

# Project Agroinoculatie

Een samenwerkingsproject tussen IBL-Leiden en PRI-  
Wageningen  
in opdracht van COGEM  
uitgevoerd Februari 2006 tot en met Mei 2007

**Medewerkenden:**

**In Leiden:**

**Dr J.D. Louwerse**

**Mw. H den Dulk-Ras**

**Prof. Dr. P.J.J. Hooykaas\***

**Dr. B.S. de Pater**

**Dr. B.J. van der Zaal**

**In Wageningen:**

**Dr J.M. van der Wolf \*\***

**Dr. H. Jalink**

**Ing. R van der Schoor**

**Mw P van der Zouwen**

Universiteit Leiden, IBL, Wassenaarse weg 64, 2333AL Leiden

\* p.j.j.hooykaas@biology.leidenuniv.nl

Wageningen UR, PRI, Bornsesteeg 65 gebouw 122, 6708PD Wageningen

\*\*jan.vanderwolf@wur.nl

Dit rapport is in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) samengesteld. De meningen die in het rapport worden weergegeven zijn die van de auteurs en weerspiegelen niet noodzakelijkerwijs de mening van de COGEM.



# Inhoudsopgave

<b>1. Introductie</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Vraagstelling en vereisten</b>	<b>5</b>
<b>2. Experimentele proef opzet</b>	<b>7</b>
<b>3. Agrobacterium</b>	<b>9</b>
<b>4. Agroïnoculatie van Arabidopsis</b>	<b>11</b>
<b>5. Detectie van T-DNA insertie door middel van laser technologie</b>	<b>13</b>
<b>6. Detectie van <i>Agrobacterium</i> door middel van laser technologie</b>	<b>15</b>
<b>6.1 Laser analyse van planten na inoculatie</b>	<b>15</b>
<b>6.2 Laser analyse van zaden na inoculatie</b>	<b>15</b>
<b>7. Detectie van <i>Agrobacterium</i> doormiddel van BioPCR</b>	<b>17</b>
<b>8. Uitgebreide analyse van zaden afkomstig van agrogeïnoculeerde planten</b>	<b>19</b>
<b>9. Effect van zaadopslag en antibioticum behandeling op aanwezigheid van <i>Agrobacterium</i> na floral-dip</b>	<b>21</b>
<b>10. Samenvatting</b>	<b>23</b>
<b>11. Aanbevelingen</b>	<b>25</b>
<b>Literatuur Agroïnoculatie Project</b>	<b>26</b>



# 1. Introductie

*Agrobacterium tumefaciens* wordt gebruikt om genetisch materiaal te integreren in het plantengenoom. Plantencellen met een stabiel in het genoom geïntegreerd transfer-DNA of T-DNA kunnen worden geregenereerd tot transgene planten. Bij agroïnoculatie is regeneratie van transgene planten juist niet de bedoeling. De bacterie wordt met een injectie spuit in het blad gespoten waarbij overdracht van T-DNA en expressie kan plaats vinden. Overdracht van T-DNA hoeft niet te leiden tot integratie van het T-DNA in het planten genoom, of blijft beperkt tot integratie in het genoom van de cellen van het geïnjecteerde weefsel. Theoretisch is het mogelijk dat *Agrobacterium* zich verplaatst door de plant en mogelijk elders cellen kan transformeren. Voor biovar 3 van *Agrobacterium* is dat gedocumenteerd. De voor transformatie gebruikte stammen zijn echter van biovar 1.

In de onderzoekspraktijk en de veredelingswereld wordt agroïnoculatie hoofdzakelijk toegepast als een snel instrument om planten te testen op resistenties of toleranties. Met behulp van agroïnoculatie kunnen genen in de plant tot expressie gebracht worden, waarna de reactie van het plantenweefsel op de geproduceerde eiwitten gevolgd kan worden. Planten die de gewenste eigenschap lijken te vertonen zullen vervolgens in het verdere veredelingsproces gebruikt en getest worden.

## 1.1 Vraagstelling en vereisten

De vraagstelling vanuit de COGEM luidt: *Kan aan zaden van planten na agroïnoculatie een ggo vrije status verleend worden?*

De vereisten daarvoor zijn tweeledig, namelijk er mag geen inbouw van T-DNA in kiembaan cellen plaats vinden en er mag geen besmetting van zaad met *Agrobacterium tumefaciens* optreden.

Zaadbesmetting zou theoretisch het gevolg kunnen zijn van de verspreiding van *Agrobacterium* van de inoculatieplaats aan de onderzijde van het blad naar de bloeiwijze, en zou via intercellulaire ruimtes of vaatweefsels op kunnen treden. Een tweede mogelijkheid is externe verspreiding, via bijvoorbeeld sproeiwater, via de bodem, of tijdens de zaad oogst, wanneer geïnoculeerde bladresten de zaden kunnen verontreinigen. Voor deze laatste mogelijkheid zijn fytosanitaire maatregelen te treffen. Dit valt echter buiten deze studie.

