



Merkervrije lelies met luisresistentie

Deel 1

Auteur: Dr. F.A. Krens



Productschap  Tuinbouw

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Wageningen UR Plant Breeding
Januari 2013

Eindrapport

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: Wageningen UR Plant Breeding

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van dit rapport kunnen door heffingbetalers van het internet gedownload worden via www.tuinbouw.nl van het Productschap Tuinbouw



Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR, Wageningen UR Plant Breeding

Adres : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 09 62
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.wageningenUR/nl/pri

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	2
2.1 Achtergrond problematiek	2
2.2 Voorwaarden Productschap Tuinbouw	3
3. Resultaten	4
3.1 IP verklaring	4
3.2 Vectorconstructie	4
3.3 Plant materiaal	5
3.3.1 Cultivars	5
3.3.2 Callusinductie	5
3.3.3 Regeneratievermogen	6
3.4 Transformatie	7
3.4.1 Toetsing transformeerbaarheid	7
3.4.2 Productie gentech lelies	8
3.5 Moleculaire karakterisering	8
3.5.1 PCR	8
3.5.2 Expressie, RT-PCR	9
4. Bijstelling tijdsplanning	10
5. Conclusies	11
Bijlage I. Artikel in Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 111:113-122 (2012).	1

1. Samenvatting

Nadat er in eerdere projecten een reproduceerbaar protocol was ontwikkeld om lelie cultivars van verschillende typen (Longiflorum en Oriental) genetisch te modificeren en de merker-vrije technologie (geen ongewenste genen meer, alleen doelgenen) toe te passen is er met vertegenwoordigers van lelie-veredelingsbedrijven binnen Stiverbol gediscussieerd over al of niet doorgaan hiermee en zo ja, wat voor doeleigenschap in te brengen. De uitkomst was om een project aan te vragen voor financiering door het Productschap Tuinbouw om merker-vrije gentech lelies te produceren met resistentie tegen bladluizen als overbrengers van virussen. Dit eindrapport deel I brengt verslag uit van de resultaten van dit PT project 12966.

Aangezien het de bedoeling was om in geval van succes daadwerkelijk door te gaan met zo mogelijk vermarkting van de gemaakte gentech lelies is er binnen dit project onderzocht of er sprake zou zijn van obtakels hiervoor met het oog op mogelijk relevante patenten op genen of protocollen (intellectual property = IP). Drie patenten bleken relevant en zij betroffen één protocol, het merker-vrij maken van gentech gewassen m.b.v. excisie door recombinatie, en twee genen, het equistatine gen (EQ) en het linalool synthase gen (LS). Vervolgens zijn juridisch bindende afspraken gemaakt met de eigenaren van die patenten, zijnde Plant Research International te Wageningen (protocol en EQ) en ENZA Zaden Beheer b.v te Enkhuizen en Monsanto Invest n.v. te Bergschenhoek (LS). In deze afspraken is geregeld dat er in geval van commercialisering van gentech lelies gemaakt binnen dit project een royalty-vrije licentie werd verleend op het protocol en dat er licenties werden verleend op de genen waarbij over eventuele royalties in een later stadium in redelijkheid onderhandeld zou worden met inachtneming van de investeringen door de sector.

Om de kans op succes in het produceren van gentech bladluisresistente lelies te vergroten gezien de eerdere geconstateerde cultivar-afhankelijkheid van regeneratie- en transformatie-efficiënties is op voorspraak van de lelie-bedrijven het aantal te onderzoeken cultivars uitgebreid van acht naar tweeëntwintig. Vervolgens zijn het vermogen om callus te induceren op de juiste bloemdelensdelen, filament en stijl, callusgroeisnelheid en regeneratievermogen in kaart gebracht. Het genotype (cultivar) speelde daarin de belangrijkste rol, maar op één na kon van alle cultivars voldoende uitgangsmateriaal (callus) verkregen worden. Het regeneratievermogen liep wel wat terug in de tijd. In een eerste toets op genoverdracht door *Agrobacterium tumefaciens*, gescoord m.b.v. transiënte expressie van het reporter gen GUS, bleek dat dit bij alle acht daar geteste cultivars mogelijk was. In een later stadium werd hetzelfde vastgesteld voor stabiele integratie, waarbij transgene GUS positieve plantjes werden verkregen. De efficiëntie waarmee dit gebeurde was weer cultivar afhankelijk. In deze proeven is ook het protocol nog verder geoptimaliseerd. Dit onderzoek resulteerde in een publicatie in een wetenschappelijk tijdschrift.

De vector met een combinatie van genen voor excisie en selectie en met de twee uitgekozen doelgenen, EQ en LS, die in andere gewassen elk afzonderlijk reeds tot resistentie tegen luizen en thrips hadden geleid, is binnen dit project geconstrueerd en in een supervirulente *Agrobacterium* stam AGL1+virG ingebracht. Met deze stam zijn een aantal grote transformatie-experimenten uitgevoerd en ± 240 mogelijk transgene plantlijnen geproduceerd. Hiervan zijn er 77 moleculair gekarakteriseerd door middel van PCR, een techniek die in lelie vanwege het complexe en grote genoom geen makkelijk en eënduidig resultaat gaf. Met als criteria, goede groei op selectiemedium en positief in 3 van de 5 PCR én voor beide doelgenen, zijn zevenentwintig (27) lijnen van 8 cultivars als transgeen aangemerkt om verder met behulp van biochemische analyses en resistentietoetsen in de kas bestudeerd te worden.

