Mentor note: Hierna volgt het verslag van GP cel en gen van Shauni en Jeroen (2013-2014). Ik moest hierbij even doorgeven dat er veel schrijf –en taalfouten te vinden zijn, maar dat de prof de inhoud wel echt goed vond. Ook het maken van een inhoudsopgave was een grote plus.

-Sofie

**Jeroen Crobeck**

**Shauni Loopmans**

**3de Bachelor Bio-ingenieurswetenschappen**

**Afstudeerrichting Cel- en Genbiotechnologie**

**PRACTICUMVERSLAG GEÏNTEGREERD PRACTICUM CEL- EN GENBIOTECHNOLOGIE PARTIM PLANTKUNDE**

**Prof. Dr. Ir. Johan Gielis Ashka Jhaveri Universiteit Antwerpen Academiejaar 2013-2014**

**Inhoudsopgave**

1. Experiment I: Fytohormoonbepaling………………………………………………………..2

1.1. Doel………………………………………………………………………………..2

1.2. Materiaal & methoden…………………………………………………………….2

1.2.1. Hormoonisolatie…………………………………………………………2

1.2.2. Analyseren fytohormonen via UPLC-MS/MS…………………………..2

1.3. Resultaten………………………………………………………………………….2

1.4. Bespreking…………………………………………………………………………4

1.4.1. Cytokinineproductie onder invloed van acetosyringone………………...4

1.4.2. Vergelijking UPLC/HPLC………………..……………………………..4

1.4.3. Alternatieve techniek voor kwantificatie/identificatie van fytohormonen…………………………………………………………………...4

2. Experiment II: In vitro cultuur……………………………………………………………....5

2.1. Doel………………………………………………………………………………..5

2.2. Materiaal & methoden…………………………………………………………….5

2.3. Resultaten………………………………………………………………………….5

2.4. Bespreking………………………………………………………………………....5

2.4.1. Hormoonconcentratie plantregeneratie…………………………...…......6

2.4.2. Molaire/equivalente waarden cultuurmedia……………………………..6

3. Algemene opdracht: rijstproductie…………………………….…………………………….7

4. Groepsopdracht: monocot transformatie…………………….………………………………8

5. Referenties ………………………………………………………………………………..11

**1. Experiment I: Fytohormoonbepaling**

**1.1 Doel**

In dit practicum bepalen we de hoeveelheid cytokininen en auxinen in *Agrobacterium tumefaciens*

culturen, in aan- en afwezigheid van acetosyringone.

**1.2 Materiaal en methoden**

**1.2.1 Hormoonisolatie**

Het zuiveren van IAA en cytokininen wordt gerealiseerd via SPE (Solid Phase Extraction). De cartridge die gebruikt wordt voor dit proces is de RP-C18 cartridge.

Voor de hormoonisolatie werden twee stalen gebruikt: een controlestaal en een geïnduceerde staal, waaraan acetosyringone werd toegevoegd.

Het volledige SPE proces, bestaande uit conditionering van de kolom, adsorptie, wassen en elutie, wordt beschreven in de practicumnota’s.

Hierna worden de stalen aan de hand van stikstof ingedroogd en voorbereid op de chromatografische

scheiding.

**1.2.2 Analyseren fytohormonen via UPLC-MS/MS**

Voor het analyseren van de fytohormonen, cytokininen en auxinen, wordt tegenwoordig gebruik gemaakt van fysicochemische analystechnieken. In dit practicum wordt de fytohormoonbepaling uitgevoerd met behulp van UPLC-MS/MS (Ultra performance liquid chromatography - massaspectrometrie).

Het protocol voor het voorbereiden van de stalen bekomen uit de hormoonisolatie en een uitgebreide beschrijving van UPLC-MS/MS staan beschreven in de practicumnota’s.

