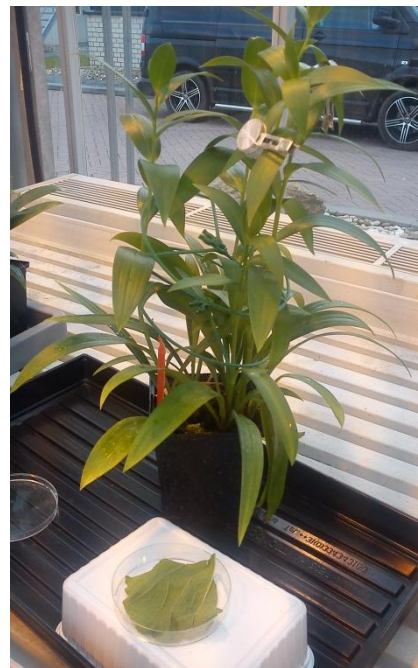




# Merker-vrije lelies met luisresistentie

Deel 2

Auteur: Dr. F.A. Krens



Productschap  Tuinbouw

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR  
Wageningen UR Plant Breeding  
maart 2014

Eindrapport

© 2014 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

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

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

Exemplaren van dit rapport kunnen door heffingbetalers van het internet gedownload worden via [www.tuinbouw.nl](http://www.tuinbouw.nl) van het Productschap Tuinbouw.



PT-projectnummer 14587

Dank aan de inzet van Jan Schaart, Bernadette van Kronenburg, Greet Steenhuis, Roeland Voorrips, Linda Kodde, Luuk Suurs, Annemarie Dechesne, Alex van Silfhout, Tila Menzel, Wang Yue, Engelen Kerkhof, Laura Wijnoltz.

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

Adres : Postbus 386, 6700 AJ Wageningen  
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
Tel. : 0317 – 48 09 62  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl)  
Internet : <http://www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Onderzoeksinstituten/plant-research-international.htm#>

# Inhoudsopgave

|  | Pagina |
|--|--------|
| 1. Samenvatting                              | 1      |
| 2. Inleiding                                 | 2      |
| 2.1 Achtergrond                              | 2      |
| 2.2 Afbakening                               | 3      |
| 3. Materialen en methoden                    | 4      |
| 3.1 Plantmateriaal                           | 4      |
| 3.2 Biochemische analyses                    | 4      |
| 3.2.1 Linalool                               | 4      |
| 3.2.2 Equistatine                            | 4      |
| 3.3 Insectentoetsen                          | 4      |
| 3.4 Dexamethason behandeling                 | 7      |
| 4. Resultaten                                | 9      |
| 4.1 Biochemische analyses                    | 9      |
| 4.1.1 Linalool                               | 9      |
| 4.1.2 Equistatine                            | 10     |
| 4.2 Insectentoetsen                          | 12     |
| 4.3 Dexamethason behandeling                 | 15     |
| 4.3.1 Callus niveau                          | 15     |
| 4.3.2 Schubjes van controles en de GM lijnen | 15     |
| 5. Discussie en conclusies                   | 17     |
| 5.1 Transgene karakter van de geteste lijnen | 17     |
| 5.2 Biochemische bevestiging                 | 17     |
| 5.3 Insectenresistentie                      | 18     |
| 5.4 Merker-vrij maken                        | 18     |
| 5.5 Conclusies                               | 19     |

# 1. Samenvatting

Genetisch gemodificeerde lelielijnen, die geproduceerd waren binnen PT project 12966, zijn in dit vervolproject verder gekarakteriseerd. Dit betrof 28 GM lijnen die na selectie m.b.v. moleculaire analyse (PCR) als zodanig waren geïdentificeerd en 55 GM lijnen die alleen op basis van hun goede groei en regeneratie op hygromycine-selectie medium als potentiële GM kandidaten waren geselecteerd. Het doel van project PT 12966 en dit project PT14587 was om GM lelies te maken die een tweetal nieuwe genen hebben ontvangen die ze resistent tegen of in ieder geval minder gevoelig zouden maken voor aantasting door bladluizen. Uit zulke lijnen zouden vervolgens ongewenste genen, zoals de antibioticum-resistentiegenen nodig voor selectie, verwijderd worden, zodat de GM planten merker-vrij zouden zijn. Nadat eerder de aanwezigheid van het DNA van de ingebrachte genen coderend voor equistatine (EQ) en linalool synthase (LS), was aangetoond en van één van de genen ook expressie op mRNA niveau, is in dit project gekeken of de aanwezigheid van het equistatine eiwit of van het linalool synthase enzym op biochemisch niveau aangetoond konden worden. M.b.v. de gebruikte biochemische technieken, te weten SDS PAGE gelelectroforese voor EQ en gaschromatografie (GC) voor linalool, het product gevormd door LS, bleek dit niet mogelijk. In geen van de lelielijnen kon linalool aangetoond worden; in een paar van de lijnen werd wel een eiwit gevonden met een grootte overeenkomend met die van EQ, maar er kan niet met zekerheid gesteld worden dat dit ook daadwerkelijk equistatine betreft. De gevonden eiwitpatronen waren in het algemeen te onduidelijk en onbetrouwbaar.

Met als doel de introductie van resistentie tegen luizen is natuurlijk de ultieme test een resistentietoets, waarin planten blootgesteld worden aan doelinsecten, in dit geval de katoenluis, *Aphis gossypii*, als belager van lelies. Twee type toetsen zijn uitgevoerd aan 62 GM lelielijnen. Eén waarbij luizen (5) m.b.v. kooitjes op bladeren werden aangebracht en acht dagen de tijd kregen om of dood te gaan of zich te voeden en zich verder met succes te ontwikkelen met als zichtbaar bewijs daarvan de productie van huidjes na vervellingen en van jonge nymfen. In de tweede toets werden gehele planten ingehuld in cilinders of hoezen en werden vijftien katoenluizen op deze planten losgelaten. Hier werd na drie weken gescoord. Statistische analyses van de resultaten van deze toetsen gaven ondanks de soms niet geringe spreiding toch enkele lijnen te zien waar de luizen zich significant minder goed ontwikkelden (zowel qua sterfte als via minder huidjes en nymfen) en die mogelijk minder gevoelig of zelfs resistenter genoemd kunnen worden. Met gebruik van de criteria beschreven in dit rapport bleken 19 GM lijnen significant minder gevoelig voor de katoenluis.

Zes van die lijnen zijn vervolgens gebruikt om te zien of en hoe ze merker-vrije te maken waren door een behandeling met dexamethason (Dex). Hiervoor zijn de lijnen vermeerderd en zijn schubjes verzameld en gebruikt voor de Dex behandeling. Gevonden werd dat lelie in deze vorm, dus als schubjes, niet effectief genoeg blootgesteld kan worden aan de Dex zodat die niet in elke cel zijn werking kan uitvoeren. Ook bleek dat lelie een grote tolerantie liet zien tegen het toxisch geachte 5-fluorouracil, het product van de omzetting van het niet-toxische 5-fluorocytosine (5-FC) o.i.v. het enzym cytosinedeaminase (codA). Dit enzym is onderdeel van de techniek om te kunnen selecteren voor succesvolle verwijdering van ongewenste genen. Uiteindelijk kon geen uitspraak gedaan worden over de effectiviteit van de Dex en bleek selectie op 5-FC veel hogere concentraties te vergen dan getest zijn. Samenvattend zijn er GM lelies gemaakt die luizen significant minder ontwikkelingsmogelijkheden boden, die resistenter zijn. Voor merker-vrij maken van lelie zullen de juiste condities nog gevonden moeten worden, waarschijnlijk in een eerder callusstadium voor de regeneratie nog.

## 2. Inleiding

### 2.1 Achtergrond

Het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen in de teelt van lelies bedroeg in 2004 129,1 kg Werkzame Stof per hectare, een toename met 24% ten opzichte van het jaar 2000 (bron: CBS). Een significant deel daarvan wordt gevormd door middelen ter bestrijding van bladluizen met als hoofddoel verspreiding van virussen tegen te gaan. De wens om het gebruik van middelen terug te dringen wordt binnen de sector breed gedragen. Onderzoek naar de mogelijkheden hiertoe is belangrijk en loopt al op het gebied van teeltmaatregelen. Een minstens zo belangrijke benadering is via het lelie-uitgangsmateriaal en dan vooral veredeling op resistentie tegen bladluizen. Diverse soorten bladluizen kunnen als belagers van lelie virussen overbrengen met als belangrijkste de groene perzikluis, *Myzus persicae*, en de katoenluis, *Aphis gossypii*. De genenpool van lelie wordt actief gescreend op bronnen voor brede resistentie tegen luizen om zo spoedig mogelijk met kruisingen te kunnen beginnen. Genetische modificatie als oplossingsrichting is het onderwerp van een eerder door het Productschap Tuinbouw gefinancierd project (PT12966). Het huidige project is het vervolg hierop.