Vanwege de uitbreiding in het aantal cultivars ging er meer werk, tijd en geld zitten in de productie van voldoende gentech lelies. Om toch zoveel mogelijk van de geplande analyses en toetsen goed te kunnen uitvoeren is er bij PT een vervolgproject aangevraagd en toegekend, PT 14587.

2. Inleiding

2.1 Achtergrond problematiek

Het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen in de teelt van bolgewassen bedroeg in 2008 41,9 kg Werkzame Stof per hectare, weliswaar een afname met 8,3 % ten opzichte van het jaar 2004 (bron: CBS), maar toch is er nog veel ruimte voor verdere verbetering. Een niet-onaanzienlijk deel van die gewasbeschermingsmiddelen bestaat uit minerale olie plus pyrethroïden ter bestrijding van bladluizen met als hoofddoel: het tegengaan van verspreiding van virussen. De wens om het gebruik van middelen terug te dringen wordt binnen de sector breed gedragen. Onderzoek naar de mogelijkheden hiertoe is belangrijk en loopt al op het gebied van teeltmaatregelen. Een minstens zo belangrijke benadering is via het lelie-uitgangsmateriaal en dan met name veredeling op resistentie tegen bladluizen. Helaas zijn er nog onvoldoende bronnen voor brede resistentie in de genenpool van lelie geïdentificeerd om op korte termijn veel van kruisingen te verwachten. Genetische modificatie als oplossingsrichting is sinds kort in beeld gekomen door de succesvolle afronding van een eerder door het Productschap Tuinbouw gefinancierd project (PT11053). Hierin is een protocol ontwikkeld waarmee lelie, zowel Longiflorums als Orientals, reproduceerbaar kan worden getransformeerd door middel van *Agrobacterium tumefaciens*. Om de acceptatie van gentech-lilies te vergroten is een systeem om z.g. merker-vrije GM-planten te maken voor lelie geschikt gemaakt. Merker-vrije GM-planten wil zeggen dat in de uiteindelijke planten alleen de gewenste genen aanwezig zijn en dat ongewenste genen zoals antibioticum-resistentie genen, die voor selectie worden gebruikt, verwijderd zijn.

Naast een protocol voor genetische modificatie van lelie zijn er nog genen nodig die in lelie kunnen zorgen voor resistentie tegen de groene perzikluizen en tegen de katoenluis. Op PRI zijn een aantal genen beschikbaar die werkzaam tegen luizen zijn. Sommige daarvan zijn getest tegen de groene perzikluis (*Myzus persicae*) in bijv. Arabidopsis (zandraket), chrysant of aardappel en blijken een negatief effect op de luis te hebben. Dit betreft het equistatine gen (EIM), een proteïnase inhibitor, werkzaam na opname door de luis, en het linalool synthase gen (LS), waarbij de gevormde linalool (= vluchtig terpeen) als een repellent werkt. Het EIM gaf in Arabidopsis in een periode van 20 dagen een reductie van 80% te zien in het aantal perzikluisnymphen. Het LS in een aardappel- en chrysant bladkeuzetoets leidde ertoe dat 70-80% van de bladluizen koos voor het controleblad (normaal is 50%). Van voornoemde twee genen is in ieder geval *in planta* (chrysant/aardappel) een bepaalde mate van afweer als effect gevonden; daar de twee verschillen in werkingsmechanisme zou de combinatie van die twee werkzamer kunnen zijn dan de genen afzonderlijk. Naast de directe ontwikkeling van resistente cultivars door introductie van de genen in elite-variëteiten kunnen geproduceerde gentech lilies ook gebruikt worden als ouder bij kruisingen voor de veredeling van nieuwe, resistente cultivars.

Voor dit door het Productschap Tuinbouw gefinancierde onderzoeksproject zijn de volgende doelstellingen geformuleerd:

- Het combineren van het equistatine gen (EIM) en het linalool synthase gen (LS) in gentech cultivars van lelie, die in een later stadium merker-vrij gemaakt kunnen worden indien gebleken is dat de ingebrachte genen een veelbelovende mate van luisresistentie opleveren in lelie. Oorspronkelijk waren er 8 cultivars gesuggereerd om te worden gebruikt, 2 Longiflorums, namelijk Snow Queen (als positieve controle omdat hiervan reeds uitgangsmateriaal beschikbaar is en omdat er succesvol mee getransformeerd is in project PT11053) en White Heaven en 6 Orientals, waarvan cv. Barbados als positieve controle. Voor de overige 5 cultivars was een keuze gemaakt uit de beschikbare genenpool zodanig dat het genetische spectrum van de Orientals zo veel mogelijk gedekt zou zijn. De gesuggereerde cultivars waren Helvetia, Merostar, Siberia, Sorbonne en Starfighter, maar dit is bij toekenning van het project door PT gewijzigd op instigatie van de deelnemende lieweredelingsbedrijven.
- Het toetsen van de werkzaamheid van die twee genen in het leiden tot verhoogde afweer tegen de groene perzikluis en de katoenluis in gentech lilies.

