



Eindrapportage PT10314

Indirect selectie in lelie en tulp met moleculaire merkers



Uitvoerder: Plant Research International
Business Unit Biodiversiteit en Veredeling

Projectmedewerkers: Dr. F.A. Krens (coördinator)
Dr. ir. J.M. van Tuyl
Dr. ir. A.W. van Heusden
Dr. ir. T.W. Prins



Eindrapportage PT10314

Indirect selectie in lelie en tulp met moleculaire merkers

Resultaten en opgeleverde producten:

- Getoetste lelie- en tulppopulaties, dus gefenotypeerd plantmateriaal
- Een op lelie en tulp toepasbare merkertechnologie, nl de AFLP-technologie
- Genetische koppelingskaarten van de ouders in lelie en tulp en aan diverse kenmerken gekoppelde merkers, nl in tulp aan bloemkleur, bloemblad, bloemhart, TBV (Tulip Breaking Virus)-resistentie; in lelie aan mannelijke steriliteit, TBV-resistentie en *Fusarium*-resistentie.
- Moleculaire, indirecte selectie kan toegepast worden in lelie- en tulpveredeling.

Conclusies:

- *Het is mogelijk in lelie en tulp om moleculaire merkers gebaseerd op de AFLP technologie te vinden en hiermee koppelingskaarten op te stellen.*
- *Koppeling met belangrijke eigenschappen in lelie en tulp kan gevonden en toegepast worden.*
- *Ombouw van AFLP tot 'makkelijke' PCR merker (SCAR of CAPS) is moeilijk, maar niet onmogelijk. Een aan te bevelen strategie voor de toekomst is om meerdere merkers hiervoor te kiezen en je niet te beperken tot één. Recent ontwikkelde, moderne technieken geven de mogelijkheid de benodigde sequentiegegevens sneller en nauwkeuriger te produceren. De geïdentificeerde Fusarium merkers in lelie lenen zich hier bij uitstek voor.*

Inhoudsopgave

Resultaten en opgeleverde producten	2
Conclusies	2
Samenvatting oorspronkelijke projectvoorstel	3
Plan van aanpak	3
Gebruikte afkortingen	4
Resultaten	4
Toetsen en ontwikkelen van uitsplitsende populaties	5
Het vinden en uitvoeren van een goede merkermethode	9
Vergelijken datasets en identificatie merkers	10
Stand van zaken na koppelingsanalyse	14
Eerste nabeschuwing	15
Van AFLP-merker naar enkelvoudige PCR-merker	16
Finale nabeschuwing	20
Flowchart van AFLP naar PCR-merker	21
Koppelingskaarten	25 e.v.

Indirecte selectie in lelie en tulp met moleculaire merkers

Oorspronkelijke looptijd project: 01-01-1999 t/m 31-12-2001

Financier: Productschap Tuinbouw

PT projectnummer: 10314

Samenvatting van het oorspronkelijke projectvoorstel

Doelstelling

Als doelstellingen dienen minimaal te worden gehaald:

1. Bepalen van 1 ‘monogene’ morfologische “voorbeeld” eigenschap (bijv. bloemkleur), 1 ‘monogene’ toetsbare eigenschap (virusresistentie) en 1 polygene toetsbare eigenschap (*Fusarium*-resistentie) in uitsplitsende populaties.
2. Toepasbaar maken van de AFLPTM / PCR-technologie voor lelie en tulp.
3. Uitvoeren van koppelingsberekeningen, het maken van een merkerkaart (per onderzochte populatie) en het vaststellen van de best gekoppelde merkers aan de onder punt 1 genoemde eigenschappen.

Maken van SCARs gekoppeld aan de onder punt 1 genoemde eigenschappen. Toetsen van de SCARs op bijbehorende populatie(s) en belangrijke cultivars.

Plan van aanpak

1. Toetsen (en ontwikkelen) van uitsplitsende populaties.

Jaar	Gewas	Eigenschap	Populatie
1999	Tulp	Alle morfologische eigenschappen TBV-resistentie (besmetting)	T1, T2, T3 T1, T2
	Lelie	Alle morfologische eigenschappen <i>Fusarium</i> -resistentie	L1 L1
2000	Tulp	TBV-resistentie (nateelt) <i>Fusarium</i> -resistentie	T1, T2 T1
	Lelie	TBV-resistentie (besmetting)	L1
2001	Tulp	<i>Fusarium</i> -resistentie	T3
	Lelie	TBV-resistentie (nateelt)	L1

2. Ontwikkelen van geschikte merkers voor bolgewassen.

Onderdeel	Variabelen
DNA isolatie	Blad, spruit, schubbol
Enzym combinaties	<i>EcoR</i> I / <i>Mse</i> I, <i>Pst</i> I / <i>Mse</i> I
Aantal selectieve basen	Preselectieve / selectieve amplificatie

3. Koppelingsberekeningen.

Koppelingsberekeningen met JoinMap[®] en MapQTL[®] en een merkerkaart zullen geconstrueerd worden. Voor fijnkartering van monogene eigenschappen zal mogelijk gebruik gemaakt gaan worden van de Bulk Segregant Analysis (BSA).

4. Maken van Sequence Characterised Amplified Region's (SCARs).

Dit is een nieuwe primerset, gebaseerd op een deel van de sequentie van het fragment, die zeer specifiek gekoppeld is aan het betreffende locus. De betrouwbaarheid van de SCAR zal worden gecontroleerd op de bijbehorende populatie. Tevens zal de SCAR, om de algemene bruikbaarheid vast te stellen, worden getoetst op een reeks cultivars, waarvan de betreffende eigenschap bekend is, en bij tulp op populatie T2 of T3. Hierbij zal extra aandacht worden besteed aan cultivars met een andere genetische achtergrond zoals *Fusarium*-resistentie afkomstig uit *T. gesneriana* en *T. fosteriana*.

Gebruikte afkortingen:

ConKing	Leliecultivar Connecticut King
Orlito	Leliecultivar Orlito
Pirate	Leliecultivar Pirate
KN	Tulpcultivar Kees Nelis
Cant	Tulpcultivar Cantate
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
PCR	Polymerase Chain Reaction
BSA	Bulk Segregant Analysis
QTL	Quantitative Trait Locus
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Section
TBV	Tulip Breaking Virus (Lily Mottle Virus)
F	Fusarium

Resultaten

Dit verslag geeft de resultaten zoals die verkregen zijn in het bovenstaande project en binnen de oorspronkelijke looptijd. Daarna is nog verder gegaan met populatieopbouw en met het omzetten van de verkregen arbeidsintensieve merkers in gebruikersvriendelijke merkers (zie hieronder onderdeel 4). Dit laatste onderdeel zal hier ook in detail besproken worden.

Voor het bereiken van de doelstellingen is uiteindelijk gekozen om te concentreren op de volgende vier onderdelen:

Toetsen en ontwikkelen van uitsplitsende populaties in lelie en tulp

TBV en *Fusarium* in lelie

TBV, *Fusarium* en morfologische eigenschappen, zoals bloemkleur, bloemhart en bloemblad, in tulp

Het vinden en uitvoeren van een goede moleculaire merkermethode

Optimaliseren AFLP-methode

Bepalen merkers in beide populaties

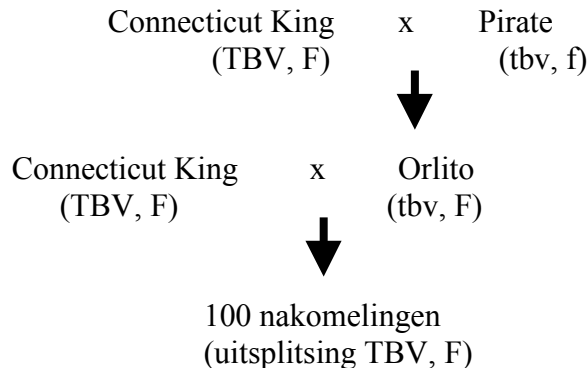
Uitrekenen koppelingskaarten

Vergelijken datasets (toetsresultaten en merkers) en identificatie merkers geassocieerd met TBV en *Fusarium*

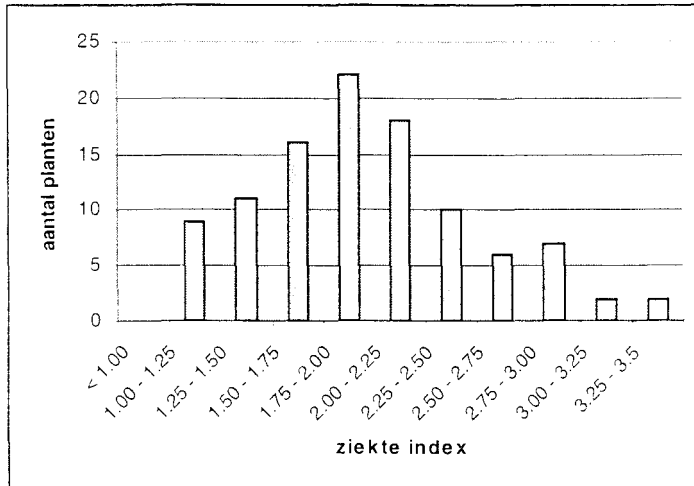
Het converteren van de arbeidsintensieve merkers naar merkers die gemakkelijk in de praktijk gebruikt kunnen worden