Voor integratie van T-DNA is het noodzakelijk dat de virulentiegenen van *Agrobacterium tumefaciens* worden geïnduceerd. Inductie vindt plaats na verwonding van plantencellen, als respons op vrijkomende specifieke plantstoffen. T-DNA overdracht is hoogstwaarschijnlijk ook afhankelijk van de bacteriële concentratie, via quorum sensing.

Om ggo nakomelingen te verkrijgen moet T-DNA integratie in de kiembaan cellen plaats vinden bijvoorbeeld in de eicellen vlak voor de bevruchting (1). Bij sommige *Brassicaceae*, zijn zulke cellen gemakkelijk toegankelijk omdat de bloemen van deze planten een open gynoecium hebben. Wetenschappers maken hier gebruik van om transgene *Arabidopsis* planten te verkrijgen door de bloemen te dippen in een suspensie van *Agrobacterium* en vervolgens de zaden te selecteren door gebruik te

maken van een selecteerbaar marker gen op het T-DNA. Dit is de zo genoemde floral-dip methode. Met de floral dip methode wordt bij de meeste andere gewassen echter geen succes behaald.

## 2. Experimentele proef opzet

In overleg met de COGEM begeleidingscommissie zijn we tot de volgende experimentele proef opzet gekomen. Als modelplant is gekozen voor *Arabidopsis thaliana* of zandraket omdat voor deze plant de floral-dip methode als worst case scenario kan dienen. *Agrobacterium tumefaciens* wordt van een fluorescentie label voorzien, door een marker gen aan te brengen dat tot expressie komt in de bacterie. Het T-DNA van *Agrobacterium* wordt voorzien van een ander fluorescentie label dat alleen tot expressie komt in zaden (2). Met behulp van laser technologie wordt in zaden gezocht naar het specifieke fluorescentie signaal dat duidt op T-DNA integratie. Aanwezigheid van *Agrobacterium tumefaciens* op de zaden wordt aangetoond met behulp van BioPCR, een methode die is ontwikkeld om levende bacteriën aan te tonen. Daarnaast zal ook de laser technologie worden gebruikt om *Agrobacterium* op zaad te detecteren. In een standaard proefopzet wordt een deel van de planten niet behandeld, een deel geïnoculeerd volgens de agroïnoculatie en een deel volgens de floral-dip methode. De floral-dip methode dient om uitgangsmateriaal te genereren voor het opzetten van de assays en ter controle van de gebruikte *Agrobacterium* stammen.





### 3. *Agrobacterium*

In eerste instantie zijn drie *Agrobacterium* stammen getest, te weten LBA1100, LBA4404 en AGL1. Deze stammen bevatten geen T-DNA. Als marker voor T-DNA integratie zijn plasmiden pFluar100 of pFluar101(2) ingebracht. Deze plasmiden bevatten een T-DNA met een GFP of dsRED fluorescent marker gen dat aangestuurd wordt door de sterke zaadspecifieke napin promotor (3). Verlies van deze plasmiden kan optreden en wordt voorkomen door te selecteren op een antibioticum-resistentie marker die op de desbetreffende plasmiden is gelegen. Inbouw van het T-DNA in het plantengenoom zal leiden tot GFP of dsRED expressie in zaden, dat wil zeggen na aanstralen met een specifieke laser zullen groene GFP zaden of rode dsRED zaden zichtbaar zijn in een bepaald emissie spectrum.

Als visuele marker voor *Agrobacterium* zijn dsRED en GFP genen gebruikt die aangestuurd worden door de *lac* promotor van *Escherichia coli* (4). Om hoge expressie in *Agrobacterium* te krijgen zijn deze genen gekloneerd naar vector pME6031 dat een pVS1 replicon bevat, dat zeer stabiel is (5). Per cel kan een hoog aantal kopieën van dit plasmide worden gehandhaafd in *Agrobacterium* en wij vonden dat dit plasmide stabiel te handhaven is in combinatie met de pFluar plasmiden.

De stabiliteit van de bacteriële expressie van dsRED en GFP bleek een probleem te zijn in LBA4404. Hoewel de stam werd gegroeid onder condities die selectief zijn voor het handhaven van het plasmide, werden toch kolonies gevonden zonder dsRED of GFP expressie. LBA4404 is niet meer gebruikt in verdere agroïnoculatie experimenten.

Na inoculatie op de plant valt de selectie voor beide plasmiden weg. Daarom is uitgetest of de stammen de plasmiden zouden verliezen als ze worden opgegroeid onder niet selectieve condities. Na vijf keer doorgroeien op rijk medium werden bacteriën aangetroffen die fluorescentie hadden verloren en de antibioticum resistentie misten die gelegen is op de pFluar plasmiden. Verlies van plasmiden, en daarmee de markers, is tijdens het groeien op de plant daarom niet geheel uit te sluiten. Het is niet bekend hoe frequent plasmide verlies optreedt onder voor de bacterie sub-optimale groei condities.

