

Project GM1/2

Genetische modificatie tomaat en chrysant

Organisatie: *Plant Research International*
Uitvoerder: **Prof. Dr. Gerco Angenent**

Inleiding

De gecombineerde onderzoeksprojecten 'genetische modificatie tomaat en chrysant' (projecten GM1/2, GM1, GM2) hebben als doel om het energieverbruik bij de teelt van tuinbouwgewassen te verminderen middels genetische modificatie. Als modelgewassen is gekozen voor tomaat en chrysant. Getracht is om modificaties aan te brengen in de eigenschappen contactstress, bloei en plantarchitectuur.

De resultaten van de transformatie van de verschillende genconstructen naar tomaat en chrysant en de analyse van de verkregen transformanten staan hieronder vermeld.

1. Tomaat

1.1. Construct 1 - RBC::ERT1-1

Er zijn drie transformaties ingezet met het RBC::ert1.1 construct. In het totaal zijn er 47 planten verkregen uit de transformaties met dit construct. Van alle planten is het ploidy niveau bepaald. Vier van deze planten (8.5%) bleken polyploid te zijn en van deze planten is geen zaad geoogst, de andere 43 waren diploid. Plant TO 01-015 is een erg iele dwergachtige plant die wel langzaam doorgroeit. Mogelijk komt dit afwijkende fenotype door somaclonale variatie. Bij vier planten (TO 01-001, TO 01-004, TO 01-028 en T01-047) is een fenotype gevonden die te wijten kan zijn aan het transgen. Deze planten vertonen namelijk vruchten die niet goed afrijpen (geel blijven) en versnelde afsterving van blad waarschijnlijk door overgevoeligheid van ziektes.

A



B

Figuur 1. Fenotype van sommige RBC::etr1.1 planten. A niet rijpende vruchten van T01-004. B versnelde verwelking van T01-001

Dit afwijkende fenotype komt overeen met de literatuur waarbij deze afrijping en verhoogde vatbaarheid voor pathogenen ook beschreven wordt.

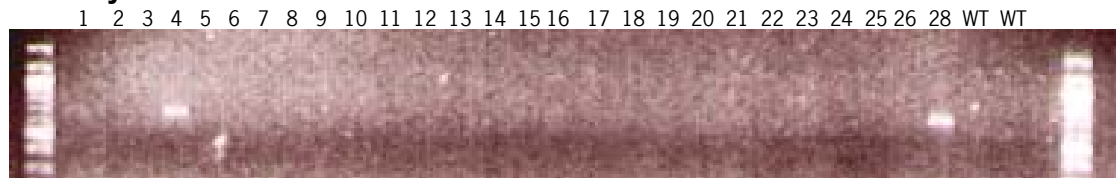
De zaadzetting van deze drie planten was heel slecht, echter van elke plant met dit afwijkende fenotype zijn 50 tot 150 zaden (uit selfings) geoogst. Het stekken van deze planten om tot meer zaad te komen of om er kruisingen mee uit te voeren lukte niet in verband met de slechte beworteling en snelle aantasting van deze planten. Alle planten zijn met behulp van PCR bekeken op de aanwezigheid van het Kanamycine gedeelte van het transgen. De vier planten met het fenotypen waren alle positief in de PCR (voor T01-001,

T01-004 en T01-028 zie figuur 2, voor T01-047 zie figuur 3.). Daarnaast gaven ook plant T01-041, T01-042, T01-044 en T01-045 een positief signaal in de PCR (Figuur 3). Mogelijk dat deze laatste genoemde planten zonder een afwijkend fenotype een lage expressie van het transgen vertonen en dus mogelijk zeer waardevol zijn bij het testen van deze transgene planten in volgende proeven. Plant T02-31 is bij deze PCR meegenomen (zie Figuur 3) omdat deze plant ongeveer hetzelfde fenotype geeft als de andere afwijkende transgene planten uit deze serie terwijl dat niet te wijten kan zijn aan het construct 35S::fbp2. Mogelijk dat dit een verdwaalde transformant is uit de T01 serie. Verdere moleculaire analyses moeten dit uitwijzen. Het WT DNA dat in deze laatste PCR is meegenomen (zie Figuur 3) is niet gelijktijdig geïsoleerd en kan verontreinigd zijn geweest waardoor deze ook een positief signaal geeft. Dat niet alle planten van T01-029 tot en met T01-047 positief zijn betekent dat de PCR op dit DNA niet verontreinigd is en dus betrouwbaarder. Het blijft wel nodig om een volgende generatie nogmaals te toetsen op de aanwezigheid van het transgen. Van alle T01 planten zijn zaden (verkregen uit selfings) geoogst en totale fenotypen van de planten beschreven.

Chromosomaal DNA

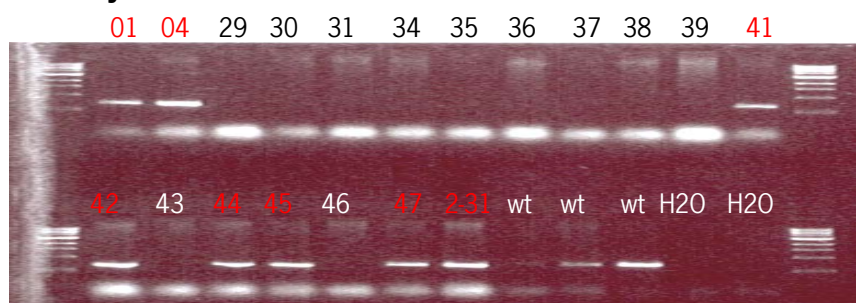


Kanamycin PCR



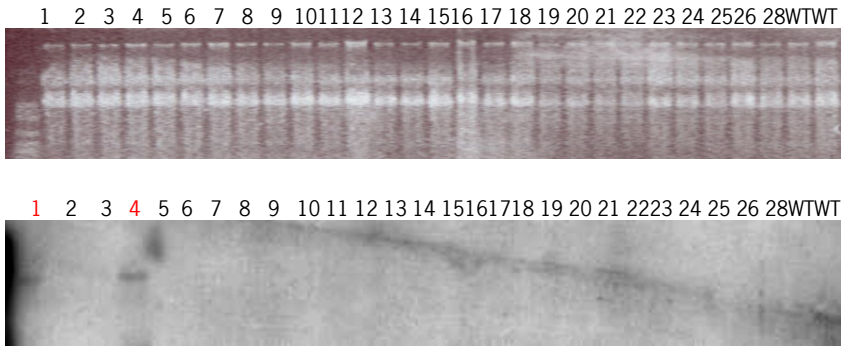
Figuur 2. Kanamycine PCR op DNA van planten T01-001 tot T01-0028.

