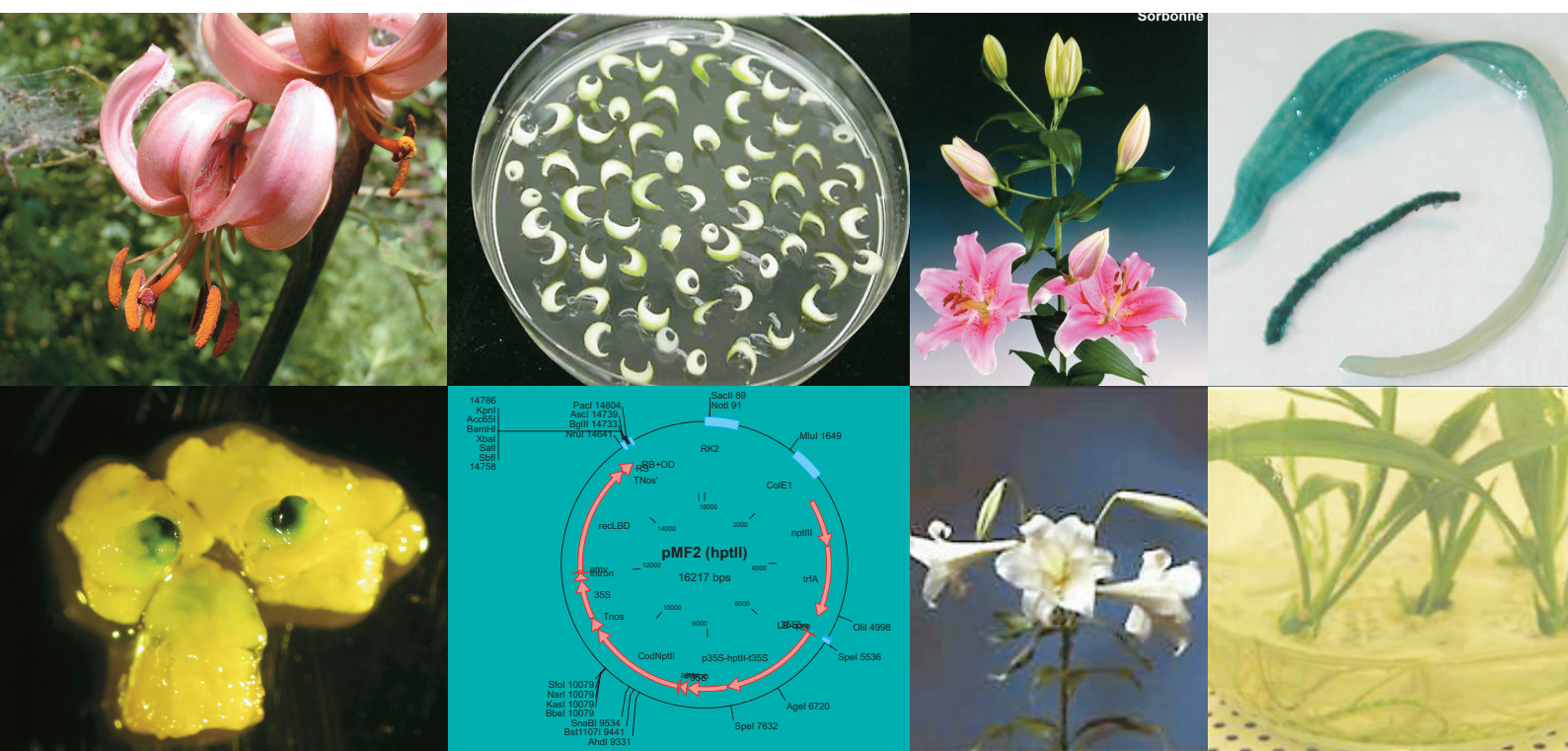


Protocolontwikkeling voor de productie van merker-vrije transgene lelies

Frans Krens





Protocolontwikkeling voor de productie van merker-vrije transgene lelies

Frans Krens

© 2007 Wageningen, Plant Research International B.V.

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 Plant Research International B.V.

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



PT-projectnummer 11053

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Medewerkers:

Han Bouman
Jolanda ter Brugge
Koen Pelgrom
Bernadette van Kronenburg
Jan Schaart
Daniël Deinum
André van Vliet
Chang Liu

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Achtergrond	3
3. Resultaten	5
3.a Weefselkweekaspecten	5
3.a.1 Uitgangsmateriaal, callusinductie en regeneratie	5
3.a.2 Invloed FluoroCytosine op groei en regeneratie	8
3.a.3 Effectieve hygromycine concentratie	9
3.b Transformatie	9
3.b.1 Particle Bombardment (PB)	9
3.b.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
3.c Vectorconstructie	19
3.c.1 pMF-1000.	20
3.c.2 pMF-1 en pMF2.	20
4. Conclusies	21

1. Samenvatting

Na lange tijd apart te zijn opgetrokken in het ontwikkelen van transformatie (genoverdracht) methoden in bolgewassen was het onderhavige project uitermate geschikt om door middel van het bundelen van de krachten én de expertise van PPO-Lisse en Plant Research International, Wageningen te komen tot de ontwikkeling van een protocol om merker-vrije transgene lelies te produceren.

In lelietransformatie hadden beide instituten wat successen geboekt, maar er was bij het begin van dit project nog steeds geen sprake van een betrouwbare en reproduceerbare methode voor genoverdracht. Er was echter nog wel steeds behoefte aan een degelijke transformatiemethode, maar dan bij voorkeur direct gericht op het produceren van gentech-lijes die alleen maar het gewenste gen (= eigenschap) zouden bezitten en die vrij zouden zijn van ongewenste of in het eindproduct niet langer nodige genen, vooral de selectiegenen, kortom de z.g. merker-vrije GM-lijes.

Studie op drie deelgebieden is voor dit doel noodzakelijk, ten eerste de plant. Uitgangsmateriaal, callus inductie, regeneratievermogen en het vermogen van plantencellen om nieuw DNA op te nemen en stabiel in het genoom te integreren, zijn hier belangrijke aspecten. Ten tweede de transformatiemethode. Zowel PPO-Lisse als PRI maakten gebruik van de 'particle bombardment' methode. De uitwisseling van ervaringen en de afstemming van het onderzoek binnen het project op deze punten is erg gestimuleerd door de overgang naar Wageningen van de Weefselweekgroep van PPO-Lisse en de integratie in de BU Biodiversiteit en Veredeling van PRI. Het project is vervolgd met het ontwikkelen van een transformatiemethode m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens*. Dit vanwege het feit dat zo de overdracht van alle elementen, nodig voor het verwijderen van ongewenst DNA, het best te realiseren zou zijn. Als derde benodigdheid geldt het ontwikkelen en produceren van een voor lelie geschikte 'merker-vrije' vector, het DNA molecuul waarop alle benodigde sequenties en genen bijeen zijn gebracht en die *Agrobacterium* kan overbrengen.

Als uitgangsmateriaal zijn bolschubjes en bloemonderdelen zoals filamenten van meeldraden en stijlen getest. Bolschubjes werden al langer gebruikt, maar de bloemdelen waren nog niet eerder geprobeerd en bleken prima bruikbaar om callus op te induceren, dat lang aangehouden kon worden, goed was te vermeerderen voor voldoende materiaal voor experimenten, goed regenereerde tot scheuten en transformeerbaar bleek. De bolschubjes leveren meer materiaal in kortere tijd op, waarmee bij aanvang ook de meeste ervaring was opgedaan. De eerste optimalisatiestudies voor callusinductie zijn met bolschubjes gedaan. Hierbij zijn diverse parameters getest, zoals koolstofbron (suiker), concentratie auxine, type auxine. Tevens is het regeneratievermogen van het geproduceerde callus bekeken in relatie tot het inductiemedium. Dit heeft geleid tot de uiteindelijke gekozen callusinductie- en regeneratiemedia. Ten behoeve van het latere transformatiewerk is ook nog het effect op regeneratie van verwonding en onderdompeling van het callus bekeken (nodig voor *Agrobacterium*). Dit bleek geen negatief effect te hebben. Als selectiemiddel bleek hygromycine beter te voldoen dan Basta®. Fluorocytosine, nodig voor selectie ná verwijdering van ongewenst DNA, werd getest op beïnvloeding van het regeneratieproces. Concentraties tussen 250 en 500 mg/l gaven geen enkel probleem en zijn bruikbaar.

Particle bombardment (PB) was de methode die bij beide instituten was gebruikt en transgeen lelie materiaal had opgeleverd (bij PPO 1x; bij PRI ten minste 4x, maar ook vaak niet). Uit de beide protocollen is een hybride methode opgesteld gebaseerd op een mix van omstandigheden waarvan aannemelijk was dat die bepalend zouden kunnen zijn. Deze hybride methode is gebruikt voor verdere optimalisatie. Geschoten werd op bolschubjes direct en op callus van bolschubjes, selectie vond plaats door Basta® of door hygromycine en de callusfase na transformatie werd verlengd (inductie van regeneratie dus uitgesteld). Dit leidde tot een reproduceerbare transformatiemethode via PB uitgaande van callus en selectie op hygromycine met een langere callusfase. Moleculaire analyses bevestigden succes en reproduceerbaarheid. Toch bleef de efficiëntie laag en is de inbouw van nieuw DNA na PB waarschijnlijk

te onregelmatig en onvolledig in vergelijking met inbouw door *Agrobacterium* (blijkt uit de literatuur bij andere gewassen). Voor het succesvol toepassen van de 'merker-vrije' technologie is inbouw van het nieuwe DNA als één geheel een voorwaarde.