1) Toetsen en ontwikkelen van uitsplitsende populaties in lelie en tulp

a) Lelie populatie



Deze populatie van 100 nakomelingen is in totaal driemaal getoetst op TBV-resistentie en viermaal op *Fusarium* resistentie. De resultaten van de toetsen zijn gebruikt in de koppelingsberekeningen. Een résumé van de uiteindelijke resultaten voor wat betreft de bepalingen van de eigenschappen komt op het volgende. Voor *Fusarium* zijn met deze populatie zijn in totaal vier toetsen gedaan. De aantasting is visueel bepaald op een ordinale schaal met zes klassen: 1 = gezond; 2 = licht aangetast; 3 = zwaarder aangetast; 4 = zwaar verrot; 5 = erg zwaar verrot; 6 = volledig vergaan. De gemiddelde score verschilde nogal tussen de jaren (2.9 +/- 0.95, 2.2 +/- 0.95, 2.4 +/- 1.00 en 2 +/- 0.5 for 1992, 1993, 1994 en 1999 resp.). Ook de range van de resistentiescores varieerde tussen de jaren. (resp. 1.4-6, 1.0-5.4, 1.0-5.6, 1.1-3.7). Als voorbeeld zijn hieronder in figuur 1 de proefgegevens van 1999 weergegeven. Er waren destijds geen significante blok effecten gevonden ($p < 0.001$). De cultivars 'Connecticut King' en 'Orlito' waren resistent met een gemiddelde aantasting van respectievelijk 1.4 en 1.8. De cultivar 'Pirate' was gevoelig voor *Fusarium* met een aantastingsgemiddelde van 3.2. De populatie vertoonde aantasting die lag tussen de 1.1 en 3.7 en welke normaal verdeeld was zoals in eerdere proeven gevonden.



Figuur 1. Verdeling van de ziekte-index waarden van de 100 nakomelingen Van de kruising tussen CK en Pirate over de categoriën.

Voor TBV bleek de resistentie aanwezig in Connecticut King en waarschijnlijk enkelgens bepaald (1:1 uitsplitsing). De resistentie is verscheidene keren met de ziekte-toets bepaald.

De mannelijke steriliteit is visueel gescoord.

b) Tulp populatie

Kees Nelis x Cantate
(tbv, F) (TBV, f)



Populatie van 89 nakomelingen
(uitsplitsend voor TBV en Fusarium resistentie)

De populatie is gebruikt om de gekozen eigenschappen aan te bepalen. Voor *Fusarium* gold dat voor een betrouwbare toets voldoende materiaal nodig is om de benodigde testen uit te voeren. Gebleken is dat de toets ook een grote jaarlijkse variatie heeft en dus in verschillende jaren getoetst moet worden. In dit project heeft daarom het accent voornamelijk op materiaalontwikkeling gelegen en is een enkele toets gedaan. Dit is voortgezet in de jaren na de officiële looptijd van het project. Een en ander natuurlijk wel aan die planten waar alle merkers aan bepaald zijn.

Voor de TBV toetsen zijn voor en tijdens de bloei van alle planten, op zowel blad als bloem de TBV symptomen gescoord. In grote lijnen kwamen waarnemingen van het blad en bloem overeen. Alle bollen van de TBV-test die nog gezond waren, zijn een jaar later opnieuw in het veld beoordeeld op virusaantasting. Bovendien zijn al deze nummers m.b.v. Elisa getest op aanwezigheid van TBV. Bij de KN x Cant werden 37 nakomelingen vatbaar en 46 resistent gescoord. Zie tabel 1 als voorbeeld.

Tot slot zijn als morfologische eigenschappen de bloemkleur, bloemhart en bloemblad van alle nakomelingen van de populaties KN x Cant zijn gescoord. De resultaten zijn gebruikt voor koppelingsberekeningen.

Tabel 1.

TBV waarnemingen populatie Kees Nelis x Cantate. Oordeel 95/98 (C) zijn de oorspronkelijke scoringen, in 2000 is dit herhaald op een aantal planten van de kloontjes en op blad en bloem (A en B). In 2001 is op de aanwezigheid van virus getoetst (D). De groen en rood benadrukte planten zijn gebruikt voor de BSA om beter gekoppelde merkers te vinden.

0=ZIEK/VATBAAR

1=GEZOND/RESISTENT

	Plant nr	Aantal gepland 2000	Blad	Bloem	Oordeel 2000 (A en B)	Oordeel 95/98 (C)	BKD-2001 (D)	Uiteindelijk oordeel
	kn	3	0	0	0	0	0	0
	ca	3	1	1	1	1	1	1
1	1	2	1	1	1	1	1	1
2	2	2	1	1	1	1	1	1
3	3	2	1	1	1	0	0	0
4	5	3	1	1	1	1	1	1
5	6	3	1	0	0	0	0	0
6	7	3	1	1	1	1	1	1
7	10	3	0	0	0	0	0	0
8	11	3	0	0	0	0	0	0
9	13	2	0	0	0	0	0	0
10	14	2	1	0	0	0	0	0
11	16	3	0	1	1	1	1	1
12	18	3	1	1	1	1	1	1
13	20	3	1	1	1	0	1	1
14	21	3	1	1	1	1	1	1
15	22	3	1	1	1	1	1	1
16	24	3	1	1	1	1	1	1
17	26	3	1	1	1	1	1	1
18	28	3	1	0	0	0	0	0
19	29	3	1	0	0	0	0	0
20	30	3	0	0	0	0	0	0
21	31	3	1	1	1	0	1	1
22	32	3	1	1	1	1	1	1
23	33	3	1	1	1	1	1	1
24	34	3	1	1	1	1	1	1
25	35	3	1	1	1	1	0	9
26	39	3	1	1	1	1	1	1
27	40	3	1	1	1	1	1	1
28	41	2	1	1	1	1	1	1
29	42	3	1	0	0	0	0	0
30	43	3	0	0	0	0	0	0
31	45	3	1	0	0	0	0	0
32	46	3	1	0	0	0	0	0
33	48	3	1	1	1	1	0	9
34	49	2	0	0	0	0	0	0
35	50	2	1	0	0	0	0	0
36	52	3	1	1	1	1	1	1

	Plant nr	Aantal geplant 2000	Blad	Bloem	Oordeel 2000 (A en B)	Oordeel 95/98 (C)	BKD- 2001 (D)	Uiteindelijk oordeel
37	53	3	1	1	1	1	1	1
38	54	3	1	1	1	1	1	1
39	56	3	1	1	1	0	1	1
40	58	3	1	1	1	1	0	9
41	59	3	1	1	1	1	1	1
42	60	3	1	1	1	1	1	1
43	61	3	0	0	0	0	0	0
44	62	3	1	0	0	0	0	0
45	63	3	1	1	1	1	1	1
46	64	3	1	1	1	0	1	1
47	65	3	1	1	1	1	1	1
48	66	1	1	1	1	1	1	1
49	67	3	0	1	9	1	1	9
50	68	3	1	1	1	1	1	1
51	69	3	1	1	1	1	1	1
52	70	3	0	0	0	0	0	0
53	71	3	1	1	1	1	1	1
54	72	3	1	0	9	1	0	9
55	73	3	1	1	1	1	1	1
56	74	3	0	0	0	0	0	0
57	75	3	1	1	1	1	1	1
58	76	1	0	1	9	1	0	9
59	77	3	1	1	1	1	0	9
60	78	2	1	1	1	0	1	1
61	79	2	1	1	1	1	1	1
62	80	3	0	0	0	0	0	0
63	81or	3	0	0	0	0	0	0
64	81ro	3	0	0	0	0	0	0
65	83	3	1	1	1	1	1	1
66	84	3	0	1	9	1	1	1
67	86	3	1	1	1	1	1	1
68	87	2	1	1	1	0	1	1
69	88	1	1	0	0	0	0	88 = 50
70	89	2	1	1	1	0	0	0
71	90	2	1	1	1	1	1	1
72	91	3	0	0	0	0	0	0
73	92	3	1	0	0	1	0	92 = 45
74	93	3	0	1	9	0	0	0
75	94	3	0	0	0	0	0	0
76	95	3	1	1	1	1	1	1
77	96	3	1	1	1	1	1	96 = 40
78	97	3	1	1	1	1	1	1
79	99	3	1	1	1	1	1	1
80	101	3	1	1	1	1	1	1
81	103	3	1	0	0	1	0	81 = 30
82	104	3	0	1	9	1	1	1
83	105	2	0	0	0	1	0	0
84	106	3	1	1	1	0	1	1
85	107	1	1	1	1	1	1	1
86	108	3	1	1	1	0	0	0

	Plant nr	Aantal geplant 2000	Blad	Bloem	Oordeel 2000 (A en B)	Oordeel 95/98 (C)	BKD-2001 (D)	Uiteindelijk oordeel
87	109	3	9	9	9	0	0	0
88	110	3	1	1	1	1	1	1
89	111	3	1	0	0	0	0	0

De uiteindelijke TBV-scores over de jaren klopt in grote lijnen maar er zijn toch altijd een aantal afwijkers (grijs getint). De aanwezigheidstoets op virus is als maatstaf genomen, in de gevallen dat dat niet klopt met het eerdere oordeel is gekeken of dat eerdere oordeel éénduidig was, indien ja dan is voor deze kloon een missende waarneming ingevoerd.

