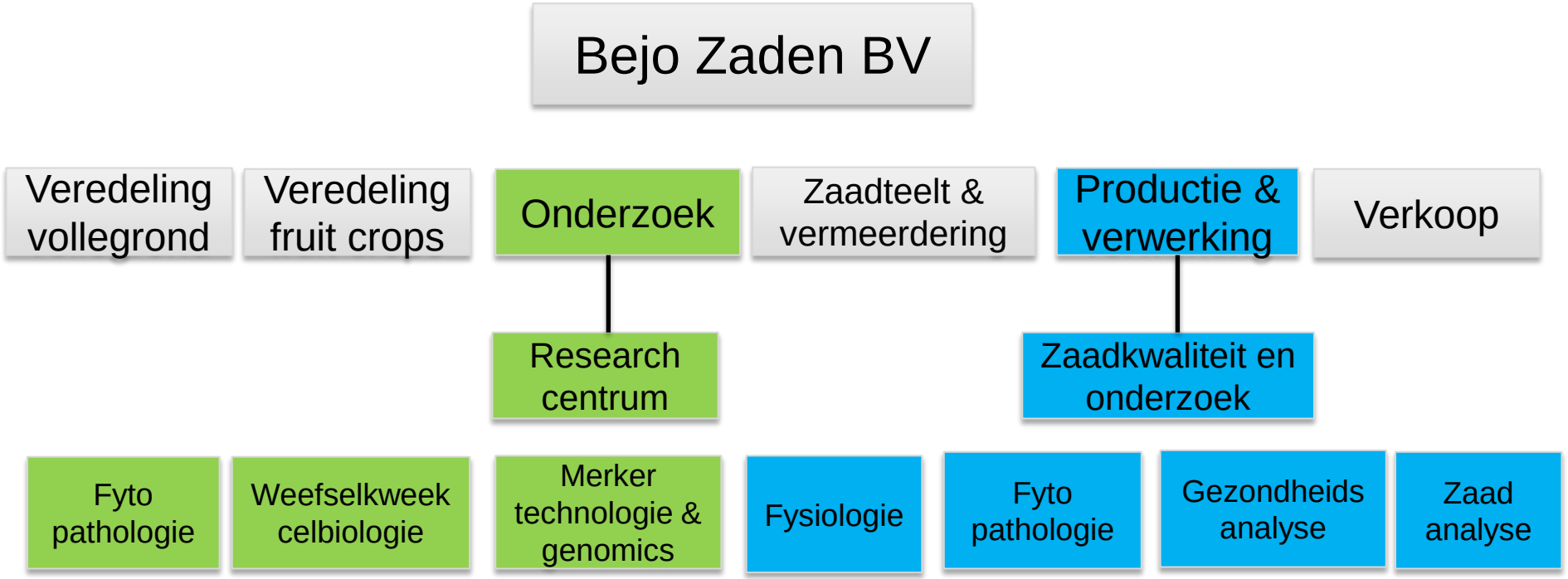
’t Saet kruipt waar het niet gaan kan

Research en DNA technieken



Organisatie



Research Centrum

Fytopathologie en inhoudsstoffen

Weefselkweek en celbiologie

Merkertechnologie en genomics

Fytopathologie
en inhoudsstoffen

Peronospora destructor





Fusarium oxysporum



Albugo candida



Fytopathologie en inhoudsstoffen

Met deze groep werken wij aan:

1. meer dan 70 projecten voor verbetering van Bejo's rassen ten aanzien van resistentie tegen ziekten en plagen.

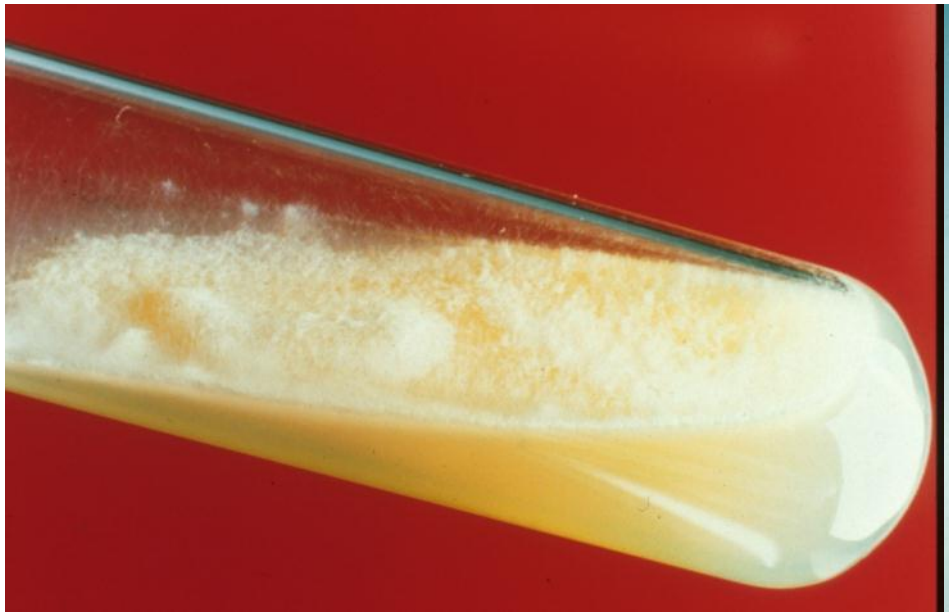
2. Het meten en verbeteren van het gehalte aan inhoudsstoffen.