Lang is gedacht dat *Agrobacterium tumefaciens* niet in staat zou zijn om monocotylen (eenzaadlobbigen) te transformeren, maar recent is anders gebleken. In de literatuur kwamen rapportages van succes in rijst en later andere grasachtigen. Op PRI werd succes geboekt met gladiol en *Alliums* (Liliaceae; ui, knoflook en sjalot) en in Japan met lelie zelf. Uitgangspunt is een zogenaamde supervirulente stam, de AGLO, en naar aanleiding van de ervaringen met PB is gekozen voor selectie m.b.v. hygromycine. De gebruikte vectoren zijn pCambia1301 met naast het selectiegen het reportergen *gus* om genoverdracht te kunnen vaststellen, ook al snel na de inoculatie met *Agrobacterium* (transiënte expressie). Als tweede vector is pRCNG gebruikt die geschikt is om het merker-vrije systeem gebaseerd op recombinatie uit te testen. Allereerst is gekeken of genoverdracht vast te stellen was in lelie door te kleuren voor GUS activiteit (transiënt) en zijn diverse parameters bestudeerd. Getest zijn uitgangsmateriaal, en wel wortels, schubben en filamenten, de rol van callusleeftijd is bekeken plus de manier van verwonden, de stijfheid van het medium, het callus inductie medium (CIM) en de cultivar-afhankelijkheid. De schubben en filamenten boden perspectief en het cultivartype was ook bepalend, Longiflorums > Orientals >> Aziaten. Callusleeftijd of inductiemedium en de manier van verwonden maakten geen verschil; de mediumstijfheid alleen bij de filamenten.

Door het plantmateriaal na inoculatie en cocultivatie met *Agrobacterium* te laten doorgroeien op selectiemedium is gekeken naar stabiele genoverdracht en integratie van het overgedragen DNA. Regeneratie van scheuten op actief groeiend callus op selectie is verkregen. Scheuten verkregen na inoculatie met AGLO(pCambia1301) gaven blauwkleuring als indicatie voor het stabiele, transgene karakter van de scheuten; moleculaire analyse d.m.v. PCR bevestigde dit, ook in de scheuten verkregen na inoculatie met AGLO(pRCNG).

Ook in stabiele transformatie bleken de Longiflorums beter dan de Orientals en maakten mediumstijfheid, manier van verwonden en CIM niet uit in de verkregen frequenties. Callus van bolschubjes en van filamenten leverden beide transgene scheuten in diverse onafhankelijke experimenten. Kortom, er is een reproduceerbare methode ontwikkeld voor zowel Longiflorums als Orientals, zij het met een verschil in frequentie. De eerste aanwijzingen voor het werken van de elementen voor verwijderen van ongewenst DNA in lelie zijn gevonden. Dit opent de weg voor de productie van merker-vrije GM-lilies.

Een speciale vector waarin al het op termijn te verwijderen DNA, d.w.z. alle benodigde functies inclusief het hygromycine selectiegen tussen de daartoe bedoelde DNA sequenties (recombinatieplekken) ligt, is gemaakt.

Buiten deze recombinatieplekken ligt alleen een stukje DNA waarin in de toekomst interessante en gewenste genen gecloneerd kunnen worden en die als enige eigenschap in de GM-lilie zullen achterblijven.

2. Achtergrond

Er is de afgelopen periode door de bollensector, via het Productschap Tuinbouw (PT), en door de overheid, via DWK programma's van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV), geïnvesteerd in de ontwikkeling van een transformatieprotocol voor lelie, zowel bij Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (PPO), Bloembollen, Bomen en Fruit te Lisse als bij Plant Research International (PRI), Biodiversiteit en Veredeling te Wageningen. Het uiteindelijke doel is het produceren van vermarktbare, transgene lelies met nieuwe of verbeterde eigenschappen, zoals bijvoorbeeld virusresistentie of bloemvorm. De lelie is echter een recalcitrant gewas gebleken voor deze nieuwe technologie van genetische modificatie. Nodig zijn methoden om genetisch materiaal (DNA) over te dragen naar de cellen van lelie, methoden om uit die cellen gehele planten te regenereren met alle eigenschappen (oud en nieuw) van de oorspronkelijke uitgangscel en, uiteraard, genen die verantwoordelijk zijn voor de gewenste nieuwe eigenschappen.

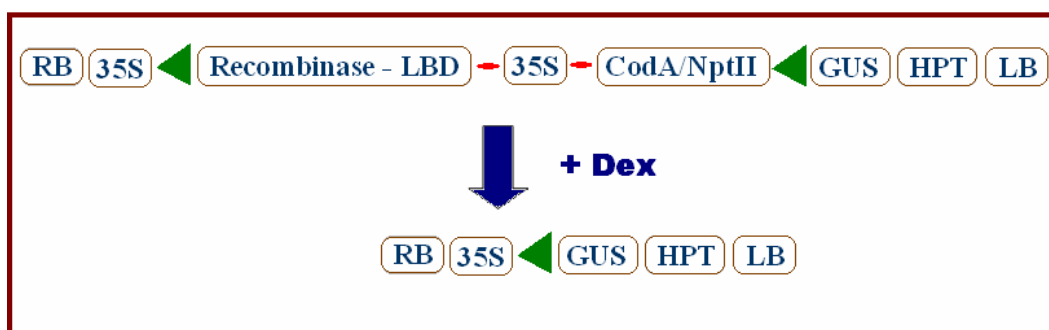
Weefselweek, zoals *in vitro* vermeerdering, en regeneratie zijn in lelie niet zo moeilijk. Genoverdracht ofwel transformatie was minder eenvoudig en de succesvolle combinatie van beide processen leidend tot geregenereerde, transgene planten, bleek in de beginperiode slechts sporadisch bereikt te kunnen worden. Voor monocotylen zoals lelie werd destijds vooral 'particle bombardment' als transformatiemethode gebruikt. Deze methode resulteerde over een periode van zo'n tien jaar in transgeen lelie materiaal van cultivar Snow Queen, een Longiflorum, met het reporter-gen *gus* (geeft blauwkleuring in een histochemische kleuringsreactie) en als selecteerbare herbicide merker, basta resistentie. Daarnaast werden Snow Queen's geproduceerd met bloemmorfologie-genen en basta resistentie. Van de Oriental hybrid, Star Gazer, is ook één transgene lijn verkregen met *gus* en basta resistentie. PPO-Lisse produceerde transgeen Snow Queen materiaal gebaseerd op selectie op het antibioticum hygromycine, dat naast dat antibioticum-resistentiegen het manteleiwit(CP)gen van het Lily Symptomless Virus (LSV) bevatte. Met dit laatste materiaal is in 2001 een veldproef uitgevoerd; het andere materiaal is enige tijd in de kas aangehouden en op overerving bekeken. Uiteindelijk bleken de gewenste fenotypes bleken niet of nauwelijks uit de verf te komen, dat wil zeggen de bloemvormgenen (afkomstig uit petunia) en het LSV-CP gen hadden geen effect op bloemvorm of resistentie. De efficiëntie van de apart ontwikkelde transformatiemethoden van Lisse en Wageningen waren onvoldoende.

In 2001 is besloten om de krachten en ervaringen van Lisse en Wageningen te bundelen en via dit PT-project een meer efficiënte methode van 'particle bombardment' te ontwikkelen. Tevens kon zo ingespeeld worden op de laatste ontwikkelingen op het gebied van transformatie van gewassen in het algemeen en van monocotylen in het bijzonder. In de literatuur werd meer en meer gepubliceerd over de mogelijkheid om *Agrobacterium tumefaciens* voor genoverdracht te gebruiken bij monocotylen; eerst bij rijst en tarwe, later ook bij bolgewassen zoals gladiol en lelie. *Agrobacterium* is het middel voor genoverdracht bij dicotylen en de bacterie levert het DNA ook op een nettere manier af in de cel en in het genoom van de plant. Dit is van belang voor een andere ontwikkeling, de mogelijkheid om DNA sequenties die in het eindproduct niet langer nodig of gewenst zijn, uit de transgene planten te verwijderen en zo zogenaamde 'merker-vrije' gentech gewassen te maken.

De meest gangbare transformatieprotocollen zijn gebaseerd op selectie van getransformeerde cellen m.b.v. antibiotica of herbiciden. Juist de aanwezigheid van dat soort genen in transgene planten is recentelijk steeds meer ter discussie komen staan en in Nederland wordt de aanwezigheid van antibioticum of herbicide resistentiegenen niet meer geaccepteerd bij marktintroducties en vanaf 2008 ook niet meer bij veldproeven. Binnen PRI, inspelend op de richting waarin de maatschappelijke discussie t.a.v. acceptatie van gentech gewassen zich beweegt, loopt onderzoek gericht op de ontwikkeling van een techniek om geïntroduceerde DNA-sequenties, die alleen nodig zijn voor selectie van transgeen weefsel, na de selectiestap te verwijderen uit het weefsel. Bij het maken van zulke merker-vrije transgene planten wordt naast het gewenste gen, bijvoorbeeld virusresistentie, ook een gen ingebouwd dat zorgt voor productie van een enzym, een recombinase. Als de selectiegenen hun werk hebben gedaan, kan dit

enzym worden geactiveerd. Het knipt dan alle overbodige en ongewenste DNA-stukken tussen twee herkennings'bakens' uit. Wat resteert is het doelgen met de gewenste eigenschap. Dit principe is via modelvectoren uitgetest bij aardappel, tabak, appel en aardbei. De modelvector is gebouwd rond het antibioticumresistentiegen *npII*, dat resistentie geeft tegen kanamycine (Schaart JG, FA Krens, KTB Pelgrom, O Mendes & GJA Rouwendal. 2004. *Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene*. *Plant Biotechnol. J.* 2:233-240). Voor toepassing bij lelie is introductie van of het *bar* gen (basta resistentie) of van het *hpt* gen (hygromycine resistentie) nodig. pRCNG bevat als extra gen het *hpt* gen, zodat die mogelijk gebruikt kan worden om het systeem in lelie te testen. Daar dit gen niet op het deel zit dat er later uit geknipt wordt, moet voor een uiteindelijke toepassing in lelie een speciale vectorset geconstrueerd worden. De voor dit principe benodigde DNA-elementen moeten netjes samen met het doelgen, liefst in één kopie in het genoom van de plant worden ingebracht. *Agrobacterium* is hiervoor het meest geschikte instrument.