Uit praktisch oogpunt is gekozen om vervolg proeven uit te voeren met één stam, LBA1100, een C58 nopaline stam met het napin-GFP plasmide pFluar100 en het plasmide met de plac-dsRED bacteriële marker. Deze stam is LBA3576 genoemd en na floral-dip zullen bacteriën dsRED -rood- gemarkeerd zijn en de zaden als gevolg van T-DNA integratie GFP -groen. Dit werd in alle proeven ook waargenomen.

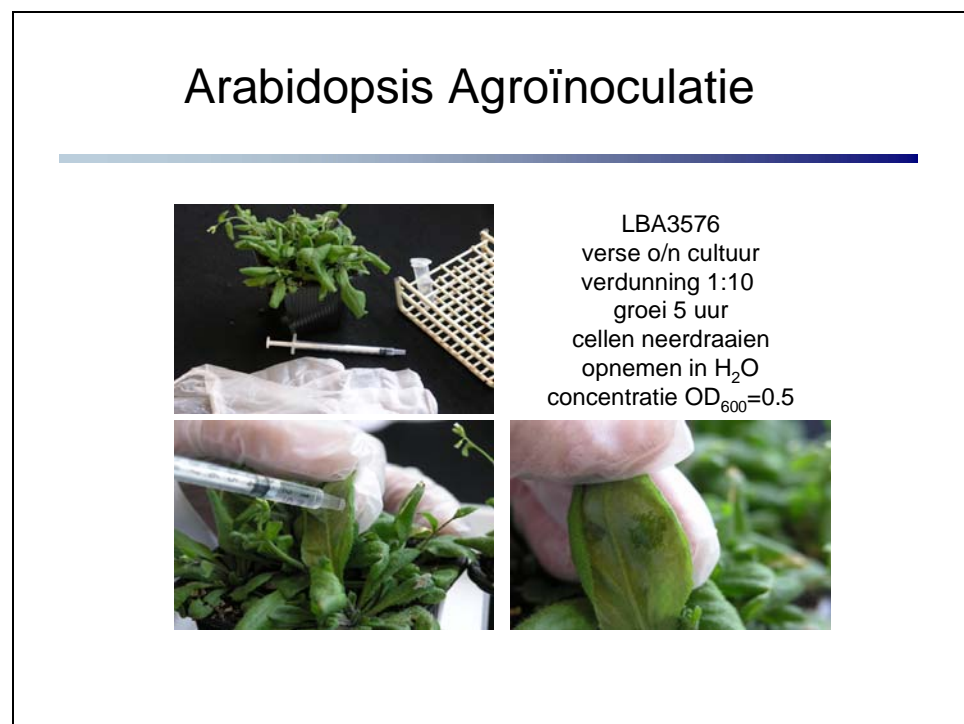


## 4. Agroïnoculatie van Arabidopsis

Agroïnoculatie werd uitgetest op drie Arabidopsis ecotypes Columbia (Col), WS en C24, volgens beschreven protocol (6). Efficiënte agroïnoculatie onder lange dag groei condities werd verkregen met ecotype Columbia. Een protocol werd opgezet waarin een verse overnacht culture wordt doorverdund en voort gegroeid gedurende 5 uur. Cellen worden geogst en als suspensie met een optische dichtheid van 0.5 met een spuitje zonder naald ingespoten in het blad, aan de onderzijde (Figuur 1). De floral-dip wordt met dezelfde bacteriële cultuur volgens protocol (7) uitgevoerd.

Het bleek essentieel te zijn om zaden van floral dip behandelde planten te kunnen onderscheiden van zaden van planten na agroïnoculatie. Daarom hebben we gekozen om de *transparante testa* mutant tt16 (8) te gebruiken voor floral-dip. Zaden van deze mutant hebben een doorzichtige zaadhuid en zijn gemakkelijk te onderscheiden van de donkerbruine zaden van ecotype Columbia, maar geven wel meer achtergrond signaal in de laser detectie. T-DNA integratie via floral-dip verloopt over het algemeen iets minder efficiënt dan met Columbia wildtype.