Resistentie toetsing

- Om één of meerdere resistentiebronnen te vinden wordt een **resistentietoets** ontwikkeld
- De plant wordt in die toets in contact gebracht met de ziekteverwekker.
- Veel lijnen, rassen en soms ook wilde varianten worden getoetst.

Resistentie toetsing

Voorbeeld : Resistentietoets *Fusarium oxysporum* in kool





Resistentie toetsing

Voorbeeld : Resistentietoets *Fusarium oxysporum* in kool





Resistentie toetsing

Voorbeeld : Resistentietoets *Fusarium oxysporum* in kool





Resistentie toetsing

Voorbeeld : Resistentietoets valse meeldauw in ui





Terugkruising

Om resistentie en kwaliteit te combineren wordt de resistentiebron gekruist met een kwaliteitsouder.

In volgende generaties steeds eerst op resistentie te selecteren en daarna op kwaliteit, zo wordt geleidelijk vooruitgang geboekt.

Door herhaald terugkruisen krijg je uiteindelijk een ras dat resistent is én een goede kwaliteit heeft.

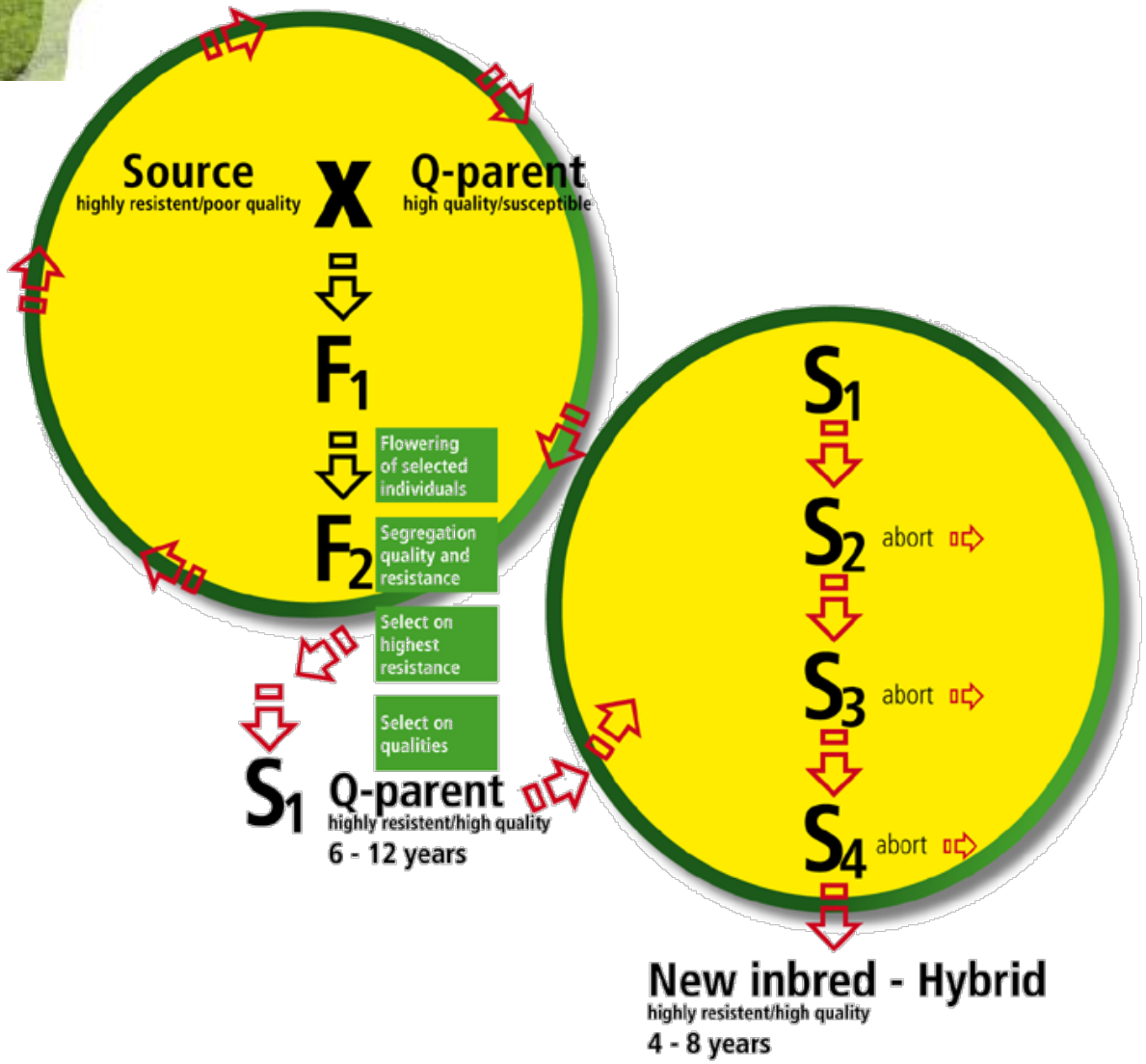
Dit deel van het proces duurt 6 tot 12 jaar. Door gebruik van innovatieve technologieën kan deze tijd aanzienlijk worden verkort.