De doelstelling van dit project was: het ontwikkelen van een protocol voor de productie van merker-vrije transgene lilies. Hiertoe zou één cultivar gebruikt worden, nl. *L. longiflorum* cv. Snow Queen en als vector de modelvector, pRCNG (Figuur 1). Het reeds produceren van verkmarktbaar lilies was nadrukkelijk niet het doel. De opzet was om eerst te komen tot de meest efficiënte condities voor transformatie via 'particle bombardment' door de protocollen van Lisse en Wageningen te integreren, doel een reproduceerbare methode; te onderzoeken of *Agrobacterium* gebruikt kan worden om lelie te transformeren; een voor lelie geschikte vector-set te maken voor de productie van merker-vrije transgene planten; bij voorkeur moest dit leiden tot merker-vrije transgene weefselkweekplantjes van *L. longiflorum* cv. Snow Queen, hiertoe moesten de condities bepaald worden om het recombinase-enzym in lelie te activeren en om voor het succesvol verlopen van dat proces te kunnen selecteren.



Figuur 1. pRCNG met uitleg van de elementen.

RB = Rechter border; LB = Linker border, *Agrobacterium* herkent deze grenzen en brengt alles wat ertussen ligt over naar de plant, het zogenaamde T-DNA; HPT = hygromycine resistentie gen voor selectie in lelie, dit gen heeft zijn eigen promotor en terminator (niet getekend); 35S = CaMV 35S promotor; Recombinase = is het enzym dat alles tussen de recombinatepunten (groene driehoekjes) verwijdert; LBD = 'ligand binding domain', dit zorgt ervoor dat het recombinase-enzym niet actief kan zijn; pas na een Dex = dexamethason behandeling wordt het enzym actief en verwijdert het DNA (tussen de driehoekjes); CodA = cytosine deaminase, dit is een enzym selectie voor succesvolle recombinate (verwijdering) mogelijk maakt; het zet FC = fluorocytosine wat zelf niet toxisch is voor plantencellen om in FU = fluorouridine dat wel toxisch is. Toevoegen van FC aan het regeneratiemedium laat cellen die codA niet hebben ongemoeid. Dit zijn ongetransformeerde cellen en cellen die na recombinate het codA gen weer kwijt zijn. NptII = het kanamycine resistentiegen dat na transformatie selectie voor cellen met het T-DNA mogelijk maakt; GUS = het reportergen dat in dit geval slechts actief wordt na recombinate daar het oorspronkelijk geen eigen promotor heeft, maar pas na recombinate, kortom een zichtbare indicatie voor succesvolle recombinategebeurtenissen. Bij dit construct blijft dus na recombinate achter een actief gus-gen en een actief hpt-gen; de rest is weg. Voor het maken van merker-vrije transgene planten moeten alle elementen tussen de recombinatepunten aanwezig zijn (het recombinase-gen nu met zijn eigen promotor binnen het driehoekje) en gus en hpt weg.

3. Resultaten

Het onderzoek in dit project is uitgevoerd in drie hoofdrichtingen. Via een *in vitro* weefselkweek benadering zijn bij diverse cultivars aspecten zoals uitgangsmateriaal, callusinductie-efficiëntie, regeneratievermogen, invloed van FC op groei en regeneratie en de effectieve concentratie van hygromycine bestudeerd. Voor de genoverdracht zijn allereerst lopende protocollen van PRI-Wageningen en PPO-Lisse voor Particle Bombardment vergeleken om te zien of het mogelijk was om tot een reproduceerbare methode te komen met een hoge efficiëntie; vervolgens zijn de mogelijkheden voor inoculaties met *Agrobacterium tumefaciens* onderzocht, waarbij ook weer naar het effect van uitgangsmateriaal gekeken is en van bepaalde condities zoals wijze van verwonden, ammonium-gehalte tijdens de co-cultivatatie, percentage Gelrite, selectiedruk e.d. Dit op basis van een Japans artikel (*Hoshi Y, M Kondo, S Mori, Y Adachi, M Nakano & H Kobayashi. 2004. Production of transgenic lily plants by Agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell Rep. 22:359-364*). Tot slot is er een vector geconstrueerd m.b.v. molecuair biologische technieken die geschikt is voor toepassing in lelie en die de productie van merker-vrije transgene plantjes mogelijk moet maken.

3.a Weefselkweekaspecten

3.a.1 Uitgangsmateriaal, callusinductie en regeneratie

Bolschubjes. Jonge lelie schubjes kunnen via particle gun techniek getransformeerd worden. Vervolgens wordt via een callusfase het getransformeerde weefsel geselecteerd. Uit het callus moeten dan weer plantjes geregenereerd worden. Ten bate van deze techniek werden calli op verschillende media geïnduceerd en hun regeneratiecapaciteit onderzocht.

Callus kan ook een geschikt weefsel zijn voor lelietransformatie via *A.tum.*. Om een geschikt callus te verkrijgen voor zowel na particle gun transformatie als voor *Agrobacterium tumefaciens* inoculatie is eerst een zo breed mogelijk scala aan behandelingen ingezet. Dit zijn 24 verschillende behandelingen waarbij een matrix is gemaakt met twee auxines, elk 3 concentraties en twee suikers, elk 2 concentraties (Tabel 1). Elk medium bevat standaard 0.5 μM benzyladenine (BA, een cytokinine).

Tabel 1. Media matrix

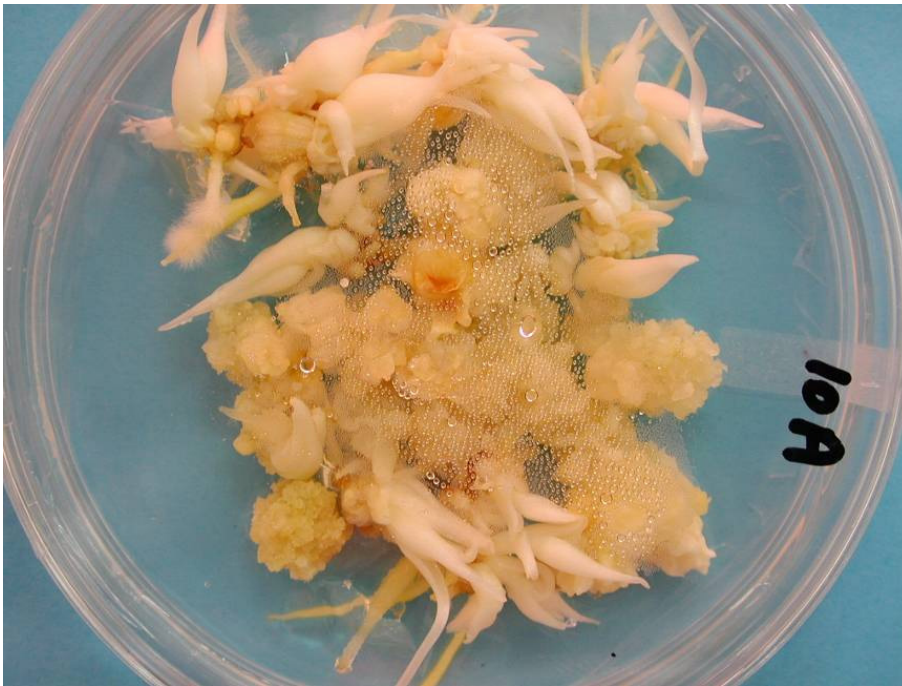
Behandeling:		picloram			dicamba		
		1,5 μM	5 μM	15 μM	1,5 μM	5 μM	15 μM
sucrose	3%	1	2	3	13	14	15
sucrose	6%	4	5	6	16	17	18
glucose	3%	7	8	9	19	20	21
glucose	6%	10	11	12	22	23	24

Hieruit zijn 4 behandelingen gekomen (nummers 7-8-10-11) die het beste reageren met het gezochte soort callus. Dit callus is over langere tijd in stand gehouden. De verschillen tussen glucose en sucrose waren niet groot. Picloram was beduidend beter dan dicamba, maar 15 μM is teveel.

Het callus was nog erg organogeen in deze 4 behandelingen (Figuur 2) en daarom is getest of de cyclusduur omlaag moest om het percentage organogeen callus te verminderen maar dat gaf geen

verbetering. Des ondanks is er genoeg vorming van het gezochte callus type om met deze 4 media door te gaan (ca 30 % van de inzetten).

Er zijn proeven ingezet om de calli te testen op hun regeneratiecapaciteit. Als voorbereiding op inoculatie met *Agrobacterium tumefaciens* is bekeken in hoeverre het plantmateriaal last had van extra verwonding op dag 0 ; 4 en 7 in relatie tot de vorming van het gezochte callus. Dit verwonden gaf geen problemen bij de regeneratie. Tevens is voor dit doel gekeken of het plantmateriaal een half uur in demi water kan overleven. Ook dit had geen negatief resultaat op verdere groei en regeneratie.

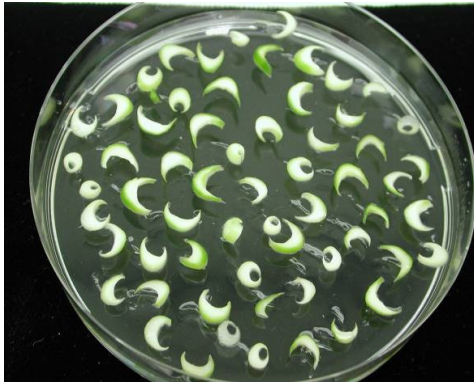


Figuur 2. Callus geïnduceerd op lelieplakjes. Medium: glucose 6 %; picloram 1.5 μ M, deels te vroege organogenese, deels het geschikte callus.

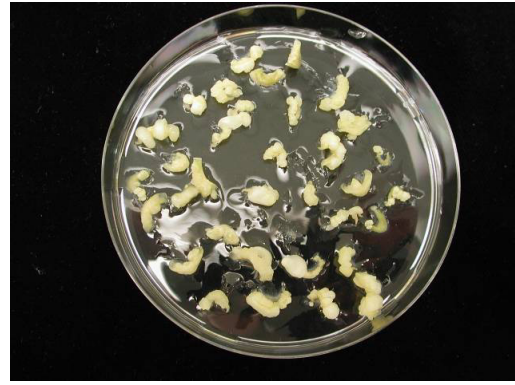
Conclusie: Voor optimale callusinductie bij voorkeur glucose i.p.v. sucrose gebruiken en picloram in een concentratie van 1,5 tot 5 μ M naast 0.5 μ M BA.

