



# NVPW

## Najaarsymposium 2009

### 20 november

Nederlandse Vereniging voor Plantenbiotechnologie en -Weefselkweek  
Netherlands Society for Plant Biotechnology and Tissue Culture

Hotel de Nieuwe Wereld, Marijkeweg 5, 6709 PE, Wageningen

- 09:30 **Registratie en koffie**
- 09:55 Opening door de voorzitter: **Titti Mariani**
- 10:00 **Evert Jacobsen - WUR**  
Cisgenic transformation of broad spectrum *Rpi*-genes for potato resistance to late blight
- 10:35 **Stefaan Werbrouck - Laboratorium voor plantenbiotechnologie, Hogeschool Gent**  
Nieuwe aromatische cytokininen in de plantenweefselteelt: verdiensten en beperkingen
- 11:10 **“Elevator Pitch” door de diverse exposanten**
- 11:15 **Koffiepauze**
- 11:30 **Jan van Cromvoirt – Aarts Plastics b.v.**  
Weefselkweekbakjes, iets speciaals?
- 12:05 **Katarzyna Bednarczyk – ENBIO TECHNOLOGY Sp. z.o.o**  
Flash sterilization by EnbioJet.
- 12:40 **Lunch**
- 13:40 **Geertjan de Klerk - WUR**  
Flux van mediumcomponenten in weefselkweek
- 14:15 **Timothy J. Golds - Bayer Bioscience NV**  
Chloroplast Transformation and its biotechnological applications
- 14:50 **Koffiepauze**
- 15:05 **Ronald Gronsveld - Rofianda Consultancy b.v.**  
GGO afval waterdesinfectie systeem
- 15:40 **Sacco te Lintel Hekkert - Sensor Sense**  
Uiterst gevoelige ethyleen detectie en toepassingen op biologische systemen.
- 16:15 **Afsluiting onder het genot van een drankje.**

Deelname aan het Symposium is gratis voor de leden. Niet leden betalen € 12,50.  
De kosten voor de lunch bedragen € 10,-.

Gaarne aanmelden voor het symposium en eventueel de lunch **vóór 16 november** onder vermelding van naam, adres en eventueel NVPW nummer via één van de onderstaande e-mail adressen:

nvpw@nvpw.nl  
mariani@science.ru.nl

c.j.m.raemakers@genetwister.nl  
jan.schaart@wur.nl

## **Cisgenic transformation of broad spectrum *Rpi*-genes for potato resistance to late blight**

E Jacobsen and Suxian Zhu,

Plant Breeding, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Modern plant breeding is more and more dependent on introgression of important traits, like disease resistance, from crossable wild species. This is often connected with linkage drag problems, especially when several genes from different species have to be introgressed. In potato we are working on resistance to *Phytophthora infestans*, with broad spectrum resistance (*Rpi*) genes from different species. For durable resistance, stacking of at least 3 *Rpi*-genes is needed. It is expected that conventional introgression breeding, even with marker assisted selection, free of disturbing linkage drag effects will be complicated. A more simple way is genetic modification of existing varieties with a multiple *Rpi*-genes containing vector. However, acceptance of GMO and the high costs for safety assessments are still big bottle necks. We try to come to a better and quicker solution by introducing only genes from the plant itself or from crossable species, which are called cisgenes. We believe that this approach, called cisgenesis, can be exempted from the GM Directive 2001/18/EC. At this moment a committee from the EU is investigating whether cisgenesis and other new approaches can be exempted.

Cisgenesis is dependent on marker-free transformation. In the present contribution we like to show some aspects of marker-free transformation of potato. PCR based selection of transformants is different from kanamycin selection. We are investigating marker-free transformation with a triple gene construct and expression of the 3 *Rpi*-genes in the PCR selected transformants, including epistatic effects.

## **Nieuwe aromatische cytokininen in de plantenweefselteelt: verdiensten en beperkingen**

Stefaan P.O. Werbrouck, Laboratorium voor plantenbiotechnologie, Hogeschool Gent, Universiteit Gent, Voskenslaan 270, 9000 Gent, België, stefaan.werbrouck@hogent.be

