

Projektrapport ”Introduktion af nye og forbedrede vildarts-egenskaber i kartoffel”

Overordnet rapportering

Projektet ”Introduktion af nye og forbedrede vildarts-egenskaber i kartoffel” som er et samarbejde initieret mellem KVL, KMC og LKF Vandel afsluttedes i December 2005. Projektet kan betragtes som den første fase i at etablere et tæt samarbejde mellem disse tre parter omkring stivelses kvalitet i kartofler forbedret med cellefusions teknologi.

I projektet har det været et bærende koncept at udnytte kompetencer om stivelses kvalitet og bioteknologi på KVL sammen med forædlingskompetencen på LKF og stivelsesproduktion og procesaktiviteter på KMC. Projektet er blevet en succes idet at cellefusionsteknologien nu er initieret på KVL og at udveksling af værdifulde kartoffellinier med høj stivelses kvalitet (høj stivelsesforsforyleringsgrad) er blevet foretaget. Kallusvæv fra fusionsprodukter er blevet produceret. Projektet kan ses som et særdeles ambitiøst initiativ og derfor er det ikke helt lykket af overholde alle elementer i den detaljerede tidsplan. De overordnede formål med projektet, initiering og etablering af et projekt-kontaktnetværk med KVL, LKF Vandel og KMC samt etablering af en bioteknologisk *ikke* GMO strategi til udnyttelse af vildtype egenskaber med fokus på vigtige stivelses kvalitets parametre i kartoffelforædlingsprogram er blevet fuldt opnået. Problemerne i tidsplanen er relateret til trips angreb af plantemateriale samt stress ved opformering som har bidraget til forsinkelser og merarbejde. Til gengæld har KVL analyseret et yderligere parti stivelsesprøver med variationer i fosforylering leveret fra LKF. Her er interessante plantelinier med meget høje fosfatniveauer blevet identificeret. I projektføreløbet har kontinuerlig skriftlig del-rapportering i projektet fra KVL og LKF blevet foretaget. Der vil fortsat blive dyrket kalli i 2006 for at sikre at skud kan regenereres. Dette arbejde vil blive fortaget det første kvartal 2006 med medfinansiering fra KVL samt KMC.

Detaljeret rapport.

Planlagt tidsforløb i starten af projektet

Maj: Cellefusion

Juni: Første celledeling af somatiske hybrider

Juli: Skud isoleret fra kallusvæv

August: Screening og selektion af hybrider

September: Opformering af udvalgte plantelinier

Oktober: Produktion af miniknolde analysemateriale

November-December: Isolering og kvantificering af stivelsens fosforyleringsgrad og amyloseindhold

Forsinkelse af tidsplan.

På grund af angreb af *in vitro* materiale hos LKF med trips i starten af projektet blev der i stedet for sendt virusfrie knolde af de samme kartoffel linier sendt over til KVL i starten af juni. Disse blev overfladesteriliseres og *in vitro* kulturer etableret på KVL. Denne procedure forsinkede projektet.

Projektets opstartsfasen.

I starten af projektet sendte LKF KVL data om forskellige højfosforylerede dihaploider og vildarter med information om stivelsesfosforylering. I samråd med LKF har KVL fået tilsendt de følgende kartoffellinier for overfladesterilisering og opformering af *in vitro* kulturer:

88-0-11-05
93-0-11-01
94-HGD-04
V11
V12
V345
V346
V503
V512
V37

Etableringen i *in vitro* har taget længere tid end forventet sandsynligvis pga. at linierne ikke endnu er afpasset *in vitro* forholdene eller for hurtig opformering. Præliminært selekteredes følgende linier ud for opformering *in vitro* på KVL. En ny linie, 96-0-91-01 blev tilsendt KVL fra Vandel. Denne bliver nu opformeret men var desværre alt for stresset for at kunne benyttes nu. Gennem opformeringsforløbet er det set, at flere af linierne udviser store stress-symptomer, bl.a. 93-0-11-01 der ellers som udgangspunkt var udvalgt. Som følge af det noterede stress, blev linierne re-selekteret ud fra de der er mindst stresset og dermed bedst *in vitro*. Disse har vi navngivet Set 1:

V37	<i>S. phureja</i>	33.6 nmol Glc6-P / mg stiv.
88-0-11-05	<i>S. tuberosum</i>	28.3 nmol Glc6-P / mg stiv.
V345	<i>S. sparsipilium</i>	32.0 nmol Glc6-P / mg stiv.
V503	<i>S. neorossii</i> 325 x <i>S. brevicaula</i> 492	32.4 nmol Glc6-P / mg stiv.
97-0-102-20	<i>S. tuberosum</i>	28.7 nmol Glc6-P / mg stiv.

Desuden er der tilsendt yderligere potentielle højfosfat plantelinier fra Vandel, navngivet Set 2:

05-3
05-4
05-14
05-18
05-19

Optimering af fusionsteknologien:

En fusionsprotokol er blevet optimeret med hensyn til elektriske parametre for fusionsinstrumentet. En tetraploid linie veletableret (c.v. Dianella) er blevet brugt for dette formål. 9 forskellige kombinationer for vekselstrøm og jævnstrøm pulser, blev testet:

20	40	70	V	jævnstrømpulse
1.0	1.5	2.0	kV	vekselstrømpulse

Ved mikroskopisk screening af cellestrukturer efter 1 måneds vækst i flydende medium indikerede at 1 kv vekselsstrømpulse genererer bedst kallusvækst. Jævnstrømpulsen virker indledningsvis mere uafhængigt resultatet, dog synes 20V at være noget bedre.

Protoplastfusion af dihaploide plantelinier september

Fire fusioner af diploide højfosfatkloner fra Set 1 er blevet foretaget. Parametre til fusionen er som beskrevet i Bilag ”Protoplastfusion”. Fusionsprodukter samt kontroller er transfereret til regenereringsmedium (VKM, se bilag). De to mindst stressede linier i Set 1 (V345 og 88-0-11-05) blev initialt valgt ud til fusionering med S. phureja (V37). Der lykkedes at blive præpareret protoplaster kun fra 88-0-11-05 og fra V37. Derfor blev følgende fusionskombinationer foretaget:

Partner 1	Partner 2
V37	88-0-11-05
V37	88-0-11-05
V37	V37
V37	V37

Desuden er der negative kontroller for begge linier – dvs. isolerede protoplaster uden fusion. Inspektion af fusionsprodukterne efter cirka 1 måned har påviset generering af mikrokallus. Ved senere inspektion viser det sig imidlertid at disse kalli ikke har fortsat vokse. Konklusionen er at udgangsplantematerialet skal have bedre kvalitet for at fuld regenerering skal lykkes. Vi arbejder derfor fortsat med in vitro optimering og vedligeholdelse af linier med højt fosfatindhold, med henblik på at få velegnet materiale til senere fusion.

Protoplastfusion af dihaploide plantelinier december

7 fusioner af diploide kloner fra Set 2 samt 5 negative kontroller (dvs. isolerede protoplaster uden fusionering) blev lavet:

Partner 1	Partner 2
05-14	05-18
05-14	05-18
05-14	05-14
05-19	05-03
05-19	05-03
05-19	05-04
05-19	05-04