Buiten de doelstellingen van dit project vallen expliciet:

- Het merker-vrij maken van de gentech lelies. Eerst zal de effectiviteit van de ingebrachte genen vastgesteld worden. In geval van succes kunnen de interessante gentech lelies in een vervolgproject merker-vrij gemaakt worden om zo tot een bruikbaar product te komen, of direct of als kruisingsouder.
- Onderzoek naar de mogelijkheden van commerciële teelt en vermarkting van merker-vrije gentech lelies (vergunningen, acceptatie e.d.). Dit type onderzoek is als aparte PT projecten (PT 13973 & PT 14661) uitgevoerd. Van PT 13973 is het eindrapport al beschikbaar vanaf februari 2012.
- De opschaling naar de teeltsituatie en het vaststellen van de eventueel daar nog benodigde spuitregimes. Dit zou, in geval van succes en van toestemming van de overheid kunnen plaatsvinden in een vervolgproject bij PPO-Lisse of bij geïnteresseerde bedrijven. Bij PPO-Lisse is ook veel ervaring op het gebied van bolgewassen en virussen.

2.2 Voorwaarden Productschap Tuinbouw

De projectaanvraag is door PT in een brief dd 9 mei 2008 gehonoreerd, maar er was sprake van een tweetal bijzondere, aanvullende voorwaarden.

1. In verband met eventuele toekomstige vercommercialisering van de eindproducten moesten licentieafspraken over onderdelen of protocollen waar octrooien op aangevraagd of toegekend zijn (hierna te noemen IP, intellectual property) 1 jaar na aanvang van het project vastgelegd zijn. Voorzien was dat PT rond juni 2009 een go/no go beslissing over voortgang van het project zou nemen gebaseerd op het tot stand komen van een bevestigende IP verklaring.
2. Op advies van de begeleidingscommissie Stiverbol sectie Lelie zijn meer en modernere rassen in het project opgenomen dan de 8 die in het projectvoorstel waren genoemd. Het doel hiervan was om te waarborgen dat er aan het eind van het project voldoende getransformeerde en geregenereerde lijnen van meerdere lelietypen verkregen zouden zijn. Om dit laatste te beoordelen werd er voor eind 2010 een tweede go/no go beslismoment gepland. Het criterium voor een 'go' beslissing werd gesteld op minimaal 2 cultivars met elk 5 aparte transgene lijnen. In totaal omvatte de lijst met suggesties 22 cultivars (zie tabel 1).

Tabel 1. Lijst met door Stiverbol sectie Lelie aangedragen lelie cultivars voor PT12966.

Cultivar	Type	Ploidie	Cultivar	Type	Ploidie
Lesotho	OT	3	Lexus	O	2
Manissa	OT	3	Santander	O	2
Yelloween	OT	2	Topwhite	O	4
Robina	OT	3	White Express	O	2
Montezuma	O	2	Cherbourg	O	2
Barbados	O	2	Legend	O	2
Lake Carey	O	2	White Triumph	LO	3
Paradero	O	2	Yellow Diamond	LA	3
Burlesca	O	2	Brindisi	LA	3
Gracia	O	2	Snow Queen	L	2
Sheila	O	2	White Heaven	L	2

3. Resultaten

3.1 IP verklaring

Uit inventariserend onderzoek bleek dat er op 1 protocol en op 2 onderdelen sprake was van IP. Dit betrof de methode om z.g. merker-vrije genetisch gemodificeerde planten te maken m.b.v. excisie door middel van recombinatie, gepatenteerd door en eigendom van Plant Research International te Wageningen. Daarnaast betrof het het gen coderend voor equistatine, eveneens gepatenteerd door en eigendom van Plant Research International (PRI) te Wageningen en het gen coderend voor linalool synthase met als eigenaren van het patent de firma's ENZA Zaden Beheer b.v te Enkhuizen en Monsanto Invest n.v. te Bergschenhoek.

Juridisch bindende documenten zijn opgesteld, waarin is vastgelegd dat door PRI aan de 6 aan PT project12966 deelnemende lelieveredelingsbedrijven, zijnde Gebr. Vletter & Den Haan, Rijnsburg, Mak Breeding, Wieringerwerf, De Jong Lilies, Andijk, Van Zanten Flowerbulbs, Hillegom, Marklily, Hillegom en World Breeding, Breezand, een niet-exclusieve, royalty-vrije, niet-overdraagbare, niet-sublicentieerbare licentie wordt verleend voor het commercialiseren (i.c. op de markt brengen) van binnen het project PT12966 door PRI met behulp van de door PRI gepatenteerde merker-vrije technologie gegenereerde gentech leliecultivars (voor cultivars, zie lijst PT12966) en de door kruising met genoemde gentech leliecultivars te genereren nieuwe cultivars. Voor het commercialiseren (i.c. op de markt brengen) van merker-vrije, luisresistente gentech leliecultivars (zie lijst PT12966, tabel 1) en eventuele kruisingsproducten, uitgerust hiertoe binnen PT12966 met de genen coderend voor equistatine en linalool synthase zijn door respectievelijk PRI en ENZA en Monsanto niet-exclusieve, niet-overdraagbare en niet-sublicentieerbare licenties verleend, waarbij tussen alle betrokken partijen is overeengekomen om te zijner tijd en zodra aan de orde in redelijkheid te onderhandelen over de hoogte van de verschuldigde royalties verbonden aan genoemde licenties, waarbij recht wordt gedaan aan investeringen die door de sector zijn gedaan voor het mogelijk maken van de productie van bovengenoemde gentech lilies.