2) Het vinden en uitvoeren van een goede moleculaire merkermethode

Optimaliseren AFLP-methode.

De AFLP methode is een veel gebruikte merkermethode met een paar in het oog springende voordelen. Voordelen zoals het kunnen beginnen zonder moleculaire voorkennis over het gewas en het grote aantal merkers wat bepaald kan worden in een segregerende populatie. Dit laatste is vooral voor gewassen met een hoog niveau heterozygotie. Voor zowel lelie als tulp was de grootte van de genomen (voor lelie bijvoorbeeld 70 x het genoom van tomaat) een potentieel probleem om betrouwbare AFLP-patronen te verkrijgen. Voor beide gewassen was wel de verwachting een hoog aantal polymorfismen te vinden.

a) Lelie

Met een mini-isolatiemethode is DNA geïsoleerd van lelie. Na het bepalen van een aantal AFLP-patronen konden de volgende conclusies getrokken worden: de gangbare methode met zes selectieve basen en de enzymprimercombinatie *Eco/Mse* gaf een te complex patroon. Met zeven selectieve basen worden de patronen interpreteerbaar. zes selectieve basen en de enzymprimercombinatie *Pst/Mse* gaven goede patronen de methode is goed reproduceerbaar er worden voldoende polymorfe, uitsplitsende merkers gevonden.

b) Bepalen merkers in lelie populatie

15 AFLP enzymprimer combinaties, met gemiddeld 80-120 fragmenten, zijn gebruikt om in totaal 527 segregerende, scorebare AFLP merkers te krijgen. Twee enzyme primer combinaties zijn gebruikt om het risico van klustering van merkers te verminderen (Haanstra *et al.*, 1999). Van de 527 markers in de 'Connecticut King' x 'Orlito' kruising waren er 176 afkomstig van 'Connecticut King' en 201 van 'Orlito';

INFORMATIEBOX 1

DNA isolatieprotocol (mini-isolatie)

- Buizen met (blad)materiaal uit de vriezer (-50°C) met behulp van vloeibare stikstof nog verder laten afkoelen. Het bladmateriaal in kleine stukjes stampen en 0.2-0.3 gram gestampt materiaal overbrengen naar een eppendorfvaaatje (epje).
- 750 µl DNA-isolatiebuffer (IB) met Na₂S₂O₅ (3.8 g/l) wordt toegevoegd aan het bladmateriaal. Dit mengsel wordt gedurende 60 minuten bij 65°C geïncubeerd; het epje wordt af en toe geschud (IB = 1 M NaCl, 0.175 M Sorbitol, 1% w/v CTAB, 1% sarkosyl, 0.015 M EDTA, 0.15 M Tris.HCl pH=7.5).
- Epjes uit het waterbad halen, schudden en daarna 750 µl chloroform/ isoamylalcohol (24:1) toevoegen. Enkele keren schudden en vervolgens 5 minuten centrifugeren op toerental 15.000.
- Pipetteer 400 µl van de bovenstaande vloeistof in een nieuw 1.5 ml epje en voeg 400 µl koude (-20°C) isopropanol toe. Ieder epje voorzichtig schudden.
- De epjes 6 minuten bij kamertemperatuur centrifugeren op maximale snelheid.
- Afgieten van bovenstaande vloeistof; zorg dat pellet in epje achterblijft. **Pas op:** het pellet zit niet al te vast!
- Voeg 500 µl 70% koude (-20°C) ethanol toe en schud de epjes, centrifugeer vervolgens 6 minuten en giet de ethanol af. De pellet wordt gedroogd in een vacuümdroger.
- Voeg 100 µl TE (0.1 M Tris, 0.005 M EDTA) toe.
- Na het resuspenderen wordt standaard 10 µl van de DNA oplossing gebruikt voor de AFLP-reacties.

de overige 150 merkers waren in beide ouders (heterozygoot) aanwezig en splitsten daarom ook in de nakomelingen uit.

c) Koppelingskaart Lelie

Er is een kaart gemaakt van alle ConKing merkers en de merkers die in zowel ConKing als Orlito aanwezig zijn. 251 van deze 326 uitsplitsende merkers konden geplaatst worden in koppelingsgroepen met minimaal 5 merkers (zie informatiebox 2). In totaal konden 24 koppelingsgroepen worden geïdentificeerd met als genetische lengte 1400 cM. Aangezien lelie 12 chromosomen heeft zouden met een ideaal scenario ook 12 verschillende koppelingsgroepen gevonden moeten worden. Ongeveer 25% van de merkers (75) waren niet significant gekoppeld met ten minste vier andere merkers. De kaarten zijn aan het eind van dit verslag te vinden als figuren 7 en 8.

Tulp

Ook hier kon de AFLP-techniek gebruikt worden om snel een groot aantal merkers te krijgen.

Bepalen merkers in tulp populatie

In totaal zijn 12 verschillende primercombinaties gebruikt om een gemiddeld aantal polymorfismen van ongeveer 50 te vinden met als uitschieter een combinatie met maar liefst 105 polymorfe fragmenten. De populatie bestaat uit 89 planten. In totaal zijn 595 segregerende merkers gescoord en zijn er 12 primercombinaties gebruikt, de kaart is op dezelfde wijze berekend als beschreven voor lelie.

Bij 117 van de 595 merkers werden segregatieratio's gevonden die duidelijk afweken van wat verwacht werd. Zulke scheve uitsplitsingen komen veel voor bij kruisingen, omdat ze echter het maken van een kaart compliceren doordat ze koppeling suggereren die er in werkelijkheid niet is, zijn ze niet gebruikt.

Koppelingskaart tulp.

Er is een genetische koppelingskaart gemaakt met de KN merkers en enkele merkers die in beide ouders voorkwamen. In totaal werden 17 koppelingsgroepen gevonden en 1238 cM berekend. Tulp heeft 12 chromosomen, dus in het ideale geval zouden ook 12 koppelingsgroepen gevonden moeten worden. Voor Cant werden 16 koppelingsgroepen berekend (1004 cM). Er is een aparte vaderlijke (KN) en moederlijke (CANT) kaart berekend. De kaarten zijn aan het eind van dit verslag te vinden als figuren 5 en 6.

3) Vergelijken datasets (toetsresultaten en merkers) en identificatie merkers geassocieerd met TBV en Fusarium

Vergelijken datasets (toetsresultaten en merkers) en identificatie van merkers geassocieerd met de betrokken eigenschappen in lelie

TBV

Het gen verantwoordelijk voor TBV resistentie is geplaatst op koppelingsgroep 7 met de significantste koppelingen met merkers P31M55-21, P31M59-28, P31M59-17 en E40M52T-5.

Omdat de best gekoppelde merker nog steeds ongeveer 10 cM (één op 10 nakomelingen heeft een recombinatie tussen merker en gen) is geprobeerd met Bulk Segregant Analysis (BSA) beter gekoppelde merkers te vinden. In totaal zijn 64 nieuwe

enzymprimer combinaties gebruikt maar zonder succes. De al gevonden merkers bleven de best gekoppelde merkers. Eén van deze merkers is succesvol getest op een aantal cultivars waaruit bleek dat de koppeling tussen merker en resistentie ook in de verschillende cultivars bleef bestaan. Deze merker is toen gekozen om omgezet te worden in een gebruikersvriendelijke PCR-merkers om *proof of concept* te geven over de haalbaarheid van het omzetten van merkers in een gewas met zulk een groot genoom.

Fusarium

Om de associates van *Fusarium* resistentie met de moleculaire merkers op de AFLP-koppelingskaart te vinden zijn de vier data sets apart geanalyseerd. The statistische test geeft de significantie en hoogte van het effect. Onderstaande tabel laat de verschillende effecten en de significantie zien.

Tabel 2. De chromosoomgebieden met een significante koppeling met *Fusarium* resistentie in 1992, 1993, 1994 of 1999

Linkage groep	1992	1993	1994	1999	De merker in het gebied met de grootste koppeling
Linkage group 1 (17 - 27 cM)	****	*	-	****	E41M52A-35, E40M52A-27
Linkage group 5 (65 - 90 cM)	*****	****	**	*****	P31M52-12, P31M59-21
Linkage group 13 (35 - 50 cM)	***	**	**	****	E41M52A-1
Linkage group 16 (0 - 20 cM)	***	****	*	**	E41M52A-11, P31M55-1

-, *, **, ***, ****, *****, *****, *****, Niet significant of significant bij P = 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 or 0.0005.

Op deze wijze werden vier verschillende QTLs geïdentificeerd. Door de jaarlijkse variatie in de *Fusarium* testen werden niet alle QTLs ieder jaar weer gedetecteerd. De significantie was lager of er was zelfs helemaal geen significantie meer. Alle merkers waren in koppelingsfase met de resistentie. Dit betekent dat planten met de merker minder gevoelig zijn voor *Fusarium* (zie informatiebox 3).

Informatiebox 3
 Er waren in de hele populatie acht planten zonder één van de vier positieve resistentie allelen (of eigenlijk zonder de gekoppelde merkers van de resistentiegenen). Vijftien planten hadden wel alle merkers gekoppeld aan de resistentie-allelen. De verschillen waren overduidelijk (Tabel 3).