**1.3 Resultaten**

Aan beide stalen die onderzocht worden via UPLC, wordt een gekende hoeveelheid DCK toegevoegd. Dit is de interne standaard. In het staal is ook een onbekende hoeveelheid CK aanwezig. Wanneer er handelingen uitgevoerd worden op het staal, zal er een rendementsverlies optreden van de aanwezige cytokininen. Aangezien de DCK chemisch identiek is aan de aanwezige CK, zal het rendementsverlies voor beiden even groot zijn. De onderlinge verhouding tussen DCK en CK blijft dus constant. Doordat de respons op MS recht evenredig is met de hoeveelheid DCK of CK, kan verondersteld worden dat de verhouding van de respons bekomen voor CK en DCK gelijk moet zijn aan de verhouding van de respectievelijke concentraties. De onbekende hoeveelheid CK kan berekend worden via volgende formule:

ு௢௘௩௘௘௟௛௘௜ௗ ஼௄

ு௢௘௩௘௘௟௛௘௜ௗ ௗେ୏

= ூ௡௧௘௚௥௔௧௜௘௪௔௔௥ௗ௘ ஼௄

ூ௡௧௘௚௥௔௧௜௘௪௔௔௥ௗ௘ ௗ஼௄

*=> Hoeveelheid CK =*

ூ௡௧௘௚௥௔௧௜௘௪௔௔௥ௗ௘ ஼௄

ூ௡௧௘௚௥௔௧௜௘௪௔௔௥ௗ௘ ௗ஼௄

\**hoeveelheid DCK*

Dus de hoeveelheid hormonen wordt berekend door de hoeveelheid IS (Internal Standard) te vermenigvuldigen met de verhouding van de piekoppervlakken hormoon – IS. Om de juiste concentratie te berekenen, moet wel nog rekening gehouden worden met het initieel volume (5 mL) van het geëxtraheerde staal.

Er werden vier interne standaarden waargenomen in alle stalen nl. d-DHZR, d-DHZ, d-IPA en d-IP. Naast deze interne standaarden, waren er nog zeven andere cytokininen aanwezig: DHZR, trans-ZR, DHZ, trans-Z, cis-Z, IPA en IP. De cytokininen die niet werden teruggevonden zijn: cis-ZR, d-ZNG, DH-ZNG, ZNG, d-IP-G en IP-G. De methylthiosulfaten werden genegeerd en als vals positief beschouwd.

Hieronder volgt een overzicht van deze cytokininen en hun concentratie met standaarddeviatie. Voor een volledig overzicht en de berekeningen wordt verwezen naar het Excel-bestand ‘GP partim

plantkunde SJ’ onder de sheet ‘CK’.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **CK’s** | **Controle (pm)** | **Geïnduceerd (pm)** |
| DHZR | NIET AANWEZIG | (16 ± 6) 10 |
| Trans-ZR | (5 ± 2) 10 | (13 ± 1) 103 |
| DHZ | (9 ± 3) 10 | (138 ± 5) 102 |
| trans-Z | (14 ± 2) 103 | (63 ± 2) 104 |
| cis-Z | (14 ± 2) 103 | (64 ± 2) 104 |
| IPA | NIET AANWEZIG | (75 ± 4) 10 |
| IP | (100 ± 9) 102 | (12 ± 1) 104 |

*Tabel 1: Gemiddelde concentraties voor experimentele en controlecondities*

Deze data staat hieronder nogmaals weergegeven in een staafdiagram. Voor een vergemakkelijking van de visualisatie, werd een logaritmische schaal gebruikt. De afwezige cytokininen werden

weggelaten.

1000000

100000

**Concentratie (pm)**

10000

1000

100

10

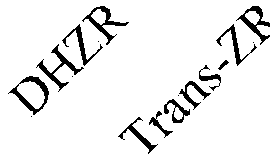
1

**Cytokinine concentraties**

Control

Induced

**Cytokinine**



*Grafiek 1: Overzicht cytokinineconcentraties voor controle en induced sample*

Om het extractierendement te bepalen, berekent men de verhouding van de interne standaarden referentiestaal - twee geëxtraheerde stalen. Hieronder volgt de tabel met de verschillende

extractierendementen per IS/per staal.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **CK’S** | **Controle** | **Geïnduceerd** |
| d-DHZR | 0,18 | 0,10 |
| d-DHZ | 0,20 | 0,25 |
| d-IPA | 0,15 | 0,28 |
| d-IP | 0,15 | 0,22 |

*Tabel 2: Extractierendementen*

**1.4 Bespreking**

**1.4.1 Cytokinineproductie onder invloed van acetosyringone**

Acetosyringone is een natuurlijk fenol product dat teruggevonden wordt in planten. Het wordt vrijgegeven als de plant fysiologische veranderingen ondergaat zoals bijvoorbeeld verwonding. In de plantbiotechnologie wordt het veelvuldig gebruikt aangezien het een hogere transformatie efficiëntie toelaat. Een toevoeging van acetosyringone zal de virulente genen van *Agrobacterium tumefaciens* activeren, wat leidt tot een verhoging in de hormoonproductie.