**Figuur 1. Methode van Agroïnoculatie**



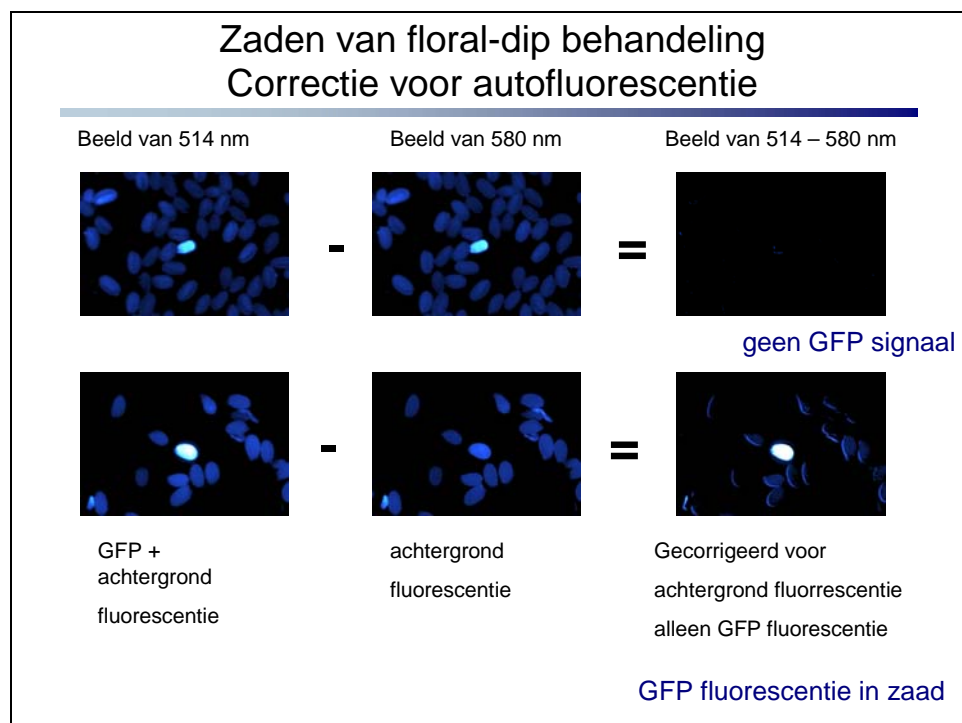


## 5. Detectie van T-DNA insertie door middel van laser technologie

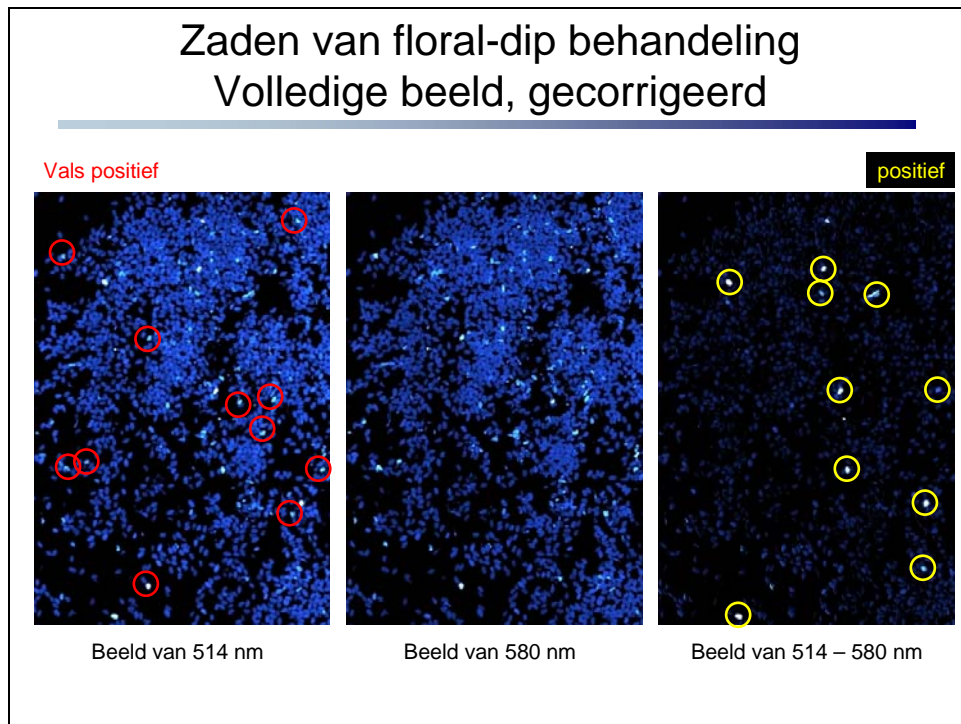
Een blauwe (473 nm) en groene (532 nm) laser worden gebruikt om het plantenmateriaal aan te stralen, respectievelijk de specifieke excitatie van GFP en dsRED. Met optische filters wordt uit het geëmitteerde licht van het plantmateriaal het GFP (514 nm) en dsRED (580 nm) signaal gefilterd en opgenomen met een CCD camera met 4008x2672 pixels. De maximaal haalbare resolutie van de gebruikte opstelling was 10 µm.

Aspecifiek fluorescentie signaal, vermoedelijk van lignine verbindingen in de zaadhuid, bemoeilijkt de detectie van het GFP signaal. Om tot specifieke metingen te komen werd een methode ontwikkeld waarin twee opnames worden gemaakt. De zaden worden aangestraald met blauw laser licht van 473 nm en twee emissie opnames worden gemaakt, de eerste bij 514 nm en tweede bij 580 nm. De tweede meet de emissie buiten de GFP emissie zone en wordt afgetrokken van de eerste zodat specifiek GFP signaal overblijft (Figuur 2). In één meting kunnen 20.000 zaden geanalyseerd worden (Figuur 3).