Tabel 3

	1992	1993	1994	1999
Gemiddelde (100 planten)	2.9	2.2	2.4	2.0
Zonder merkers van de QTLs (8 plants)	3.6	3.5	3.1	2.3
Met de merkers van de QTLs (15 plants)	2.2	1.8	1.9	1.5

Mannelijke steriliteit

De factor die mannelijke steriliteit veroorzaakt kon gelokaliseerd worden. De meest nauw gekoppelde merkers waren P31M59-32 en E37M52T-17.

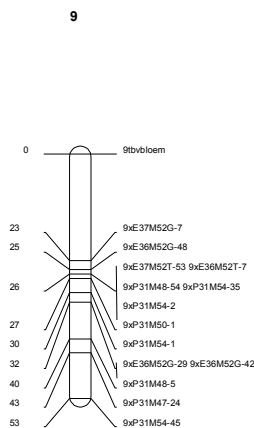
Vergelijken datasets (toetsresultaten en merkers) en identificatie van merkers geassocieerd met de betrokken eigenschappen in tulp

TBV

Cant is TBV (tulip breaking virus) resistent. Deze eigenschap splitst uit in de populatie en is gescoord door te kijken naar de breking van de bloemkleur na TBV- infectie. De TBV-resistentie lijkt bepaald te worden door een dominant enkelgens kenmerk. In eerste instantie waren de significante koppelingen met merkers die helaas nog verder dan 20 cM van het resistentiegen verwijderd lagen. Hoewel het betrouwbare koppelingen zijn, zijn deze merkers niet geschikt als selectiemerkers en zullen er dus merkers dichterbij het resistentiegen gevonden moeten worden. Dit is gebeurd met Bulked Segregant Analysis (BSA). Aan de hand van de TBV resistentie gegevens van dit jaar en de merkers zijn 10 planten geselecteerd voor een resistente pool en 10 voor een vatbare pool. Met deze methode zijn een aantal merkers dichterbij het TBV-resistentiegen gevonden. Een aantal hiervan kunnen voor een geselecteerd assortiment van tulpen cultivars bepaald worden.

Figuur 2. Koppelingskaart rondom TBV-resistentiegen gebaseerd op eerdere data.

tbvbloem	0
E37M52G-7	23
E36M52G-48	25
E37M52T-53	26
E36M52T-7	26
P31M48-54	26
P31M54-35	26
P31M54-2	26
P31M50-1	27
P31M54-1	30
E36M52G-29	32
E36M52G-42	32
P31M48-5	40
P31M47-24	43
P31M54-45	3



Figuur 3. Koppelingsgroep rondom TBV-resistentiegen na BSA



Fusarium

Voor betrouwbare analyses is het nodig de *Fusarium* toets verscheidene jaren achtereen uit te voeren. Dit kon helaas niet in de tijd van dit project, maar in de daarna volgende jaren is dit verder voltooid. De associatie is niet uitgevoerd, maar met de populatie en de merkerdata voorhanden kan dit indien gewenst in de nabije toekomst nog gedaan worden.

Stand van zaken voor lelie en tulp na de koppelingsanalyse:

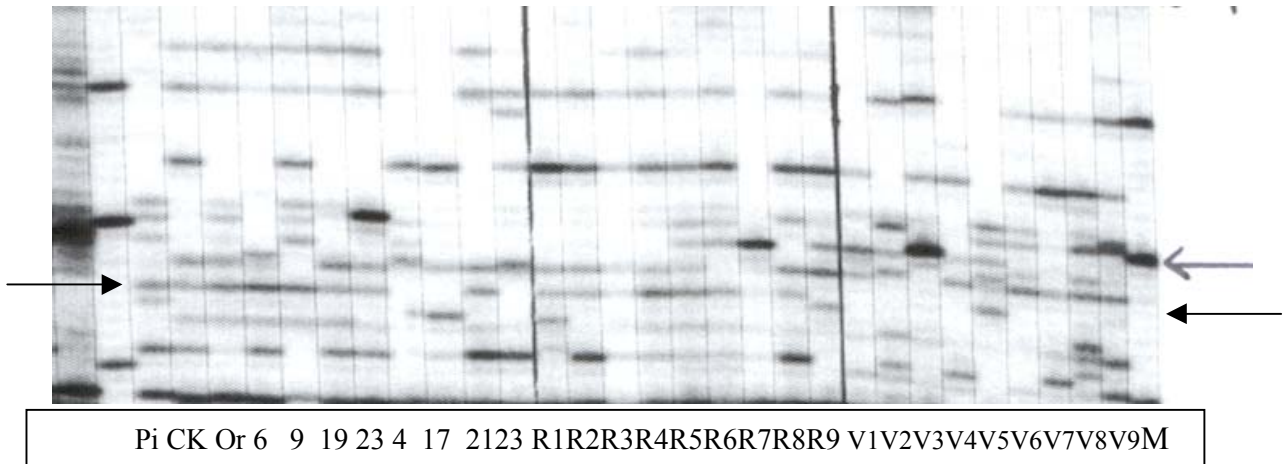
Ook voor lelie en tulp met hun grote genoom is het mogelijk AFLPs te gebruiken en koppelingsanalyses uit te voeren.

Er zijn gekoppelde merkers voor morfologische kenmerken

Fusarium resistentie moet in meerdere jaren bepaald worden om betrouwbare koppelingsanalyses te doen. Er zijn in lelie vier chromosoomgebieden geïdentificeerd met een associatie met *Fusarium* resistentie. De positieve allelen van deze vier gebieden geven een grote mate van resistentie.

Er zijn gekoppelde merkers met aan TBV resistentie gevonden en deze koppeling blijft overeind in het assortiment (resistente cultivars hebben veel vaker de merker dan vatbare planten)

Figuur 4. AFLP gel met de lelie ouders, nakomelingen en assortimentsvertegenwoordigers die de koppeling tussen merker en TBV-resistentie tonen. Zie ook verderop.



Eerste Nabeschouwing:

In de eerste jaren van dit project zijn de koppelingskaarten gemaakt van lelie en tulp op basis van AFLPs en twee enzymcombinaties (*EcoMse* en *PstMse*). Met beide combinaties werden goed scorebare en segregerende verschillen gevonden. De lelie- en tulpenpopulatie zijn ook gefenotypeerd voor TulipBreakingVirus- en *Fusarium* resistentie. De ontwikkeling van de tulpenpopulatie nam zoveel tijd in beslag dat het niet meer mogelijk was voldoende, onafhankelijke *Fusarium* toetsen uit te voeren in de gegenotypeerde tulpenpopulatie. Er werden ook goede koppelingen gevonden voor het enkelgens resistentiegen tegen TBV in lelie en tulp en enkele QTLs voor *Fusarium*-resistentie in lelie. In tulp is ook gebleken dat met BSA op een snelle, efficiënte wijze nauwer gekoppelde merkers gevonden konden worden. Dit lukte niet bij lelie maar dat kan ook zijn oorzaak hebben in de opbouw van de populatie van lelie (een terugkruising op ConKing). Als finale in het project zou een aantal van de gevonden AFLP-merkers "omgebouwd" worden naar andere, gemakkelijker te gebruiken, PCR markers. In deze fase van het onderzoek aangekomen bleek dat de gevonden AFLP-patronen moeilijk te reproduceren waren door anderen (Keygene en IdQ). Dit heeft veel vertraging en onnodige kosten opgeleverd. Hoewel dus bijna alle doelstellingen bereikt zijn (zie informatiebox 4) resteert het converteren van de merkers. Besloten is vervolgens in samenspraak met de Begeleidingscommissie en PT na afloop van het project door te gaan en één *PstMse* merker gekoppeld aan TBV resistentie van AFLP merker om te zetten in een enkelvoudige gemakkelijk te bepalen PCR-merker (p31m55-21; 130bp).

Informatiebox 4

Als doelstellingen dienen minimaal te worden gehaald:

1. Bepalen van 1 'monogene' morfologische "voorbeeld" eigenschap (bloemkleur of mannelijke steriliteit), 1 'monogene' toetsbare eigenschap (virusresistentie) en 1 polygene toetsbare eigenschap (*Fusarium*-resistentie bij lelie) in uitsplitsende populaties.
2. Toepasbaar maken van de AFLPTM / PCR-technologie voor lelie en tulp.
3. Uitvoeren van koppelingsberekeningen, het maken van een merkerkaart (per onderzochte populatie) en het vaststellen van de best gekoppelde merkers aan de onder punt 1 genoemde eigenschappen.
4. Maken van SCAR's gekoppeld aan de onder punt 1 genoemde eigenschappen. Toetsen van de SCAR's op bijbehorende populatie(s) en belangrijke cultivars.

4) Van AFLP-merker naar enkelvoudige PCR-merker

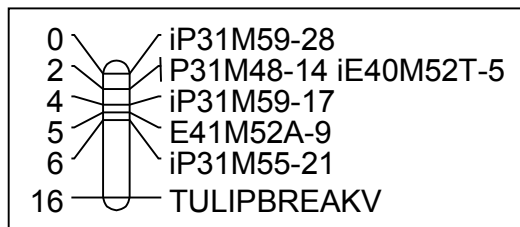
Inleiding

Zoals boven beschreven is voor dit project een genetische koppelingskaart van lelie gemaakt bestaande uit AFLP-merkers. De ongeveer 100 fragmenten per laan en 35-50 polymorfismen maakten het mogelijk redelijk efficiënt een genetische kaart te maken. Er is zowel een vaderlijke als een moederlijke kaart gemaakt.