Dit wordt bevestigd wanneer de hormoonconcentraties tussen het controlestaal en het met

acetoysyringone geïnduceerde staal worden vergeleken.

**1.4.2 Vergelijking UPLC/HPLC**

Ultra performance liquid chromatography (UPLC) en High-performance liquid chromatography (HPLC) zijn in feite zeer vergelijkbare technieken. Het zijn beiden methoden die analieten trachten te scheiden door middel van kolomchromatografie. De analieten worden gescheiden op basis van hun polariteit en interacties met de mobiele(vloeibare) fase of stationaire fase. Achter de kolom worden de analieten gedetecteerd met massaspectrometrie (MS). Deze geeft een piek wanneer het analiet uit de kolom komt. De oppervlakte van de piek staat evenredig met de hoeveelheid ingespoten analiet. Door gebruik te maken van een inwendige standaard, waarvan men de ingespoten hoeveelheid kent, kan men berekenen hoeveel analiet aanwezig is in elk mengsel.

Er zijn echter ook een aantal verschillen tussen deze twee technieken. Om te beginnen werkt UPLC

onder een veel hogere druk (± 1000bar) dan HPLC (± 250bar).

De pakking van de UPLC kolom is veel nauwer, waardoor men een grotere dichtheid creëert. Hierdoor worden de analieten veel beter gescheiden. Het nadeel hiervan is dat door de grotere dichtheid, de retentietijden kunnen oplopen, maar dit probleem wordt opgelost door met grotere druk te werken.

De pieken zijn ook scherper en hoger, waardoor ze beter herkenbaar zijn. Bij HPLC worden soms te kleine pieken aanzien als ruis, terwijl deze bij UPLC wel duidelijk gedetecteerd worden.

**1.4.3 Alternatieve techniek voor kwantificatie/identificatie van fytohormonen**

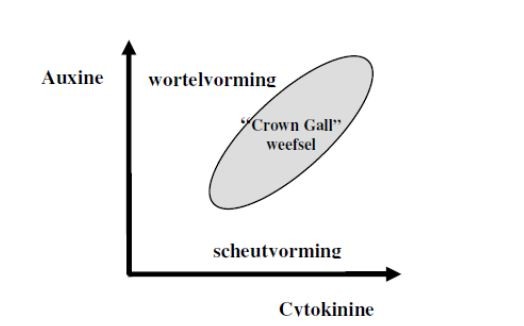
Een alternatieve wijze waarop fytohormonen onderzocht kunnen worden, is via immunoassays. Hierbij wordt gebruik gemaakt van antilichamen om de concentratie van macromoleculen te bepalen. De meest gebruikte voor het onderzoeken van fytohormonen zijn enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) en radioimmunoassays.

Het principe van immunoassays berust op het feit dat de antilichamen in een complex mengsel van

macromoleculen op specifieke macromoleculen kunnen binden, in dit geval cytokininen. Vervolgens kan het aantal gebonden antilichamen gemeten worden, wat evenredig staat met de concentratie van het macromolecule in kwestie.

Het meten van de hoeveelheid antilichamen kan op verschillende uiteenlopende manieren gebeuren vb. fluorescentie of emitteren van straling.

**2. Experiment II: In vitro cultuur**



**2.1. Doel**

Het doel van dit practicum is het analyseren van callusgroei uit bladweefsel van *Hydrangaea* en de invloed van verschillende concentraties cytokininen en auxinen op de ontwikkeling van calli.

**2.2. Materiaal en methoden**

Voor het opkweken van calli wordt er gebruik gemaakt van hormoonvrij MS-medium aangereikt met verschillende concentraties NAA (als auxine) en BAP (als cytokinine).

Het volledige experiment inclusief het aanmaken van het MS-medium staan volledig beschreven in de

practicumnota’s.

Er worden tien verschillende NAA-BAP concentratiecombinaties verwerkt in de platen. Van elke plaat wordt er vervolgens een dubbel gemaakt, zodat er in totaal twintig platen zijn.

