



# Voorjaarssymposium

Nederlandse Vereniging voor Plantenbiotechnologie en -Weefselkweek  
Netherlands society for Plant Biotechnology and tissue Culture

19 Maart 2004

## WICC-IAC – Wageningen

- 9:30 Registratie and koffie
- 10:00 Opening door de voorzitter: **Rob Bogers**
- 10.10 **Ton Peeters** (Ecofysiologie van Planten, Universiteit Utrecht)  
Expansines in *Rumex*
- 10:40 **Merel Langens-Gerrits** (Enza Zaden, Enkhuizen)  
Bolgroei en faseverandering in lelie tijdens de regeneratie in vitro
- 11:10 **Anker Sørensen** (Keygene, Wageningen)  
Breeding by design
- 11:40 **Nick de Vetten** (AVEBE b.a., Veendam)  
Selectiemerker-vrij transformeren van aardappel
- 12:10 **Lunch**
- 12:50 **NVPW Ledenvergadering**
- 14:00 **Frans Krens** (WTCC, WageningenUR)  
Introductie: Wageningen Weefselkweek Centrum WTCC
- 14.10 **Krit Raemakers** (WTCC, WageningenUR)  
Amylose vrije cassave via genetische modificatie
- 14:30 **Jan Schaart** (WTCC, WageningenUR)  
'Schone' genetische modificatie
- 14:50 **Zhihui Shan** (WTCC, WageningenUR)  
Regeneration in legumes
- 15:10 **Han Bouman** (WTCC, WageningenUR)  
Soortspecifieke weefselkweekmedia; aanpassingen in element-samenstelling
- 15:30 **Jan Custers** (WTCC, WageningenUR)  
Microsporenembryogenese; fundamenteel en toegepast
- 15:50 **Jaap van Tuyl** (WTCC, WageningenUR)  
Toepassing van in vitro bestuiving, ovarium-, zaadknop- en embryo cultuur en chromosoomverdubbeling in de veredeling
- 16:10 Koffie en thee

## **Expansines in *Rumex palustris***

*Ton Peeters*

*Ecofysiologie van planten, Universiteit Utrecht*

Expansines zijn eiwitten die betrokken zijn bij de groei en ontwikkeling van planten. Er worden drie soorten onderscheiden te weten  $\alpha$ ,  $\beta$ . De  $\alpha$ -expansines zijn bij dicotylen voornamelijk betrokken bij celgroei en elongatie, de  $\beta$ -expansines in dicotylen zijn vaak zijn pollen allergenen terwijl ze in monocotylen vaak aan groei gerelateerd zijn.

Dit verhaal gaat over  $\alpha$ -expansines. De werking van deze stoffen is niet geheel duidelijk maar men denkt dat ze een rol spelen bij het "verweken" van de celwand (verbreken van waterstofbindingen) waardoor deze verder kan uitrekken. Sinds de ontdekking begin jaren 90 zijn in zeer veel plantensoorten genen die hiervoor coderen gecloneerd. Het blijkt dat ze binnen een soort voorkomen in zeer grote genfamilies, 30-40 leden is geen uitzondering.

*Rumex palustris* (*Rp*), moeraszuring, is een soort die o.m. in de uiterwaarden van rivieren voorkomt en in staat is kortdurende overstromingen met niet al te hoge waterstanden te overleven. Strikt genomen zijn er 2 strategieën te onderscheiden als planten onder water komen te staan; niets doen en wachten of groeien zodat één of meerdere bladeren boven het water uitkomen. *Rp* is een soort die gebruik maakt van de tweede methode waarbij bladeren eerst een hyponastische respons vertonen waarna de petiool versneld gaat groeien. De groeireactie is een vorm van differentiele groei, een rij van enkele tientallen cellen aan de abaxiale kant verlengen waardoor de petiool kan opklappen naar een meer verticale positie, daarna verlengen de cellen zich over de hele lengte van de petiool.

Wij hebben 20  $\alpha$ -expansinegenen uit *Rp* gecloneerd en onderzocht welke waar een rol spelen in dit proces. We hebben dit gedaan door naar expressie op het nivo van mRNA en eiwit naar enkele leden van deze familie te kijken.