Resultaten

Gekoppelde merker

De TBV-resistentie splitste 1:1 uit en berust dus hoogstwaarschijnlijk op één dominant overervend allel. P31M55-21 is het best gekoppelde merker, maar bevindt zich toch nog steeds op 10cM afstand (significantie wel hoog: LOD=8).



Korte toelichting:

De merker (het AFLP-fragment) wordt zowel gevonden in ConKing (resistent) als in Orlito als in Pirate (beide vatbaar). De koppeling is gebaseerd op de 1:1 uitsplitsing van TBV in de nakomelingen van de kruising Connecticut King x Orlito en de 3:1 uitsplitsing van de

merker.

Als de resistentie als type ab x aa (enkelgenskenmerk) gescoord wordt en de merker als type ab x ab worden het resistentiegen en de extra merker op de koppelingsplaats geplaatst en is afstand tussen het resistentiegen en de merkers bekend. De afstand met de dichtsbijzijnde merker (M) is 10cM met een hele hoge significantie (LOD=8.0).

In alle kruisingen hebben alle ouders de merker (dus ook de vatbare Pirate en Orlito), toch is er een koppeling tussen merker en resistentie-allel. Dit kan als volgt verklaard worden:

Mogelijkheid 1:

Merker is zowel aanwezig in ConKing als in Pirate; Orlito heeft het merkerallel van Pirate gekregen zonder de resistentie. Bij de terugkruising op CK splitst de gekoppelde merker aan TBV-resistentie 3:1 uit. En de resistentie 1:1. In de resistente planten is de merker aanwezig dus de merker en het resistentiegen zijn in koppelingsfase.

Mogelijkheid 2:

Merker is zowel aanwezig in CK als in Pirate. Koppeling tussen merker en resistentiegen zal door recombinatie verdwijnen in sommige van de voortplantingscellen van CK, Orlito is het resultaat van één van deze cellen samen met het allel van Pirate wat geen band geeft. Orlito wordt teruggekruist met CK en de merker splitst 3:1 uit.

Feitelijk hebben mogelijkheid 1 en 2 dezelfde gevolgen en kunnen hetzelfde geïnterpreteerd worden.

CONCLUSIE:

We hebben een duidelijke, in koppelingsfase zijnde, AFLP-merker aan het resistentiegen; deze merker is 130 baseparen lang.

Merker over gedeelte assortiment

Bovenstaande merker is getest op een aantal leliecultivars, bij het bepalen van de merker bleken zes van de zeven resistente cultivars (Sarina, Dreamland, Sorbet, Pollyanna, Elite, Gran Cru, Chianti, Cordelia, Jolanda) het AFLP-fragment te hebben en acht van de negen vatbare cultivars (Ster Star, Mont Blanc, L. Maculatum, L. Dauricum, Juliana, Chinook, wilsonii, Enchantment, L. Tigrinum) hadden het fragment niet.

In 2004 is nog eens opnieuw de betrouwbaarheid en robuustheid van de merker bevestigd doordat een nieuw persoon met oud én nieuw DNA van eerder geteste én nieuwe assortimentsvertegenwoordigers waarvan de resistentie bekend is, het AFLP-bandje kon reproduceren. De uitsplitsing en koppeling bleken zoals verwacht.

CONCLUSIE:

We hebben een duidelijke, in koppelingsfase zijnde, AFLP-merker aan het resistentiegen; deze merker is 130 baseparen lang en ook bij het assortiment is er duidelijk sprake van een koppeling tussen merker en de aanwezigheid van resistentie.

Bepalen sequentie van de merker

Het sequencen en ombouwen van AFLP-banden is bij lelies en tulpen zeker moeilijker dan bij andere planten door de complexe AFLP-patronen en de grootte van het genoom van lelie en tulp. Er zijn veel repetitieve sequenties in deze genomen die het ombouwen kunnen compliceren.

Om de complexe AFLP-patronen te simplificeren (zie A in flowchart) is een specifieke methode toegepast die op het hieronder beschreven principe gebaseerd is:

Enzymprimercombinatie

P31M55	a)	P31M55	a)	P31M55
P31M55A	b)	P31M55CA	b)	P31M55CAA
P31M55T	c)	P31M55CT	c)	P31M55CAT
P31M55C	d)	P31M55CC	d)	P31M55CAC
P31M55G	e)	P31M55CG	e)	P31M55CAG

Aan de M55 kant zijn de selectieve basen TCG; hierbij wordt het gekoppelde AFLP fragment gevonden. Als dezelfde reactie over wordt gedaan met vier andere primers die elk één van de vier mogelijke baseparen hebben, dan zal hetzelfde fragment maar met één van deze vier fragmenten teruggevonden worden. In ons geval was dit met de C (zie vetgedrukt), dezelfde truc kan herhaald worden en de volgende selectieve base wordt bekend (een A) en nogmaals (weer een A).

Als nu de AFLP reactie wordt gedaan zal een veel rustiger patroon ontstaan (theoretisch maar $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = 1/64$ van het totaal aantal banden (zie B in flowchart).

In dit minder gecompliceerde patroon kan het fragment uit de gel gesneden worden en kan de sequentie direct bepaald worden of kan het gebruikt om te kloneren. M.b.v. een de gekloneerde sequentie kan dan ook de sequentie bepaald worden (zie C in flowchart).

Dit is gedaan en de volgende sequentie is gevonden:

P31 kant – AAACCTCCACCATCATCAAACGTGATAAGACTTGAAAACCTCCA
CCATCATCAAATATTATAGGACTTGAAAACCTGCAAGCTTTTACAATCG – M55
kant

CONCLUSIE:

Het gekoppelde fragment is succesvol gesequenced. De sequentie is wel te kort om succesvol omgezet te kunnen worden naar een enkelvoudige PCR-merker. Daarom moet de sequentie verlengd worden.

Verlengen sequentie AFLP-fragment:

Om de sequentie te verlengen wordt het gehele genoom van lelie geknipt met een bepaald restrictie-enzym (zie D in flowchart). Alle fragmenten worden nu begrensd door bekende restrictiesites en aan deze restrictiesites worden nu bekende sequenties geplakt (adapters, zie E in flowchart). Slechts enkele van deze fragmenten hebben de sequentie van het AFLP-fragment. De fragmenten die de sequentie van het AFLP fragment hebben bestaan uit een adaptersequentie, een stukje onbekende sequentie, de AFLP-sequentie, weer een stukje onbekende sequentie en tenslotte ook weer een adaptersequentie (F).

Er worden primers gemaakt mbv de bekende AFLP sequentie en de bekende adaptersequentie. Indien het fragment niet te groot is zal (in twee aparte reacties) met een PCR-reactie zowel het fragment rechts als links van de AFLP-sequentie bepaald kunnen worden. Als geen amplificatieproducten verkregen worden kan hetzelfde proces herhaald worden met een ander restrictie-enzym totdat uiteindelijk het restrictie-enzym gevonden wordt wat dicht genoeg bij de bekende AFLP-sequentie knipt (zie G in flowchart) en dus producten oplevert. Dit fragment kan gekloneerd worden en van een aantal apart klonen kan de sequentie bepaald worden.

De sequentie kon inderdaad verlengd worden na knippen met het restrictie-enzym *HaeI*. Een aantal klonen is gesequenced. Het was opvallend dat er nog veel iets afwijkende sequenties gevonden werden. Afwijkende sequenties kunnen komen door sequentiefoutjes, maar het kan ook een teken zijn dat niet alleen de sequentie rondom het AFLP-fragment wordt opgepikt, maar ook nog (iets afwijkende) gedupliceerde sequenties. Een fenomeen wat in lelie met zijn grote genoom tot de mogelijkheden behoort.

Er werden ook een aantal dezelfde sequenties gevonden. Bij 10 sequenties van ConKing was het enige verschil in de 213 basenparen een polymorfisme in de *Mse*-site (bij een AFLP-merker kan het polyformisme veroorzaakt worden door een polymorfisme in één van de twee restrictiesites (in dit geval *Pst/Mse*). Een verschil wat verwachten kon

worden en waarvan het aannemelijk was dat het gebruikt zou kunnen worden om er een enkelvoudige PCR-merker (CAPS) mee te maken.

CONCLUSIE:

Een sequentie van 213 basepaar lengte met een polymorfisme in de Mse-site, bij ConKing hebben 5 sequenties wel de site en vijf niet (Restrictiesite *MseI* TTAA, Niet-restrictie TTAT). Deze sequentie is ook aanwezig in Pirate en Orlito.

Via de gevonden sequentie naar een enkelvoudige PCR-merker

De vraag was: Is het mogelijk primers te maken die alleen de sequentie met in het midden het polymorfisme amplificeren. Als dit mogelijk is wordt het volgende resultaat verwacht (zie onderstaand figuur en flowchart):

In alle genotypen wordt het fragment geamplificeerd (de sequentie is overall aanwezig) In Pirate, Orlito en ConKing zal het geamplificeerde allel met de knipplaats wel geknipt worden en het allel zonder de knipplaats niet. Na digestie zal een patroon van drie banden ontstaan.

Alle vatbare nakomelingen (4, 7, 37 en 40) hebben alleen de allelen zonder de knipplaats en na digestie is er niets veranderd.

