

Ontwikkeling van een protocol voor de transformatie van iris; introductie van resistentie tegen irismozaïk virus (IMMV)

Dr. S.A. Langeveld (afroning verslag door Dr. G.J. de Klerk)

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Juni 2004
PPO nr. 320439

© 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: 320439

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 Regeneratie / transformatie.....	11
3.2 Virologie/moleculaire technieken.....	12
3.3 Selectie getransformeerd callus-weefsel.....	13
3.4 Verkregen resistentie	14
4 CONCLUSIE EN DISCUSSIE	15
5 PRODUCTEN OPGELEVERD GEDURENDE DE GEHELE LOOPTIJD VAN HET PROJECT	17

Samenvatting

Twee iris cultivars, Blue Magic en Blue Sail, werden in weefselkweek gebracht en callus werd geïnduceerd. Dit callus werd genetisch gemodificeerd met virusresistentie via de *particle gun* procedure die eerder voor lelie was ontwikkeld. Van een van de cultivars, Blue Magic, werden getransformeerde planten in de kas opgekweekt en getoetst op resistentie. De planten waren resistent. De verkregen resistentie was partieel, maar kan verbeterd worden door andere resistentie-mechanismen in te bouwen in plaats van of naast het nu ingebouwde mechanisme. De getransformeerde cultivar is een chimeer en bij transformatie treedt ontmenging van de chimeren op. Het is de vraag of de bijzondere eigenschap van de chimere cultivar behouden blijft. In het veld verkregen sporten zijn waarschijnlijk altijd chimeren. De getransformeerde cultivar kan niet in de praktijk gebruikt worden omdat er naast de virusresistentie ook antibioticumresistentie aanwezig is. Vanwege de verscherpte regelgeving mogen deze planten niet in de open lucht geteeld worden.

1 Inleiding

In iris komt het irismozaïek virus (IMMV) algemeen voor. Het grote schadelijke effect van de virusinfectie op het uiterlijk van de plant en de bolopbrengst bleek voor het eerst toen in de jaren zeventig enkele cultivars virusvrij gemaakt werden. De sterke verbetering van de kwaliteit van de bloem en van de bolopbrengst in virusvrije planten hebben de aanzet gegeven tot het virusvrij-maken van een groot aantal andere cultivars die tezamen 80% van het iris-areaal in Nederland vertegenwoordigen. In de praktijk blijkt dat zonder (kostbare) voorzorgsmaatregelen snel herinfectie optreedt.

In iris is natuurlijke resistentie tegen IMMV niet of slechts in beperkte mate aanwezig. Daarom zijn er problemen met het inkruisen van resistentie middels klassieke veredeling. In iris wordt kruisingsveredeling sowieso nauwelijks uitgevoerd omdat er weinig geniteurs met nieuwe eigenschappen beschikbaar zijn. Met een protocol voor genetisch modificatie kunnen efficiënter dan met kruisingsveredeling nieuwe eigenschappen zoals virusresistenties en schimmelresistenties aan het bestaande assortiment van cultivareigenschappen worden toegevoegd. Voor iris is momenteel echter geen transformatie-protocol beschikbaar zodat er weinig mogelijkheden zijn om nieuwe eigenschappen met betrekking tot pathogeen-resistentie, houdbaarheid en kleur te introduceren. Genetische modificatie wordt op het LBO/PPO onder andere bij lelie toegepast waarbij resistenties tegen het symptoomloos lелиevirus en leliemozaïekvirus worden ingebouwd (zie project 320438).

Het doel van dit project was de ontwikkeling van een transformatie-protocol voor iris waarbij een stabiele overerving wordt verkregen van de geïntroduceerde eigenschappen, in dit project resistentie tegen het IMMV. Vervolgens is inbouw van andere pathogeen resistenties in principe ook mogelijk. Een virusvrije teelt van iris geeft een grotere bolopbrengst. Ook treedt een verbeterde uitbloei van de snijbloem op en is de houdbaarheid op vaas beter. Introductie van genen die de houdbaarheid beïnvloeden met het ontwikkelde transformatieprotocol behoort eveneens tot de mogelijkheden.