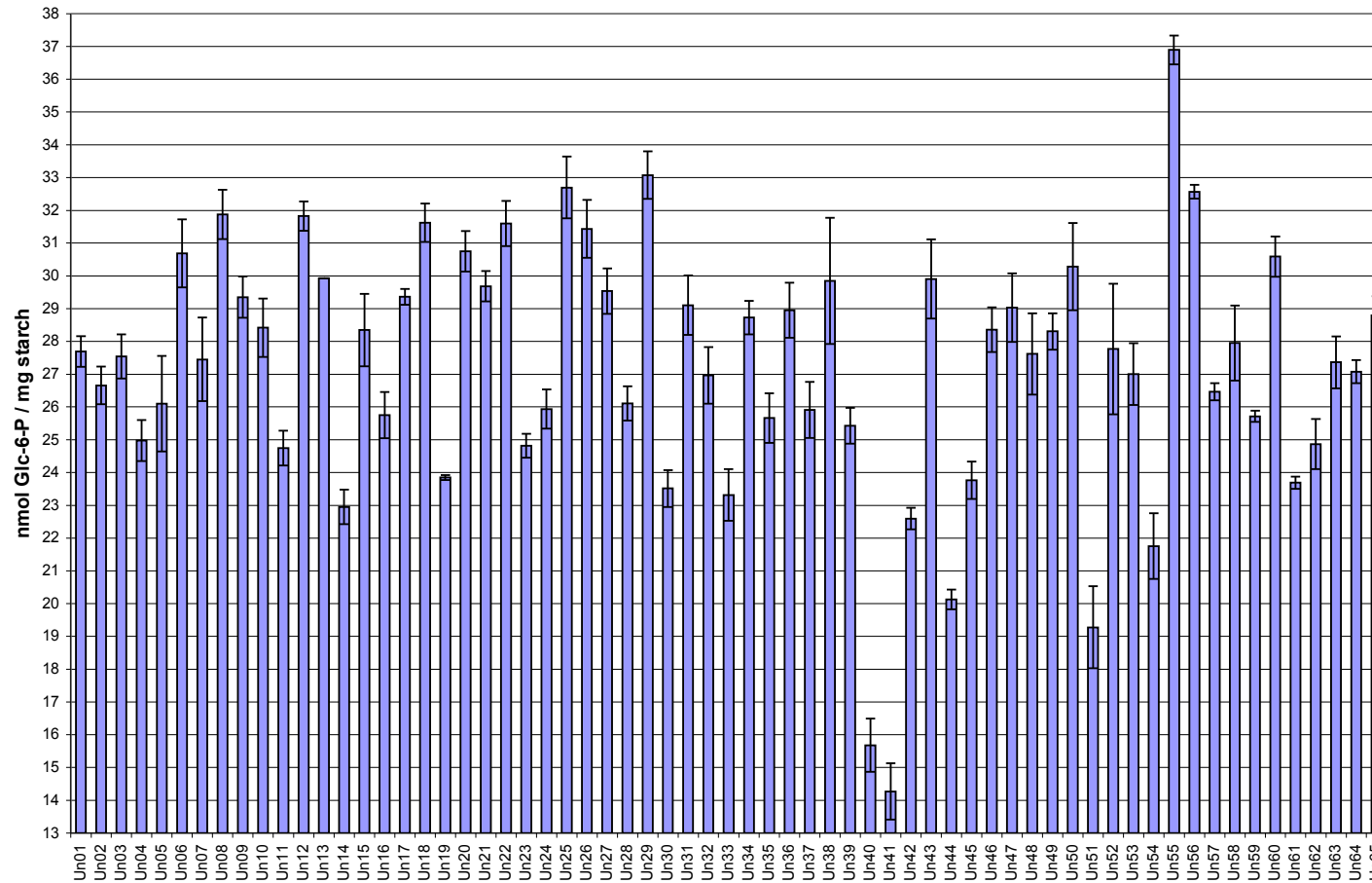
Fusionsprodukter samt kontroller er flyttet til regenereringsmedie (VKM). Hvis mikrocalli fås heraf, vil disse overføres til vedligeholdelsesmedium. Plantemateriale til nye fusioner, er planlagt til om 3-4 uger. Her burde være materiale nok til adskillige

fusioner, samt test af forskellige parametre, som f.eks. at prøve dyrkningsbetingelser ved at stille materialet mørkt i 2-5 dage før fusion. Disse aktiviteter vil dog kræve yderligere økonomisk støtte for materiale f.eks. større antal af sigter, fusionskamre samt lønmidler.