**Figuur 2. Panel 1 en 2 zijn beide aangestraald met blauw laser licht (473 nm). Panel 1 is een emissie opname bij 514 nm en panel 2 bij 580 nm. Panel 3 is een verschilbeeld van panel 1 en 2, voor de bovenste opname is er geen GFP expressie, de onderste opname geeft een zaad met GFP fluorescentie signaal.**



**Figuur 3. Panel 1 en 2 zijn beide aangestraald met blauw laser licht (473 nm). Panel 1 is een emissie opname bij 514 nm en panel 2 bij 580 nm. In panel 1 zijn de vals positieve rood omcirkeld. Panel 3 is een verschilbeeld van panel 1 en 2 en de zaden die GFP fluorescentie vertonen zijn geel omcirkeld.**



## 6. Detectie van *Agrobacterium* door middel van laser technologie

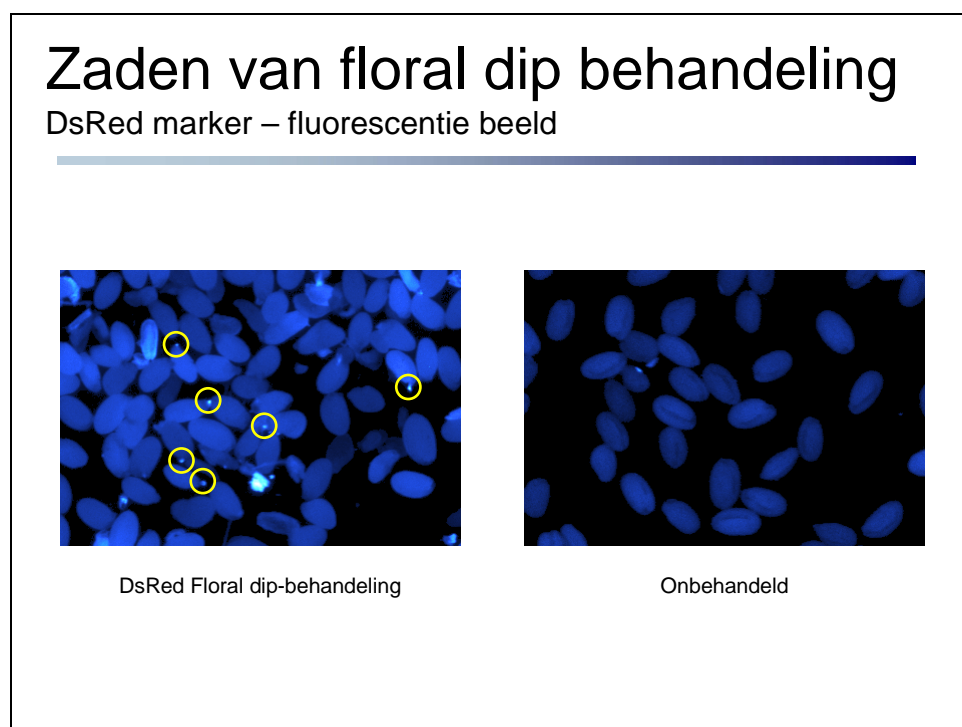
### 6.1 Laser analyse van planten na inoculatie

Enkele dagen na agroïnoculatie werden planten onderzocht op aanwezigheid van *Agrobacterium* door te zoeken naar dsRED signaal. Het dsRED signaal van de bacteriecultures zelf was niet te detecteren en op planten werd geen specifiek signaal gevonden na agroïnoculatie, mede door de verwonding van het blad dat bijdraagt tot verhoging van het achtergrondsignaal. Tien dagen na floral-dip inoculatie werd specifiek dsRED signaal gevonden op bloemstengels en onrijpe zaaddozen. Geconcludeerd werd dat het dsRED signaal niet sterk genoeg is om lage bacterie concentraties van *Agrobacterium* op of in de plant te kunnen detecteren.

### 6.2 Laser analyse van zaden na inoculatie

Een fractie van de zaden van floral-dip behandelde planten vertoonden dsRED signaal dat specifiek gelokaliseerd is op de funiculus van het zaad. De funiculus verbindt de eicel met de placenta in de bloem of vrucht. Dit specifieke signaal werd alleen gevonden in zaden na floral-dip (Figuur 4). Na floral-dip met een *Agrobacterium* stam die wel het napin-GFP T-DNA bevatte, maar niet het lac-dsRED plasmide werd geen dsRED signaal op de funiculus gevonden. Dit geeft aan dat het signaal specifiek is voor de stam met het lac-dsRED plasmide.

**Figuur 4. Twee opnamen van DsRed fluorescentie. De verhoogde intensiteit ter plekke van de funiculus is ten gevolge van lokale DsRed expressie van bacteriën**







## 7. Detectie van *Agrobacterium* doormiddel van BioPCR

BioPCR is ontwikkeld om levende bacteriën te detecteren, door middel van een verrijkingstap voor de bacteriën gevolgd door verdunningsstappen. Het flow schema voor BioPCR is weergegeven in Figuur 5. Door het gebruik van *virD2* primers (9) is deze methode niet specifiek voor LBA3576 maar zal ook LBA1100 zonder pFluar100 of lac-dsRED plasmide aangetoond kunnen worden. Per zaadmonster zijn 3 submonsters getoetst, aan één daarvan werd standaard een bekende hoeveelheid bacteriën toegevoegd om vast te stellen of de verrijkingstap succesvol was. Deze methode is uiterst gevoelig. We vonden dat we in zaadextracten waaraan een bacteriële verdunning is toegevoegd één enkele *Agrobacterium* konden aantonen.