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.

Het onderzoek omvat twee aspecten. Het eerste aspect betreft de ontwikkeling van een transformatie-regeneratie-protocol voor iris. Nieuwe weefselkweektechnieken moeten worden ontwikkeld voor de selectie van getransformeerde plantencellen, de gevoeligheid voor verschillende selectiemiddelen moet worden bepaald, en verder moet het regeneratievermogen van verschillende type weefsels onderzocht worden. In dit deel van het onderzoek is gebruik gemaakt van de kennis die tijdens het virusvrij-maken van iris en in het onderzoek naar de transformatie van lelie verkregen is. DNA wordt ingebracht middels de *particle gun* methode. Het tweede onderdeel betreft de constructie van recombinant-DNA moleculen die in de transformatie van iris gebruikt zullen worden. De methode om via recombinant-DNA technieken virusresistentie te verkrijgen is een bekende en beproefde methode. Als resistentie-eigenschap zal het manteleiwitgen van het IMMV in de chromosomen van iris geïntroduceerd worden.

2 Materiaal en methode

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

Plantmateriaal

Het onderzoek werd gedaan bij twee cultivars, Blue Magic en Blue Sail.

Weefselweek

Het weefselweekmedium was een standaardmedium voor iris (Van der Linde et al., 1988) waarbij 'sterke' auxines (picloram en 2,4-D) werden getoetst op hun capaciteit callus te induceren. Regeneratie uit dit callus gebeurde vervolgens op medium waaruit de 'sterke' auxines waren weggelaten (zie Resultaten sectie voor de procedure). De selectiemarkers waren hygromycine resistentie en BASTA resistentie. Na de transformatie werd het getransformeerde callus hiermee geselecteerd.

Transformatie

De transformatie werd uitgevoerd via de *particle gun* methode in beginsel volgens procedures ontwikkeld voor transformatie van lelie (zie verslag van project 320438).

3 Resultaten

3.1 Regeneratie / transformatie

Dedifferentiatie van axillaire meristemen (Blue Magic) en hoofd meristemen (Blue Sail) op media (Murashige and Skoog, 3% suiker) met verschillende hormoonconcentraties leidde tot vorming van callus (5 μ M picloram, NAA of 2,4-D met 0,5 of 5 μ M BAP; callus van alle cultures werd overgezet naar 5 μ M 2,4-D + 0,5 μ M BAP). Het bleek mogelijk dit callus te vermeerderen en het groeide gedurende de drie jaar dat het aangehouden werd. Het callus werd fel geel. Het regenereerde scheuten op aangepast medium. Deze scheuten konden aangezet worden tot bolvorming. Om nieuw plantmateriaal van het callus te verkrijgen zijn de volgende stappen in de procedure gevolgd: Het callus werd overgezet naar medium zonder hormonen dan wel naar medium met een lage NAA-concentratie (0.1 μ M). De cultures werden 6 weken bij 20 °C zonder licht geplaatst, en 7 weken bij 15 °C met een licht/donker regime (16 uur/etmaal). De ontstane spruiten werden overgezet op bolinductie medium (= 6% suiker / 0.15 μ M NAA) voor 6 weken bij 15 °C met een licht/donker regime (16 uur/etmaal), 8 weken bij 5°C zonder licht en vervolgens 14 weken bij 20 °C eveneens zonder licht. De gevormde bolletjes werden geoogst, in houten kistjes met aarde opgeplant en gekweekt bij 17 °C met een licht/donker regime (16 uur/etmaal). Bij Blue Magic werden 20 grote bolletjes (163 ± 18 mg) verkregen. Na twee seizoenen en na bewaring bij 20°C wogen ze $1,45 \pm 0,20$ g. Bij Blue Sail werden 53 bolletjes verkregen (174 ± 9 mg; na 2 seizoenen en na bewaring bij 20°C: $1,93 \pm 0.17$ g). De gevoeligheid van het callus voor BASTA en hygromycine werd onderzocht. Voor hygromycine bleek 25 μ g/ml effectief, voor BASTA 5 μ g/ml. De experimenten zijn herhaald. In de gevoeligheid voor BASTA bleek een sterke variatie te zijn.