Kanamycin PCR



Figuur 3. Kanamycine PCR op DNA van T01-29 tot T01-047 en enkele controles.

De eerst gevonden transgene planten (T01-001, T01-004 en T01-028) zijn met behulp van Northern blot hybridisatie bekeken op expressie van het transgen. Alle drie de planten vertoonden (lage) expressie terwijl controle (niet-transgene) planten en de potentiële transgene planten die negatief waren in de kanamycine PCR geen hybridisatie vertoonden (figuur 4). De andere kanamycine positieve planten zijn niet getest met behulp van Northernblots.



Figuur 4. Northern blot analyse van T01-001 tot T01-028 met de RNA controle.

Om te zien of een volgende generatie van deze transgene planten nog planten geeft die ook het transgen bevatten zijn 12 zaden van T01-001 en T01-004 uitgezaaid in potgrond. Hiervan kiemde er respectievelijk 9 en 6. Op deze planten is vervolgens een kanamycine PCR uitgevoerd om te testen voor de aanwezigheid van het transgen. Van de 9 T01-001 planten waren er 2 positief wat betekend dat het gen doorgegeven wordt en dat het mogelijk zal zijn om homozygote transgene lijnen te selecteren. De twee positieve planten van T01-001 worden in de kas opgekweekt om later terug te kruisen met een niet-transgene om te zien of dat de zaadzetting verbeterd.

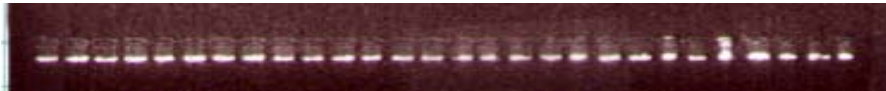
1.2. Construct 2 - 35S::FBP2

Het construct 35S::FBP2 is gebruikt in vier transformaties waarin een totaal van ongeveer 1000 explantaten zijn gebruikt. Dit heeft geresulteerd in 77 planten die naar de kas zijn gebracht. Van alle planten is het ploidy nivo bepaald. Zes planten (7.8%) werden als tetraploid beoordeeld en zijn verwijderd. In de eerste serie van planten (T02-001 tot T02-027) die naar de kas werden gebracht waren twee planten met een afwijkend fenotype (T02-014 en T02-015). Deze planten gaven lange trossen, grote groene bloemen en maar weinig vruchten (figuur 5). De vruchten waren klein en bleven in veel gevallen groen.



Figuur 5. Enkele van de 35S::FBP2 planten gaven grote groene bloemen

DNA



PCR



Figuur 6. Kanamycine PCR op DNA van T02-001 tot T02-027.

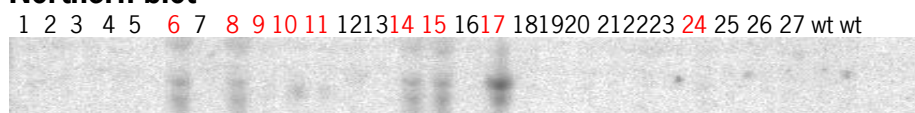
Dit fenotype zou mogelijk een silencing effect zijn van de tomaathomoloog van FBP2. Deze eerste serie planten is zowel bekeken op de aanwezigheid van het transgen met behulp van PCR als bekeken op expressie met Northern blot hybridisatie. Van de 22 diploïde planten gaven 15 planten (68%) een positief signaal in de kanamycine PCR (Figuur 6). Deze PCR, uitgevoerd op schoon DNA, werd meerdere keren op hetzelfde materiaal uitgevoerd.

De twee planten met fenotype (T02-014 en T02-015) geven zoals verwacht in de PCR een positief signaal. Northern blot analyses van de planten uit de eerste reeks (T02-001 tot en met T02-027) toont aan dat de expressie laag is en moeilijk aantoonbaar. Van de 15 diploïde transgene (kanamycine positieve) planten kon van 3 planten duidelijke expressie worden aangetoond (T02-006, T02-014 en T02-015) en bij drie andere (T02-010, T02-011 en T02-024) werd een zeer vaag signaal gevonden. (Figuur 7). Deze expressie kon op de originelen blots onderscheiden worden, bij de hier getoonde Northern blots is dit signaal niet meer zichtbaar. Dat de planten T02-014 en T02-015 een signaal geven op Northern blots terwijl het fenotype een silencing effect zou

RNA lading



Northern blot



Figuur 7. Northern blot analyse van planten T02-001 tot en met T02-027 en de bijbehorende RNA ladingscontrole.

kunnen zijn, zou betekenen dat het hier om post-transcriptional silencing gaat. Verder (moleculaire) analyse zal dit moeten uitwijzen.

Voor moleculaire analyse is het wenselijk dat met planten gewerkt wordt met een enkele insertie van het transgen. Daartoe zijn een aantal lijnen uitgezaaid op medium met kanamycine waardoor een onderscheid gemaakt kan worden tussen planten met en zonder het transgen.

Tabel 1. Kanamycine resistentie in selfings van een aantal lijnen met eerder genoemde resultaten uit PCR en Northern analyse.

Plantlijn	PCR	Northern	Aantal opgekomen	Kan vatbaar	Kan resistent	% Kan resistent	Opmerk.
T02-003	+	-	48	48		0	
T02-004	+	-	44	44		0	
T02-005	+	-	45	45		0	
T02-006	+	+	43	3	40	93	Enkele afwijkende zaailingen
T02-007	+/-	-	47	47		0	
T02-010	+	+/-	50	15	35	70	
T02-011	+	+/-	49	49		0	
T02-012	+	-	50	50		0	
T02-013	+/-	-	43	43		0	
T02-019	+	-	45	13	32	71	
T02-020	+	-	51	51		0	
T02-022	+	-	49	49		0	
T02-024	+	+/-	48	2	46	96	Zwak kana resistent
T02-025	+	-	39	13	26	67	
T02-027	+	-	39	34	5	13	

Drie van de hier geteste lijnen (T02-10, T02-019 en T02-025) lijken een enkele insertie van het transgen te hebben (Tabel 1).