## **Bolgroei en faseverandering in lelie tijdens de regeneratie *in vitro***

*Merel Langens*

*Enza Zaden B.V.*

Weefselkweek biedt niet alleen mogelijkheden om planten sneller te vermeerderen maar ook om de kwaliteit van plantmateriaal te verhogen. Het onderzoek is gericht op de mogelijkheden om leliebolletjes tijdens hun groei en ontwikkeling *in vitro* te 'programmeren' voor optimale groei na uitplanten.

De groei van een bolletje na de weefselkweekperiode hangt voornamelijk af van het bolgewicht, de rijpheid (wel of niet volwassen) en het rustniveau. Grote bolletjes groeien sneller na uitplanten dan kleine bolletjes. Tijdens de weefselkweek kunnen bolletjes rijpen en volwassen (adult) worden. De omslag van juveniel naar adult wordt in belangrijke mate bepaald door de grootte van een bolletje. Alleen in bolletjes die zwaarder zijn dan een bepaald drempelgewicht kan de omslag plaatsvinden. Om adulte bolletjes te kunnen produceren is het dus van belang om te weten welke factoren bolgroei *in vitro* bepalen. Een voordeel van adulte bolletjes is hun grotere groeikracht.

Voor bolgroei zijn voedingsstoffen nodig en er is onderzocht welke bijdrage de twee beschikbare voedingsbronnen *in vitro*, het explantaat en het medium, leveren aan de groei van een leliebolletje. Bolgroei wordt voornamelijk bepaald door de grootte van het explantaat en de sucrose concentratie in het medium. Een bolletje dat de faseverandering van juveniel naar adult heeft ondergaan, is te herkennen aan de vorming van een stengeltje na uitplanten. Onder natuurlijke omstandigheden duurt het 1-2 groeiseizoenen voor de faseverandering plaatsvindt. In weefselkweek kon die periode worden teruggebracht tot een paar maanden. Temperatuur en bolgrootte zijn de belangrijkste factoren die de faseverandering reguleren.

## **BREEDING BY DESIGN™**

*Anker Sørensen*

*Keygene, Wageningen*

Breeding by Design is a concept which aims to control all allelic variation for all genes of agronomical importance. This concept can be achieved through a combination of precise genetic mapping, high-resolution chromosome haplotyping and extensive phenotyping. Thanks to marker technology, software tools and know-how available today, this goal can be achieved now. Depending on the crop specific generation time, controlled marker assisted selection strategies can now lead to the production of superior varieties within five to ten years.

## **Selectiemerker-vrij transformeren van aardappel**

*Nick de Vetten*

*AVEBE.b.a. Veendam*

Om de genetisch veranderde plantencellen te onderscheiden van de niet veranderde cellen wordt veelal een selectiemerker toegevoegd. Met name het gebruik van antibioticum resistentie genen als selectiemerker is een heikel punt geworden in de discussie rondom het gebruik van genetisch gemodificeerde gewassen en heeft geleid tot een uitspraak van de Europese Unie, waarin gesteld wordt dat transgene gewassen die een antibioticum resistentie gen bevatten na 2008 van het veld verdwenen moeten zijn.

Om aan deze argumenten van de overheid en milieu-organisaties tegemoet te komen heeft AVEBE een methode ontwikkeld waarbij het gebruik van een selectiemerker vermeden wordt.

Algemeen verondersteld wordt dat selectiemerkers voor planttransformaties noodzakelijk zijn omdat maar "één op de miljoen" plantencellen getransformeerd zou worden. Om een plant met juiste eigenschappen te vinden zouden daarom miljoenen bekeken moeten worden, hetgeen ondoenlijk is. De discussie omtrent het gebruik van antibioticum resistentie in planten heeft er om deze redenen voor gezorgd dat veel nieuwe selectiemerkers en alternatieven ontwikkeld zijn door bedrijven en universiteiten. Hierbij is gekeken naar enzymen die een voor de plant toxische stof kunnen neutraliseren of een enzym dat een onbruikbare stof kan omzetten in een stof die de plant nodig heeft voor de groei. Verder zijn diverse systemen ontwikkeld om de selectiemerker na gebruik voor de selectie van de genetisch gemodificeerde cellen te verwijderen. Al deze ingenieuze uitvindingen laten echter de vraag onberoerd of selectiemerkers wel noodzakelijk zijn voor transformatie van planten.