Van lijn tot ouderlijn

Als kwaliteit en resistentie in voldoende mate aanwezig zijn wordt de lijn verder uniform gemaakt.

Meerdere keren intelen verwijdert alle ongewenste variaties en maakt de nieuwe ouderlijn zo uniform mogelijk.

Deze verfijnstap kan 8 jaar of langer duren, maar is door de inbreng van nieuwe technieken sterk te verkorten.


Source
highly resistent/poor quality
X
Q-parent
high quality/susceptible
F1
Flowering of selected individuals
F2
Segregation quality and resistance
Select on highest resistance
Select on qualities
S1
Q-parent
highly resistent/high quality
6 - 12 years
S1
S2
abort
S3
abort
S4
abort
New inbred - Hybrid
highly resistent/high quality
4 - 8 years

12 + 8 = 20 jaar.....

toets ontwikkeling

evaluatie

testen en introductie van F1

1991

veredelingsprogramma

testkruisingen

2014

resistentiebron





Сочи

Fythopathologie en inhoudsstoffen

Met deze groep werken wij aan:

1. meer dan 70 projecten ter verbetering van Bejo's rassen ten aanzien van resistentie tegen ziekten en plagen.

2. het meten en verbeteren van het gehalte aan inhoudsstoffen.

Inhoudsstoffen

- Vitamines
- Suikers
- Droge stof
- Caroteen
- Lycopeen
- Pyruvaat
- Glucosinolaten
- Sap (wortel, biet)



Celbiologie & weefselkweek

Deze groep werkt aan de ontwikkeling van methodes die het veredelingsproces kunnen **versnellen**, **aanvullen** of **ondersteunen**.

Activiteiten van de afdeling

Versnellen van de veredeling:

1. Vegetatieve vermeerdering en instandhouding (kool, cichorei, asperge en prei)

   Soms: het redden van zieke maar belangrijke planten

2. Antherencultuur & microsporencultuur bij kool, ui, asperge en pepers: versnelde inteelt (= DH techniek)

3. Embryo rescue (ui)

4. Andere celbiologische technieken

Instandhouding en vermeerdering

Doel: het behouden en vermeerderen van **geselecteerde** planten uit proefvelden wereldwijd







Instandhouding en vermeerdering

Vermeerdering van prei en asperge voor zaadproductie (virus/ziektevrij materiaal!)