BioPCR en laser technologie zijn vergeleken op geïnoculeerd planten materiaal (Tabel 1). In deze proef werden met laser detectie alleen zaden met specifiek dsRED signaal aangetoond na floral-dip behandeling, niet na agroïnoculatie. Echter met BioPCR werd wel *Agrobacterium* op zaden aangetoond na agroïnoculatie. Wanneer 10 zaden van floral-dip met dsRED signaal werden geselecteerd en met BioPCR geanalyseerd werd soms wel, soms geen BioPCR signaal gevonden. Conclusie is dat BioPCR gevoeliger is dan laser detectie en onafhankelijk van de aanwezigheid van plasmiden, maar dat BioPCR niet altijd betrouwbaar is en soms vals negatieve signalen geeft.

**Tabel 1. Detectie van *Agrobacterium* op zaden; vergelijking laser technologie met Bio-PCR**

Behandeling	Zaden met dsRED signaal op de funiculus	Getest met BioPCR	Uitkomst BioPCR
onbehandeld	-	10 zaden, zonder dsRED	-
Agroïnoculatie A	-	10 zaden, zonder dsRED	+
Agroïnoculatie B	-	10 zaden, zonder dsRED	-
floral dip	+	10 zaden, zonder dsRED	+
floral dip		10 zaden met dsRED signaal	-
floral dip		10 zaden met dsRED signaal	+
floral dip		10 zaden, met dsRED signaal	-



## 8. Uitgebreide analyse van zaden afkomstig van agroëinoculeerde planten

In twee groot opgezette experimenten zijn zaden van agroëinoculeerde planten getest op T-DNA insertie en *Agrobacterium* besmetting. In totaal zijn ruim 170.000 zaden geanalyseerd (Tabel 2 en 3). Van een equivalent zaden zouden in onze proefopzet ruim 100 T-DNA integratie gebeurtenissen met de floral-dip methode te verwachten zijn.

**Tabel 2. Agroëinoculatie experiment 1, 72 planten**

Behandeling	zaden met dsRED signaal (88.000 getest) laser detectie	zaden met GFP signaal (88.000 getest) laser detectie	Aantal zaden getest met Bio-PCR	Resultaat Bio-PCR
Floral dip	8.5 % ( $\pm 2.5$ )	0.06 % ( $\pm 0.03$ )	25.000	+
			1000	+
			100	+
			10	-
			1	-
Agroëinoculatie	0.002% (2 zaden)	0.001 (1 zaad)*	25.000	+
Onbehandeld	0	0	25.000	-

\*Met de laser detectie methode is één zaad gevonden met GFP signaal na agroëinoculatie. Dit zaad is gekiemd en met PCR is aangetoond dat de GFP DNA sequentie niet aanwezig is in het genoom van deze plant. We concluderen hieruit dat de laser techniek, ook als aspecifiek fluorescentie signaal wordt afgetrokken, soms toch vals positief signaal geeft.

**Tabel 3. Agroïnoculatie experiment 2, 72 planten**

Behandeling	zaden met dsRED signaal (88.000 getest) laser detectie	zaden met GFP signaal (88.000 getest) laser detectie	Aantal zaden getest met Bio-PCR	Resultaat Bio-PCR*
Floral dip	2 % ( $\pm$ 0.6)	0.05 % ( $\pm$ 0.01)	25.000	1000 100 10 1
Agroïnoculatie	0.003 % (3 zaden)	0	25.000	
Onbehandeld	0.005 % (4 zaden)	0	25.000	

\* Er zijn problemen met de PCR (aspecifieke reacties). Deze resultaten zullen zo spoedig mogelijk nagezonden worden.

Met de laser technologie zijn in totaal 3 zaden met dsRED fluorescentie op de funiculus gevonden. Maar ook in zaden van onbehandelde planten zijn 4 zaden met dsRED signaal op de funiculus aangetroffen. Het is echter niet uit te sluiten dat een toevallig aspecifiek signaal in het beeld samenvalt met de funiculus en zo een vals positief beeld geeft. Na agroïnoculatie werd dsRED signaal op de funiculus 3000x minder frequent gedetecteerd dan na floral dip behandeling.