In PT12966 zijn met succes diverse transgene lelies gemaakt m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens* en een genconstruct gebaseerd op de merkervrije technologie van Wageningen UR met twee genen waarvan de producten actief moeten zijn tegen bladluizen. Dit betreft het equistatine gen (EIM), coderend voor een proteïnase inhibitor, werkzaam na opname door de luis, en het linalool synthase gen (LS), verantwoordelijk voor de vorming van linalool (= vluchtig terpeen), dat als een repellent werkt. Binnen PT12966 is op voorhand de mogelijkheid onderzocht en gewaarborgd dat eventuele patenten op genen, methoden of systemen geen obstakel zullen vormen in geval van commercialisatie in een later stadium (wanneer aan de orde). Een en ander is schriftelijk gegarandeerd door patenthouders. Van tweeëntwintig cultivars zijn bloemen aangeleverd door vijf lელიveredelingsbedrijven om als uitgangsmateriaal te dienen voor callusinductie, regeneratie en transformatie-experimenten. Uiteindelijk zijn tenminste 27 individuele transgene lijnen geïdentificeerd m.b.v. moleculaire (PCR) analyse op aanwezigheid van beide genen. Deze lijnen vertegenwoordigden acht cultivars en van twee cultivars werden meer dan vijf individuele lijnen verkregen. Vervolgens is expressie van de genen aangetoond m.b.v. RT-PCR in negentien van de 27 lijnen. Vanwege het grote genoom van lelie zijn op PCR gebaseerde analyses niet gemakkelijk. Vals negatieven komen herhaaldelijk voor; dit betekent dat het aantal transgene en expressie gevende lijnen groter kan zijn dan moleculair aangetoond kan worden.

In vitro materiaal van de lijnen en controles is vermeerderd en opgekweekt om voldoende bladmateriaal te verkrijgen t.b.v. biochemische analyses en om na een koudebehandeling de bolletjes over te brengen in aarde en naar de kas. De in PT12966 geproduceerde gentech lelies hebben ook gediend als uitgangspunt voor het opstellen van een virtuele casus met als doel om via dat dossier inzicht te krijgen in de obstakels waarmee de sector geconfronteerd zou worden bij het aanmelden bij de overheid (Bureau GGO, Ministerie van Infrastructuur en Milieu, COGEM) voor de marktintroductie van genetisch gemodificeerde (GM) siergewassen, PT13973 (Bloemisterij). Uit dat project bleek dat directe markttoelating zonder veldproeven niet mogelijk is en dat voor de aanvraag voor veldproeven de lijnen bij voorkeur merker-vrij dienen te zijn en goed gekarakteriseerd op moleculair en biochemisch gebied, maar ook voor het beoogde effect en vernieuwde fenotype, i.e. qua bladluisresistentie. De begeleidingscommissies van beide projecten hebben aangegeven dat zij graag zouden zien dat er aparte vervolgaanvragen zouden worden opgesteld voor de benodigde verdere karakterisaties en het merker-vrij maken en voor het opstellen van een eerste categorie 1 veldproefaanvraag voor deze gentech lelies als voorbeeld voor een siergewas. Het merker-vrij maken en de karakterisaties als vervolg op PT12966 zijn het onderzoeksonderwerp van het onderhavige project, PT14587, gehonoreerd door het Productschap Tuinbouw Bloembollen. Het opstellen van de veldproefaanvraag is gebeurd als project bij PT Bloemisterij als vervolg op PT13973. Het eindverslag van dit laatste project, PT14661, is in februari 2013 opgesteld en aangeboden aan het Productschap en via hen verkrijgbaar.

## 2.2 Afbakening

Diverse analyses zijn uitgevoerd op genetisch gemodificeerde lelielijnen, een aantal geselecteerd op basis van eerdere, positieve PCR analyses geselecteerde lijnen (zie PT12966) en een aantal nieuwkomers geselecteerd op grond van fenotype en goede groei op hygromycine-bevattend medium geselecteerde lijnen.

In de biochemische analyses is gekeken naar het voorkomen van de proteïnase inhibitor, equistatine, als eiwit (n=20) en linalool als vluchtige stof in bladeren van in de kas opgekweekte planten (n=32).

Insectentoetsen om het resistentieniveau tegen de katoenluis te bepalen zijn uitgevoerd via 'clip-on' kooitjes op bladeren van kasplanten (geen-keuze toets) en via ontwikkelingstoetsen waarbij luizen op gehele planten in kooien zijn geplaatst en in hun ontwikkeling zijn gevolgd (n=62).

Het merker-vrij maken van de lijnen is gedaan m.b.v. een behandeling van in vitro schubmateriaal met dexamethason (Dex) en selectie op fluorocytosine (FC) bevattend groeimedium. Materiaal met en zonder Dex behandeling is gekweekt op medium met hygromycine of met FC en na 4 en 8 weken op groei en fenotype bekeken. Controles (zowel callus als schubmateriaal) zijn op het toxische fluorouracil (FU) gekweekt om het effect op groei en levensvatbaarheid te kunnen bestuderen.

## 3. Materialen en methoden

### 3.1 Plantmateriaal

Na een koudebehandeling zijn in 2012 de in vitro bolletjes van leliemateriaal, afkomstig van de transformaties met de diverse cultivars en mogelijk genetisch gemodificeerd, in aarde opgepot en opgegroeid. Dit betrof 28 op basis van PCR geselecteerde lijnen (zie eindrapportage PT12966; 27+1 nagekomen) en 55 lijnen die op basis van goede groei en fenotype op hygromycine selectiemedium alsnog als potentiële gentech kandidaten zijn geïdentificeerd. De 83 lijnen omvatten 3 Lake Carey's (LC), 6 Cherbourgs (Ch), 41 White Express (WE), 3 Sheila's (Sh), 22 Robina's (Ro), 5 Montezuma's (Mo) en 3 Paradero's (Pa; zie tabel 1).

### 3.2 Biochemische analyses

#### 3.2.1 Linalool

Vers bladmateriaal van opgekomen planten van 32 lijnen (tabel 1) is gebruikt om een extract te maken met ethanol en dat op een GasChromatograaf (GC) biochemisch te analyseren op de aanwezigheid van linalool; vergeleken werd met een standaard linalool oplossing in methanol. Gemiddeld werd 900 mg blad opgenomen in 2,5 ml ethanol in afsluitbare glazen buisjes en in een waterbad gesonificeerd. Na centrifugatie van de homogenaten werden de vloeibare fasen gefiltreerd (0.45 µm) en verzameld in hersluitbare buizen. Hieruit werden 1 µl monsters genomen en in speciale GC reactievatjes overgebracht. De monsters werden met behulp van een Agilent Gas Chromatograaf met FID (flame ionization detector) uitgerust met een DB-23 kolom en H<sub>2</sub> als drijfgas geanalyseerd. De duur van de run was 27 minuten.

#### 3.2.2 Equistatine

Vers bladmateriaal van 20 lijnen (tabel 1) is gebruikt om een eiwit extract van te maken en m.b.v. een nieuw Bio-Rad 4-15% PAGE systeem met beeldanalyse op eiwitpatronen te bekijken en op de aanwezigheid van equistatine, een eiwit met een grootte van 22 kD. Gemiddeld is 100 mg vers bladmateriaal geoogst en ingevroren. Voor eiwitextractie is het materiaal m.b.v. een pottertje gehomogeniseerd na toevoeging van 50 µl extractiebuffer. Vervolgens zijn de monsters gekookt, geschud en gecentrifugeerd bij 10.000 rpm. Het supernatans (2 µl ervan) is op voorgegoten Bio-Rad SDS-PAGE gels (4-15%) opgebracht en geëlectroforeerd om de eiwitten op grootte te scheiden. De gel is na kleuring m.b.v. beeldanalyse software doorgemeten en de groottes van de eiwitbanden zijn afgeleid van een monster met standaarden.