AVEBE heeft in samenwerking met Wageningen Universiteit en Research centrum in aardappel gekeken of het idee van een frequentie van één op de miljoen getransformeerde plantencellen wel klopt. Hierbij zijn stukjes stengelweefsel getransformeerd met *Agrobacterium tumefaciens* en vervolgens zijn hiervan planten geregenereerd. Of deze nieuwe gevormde plantjes getransformeerd zijn wordt aangetoond met PCR. Na het doormeten van enkele duizenden planten bleek dat afhankelijk van het gebruikte type *Agrobacterium* een frequentie optrad van 3 tot 46 transgene planten van de 1000 geteste planten. Er is dus niet sprake van één op de miljoen plantencellen die getransformeerd wordt maar van ongeveer 50 op de duizend plantencellen. Deze frequentie maakt het gebruik van selectiemerkers in aardappel overbodig. De verwachting is dat ook andere plantensoorten via deze methode getransformeerd kunnen worden, maar de frequenties ervan zou kunnen variëren

Door het vermijden van selectiemerkers en door het inbrengen van een inverted repeat antisense Korrelgebonden Zetmeelsynthase konstrukt is een amylose-vrije zetmeelaardappel ontwikkeld waarbij het ingebrachte DNA bijna volledig aardappel DNA

is. Enkel de grenzen van het construct en het stopsignaal van transcriptie zijn aangegeven met *Agrobacterium* DNA.

De eerste honderd amylose-vrije transgene aardappel planten zijn gemaakt en gescreend voor het aantal kopieën en of er geen bacterieel DNA in de aardappel terecht is gekomen. De planten vrij van Ti plasmide DNA zijn geselecteerd en zijn op het veld getest voor opbrengst, ziekteresistenties en andere landbouwkundige eigenschappen.

## **Introductie: Wageningen Weefselweek Centrum WTCC**

*Frans Krens*

*Wageningen Tissue Culture Centre*

Met de komst van de (weefselweek)onderzoekers en hun onderzoekprojecten van PPO-Lisse naar Plant Research International in Wageningen vorig jaar is al het onderzoek en onderwijs op het gebied van plantaardige weefselweek nu geconcentreerd in Wageningen. Dit heeft geleid tot de oprichting van het WTCC, het Wageningen Tissue Culture Centre. Behalve PPO en Plant Research International zijn ook Wageningen Universiteit, Van Hall/Larenstein, het IAC en Breedwise deelnemer aan het WTCC.

Het WTCC kan zowel onderzoek als onderwijs op het gebied van weefselweek verzorgen. Expertise is vooral aanwezig op de gebieden van vermeerdering, embryo rescue, haploïden, embryogenese, cryopreservering, regeneratie, somatische hybridisatie en transformatie. Ook wordt er gewerkt aan het opzetten van verschillende cursussen. Vanuit het buitenland is er veel vraag naar specifieke weefselweekopleidingen. Het WTCC onderzoekt de haalbaarheid hiervan.

De 'grondleggers' van het WTCC zijn Frans Krens, Marcel Toonen en Jan Custers (PRI), Han Bouman, Geert-Jan de Klerk (PPO) en Krit Raemakers, Dick Vreugdenhil en Maarten Koornneef (WU).

## **Amylose vrije cassave via genetische modificatie**

*Krit Raemakers*

*Wageningen Tissue Culture Centre, Wageningen Universiteit*

Cassave behoort tot de familie van de euphorbiaceae en wordt geteeld voor zijn zetmeelrijke verdikte wortels in de tropen. Cassave wordt voornamelijk gebruikt voor menselijke en dierlijke consumptie. Echter de industriële toepassing van cassave zetmeel wordt steeds belangrijker in een groot aantal landen. In deze lezing wordt aangegeven hoe door middel van genetische modificatie de zetmeeleigenschappen van cassave kunnen worden veranderd.