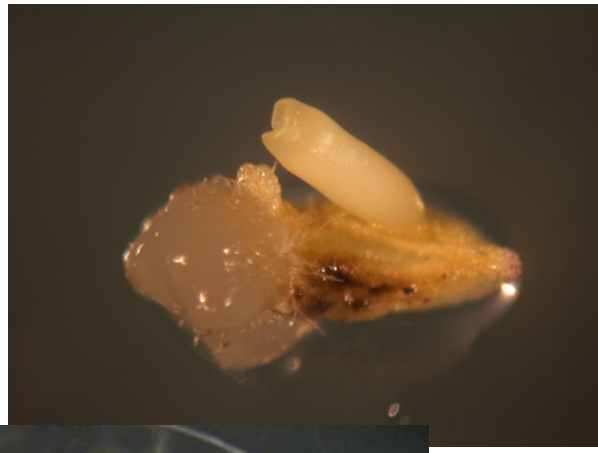


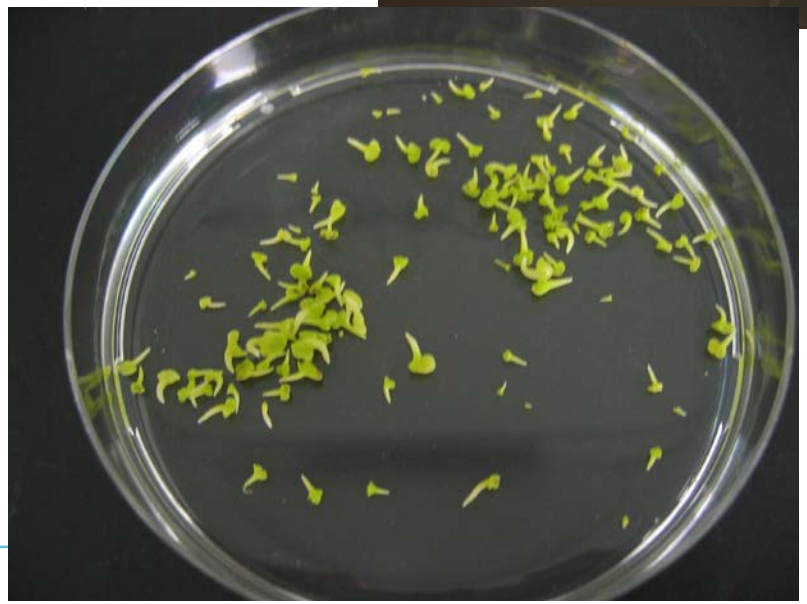


Antheren- en microsporen cultuur (DH)

Een hybride ontstaat uit 2 (homozygote) inteeltlijnen.

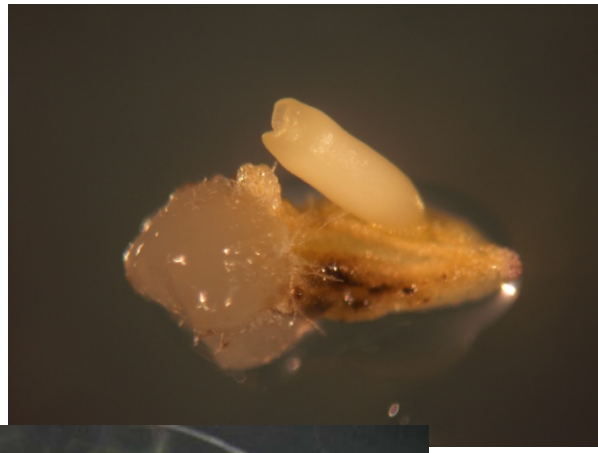
Wij ondersteunen hier met **versnelling** via de uitgroei van een stuifmeelkorrel of eicel tot een uniforme, 100 % ingeteelde plant.



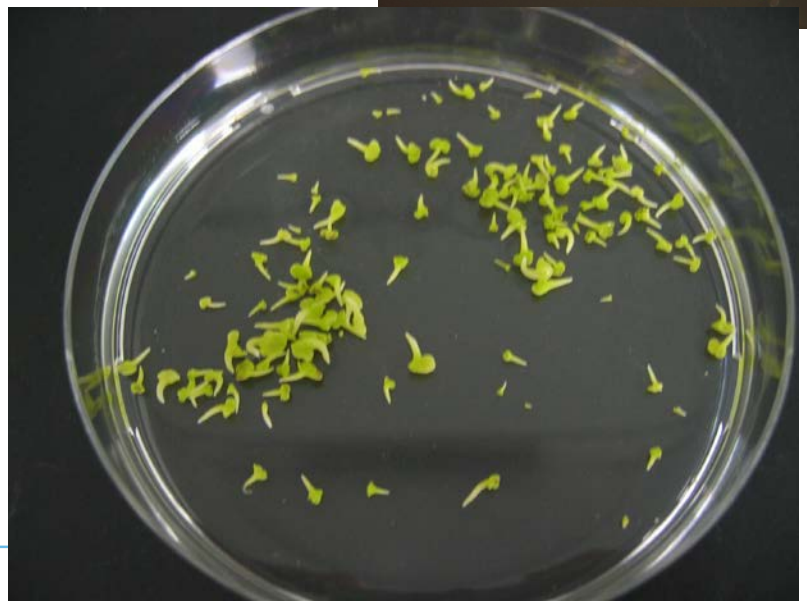


Antheren- en microsporen cultuur (DH)

Iedere plant ontstaat hierbij uit één geslachtscel met één stel chromosomen.



