Het bolmateriaal moest daarvoor eerst enige tijd bewaard worden en werd begin 2002 worden getoetst. het infectiepercentage was inderdaad hoger. Het verschil tussen transgene en gezonde planten is significant. ($P < 0,05$; Student t-toets).

Tabel 4. Infectiepercentage van transgene lelies na een jaar teelt in het veld. Zowel blad- als bolweefsel werden getest. In de voorgaande jaren zijn de lijnen op resistentie getoetst in de kas (zie Tabel 3).

		bladweefsel getest		bolweefsel getest	
		totaal getest	% ziek	totaal getest	% ziek
transgeen	T1 (5.38A)	19	0.0	19	0.0
	T2 (22.7Ca)	37	2.7	37	5.4
	T3 (36.10B)	30	6.6	30	6.6
	T4 (39.5A)	45	6.6	45	6.6
	T5 (49.5B)	24	12.5	24	12.5
	T6 (50.5B)	28	3.6	28	3.6
	T7 (36.3D)	34	2.9	34	2.9
	totaal	217	5.0	217	5.5
controle	G1	45	5.0	45	13.3
	G2	56	12.5	56	14.3
	totaal	101	8.9	101	13.9

4 Conclusie en discussie

Door middel van transformatie m.b.v. de *particle gun* methode is resistentie tegen LSV geïntroduceerd in lelie. De resistentie werd in een aantal opeenvolgende jaren getoetst in de kas en in het laatste jaar in het veld. De ingebrachte resistentie is niet absoluut en niet altijd stabiel (lijnverschillen). De twee meest resistente lijnen bleken wat minder groeikracht te hebben. De toegepaste kastoets geeft goede selectiemogelijkheden. Omdat door strengere regelgeving de aanwezigheid van antibioticumresistentie in de geproduceerde transgene planten marktintroductie van de verkregen resistente lelies onmogelijk maakt, moet het beschikbare manteleiwitgen middels een merkervrije techniek ingebouwd worden.

Literatuur

Langeveld, S.A. (1996): Introductie van resistentie tegen LSV in *Lilium longiflorum* 'Snow Queen' met behulp van genetische modificatie technieken. Rapport Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse.

Langens-Gerrits, . & de Klerk G.J.M (1999): Micropropagation of flower bulbs. Lily and Narcissus. in: R.D. Hall (ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 111: *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 141-147.

5 Producten opgeleverd gedurende de gehele looptijd

Protocol voor genetische modificatie van lelie en gemodificeerde, virusresistente lelies (partiële resistentie). Een kastoets geeft goede selectiemogelijkheden Omdat door strengere regelgeving de aanwezigheid van antibioticumresistentie in de geproduceerde transgene planten marktintroductie onmogelijk maakt, moet het beschikbare manteleiwitgen middels een merkervrije techniek ingebouwd worden.

artikelen

S.A. Langeveld; S. Marinova; M.M. Gerrits; A.F.L.M. Derks; P.M. Boonekamp (1997): Genetic transformation of lily. Acta Horticulturae 430: 290.

S.A. Langeveld, K. Pham, M. van Schadewijk, M. Langens, A.F.L.M. Derks. (1999) Eerste ervaringen met LSV-resistente 'Snow Queen'. Bloembollenkultuur, nov 1999

lezingen

3/3/1999 Jaarvergadering CIOPORA Nederland. Toepassing geotrooieerde technieken in de sierteelt (S. Langeveld).

9/2/2000 Jaarvergadering Lelie KAVB. Lezing 'Moleculaire veredeling' (S. Langeveld)

10/2/2000 Bezoek IBC (Europese journalisten). Lezing 'Moleculaire veredeling' (S. Langeveld)

16/3/2000 Jaarvergadering Stiverbol. Poster 'Genetische modificatie', (S. Langeveld ook namens K. Pham en M. v. Schadewijk.)

28-31/8/2000: VIIIth International Symposium on Flowerbulbs, Kaapstad, Zuid-Afrika Poster 'Genetic transformation of bulbous crops' (gepresenteerd door H. Gude). S. Langeveld mede namens K. Pham, M. van Schadewijk, D. Buma, M. Langens-Gerrits, A. Bach en T. Derks

4/10/2000 Vergadering sectie Lelie van Stiverbol, Akersloot. Presentatie over voortzetting van het transformatie onderzoek (M. Langens).