Omdat vele van de andere potentieel interessante transgene (silencing) planten slecht zaad zetten zijn deze planten gebruikt in terugkruisingen met het niet transgene wildtype waarbij de transgene als moederplant zijn gebruikt. Op deze manier zijn van plant T02-014 twee vruchten verkregen. De overige planten (T02-028 tot en met T02-077) zijn niet moleculair geanalyseerd maar worden wel net als de eerste serie in de kas opgekweekt voor fenotypische selectie en zaad opbrengst (uit selfings). In deze serie zijn nog 4 planten gevonden met een afwijkend fenotype. De planten T02-043 en T02-056 geven net als T02-014 en 015 grote groene bloemen en slechte vruchtzetting. T02-036 en T02-042 geven ook groene bloemen hoewel deze niet zo groot worden als de eerder genoemde plantlijnen. Ook deze geven echter weinig vruchten. Voor alle planten met een afwijkend fenotype die een slechte vruchtzetting hebben gegeven, zijn terugkruisingen gemaakt en stekken.

1.3 Construct 6 – 35S::phyA

Zaad van de in Japan gemaakte planten met het 35S::phyA construct zijn binnen Plant Research International geanalyseerd. Van deze plantenlijnen zijn ongeveer 50 zaden (behalve wanneer er weinig zaad aanwezig was) uitgezaaid op kanamycine medium *in vitro* om een idee van het aantal geïnserteerde kopieën te krijgen. Van de resistente planten is vervolgens een Northern analyse gedaan om het expressie niveau te bepalen. Elf van de 16 geteste lijnen (69%) bevatten het kanamycine gen. Van deze 11 lijnen geven 7 lijnen een uitsplitsing van kanamycine resistentie die niet afwijkt van een verhouding die verwacht wordt voor een enkele kopie insertie (3:1). Bij deze 7 lijnen zitten veel lijnen die een kleiner zijn dan normaal, maar ook die extra lang lijken te zijn. Dit zijn waarschijnlijk fenotypen die veroorzaakt worden door het transgen zoals al eerder in de literatuur vermeldt is.

Bladeren van een aantal transgene planten per potentiële interessante lijn (met single integratie) werden gebruikt voor RNA isolatie voor expressie analyse van het transgen.

Tabel 3 geeft de resultaten van deze analyse. De meeste van de potentieel interessante lijnen gaven dus expressie, er was weinig verschil in expressie niveau. De lijnen 996122, 996124, 996126 en 996128 zijn de beste lijnen om verder te analyseren aangezien zij een enkele kopie van het transgen bevatten en zeker is dat deze ook tot expressie komen.

Tabel 2. Kanamycine resistentie en fenotypen van de 35S::phyA lijnen. De planten met * worden beschouwd als plantlijnen met enkele integratie van het transgen.

Plantlijn	Opgekomen zaden	Kan vatbaar	Kan resistent	% Kan resistent	Opmerkingen
996028	35	11	24	69*	tetraploid
996029	4 (4 gezaaid)	4	0	0	Nog 5 zaden over
996030	42	23	19	45	Klein en gestrest
996031	42	14	28	67*	
996122	45	13	32	71*	
996123	33	18	15		lele plant, slechte kieming
996124	30	10	20	67*	Grote planten, grote cotylen
996125	35	35	0	0	
996126	49	16	33	67*	4 planten met lange internoden
996127	43	43	0	0	
996128	47	13	34	72*	Kleine planten, licht blad
996129	8 (8 gezaaid)	3	5	63*	Nog 9 zaden over Grote planten, tetra?
996130	46	0	46	100	Klein, licht blad
996131	46	46	0	0	
996132	40	16	24	60*	
996133	49	24	25	51	Groot 1ste blad

Tabel 3. Northern blot analyse van de 35S::phyA lijnen met mogelijk enkele insertie.

Plantlijn	Expressie	Opmerking
996030	+	
996031	-	
996122	+	
996123	?	Weinig RNA
996124	+	
996126	+	
996128	+	
996130	+	
996132	?	Weinig RNA
996133	+	

1.4 Construct 7 – 35S::phyB1

Net als voor de andere phytochrom constructen geldt ook voor dit 35S::phyB1 construct dat de planten gemaakt zijn in Japan. Zaden van 11 potentiële transgene lijnen zijn ontvangen en vervolgens uitgezaaid op medium met kanamycine (300mg/l). Net als in de serie van de 35S::phyA planten lijken er ook nu weer veel lijnen met afwijkende fenotypen die te wijten kunnen zijn aan het transgen. Van de 11 geteste lijnen waren er 5 (45%) niet transgeen en vertonen slechts 3 van de andere een uitsplitsing op kanamycine die overeenkomt met een mogelijke enkele kopie insertie. Naast deze planten zijn ook de drie andere lijnen (996138, 996139 en 996142) geanalyseerd op expressie met behulp van Northern blot analyse (Tabel 5). Twee van de lijnen met enkele integratie (996136 en 996140) gaven een hoge expressie terwijl plantlijn

996135 lage expressie gaf. Deze drie plantlijnen komen dus als eerste in aanmerking voor gedetailleerde analyse.

*Tabel 4. Kanamycine resistentie en fenotypen van de 35S::phyB1 lijnen. De planten met * worden beschouwd als plantlijnen met enkele integratie van het transgen.*

Plantlijn	Opgekomen zaden	Kan vatbaar	Kan resistent	% Kan resistent	Opmerkingen
996032	5 (5 gezaaid)	5	0	0	Nog 5 zaden over
996033	40	40	0	0	
996134	50	50	0	0	
996135	49	11	38	78*	
996136	50	16	34	68*	7 planten met rode opstaande cotyle en eerste blad
996137	40	40	0	0	
996138	24	2	12	86	Slechte kieming, 2 grote planten
996139	44	7	37	84	
996140	45	18	27	60*	Grote groene planten
996141	37	37	0	0	
996142	35	22	13	37	Nog 5 zaden over, Kleine planten, trage groei

Tabel 5. Northern blot analyse van de 35S::phyB1 lijnen met mogelijk enkele insertie.