### 3.3 Insectentoetsen

Om planten met meer massa te verkrijgen en goede jonge bladeren om luisresistentie op te toetsen zijn de planten en bollen verder afgerijpt, geoogst en opnieuw aan een koudebehandeling onderworpen. Zij zijn in 2013 opnieuw opgepot en uiteindelijk zijn 62 lijnen eerst m.b.v. 'clip-on' kooitjes in tweevoud getoetst. In deze z.g. geen-keuze toetsopzet zijn per plant 2 kooitjes aangebracht met vijf 1-dag-oude nymfen van de katoenluis, *Aphis gossypii*, per kooitje. De katoenluizen waren opgekweekt op lelieplanten afkomstig van ons lieieverdelingsprogramma. Na 8 dagen is er gescoord op het aantal overlevenden, het aantal huidjes (als aanwijzing voor vervellingen en dus groei en ontwikkeling) en het aantal nakomelingen (nymfen, voortgebracht door de uitgezette luizen). Later in een tweede toetsopzet, een z.g. populatie-ontwikkelingstoets, zijn dezelfde planten nog eens in hun geheel als plant in hoezen geplaatst waarna 15 luizen op de planten in de kooien zijn opgebracht. Hier is de ontwikkeling van de luizen (aantal dode, aantal huidjes en aantal nymfen) na 3 weken gescoord. Een extra 7 lijnen konden op deze laatste manier bekeken worden waarmee het totaal getoetste lijnen op 69 kwam (tabel 1). Bij alle toetsen zijn niet-GM controles meegenomen, bij voorkeur ook afkomstig van in vitro kweek. De resultaten zijn m.b.v. een ANOVA (Analysis of

Variance) geanalyseerd op significante verschillen in de aantallen levenden, huidjes of nymfen en daarmee op vatbaarheid/resistentie.



Tabel 1. Overzicht van de GM lijnen gebruikt in de tests beschreven in dit rapport.

| Plant code | Cv. | Categorie (28 of 55) | Linalool getest | Equistatine getest | Insecten getest | Plant code | Cv. | Categorie (28 of 55) | Linalool getest | Equistatine getest | Insecten getest |
|------------|-----|----------------------|-----------------|--------------------|-----------------|------------|-----|----------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| 17         | LC  | 28                   | +               | +                  | +               | 197        | Mo  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 19         | LC  | 28                   | +               | +                  | +               | 198        | WE  | 55                   | +               | -                  | +               |
| 41         | Ch  | 55                   | +               | -                  | +               | 199        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 42         | Ch  | 28                   | +               | +                  | +               | 200        | WE  | 55                   | +               | -                  | +               |
| 50         | Ch  | 55                   | -               | -                  | +               | 202        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 61         | Ch  | 55                   | -               | -                  | +               | 203        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 69         | WE  | 28                   | +               | +                  | +               | 208        | WE  | 28                   | +               | -                  | -               |
| 71         | WE  | 55                   | +               | -                  | +               | 210        | Pa  | 28                   | +               | +                  | +               |
| 73         | WE  | 55                   | -               | -                  | +               | 300        | WE  | 55                   | +               | -                  | +               |
| 74         | WE  | 55                   | -               | -                  | +               | 301        | WE  | 28                   | +               | -                  | +               |
| 75         | WE  | 55                   | +               | -                  | +               | 302        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 76         | WE  | 28                   | -               | -                  | +               | 303        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 78         | WE  | 28                   | +               | +                  | +               | 304        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 86         | WE  | 55                   | +               | -                  | +               | 305        | WE  | 28                   | +               | -                  | +               |
| 87         | WE  | 55                   | -               | -                  | -               | 306        | WE  | 28                   | +               | -                  | +               |
| 88         | WE  | 55                   | -               | -                  | +               | 307        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 92         | WE  | 55                   | -               | -                  | +               | 308        | WE  | 55                   | +               | -                  | +               |
| 94         | WE  | 55                   | +               | +                  | +               | 309        | WE  | 28                   | +               | +                  | +               |
| 143        | WE  | 55                   | +               | +                  | +               | 350        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 157        | Sh  | 28                   | +               | -                  | +               | 351        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 158        | Sh  | 28                   | +               | +                  | +               | 352        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 159        | Sh  | 55                   | -               | -                  | +               | 353        | Ro  | 55                   | -               | -                  | -               |
| 160        | LC  | 55                   | +               | -                  | +               | 354        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 162W       | WE  | 28                   | +               | +                  | +               | 355        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 163        | WE  | 55                   | +               | -                  | +               | 356        | Ro  | 55                   | -               | -                  | -               |
| 164R       | Ro  | 28                   | -               | +                  | -               | 357        | Ch  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 165R       | Ro  | 28                   | -               | +                  | -               | 358        | Ch  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 166R       | Ro  | 28                   | +               | +                  | -               | 359        | Ro  | 55                   | -               | -                  | -               |
| 167R       | Ro  | 28                   | -               | +                  | -               | 360        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 167W       | WE  | 28                   | -               | -                  | +               | 361        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 168R       | Ro  | 28                   | -               | -                  | +               | 362        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 168W       | WE  | 28                   | -               | -                  | +               | 363        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 169R       | Ro  | 28                   | -               | +                  | -               | 364        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 169W       | WE  | 28                   | +               | +                  | +               | 365        | Pa  | 55                   | -               | -                  | -               |
| 170R       | Ro  | 28                   | +               | +                  | +               | 366        | Pa  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 170W       | WE  | 28                   | +               | +                  | +               | 367        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 172        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               | 368        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 173        | Ro  | 28                   | -               | -                  | +               | 369        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 174        | Ro  | 28                   | +               | +                  | +               | 370        | WE  | 55                   | -               | -                  | +               |
| 179        | Ro  | 55                   | -               | -                  | +               |            |     |                      |                 |                    |                 |
| 182        | Mo  | 55                   | -               | -                  | -               |            |     |                      |                 |                    |                 |
| 186        | Mo  | 55                   | +               | -                  | +               |            |     |                      |                 |                    |                 |
| 188        | Mo  | 55                   | -               | -                  | -               |            |     |                      |                 |                    |                 |
| 191        | Mo  | 55                   | -               | -                  | -               |            |     |                      |                 |                    |                 |

### 3.4 Dexamethason behandeling

Van 6 lijnen die significant resistenter waren tegen katoenluizen is in vitro plantmateriaal vermeerderd om voldoende schubmateriaal te krijgen voor behandeling met dexamethason (Dex). Dit waren de GM lijnen 17 (een Lake Carey), 42 (een Cherbourg), 78 (een White Express), 168 (een Robina) en 169 en 351 (beiden White Express). Van alle cultivars konden ook niet-GM controles vermeerderd worden behalve van Robina. Ook die zijn met Dex behandeld. Van acht niet-GM controlelijnen was voldoende callus beschikbaar om het effect van hygromycine (15 mg/l), 5-fluorocytosine (FC, 500 mg/l) en 5-fluorouracil (FU, 100 & 200 mg/l) op groei en regeneratie uit te testen. In tabel 2 is weergegeven hoeveel materiaal er uiteindelijk per lijn of cultivar aan welke behandeling onderworpen kon worden.

Tabel 2. Hoeveelheid en hoedanigheid van het ingezette leliemateriaal.

| Nummer/Cultivar | Materiaal     | Aantal expl   |                |
|-----------------|---------------|---------------|----------------|
|                 |               | 0 $\mu$ M DEX | 25 $\mu$ M DEX |
| 17 (LC)         | Schub plakjes | 39            | 40             |
| 42 (Ch)         | Schub plakjes | 41            | 40             |
| 78 (WE)         | Schub plakjes | 34            | 34             |
| 168 (Ro)        | Schub plakjes | 8             | 7              |
| 169 (WE)        | Schub plakjes | 26            | 28             |
| 351 (WE)        | Schub plakjes | 29            | 26             |
| Cherbourg (Ch)  | Schub plakjes | 93            |                |
| Lake Carey (LC) | Schub plakjes | 51            |                |
| W Express (WE)  | Schub plakjes | 53            |                |
| W Express       | callus        | 4 schalen     | 95             |
| Yelloween       | callus        | 6 schalen     | 130            |
| Burlesca        | callus        | 5 schalen     | 123            |
| Wh Heaven       | callus        | 5 schalen     | 130            |
| Barbados        | callus        | 4 schalen     | 100            |
| Robina          | callus        | 6 schalen     | 140            |
| Wh Fox          | callus        | 7 schalen     | 163            |
| Santander       | callus        | 6 schalen     | 155            |

Noot: Ro =Robina

De Dex behandeling bestond uit een overnacht incubatie in vloeibaar 1/2MS50 medium met 25  $\mu$ M Dex, gevolgd door een periode van 4 weken groei op vast 1/2MS50 met 1  $\mu$ M Dex. Na die 4 weken zijn de behandelde schubjes gelijkmatig verdeeld over medium met 15 mg/l hygromycine of medium met 500 mg/l FC. Controles werden op dezelfde manier behandeld maar dan met 0  $\mu$ M Dex in de vloeibare en vaste media. In geval van een succesvolle inductie van de recombinatie en daarmee van het merker-vrij maken van het materiaal moet er op hygromycine geen groei meer kunnen optreden en wel op FC; indien het plantmateriaal niet merker-vrij is geworden, dan kan het nog steeds groeien op hygromycine, maar niet op FC vanwege de omzetting van FC door het dan nog aanwezige *codA* genproduct in het toxische FU. De niet-GM schub- en calluscontroles zijn gelijkmatig over de media met hygromycine, FC en 100FU en 200FU verdeeld om te zien/bevestigen dat hygromycine toxisch is, dat FC geen effect heeft en bij welke concentratie FU een zichtbaar negatief effect heeft. Na 4 weken op de diverse selectiemedia is er gescoord