De ondertekende IP verklaringen zijn aan alle betrokkenen opgestuurd en zij waren akkoord met deze verklaringen. Op grond van deze akkoordverklaringen is vastgesteld dat aan de voorwaarde voor de eerste 'go' was voldaan en PT gaf vervolgens een officiële 'go' aan dit project.

3.2 Vectorconstructie

Het equistatinegen (EQ) onder controle van de rubiscopromotor uit chrysaant (die is sterker dan de veelgebruikte CaMV 35S promotor) is op basenvolgorde gecontroleerd en daarna uit de cloningsvector geïsoleerd. Hetzelfde is gedaan voor het linalool synthase gen (LS) dat onder controle van de dubbele 35S CaMV promotor staat. Dit laatste gen is uitgerust met een chloroplast targeting signaal afkomstig uit chrysaant, omdat de meeste terpenoïden zoals linalool, in de chloroplast worden geproduceerd. Daarnaast bevat het een intron om te voorkomen dat het gen al in *Agrobacterium* tot expressie komt, wat een negatief effect op de groei van de bacterie zou hebben. Beiden zijn vervolgens samen gecombineerd in de basis pMF-vector uitgerust met een hygromycine resistentiegen, de pMF2. Omdat het bij eerdere pogingen niet lukte om beide genen in één vector te combineren, zijn er een aantal alternatieven naast elkaar uitgetest en uiteindelijk heeft dit geleid tot twee pMF2-plasmiden met de twee genen in dezelfde orientatie t.o.v. elkaar maar in verschillende volgorde, dus EQ+LS en LS+EQ. De plasmiden zijn in twee verschillende supervirulente *Agrobacterium* stammen ingebracht, te weten in AGL1 en in AGL1 met extra virG kopie.

Kortom, we beschikken nu over de volgende stammen:

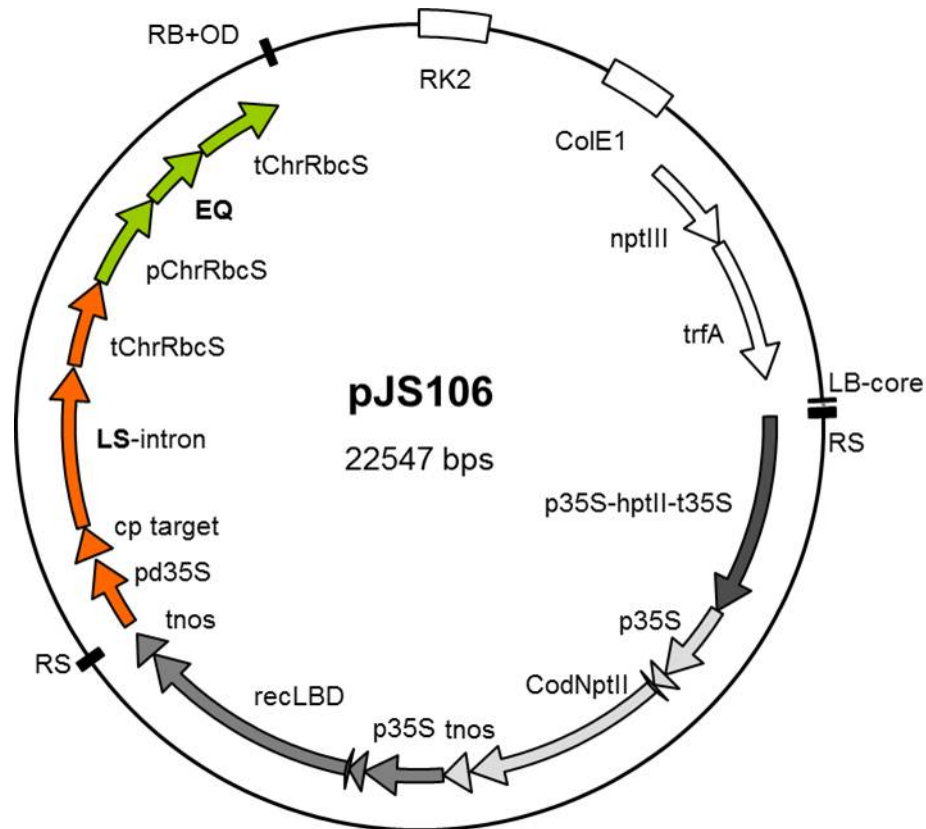
pJS105:AGL1(pMF2+LS+EQ)

pJS106:AGL1+virG (pMF2+LS+EQ)

pJS107:AGL1(pMF2+EQ+LS)

pJS108::AGL1+virG (pMF2+EQ+LS)

Er is geen reden om te verwachten dat de volgorde van de doelgenen iets uitmaakt; omdat de extra virG kopie verhoogde genoverdracht zou moeten kunnen geven (dit is gevonden in andere gewassen), is besloten om voor de transformaties van lelie pJS106 (zie figuur 1) te gebruiken.