Voor de Snow Queen bolschubjes die in Wageningen standaard worden gebruikt is als callusinductiemedium MS met 3% sucrose (MS30) en als groeiregulatoren 0.44 μ M BA en 4 μ M picloram het meest simpel in bereiding en het meest effectief gebleken. Regeneratie op dit callus vindt plaats na overbrenging op regeneratiemEDIUM, MS30 + 0.5 μ M NAA (naftaleenazijnzuur). In een Japans artikel (Hoshi *et al.* 2004) waaruit veel beschreven condities zijn geprobeerd, wordt callus geïnduceerd op medium met als enige groeiregulator 8 μ M picloram. Het callus dat op beide manieren van bolschubjes is verkregen en duidelijk in morfologie verschilt, is lang apart in transformaties met *Agrobacterium* uitgetest. Verschillen in transformatiefrequentie werden echter uiteindelijk niet gevonden.

Conclusie: Voor bolschubjes is voortaan het standaard CIM van Wageningen (Figuur 3) prima te gebruiken.



Links: Bolschubjes direct na uitprepareren op callus inductie medium (CIM; Wageningen) gelegd.

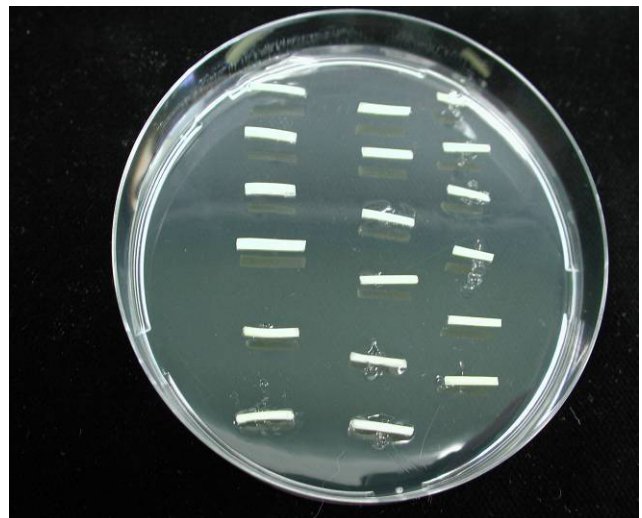
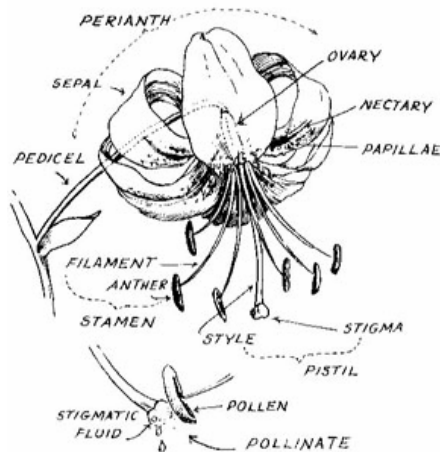


Rechts: Bolschubjes na 1 maand op CIM (Wageningen)

Figuur 3. Bolschubjes van cv. Snow Queen als uitgangsmateriaal voor callusinductie.

Bloemonderdelen. In het eerder genoemde artikel werd callus geïnduceerd op de filamenten (stengeldeel van de meeldraad) geïsoleerd uit nog gesloten leliebloemknoppen (Figuur 4). Na vermeerdering werd dit callus gebruikt voor inoculaties met *Agrobacterium*. Binnen dit project is van de cvs. White Fox (Longiflorum), Sorbonne, Barbados en Marrero (Orientals) en Regatta (Aziaat) callus verkregen afkomstig van filamenten en van de stijlen op de door de Japanners beschreven wijze. Dit callus bleek goed te vermeerderen en tot regeneratie aan te zetten. Het regeneratiemedium wijkt iets af van dat van Wageningen voor bolschubjes en bevat als groeiregulatoren 0.4 μM picloram samen met 0.05 μM BA.

Conclusie: Filament- en stijlcallus is goed te gebruiken voor uitgangsmateriaal voor callusinductie, callusvermeerdering en regeneratie voor Longiflorum en Orientals.



Links: Tekening van een lelie-bloem met positie van filament en stijl. Rechts: Geïsoleerde filamentstukjes op CIM (Japans).

Figuur 4. Filament (meeldraad) stukjes van cv. White Fox als uitgangsmateriaal voor callusinductie.

3.a.2 Invloed FluoroCytosine op groei en regeneratie

Voor de merker-vrije techniek van transformatie wordt in een belangrijke stap als negatieve selectie-merker fluorocytosine (FC) gebruikt. Belangrijk is te weten of deze merker invloed heeft op callusgroei en regeneratie.

Bij twee geselecteerde behandelingen, d.w.z. 3 en 6% glucose, 5 μ M picloram werd de invloed van een oplopende concentratie FC op callusgroei en regeneratie onderzocht; 0, 250, 500 en 1000 mg/l (zie tabel 2 voor proefopzet, 24 behandelingen: 8 voor callusgroei en 16 voor regeneratie).

Tabel 2. Schematisch overzicht van weefselweekregimes

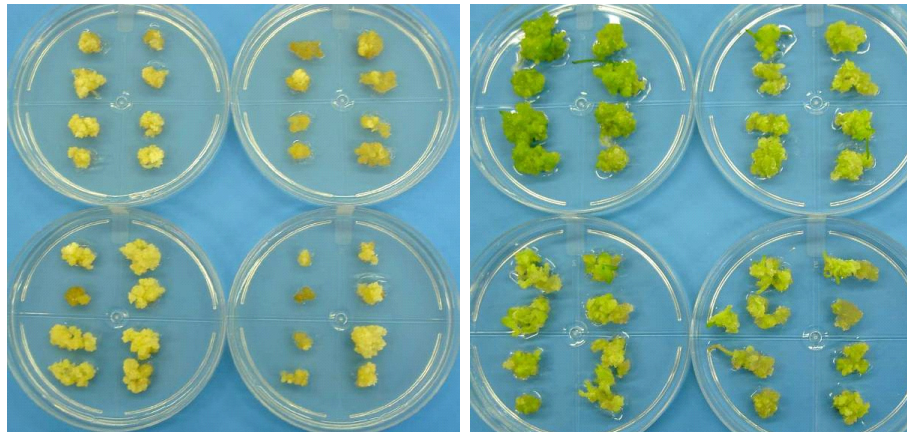
Afkomstig van:	Behandeling:	Fluorocytosine mg/l			
		0	250	500	1000
3 % glucose	Reg. Wageningen	+	+	$\pm$	$\pm$
5 μ M Picloram	Reg. Lisse	$\pm$	$\pm$	$\pm$	-
	Callusgroei	++	+	+	$\pm$
6 % glucose	Reg. Wageningen	+	+	$\pm$	$\pm$
5 μ M Picloram	Reg. Lisse	$\pm$	$\pm$	-	-
	Callusgroei	++	+	+	$\pm$

Media met en zonder FC, en kwalitatieve beoordeling van regeneratie (rijen 1, 2, 4 en 5) en callusgroei (rijen 3 en 6) onder invloed van verschillende FC-concentraties.

Deze concentraties zijn geschikt om in de negatieve selectie te gebruiken. Hierbij werd zowel in het donker als licht gekweekt geregenereerd, waarbij belangrijk is te weten dat FC lichtgevoelig is.

Zoals Figuur 5a laat zien zijn er duidelijk verschillen in callusgroei met en zonder FC, en heeft een oplopende concentratie minder groei tot gevolg. De groei is echter niet totaal uitgeschakeld. Callusgroei in het donker lukt dus ook nog met de hoogste concentratie FC. Voor regeneratie geldt hetzelfde, zie Figuur 5b. Er zijn wat verschillen bij regeneratie in donker (Lisse) en licht (Wageningen); in het licht lijkt het beter te gaan bij gelijke concentraties FC, mogelijk doordat het lichtgevoelige FC dan eerder inactief is geworden. De kwalitatieve beoordeling is aangegeven in de tabel.

Conclusie: FC laat bij lelie callusgroei en regeneratie toe bij afwezigheid van een *codA* gen (controle situatie). Aanbevolen concentraties: tussen 250 en 500 mg/l FC.



Figuur 5a. Callusgroei, met (rechts) en zonder (links) 1000mg/l FC. Boven 3 % en onder 6 % glucose. De callusfragmenten zijn positioneel hetzelfde, d.w.z. een stukje callus van een schaal links is gebruikt op de rechter petrischaal op dezelfde plaats.

Figuur 5b. Regeneratie met en zonder FC; ‘Wageningse’ methode (met licht). Links boven beginnend met de klok mee, 0, 250, 500 en 1000 mg/l FC.

Figuur 5. Effect van Fluorocytosine (FC) op callusgroei en regeneratie.

3.a.3 Effectieve hygromycine concentratie

Van de cultivar Snow Queen zijn bolschubjes gebruikt om op CIM-Wageningen uit te leggen en callusvorming te bestuderen in aanwezigheid van verschillende concentraties hygromycine. Regeneratie is bestudeerd op door callus uit te leggen op regeneratiemedium met diverse concentraties hygromycine, te weten 0, 5, 10, 15, 20 en 25 mg/l. Gekeken is naar remming van de callusvorming of regeneratie zonder dat het weefsel te snel dood ging. Hiervoor bleek 15 mg/l hygromycine de beste concentratie.

Conclusie: Selectie op 15 mg/l hygromycine.