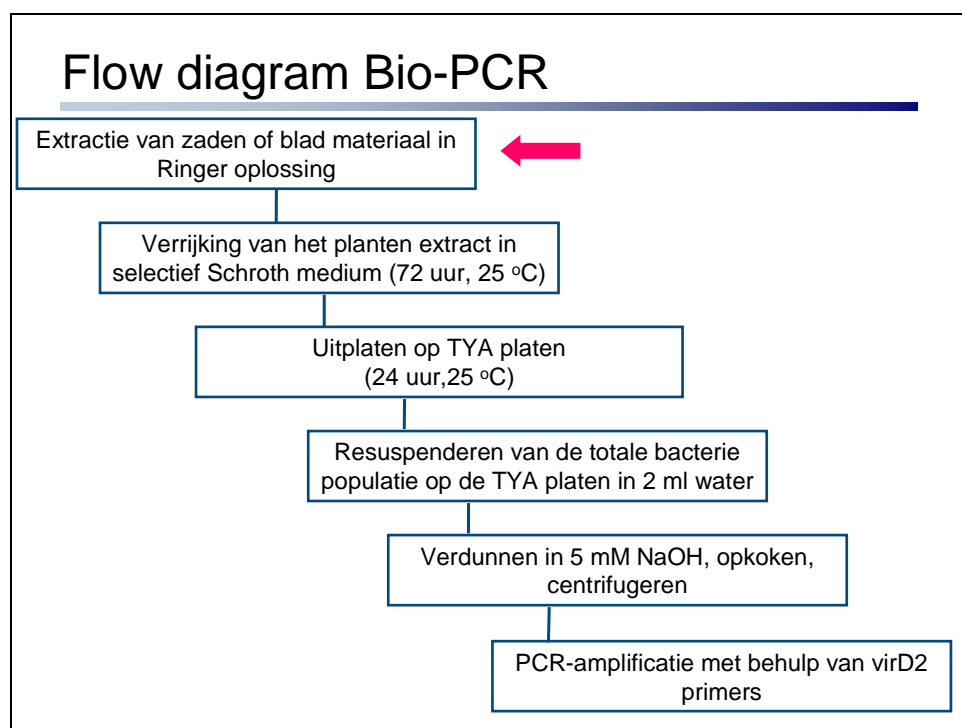
Met BioPCR is aangetoond dat *Agrobacterium* aanwezig is in zaden van agroëinoculeerde planten. Echter we kunnen niet uitsluiten dat deze zaden zijn verontreinigd met verdroogde geïnoculeerde bladresten en zo zijn besmet.

## 9. Effect van zaadopslag en antibioticum behandeling op aanwezigheid van *Agrobacterium* na floral-dip

Zes porties zaad van floral-dip behandelde planten werden gesplitst en gedurende één maand bewaard bij kamertemperatuur of respectievelijk bij 15°C-15% RV. BioPCR analyse van deze 12 monsters toonde aan dat deze besmette zaden afkomstig van floral-dip behandelde planten, nog steeds levende *Agrobacterium* bevatten zowel na opslag bij kamertemperatuur als na één maand opslag bij lage temperatuur en luchtvochtigheid.

Zaden van floral-dip behandelde planten werden uitgezaaid op weefselkweek medium met een selectieve stof en het antibioticum timentine om *Agrobacterium* af te doden. Transgene kiemplanten (T1) werden geselecteerd, verder gegroeid en zaad (T2) werd geoogst. Vijf T2 zaad fracties werden getest, en geen enkele maal werd *Agrobacterium* aangetroffen via BioPCR.

**Figuur 5. Flow diagram van BioPCR De pijl geeft aan wanneer agrobacterium wordt toegevoegd in de controle behandeling**





## 10. Samenvatting

Efficiënte agroïnoculatie van *Arabidopsis* is afhankelijk van groeicondities en ecotype.

LBA3576 werd specifiek ontwikkeld voor laserdetectie experimenten. Stabiele expressie van fluorescente marker genen bleek stam afhankelijk en verlies van marker genen kan niet worden uitgesloten. Echter de BioPCR detectiemethode, gericht op detectie van het stabiele Ti plasmide, heeft deze beperkingen niet en wordt in combinatie met lasertechnologie gebruikt voor gevoeliger detectie.

We zijn tot een proefopzet gekomen waarin agroïnoculatie werd uitgetest op *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia met dsRED gemarkeerde *Agrobacterium* en GFP gemarkeerd T-DNA. Het *worst-case-scenario* doormiddel van Floral-dip toonde aan dat *A. tumefaciens* stam LBA3576 de te verwachten resultaten gaf, namelijk bacteriën met dsRED signaal op de funiculus van het zaad en zaden met GFP signaal als gevolg van T-DNA integratie.

Een laser-screening werd ontwikkeld om enkele T-DNA integraties in grote hoeveelheden zaden aan te tonen. Met behulp van laser technologie werden ruim 170.000 zaden van agrogeïnoculeerde planten geanalyseerd. Dat is een equivalent zaden voor 100 T-DNA integratie gebeurtenissen met onze floral-dip controle. In de 170.000 zaden werd één zaad met vals positief GFP signaal gevonden. In dit zaad bleek geen GFP-T-DNA insertie aanwezig te zijn.

**We kunnen dus concluderen dat in onze proefopzet na agroïnoculatie geen getransformeerde zaden met T-DNA zijn gevonden. Het proces van zaad transformatie na agroïnoculatie is op zijn minst 100 maal minder efficiënt dan floral-dip transformatie.**

Met laser technologie is dsRED signaal gevonden op de funiculus van vijf zaden na agroïnoculatie. Ook in zaden van onbehandelde planten zijn echter 4 zaden met dsRED signaal aangetroffen. Het is daarom niet uit te sluiten dat een toevallig aspecifiek signaal in het beeld samenvalt met de funiculus en zo een vals positief beeld geeft. De frequentie van dsRED signaal op de funiculus was erg laag; 3000x minder frequent dan na floral dip behandeling.