Transiënte expressie van het 35S-GUS-gen in verschillende type weefsel van iris werd onderzocht. Een opmerkelijk resultaat was dat ook in bolweefsel van iris afkomstig uit weefselweek veel transiënte expressie werd waargenomen, dit in tegenstelling tot de geringe expressie die in leliebolschubben werd waargenomen.

Beide onderzochte cultivars zijn chimere. Er is in de wetenschappelijke literatuur de algemene mening dat chimere ontmengen als uit een chimere plant scheuten adventief gevormd worden. Transformatie van planten berust erop dat in individuele cellen her en der in het weefsel nieuw DNA aan het oorspronkelijke DNA wordt toegevoegd. Deze getransformeerde cellen kunnen in weefselweek door adventieve regeneratie hele nieuwe planten vormen. Hierbij gaat de chimere structuur zeker verloren. Als de bijzondere eigenschap van de chimere het gevolg juist van de aanwezigheid van twee verschillende genotypes (bijv. bij chimere planten met bladeren met witte randen waarin de witte cellen een ander genotype hebben dan de groene cellen), of als de regeneratie plaatsvindt uit niet-gemuteerde cellen, zal de bijzondere eigenschap verloren gaan. In het veld aangetroffen sporten zijn overigens vrijwel altijd chimere.

3.2 Virologie/moleculaire technieken

Voor de introductie van resistentie tegen IMMV werd het manteleiwitgen gebruikt. Met potyvirus specifieke PCR-primersets is dit gen uit een veldisolaat in de vorm van een DNA-fragment geïsoleerd. Van dit fragment is de nucleotidenvolgorde bepaald. Het fragment bevat een gedeelte van het NlB-replicase cistron, het volledig manteleiwit cistron en het volledige 3' onvertaalde uiteinde van het IMMV virus RNA. De IMMV-sequentie is vergeleken met die van andere potyvirussen. Hiervoor werd de database van bekende potyvirussequenties geactualiseerd met speciaal ontwikkelde programmatuur. Uit de vergelijking, een clusteranalyse, bleek dat het IMMV een nieuw potyvirus is dat geen stamverwantschap vertoont met ander potyvirussen. Voor detectie van IMMV in weefselweek materiaal is een specifieke primerset voor PCR ontworpen. Voor introductie van het IMMV manteleiwitgen in iris met de particle gun is een nieuwe DNA vector gemaakt waarin het gen in combinatie met hygromycine resistentiegen en het bar-gen is ingebracht. De volgende DNA-constructen zijn gebruikt: *pBRC_hyg_IMMVcp*, dit construct is opgebouwd uit de pBRCexp vector die is afgeleid van de vector PBRI221 zoals beschreven door Jefferson. De pBRCexp vector is in de BamHI site voorzien van een cDNA-fragment waarop het IMMV-manteleiwitcistron is gelegen en van een EcoRI-HindIII fragment dat het hygromycine gen bevat onder controle van de 35S-promoter en de nosT terminatorsequentie. *pSK+GUS* een plasmide met het GUS reporter-gen onder controle van de 35S-promoter. *pBRC_hyg_IMMVcp_BASTA*: als pBRC_hyg_IMMVcp met extra bar-gen onder controle van 35S promoter.

3.3 Selectie getransformeerd callus-weefsel

Het callus werd verkregen door middel van hormoonstimulatie van meristemen van de cvs 'Blue Sail' en 'Blue Magic', op basis van visuele selectie en op basis van het vermogen om het reporter-gen GUS onder controle van de 35S-promoter efficiënt tot expressie te brengen. Het geïsoleerde callus gaf een zeer efficiënte expressie van GUS te zien. Vervolgens is het callusweefsel gebruikt voor de introductie van het IMMV-manteleiwitgen, het GUS-gen en het hygromycine gen met de particle gun. Het beschoten weefsel werd op hygromycine-medium geselecteerd. Op verschillende tijdstippen na de beschieting is telkens een gedeelte van het geselecteerde weefsel op GUS-expressie getoetst. In enkele experimenten werd ook na twee maanden nog GUS-expressie gevonden waarbij in het callus gedifferentieerde delen in ontwikkeling waren die een zeer sterke GUS-activiteit lieten zien. Callus van de virusvrije cultivars 'Blue Sail' en 'Blue Magic' werd geprepareerd in stukjes van 3-4 mm midden op een Petri schaal met hetzelfde hormoonmedium geplaatst.