De resistente nakomelingen kunnen zowel een allel met knipplaats samen met een allel zonder knipplaats hebben (bv 19,23) als twee allelen met beide een knipplaats (bv 6,9). In het eerste geval zal weer een patroon van drie banden ontstaan en in het tweede geval worden alleen de geknipte fragmenten gevonden.

	Pi	Or	CK	4	7	37	40	6	9	19	23
Ongeknipt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Geknipt	—	—	—	—	—	—	—		(—)	(—)	
	—	—	—					—	—	—	—
	—	—	—					—	—	—	—

Dit experiment is uitgevoerd en helaas werd bij alle genotypen het patroon met drie banden gevonden en bleek onderscheid niet mogelijk; kortom de helft van de allelen die we amplificeerden met de door ons gekozen primers werd geknipt en de andere helft niet.

Inmiddels hadden we toegang gekregen tot een nieuwe techniek: Het PYROSEQUENCEN. Deze techniek werkt als volgt: Op een bekende sequentie wordt een primer ontworpen en op ingenieuze manier worden een aantal baseparen (30-40) volgend op de sequentie van de pyrosequence primer afgelezen. Op deze manier kan over de *Mse-site* heengelezen worden en kunnen op deze manier allelen gescoord worden. Ook

hier kwamen we niet tot een bevredigend resultaat omdat het geamplificeerde product (gemaakt met nieuw gekozen primers) niet zuiver was maar uit meerdere sequenties door elkaar bestond. Dit leidde tot niet interpreteerbare resultaten.

CONCLUSIE:

Onze gekozen primers amplificeren niet selectief genoeg, er worden waarschijnlijk naast de beoogde sequentie een paar andere erg vergelijkbare sequenties gelijktijdig geamplificeerd. Bijvoorbeeld één die homozygoot aanwezig is maar geen knipplaats heeft en één die homozygoot aanwezig is met de knipplaats. Het verschil wat aangetoond moest worden werd hierom niet zichtbaar. Hierdoor was de laatste stap van de AFLP_merker naar een CAPS marker nog niet mogelijk.

Finale nabeschuiving

Hoewel de meeste doelstellingen van het project gehaald zijn en gebleken is dat het gebruik van moleculaire merkers en koppelingsanalyses leidt tot het identificeren van gebieden in het genoom met een associatie met de onderzochte eigenschap is de vierde en laatste doelstelling, het succesvol kunnen omzetten van de AFLP-merker in een handzame eenvoudige andere merker, onvoltooid.

Het grote genoom van zowel lelie als tulp met de vele repetitieve sequenties zal hier zeker debet aan zijn. Maar wellicht kan ook de keuze welke AFLP-merker om te zetten hier aan bijgedragen hebben. Veel meer sequentie-informatie blijkt nodig om de juiste amplificatieprimers te kunnen kiezen.

Natuurlijk is er nu een merker voor TBV resistentie maar het blijft een arbeidsintensieve AFLP-bepaling waarvan gebleken is dat deze niet altijd in andere laboratoria te reproduceren zijn (intern hebben we hier geen problemen mee).

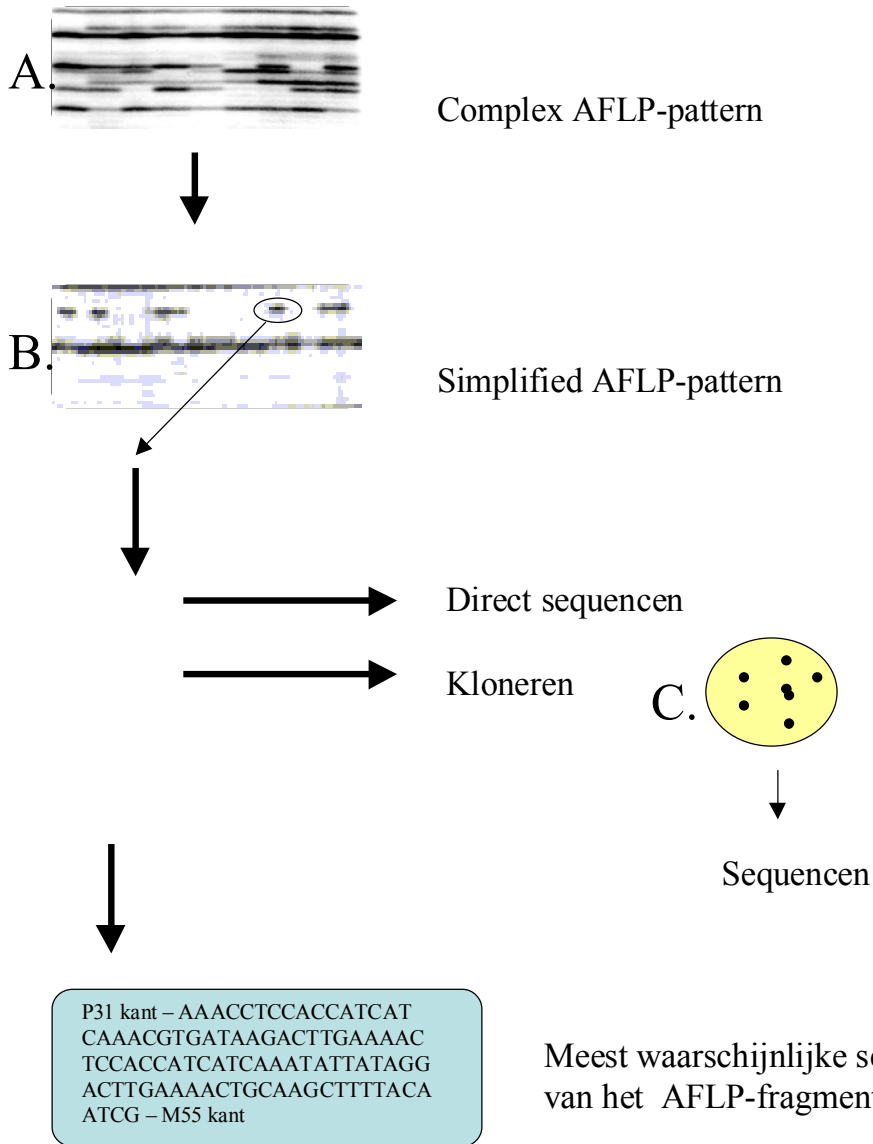
Afsluitend:

- *Het is mogelijk in lelie en tulp om moleculaire merkers gebaseerd op de AFLP technologie te vinden en hiermee koppelingskaarten op te stellen.*
- *Koppeling met belangrijke eigenschappen in lelie en tulp kan gevonden en toegepast worden.*

Ombouw van AFLP tot 'makkelijke' PCR merker (SCAR of CAPS) is moeilijk, maar niet onmogelijk. Een aan te bevelen strategie voor de toekomst is om meerdere merkers hiervoor te kiezen en je niet te beperken tot één. Recent ontwikkelde, moderne technieken geven de mogelijkheid de benodigde sequentiegegevens sneller en nauwkeuriger te produceren. De geïdentificeerde Fusarium merkers in lelie lenen zich hier bij uitstek voor.

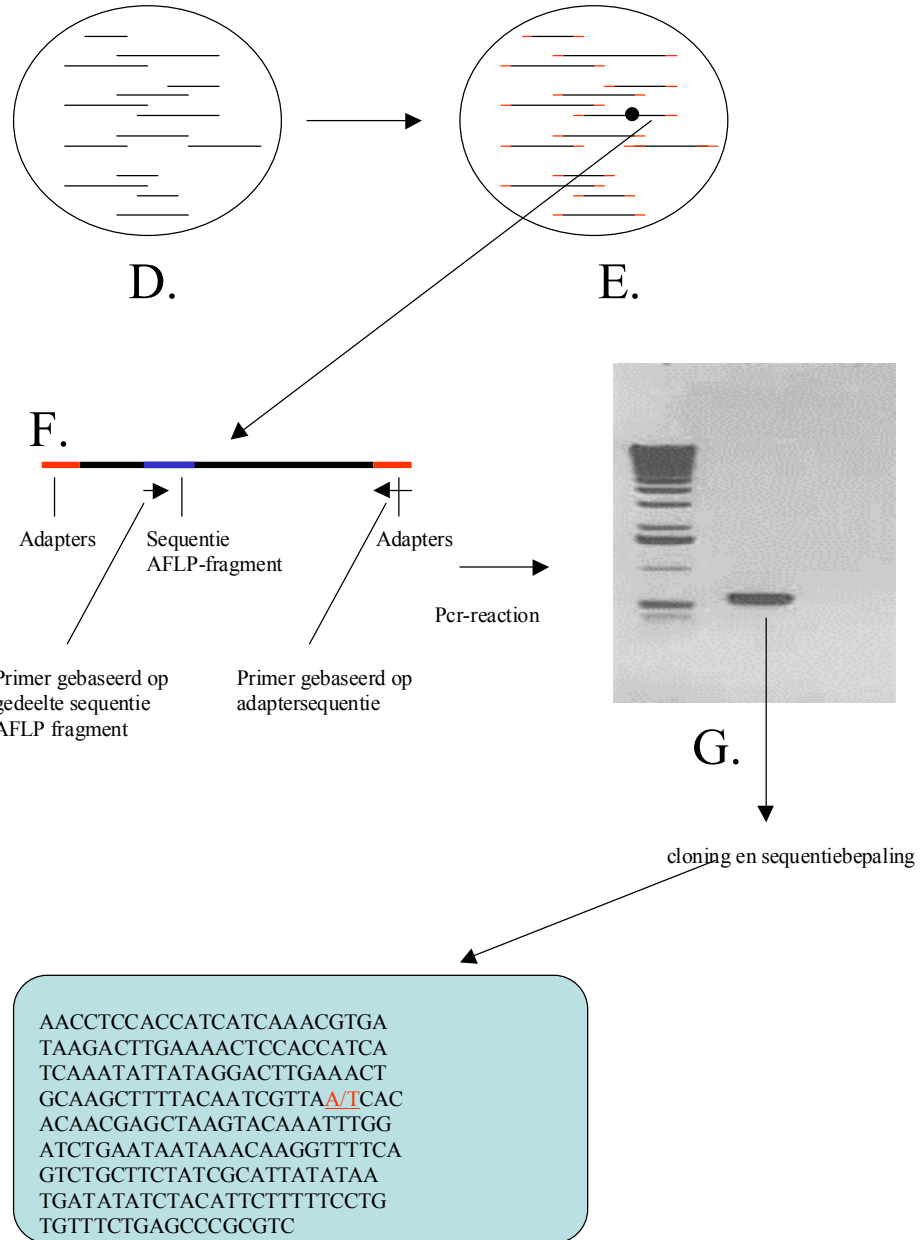
Flowchart van AFLP naar simpele PCR merker