Plantlijn	Expressie	Opmerking
996135	+/-	enkele kopie
996136	+	enkele kopie
996138	+/-	
996139	+	
996140	+	enkele kopie
996142	?	weinig RNA

1.5 Construct 8 – 35S::phyB2

Planten met het phytochrom construct 35S::PhyB2 zijn op dezelfde manier geanalyseerd als hierboven beschreven. Ongeveer 50 zaden zijn uitgezaaid op kanamycine medium om de kanamycine uitsplitsing te bestuderen, resistente planten te selecteren, fenotypen te bekijken en de resistente planten te gebruiken voor expressie analyse. Vijf van de 20 geteste lijnen (25%) waren niet transgeen. Bij de overgebleven 15 lijnen lijkt de uitsplitsing voor kanamycine overeen te komen met een enkele insertie. Veel planten uit deze serie vertonen een chlorotisch fenotype. De resistente planten zijn gebruikt voor RNA isolatie en Northern blot analyse. De resultaten van de Northern staan in tabel 7. De plantlijnen 996081, -84, -85, -92 en -93 zijn dus de lijnen met waarschijnlijk één kopie van het transgen en waarbij het phyB2 gen ook tot expressie komt.

Tabel 6. Kanamycine resistentie en fenotypen van de 35S::phyB2 lijnen. De planten met * worden beschouwd als plantlijnen met enkele integratie van het transgen.

Plantlijn	Opgekomen zaden	Kan vatbaar	Kan resistent	% Kan resistent	Opmerkingen
996018	44	2	42	95	Lange internoden, 3 albino planten
996019	44	14	30	68*	Klein, trage groei
996020	45	45	0	0	
996077	19	12	7	37	Slechte kieming, klein, trage groei
996078	47	14	33	70*	Groot, iets chlorotisch
996079	46	46	0	0	
996080	46	46	0	0	
996081	49	14	35	71*	Lange groene planten
996082	46	22	24	52	chlorotisch
996083	33	17	26	60*	chlorotisch
996084	41	18	23	56*	
996085	47	11	36	77*	Grote planten
996086	49	11	38	78*	3 albino planten
996087	50	8	42	84	Klein beetje chlorotisch
996088	46	7	39	85	Groen/geel chlorotisch
996089	44	44	0	0	
996090	12	1	11	92	Chlorotisch, trage groei
996091	14	14	0	0	
996092	50	16	34	68*	Enkele grote, meeste klein
996093	41	11	30	73*	7x misvormt, andere met chlorotisch mozaiek

Tabel 7. Northern blot analyse van de 35S::phyB1 lijnen met mogelijk enkele insertie.

Plantlijn	Expressie	Opmerking
996018	+	
996019	-	enkele kopie
996078	-	enkele kopie
996081	+	enkele kopie
996082	-	
996083	-	enkele kopie
996084	+	enkele kopie
996085	+	enkele kopie
996086	-	enkele kopie
996087	-	
996088	+	
996092	+	enkele kopie
996093	+	enkele kopie

1.6 Construct 11 - B2::RoIC

Vier transformaties zijn uitgevoerd met construct B2::RoIC (pVIP65). Al vanaf het begin bleek dit construct de minste planten op te gaan leveren. Daarom zijn er in totaal niet minder dan 1500 explantaten gebruikt. Ondanks het grote aantal explantaten zijn er slechts 12 planten uit de transformatie gekomen. Van deze 12 waren er 4 tetraploid (33%). Alle planten werden getest met behulp van een kanamycine PCR. Slechts 1 plant bleek een positief signaal te geven, deze bleek echter ook tetraploid die liever niet gebruikt worden voor transgene analyses door het complex uitsplitsen van het transgen. In overleg met de andere partner bij de WU (Sander van der Krol en Dick Kendrick) werd besloten niet meer met dit construct verder te gaan. Deze planten zijn niet verder geanalyseerd.

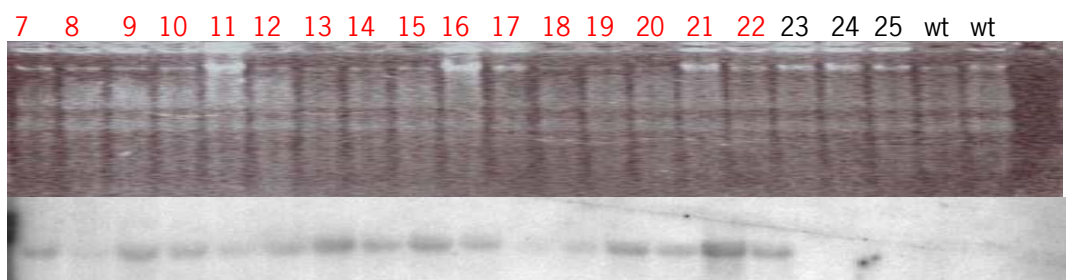
2. Chry sant

2.1 Construct 1 - RBC::ETR1-1

Er zijn voor transformatie met dit construct 300 explantaten gebruikt. Deze hebben na selectie geleid tot 32 scheuten (TE01-1t/m32) die vervolgens naar de kas zijn gebracht. Deze planten zijn na verwijderen van de top tot moederplanten gemaakt (uitgangsplanten om van te stekken). De moederplanten gaven geen duidelijk afwijkend fenotype. Alle planten zagen er aanvankelijk iets minder mooi uit en groeiden iets minder dan normaal, maar dit lijkt een seizoensinvloed te zijn.

Er is besloten om van een aantal onafhankelijke lijnen 4 klonen te maken (plantnummers TE 23 t/m 32). Deze planten zijn zeer dicht op elkaar geplaatst om de plantnummers, die weinig contactstress hebben, te kunnen selecteren. Na 3 maanden groei waren geen uitschieters te herkennen. De algemene indruk was dat de planten wat lager bleven dan de controle, maar dit is juist het tegenovergestelde van wat te verwachten was.