Figuur 1. Binair plasmide ingebracht in *Agrobacterium tumefaciens* stam AGL1+virG. Het 'zuidelijk' deel tussen RB en LB wordt naar de plant overgebracht als T-DNA. Het deel tussen de twee RS sites kan er te zijner tijd uit verwijderd worden.

3.3 Plant materiaal

3.3.1 Cultivars

De cultivars waarmee gewerkt is in dit project zijn weergegeven in tabel 1 op pagina 4. Het betreft een doorsnee van moderne rassen die meerdere typen en ploïdieniveaus vertegenwoordigen. Uit eerdere projecten was gebleken dat longiflorums zich het best leenden voor transformatie, gevolgd door Orientals. Bij Aziaten was geen succes behaald. De cultivars zijn of zelf na modificatie geschikt voor vermarkting of zijn bruikbaar als kruisingsouder. De hoeveelheid cultivars is op suggestie van Stiverbol sectie Lelie vergroot t.o.v. het oorspronkelijke voorstel om de kans op succes te vergroten, uitgaande van het feit dat er een cultivar-effect verwacht werd op regeneratie- en transformatiecapaciteit. Van de cultivars Barbados, Santander en Snow Queen waren reeds eerder transgene plantjes verkregen, waarmee zij als controle of referentie konden dienen.

3.3.2 Callusinductie

Het in PT project 11053 ontwikkelde protocol voor transformatie en regeneratie van lelie cultivars gaat uit van callus geïnduceerd op filamenten (meeldraden zonder helmhokken) en stijlen van leliebloemen. Grote, maar nog gesloten bloemknoppen van 21 cultivars (van Snow Queen was nog goed regenererbaar en transformeerbaar schubcallus beschikbaar) zijn uitwendig gesteriliseerd en vervolgens aseptisch geopend en filamenten en stijlen zijn in stukken van $\pm 0,5$ cm gesneden en op callusinductiemedium uitgelegd. Het callusinductiemedium is in essentie MS met als groeiregulator $8 \mu\text{M}$ picloram. De mate waarin en de snelheid waarmee callus werd geïnduceerd is vervolgens gescoord. Deze gegevens zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Callusvorming en groeisnelheid van de leliecultivars op filamenten en stijlen (gecombineerd).

Cultivar	Inductie	Groeisnelheid	Cultivar	Inductie	Groeisnelheid
Lesotho	Laag	Intermediair	Lexus	Intermediair	Intermediair
Manissa	Nihil	n.v.t.	Santander	Hoog	Hoog
Yelloween	Laag	Intermediair	Topwhite	Laag	Intermediair
Robina	Intermediair	Intermediair	White Express	Laag	Laag
Montezuma	Hoog	Hoog	Cherbourg	Intermediair	Hoog
Barbados	Hoog	Hoog	Legend	Hoog	Inf.
Lake Carey	Hoog	Hoog	White Triumph	Laag	Laag
Paradero	Intermediair	Hoog	Yellow Diamond	Laag	Laag
Burlesca	Intermediair	Hoog	Brindisi	Laag	Laag
Gracia	Hoog	Hoog	Snow Queen	n.t.	n.t.
Sheila	Intermediair	Hoog	White Heaven	Laag	Laag

Inf. = geïnfecteerd; n.t. = niet getest

De Orientals gaven de beste response en de Aziaten een slechte. Verder bleek er ook sprake van een cultivar-effect. Verder bleek ook vaak dat hoewel de callusinductie soms wat stroef ging, de groeisnelheid van het eenmaal geïnduceerde callus een stuk beter kon gaan. Dat laatste betekende dat het wellicht wat langer duurde, maar dat het toch mogelijk was om voldoende callus te genereren voor de regeneratietoetsen en de transformaties voor die cultivars.

3.3.3 Regeneratievermogen

Het callus van de diverse cultivars ontstaan op de beide typen organen (filament en stijl) is verder apart aangehouden en vermeerderd, waar dat beschikbaar was. Dit callus is verschillende malen getoetst op regeneratievermogen, waarbij de leeftijd van het callus in de tijd uiteraard toenam. Zo kon bekeken worden of het vermogen tot regenereren in de tijd zou teruglopen. Het MS regeneratiemedium bevatte als groeiregulatoren bedoeld om de aanleg van scheuten te stimuleren 0,4 μM picloram en 0.044 μM 6-benzyladenine. Uiteindelijk was het mogelijk om uitspraken te doen over de effecten op regeneratie van cultivar, leeftijd callus en origine van het callus. Er bleek een significant effect te zijn van het genotype (cultivar), een effect van de leeftijd van het callus, waarbij het regeneratievermogen terugliep met het vorderen van de leeftijd. Het callustype bleek geen significant effect te hebben, maar er was wel sprake van een duidelijke interactie tussen cultivar en callus type. Dit wil zeggen dat voor de ene cultivar filament callus beter regeneert, terwijl voor een andere cultivar stijl callus het beter deed. Dit onderzoek heeft geleid tot een publicatie in een wetenschappelijk tijdschrift getiteld "Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of multiple lily cultivars" door Wang *et al.* (2012, Plant Cell Tiss Organ Cult 111:113-122). Hieronder in tabel 3 wordt als voorbeeld het regeneratievermogen van bepalingen uit 2008 en 2009 weergegeven. Voor de eerste meting was er callus beschikbaar van 16 cultivars; voor de tweede meting van 17 cultivars, waaronder 3 nieuwe terwijl er 2 verloren waren gegaan.