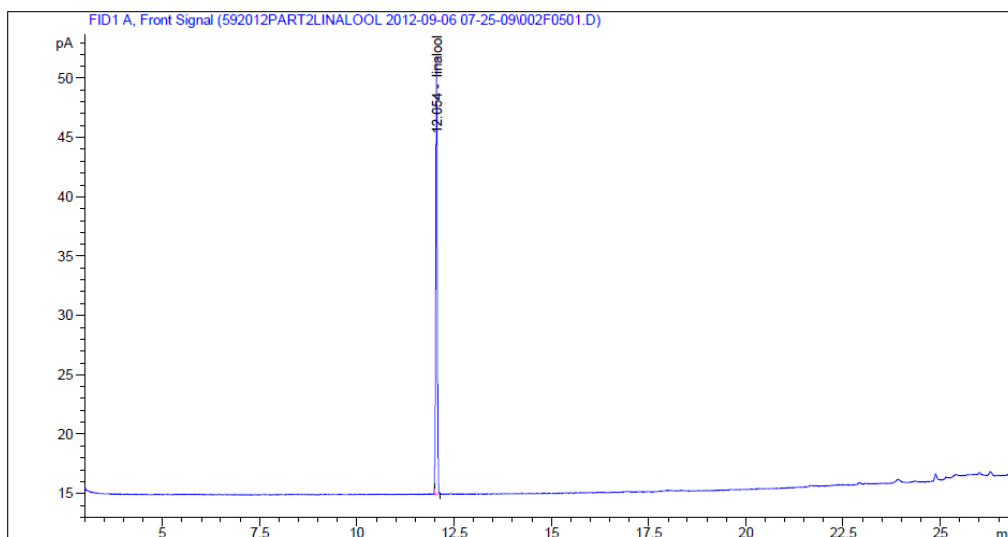
en zijn de nog levende schubjes en calli op vers medium met toevoegingen gezet. Vanwege het feit dat er geen reactie te zien was op de media met 100 en 200 mg/l FU is al het materiaal overgezet op medium met 500 mg/l FU. Na weer een periode van 4 weken kweek is de uiteindelijke score op groei en overleving (+/- regeneratie) gedaan.

## 4. Resultaten

### 4.1 Biochemische analyses

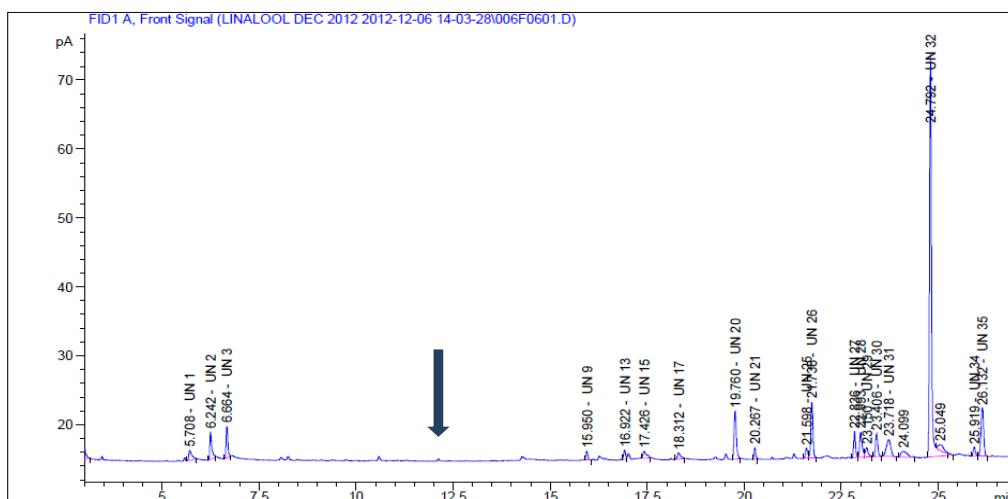
#### 4.1.1 Linalool

De standaardoplossing in methanol gaf het in figuur 1 getoonde patroon met een piek op de RetentieTijd (RT) waarde van 12.054. Pieken in de leliemonsters met dezelfde RT geven een indicatie voor de aanwezigheid van linalool in het monsters en de piekoppervlakte geeft een idee van de hoeveelheid.



Figuur 1. GC spectrum van de linalool-standaard

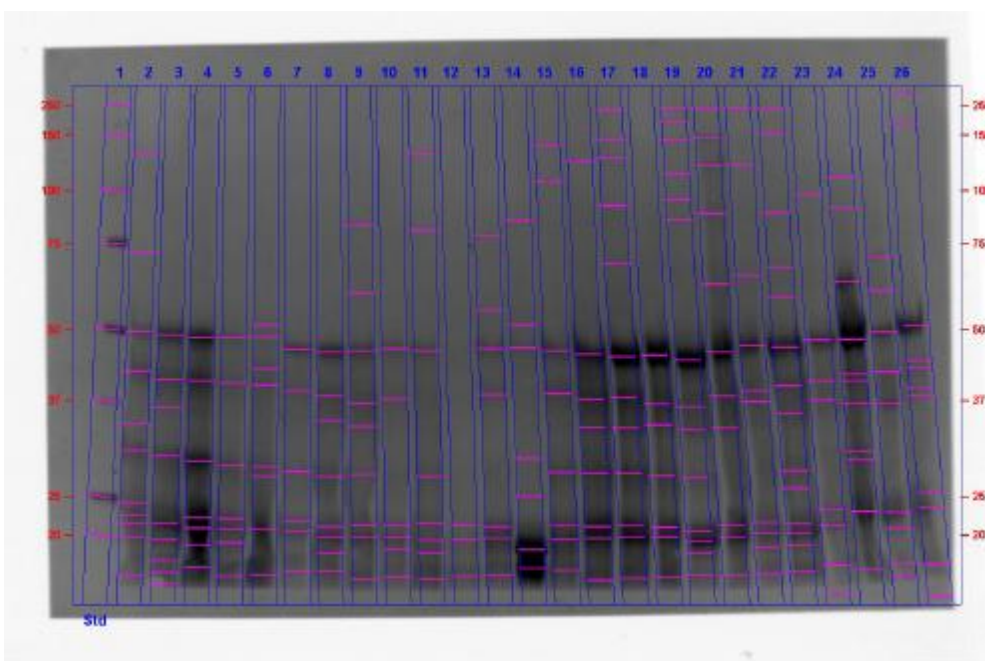
Zoals in de Materialen & Methoden paragraaf beschreven zijn uiteindelijk GC spectra van 32 monsters gemaakt. Helaas kon in geen van de monsters linalool aangetoond worden op deze manier. De leliemonsters bevatten diverse vluchtige verbindingen, maar geen een met een RT rond de 12,0. Een representatief voorbeeld van het GC spectrum van een leliemonster is te zien in figuur 2.