Relatieve expressie-niveaus zijn bepaald van de plantnummers 7 t/m 25. Matige tot hoge expressie werd gemeten bij nummers 7 t/m 22 (rood) en geen expressie bij de nummers 23 t/m 25 (zwart). De plantnummers 23 t/m 25, die ook meegenomen zijn in het pilotexperiment naar contactstress gaven geen expressie van het transgen te zien.



Figuur 8. Northern blot analyse van planten TE01-7 tot en met TE01-25, de wild-type controles (wt) en de bijbehorende RNA ladingscontrole.

2.2 Construct 2 – 35S::FBP2

Voor dit construct zijn 500 explantaten gebruikt. Dit heeft geresulteerd in 50 planten die op dit moment in de kas staan, en waarvan moederplanten gemaakt zijn. Primaire moleculaire analyses hebben aangetoond dat in een aantal planten fbp2 tot expressie komt (zie figuur 13).

Van de transformanten TE02-13 t/m 30 zijn weer 4 klonen gemaakt en in bloei getrokken. In deze set van planten waren duidelijk een aantal interessante lijnen te onderscheiden. Er is gekeken naar bloei, stevigheid, vertakking van de stengel na knopinductie en tijdstip van bloei.

Bloei:

Bij lijn 23 is veel variatie in bloemvorm aanwezig tussen de vier klonen. Ook is er vaak een onregelmatige verdeling te zien tussen de hoeveelheid buis- en lintbloemen (zie figuur 10). Lijn 25 geeft de kleinste en lichtste planten, maar laat tevens een afwijkende bloei zien. Zij vormt alleen eindstandige kleine bloemen.



Fig 9. *Verschillende bloemkleuren in set van transgenen met het fbp2 gen. V.l.nr. Cv. 1581(niet-transgene controle), TE02-14 en TE02-28 (A). Bloem van plantlijn TE02-28 (B).*



Fig. 10. *Verstoorde verdeling van de lint- en buis bloemen in plantlijn TE02-23.*



Fig 12a. *Bloeiwijze van cv. 1581 (niet-transgene controle).*



Fig 12b. *Bloeiwijze van plantlijn TE02-30.*

Vertakking en hoogte

Lijnen 17, 18, 22, 25 en 26 geven een sterke, vroege vertakking al in de lange dag op het moment dat de eindstandige bloem wordt gevormd (Figuur 11). De niet-transgene controle planten worden ongeveer 70 cm hoog. De meeste transgene Fbp2-planten zijn beduidend lager, met name nummers 13, 15, 18, 19, 23, 25, 28 en 29. Het verschil is zo'n 10-20 cm. Een uitzondering is TE02-30, klonen van deze transformant zijn juist zo'n 5 cm langer dan de controle. Opvallend aan deze transformant zijn ook zijn grote, lichte en zeer gevulde bloemen (Figuur 12).

Van de overige getransformeerde Fbp2-planten (TE02-31 t/m TE02-50) kon slechts één stek genomen worden (van de topscheut). De planten bloeien nog niet, maar er is al wel een duidelijk lengteverschil tussen de planten waarneembaar. Opvallende nummers zijn: TE02-37 en 42 (70 cm), de rest is ongeveer 20 cm lager.



Fig 12a Vertakking van cv. 1581 (niet-transgene controle, TE02-25, TE02-18 en TE02-22 tijdens de vegetatieve fase.

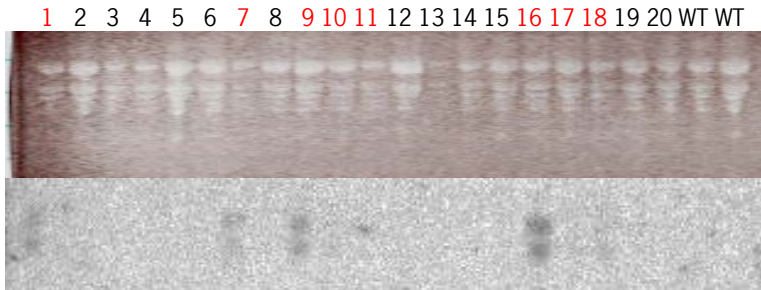


Fig 12b Vertakking van cv. 1581 (niet-transgene controle, TE02-25, TE02-18 en TE02-22 tijdens de generatieve fase.

Moleculaire analyse

Relatieve expressieniveaus zijn bepaald van TE02-1 t/m 20. Hoge expressors waren de nummers 7, 9 en 16. Nummers 1, 10, 11, 17 en 18 gaven matige expressie. Van de plantnummers 21 t/m 50 is (nog) geen expressie bepaald.

Het veranderde fenotype van plantnummers 17 en 18 correspondeert met expressie van het Fbp2 gen. Het is echter erg voorbarig te stellen dat alle veranderingen van het fenotype, zoals hierboven beschreven, veroorzaakt is door expressie van het fbp2 gen.



Figuur 13. Northern blot analyse van planten TE02-1 tot en met TE02-20, de wild-type controles (wt) en de bijbehorende RNA ladingscontrole.

2.3. EPF2-5::IPT

De 400 gebruikte explantaten hebben geleid tot 43 planten in de kas. Van 31 planten zijn 4 klonen opgezet en dicht op elkaar geplaatst om contactstress te simuleren en om sneller bladveroudering (op de onderste bladeren) te bewerkstelligen. De planten zijn gevolgd tot en met de bloei. Er werd echter tot dit tijdstip geen bladveroudering waargenomen.

Opvallende fenotypen waren plantnummer 24 (paarse bloem), 27 (gele bloem), nummers 35 en 40 (een bovengemiddelde hoeveelheid bloemknoppen over de bovenste 7 bladparen) en nummers 13 en 17 (juist weinig bloemknoppen). Bovendien is plantnummer 17 erg klein.

Ook hier kunnen we zonder moleculaire analyse van de planten geen uitsluitsel geven of de genoteerde fenotypen gecorreleerd zijn aan genexpressie van EPF2-5::IPT.