## **'Schone' genetische modificatie**

*Jan Schaart*

*Wageningen Tissue Culture Centre, Plant Research International*

De laatste jaren zien we steeds meer voorbeelden van interessante toepassingen van genetisch gemodificeerde (GM) gewassen, maar de commerciële teelt van GM gewassen blijft voorsnog beperkt tot landen buiten Europa. Als belangrijke reden hiervoor wordt de bezorgdheid bij consumenten en overheden over de veiligheid van GM gewassen genoemd. De veronderstelde onzekerheden, met name met betrekking tot de veiligheid van antibioticum resistentie genen, waren aanleiding voor de EU om veldproeven en de teelt van GM gewassen met antibioticum resistenties in de nabije toekomst te verbieden.

Om tegemoet te komen aan de eisen van de EU, is op Plant Research International een elegante methode ontwikkeld waarmee antibioticum resistentie genen, nadat ze hun nut hebben bewezen, uit het transgene weefsel kunnen worden verwijderd. Hiervoor wordt een induceerbaar recombinatie systeem gebruikt waarmee zeer precies ongewenste transgene DNA sequenties kunnen worden verwijderd. Door het gebruik van de recombinase te combineren met de toepassing van een negatieve selectie merker, zijn op een effectieve wijze transgene aardbei, appel en tabaksplanten verkregen, welke volledig vrij waren van antibioticum selectie merkers.

Om acceptatie verder te bevorderen wordt momenteel een aangepaste versie van de binaire vector pBINplus uitgetest, waaruit overtollige sequenties zijn verwijderd, en het recombinatie en negatieve selectie systeem zijn ingebracht, zodat uiteindelijk een minimale hoeveelheid 'vreemd' DNA in de transgene plant aanwezig blijft. Daarnaast moet bij 'schone' genetische modificatie gestreefd worden naar het gebruik van DNA sequenties afkomstig van verwante soorten. Uit sociologisch onderzoek, dat als onderdeel van een multidisciplinair EU-project werd uitgevoerd met transgene aardbei als voorbeeld, bleek dat naast afwezigheid van antibioticum resistentie genen, het gebruik van soort-eigen sequenties als promotor en genen, voor zowel producenten als consumenten, tot een goede acceptatie van GM producten zou leiden.

## **Soortspecifieke weefselweekmedia; aanpassingen in element-samenstelling**

*Han Bouman, Annemiek Tiekstra en Geert-Jan de Klerk*

*Wageningen Tissue Culture Centre, Plant Research International/Applied Plant Research  
e-mail: han.bouman@wur.nl*

Voor weefselweek wordt meestal MS (Murashige-Skoog) medium gebruikt dat ontwikkeld is voor tabakscallus. Omdat iedere soort zijn eigen element-samenstelling heeft, ligt het evenwel voor de hand dat de samenstelling van MS meestal niet optimaal is en dat in weefselweek iedere soort zijn eigen specifieke element-behoefte heeft. Onze uitgangshypothese is dus dat weefselweek media die qua element-samenstelling aangepast zijn aan soortspecifieke eisen betere resultaten geven in vermeerdering en/of plantjes leveren met een betere kwaliteit op dan het klassieke MS medium. Element-aanpassingen die getest zijn waren gebaseerd op 1. de macro-element samenstelling van de gezonde, goed groeiende plant (speciaal jong-volwassen blad), 2. de minerale samenstelling van de voeding in substraatteelt. Uitgangspunten en bijkomende problemen worden behandeld.

Als voorbeelden worden Cymbidium, gerbera, dahlia en roos besproken. Bij Cymbidium werd een sterke verhoging bij de groei van de pseudoprotocormen gevonden in het aangepaste medium t.o.v. ½ MS. Het aangepaste gerberamedium leverde vergeleken met MS meer en grotere plantjes op die ook uiterlijk verschilden. Dahlia gaf op aangepast, vast medium een betere groei dan op het gebruikelijke DKW, terwijl bij gebruik van vloeibaar medium het verschil veel kleiner was. Hier speelde het probleem van het optreden van neerslagen bij de bereiding van het DKW medium een rol. Hoewel bij de vermeerdering van roos het aangepaste medium geen verbetering te zien gaf t.o.v. MS, werd een sterk verbeterde groei en overleving gevonden na uitplanten, in het bijzonder bij aanpassing van de micro-element concentraties.