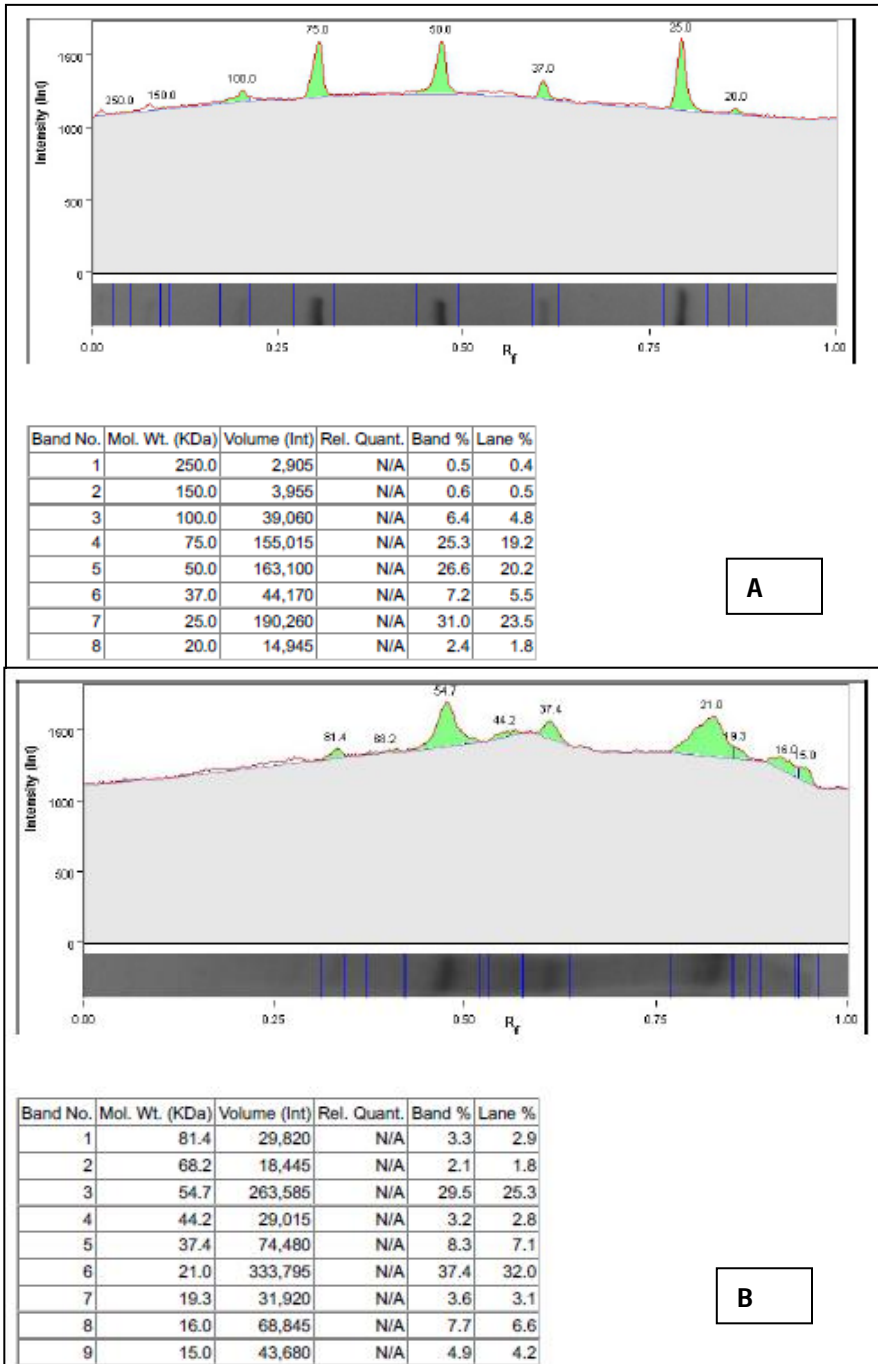
Figuur 2. GC spectrum van GM lelielijn #19, een Lake Carey.

## 4.1.2 Equistatine

De voorgegoten Bio-Rad 4-15% SDS-PAGE gel leverde een mooie scheiding op in geval van het monster met de standaard eiwitmix. Ook de eiwitmonsters van de lelielijnen gaven eiwit bandenpatronen te zien die m.b.v. de beeldanalyse zijn gekarakteriseerd. Het equistatine eiwit is een eiwit met een grootte van 22 kD. Een band met een dergelijke grootte is alleen aangetroffen in de Lake Carey controle (!; 22 kD), bij de White Express GM lijnen 107 en 309 (resp. 21.2 en 21.5 kD), bij de Sheila GM lijn 158 (22.8 kD), Paradero GM lijn 210 (21 kD) en de Robina 174 (21 kD). Het systeem lijkt de beste scheiding te geven tussen 25 en 100 kD; daaronder en daarboven wordt het minder duidelijk. Vreemd was dat de controles en de GM lijnen van één soort geen overeenkomstig patroon te zien gaven en ook dat de diverse GM lijnen binnen één soort geen zelfde patroon gaven. Dit is wel de verwachting. In figuur 3 is de gel weergegeven en figuur 4 laat een tweetal voorbeelden zien van de uitkomsten van de beeldanalyse, de standaard en een GM lijn.



*Figuur 3. Bio-Rad 4-15% SDS-PAGE gelelektroforese met in de lanen de banden aangegeven die m.b.v. beeldanalyse zijn geïdentificeerd. Laan 1 is de standaard, de overige lanen bevatten leliemonsters, controles en GM lijnen. Bijvoorbeeld laan 2 de Lake Carey controle en laan 7 Lake Carey GM lijn 17.*



Figuur 4. Twee lanen van de SDS-PAGE gelelectroforese met de beeldanalyse scan en de door de software geïdentificeerde eiwitpieken. A laat de standaard zien en B de Paradero GM lijn 210.

Of de banden in de GM lijnen, variërend in grootte van 21 tot 22.8 kD, daadwerkelijk equistatine betreffen, kan niet vastgesteld worden. Duidelijk is wel dat de band in de Lake Carey controle geen equistatine kan zijn.

## 4.2 Insektentoetsen

De insektoetsen zijn in twee series uitgevoerd waarbij eerst twee planten per lijn zijn uitgerust met elk twee klemkooitjes. In de klemkooitjes zijn vijf 1-dag-oude nymfen gezet en na acht dagen is gescoord op overlevenden, huidjes en nakomelingen (nymfen). Dit leverde dus vier waarnemingen per lijn (controle of GM lijn) op, die zijn gebruikt voor een ANOVA. Van 62 lijnen kon zo bepaald worden of waargenomen verschillen significant zijn t.o.v. de controles of t.o.v. de andere GM lijnen. Nadat de toets met de klemkooitjes was beëindigd konden dezelfde planten vervolgens gebruikt worden in een toets waarbij de gehele plant in een cilinder of hoes werd geplaatst waarna 15 luizen per plant werden uitgezet. Ook hier werd gescoord op overlevenden, huidjes en nymfen, nu na 3 weken. Dit leverde per lijn dus twee waarnemingen op voor de analyse en de bepaling of lijnen significant verschilden in resistentie. In figuur 5 worden voorbeelden gegeven van een plant met klemkooitjes en planten in cilinders. In beide toetsen waren de planten willekeurig (random) genummerd en werden zij dubbel blind gescoord.




*Figuur 5. A) Jonge ontwikkelende plant met op twee afzonderlijke bladeren een klemkooitje met 5 luizen; B) Plant in zijn geheel in een afgesloten cilinder met 15 luizen.*

De verschillende ANOVA's geven elk afzonderlijk een beeld van op welke lijnen in die specifieke toets en serie de katoenluizen zich significant beter of slechter ontwikkelden. In geval van geen overlevenden, geen huidjes (dus geen vervellingen) en geen nymfen (geen voortplanting/vermeerdering) kan gesproken worden over materiaal dat resistent is en hoe meer overlevenden, huidjes en nymfen des te vatbaarder het materiaal. Figuur 6A laat een uittreksel zien van de ANOVA van de eerste serie voor de toets met de klemkooitjes als representatief voorbeeld. De groene achtergrondkleur in de afzonderlijke kolommen geeft aan dat die lijnen voor die observatie (dus of overlevenden of huidjes of nymfen) als resistenter beschouwd kunnen worden; een rode kleur betekent vatbaar/gevoelig. De letters in de kolom achter de getallen geven aan of die waarden significant verschillen van andere lijnen; een andere letter betekent significant verschillend ( $p < 0.05$ ). Figuur 6B geeft een lelieblad te zien met adulten en kleinere nymfen, afkomstig van een plant uit de cilindertoeets. De resultaten van de ANOVA's voor klem- en cilindertoeets zijn gecombineerd om te komen tot een eindoordeel over 'resistentie' of vatbaarheid tegen de katoenluis. Aangezien de klemkooitjes op de jonge bladeren niet altijd goed bevestigd konden worden, zijn de scores van de cilindertoeetsen als leidend genomen. Als criterium is hierbij gehanteerd dat een lijn pas het label 'resistent(er)' krijgt als de lijn in de cilindertoeets minimaal groen scoorde voor twee van de drie ontwikkelingsstadia en nergens roze of rood (stadia: overlevenden, huidjes en nymfen; in dit klem(!)voorbeeld zou dat gelden voor de lijnen 167W tot en met 69). Daarboven moesten de kandidaatlijnen uit de cilindertoeets ondersteund worden door minstens 1 groene score in de klemtoets



(en nergens een roze of rode!). In figuur 6A kan gezien worden dat er lijnen groen scoren voor 1 of 2 van de stadia maar niet voor de andere(n), bijvoorbeeld lijn 305. Hetzelfde geldt voor een rode/roze score, voorbeeld lijn 158.