2.4. 35S::PHYA, 35S::PHYB1, 35S::PHYB2

Deze constructen zijn pas laat beschikbaar gekomen voor transformatie naar chrysant.

Uiteindelijk (eind december 2000) zijn de volgende aantallen transgenen naar de kas gebracht; 55 van PHYA, 62 van PHY B1 , en 13 van PHYB2. Naar verwachting zullen de planten in april 2001 bloeien en kunnen ze verder geanalyseerd worden.

2.5. SAG12::IPT en SAG13::IPT

Voor dit experiment zijn voor beide constructen 300 explantaten gebruikt die al snel mooie scheuten opleverden. Er zijn 51 SAG12::IPT (= T039 serie) en 43 SAG13::IPT(= T040 serie) planten naar de kas gebracht. Van 25 plantnummers per construct zijn 4 klonen opgezet en dicht op elkaar geplaatst om weer contactstress te simuleren en om sneller bladveroudering (op de onderste bladeren) te bewerkstelligen. De planten zijn gevolgd tot en met de bloei (3 maanden). Er werd echter tot dit tijdstip geen bladveroudering waargenomen.

De algemene indruk van deze sets van planten was dat ze wat lager bleven dan de controle. Dit kan echter ook te maken hebben met de ouderdom van de moederplanten. Enkele opvallende fenotypen werden waargenomen: plantnummer T039-32 en T040-39 gaven duidelijk meer vertakking onder aan de stengel dan de wild-types. Alle klonen van T039-30 hebben lichtgroen blad en blijven opvallend klein. Eveneens blijven alle 4 planten van T040-3 opvallend klein.

Eindverslag project GM1/2 (vervolg Chrysant)

Peter Visser¹⁾, Sander van der Krol²⁾

¹⁾ *Plant Research International*, ²⁾ *Plantenfysiologie-WU*

Inleiding

De gecombineerde onderzoeksprojecten "Genetische modificatie tomaat en chrysant" (Projecten GM1 en GM2) hebben als doel om het energieverbruik bij de teelt van tuinbouwgewassen te verminderen middels genetische modificatie. Tomaat en chrysant zijn hiervoor gekozen als modelgewassen. Modificaties zullen worden aangebracht in de eigenschappen contactstress, bloei en plantarchitectuur, bladveroudering en source-sink verhouding en het effect hiervan op het energieverbruik zal worden bestudeerd. Voor beide projecten, GM 1 (tomaat) en project GM 2, (chrysant) zijn verschillende genconstructen gemaakt. De resultaten van de transformatie van de verschillende genconstructen naar chrysant en de analyse van de verkregen transformanten staan hieronder vermeld.

Werkwijze

In de eerste fase van het onderzoek 1999-2001, Plant Research International (P.R.I.):

- Maken van genconstructen bevattende genen die een positief effect kunnen hebben op de energie-benutting van de plant (tabel 1).
- Transformatie van het siergewas chrysant
- Moleculaire analyse van de getransformeerde planten en beperkte fenotypische evaluatie, om een juiste selectie van planten mogelijk te maken voor onderzoek in fase twee

In een tweede fase van het onderzoek (2001-2003) Leerstoelgroep Plantenfysiologie (PF):

- Bestuderen van de fysiologische effecten van deze geïntroduceerde genen, zoals veranderde plantarchitectuur (vermindering contactstress en modificatie bloei), voorkoming van bladveroudering, en verbetering van de lichtabsorptie.

Tabel 1 Genen voor transformatie naar chrysant

Construct in werkplan	Toepassing/verwacht effect	Construct ingebouwd
Rbc-ETR1-1	Verminderen contact stress	Rbc-ETR1-1
sag12-IPT	Voorkomen veroudering	sag12-IPT + sag13-IPT
EPF2-5-IPT	Voorkomen veroudering	EPF2-5-IPT
B2-rolC	Voorkomen veroudering	Niet uitgevoerd
rbc-FBP2	Versnelling bloeiinductie, terminale bloeiwijze	35S-FBP2
rbc-phyA	Verandering plantvorm, voorkomen contactstress	35S-phyA
rbc-phyB1	Verandering bloei	35S-phyB1
rbc-phyB2	Verandering bloei	35S-phyB2

Resultaten

Genconstructen

Vectoren met alle genen op 1 na (B2-rolC) zijn gemaakt of ter beschikking gesteld volgens planning. In afwijking van de planning is het in een aantal gevallen (FBP2, phyA, phyB1 en PhyB2) de 35S promoter niet vervangen door de rbc-promoter. De 35S constructen zijn gemaakt en gebruikt voor de transformatie naar tomaat. In tegenstelling tot het werkplan zijn twee constructen met verschillende sag-promoters gebruikt, sag12 en sag13. Beide promoters zouden een verschil in de mate van genexpressie kunnen opleveren. Het B2-rolC construct is niet gebruikt voor transformatie naar chrysanthe omdat tijdens de transformatie naar tomaat bleek dat het construct problemen opleverde voor de een normale groei van de transgene planten.

De binaire vectors waarin de constructen gekloneerd zijn, hebben een verschillende herkomst. Omdat dit verantwoordelijk kan zijn voor een deel van de uiteindelijke resultaten, staan deze vermeld in Tab 2.

Transformaties

Er is een standaard protocol gebruikt voor transformatie van de constructen naar chrysanthe (De Jong et al., 1995). Als explantaatype zijn bloemstengeltjes gebruikt (300-500 per construct). Voor transformatie van constructen 35S-phyA, 35S-phyB1 en 35S-phyB2 is *A. tumefaciens* stam C58 gebruikt, voor alle andere constructen Agl0 (Tabel 2). De transgene scheuten zijn geselecteerd op het antibioticum kanamycine. Onderstaand schema geeft de benodigde tijd weer van transformatie naar volwassen plant.