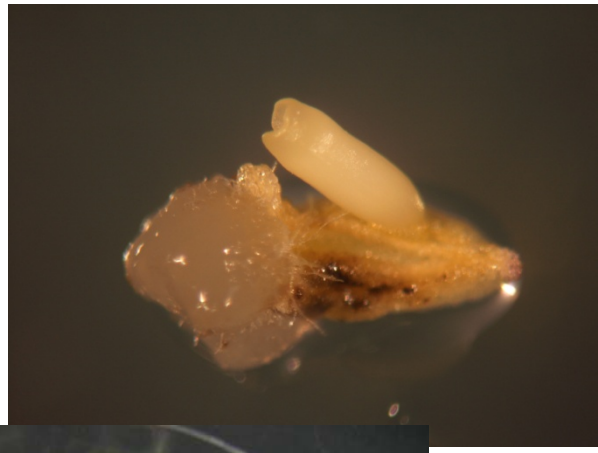
Het aantal chromosomen verdubbelt vaak vanzelf zodat de plant genetisch 100 % zuiver (homozygoot) is.

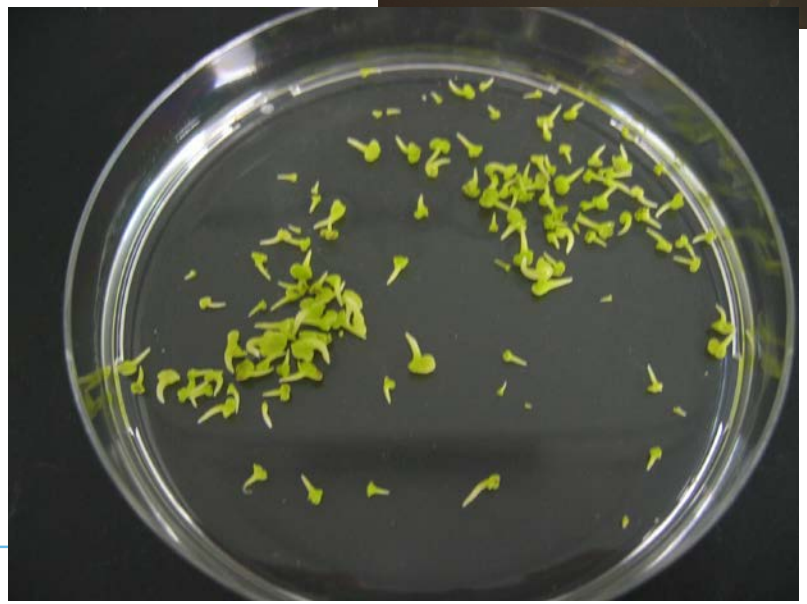


Antheren- en microsporen cultuur (DH)

Ieder jaar leveren we hierbij vooral DH kool, asperge en enkele andere, kleinere gewassen af.

Al deze planten zijn gecontroleerd op chromosoomaantal.

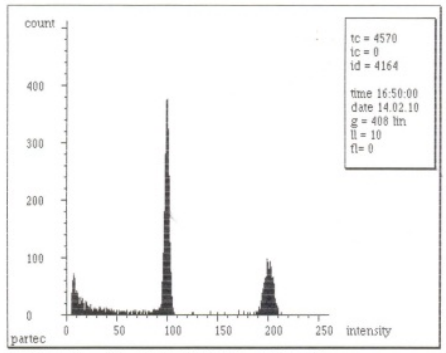


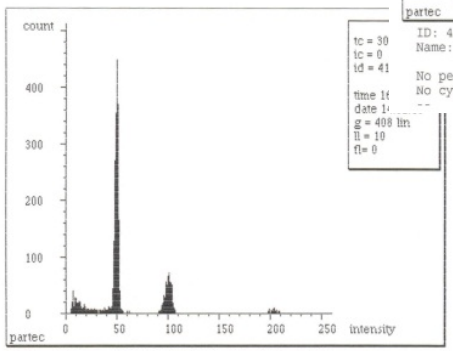


Meting chromosoomaantal

- Dit gebeurt met een “flowcytometer”
- Een <u>klein</u> stukje blad wordt fijngehakt en een DNA kleurstof toegevoegd
- Meting van 96 monsters per “batch”
- Je kunt heel zeker zien welke planten het juiste, diploïde chromosoomaantal hebben.