De verscheidene concentratiecombinaties staan hieronder opgelijst:

- 0 mg/l NAA - 0 mg/l BAP

- 0 mg/l NAA - 10 mg/l BAP

- 0,1 mg/l NAA - 0 mg/l BAP

- 0,1 mg/l NAA - 0,1 mg/l BAP

- 0,1 mg/l NAA - 1 mg/l BAP

- 1 mg/l NAA - 0,1 mg/l BAP

- 1 mg/l NAA - 1 mg/l BAP

- 1 mg/l NAA - 10 mg/l BAP

- 10 mg/l NAA - 0 mg/l BAP

- 10 mg/l NAA - 10 mg/l BAP

Er wordt een stockoplossing gemaakt van 20g/L en hieruit wordt een verdunningsreeks gemaakt. Op deze manier kan de juiste concentratie hormonen toegevoegd worden aan het MS-medium voordat de platen gegoten worden.

**2.3. Resultaten**

De resultaten per plaat zijn terug te vinden in het Excel bestand ‘GP partim plantkunde SJ’ onder de sheet ‘Callusweefsel’. Over het algemeen werd er niet echt een significante groei van callusweefsel waargenomen. Het meeste bladweefsel was afgestorven in plaats van verder gegroeid.

**2.4. Bespreking**

In onderstaande figuur wordt de verwachting van callusvorming i.v.m. de verhouding auxine/cytokinine weergegeven**.** Wanneer we deze verwachtingen vergelijken met de resultaten uit het experiment, kunnen we besluiten dat het experiment voornamelijk mislukt is. Dit kan verschillende

oorzaken hebben bv. het niet volledig steriel werken bij het vullen van de petrischalen.

*Grafiek 2: Schematische voorstelling van auxine/cytokinine verhouding*

**2.4.1. Hormoonconcentratie plantregeneratie**

In de literatuur worden verschillende experimenten teruggevonden die de invloed van NAA en BAP

op plantregeneratie bestuderen. De resultaten van deze experimenten zijn niet altijd identiek en om een antwoord op deze vraag te formuleren, werd er gebruik gemaakt van het meest recente onderzoek.

Het experiment is uitgevoerd op plantweefsel afkomstig van aubergines. De resultaten toonde dat MS- medium dat 2,0 mg/L BAP en 0,5 mg/L NAA bevat, de beste resultaten gaf voor plantregeneratie.

**2.4.2. Molaire/equivalente waarden cultuurmedia**

Om de molaire waarden te berekenen wordt de concentratie gedeeld door de molaire massa. Om vervolgens de equivalente waarde te bekomen, wordt de molaire waarde vermenigvuldigd met het aantal equivalenten van het molecule. Een overzicht van alle componenten van het medium en de molaire en equivalente waarden zijn terug te vinden in het Excel bestand ‘GP partim planten SJ’ onder de sheet ‘Cultuurmedia’. Hieronder volgt de tabel met de molaire en equivalente waarden voor het

MS-medium.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Componenten MS medium** | **Molaire waarden**  **(mmol/L)** | **Equivalente waarden**  **(mEq/L)** |
| KNO3 | 18,8 | 18,8 |
| NaNO3 | - | - |
| NH4NO3 | 20,6 | 20,6 |
| Ca(NO3)2.4H2O | - | - |
| CaCl2.2H2O | 3,0 | 6,0 |
| MgSO4.7H2O | 1,5 | 3,0 |
| K2SO4 | - | - |
| KCl | - | - |
| KH2PO4 | 1,2 | 3,7 |
| MnSO4.4H2O | 100,0 | 199,9 |
| MnCl2.2H2O | - | - |
| ZnSO4.7H2O | 29,9 | 58,8 |
| H3BO3 | 100,0 | 300,0 |
| KI | 5,0 | 5,0 |
| CuSO4.5H2O | 0,1 | 0,2 |
| Na2MoO4.2H2O | 1,0 | 4,1 |
| CoCl2.6H2O | 0,1 | 0,2 |

*Tabel 3: Overzicht ionen MS-medium*

**3. Algemene opdracht: rijstproductie**

Hoewel het hier een opdracht voor geïntegreegd practicum: cel- en genbiotechnologie betreft, ligt de oplossing voor deze productieverhoging niet per definitie in genetische manipulatie van rijst. Dat spreekt niet tegen dat genetische modificatie van rijstgewassen zeer nuttig kan zijn om bepaalde problemen aan te pakken. Zo kan bijvoorbeeld het creëren van insecten-resistentie in rijstsoorten enorm belangrijk zijn om het verlies in productie ten gevolge van bepaalde insectenplagen te reduceren en zorgt het ontwikkelen van herbicidetolerante gewassen voor lagere teeltkosten, een meer eenvoudige opvolging van de teelt en als dusdanig ook voor een hogere productie.