Tabel 3. Percentage calli die regeneratie vertoonden per cultivar en callustype in twee onafhankelijke experimenten, de één in 2008 en de ander in 2009.

Cultivar	Regeneratie (1 ^e x) (%)		Regeneratie (2 ^e x) (%)	
	F	S	F	S
Barbados	76	40	61	62
Brindisi	n.d.	n.d.	76	x
Burlesca	66	72	67	80

Cultivar	Regeneratie (1 ^e x) (%)		Regeneratie (2 ^e x) (%)	
	F	S	F	S
Cherbourg	40	72	64	19
Gracia	68	74	89	87
Lake Carey	57	79	50	39
Legend	62	64	x	x
Lesotho	n.d.	n.d.	44	39
Lexus	72	n.d.	70	72
Montezuma	84	60	15	31
Paradero	40	68	29	34
Robina	61	40	27	27
Santander	100	74	60	75
Sheila	73	90	x	63
Snow Queen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Topwhite	66	68	54	50
White Express	74	n.d.	70	16
White Heaven	n.d.	n.d.	20	x
White Triumph	n.d.	80	x	x
Yellow Diamond	n.d.	n.d.	x	x
Yelloween	62	n.d.	57	40

F= filament, S= stijl, n.d.=niet getest, x= materiaal verloren gegaan door infecties.

3.4 Transformatie

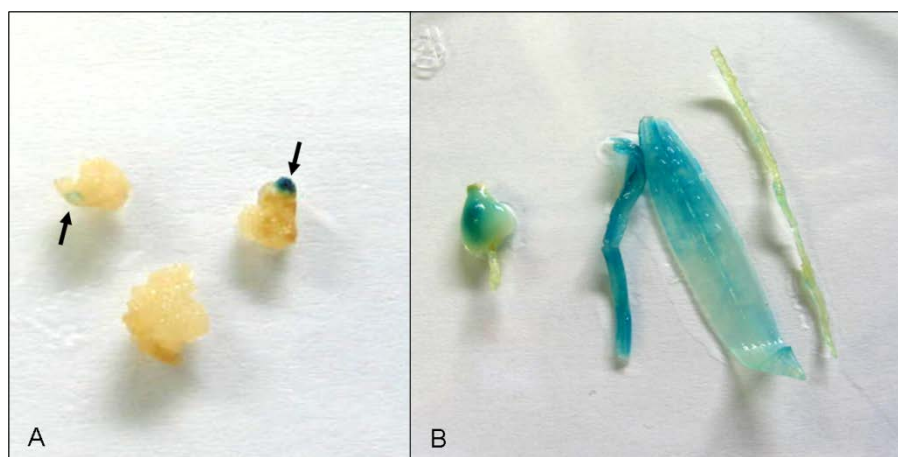
3.4.1 Toetsing transformeerbaarheid

Op basis van callusgroeisnelheid, regeneratievermogen en herkomst (bedrijf) zijn 7 cultivars geselecteerd waarvan callusmateriaal is gebruikt voor de eerste transformatie-experimenten, later samen met het schubcallus van referentie cv. 'Snow Queen'. Om de transformeerbaarheid, de frequentie van genoverdracht, vast te stellen is een *Agrobacterium* stam gebruikt met binair plasmide waarop t.b.v. selectie het hygromycine resistentiegen is gelegen en t.b.v. snelle bepaling van genoverdracht het GUS-reportergen. Transiënte genoverdracht werd geconstateerd bij alle 7 nieuwe cultivars in frequenties variërend van 0.5 tot 11.5 % (tabel 4). Een eerste transgeen plantje werd toen reeds verkregen van de cultivar 'Gracia'. Er is vervolgens in afwachting van het gereed komen van de benodigde vectoren naar gestreefd de efficiëntie verder te verhogen door nog een aantal parameters uit te testen. Dit betrof het toevoegen van zilvernitraat, AgNO₃, en het cocultiveren op vochtig filtreerpapier i.p.v. op agarmedium. Van het eerste kon geen effect op transformatie worden vastgesteld, van het tweede wel, vandaar dat dat werd opgenomen in het standaard-transformatie-protocol, dat later werd gebruikt voor de productie van de transgene lelielijnen. Deze experimenten werden ook gebruikt om meer gegevens over de rol van cultivar en callustype te verkrijgen bij meer stabiele, langere termijn transformatie. Het cultivar-effect bleek weer significant en ook het effect van het callustype afhankelijk van de cultivar. Uiteindelijk zijn van alle 8 cultivars één of meer transgene, GUS positieve plantjes verkregen. Figuur 2 laat het resultaat zien van de kleuring voor GUS in callus kort na transformatie en in een transgeen plantje.

Tabel 4. Percentage calli met GUS-positieve plekken bij de 7 geteste cultivars voor beide callustypen.