## **Microsporenembryogenese; fundamenteel en toegepast**

*Jan Custers*

*Wageningen Tissue Culture Centre, Plant Research International  
e-mail: jan.custers@wur.nl*

Microsporen, de nog onrijpe stuifmeelkorrels van een plant, kunnen in weefselkweek embryo's vormen. Bij het gewas koolzaad gaat dat vrij gemakkelijk en wij gebruiken die plant als model voor het ontrafelen van de moleculaire basis voor het ontstaan van embryogenese uit de microsporen. Dit onderzoek zal ook informatie opleveren over genen die betrokken zijn bij de normale zygotische embryogenese van planten. We isoleerden al het *BABY BOOM (BBM)* gen, dat somatische weefsels aanzet tot vorming van embryo's. Gedetailleerde vergelijking van de morfogenese van zygotische embryo's met die van microsporenembryo's laat echter vooral in de beginstadia grote verschillen zien in met name de vroege patroonvorming. Daarom rees de vraag of het wel mogelijk is om via microsporencultuur specifieke genen te vinden voor de vroege embryogenese bij planten. Door verfijning van het protocol is het ons recent gelukt om de microsporen in kweek embryo's met suspensors te laten vormen, met een zelfde initiële patroonvorming als bij de zygotische embryogenese. In cDNA-microarray onderzoek toonden deze embryo's met suspensor expressie van genen die niet werden gevonden in klassieke microsporencultures.

Planten ontstaan uit microsporen zijn in principe haploid en na verdubbeling van het aantal chromosomen ontstaan volledig homozygote planten, die een belangrijk hulpmiddel zijn in veredelingsprogramma's van verschillende gewassen. Met name siergewassenveredelaars zien in de snelle productie van verdubbelde haploïden een mogelijkheid om van vegetatieve vermeerdering van hun gewassen te komen tot zaadvermeerdering. Wij werken aan protocolontwikkeling van microsporencultuur en hebben recent goed reproduceerbare procedures voor snelle productie van verdubbelde haploïden ontwikkeld voor siergewassen Anemoon, Zantedeschia en Delphinium.

## **Toepassing van in vitro bestuiving, ovarium-, zaadknop- en embryo cultuur en chromosoomverdubbeling in de veredeling**

*Jaap van Tuyl*

*Wageningen Tissue Culture Centre, Plant Research International*

In vitro veredelings technieken zijn ontwikkeld om soortkruisingsbarrières te omzeilen.

Globaal kunnen vier typen van kruisingsbarrières onderscheiden worden te weten:

1. Kruisingsbarrières die vóór de bevruchting optreden, meestal veroorzaakt door remming van de pollenbuisgroei. Door middel van in vitro bestuivingstechnieken (in vitro bestuiving, afgesneden stijl- en geënte stijl methode) kunnen deze barrières omzeild worden.
2. Kruisingsbarrières die optreden nadat bevruchting heeft plaatsgevonden. Hierbij is de oorzaak van de barrière embryoabortie en/of endospermdegeneratie. Diverse embryoreddingstechnieken (ovarium-, zaadknop- en embryocultuur) zijn ontwikkeld om dit probleem te op te lossen.
3. F<sub>1</sub>-steriliteit: dat wil zeggen dat bij de overigens groeikrachtige hybriden vanwege problemen met de chromosoomparing tijdens de meiose steriliteit optreedt, waardoor verdere veredeling onmogelijk is. In vitro chromosoomverdubbeling levert tetraploïde F<sub>1</sub>-hybriden, waarbij wel chromosoomparing mogelijk is en de fertiliteit is in het algemeen hersteld is.
4. Introgressie van eigenschappen in de nakomelingen is essentieel voor de veredeling. Daartoe is interchromosomale recombinatie vereist. Dit kan onderzocht worden middels de GISH-techniek (genomische *in situ* hybridisatie) aan de hand van (in vitro) verkregen worteltopjes.

Toepassing van deze technieken is in het modelgewas lelie onderzocht, maar in tal van andere gewassen worden ze ook toegepast, niet alleen om soortkruisingsbarrières te omzeilen maar ook als algemeen hulpmiddel in de veredeling.