Het cytokinine dat men kiest kan bepalen of de in vitro vermeerdering van een plantenspecies al dan niet lukt. Deze groep plantengroeiregulatoren stimuleren of inhiberen allerlei voor de praktijk belangrijke processen zoals vertakking, scheutinductie, veroudering en wortelvorming. Natuurlijke cytokininen zijn N6-gesubstitueerde purine-derivaten, die ingedeeld worden volgens de configuratie van hun N6-zijketen in isoprenoïde of aromatische cytokininen. Vroeger werd alleen de eerste groep beschouwd als natuurlijke verbindingen. Groot was de verrassing toen aromatische cytokininen, zoals benzyladenine, geïdentificeerd werden in planten. Ook de gehydroxyleerde vormen van benzyladenine, meta- and ortho-topoline, bleken in de natuur voor te komen, net zoals hun methoxy-derivaten en de corresponderende 9-ribosiden. Nog later werden fluorderivaten gesynthetiseerd en getest in bioïetsen en diverse micropropagatiesystemen. Tijdens deze lezing wordt een overzicht gegeven van de verdiensten en beperkingen van deze nieuwe aromatische cytokininen. Eigen resultaten en die van collega's worden van commentaar voorzien. Het besluit is dat deze nieuwe cytokininen bruikbare additionele hulpmiddelen zijn die specifieke problemen bij de in vitro cultuur van een aantal plantenspecies kunnen helpen oplossen.

## **Weefselweekbakjes, iets speciaals?**

Jan van Cromvoirt – Aarts Plastics b.v.

Er worden honderden modellen kunststof bakjes en kuipjes geproduceerd voor o.a. verpakking van voedsel. Toch vereist een model voor het kweken van gewassen en plantjes bijzondere eigenschappen. In overleg met deskundigen in de sector en deskundigheid van een kunststof spuitgietbedrijf kan een product tot stand gebracht worden dat voldoet aan veel wensen en functies.

In de lezing wordt o.a. ingegaan op het programma van eisen, de mogelijkheden en beperkingen van een gespuigiet bakje, maar vooral de voordelen. Ook de productiemiddelen, zoals de spuigietmatrijzen en automatisering om de bakjes schoon c.q. fabriekssteriel te houden, komen onder de aandacht.

Ook wordt duidelijk dat ook de gebruikte grondstof, uiteraard zonder "weekmakers", een grote rol speelt.

Na de lezing moet de toehoorder kunnen vaststellen of hij/zij nog iets speciaals kan toevoegen en of dit het dan waard is een nieuw concept te laten ontwikkelen.

## Flash Sterilization by EnbioJet

Katarzyna Bednarczyk – ENBIO TECHNOLOGY Sp. z.o.o

Sterilization in flow have obvious advantages on economical side – particular when high efficiency is needed. It also creates new opportunities, unavailable with any batch methods. The whole sterilization process in flow takes only few seconds – it mean approximately 100 times shorter than autoclaving. Such short exposition for high temperature minimize decomposition and generally provide high quality of sterilized media. There is much literature in this subject, but mostly focused on food products.

The technology Direct Energy Transfer (DET) used in EnbioJet, utilize microwave as a source of the heat. New technology avoid typical problems tightly combined with any convection heating method (based on heat exchangers), such as overheating, overburning and deposition. These advantages can be very important for processing of viscous and dense media - like typical media with agar-agar.

EnbioJet – work in in-vitro Lab – sterilizing everyday few hundred liters of media.

## Flux van mediumcomponenten in weefselweek

Geert-Jan de Klerk. Wageningen Tissue Culture Centre, Wageningen UR Plant Breeding  
geertjan.deklerk@wur.nl

Plantmateriaal neemt tijdens weefselweek organische en anorganische stoffen uit de voedingsbodem op. Het is de vraag hoe deze stoffen naar de *target tissues* verplaatst worden en of dit optimaal gebeurt. Verplaatsing van stoffen opgelost in water gebeurt op twee manieren: (1) via diffusie en (2) via convectie (ze worden meegenomen in waterstromen). Volgens de diffusiewet van Fick is verplaatsing snel over korte afstanden en extreem langzaam over lange afstanden. Ter illustratie, diffusie van suiker over 50 µm (van de ene kant van een cel naar de andere), 2 cm en 1 m duurt respectievelijk 2.5 sec, 9 dagen en 32 jaar. Voor transport over lange afstanden gebruiken planten dan ook de waterstromen in de vaatbundels (in het xyleem en het floëem).