Embryo rescue

Doel: bij moeilijk kruisbare soorten het embryo te **“redden”** ten behoeve van bijv. resistentieveredeling

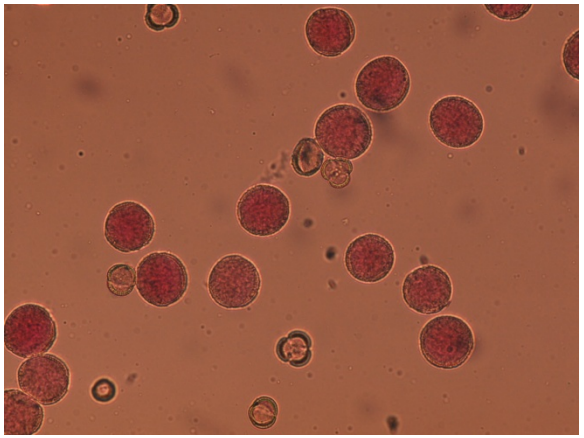




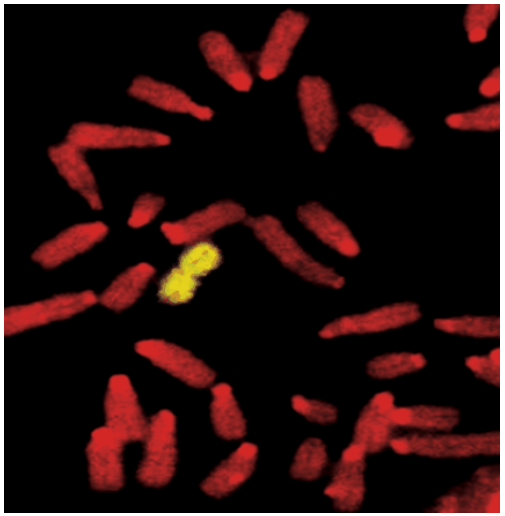
voorbeeld: ui

Celbiologische technieken

Via **microscoop-kleuringen** worden stuifmeelkorrels..



.. en chromosomen onderzocht



Protoplasten
(=cellen zonder celwand)
kunnen tot plant uitgroeien

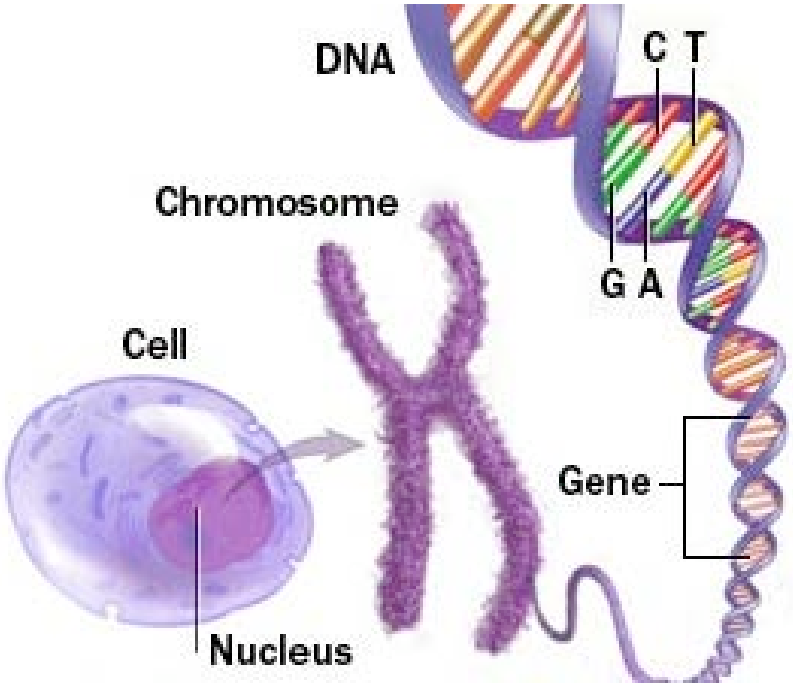


Merkertechnologie & Genomics

Wij werken aan het toepassen van diverse DNA technieken.