Dag

- 0 *Infectie explantaten met Agrobacterium*
- 2 *Overzetten naar selectiemedium*
- 21 *Overzetten naar vers medium*
- 41 *Oogsten scheuten en bewortelen*
- 74 *Afharderen in kas*
- 100 *Vermeerdering d.m.v. stekken*

De transformatieprocedure en de selectie op kanamycine verliepen volgens verwachting. Van alle constructen, behalve van 35S-PHYB2 konden minimaal 32 planten naar de kas gebracht worden. 35S-PHYB2 leverde slechts 13 kanamycine-resistente planten. Alle planten zijn tot bloei gebracht om een fenotypische analyse mogelijk te maken.

Moleculaire analyse

Voor een moleculaire analyse van de planten zijn twee technieken gebruikt; PCR en Northern blot analyse.

De PCR methode is in eerste instantie gebruikt om aan te tonen dat de planten, die de kanamycine selectie overleefd hadden, werkelijk getransformeerd waren, ofwel dat het kanamycine-resistentiegen en het doelgen aanwezig waren. De Northern blot analyse is erop gericht om na te gaan of het ingebrachte gen ook werkelijk tot expressie komt, ofwel dat er mRNA van het gen aangemaakt wordt.

Het bleek dat in chrysanthe de PCR methode niet zo eenvoudig was als gedacht. Er is erg veel energie gestoken in het optimaliseren van de methode. Gedurende de officiële looptijd van het project zijn we hier niet in geslaagd. Pas eind 2001 waren we in staat een betrouwbare en reproduceerbare procedure te leveren. Het is gebleken dat vooral de kwaliteit van het in de

PCR procedure aangeboden DNA cruciaal is. Daarnaast is een extra stap in de PCR procedure zelf noodzakelijk, met gebruikmaking van een tweede set "nested" primers. Uiteindelijk zijn er, vanwege tijdgebrek, alleen een geselecteerd aantal planten uit de 35S-phyA, 35S-phyB1 en 35S-phyB2 sets met PCR gecheckt.

Vanwege de problemen met de PCR methode is overgestapt op het maken van Northern blots. Met deze methode kunnen gelijk de transgene planten met de hoogste expressie van het doelgen herkend worden. Een aantal sets planten is geanalyseerd (rbc-ETR1-1, 35S-FBP2, 35S-phyA, 35S-phyB1 en 35S-phyB2). De sets rbc-ETR1-1 en 35S-FBP2 gaven in 85% resp. 45% van de planten een verhoogde expressie. Dit geeft dus aan dat minimaal deze percentages van de bemonsterde planten transgeen zijn. Uit de literatuur is echter bekend dat dit lage of geen expressie in transgene planten relatief vaak (soms tot 50% van alle planten) voorkomt, door "co-suppressie" of inbouw in een "ongunstig, inactief" gebied van het plantengenoom. Het werkelijk aantal transgene planten van de sets rbc-ETR1-1 en 35S-FBP2 zal dus naar verwachting hoger zijn. Van alle planten bemonsterde planten van de sets 35S-phyA (20x), 35S-phyB1 (20x) en 35S-phyB2 (9x) waren er echter maar 4 planten met een positief signaal voor het NPTII (kanamycine resistentie gen). Expressie van de respectievelijke phy-genen kon niet worden aangetoond. Een PCR in het najaar van 2001 gaf inderdaad aan dat deze planten getransformeerd waren, terwijl een steekproef van andere planten uit de sets 35S-phyA, 35S-phyB1 en 35S-phyB2 negatief in dezelfde PCR waren. Dit zijn dus sterke aanwijzingen dat de transformaties met de constructen 35S-phyA, 35S-phyB1 en 35S-phyB2 grotendeels mislukt zijn. Een sluitende verklaring hiervoor is niet te geven, maar het vermoeden bestaat dat de slechte transformatie-efficiëntie te maken heeft met een verschil in gebruikte binaire vector en bacteriestam t.o.v. de andere transformaties. In eerdere series is vastgesteld dat normale transformatie-efficiëntie bij een gelijke kanamycine selectiedruk als gebruikt bij deze experimenten voor chrysanthe > 90% is. In deze gevallen kon het wel of niet transgeen zijn van de planten bepaald worden met een simpele GUS-kleuring.

Fenotypische analyse

Mede doordat de moleculaire analyse zeer moeizaam verliep, is er voor gekozen om een eerste selectie van planten te doen op uiterlijke kenmerken. Deze analyse staat dus los van de gedetailleerde fenotypische analyse die, volgens het werkplan, in de tweede fase pas zou worden uitgevoerd door PF.

Bij de selectie is rekening gehouden met de uiterlijke afwijkingen die op basis van de genfunctie verwacht worden. Dit is belangrijk, omdat het van chrysanthe bekend is dat er na een weefselkweekfase gemakkelijk afwijkende fenotypen ontstaan door somaklonale variatie. Dit fenomeen bemoeilijkt dus de selectie. Een uitgebreid verslag van de fenotypische analyse is te vinden in het jaarverslag 2000. De analyse is gedaan aan 4 stekken per individuele "transgene" moerplant. De rbc-ETR1-1, sag12-IPT, sag13 -IPT en EPF2-5-IPT stekken zijn dicht op elkaar geplaatst (10 cm potjes, tegen elkaar aan) om de gevoeligheid voor contactstress te beoordelen. De 35S-FBP2 stekken zijn verder uit elkaar gezet, waarbij is gekeken naar bloei, stevigheid, vertakking van de stengel na knopinductie en tijdstip van bloei.

Hier in het kort waarnemingen per construct:

Rbc-ETR1-1: geen verschillen in bladveroudering of andere bijzondere fenotypen.

Sag12-IPT en Sag 13-IPT: geen verschillen in bladveroudering, twee nummers gaven meer vertakking aan de onderkant van de stengel.

EPF2-5-IPT: geen verschillen in bladveroudering, in deze set zaten twee kleurmutanten, twee nummers met een bovengemiddelde hoeveelheid bloemknoppen over de bovenste 7 bladparen en nummers met opvallend weinig bloemknoppen.

35S-FBP2: bevatte een aantal aan het doelgen te relateren fenotypes: 1 lijn met kleine en lichte planten, met alleen eindstandige kleine bloemen. Vijf lijnen met een vroege vertakking, reeds in de lange dag periode. Acht lijnen met een korter planttype. Ongerelateerde fenotypen; 1 kleurmutant, verschil in gevuldheid van de bloemen, een hoger planttype met zware bloemen.