Bilag 1: Højfosfat dihaploider fra Vandel:

SOR	ART	Kr. tal	EBN	In vitro	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	GnsG6P	AntG6P	StdG6P
88-0-11-05	<i>S. tuberosum</i>	24	2	+	30,9	25,0	28,9									28.3	3	3,0
93-0-11-01	<i>S. tuberosum</i>	24	2	+		30,2	32,7	33,7								32.2	3	1,8
94-HGD-04	<i>S. tuberosum</i>	24	2	-				33,5	27,3	27,6						29.5	3	3,5
96-0-91-01	<i>S. tuberosum</i>	24	2	+						31,9	27,2	31,8				30.3	3	2,7
97-0-102-20	<i>S. tuberosum</i>	24	2	-						30,7	28,7	26,6				28.7	3	2,1
V11	<i>S. vernei</i>	24	2	+		29,7	32,2		26,5							29.5	3	2,9
V12	<i>S. vernei</i>	24	2	+	27,4	29,6	32,2	27,3								29.1	4	2,3
V345	<i>S. sparsipilum</i>	24	2	+					36,2					27,8		32.0	2	5,9
V346	<i>S. sparsipilum</i>	24	2	+					29,4					27,0		28.2	2	1,7
V37	<i>S. phureja</i>	24	2	+	35,6	31,6										33.6	2	2,8
V4	<i>S. microdontum</i> <i>ssp. gigantophyllum</i>	24	2	+	33,7		32,8							26,4		31.0	3	4,0
V503	<i>S. neorossii</i> 325 x <i>S. brevicaule</i> 492	24	2	+			30,9	36,0	29,4						33,2	32.4	4	2,9
V506	<i>S. neorossii</i> 325 x <i>S. brevicaule</i> 492	24	2	+			34,7								30,7	32.7	2	2,8
V512	<i>S. neorossii</i> 325 x <i>S. brevicaule</i> 492	24	2	+			29,6	33,7								31.7	2	2,9

Bilag: Fosfatanalyse på selekterede stivelsestyper fra dihaploider fra Vandel:



Bilag: Kartoffel kulturmedia - VKM

Microelements	mg/L
Saccharose	15000
Glucose	15000
Mannitol	35000
Sorbitol	250
Ribose	250
Xylose	250
Mannose	250
Rhamnose	250
Fructose	250
Cellobiose	250
Inositol	100
Na-Pyruvate	20
Fumaric acid	40
Acetic acid	40
Malic acid	40
Ca-Pantothenate	1
Choline chloride	1
Ascorbic acid	2
Macroelements	mg/L
KNO ₃	1480
MgSO ₄ * 7H ₂ O	984
CaCl ₂ * 2H ₂ O	735
KH ₂ PO ₄	68
NaFeEDTA	40
Vitamins	mg/L
Nicotinamide	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10
Aminobenzoic acid	0,02
Folic acid	0,04
Biotin	0,01
Vitamin A	0,01
Vitamin D ₃	0,01
Vitamin B ₁₂	0,02
Microelements 2	mg/L
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄ * H ₂ O	10
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,025
KI	0,75
Hormons	mg/L
2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid)	0,2
NAA (Naphthylacetate)	1
Zeatin	0,5
Caseinhydrolysate	250
BSA (Bovine Serum Albumin)	2000
Coconut water (mL/L)	20

pH = 5,6. Sterilfilteres.

Bilag: Opløsninger til isolering af protoplaster

0,5 M Mannitol

Sterilfiltreres.

Enzymopløsning	%
Cellulase ("Cellulysin")	1
Pectolysase	0,1
Macerozym	0,1

Enzymerne opløses i 0,5 M Mannitol, omrøres 1 time og sterilfiltreres.