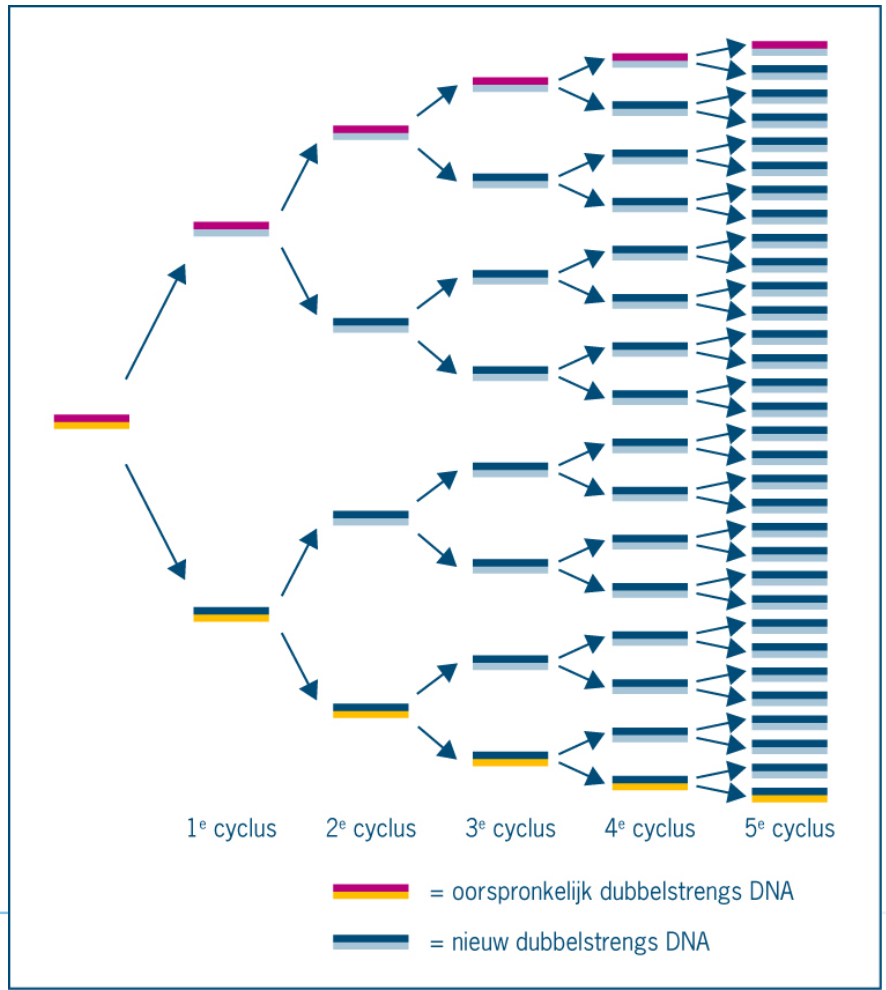
DNA is drager van de informatie die bepaalt hoe plant, dier of mens eruit zien.

Het DNA is georganiseerd in chromosomen; hierop liggen de eigenschappen gecodeerd in de “letters” A, T, G of C.



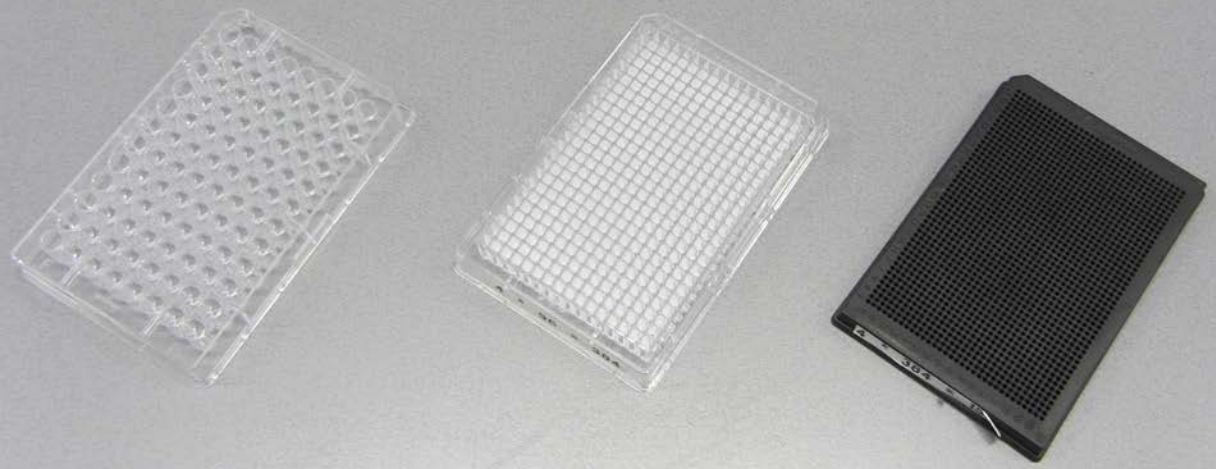
PCR reactie: steeds opnieuw de strengen kopiëren:

Eén streng DNA is niet te zien.
Na 20 rondes verdubbelen met *PCR* heb je 10 miljoen kopieën….
en die zijn dus wèl makkelijk zichtbaar te maken.