3.b Transformatie

3.b.1 Particle Bombardment (PB)

Bij aanvang van dit project waren er twee PB methoden in gebruik op Plant Research International. Ook was er in 1994/1995 m.b.v. PB transgeen lelie materiaal geproduceerd op PPO-Lisse. Het protocol bleek niet op volledig identieke wijze te herhalen vanwege het verloren gaan van technische aanpassingen aan de “Gun”. Het protocol is vervolgens zo veel mogelijk aan de huidige mogelijkheden aangepast en vergeleken met de PRI methoden. Er zijn diverse particle bombardment (PB) experimenten ingezet om een transgene lelie (*L. longiflorum* cv. Snow Queen) te maken en te bepalen welke methode het meest geschikt is om merker-vrije lelies mee te kunnen produceren. Hiervoor is uiteindelijk een goed reproduceerbaar en redelijk efficiënt protocol nodig.

Er is in deze proeven meestal getransformeerd met pPG5 (PAT-GUS) en met pRCNG-1 (merkervrij modelvector).

De twee methoden die op PRI waren ontwikkeld bleken onvoldoende reproduceerbaar, alhoewel er bij gelegenheid wel degelijk transgene calli en scheutjes zijn verkregen. Deze methoden waren gebaseerd op het gebruik van BASTA als selectiemiddel en een relatief korte callusperiode. Vervolgens is een aangepast PPO-Lisse protocol getest met jonger uitgangsmateriaal, een langere callusfase in het donker en selectie op hygromycine. In vier onafhankelijke experimenten is geschoten met pPG5 en met pRCNG-1. En in twee experimenten is geschoten met alleen pRCNG-1.

Het materiaal dat is beschoten met pPG5 en dus op medium met BASTA beselecteerd wordt, gaf de eerste weken een veel betere groei van het materiaal dan de explantaten die beschoten waren met pRCNG-1 en op medium lagen met hygromycine. De selectie op hygromycine verloopt veel sterker en sneller dan de selectie op BASTA. In een later stadium veranderde dit en bleef er in de meeste gevallen alleen nog wat callus in leven op medium met hygromycine.

Uit de eerste experimenten die gedaan zijn, zijn calluslijnen voortgekomen die transgeen bleken te zijn. Dit is aangetoond mbv PCR. De gebruikte constructen waren pPG5 en pRCNG-1. Het lijkt erop dat het aangepast PPO-Lisse reproduceerbaar transgeen callus en scheutjes geeft. Moleculaire analyse van het eerste lelie plantmateriaal verkregen na transformatie met pRCNG via PCR gaf als resultaat dat de aanwezigheid van het *hpt* gen én van het *gus* gen kon worden aangetoond.

Een andere aanpak is om geen bolschubjes te gebruiken als uitgangsmateriaal, maar callus. Dit naar analogie van een erg succesvol protocol dat ontwikkeld is bij *Allium* spp. (ook *Liliaceae*; *A. tum*). Derhalve is er in twee experimenten op verschillende media en op verschillende soorten explantaten callus gemaakt. Dit callus is gebruikt voor transformatie experimenten met de gun en met *A. tum*.

Het hybride protocol is vijfmaal herhaald met de model-MF-vector, pRCNG. Uit alle vijf is transgeen callus materiaal verkregen, wat doorgroeit op 15 mg/l hygromycine. Inductie van regeneratie is ingezet. Van het eerste experiment zijn transgene scheuten verkregen. Het transgene karakter van de eerste vier lijnen is bevestigd d.m.v. PCR. Alle lijnen bevatten *hpt* en *gus* sequenties; 3 van de vier zijn PCR-positief ook op alle andere geteste elementen, zoals *codA*, LBD en *recR*. Onduidelijk is of die drie onafhankelijke transformanten zijn en of alles er in één doorlopende insertie in zit of verspreid over meerdere inserties. Een deel van dit materiaal groeit zo snel op hygromycine-medium, dat er voldoende was om met DEX te behandelen en de groei op FC-medium in verschillende concentraties te volgen. Een eerste beoordeling geeft aan dat er geen verschil is tussen met of zonder DEX behandeling, maar dat er wel degelijk een effect is van de FC (Figuur 6). Dit zou erop kunnen wijzen dat het *codA* aanwezig en actief is. Bij de controles op medium zonder FC is er geen sprake van uitval. Controle non-GM callus groeit ook door op medium met FC (zie weefselkweek). Het afwezig zijn van een effect van DEX kan betekenen dat het gen er niet volledig in zit, dat de inductie niet goed werkt of dat er meerdere kopieën van het *codA* gen in het genoom van lelie zijn terechtgekomen, die er door de DEX behandeling niet allemaal zijn uitgegooid. Meerdere kopieën van (stukken van) T-DNA worden vaak aangetroffen na PB. Verdere moleculaire analyse was nodig geweest om hierover uitsluitsel te geven. Echter, dit materiaal is helaas verloren gegaan in 2005 tezamen met al het andere materiaal waarschijnlijk door een verkeerde batch hygromycine (zie later).

De ervaringen met het te verwachten integratiepatroon na PB (in stukken en in meerdere kopieën) en de eerste observaties hier maken deze genoverdrachtmethode minder geschikt voor de doelstelling van dit project, het maken van merker-vrije transgene lelies; hiervoor is bij voorkeur 1 kopie van een volledig intact T-DNA met al zijn elementen nodig. *Agrobacterium* is hiertoe beter geschikt.



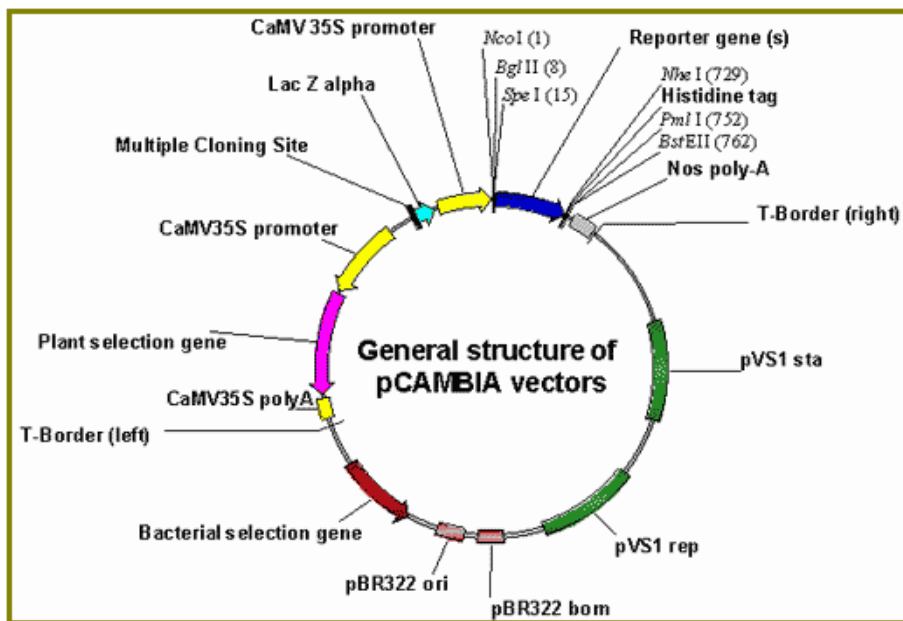
Figuur 6. Groei- en regeneratieverschillen o.i.v. DEX en FC in het medium.

Het verschil in groei op medium met of zonder FC (250 mg/l) van Snow Queen callus verkregen na PB met pRCNG en selectie op hygromycine (15 mg/l). Er is niet eerst een DEX behandeling gegeven, wel zit er iets in het medium.

Conclusie: Er is een reproduceerbare genoverdrachtsmethode voor lelie beschikbaar gebaseerd op Particle Bombardment (*Benedito VA, BCE van Kronenburg-van der Ven, JM van Tuyl, GC Angenent & FA Krens. 2005. Transformation of *Lilium longiflorum* via particle bombardment and generation of herbicide-resistant plants. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 5:259-264*). Voor de productie van merker-vrije transgene lilies wordt overgegaan op *Agrobacterium*-gemedieerde genoverdracht.

3.b.2. *Agrobacterium tumefaciens*

In de jaren voorafgaand aan dit project was er op verschillende momenten reeds onderzoek gedaan aan de mogelijkheid om via *Agrobacterium* genen over te dragen naar lelie. Meestal werden hiertoe explantaten afkomstig van wortel, blad of schub geïnoculeerd met de op dat moment beschikbare *Agrobacterium* stammen uitgerust met binaire vectoren met selectie en reporter(*gus*)gen. Inmiddels is uit onderzoek aan andere monocotylen zoals rijst en tarwe, maar ook aan ui of gladiol meer bekend over welke stammen, vectoren, inoculatie- en selectieparameters van belang zijn bij transformatie van monocotylen. Deze nieuwe inzichten zijn in dit project ingebracht. Het Japanse protocol (Hoshi *et al.* 2004) leverde ook veel nieuwe invalshoeken op, die uitgetoet zijn. Met behulp van de histochemische kleuringsreactie op GUS activiteit is eerst het effect van diverse parameters op genoverdracht bekeken; parallel daaraan is vaak het grootste deel van de geïnoculeerde explantaten doorgekweekt op selectie om de frequentie van stabiele genoverdracht te kunnen bepalen. Standaard is als *Agrobacterium* stam de stam AGLO gebruikt. Dit is een zogenaamde supervirulente stam die zeer geschikt is voor monocylentransformatie. Het binaire plasmide pCAMBIA1301 (Figuur 7) met als selectiegen het *hpt* gen coderend voor hygromycine selectie en het *gus* gen als reporter. Die laatste maakt het mogelijk tussentijds een beeld te kunnen krijgen van de genoverdrachtsefficiëntie d.m.v. een histochemische kleuring. Hiernaast is als binaire vector ook pRCNG gebruikt die ook het *hpt* gen bevat en gebruikt kan worden om te zien of de elementen nodig voor het maken van merker-vrije lilies werkzaam zijn in lelie.



Figuur 7. Kaartje van pCAMBIA1301.