W-5 opløsning	g/L
CaCl ₂ ,2H ₂ O	18,4
NaCl	9
Glucose,H ₂ O	1
KCl	0,37

pH 5,6-5,8. Sterilfiltreres. Kan med fordel laves som en koncentreret stamopløsning f.eks. 10X

CPW-saltopløsning	mg/L
KH ₂ PO ₄	27,2
KNO ₃	101
CaCl ₂ ,2H ₂ O	1480
MgSO ₄ ,7H ₂ O	246
KI	0,16
CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,025

Sterilfiltreres. Kan med fordel laves som en koncentreret stock-opløsning (5X).

CPW-16

CPW-saltopløsning med 160g/L sucrose

Kan med fordel laves ved at blande en koncentreret CPW-saltopløsning (5X) i forholdet 1:5 med en 200g/L steril opløsning af sucrose.

Bilag: Protokol for Protoplastfusion

Dag 1:

Der bruges plantemateriale fra 3-4 uger gamle planter.

De 3-4 øverste blade fra ca. 20-30 planter (afhængigt af størrelse) afklippes og placeres i en petriskål med lidt sterilt vand – evt. 0,5M mannitol.

Når bladene er isoleret suges vandet fra og bladene klippes/skæres i små stykker (2-3 mm²).

Der tilsættes 5-10 mL enzymblanding (afhængigt af mængden af plantemateriale) og inkuberes natten over ved stuetemperatur.

Kommentarer:

Erfaringsmæssigt giver det bedre resultater hvis man afklipper de 3-4 øverste blade samt stængel. Hermed går det hurtigere, og man undgår at de afklippede blade ligge længe før de klippes i stykker.

Plantemateriale kan evt. stilles i mørke 2-5 dage (15°C) før fusion.)

Dag 2:

Protoplasterne inspiceres i omvendt mikroskop.

Petriskålene kan evt. stilles på rystebord ½-1 time før filtrering for at få flere løse protoplaster.

Protoplasterne filtreres gennem en sigte (100 µm) og der vaskes efter med W5-opløsning (både petriskål og sigte).

Frem til fusion arbejdes nu på is.

Der overføres ca. 3 mL protoplastsuspension til et 10 mL rør med skruelåg, og der fyldes op med W5.

Centrifugeres 10 min, 1000 RPM ved 4°C. Supernanten fjernes med undtagelse af ca. 0,5 mL der efterlades med de bundfældede protoplaster.

Protoplasterne fra 2 rør føres sammen og anbringes forsigtigt oven på en CPW-16 opløsning i et nyt rør.

Der centrifugeres 10 min, 1000 RPM ved 4°C, og de isolerede protoplaster bør nu ligge i interfasen mellem CPW-16 og W5 som et grønt bånd.

Protoplasterne pipetteres forsigtigt af og overføres til et nyt rør. Der vaskes med 0,5M mannitol og centrifugeres 10 min, 1000 RPM ved °C.

Supernatanten fjernes og protoplasterne opløses i 1 mL 0,5 M mannitol.

Protoplasterne tælles – der bør være ca. 10⁶ protoplaster/mL.

Fusion:

Fusionskamrene steriliseres med ethanol og vaskes med 0,5M mannitol.

De protoplaster der ønskes fusioneret blandes 1:1 og 100 µL af suspensionen overføres til fusionskammeret. Vær opmærksom på at suspensionen er jævnt fordelt langs elektroderne.

Der påføres nu jævnstrøm (10V) i ca. 10 s. hvorved protoplasterne bliver ”aligned”. Herefter fusioneres ved at påføre vekselstrøm (1 kV/cm) i 3-5 s.

Efter en halv times hvile i fusionskamrene overføres fusionsprodukterne til en lille petriskål, og der tilsættes VKM. Fusionsprodukterne stilles mørkt evt. med svagt lys efter et par dage.

Efter ca. 14 dage observeres mikrocallus.

Kommentarer:

Vores apparatur/strømforsyninger er ikke specielt velegnet til fusionering, hvilket giver usikkerheder på f.eks. varighed af pulser og tidsrummet mellem jævn- og vekselstrøm.