Bepaling sequentie van het AFLP-fragment

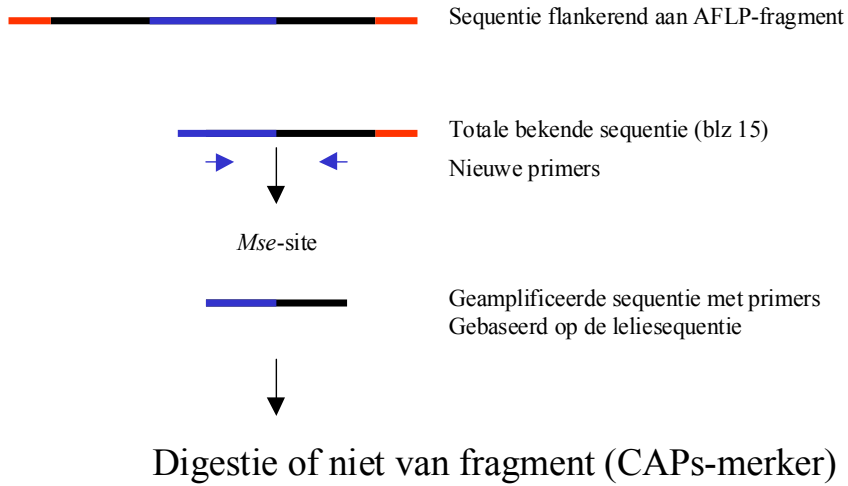


De unieke sequentie voor dit fragment is 92 unieke basen (de primer- en adaptersequenties tellen niet mee).

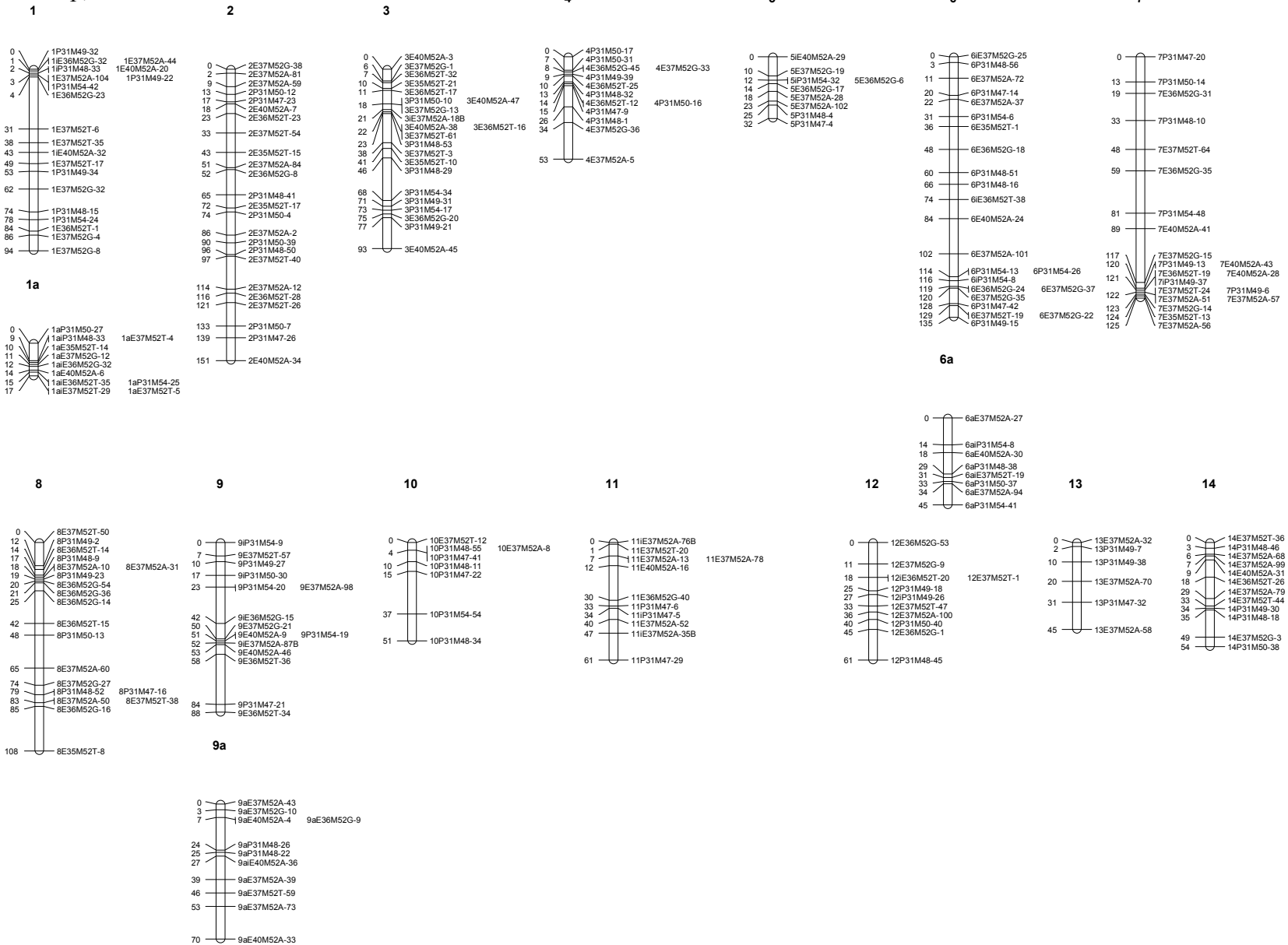
Verlengen sequentie AFLP-fragment



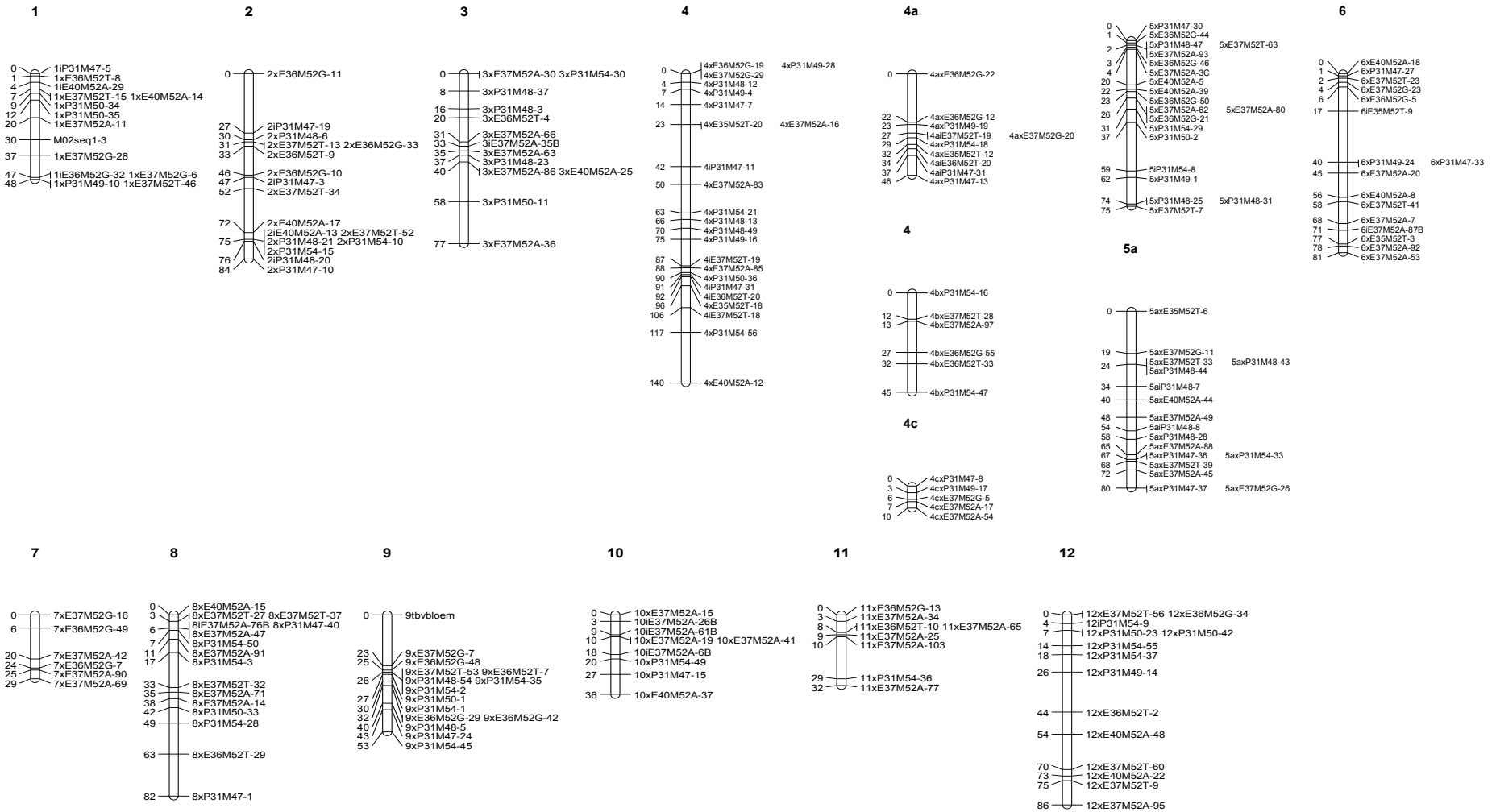
Gebruik van de verlengde merker om CAPS merker te vinden