3.b.2.1 Transiente expressie

Uitgangsmateriaal, leeftijd callus en selectiedruk. Bolschubjes zijn het basis uitgangsmateriaal voor op PRI gebruikte protocollen voor transformatie. Door deze uit te leggen op callusinductiemedium (CIM) kan er callus op de schubjes geïnduceerd worden dat ook bruikbaar is voor transformaties. Het callus is gemakkelijk in grote hoeveelheden te verkrijgen en regenereert goed. Bij gladiol bleek het belangrijk eerst callus te induceren en niet direct de kraaltjes aan *Agrobacterium* inoculatie bloot te stellen. De leeftijd van het callus was een bepalende factor voor succes. Analoog hieraan zijn schubben direct en na verschillend aantal maanden (1, 2 of 3) op CIM gebruikt voor transformatie. Het Japanse protocol is gebaseerd op het gebruik van filamenten. Deze worden uit ongeopende bloemen geïsoleerd en op callus proliferatie medium gelegd. Na 2 maanden kan dit callus gebruikt worden, maar het kan ook aangehouden worden op hetzelfde medium en later gebruikt worden in transformaties. Andere opvallende karakteristieken van het protocol zijn de manier van verwonden van het callus (schuurpapier in buizen en schudden), het gebruik van MS zonder NH_4NO_3 in inoculatie- en cocultivatiedmedium, de cocultivatieduur (7 dagen!), het direct na cocultivatatie plaatsen op regeneratiemedium en het gebruik van 50 mg/l hygromycine.

Voor een overzicht van de experimenten, zie Tabel 3. Een deel van de calli, behandeld met *A. tum* (pCAMBIA1301) is ter vaststelling van de genoverdrachtsfrequentie na inoculatie gekleurd op GUS-activiteit. Het beeld uit die kleuringen was dat er bij schubben en wortels meestal slechts erg weinig genoverdracht had plaatsgevonden bij gebruik van de PRI-methode (weinig tot geen blauwe spots). Wel zijn er nog calli, die nog groei vertonen op selectiemedium met 20 mg/l hygromycine na 6 tot 17 weken (afh. van experimentnummer). Als voorlopige observatie kan gelden dat tot nu toe de meeste spots en doorgroei is vastgesteld met callus van twee maanden oud, zowel bij schubben als bij wortels. Getest is ook of 50 mg/l hygromycine, zoals gemeld in het Japanse artikel bruikbaar was. Duidelijk was wel dat 50 mg/l hygromycine teveel is als selectiedruk. Het Japanse protocol gaf de meeste blauwkleuring, maar uiteindelijk geen doorgroei in de eerste experimenten vanwege de te hoge hyg-concentratie. Deze is aangepast tot 20 mg/l in vervollexperimenten en nog weer later tot 15 mg/l (zie eerder). Ook schubben en wortels zijn m.b.v. een aangepast Japans protocol getransformeerd. Dit leidde tot meer spots en doorgroei van calli.

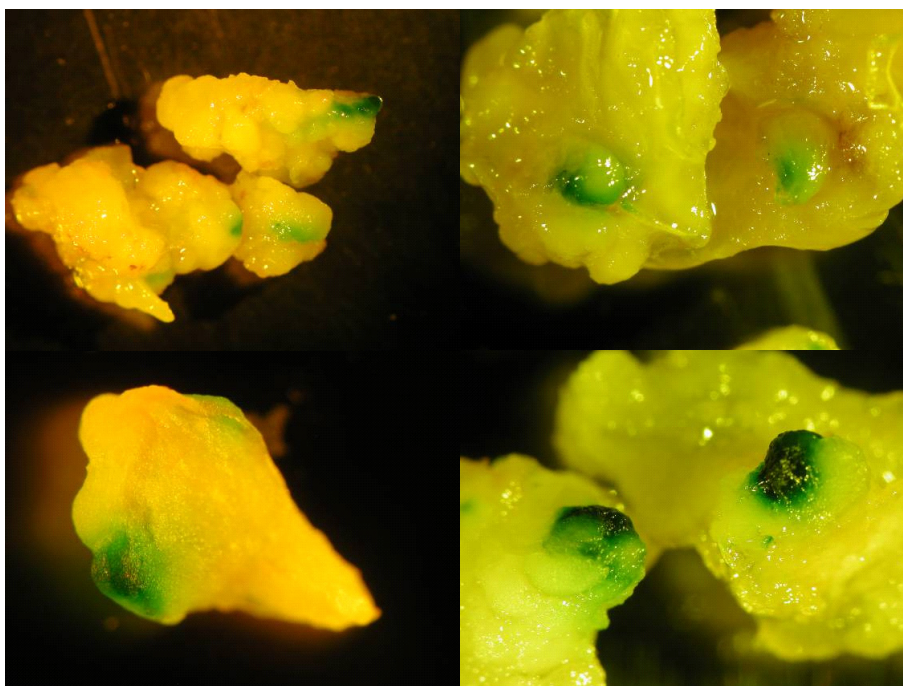
Tabel 3. De transformatie-efficiëntie gekoppeld aan cultivar, callustype en protocol (experimenten 2004 deel één).

Exp nr	Explantaat type Callus op	Methode	Aantal expl geselecteerd op 20 of 50 mg/l hygro		Aantal expl nog over na x weken; na selectie op 20 of 50 mg/l hygro		Opmerkingen
			20	50	20	50	
2	Schubben 1 mnd oud	PRI	182	200	23 na 17 weken	0 na 4 weken	0 spots
3	Schubben 2 mnd oud	PRI	200	200	330 na 13 weken	0 na 13 weken	Weinig spots
4	Schubben 3 mnd oud	PRI	1250	1200	90 na 13 weken	0 na 9 weken	0 spots
5	Wortels 1 mnd oud	PRI	160	340	0 na 17 weken	0 na 8 weken	0 spots
6	Wortels 2 mnd oud	PRI	200	200	95 na 14 weken	0 na 14 weken	0 spots
7	Filamenten 1 mnd oud	Japans		600		0 na 17 weken	Wel spots
9	Wortels 2 mnd oud	Japans	370		250 na 6 weken		van de 360 expl 9 expl met spots
10	Schubben 2 mnd oud	PRI	300		200 na 6 weken		van de 150 expl 1 expl met spots
11	Schubben 2 mnd oud	Japans	300		300 na 6 weken		van de 320 expl 6 expl met spots
13	Wortels 2 mnd oud	PRI	450		60 na 6 weken		van de 100 expl 1 expl met spots
15	Filamenten 2 mnd oud	Japans		150		0 na 10 weken	Niets gekleurd
16	Schubben 3 mnd oud	Japans		2300		0 na 10 weken	Wat spots
17	Filamenten 2 mnd oud	Japans	650		80 na 4 weken		van de 350 expl 5 expl met spots

In de tweede helft van 2004 zijn van 3 cultivars, Sorbonne [Oriental], Regata [Aziat] en White Fox [longiflorum] filamenten, stijlen en bloembladeren op Japans callusinductiemedium (CIM) uitgelegd en na 13 weken met *A.tum.* geïnoculeerd (Tabel 4). Na 7 dagen is alles GUS-gekleurd. Blauwe spots zijn als indicator voor succesvolle genoverdracht gescoord. Resultaat: Genoverdracht vond plaats; grote donkerblauwe vlekken (zie Figuur 8). White Fox> Sorbonne>>> Regata; stijlen> filamenten>> bloembladeren. Let wel: van de stijlen zijn veel minder explantaten beschikbaar i.v.m. filamenten.

Vervolgens zijn schubben op twee CIMs uitgelegd, te weten PRI en Japans. Na 14 weken zijn het callus en/of de explantaten gebruikt voor transformatie volgens het Japanse protocol. Na 8 dagen is een deel GUS-gekleurd. Alleen bij CIM PRI zijn blauwe spots geconstateerd, dus genoverdracht. De rest van het materiaal wordt doorgeselecteerd en vertoont nog groei, nu na 3 maanden op hygromycine. In het laatste experiment van 2004 is callus van de verschillende CIMs volgens de PRI methode getransformeerd en nog callus van filamenten van Sorbonne en White Fox. Het callus was zo'n 16 weken oud. GUS-kleuringen in dit experiment geven aan dat er genoverdracht geconstateerd kon worden bij schubben van CIM PRI en filamenten, dus nu ook m.b.v. het PRI-transformatie protocol! De rest van het materiaal wordt doorgeselecteerd en vertoont nog groei na 2,5 maanden op hygromycine.

Conclusie: Over het algemeen lijken de filamenten (CIM JAP + trafo Jap) en schubjes (CIM PRI + trafo Jap) de beste perspectieven te bieden.



Figuur 8. GUS-positieve spots op calli afkomstig van filamenten na transformatie volgens Japans protocol.

Tabel 4. De transformatie-efficiëntie gekoppeld aan cultivar, callustype en protocol (experimenten 2004 deel twee).

Proef nr.	Materiaal	Trafo protocol	Aantal schalen callus na transformatie	GUS
LEL-3	Sorbonne filament	JAP	7	++
	Sorbonne stijl		4	++
	Sorbonne bloemblad		1	+
	White Fox filament		3	++++
	White Fox stijl		1	++++
	White Fox bloemblad		1	++
	Regata filament		1	±
	Regata stijl		-	-
	Regata bloemblad		1	0
LEL-4	SQ schub CIM PRI	JAP	30	+++
	SQ schub CIM JAP		4	0
	SQ schub CIM JAPRI		5	0
LEL-5	SQ schub CIM PRI	PRI	16	++
	SQ schub CIM JAP		5	0
	SQ schub CIM JAPRI		1	-
	Sorbonne filament		4	±
	Sorbonne bloemblad		1	-
	White Fox filament		2	-

Mediumstijfheid gedurende cocultivatatie, wijze van verwonden. In deze experimenten was het standaard-materiaal bolschubben, callus geïnduceerd op bolschubben (cv. Snow Queen [longiflorum]) en callus geïnduceerd op stijl en filament (cvs. White Fox [longiflorum], Marrero [oriental] en Barbados [oriental]). De gebruikte *Agrobacterium* stammen waren AGLO(pCAMBIA1301 en AGLO(pRCNG). De in eerdere rapportages genoemde Japanse groep op wier protocol wij ons hybride-protocol hebben gebaseerd vond een hogere genoverdrachtsfrequentie indien cocultivatatie werd gedaan op medium met 10% Gelrite i.p.v. met 3% zoals gebruikelijk. Wij hebben dit in onze omstandigheden uitgetest en konden dit beeld bevestigen bij het callus geïnduceerd op stijl of filament; bij de bolschubjes werd geen verschil gevonden (Tabel 5). Daarnaast bleek het eerder waargenomen cultivareffect: White Fox > Marrero > Barbados (of liever longiflorum > oriental).