Het kan echter nog een stuk eenvoudiger en milieuvriendelijker. Rijsttelers over de hele wereld

kunnen door het opvolgen van een aantal eenvoudige regels, zonder moderne technieken, de opbrengst van rijst enorm verhogen en dit op een milieuvriendelijke manier, met minder waterverbruik en bijna geen investeringskosten. Het geheel van die eenvoudige regels wordt opgenomen onder de naam ‘The System of Rice Intensification’ oftewel SRI en werden reeds ontwikkeld in de jaren ’80 door de

Franse priester Henri de Laulanié. Zonder in detail te treden, zorgt het toepassen van deze regels voor een verbeterd management van bodem, water en nutriënten en steunen ze op de volgende pijlers: i) het vroegtijdig, snel en met zorg planten van de rijst om de ‘transplantatieschok’ te minimaliseren ii) verminderde plantendensiteit om competitie te vermijden en optimale groei van individuele planten mogelijk te maken iii) verbeterde bodemcondities door toevoegen van organische materie iv) verminderd en meer gecontroleerd waterverbruik en v) onkruid reeds vanaf de beginfase in bedwang houden.

Door het gebruik van de SRI methodologie wordt een meer optimaal groeimilieu gecreëerd waarin niet alleen rijst maar alle planten, hybride of niet, hun genetische potentieel sterker tot uitdrukking kunnen brengen. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat sommige planten het beter doen dan andere. Zo worden de opbrengsten bij rijst met 20-50% of meer verhoogd terwijl de inputs juist worden gereduceerd. Er wordt namelijk tot 90% minder zaad gebruikt, 30 tot 50% minder water en men heeft

20-100% minder chemische bemesting nodig. De SRI-rijst heeft daarbovenop ook minder nood aan pesticiden omdat het systeem leidt tot meer weerbare en gezonde planten. Het succes van het systeem is al in verschillende landen aangetoond, maar om ervoor te zorgen dat we de komende decennia het steeds groeiende aantal monden kunnen blijven voeden en het waterverbruik kunnen beperken, zal het vooral noodzakelijk zijn dat alle rijsttelers over heel de wereld deze eenvoudige regels gaan toepassen. Men kan zich afvragen of dat wel realistisch is, maar laat nu net de mogelijkheid tot globalisering misschien wel de grootste sterkte van het SRI-systeem zijn. Met kleine aanpassingen kan het namelijk zowat overal ter wereld en door iedereen -arm of rijk- worden toegepast. De oplossing die wij voorstellen ligt dus niet zozeer in het ontwikkelen van verbeterde rijstsoorten of nieuwe landbouwsystemen maar wel in een verbeterde communicatie over de SRI methodologie tussen

landen, regio’s, dorpen en uiteindelijk boeren zodat deze eenvoudige regels overal kunnen leiden tot een verhoogde productie. Op de eerste plaats moet deze informatie dus gratis en voor iedereen beschikbaar worden en moeten universiteiten, onderzoeksinstellingen, NGO’s, overheden, de private sector en ook de boeren zelf allen hun steentje bijdragen aan de verspreiding ervan. We besluiten met te vermelden dat deze oplossing eventueel andere oplossingen niet uitsluit en misschien nog hogere

opbrengsten kunnen gerealiseerd worden wanneer het SRI-systeem wordt gecombineerd met genetisch

gemodificeerde rijstgewassen die meer droogteresistent zijn.

**4. Groepsopdracht: monocot transformatie**

*Dendrocalamus hamiltonii* is een commercieel belangrijke bamboesoort. Deze bamboe, die een belangrijke component vormt van tropische en gematigde bossen, heeft namelijk het vermogen omgehakte en afvallige gebieden weer van een groene jas te voorzien en zo het huidige steeds dalende bosareaal terug te vergroten. *D. hamiltonii* heeft echter, net zoals soortgelijke planten, weinig

tolerantie tegen lage temperaturen. Droogte-tolerantie verkrijgen in deze bamboe door genetische

modificatie, zou het planten van deze soort in omgehakte gebieden van minder natte streken mogelijk maken. Ook is deze bamboe belangrijk voor bijvoorbeeld de pulp en vezelindustrie, die dan gebaat zou kunnen zijn met genetisch gemodificeerde soorten die een hogere cellulose en lagere lignine inhoud hebben. Kortom, de mogelijkheid tot genetische modificatie van deze bamboes heeft zeker en vast economische waarde.