Zaad besmetting werd ook aangetoond met behulp van BioPCR. Echter we kunnen in dit geval niet uitsluiten dat besmetting van zaden tijdens het oogsten is opgetreden, doordat agrogeïnoculeerde bladresten in het zaad terecht zijn gekomen.

De gevoeligheid van de detectie methodes vereist grote zorgvuldigheid in de proef opzet om uitsluitel te kunnen geven over het al dan niet besmet zijn van zaden met *Agrobacterium*. Het lijkt er daarom op dat zaadbesmetting met *Agrobacterium* mogelijk is. Onze gevoelige methodes kunnen dat niet uitsluiten.

**We concluderen dat niet kan worden uitgesloten dat zaad verkregen van agrogeïnoculeerde planten is besmet met *Agrobacterium*.**

Opslag van zaden bij lage temperatuur en luchtvochtigheid gedurende een maand is niet effectief om *Agrobacterium* af te doden. Echter een beperkte test gaf indicatie dat uitzaaien van zaden op medium met een effectief antibioticum resulteert in nakomelingen die vrij zijn van *Agrobacterium*.

**We concluderen dat nakomelingen van met *Agrobacterium* besmette zaden waarschijnlijk gemakkelijk bacterie-vrij gemaakt kunnen worden door middel van een antibioticum behandeling.**



## 11. Aanbevelingen

In de huidige proefopzet kan detectie van *Agrobacterium* met de laser technologie nog aanmerkelijk verbeterd worden door het dsRED gen in *Agrobacterium* te vervangen door een verbeterde versie die recentelijk beschikbaar is gekomen. Deze versie geeft eiwit dat in monomere vorm actief is en een veel hoger fluorescentie signaal geeft. Dit zou het traceren van *Agrobacterium* direct na agroïnoculatie op de plant mogelijk kunnen maken en eventueel het bestuderen van interne verspreiding *Agrobacterium*. Dit zal meer inzicht kunnen geven in de mogelijke kans op zaadbesmetting na agroïnoculatie.

De BioPCR analyse van zaden uit de laboratorium-stock toonde aan dat besmette zaden afkomstig van floral-dip behandelde planten nog steeds levende *Agrobacterium* bevatten na 1 maand opslag bij lage temperatuur en luchtvochtigheid. Echter, nakomelingen van deze zaden, uitgezaaid op medium platen met een effectief antibioticum, waren altijd vrij van *Agrobacterium*. Deze methode zou verder uitgetest en ontwikkeld kunnen worden om de nakomelingen op termijn wel een ggo vrije status te kunnen geven.

Er van uitgaande dat zaadbesmetting na agroïnoculatie niet uit te sluiten is, kan risico van verspreiding mogelijk verminderd worden door auxotrofe *Agrobacterium* stammen te gebruiken die niet op zaden overleven. Dit vereist wel dat effectiviteit van deze stammen in agroïnoculatie en overleving op zaden zal moeten worden uitgetest.

## Literatuur Agroinoculatie Project

1. Desfeux,C., Clough,S.J. and Bent,A.F. (2000) Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method *Plant Physiol.*, **123**, 895-904.
2. Stuitje,A.R., Verbree,E.C., van der Linden,K.H., Mietkiewska,E.M., Nap,J.P. and Kneppers,T.J.A. (2003) Seed-expressed fluorescent proteins as versatile tools for easy (co)transformation and high-throughput functional genomics in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 301-309.
3. Melamed-Bessudo,C., Yehuda,E., Stuitje,A.R. and Levy,A.A. (2005) A new seed-based assay for meiotic recombination in Arabidopsis thaliana *Plant Journal*, **43**, 458-466.
4. Stuurman,N., Bras,C.P., Schlaman,H.R.M., Wijfjes,A.H.M., Bloemberg,G. and Spaink,H.P. (2000) Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 1163-1169.
5. Heeb,S., Itoh,Y., Nishijyo,T., Schnider,U., Keel,C., Wade,J., Walsh,U., O'Gara,F. and Haas,D. (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 232-237.
6. Wroblewski,T., Tomczak,A. and Michelmore,R. (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 259-273.
7. Clough,S.J. and Bent,A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana *Plant Journal*, **16**, 735-743.
8. Nesi,N., Debeaujon,I., Jond,C., Stewart,A.J., Jenkins,G.I., Caboche,M. and Lepiniec,L. (2002) The Transparent Testa16 Locus Encodes the Arabidopsis Bsister Mads Domain Protein and Is Required for Proper Development and Pigmentation of the Seed Coat. *Plant Cell*, **14**, 2463-2479.
9. Haas,J.H., Moore,L.W., Ream,W. and Manulis,S. (1995) Universal Pcr Primers for Detection of Phytopathogenic Agrobacterium Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2879-2884.