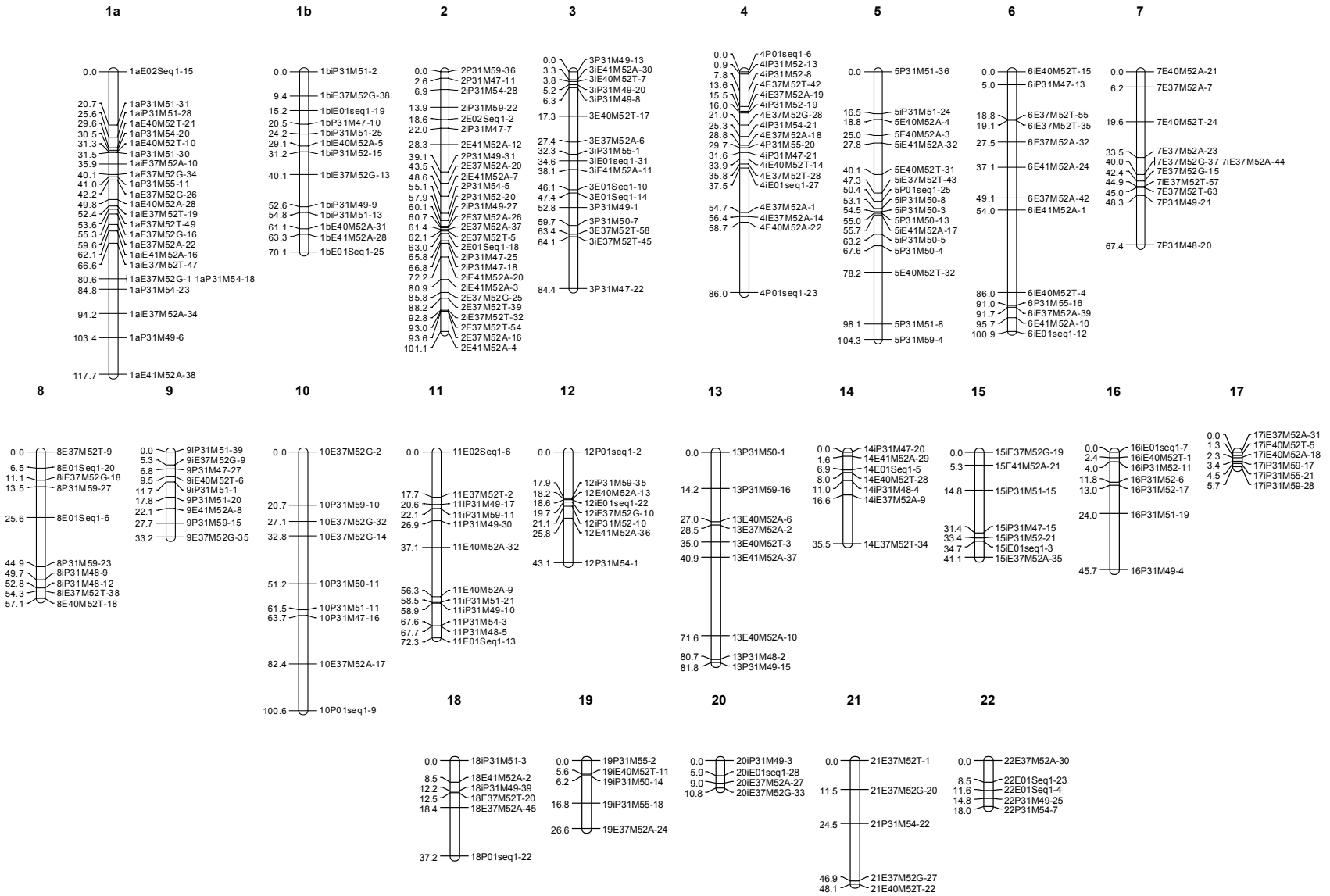
Figuur 5 Tulp, Kees Nelis



Figuur 6 Tulp, Cantate

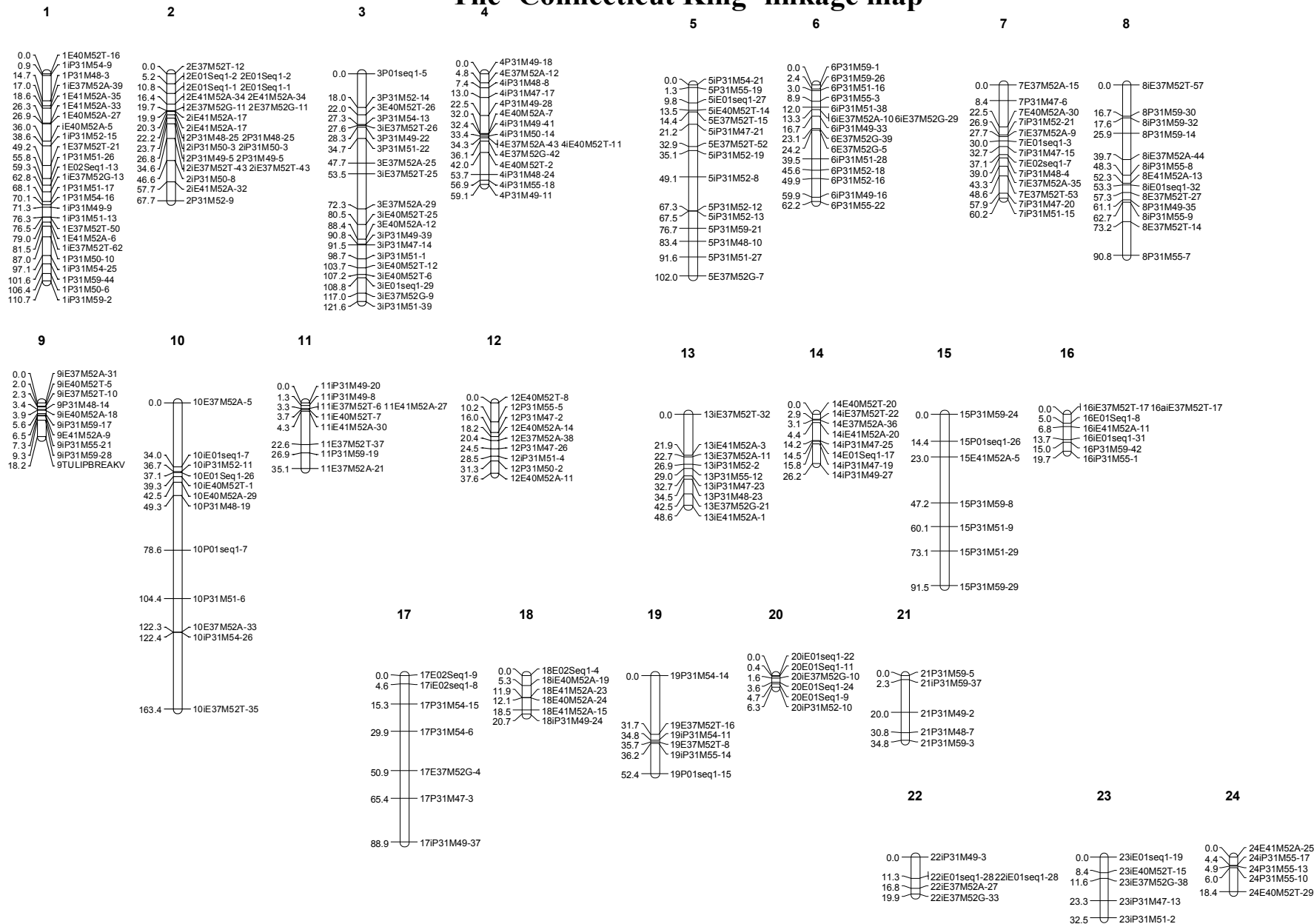


The 'Orlito' linkage map



Figuur 7 Lelie, Orlito

The 'Connecticut King' linkage map



Figur 8 Lelie, Connecticut King