Dezelfde Japanse groep verwondt het callus door het in buizen gecoat met schuurpapier te vortexen, terwijl wij de callus klein/fijn snijden in de *A. tum.* suspensie. Beide methoden van verwonding zijn nu ook door ons vergeleken. Soms gaf schuren meer spots dan snijden, maar meestal was dit andersom (Tabel 6). Op zich dus geen reden om de wijze van verwonding te veranderen, echter het materiaal kwam toch dermate anders uit de behandeling (meer intact met soms toch veel genoverdracht), dat deze wijze is toegepast in enkele van de grootschaliger experimenten naast snijden.

Het callusinductiemedium van de Japanse groep verschilt in slechts 1 aspect met dat van ons, nl. de concentratie picloram (wij 1 mg/l; zij 2 mg/l). Er is echter een duidelijk verschil in groeisnelheid van callus van bolschubben, waarbij 1 mg/l > 2 mg/l. Onderzocht is of dit leidt tot verschillen in genoverdracht, resultaat: de CIM PRI > CIM JAP (Tabel 6).

Conclusie: Uit al deze proeven bleek dat het goed mogelijk is om d.m.v. *Agrobacterium* genoverdracht te bewerkstelligen in lelie. De wijze van verwonding is niet belangrijk en voor bolschubjes de stijfheid van het medium evenmin; wel is het CIM PRI beter. Bij het filamentcallus is 10% Gelrite beter.

Tabel 5. Het effect van de concentratie Gelrite tijdens de cocultivatatie op genoverdracht (GUS-spots).

Materiaal	Aantal callus stukjes gekleurd	Aantal spots
Marrero (O) stijl 3%	9	2
Marrero stijl 10%	20	45
Marrero meeldraden 3%	35	6
Marrero meeldraden 10%	25	15
White Fox (L) stijl 3%	25	9
White Fox stijl 10%	40	125
White Fox meeldraden 3%	40	0
White Fox meeldraden 10%	50	28
Barbados (O) stijl 3%	15	0
Barbados stijl 10%	15	1
Barbados meeldraden 3%	65	0
Barbados meeldraden 10%	60	0
Snow Queen (L) schub 3%	200	35
Snow Queen schub 10%	200	30

Tabel 6. *Het effect van verwondingsmethode, CIM en callustype op de genoverdrachtsfrequentie. Gegeven is het aantal spots na GUS-kleuring op een gelijk aantal calli (n=25).*

		Gewone methode	Grof schuur papier	Fijn schuur papier
Marrero	Stijl	10	45	25
	Meeldr	71	60	6
White Fox	Stijl	98	34	25
	Meeldr	32	108	262
SQ callus	CIM JAP	62	21	29
	CIM PRI	628	160	47
SQ	schub	136	50	91



Figuur 9. *Efficiënte genoverdracht naar Snow Queen schubcallus. Hier is gekleurd na selectie (niet transient dus).*

3.b.2.2. Stabiele genoverdracht

Zoals in de vorige paragraaf gemeld is het grootste deel van het geïnoculeerde leliemateriaal uit de toenmalige experimenten in 2004 en 2005 doorgekweekt op medium met selectie, 20 later 15 mg/l hygromycine. Uit alle experimenten die volgens het verderop te beschrijven 'hybride' protocol (mix tussen de PRI methode en de Japanse methode) zijn uitgevoerd, werd materiaal verkregen dat doorgroeide op selectiemedium. Soms zelfs de eerste regeneranten. GUS kleuringen waren echter negatief, al was niet al het materiaal getest of testbaar (pRCNG afgeleid; hier is pas GUS activiteit na recombinatie). Moleculaire analyse moest uitsluitsel geven.

Uiteindelijk echter hebben alle grootschalige experimenten toch niet in transgeen callus of plantjes geresulteerd, op het laatste experiment na; veel eerder dan gebruikelijk stierf al het materiaal af.

Materiaal wat aanvankelijk doorgroeide uit experimenten uit 2004, stierf ook massaal af rond mei/juni 2005. De *Agrobacterium* stammen zijn toen m.b.v. PCR gecontroleerd op de aanwezigheid van vir-plasmide en hygromycine gen. Dit bleek in orde; vervolgens is tabak geïnoculeerd met de stammen om te bevestigen dat de stammen in staat zijn om tot transgene tabaksplantjes te leiden. Uit dit experiment kwam naar voren dat er iets mis was met de toegepaste selectie. Regeneratie bleek in orde; genoverdracht ook, maar integratie, stabiele transformatie en (dus) selectie niet. Dit kan een mogelijke verklaring zijn voor de waarnemingen qua afsterven van leliemateriaal in 2005. De laatste proef met lelie ingezet in november 2005 en de herhaling van de tabaksproeven geven aan dat de selectie toen weer normaal functioneerde. Van de laatste proef met lelie is nog callusmateriaal van White Fox aanwezig dat nu op regeneratiemedium staat en zelfs een scheutje van Marrero.

In 2006 zijn een viertal grootschalige experimenten ingezet met filament- en stijlcallus van White Fox, Barbados en Marrero (CIM JAP) en bolschubcallus van Snow Queen (CIM PRI en CIM JAP). De *Agrobacterium* stammen AGLO (pCambia1301) en AGLO(pRCNG) zijn gebruikt bij een O.D. van rond de 0.6. Inoculatie vond plaats in vloeibaar MS medium zonder NH_4NO_3 (JAP), gedurende de inoculatie (20 minuten) werd het callus fijn gesneden om wondvlakken te creëren (PRI). Cocultivatatie vond plaats op MS medium zonder NH_4NO_3 met 3% Gelrite gedurende 7 dagen (JAP). Daarna werd het materiaal overgebracht op selectiemedium, dat bestond uit regeneratiemedium (JAP) plus antibiotica om *Agrobacterium* uit te schakelen en hygromycine (15 mg/l; PRI) om te selecteren. Dit protocol is het 'hybride' standaard protocol. In sommige experimenten is verwonding geïnduceerd door vortexen in buizen met schuurpapier (JAP) en is de cocultivatatie uitgevoerd op medium met 10% Gelrite. De laatste twee experimenten zijn uitgevoerd met *Agrobacterium* stam AGLO(pMF-2; zie Tabel 7). Deze serie experimenten was bedoeld om te zien of en hoeveel transgeen lelie materiaal er d.m.v. *Agrobacterium* te genereren is, gebruik makend van een geoptimaliseerd (hybride) protocol.

Inmiddels is actief, op hygromycine groeiend en regenererend callus verkregen van alle cultivars! Het meest van Snow Queen (Figuur 9), maar hier was ook het meeste materiaal van en dus is deze cultivar ook het meest gebruikt. Aangezien van alle cultivars, *A.tum.* stammen, CIM typen en experimenten die op verschillende tijdstippen zijn uitgevoerd transgeen materiaal is verkregen is de conclusie gerechtvaardigd dat in dit project een reproduceerbare methode is ontwikkeld om lelie te transformeren m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens*, een van de doelstellingen van het project (Figuur 10). Van een deel van de plantjes (de mooiste en verst in ontwikkeling) zijn wortels, blaadjes en/of schubjes GUS gekleurd en GUS-positieve individuen zijn geïdentificeerd (Figuur 11). Moleculair zijn een aantal m.b.v. PCR geanalyseerd op aanwezigheid van *hpt* en *gus* gen; ook hier bleken alle geteste positief (Tabel 7). In de toekomst verdient het wel aanbeveling om te kijken of de plantjes op een gegeven moment van selectie afkunnen analoog aan de procedure bij bijv. aardbei. Soms lijkt toch een deel alsnog verloren te gaan als de plantjes op hygromycine aangehouden worden, een ander deel echter duidelijk niet.

Tabel 7. Efficiëntie van stabiele transformatie d.m.v. *Agrobacterium tumefaciens*.

Cultivar	Construct	Aantal GM scheuten	GUS kleuring	PCR gus	PCR hpt
Barbados	pCambia1301	3	+	+	+
	pRCNG	0			
Marrero	pCambia1301	1	n.d.	n.d.	n.d.
	pRCNG	0			
White Fox	pCambia	6	+	+	+
	pRCNG	6	+/-*	n.d.	n.d.
Snow Queen	pCambia1301	14	+	+	+
	pRCNG	8	+/-*	+	+
	pMF-2	9	+/-	+/-	+

*= bij pRCNG kan er pas GUS-kleuring waargenomen worden als er recombinatie is opgetreden.

De meeste scheuten afkomstig uit de experimenten met pRCNG waren wit, maar een paar gaven blauwe spikkels. Dit geeft aan dat er spontaan recombinatie heeft plaatsgehad, nog zonder DEX behandeling. Deze spontane recombinatie treedt ook bij andere gewassen op, zoals bij appel. Het geeft aan dat het recombinatiesysteem in lelie kan werken. De pRCNG planten worden nader bestudeerd en aan DEX behandelingen onderworpen. Nadere moleculaire analyse volgt, evenals nieuwe transformatie-experimenten.

Noot: Tijdens het schrijven van deze eindrapportage werden de eerste resultaten verkregen van een behandeling van pRCNG-lieleplantjes (schubjes) met 25 μ M dexamethason gevolgd door regeneratie van nieuwe bolletjes op medium met 250 mg/l FC. Volledig blauw gekleurde scheuten zijn verkregen. Dit bewijst de werkzaamheid in lelie van het recombinatiesysteem. Overigens werden net als bij appel en aardbei ook individuen geïdentificeerd waar de behandeling niet of niet volledig effectief is geweest, zoals bij een biologisch systeem verwacht kan worden.