In vast medium (dus medium met agar of gelrite) zal de verplaatsing voor een groot deel plaats vinden door diffusie. Het effect van de traagheid van diffusie over lange afstanden is goed te merken wanneer de mediumcomponent maar korte tijd (enkele dagen) actief is zoals bij auxine en adventieve wortelvorming. Bij kwantitatieve groei (vermeerderingfactor) zijn de mediumcomponenten de hele cyclusperiode 'actief' en is het effect van trage diffusie veel minder. Verder moet opgemerkt worden dat diffusie gehinderd wordt door de gelleerder (in het bijzonder bij gelrite), waarschijnlijk door geladen groepen in de ketens van de gelleerder. Omdat er wateropname is door het plantmateriaal (zie volgende sectie), is er ook stroming van water in vast medium. Die was met kleurstoffen echter niet aan te tonen. In vloeibaar medium is er beweging via vloeistofstromen (in niet-schuddend medium zijn er al voldoende wervelingen door temperatuurverschillen) en zal diffusie nauwelijks een bijdrage aan verplaatsing leveren. Zoals boven aangegeven, gebeurt in planten verplaatsing van stoffen over lange afstanden via waterstromen in de vaatbundels. Bij scheuten in weefselweek speelt transport via waterstromen naar verwachting ook een belangrijke rol omdat de afstanden relatief groot zijn (> 1 cm). Waterstroom in het xyleem wordt aangedreven door transpiratie van water door de bladeren. De luchtvochtigheid in weefselweek is zeer hoog, dus het is de vraag of er überhaupt transpiratie is. Het bleek dat de transpiratie 20-30 mg water per cm<sup>2</sup> per dag was (gemeten bij appelscheutjes en mungboon kiemplantjes in Wavin kuipjes). Naar schatting komt dit neer op enkele ml water per scheut/cluster-van-scheuten gedurende een cyclus van 4 weken. Er is dus sprake van continu verdampen van water via de scheuten waarna het water weer wordt opgenomen door het voedingsmedium. Verder onderzoek moet uitwijzen of dit voldoende is voor optimale groei. De transpiratie is ca. 10 maal minder dan onder natuurlijke omstandigheden. In andere weefseltypen (callus, stengelexplantaten etc) zal transpiratie en bijgevolg transport via waterstromen in het xyleem een veel geringere rol spelen. Naar verwachting hangen fluxen dan vooral af van diffusie. Waterstroom in het floëem wordt aangedreven door osmotische verschillen tussen *source*- en *sink*-gebieden in het weefsel. Onder natuurlijke omstandigheden wordt de *source* gevormd door fotosynthetiserende bladeren en opslagorganen waarin reserves worden gemobiliseerd. Of de *source* tijdens weefselweek (= het voedingsmedium en fotosynthetiserende blaadjes) ook een waterstroom in het floëem teweeg kan brengen, is onbekend.

## **Chloroplast Transformation and its biotechnological applications**

Timothy J Golds

(Bayer Bioscience NV, Gent, Belgium)

Chloroplasts are typically viewed as the sites for photosynthesis within plant cells. However, chloroplasts also contain a remnant of evolutionary development, their own genetic information and expression machinery. Compared to the more conventional method of introducing foreign genetic material into nucleus, gene transfer into the chloroplast is also possible and has several advantages. Site-specific insertion into the chloroplast genome avoids 'position effects' and leads to uniform and reproducible expression. It is also possible to introduce and co-express several genes in tandem by creating artificial operons. Furthermore, given that each cell contains up to 10,000 chloroplast genome copies it can be used as a platform for high-level expression of recombinant proteins e.g. pharmaceuticals, vaccines or industrial enzymes. Although an established technique in tobacco, chloroplast transformation in other crop species still presents a considerable challenge. An overview of the technology will be given from a tissue culturist's point of view; relating to vector design, method of DNA delivery, selection and regeneration.

## **Uiterst gevoelige ethyleen detectie en toepassingen op biologische systemen.**

Sacco te Lintel Hekkert - Sensor Sense

Aan de Radboud Universiteit in Nijmegen wordt al sinds 20 jaar uiterst gevoelige detectie van het plant hormoon ethyleen tot in het pptv bereik (1 pptv = 1 deeltje op de  $10^{12}$  deeltjes) verricht. Dit is enkele ordes van grootte gevoeliger dan de gebruikelijke GC's waarbij nog komt dat er nu continu gemeten kan worden, hierdoor is onderzoek mogelijk aan systemen die voorheen niet onderzocht konden worden. Voor dit doel zijn er gecompliceerde, op lasers gebaseerde meetsystemen ontwikkeld. Enkele jaren geleden is Sensor Sense, een spin of van de de universiteit opgericht die erin geslaagd is deze systemen dermate te vereenvoudigen en te verkleinen dat het nu mogelijk is ook zonder de hulp van fysici het biologisch onderzoek te verrichten. Sensor Sense brengt de ethyleen detectoren nu op de markt. De ethyleen detectoren zijn in de afgelopen jaren in verschillende biologische onderzoeken toegepast, variërend van stikstof fixatie van Cyanobacteriën tot cel culturen en van bloemen tot fruit zowel aan de plant als in separate cuvettes door onderzoeksgroepen uit Nederland en Europa. Aan de hand van enkele voorbeelden zal duidelijk gemaakt worden wat de mogelijkheden zijn van de ethyleen detector.