Cultivar	Aantal calli in kleuring		%-age GUS+ calli (aantal vlekken)	%-age GUS+ calli (aantal vlekken)
	F	S	F	S
Barbados	200	200	3.5 (31)	0.5 (1)
Gracia	100	100	3 (7)	7 (24)
Lake Carey	200	200	5 (23)	11.5 (79)
Santander	200	150	2 (11)	4.6 (20)
Sheila	100	100	10 (17)	6 (8)
Sorbonne	200	200	1 (5)	1 (2)
Yelloween	200	150	5.5 (44)	1.3 (10)

Figuur 2. GUS kleuring; A) calli met blauwe vlekken, links vaag, rechts sterk, onder geen; B) plantje, v.l.n.r. schubje, blaadjes, wortel.



3.4.2 Productie gentech lelies

In vijf grote transformatie-experimenten met het vernieuwde protocol (PT11053 plus cocultivatatie op filterpapier) is callus van diverse cultivars en meestal, indien beschikbaar van beide typen (filament en/of stijl) geïnoculeerd met *Agrobacterium tumefaciens* AGL1+virG(pJS106). Het binaire plasmide in deze stam bevat twee genen gericht op de introductie van resistentie tegen bladluizen en diverse onderdelen voor selectie en excisie van de selectiegenen zodra die niet meer nodig zijn. Als dat laatste is gebeurd noemen wij ze 'merker-vrij', maar dit valt niet onder het huidige project. De cultivars 'Legend', 'Manissa', 'White Triumph' en 'Yellow Diamond' waren verloren gegaan en zijn vervangen door de cultivars 'Marero', 'Sorbonne' en 'White Fox', waarvan nog callus beschikbaar was van eerdere projecten. In totaal zijn dus 21 cultivars opgenomen in de productie-opzet. Selectie vond plaats op regeneratiemedium met 25 mg/l hygromycine en gedurende meer dan 5 maanden.

Deze experimenten hebben geresulteerd in ongeveer 240 individuele, mogelijk transgene regeneranten. Het criterium voor het veronderstelde transgene karakter was de regeneratie en continue groei als plantje op medium met hygromycine. Bevestiging hiervan moet komen van de moleculaire karakterisering d.m.v. PCR.

3.5 Moleculaire karakterisering

3.5.1 PCR

Het bewijs voor stabiele integratie van het door *Agrobacterium* overgedragen T-DNA en daarmee voor het transgene karakter van de verkregen regeneranten is een 'Southern', waarbij DNA van de planten wordt geknipt met

restrictie-enzymen, geplakt op een nylon membraan en wordt gehybridiseerd met een probe of sonde. Dit is een gelabeld stukje DNA specifiek voor het overgedragen T-DNA dat kan hybridiseren met de tegenhanger van dat stukje in het plantengenoom. Vanwege het relatief zeer grote genoom van lelie is het detecteren van één geïntegreerde kopie van een gen in lelie m.b.v. een 'Southern' moeilijk tot onmogelijk. Als alternatief is gekozen voor een PCR als moleculaire techniek, al geeft die formeel wel aanwezigheid aan maar niet per se integratie in het DNA van de plant. Het grote en complexe genoom van lelie kan ook bij PCR problemen geven in de vorm van vals negatieven, dus geen reactie terwijl de plant toch transgeen is. Voor een verdere karakterisering is besloten te kijken naar groei op selectie en alleen de allerbeste uit te kiezen, daaruit DNA te isoleren en daarmee diverse onafhankelijke PCRs te doen op diverse genen.

Uit de uitgevoerde transformatie-experimenten waren rond de 240 mogelijk transgene regenerantjes verkregen. In de moleculaire analyse is gefocust op 77 individuele lijnen hiervan. Een grondige analyse van de condities voor het kunnen toepassen van PCRs bleek noodzakelijk. De DNA isolatiemethode, primerpaar keuze, amplificatieprotocollen, polymerase enzymen, apparatuurkeuze dienden geoptimaliseerd te worden om betrouwbare resultaten te verkrijgen.

Uiteindelijk is DNA van alle 77 plantjes 5 x geanalyseerd m.b.v. PCR, 3 keer met equistatine (EQ) primers en 2 keer met linalool synthase (LS) primers. 27 Individuele lijnen van 8 cultivars zijn als bevestigde genticelijnen geïdentificeerd met als criteria 1) 3 x of meer positief in de PCR én 2) zowel positief voor EQ als voor LS. Van de 27 waren er 10 5 x positief. Vals negatieve scores bleken voor te komen; in een aantal gevallen is ter bevestiging het PCR fragment gesequenced. Dit bleek in orde. Ook de positieve en negatieve controles in de PCRs gaven het verwachte beeld. In tabel 5 zijn de acht cultivars en de aantallen voor elke cultivar weergegeven.

Figuur 5. De aantallen 'bevestigde' transgene lelie lijnen per cultivar

Cultivar	Aantal
Lake Carey	2
Cherbourg	1
White Express	10
Sheila	2
Robina	8
Montezuma	1
Burlesca	1
Paradero	2

Deze genticelijnen vertegenwoordigen 27 'events', i.e. meer dan de minimale 10; via White Express en Robina wordt ook de 2 x 5 norm gehaald.