Conclusie: Stabiel getransformeerde lelie planten zijn verkregen na genoverdracht via *Agrobacterium* bij zowel Longiflorums als bij Orientals. Bij Longiflorums gaat genoverdracht veel efficiënter dan bij Orientals. Concreet bewijs, dat recombinatie mogelijk is in lelie, is geleverd en daarmee zijn merker-vrije GM-lieleplanten verkregen.



Figuur 10. Vijf transgene lelies op 15 mg/l hygromycine, compleet met bolletje, blad en wortel.

De plantjes zijn afkomstig van het eerste grootschalige experiment, nr.1 = Snow Queen, bolschub, CIM JAP, pCAMBIA; nr.2 = SQ, bolschub, CIM JAP, pRCNG; nr.3 = Barbados, filament, CIM JAP, pCAMBIA1301; nr.4 = SQ, bolschub, CIM PRI, pCAMBIA1301; nr.5 = SQ, CIM PRI, pRCNG.



Figuur 11. *GUS*-positief blad, wortel en schub materiaal twee individuen afkomstig van SQ, bolschub, CIM PRI, pCAMBIA1301.

3.c Vectorconstructie

Er zijn twee wegen gevolgd om tot een voor lelie geschikte nieuwe vector te komen om merker-vrije transgene planten te kunnen produceren, dus zonder ongewenste selectiegenen, maar met het door de onderzoeker/veredelaar/teler gewenste gen (= eigenschap). Uitgaande van een vector als de pRCNG (model) moet de doelvector beschikken over de volgende elementen:

- Een werkend selectie gen, zijnde het *hpt* gen onder controle van een werkende promotor, zijnde de 35S promotor van CaMV om de cellen met het bedoelde T-DNA te kunnen beselecteren.
- Een werkend negatief selectie gen, zijnde het *codA* gen onder controle van de 35S promotor om na de recombinitie de cellen die de ongewenste sequenties verloren hebben te kunnen beselecteren.
- De combinatie van recombinase gen en LBD activiteitsremmer met zijn eigen 35S promotor om op het gewenste moment, i.e. na selectie voor transgene cellen met het T-DNA, d.m.v. een dexamethason behandeling alles tussen de recombinitiepunten te kunnen verwijderen.
- De recombinitiepunten; al het voorgaande ligt tussen deze punten.
- Een zogenaamde 'multiple cloning site' (MCS) waarin gemakkelijk elke gewenste gencassette (= coderend gebied van een gen plus de regulatiesequenties, zoals promotor) geplaatst kan worden. Deze bevindt zich buiten de recombinitiepunten, want deze eigenschap, bijvoorbeeld een insectenresistentiegen, dient achter te blijven in de transgene lelie.
- T-DNA borders; al het voorgaande is gelegen tussen de voor overdracht door *Agrobacterium* benodigde T-DNA grenssequenties (= borders).
- Naast het T-DNA stuk is er de rest van de vector, de ruggegraat (backbone), waarop functies van belang voor handhaving van de vector in *E. coli* (voor aanpassing, inbrenging in de vector van gewenste genen) en in *A. tum.* (voor inbrenging te zijner tijd in de plant).

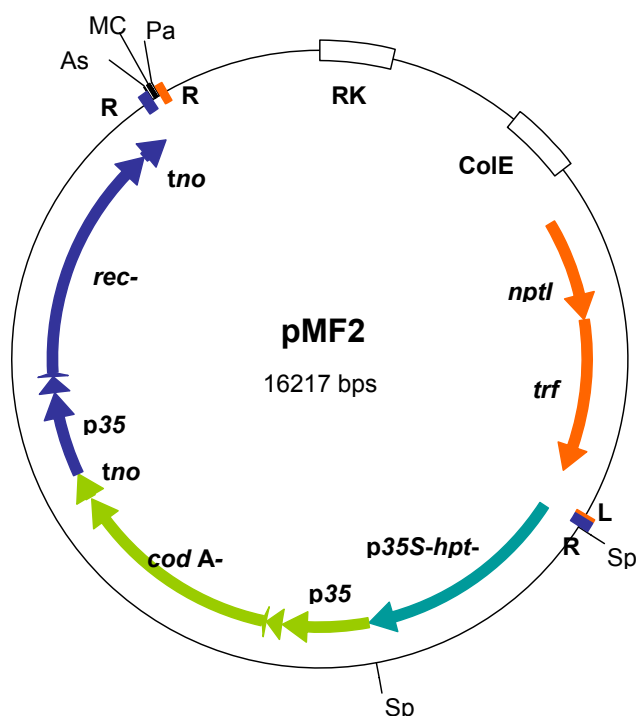
De eerste serie, afgeleiden van de pMF-1000, bleek te moeilijk en uiteindelijk ook ongeschikt; de tweede serie, pMF-1 en afgeleiden, is met succes tot stand gekomen en gebruikt in lelie transformaties.

3.c.1 pMF-1000.

Om al het overbodige DNA te verwijderen is pRCNG ontdaan van heel het T-DNA inclusief de borders. Daarna zijn alle elementen apart klaargemaakt en in de basisvector gebracht. De linker- en rechterborder (LB en RB resp.) zijn gesynthetiseerd en ingebracht. Het recombinasegen met LBD is in een expressiecassette bestaande uit een 35S promotor en nos terminator geplaatst en dat geheel is als gencassette in de basisvector geplaatst nadat die was voorzien van de recombinatiepunten. Ook het *codA-nptII* fusieconstruct compleet met regulatiesequenties is tussen de recombinatiepunten geplaatst, met daarbuiten een MCS. In deze MCS is de *gus* intron gencassette geplaatst om genoverdracht te kunnen volgen. Deze vector is getest in tabak, appel en aardbei. Voor lelie is als selectiegen het *hpt* gen nodig. In deze opzet is geprobeerd eenzelfde fusieconstruct te maken als voor *nptII*. Kortom, een fusie tussen het *codA* gen en het *hpt* gen, zodat er in de cel een fusieeiwit gevormd wordt met beide functies voor zowel positieve als negatieve selectie, analoog aan het *codA-nptII* fusieconstruct. Dit bleek niet eenvoudig te realiseren. Uit de tests met de andere gewassen bleek tevens dat er met een hoge frequentie naast T-DNA grote stukken van de vector-backbone geïntegreerd werden in de transgene planten. Dit is ongewenst. De oorzaak lag in een deletie van één basepaar in de rechterborder. Deze aanpak en de reeds geproduceerde vectoren zijn vervolgens verlaten.

3.c.2 pMF-1 en pMF2.

De pMF-1 is op dezelfde wijze als de pMF-1000 gemaakt met als verschil dat er een nieuwe rechterborder is gesynthetiseerd en dat alle onderdelen alvorens in te bouwen eerst nog eens grondig zijn gesequenced, d.w.z. dat de precieze basevolgorde van elk element is bepaald en geverifieerd. Gezien de problemen met het maken van een fusieeiwit *codA-hpt* ter vervanging van het beschikbare *codA-nptII* is besloten om tussen de recombinatiepunten een unieke restrictieplaats te incorporeren, waar op eenvoudige wijze een extra *hpt* gencassette, pMF-2, of extra *bar* gencassette, pMF-3, ingebracht kan worden. pMF-2 en pMF-3 bevatten zodoende naast het *codA-nptII* fusiegen een extra gen voor selectie op andere antibiotica dan kanamycin, namelijk respectievelijk hygromycine en Basta. Aangezien dit extra gen tussen de recombinatiepunten ligt, wordt het na recombinatie ook verwijderd en zal de transgene plant dan dus merker-vrij zijn.



Figuur 12. Kaartje van pMF2.

4. Conclusies

- Voor optimale callusinductie bij voorkeur glucose i.p.v. sucrose gebruiken als koolstofbron en picloram als auxine-type groeiregulator in een concentratie van 1,5 tot 5 μM naast 0.5 μM BA (benzyl-adenine) als cytokinine.
- Voor bolschubjes is voortaan het standaard CIM (callus inductie medium) van Wageningen prima te gebruiken.
- Filament- en stijlcallus is goed te gebruiken voor uitgangsmateriaal voor callusinductie, callusvermeerdering en regeneratie voor Longiflorum en Orientals.
- FC (fluorocytosine) hindert bij lelie de callusgroei en regeneratie niet indien het *codA* gen afwezig is (controle situatie). Aanbevolen concentraties: tussen 250 en 500 mg/l FC.
- Selectie op 15 mg/l hygromycine voldoet in het geval van lelie.
- **Er is een reproduceerbare genoverdrachtsmethode voor lelie ontwikkeld en beschikbaar gebaseerd op Particle Bombardment.**
- Over het algemeen lijken callus geïnduceerd op filamenten m.b.v. het Japanse CIM en getransformeerd op de aangepaste japanse manier (CIM JAP + trafo Jap) en callus geïnduceerd op bolschubjes getransformeerd op de aangepaste Japanse manier (CIM PRI + trafo Jap) de beste perspectieven te bieden voor succesvolle genoverdracht in lelie.
- **Uit de uitgevoerde proeven bleek dat het goed mogelijk is om d.m.v. *Agrobacterium* genoverdracht te bewerkstelligen in lelie.**
- De wijze van verwonding is niet belangrijk en voor bolschubjes de stijfheid van het medium evenmin; wel is hier het CIM PRI beter. Bij het filamentcallus is 10% Gelrite beter.
- **Stabiel getransformeerde lelie planten zijn verkregen na genoverdracht via *Agrobacterium* bij zowel Longiflorums als bij Orientals.**
- Bij Longiflorums gaat genoverdracht veel efficiënter dan bij Orientals.
- **Het bewijs dat recombinatie mogelijk is in lelie en daarmee de productie van merker-vrije GM-planten is verkregen.**
- **De voor lelie geschikte vector voor de productie van merker-vrij transgeen materiaal is klaar.**
- De doelstellingen van dit project zijn behaald.