Genetische modificatie gebeurt tot op vandaag voornamelijk met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*. Men gebruikt het vermogen van deze phytobacteriële pathogeen om plantencellen te infecteren en eigen genen in het gastheer DNA in te bouwen en tot expressie te brengen. Dat werkt zeer goed voor de transformatie van de meeste dicotylen, maar de genetische modificatie van eenzaadlobbigen waaronder *Dendrocalamus hamiltonii* is echter heel wat moeilijker. Monocotylen zijn namelijk niet de natuurlijke gastheren van *A.tumefaciens* en uit studies blijkt dan ook dat eenzaadlobbigen en in het bijzonder *D.hamiltonii* vrij resistent zijn tegen infectie van *A.tumefaciens* zodat de pathogeen de gewenste genen niet in deze bamboes tot expressie kan brengen. Er zijn drie voorname redenen voor de agrobacterium-resistentie van *D.hamiltonii*. Ten eerste induceert infectie van *Agrobacterium* de productie van een heleboel giftige polyfenolen en verwante oxidatieproducten

in de plant. Deze interfereren met de fysiologie en biochemie van de bacterie zodat necrose optreedt en infectie onmogelijk wordt. Ten tweede zal infectie bij sommige monocoten lignificatie en sclerificatie van het wondweefsel induceren waardoor de celdeling en differentiatie van genetisch

getransformeerde weefsels wordt gereduceerd. Als laatste wordt de infectie door *Agrobacterium* verhinderd door het gladde wasachtige oppervlak dat enerzijds aanhechting bemoeilijkt en anderzijds anti-microbiële eigenschappen bezit.

Om er toch voor te zorgen dat we met *Agrobacterium* de gewenste genen kunnen implementeren in het genoom van onze eenzaadlobbige bamboe moeten we een protocol ontwerpen waarmee de drie hierboven beschreven afweersystemen omzeild of tenminste in kracht gereduceerd kunnen worden.

Een dergelijk protocol werd recent beschreven door *Sood et al.* ( 2013).

De procedure gaat als volgt: eerst worden somatische embryo’s van *hamiltonii* opgekweekt via de methode van *Godbole et al*. De *Agrobacterium* streng GV2260, die een npt2 selectiegen in zijn plasmide bevat, wordt in het donker opgekweekt als een ‘ shake culture’ (180rpm) in Yeast Mannitol Broth op 28 °C tot een optische densiteit van A600=0.6. rifampicin(25μg/ml), carbenicillin(100 μg/ml) en kanamycin(50 μg/ml) worden gebruikt voor de selectie. De bacteriële cellen worden gecentrifugeerd op 6000rpm gedurende 20 min en heropgelost in basaal MS medium. Deze suspensie

,aangepast tot een celdensiteit van 109 cellen/ml, wordt gebruikt als inoculum. Intacte embryo’s

worden dan gedurende 15 minuten ondergedompeld in 10ml van het bacteriële inoculum met een druppel 0,01% Tween-20 en 500 mg/l PVP. Het overschot aan bacteriën op het oppervlak van de embryo’s wordt er eerst zorgvuldig afgespoeld en dan worden ze in co-cultivatie gebracht op MS- medium met de vir gene inducer acetosyringone(100μM) en 1mg/l BAP gedurende twee dagen.