Dit geprepareerde callus werd twee dagen geïncubeerd bij 25 °C voorafgaande aan beschieting met de particle gun. Beschieting gebeurde twee maal met 2000 psi, afstand weefsel 4 cm, met gouddeeltjes (Aldrich) gecoat met gelineariseerd pBRC_hyg_IMMVcp en gelineariseerd pSK+GUS. Het callus werd na beschieting over de plaat verdeeld en gedurende 1 week bij 25°C zonder licht geïncubeerd en vervolgens overgezet op selectiemedium met 25 µg/ml hygromycine. Om de 4 tot 5 weken werd het callus op vers medium overgezet. Na 7 maanden werd de selectiedruk verhoogd naar 50 µg/ml hygromycine, na 8 maanden naar 100 µg/ml. Na 12 maanden werd een deel van het getransformeerde callus overgezet op medium zonder hormonen om regeneratie te induceren. Vorming van scheuten vond plaats na circa 1 maand incuberen op dit type medium zowel bij cv 'Blue Sail' als bij cv 'Blue Magic'.

De aanwezigheid van het IMMV-manteleiwitgen en het hygromycine selectiegen werd aangetoond met PCR waarbij gebruik is gemaakt van specifieke primersets voor beide genen. Gedurende de selectie op hygromycine bleek dat in de controle platen met onbeschoten callus nog veel weefsel zelfs bij hogere concentraties hygromycine doorgroeide, pas na langdurige selectie waarbij de concentratie van hygromycine geleidelijk werd opgevoerd kon een duidelijk verschil waargenomen worden tussen de calluslijnen die wel en niet getransformeerd waren. Deze verschillen correleerden volledig met de resultaten uit de PCR-reacties.

3.4 Verkregen resistentie

Van materiaal van Blue Magic dat in de kas was gekweekt is, werd virusresistentie bepaald. Er was geen absolute resistentie maar de infectie was duidelijk minder in de transgene partij (7.6%, 53 planten getoetst) dan in de controle partij (35,7%, 84 planten getoetst), waarbij de planten getoetst zijn met een ELISA op het bladmateriaal.

In de transgene irissen is naast virusresistentie ook antibioticumresistentie aanwezig. Vanwege aangescherpte regelgeving is uitvoering 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 daarom besloten het materiaal na toetsing te vernietigen en geen nieuwe transformaties uit te voeren.

4 Conclusie en discussie

Het blijkt goed mogelijk om virusresistentie in te bouwen met behulp van de *particle gun* procedure die eerder voor lelie was ontwikkeld. De in deze experimenten verkregen resistentie is partieel, maar kan verbeterd worden door andere resistentie-mechanismen in te bouwen in plaats van of naast het nu ingebouwde mechanisme.

Er moet nogmaals opgewezen worden dat er bij inbouw in chimeren ontmenging van deze chimeren op zal treden. Het is de vraag of de bijzondere eigenschap van de chimere cultivar behouden blijft. In het veld verkregen sporten zijn waarschijnlijk altijd chimeren.

5 Producten opgeleverd gedurende de gehele looptijd van het project

Protocol voor genetische modificatie van iris en gemodificeerde en virusresistente irissen (partiële resistentie).

Er zijn geen lezingen of publicaties specifiek aan dit onderzoek gewijd. In algemene lezingen en in lezingen m.b.t. transformatie lelie werd op aspecten van het onderzoek aan iris ingegaan.

Literatuur

P.C.G. van der Linde, G.M.G.M. Hol, G.J.Blom-Barnhoorn, J. van Aartrijk & G.J. de Klerk (1988) In vitro propagation of *Iris hollandica* Tub. cv. Prof. Blaauw. I. Regeneration on bulb-scale explants. *Acta Hortic.* 226: 121-128