| Lijn       | Overleving |      | Huidjes |       | Nymfen |      |
|------------|------------|------|---------|-------|--------|------|
| 167W       | 0.000      | a    | 0.430   | abcd  | 0.000  | a    |
| 17         | 0.000      | a    | 0.002   | a     | 0.125  | ab   |
| 202        | 0.000      | a    | 0.476   | abcd  | 0.000  | a    |
| 351        | 0.000      | a    | 0.071   | ab    | 0.000  | a    |
| 76         | 0.000      | a    | 0.476   | abcd  | 0.000  | a    |
| 92         | 0.000      | a    | 0.912   | abcd  | 0.000  | a    |
| 69         | 0.139      | abc  | 0.476   | abcd  | 0.000  | a    |
| 158        | 0.169      | abc  | 3.368   | de    | 0.548  | abc  |
| 160        | 0.169      | abc  | 0.664   | abcd  | 0.548  | abc  |
| 163        | 0.169      | abc  | 1.038   | abcd  | 0.548  | abc  |
| 168        | 0.169      | abc  | 1.841   | abcde | 0.548  | abc  |
| 169W       | 0.169      | abc  | 0.929   | abcd  | 0.548  | abc  |
| 170W       | 0.169      | abc  | 0.373   | abcd  | 0.548  | abc  |
| 303        | 0.169      | abc  | 1.038   | abcd  | 0.548  | abc  |
| 305        | 0.169      | abc  | 0.041   | ab    | 0.548  | abc  |
| 307        | 0.169      | abc  | 1.038   | abcd  | 0.548  | abc  |
| Cherbourg  | 0.169      | abc  | 0.827   | abcd  | 0.548  | abc  |
| Lake Carey | 0.169      | abc  | 2.036   | bcde  | 0.548  | abc  |
| 86         | 0.214      | abc  | 0.803   | abcd  | 0.364  | abc  |
| 143        | 0.257      | abc  | 0.931   | abcd  | 0.734  | abc  |
| 367        | 0.257      | abc  | 0.931   | abcd  | 0.734  | abc  |
| L          | 0.257      | abc  | 0.931   | abcd  | 0.734  | abc  |
| White Expr | 0.313      | abc  | 1.252   | abcde | 2.140  | bcde |
| 357        | 0.500      | abcd | 2.229   | bcde  | 1.809  | bcde |
| 41         | 0.637      | abcd | 3.261   | de    | 4.202  | def  |
| Barbados   | 0.706      | bcd  | 2.048   | bcde  | 1.377  | bcde |
| 197        | 0.831      | cd   | 1.516   | abcde | 4.822  | ef   |
| A          | 0.840      | cd   | 1.645   | abcde | 3.030  | cde  |
| OR         | 0.875      | cd   | 5.979   | e     | 8.999  | f    |
| 210        | 0.887      | cd   | 2.629   | cde   | 4.475  | def  |
| 361        | 1.000      | d    | 1.563   | abcde | 2.262  | bcde |



Figuur 6. A) Uittreksel van de ANOVA voor de klemtoets van serie 1. De lijnen zijn gerangschikt naar oplopende overleving van de luizen. L, A en OR staan voor een Longiflorum, Aziaat en Oriental resp. die vanuit een volwassen bol in aarde zijn opgegroeid en niet afkomstig zijn uit weefselkweek. Groen = resistent; rood = vatbaar. B) Lelieblad met adulten (pijl) en jonge nymfen (ster).

De samenvatting van de weging omtrent resistentie is weergegeven in tabel 3. De uitkomst is dat er 19 lijnen zijn aan te merken als resistent volgens genoemde criteria; 2 van Lake Carey, 3 Cherbourg, 2 Robina waarbij opgemerkt dient te worden dat de controles een zelfde mate van resistentie vertoonden in de toets, 1 Montezuma en 11 White Express. Deze getallen wijken iets af van de eerder gerapporteerde getallen (Tussenrapportage) aangezien nu gekozen is voor iets andere criteria. Een viertal lijnen is alleen getoetst m.b.v. een cilindertoets. In principe bestaat de mogelijkheid dat lijnen die net niet aan de hierboven genoemde criteria voldoen toch sterk verminderd vatbaar zijn voor luis, bijvoorbeeld in een veldsituatie. Daar zou de ultieme validatie plaats moeten vinden.



Tabel 3. Samenvatting van de toetsresultaten; weergave van de als resistent aan te merken lijnen.

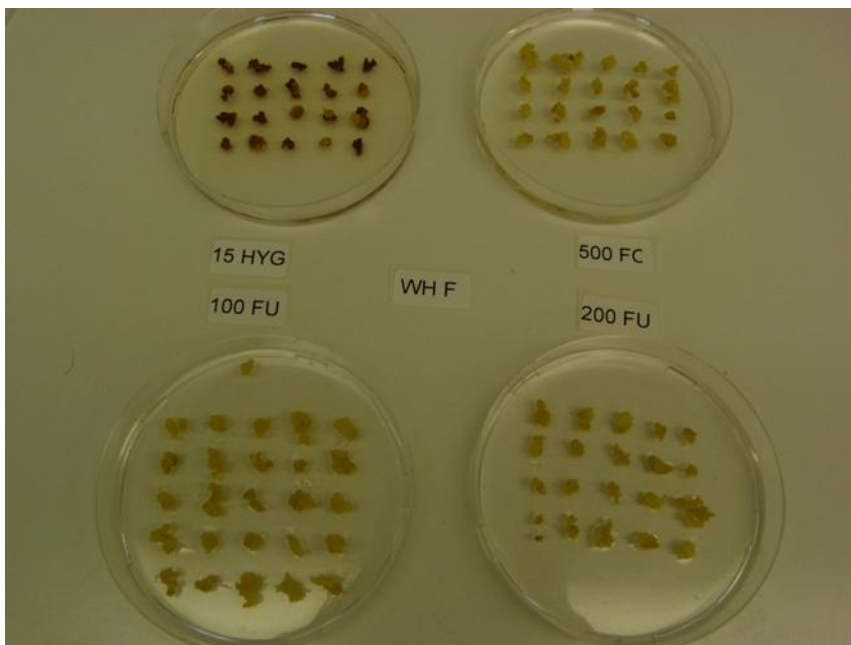
| Lijn | Cultivar      | Ontwikkeling | Klemkooi | Controle              |
|------|---------------|--------------|----------|-----------------------|
| 17   | Lake Carey    | 3            | 3        | vatbaar met spreiding |
| 19   | Lake Carey    | 2            | 3        |                       |
| 42   | Cherbourg     | 3            | n.d.     | vatbaar met spreiding |
| 50   | Cherbourg     | 3            | 1        |                       |
| 61   | Cherbourg     | 2            | 2        |                       |
| 168  | Robina        | 3            | n.d.     | zelf al 'resistent'   |
| 360  | Robina        | 3            | 3        |                       |
| 186  | Montezuma     | 3            | 3        | n.d.                  |
| 73   | White Express | 3            | 1        | vatbaar, 1 meting     |
| 78   | White Express | 3            | n.d.     |                       |
| 88   | White Express | 3            | n.d.     |                       |
| 167  | White Express | 3            | 3        |                       |
| 170  | White Express | 3            | 1        |                       |
| 198  | White Express | 2            | 3        |                       |
| 200  | White Express | 2            | 3        |                       |
| 202  | White Express | 3            | 3        |                       |
| 304  | White Express | 3            | 3        |                       |
| 351  | White Express | 3            | 3        |                       |
| 370  | White Express | 3            | 3        |                       |

In de kolommen 'Ontwikkeling' en 'Klemkooi' is het aantal stadia aangegeven waar de lijn groen gescoord heeft en significant meer resistent is.

## 4.3 Dexamethason behandeling

### 4.3.1 Callus niveau

De callusproeven betroffen de niet GM controles. Van acht cultivars was voldoende callus beschikbaar om de groei en eventueel regeneratie te testen op media met respectievelijk 15 mg/l hygromycine of met 100 mg/l FU of met 200 mg/l FU of met 500 mg/l FC. Na 4 weken bleek dat de calli duidelijk minder groeiden op medium met hygromycine; de groei was prima op zowel 5-FC als op beide concentraties van het toxisch geachte FU (zie figuur 7). Daarom is het materiaal overgezet op vers medium om te kunnen scoren na 8 weken groei op hetzelfde medium met dien verstande dat al het materiaal van de twee FU concentraties dit keer is overgezet op medium met 500 mg/l FU om te zien of er nu wel een negatief effect te zien zou zijn. Na 8 weken was het materiaal van alle cultivars op medium met 15 mg/l hygromycine dood. Op Burlesca na bleef het callusmateriaal ook op 500 mg/l FU in goede conditie. Bij Burlesca was het meeste materiaal bruin geworden en bij Robina was er sprake van groei en leven, maar ook van veel anthocyaanvorming als indicatie voor stress. De 500 mg/l FC gaf voor alle cultivar een beduidend slechtere groei dan de FU en vaak was het callus dood. Van verwisseling kan geen sprake zijn omdat dezelfde schalen bij de schubjes een duidelijk ander beeld te zien gaven.