Om de necrose veroorzaakt door de geoxideerde polyfenolen te counteren, heeft men een stof nodig die deze giftige oxidatieproducten adsorbeert. Hoewel ook het toevoegen van actieve kool resulteerde in het reduceren van agro-geïnduceerde necrose, bleek PVP oftewel polyvinylpyrrolidine nog vele malen effectiever. Het toevoegen van 500 mg/l PVP zorgde ervoor dat er nog nauwelijks necrose optrad. Door het toevoegen van de oppervlakte-actieve stof Tween-20 (0.01%) werd de wasachtige laag van de somatische embryo’s verwijderd met als resultaat dat *Agrobacterium* zich veel beter aan de plant kan hechten en vervolgens infecteren. In het vooropgestelde protocol wordt de infectie

bewerkstelligd door simpele immersie van de somatische embryo’s in het bacteriële inoculum. Uit een

vergelijkende studie tussen drie infectie methoden: immersie, vacuüm infiltratie of verwonding bleek immersie van de embryo’s in de bacteriële oplossing namelijk de minst schadelijke en meest infectie- ondersteunende methode. Aan het medium voor co-cultivatie worden acetosyringone(AS) en BAP toegevoegd. Acetosyringone is een stof die wordt uitgescheiden door verwonde planten en in dit geval wordt toegevoegd om de transformatie efficiëntie te vergroten. BAP is een cytokinine. Cytokininen spelen een dubbele rol in planten: ze promoten enerzijds actieve celdeling en verhinderen anderzijds senescentie en necrose. Het co-cultivatie medium wordt hier verrijkt met BAP om snelle proliferatie

en differentiatie van de tranformanten tot planten te bewerkstelligen. De co-cultivatie duurt maximaal

twee dagen aangezien de blijvende aanwezigheid van *A.tumefaciens* langer dan twee dagen leidt tot sterfte van de embryo’s.

Er werd reeds beschreven hoe de transformatie van *D. hamiltonii* in zijn werk kan gaan m.a.w. hoe we een vreemd gen kunnen incorporeren. Om *D.hamiltonii* meer droogte-resistent te maken, zullen we in zijn genoom ‘droogte-resistente’ genen moeten wijzigen of inbrengen. Met droogte-resistente genen bedoelen we hier dan alle genen die een invloed kunnen hebben op hoe de plant met water omgaat.

Dat zijn dus bijvoorbeeld genen die een rol spelen in de efficiëntie van de wateropname van het

wortelstelsel. Zo is er een gen bekend bij tarwe, het zogenaamde TaSIP gen dat wordt geactiveerd bij droogte en onder andere resulteert in een grotere wortelgroei voor een betere opname van water. Dit gen inbouwen of een eventueel bestaand homoloog gen in *D.hamiltonii* tot overexpressie brengen door meerdere kopieën in te bouwen, kan uiteindelijk leiden tot meer droogte resistentie in bamboes zoals *D.hamiltonii*.

Vroeger werden planten van nieuwe eigenschappen voorzien simpelweg door natuurlijke allelische variatie of door random geïnduceerde variatie met behulp van irradiatie of chemische mutagenese. Vandaag zijn er heel wat technieken beschikbaar die toelaten om het DNA veel gerichter te modificeren door middel van zogenaamde ‘site-directed nucleases.’ Deze nucleasen worden zo ontworpen dat ze een dubbelstrengige knip (DSB) initiëren op een specifieke locatie in het genoom om er zo voor te zorgen dat een random of meer specifieke modificatie kan optreden in de buurt van

de breuk. Deze technieken steunen op het inherente vermogen van cellen om dergelijke breuken in het

DNA te repareren. Dat kunnen cellen doen op twee manieren. Enerzijds via de zogenaamde ‘non homologous end joining pathway’ (NHEJ). Dit reparatieproces resulteert vaak in kleine niet specifieke DNA inserties of deleties in de breuk site die op hun beurt aanleiding geven tot frame shift mutaties en zo een niet-functionele knock-out creëren. Anderzijds kunnen cellen DNA schade herstellen via de homologous repair pathway (HR), waarbij op de breukplaats een homologe DNA donor template

wordt ingebracht. Dit tweede mechanisme is hier interessanter dan het eerste aangezien specifiek op een niet-random manier de sequentie van een gen en zo het genoom gewijzigd kan worden in plaats van enkel zijn functie te elimineren.

De sequentie van de donor template moet zo gekozen worden dat, eenmaal deze in *Dendrocalamus* is ingebouwd en tot expressie gebracht, deze zal zorgen voor meer droogte-resistentie. Dat kan bijvoorbeeld zijn door veranderingen in promoter regio’s of modificaties die de katalytische activiteit van een enzym veranderen. Deze strategie is echter complexer, omdat de donor template in de cel moet worden gebracht op het moment dat het nuclease gaat knippen.