Voor de verschillende ETR1 en IPT-getransformeerde planten zijn er dus geen fenotypen waargenomen die direct gerelateerd kunnen worden aan de functie van het ingebrachte gen. Dit in tegenstelling tot het de FBP2-planten. Hier zijn plantlijnen met een veranderde bloeiinductie en plantarchitectuur gevonden. Het veranderde fenotype van tenminste 2 van deze planten lijkt te corresponderen met expressie van het FBP2 gen.

Tabel 2. Samenvatting van gebruikt materiaal voor transformatie naar chrysanthe en analyses

Construct ingebouwd	Naam plasmide	Binair plasmide	A. <i>tumefaciens</i> stam	# planten naar kas na kanamycine selectie	Fenotypische analyse	Moleculaire analyse
Rbc-ETR1-1	pGD210 ¹⁾	pAB2	Ag10	32	S	N
sag12-IPT	pSG529 (+) ²⁾	?	Ag10	51	S	-
sag13-IPT	pSG766A ²⁾	?	Ag10	43	S	-
EPF2-5-IPT	pGD411 ¹⁾	pBinPI us	Ag10	43	S	-
35S-FBP2	pGD122 ¹⁾	pBinPI us	Ag10	50	S	N
35S-phyA	PST22B11 ³⁾	pKYL X	C58C1	55	M	N,P
35S-phyB1	PST24A1 ³⁾	pKYL X	C58C1	62	M	N,P
35S-phyB2	KYTB2 FOR ³⁾	pKYL X	C58C1	13	M	N,P

^{1,2,3)} Plasmides oorspronkelijk afkomstig van ¹⁾ P.R.I, ²⁾ R.D. Amasino, University of Wisconsin-Madison, 53706, USA, ³⁾ Japanse groep? via PF, S: analyse van stekken, M: analyse van moederplanten, N: Northern blot analyse, P: PCR analyse

Discussie

Er zijn planten getransformeerd met 8 verschillende constructen. In een paar gevallen waren dat andere constructen dan van te voren afgesproken in het werkplan (tabel 1). De veranderingen zijn pas doorgevoerd na onderling overleg tussen PRI, PF en LGP. Voor alle constructen, behalve voor PHYA, PHYB1 en PHYB2, zijn er twee keer zoveel transgene planten gemaakt dan de 20, zoals van te voren afgesproken. Na uitgebreide moleculaire analyse van de PHYA, PHYB1 en PHYB2 planten bleken van deze sets maar enkele planten transgeen. Mogelijke oorzaak is de afkomst van de plasmiden en gebruikte *A. tumefaciens* stam.

Oorspronkelijk stond in het werkplan dat alle constructen met een rbc promoter gemaakt zouden worden, omdat gevonden werd dat de 35S promoter, die standaard in veel gewassen als goede promoter gebruikt wordt, een slechts hele lage activiteit in chrysanthe heeft (Annadana, 2001). Echter na analyse van de 35S-FBP2, die al in een vroeg stadium beschikbaar kwamen, zijn we tot de conclusie gekomen dat dat niet in alle gevallen waar is. Northern analyse en fenotypische analyse van de set 35S-FBP planten gaf echter aan dat de expressie van het FBP2 gen wél voldoende was om een veranderd fenotype te veroorzaken. Op basis hiervan hebben we samen met PF besloten om de PHY constructen in de 35S vectoren te laten. Hierdoor was vergelijking met tomaat beter mogelijk en waren de klonerproblemen gelijk verholpen.

Een bottleneck in dit onderzoek was de moleculaire analyse van de getransformeerde planten. Bij aanvang van het project werd ervan uitgegaan dat de PCR methode routinematig gebruikt kon worden, zoals dat bijvoorbeeld bij tomaat het geval was. Er is veel tijd verloren om het PCR protocol te optimaliseren, hetgeen uiteindelijk wel gelukt is. Uiteindelijk is er nog een beperkte moleculaire analyse van planten gedaan d.m.v. Northern blots.

Uit de fenotypische analyse kan geconcludeerd worden dat alleen in de set 35S-FBP2 planten zeer duidelijke kenmerken te vinden waren, die gerelateerd kunnen worden aan het effect van het doelgen. Alle andere afwijkende fenotypen zouden beschouwd kunnen worden als gevolgen van somaklonale variatie. Deze beperkte moleculaire analyse was echter niet bedoeld om conclusies te trekken over het wel of niet door laten gaan van het project. Bijvoorbeeld, rbc-ETR was vooral bedoeld voor voorkoming van contactstress en niet voor veroudering. Hier is op dit moment nog niet voldoende naar gekeken.

PF heeft van alle getransformeerde planten een representatieve set in de kassen van Unifarm (universiteit) laten bloeien en op uiterlijk beoordeeld. Geen van de afwijkende fenotypen werd echter door PF gezien als interessant voor verdere fysiologische analyse. Om deze reden wordt ook afgezien van continuering van het chrysanthenonderzoek binnen dit project.

Zowel Dr. Kendrick (PF) als Dr. ir. Visser (PRI) zijn echter nog steeds van mening dat transformatie met de verschillende PHY genen wetenschappelijk maar ook commercieel interessante fenotypen kan opleveren. Voorwaarden zijn dan wel:

- gebruik van een rbc promoter voor hoge expressie van de PHY genen.
- inbouw van genconstructen in voor P.R.I. gebruikelijke vectoren
- gebruik van een op PRI beproefde *A. tumefaciens* stam (bij voorkeur Ag10)
- nauwkeurige moleculaire analyse van transgene planten (is nu mogelijk, eerder niet).

Dus een vervolg op dit project, gericht op inbouw van PHY-genen, biedt naar onze mening wel degelijk nog perspectieven.

Literatuur

De Jong J., Rademaker, W. and Ohishi, K. (1995). *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant tissue Culture and Biotechnology* 1: 38-42

Annadana, S. (2001). Towards protease inhibitor mediated resistance to western flower thrips in chrysanthemum. PhD Thesis. Wageningen University. 126 pp.