*Figuur 7. Schalen met calli van de White Heaven non-GM controle op de diverse media (getallen in mg/l; Hyg = hygromycine, FC = 5-Fluorocytosine, FU = 5-Fluorouracil)*

### 4.3.2 Schubjes van controles en de GM lijnen

Voor wat betreft de schubjes was het beeld anders. Let wel, schubjes zijn het materiaal dat bij de GM lijnen aan de Dex behandeling is onderworpen en dat vervolgens op de diverse selectiemediën is gezet. Ook hier was na 4 weken nog geen helder beeld verkregen, vandaar dat alles op vers medium is overgezet en na 8 weken opnieuw is gescoord. De schubjes van 100 en 200 mg/l FU zijn toen allen overgezet op medium met 500 mg/l FU. Voor de non-GM controles geldt voor alle cultivars dat alles op FU nu dood is en dat de schubben op hygromycine in groei duidelijk achterblijven t.o.v. het materiaal op medium met FC. De reactie van de controles is voor wat hygromycine betreft dus heftiger bij de calli (normaal bij transformaties ook het weefsel waar de selectie op wordt toegepast) dan bij schubjes; voor FC en FU is de reactie omgekeerd voor calli als voor schubjes.

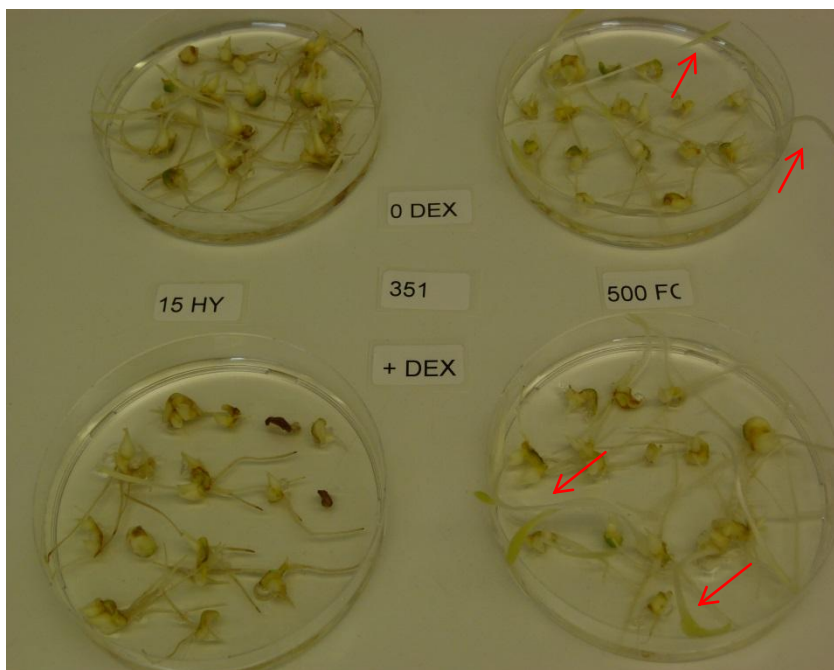
Voor de 6 GM lijnen zijn de reacties weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. Groei van GM lijnen met of zonder Dex behandeling op medium met of zonder hygromycine of 5-FC als selectie.

| Behandeling | 0 Dex/Hyg | 25Dex/Hyg | 0Dex/FC | 25Dex/FC |
|-------------|-----------|-----------|---------|----------|
| Verwachting | ++        | -         | -       | ++       |
| Lijn 17     | +         | +         | ++      | ++       |
| Lijn 42     | +         | +         | +       | +        |
| Lijn 78     | +         | +/-       | ++      | ++       |
| Lijn 168    | +         | n.d.      | ++      | ++       |
| Lijn 169    | +         | +         | ++      | ++       |
| Lijn 351    | +         | +         | ++      | ++       |

Dex = dexamethason, 25 = 25  $\mu$ M; Hyg = hygromycine 15 mg/l; FC = 5-Fluorocytosine 500 mg/l.

Bij deze GM lijnen zien we ook dat de schubjes minder last schijnen te hebben van de hygromycine net als bij de controles en dit is dus in contrast met het effect van hygromycine op calli. De groei van de GM lijnen nummers 78, 169 en 351 (allen White Express) op hygromycine is wel beter dan de non-GM controle op hygromycine. De groei van lijn 17 (Lake Carey) en lijn 42 (Cherbourg) zijn vergelijkbaar met de groei van de respectievelijke non-GM controles. Van 168 (Robina) is geen controle getest wegens gebrek aan schubmateriaal; daarom kon ook 25Dex/Hyg niet getest worden. Geen enkele lijn geeft het verwachte patroon te zien van een succesvol merker-vrij gemaakte GM lijn. Lijn 78 komt nog het dichtste bij, maar dan moet geconstateerd worden dat de selectie op FC totaal niet werkt. Dit beeld lijkt bij alle lijnen naar voren te komen, net zoals het beeld dat een 25  $\mu$ M Dex behandeling van schubmateriaal niet effectief is in het verwijderen van de ongewenste gensequenties en dus in het merker-vrij maken. De 500 mg/l FC lijkt zelfs over de gehele linie een groei- en regeneratie-stimulerend effect te hebben (zie figuur 8).



Figuur 8. Groeireactie van schubben van lijn 351, 8 weken na Dex behandeling en plaatsing op medium met 5-FC (500 FC) of met hygromycine (15 HY). Let op de blaadjes die bij de FC selectie te zien zijn (pijlen).

## 5. Discussie en conclusies

### 5.1 Transgene karakter van de geteste lijnen

Zoals in de eindrapportage van PT12966 beschreven zijn er 28 lijnen geïdentificeerd door groei op hygromycine selectie en diverse PCR analyses (n=5) waarbij deze lijnen minimaal 3 (maar ook 4 of zelfs 5 maal) positief waren en dan voor beide genen, equistatine (EQ) en linalool synthase (LS). In 16 van deze 28 lijnen is transcriptie van het LS gen in mRNA aangetoond m.b.v. RT-PCR. Voor de testen in dit project PT14857 zijn nog 55 lijnen toegevoegd uit latere transformaties die uitsluitend zijn geselecteerd op hun goede groei voor langere tijd op medium met hygromycine. Zoals uit de callusgroeioproeven, gedaan als controles in de bestudering van de effectiviteit van de Dex behandeling (4.3.1.), blijkt, is de selectie op 15 mg/l hygromycine erg effectief op callusniveau. De 55 toegevoegde lijnen zijn dus ook te beschouwen als kandidaat GM lelielijnen.

### 5.2 Biochemische bevestiging

Na identificatie van kandidaat GM lijnen door het aantonen van de aanwezigheid van 'nieuw' DNA m.b.v. PCR of Southern's en nadere verificatie door het bepalen of het geïnserteerde DNA wordt overgeschreven in RNA (genexpressie of transcriptie genoemd) kan de volgende stap zijn het aantonen van de producten van de ingebrachte genen, de eiwitten. Dit kan indirect in geval van een nieuw enzym, door de door het enzym gevormde verbinding aan te tonen, zoals hier door te kijken naar de aanwezigheid van de monoterpeen linalool gevormd door het enzym linalool synthase. Of het kan direct door op eiwitniveau de aanwezigheid van nieuwe eiwitten aan te tonen. Dit kan via gelelectroforese en kleuring op eiwitten of bijvoorbeeld door Western blotting als er antilichamen beschikbaar zijn voor het eiwit. Dat laatste was niet het geval, dus is geprobeerd het EQ eiwit in gels van eiwitextracten van GM en niet-GM lelies aan te tonen, gebaseerd op de molecuulgrootte van het eiwit.

De gebruikte GC chromatografie om linalool aan te tonen gaf geen resultaat voor de 32 geteste lijnen, terwijl er in sommige dus wel RNA wordt gevormd van het LS-gen. Dit kan betekenen dat de translatie van RNA in eiwit niet goed verloopt of dat het gevormde enzym geen activiteit heeft. Andere verklaringen kunnen zijn dat de gevormde hoeveelheid linalool te laag is om gedetecteerd te kunnen worden op deze manier. Wat elders ook wordt gevonden is dat de gevormde linalool geconjugerd (= gekoppeld) wordt aan een suikermolecuul en opgeslagen, bijvoorbeeld in de vacuole. In deze vorm kan het niet vrij komen en gedetecteerd worden. Als dit laatste het geval is, zou dit kunnen betekenen dat de linalool ook in het veld niet beschikbaar zou zijn (of onvoldoende) om als repellent tegen luizen te kunnen werken. Wel komt het voor dat bij vraat of verwonding de geconjugeerde linalool alsnog wordt vrijgemaakt door de plant. De vraag is of het dan nog bijdraagt aan verminderd aanpakken door luizen en zo aan een vermindering van virusoverdracht.