Het kritieke element in deze nuclease-gebaseerde genoommodificatietechnieken zijn uiteraard de nucleasen, die zo accuraat mogelijk het DNA moeten knippen. Tot op vandaag zijn er voornamelijk drie types nucleasen in gebruik: zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) en meganucleases. Elk hebben ze hun voor- en nadelen en hoewel we ze allemaal zouden kunnen gebruiken, kiezen we in ons protocol voor de TALENs methode omdat het globaal gezien de meest precieze en efficiënte methode is. TALENs zijn afgeleid van proteïnen, de zogenaamde TALEs ( transciption activator like effectors), afgescheiden door bacteriële plant pathogenen van het genus *Xanthomonas.* Deze TALEs kunnen het transcriptoom van de gastheer wijzigen door transcriptiefactoren na te bootsen en te binden op specifieke sequenties in promotor regio’s. Door het DNA bindingsdomein van deze TALEs te combineren met het katalytische domein van Fok1 endonuclease verkrijgt men de zogenaamde TALENs proteïnen die zeer specifiek een DSB kunnen katalyseren. Deze TALENs hebben als grootste voordeel dat ze gemiddeld om de 10 basenparen het DNA locus kunnen ‘targeten.’ Dat is veel frequenter dan bijvoorbeeld de ZFNs waarvan de targetfrequentie om en bij de 500 basenparen bedraagt. Om het genoom van *D. hamiltonii* te wijzigen zullen we via een-voor monocotylen- aangepast transformatieprotocol (zie hierboven) een construct moeten inbrengen dat codeert voor het gewenste TALE-nuclease gekoppeld met een

promotorsequentie zodat we het nuclease op het gewenste moment tot expressie kunnen brengen. Deze expressie moet gebeuren in aanwezigheid van de gewenste donor template die we ofwel zelf synthetiseren ofwel isoleren uit een andere plant. Het neomycin phosphotransferase (npt2) selectiegen wordt ook in het plasmide ingebouwd zodat de transformanten via een selectiemedium van de niet getransformeerde planten kunnen onderscheiden worden. Als controle volgt tenslotte nog een PCR- analyse of whole genome sequencing van de transformanten om te checken of het fragment effectief in het genoom is ingebracht.

Het protocol dat vooropgesteld wordt om *Dendrocalamus Hamiltonii* droogte-resistent te maken omvat uiteindelijk de volgende stappen:

1. Selecteren van het gen/de genen die je wilt wijzigen of inbrengen(droogte-resistentie)

2. Synthetiseren/isoleren van donor template sequentie

3. Ontwikkelen van een TALEnuclease construct( via bijvoorbeeld de Golden Gate plasmid kit v1)

4. Het construct in de plant brengen door *Agrobacterium* transformatie met gewijzigd protocol voor infectie van eenzaadlobbigen(PVP,tween-20).

5. Nuclease expressie induceren.

6. Selectie v/d transformanten ( via selectiemedium)

7. Controle via PCR of whole genome sequencing technieken.(WGS)

**5. Referenties**

Jhaveri A., Gielis J. (2013). Geïntegreerd practicum cel- en genbiotechologie: Partim plantkunde

Shahla N. Sheikholeslam, D. P. (1987). Acetosyringone promotes high efficiency transformation of

Arabidopsis thaliana explants by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Molecular Biology* ,8(4): 291-298

Valerie C. Pence, John L. Caruso (1987). Immunoassay Methods of Plant Hormone Analysis.

*Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, 240-256

Hassan B. P. Ray L., Nasiruddin K. M. (2011). In vitro regeneratie of Brinjal. *Bangladesh J. Agril*.

397-406

Cornell University (2014). The System of Rice Intensification. *SRI-Rice Online*

Shaun J.Curtin (2012). Genome Engineering of Crops with Designer Nucleases. *The Plant Genome*, 5 (2)

Sood P., Bhattacharya A., Sood A.(2011). Problems and possibilities of monocot transformation.

*Biologia Plantarum,* 55(1):1-15

Sood P. et al. (2014). A method to overcome the waxy surface, cell wall thickening and polyphenol induced necrosis at wound sites – the major deterrents to agrobacterium mediated transformation of bamboo, a woody monocot. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology,* 23(1): 69-80

Hao-Yue Du (2013). Function of the wheat TaSIP gene in enhancing drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, 81:417–429.