Conclusie: hiermee zijn de criteria voor de tweede 'go' beslissing (zie paragraaf 2.2) gehaald.

3.5.2 Expressie, RT-PCR

Om te zien of de ingebrachte genen tot expressie komen en daarmee ook een extra bewijs voor integratie en transgene karakter kan gebruik worden gemaakt van R(everse)T(ranscription)-PCR. Als genen tot expressie komen in plantmateriaal betekent dit dat het DNA wordt overgeschreven in boodschapper RNA (mRNA). dit mRNA wordt normaliter vertaald in eiwit door de ribosomen. Voor RT-PCR wordt het mRNA uit plantmateriaal geïsoleerd en m.b.v. het enzym Reverse Transcriptase weer teruggeschreven in cDNA; dit cDNA wordt vervolgens gebruikt als matrijs in een PCR. Een positief signaal in de RT-PCR betekent dus dat het geteste gen aanwezig en actief is. Wederom bleek lelie niet gemakkelijk; nodig is om de juiste primers te kiezen en de juiste amplificatiecondities. Voor equistatine (EQ) zijn die nog niet gevonden, maar voor linalool synthase (LS) is in 16 van de 27 lijnen expressie aangetoond. Niet uit te sluiten valt dat de overige lijnen toch ook transgeen zijn. Silencing van genen komt ook voor in transgene planten; dit houdt in dat het gen wel aanwezig is, maar niet meer tot een fenotype leidt omdat bijvoorbeeld het DNA gemethyleerd is en transcriptie niet meer mogelijk is. Ook dan is de RT-PCR negatief.

4. Bijstelling tijdsplanning

De bij de toekenning gestelde aanvullende voorwaarden en met name de uitbreiding van 8 naar 22 cultivars hadden als consequentie dat een groter deel van het toegekende budget al nodig bleek in de beginfase van het onderzoek, zoals in de tussenrapportages en bij mondelinge presentaties van het onderzoek direct is aangegeven. Gezien de voortgang en positieve resultaten en het behalen van de criteria voor de twee 'go' beslissingen is in de loop van 2011 met PT en de BCO overlegd over het vervolg van het project dat nog 1 jaar zou lopen. Hiertoe is een concrete beschrijving gemaakt van de stand van zaken en van de onderdelen die nog volgens de oorspronkelijke planning uitgevoerd zouden moeten worden. Voor die nog uit te voeren onderdelen is een begroting gemaakt. Ook zijn er alternatieven geformuleerd voor de uit te voeren onderdelen en de daarmee samenhangende aangepaste budgetten. Na discussie op basis van de aangeleverde informatie is besloten een aanvraag in te dienen voor een vervolgproject dat zou overlappen met het huidige en waarvoor een deel van het resterende budget van dit project ingezet zou worden. De nog uit te voeren onderdelen omvatten:

- het aanhouden en in vitro vermeerderen van de transgene lijnen
- het overbrengen van bolletjes in aarde en naar de kas
- biochemische analyse op linalool vorming en aanwezigheid equistatine
- toetsen op insectenresistentie
- lijnen met resistentie behandelen met DEX om ze merker-vrij te maken
- verificatie van het merker-vrije karakter.

Het vervolgproject is in 2012 toegekend onder projectnummer PT14587 en loopt van 2012 tot en met 2013.

5. Conclusies

- Patenten/octrooien relevant voor de productie van gentech insecten-resistente lelies zijn geïdentificeerd. Afspraken zijn gemaakt over aanvaardbare en werkbare condities om licenties voor commercialisatie van de geproduceerde lelies te verkrijgen van de eigenaren van de patenten, zodra dit aan de orde zal zijn.
- Door zes lelieveredelingsbedrijven zijn 22 leliecultivars aangeleverd voor dit project door zes veredelingsbedrijven die een doorsnee vertegenwoordigen van moderne rassen van diverse typen. Callusinductie, regeneratie en transformatie bleken cultivar-afhankelijk, maar in principe mogelijk bij het overgrote deel.
- Binaire plasmiden met daarop de genen nodig voor selectie in lelie en merker-vrij maken plus de doelgenen die resistentie tegen luizen moeten geven, zijn gemaakt en ingebracht in een *Agrobacterium tumefaciens* stam.
- Rond de 240 mogelijk transgene lijnen zijn verkregen na transformatie met AGL1+virG(pJS106), na selectie en regeneratie van calli van 21 cultivars. 77 Daarvan zijn uitgekozen op basis van de groeikarakteristieken op selectiemedium voor analyse m.b.v. PCR.
- Moleculaire analyse is door de grootte van het leliegenoom niet eenvoudig en éénvoudig.
- Uiteindelijk zijn 27 lijnen aangemerkt als transgeen gebaseerd op de PCR analyse. Deze lijnen waren afkomstig van 8 cultivars van 5 bedrijven. Het waren vooral Orientals (7) en één OT type.
- Een vervolproject is gestart gericht op biochemische karakterisering en op toetsen op resistentie tegen luizen. Indien interessant worden resistente lijnen merker-vrij gemaakt.

Bijlage I.

**Artikel in Plant, Cell, Tissue and Organ
Culture 111:113-122 (2012).**