Eiwitextracten van 20 lijnen zijn geprepareerd en samen met die van controles op een 4-15% SDS-PAGE systeem van BioRad geëlectroforeerd. Eiwitbanden zijn m.b.v. een kleuring en beeldanalyse geanalyseerd op voorkomen en grootte. De meegeleverde oplossing met standaard eiwitten met een bekende grootte gaf een fraaie scheiding en identificatie op molecuulgrootte. De lelielijnen gaven wel eiwitten te zien maar de patronen waren niet volgens verwachting. De patronen van een niet-GM leliecultivar en zijn GM-afgeleide zouden overeenkomstig moeten zijn met als enige verandering de extra band bij 22 kD in de GM lijn; verschillende GM lijnen binnen dezelfde cultivar zouden identiek aan elkaar moeten zijn. Gevonden werd dat die patronen niet overeenkwamen. Verder gaven slechts vijf GM lijnen een band in de buurt van de 22kD te zien. Of dit daadwerkelijk EQ is kan niet definitief vastgesteld worden. De Lake Carey niet-GM controle gaf ook een band bij 22kD te zien. Dit kan gebeuren natuurlijk, maar dit is dan niet EQ. Echter, ook de GM lijnen zouden dan die band bij 22 kD moeten vertonen, ook al zou dat dan ook niet EQ hoeven zijn. De GM Lake Carey's gaven echter daar geen band te zien. Concluderend blijkt de gelelectroforesemethode op deze manier niet betrouwbaar en kon zo geen bewijs geleverd worden voor de aanwezigheid van EQ in GM lelieweefsels. Geen biochemische bevestiging derhalve van de aanwezigheid van de stoffen die voor afweer moeten zorgen, linalool en equistatine.

## 5.3 Insectenresistentie

In totaal zijn 183 planten getoetst, eerst met twee kooitjes met 5 luizen per plant (geen-keuze toets), en daarna elk in één cilinder of hoes met 15 luizen per plant (populatie-ontwikkelingstoets). Het scoren hield in het tellen van nog levende adulte katoenluizen, van huidjes en van geproduceerde nymfen. Dit houdt in dat er vier waarnemingen van de klemkooitjes zijn verkregen en twee van de cilinders. In het geval van de geen-keuze toets worden de luizen gedwongen in de kooitjes op het blad te blijven. Nodig is dan wel dat de kooitjes goed afsluiten en dat was bij sommige lijnen door hun smalle bladeren of de geprononceerde nerven moeizaam. Soms werden er geen luizen, huidjes of nymfen aangetroffen en konden die niet als waarneming gescoord worden. Van de cilindertoetsen, waar de luizen meer bewegingsvrijheid hebben, zijn maar twee waarnemingen per plant gedaan. De aantallen waarnemingen per lijn waren dus laag en er was zeker sprake van variatie tussen die waarnemingen. In de statistische verwerking van de data is hiermee zoveel mogelijk rekening gehouden en er zijn wel degelijk significante verschillen gevonden het vermogen van katoenluizen om zich te voeden, te ontwikkelen en te reproducieren tussen de niet-GM controles, tussen de niet-GM controle en GM lijnen en tussen GM lijnen onderling, wellicht het best aan te duiden als vatbaar en minder gevoelig. De Robina niet-GM controle bleek zelf al significant minder gevoelig, net als twee GM lijnen. Onduidelijk is waarom andere GM lijnen vatbaarder bleken dan de niet-GM controle. Of de spreiding was te groot en het aantal waarnemingen te gering voor een betrouwbaarder resultaat of het ingebrachte DNA is terechtgekomen op een plek (in een gen) die betrokken is bij de 'resistentie' van de controle en heeft die uitgeschakeld. Bij White Express, Lake Carey en Cherbourg waren de GM lijnen significant minder gevoelig dan de niet-GM controles, ook al was daar sprake van spreiding in de resultaten. Verschillende sets van criteria kunnen gekozen worden en afhankelijk daarvan schommelt het aantal als 'resistent' aan te merken GM lijnen rond de twintig van de 69. Op zich geen slecht resultaat, maar de ultieme test en validatie zou moeten komen van een meerjarige veldtoets, waarbij gekeken wordt naar het voorkomen van diverse luizensoorten en de mate van overdracht van virusinfecties.

## 5.4 Merker-vrij maken

Het idee was om de geproduceerde GM lelielijnen waarbij een mate van resistentie tegen luizen was vastgesteld te kunnen ontdoen van de bij de transformatie voor selectie gebruikte antibioticum-resistentie genen. Dit in verband met eventuele commercialisatie in een latere fase van of de lijnen zelf of van kruisingsproducten. De EU-regelgeving voor veldproeven met GM planten en vooral voor vermarkting vereist de afwezigheid van genoemde antibioticum-resistentie genen. Eerder was gevonden dat het door PRI Wageningen ontwikkelde systeem waarbij een behandeling met dexamethason een recombinatiesysteem in werking stelt dat ongewenste DNA sequenties verwijdert, in lelie werkzaam kan zijn. Bij 6 GM lijnen met resistentie is dit systeem toegepast op het niveau van bolschubjes van de gevormde plantjes met bolletjes. Het merker-vrije karakter zou moeten blijken uit de groeipatronen op media met diverse selectiemiddelen na al of niet een Dex behandeling gegeven te hebben. Selectie/groei op hygromycine moet aangeven of het hygromycine resistentiegen nog aanwezig is. Bij succesvolle excisie (verwijdering = merker-vrij) zou groei op hygromycine onmogelijk of sterk verminderd moeten zijn. Selectie op 5-fluorocytosine (FC) moet hetzelfde aantonen, alleen hier is groei onverminderd goed bij succesvolle excisie en juist slecht of onmogelijk indien de excisie niet heeft plaatsgevonden. Dit systeem werkt bij aardappel, aardbei, appel en crambe maar met wisselende efficiënties. Wel zijn bij die gewassen uiteindelijk altijd merker-vrije GM plantjes verkregen. Diverse controles zijn uitgevoerd om de groei van niet-GM lijnen te monitoren op hygromycine, FC en het toxische FU zowel op callus- als op schubniveau. De groei van niet met Dex behandelde GM lijnen op die media geldt als controle voor die GM lijnen. De hygromycine werkt prima op callusniveau, maar toch minder op schubniveau. Daar moet langer of bij een hogere concentratie gekweekt worden. Aangezien het GM materiaal schubmateriaal betrof is de beoordeling van groei op hygromycine moeizaam. Uiteindelijk bleken de niet-GM controles van Lake Carey en Cherbourg op 15 mg/l hygromycine in die 8 weken even goed te overleven en groeien nog als de GM lijnen; de White Express niet-GM controle groeide wel minder. Qua groei op hygromycine met of zonder Dex behandeling gaf alleen White Express GM lijn 78 een indicatie dat die merker-vrij zou kunnen zijn. Bevestiging van het merker-vrije karakter had moeten komen van groei (of juist niet!) op medium met FC. Wij vonden goede groei en zelfs een stimulering van de regeneratie op medium met 500 mg/l FC. Zoals gezegd kan groei betekenen dat de lijnen NIET merker-vrij zijn; voor de stimulering van de groei hebben we geen verklaring. Wel vonden we in de controles, zowel bij callus als bij schubben, dat 100 en 200 mg/l FU (= toxisch) bij lelie niet toxisch zijn; overzetten naar een volgende periode van 4 weken op medium

met 500 mg/l FU resulteerde in afsterven bij de schubben. De calli overleefden ook dit. Het kan zijn dat licht een rol speelt, daar de schubben in het licht stonden en de calli in het donker. Deze resultaten suggereren dat 500 mg/l FC mogelijk een te lage concentratie is voor lelie, omdat pas de volledige omzetting van alle FC in FU tot celdood in schubben zal leiden. Volledige omzetting is onwaarschijnlijk. Deze proeven leren ons dat in lelie selectie op transformatie door hygromycine op callus zoals door ons gebruikt een prima instrument is, dat over de effectiviteit van de Dex behandeling op schubben niets te zeggen valt omdat zowel de groei op hygromycine in dit weefsel minder onderscheidend is als de groei op FC door de grote tolerantie van lelie tegen relatief hoge FU concentraties. Mogelijk is een eerder stadium in het totale transformatieproces waarbij nog sprake is van callus een beter stadium om de kandidaatweefsels aan een Dex behandeling bloot te stellen, waarna hogere concentraties van FC gebruikt moeten worden. Eerdere testen gaven ook van concentraties tot 1000 mg/l FC geen negatief effect te zien. Kortom, eerst merker-vrij maken en dan bepalen of er sprake is van resistentie.

## 5.5 Conclusies

- Er zijn transgene lelies gemaakt.
- Hygromycine is een effectief selectiemiddel op callusniveau in transformaties.
- De aanwezigheid in de GM lieweefsels van de stoffen die of als repellent (afschrikker) of als insectendodend moesten fungeren, kon biochemisch niet aangetoond worden.
- Er zijn GM lelielijnen geïdentificeerd die significant minder gevoelig bleken voor de katoenluis dan de niet-GM controles.
- Het merker-vrij maken van lelie in het schubstadium is moeilijk of in ieder geval moeilijk aan te tonen.