Steeds meer, sneller, kleiner

Van 96 naar 384 naar 1536 monsters .....



200 35 10

miljoenste liter volume





De aantallen en kleine volumes zijn niet meer met de hand te verwerken dus: ook robots werken nu bij Bejo!

Merkertechnologie & Genomics

Met ruim 20 personen werken wij aan het toepassen van diverse DNA technieken die:

- het veredelingsproces efficiënter laten verlopen, een proces van 25 jaar ***kan*** verkort worden tot 4 tot 8 jaar. Hierbij volgen we chromosoomfragmenten tijdens het veredelingsproces.

- het mogelijk maken moeilijk te combineren eigenschappen toch samen te brengen in één plant.

- herkennen van stukken chromosoom en bepalen welke eigenschappen daarop liggen (b.v. een ziekteresistentie)

- nieuwe mogelijkheden geven voor de controle van zaadpartijen

Een genenkaart maken van kool





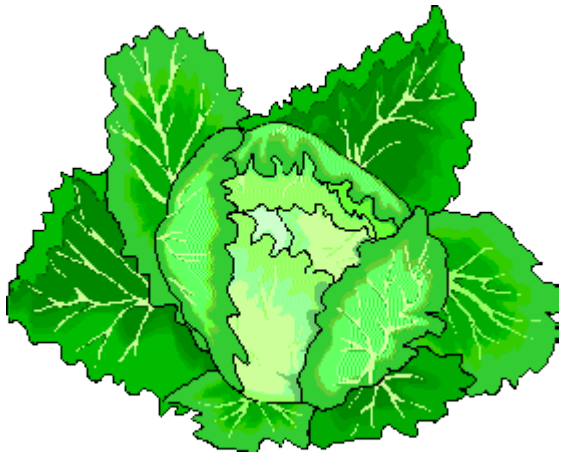
Een genenkaart maken van kool



Meer dan 1.000
“plaatsen” bekend



Een genenkaart maken van kool





Februari 2014: meer dan 10.000 “plaatsen” bekend

Toepassing Veredeling

Ziekteresistentie – voorbeeld:

Bejo wil een ras resistent maken tegen een schimmelziekte die in kool gemiddeld 1 keer per 5 jaar voorkomt.

In een jaar dat de ziekteproef goed lukt, kan via DNA-merkers het chromosoomfragment geïdentificeerd worden waarop de resistentie ligt.

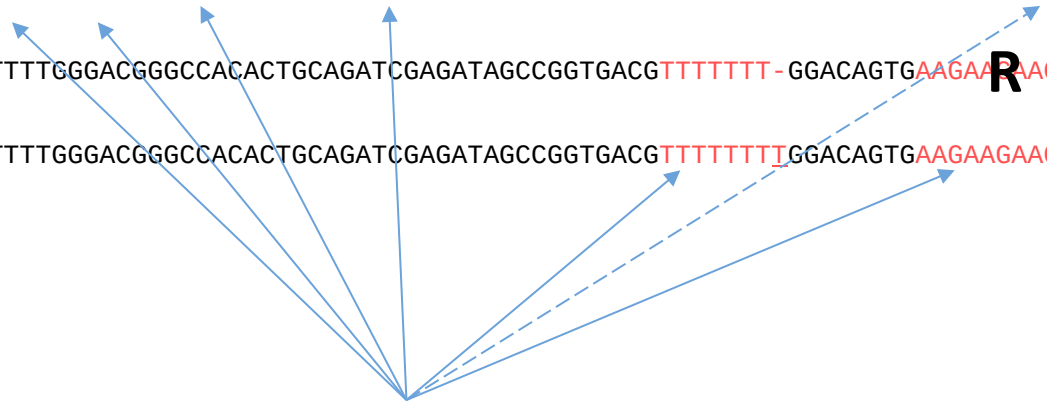
Vanaf dat moment worden door de veredeling alleen planten meegenomen die dit gen hebben. Zo worden nieuwe ouderlijnen en rassen ontwikkeld met deze resistentie.



Merkers: gebruiken van DNA verschillen

PL1 AGCCTTGACCTAGGCGTTAAATTGCCAAGCTTAGGACGTGACGATGACGGTAGGACCCACAGTAGAGAGAGAGAGAG--TGACGGATTACGGATAGGAGTAG

PL2 AGCCTTGCCCTAGCCGTTACATTGCCAAGCTAAGGACGTGACGATGACGGTAGGACCCACAGTAGAGAGAGAGAGAGAGTGACGGATTACGGATAGGAGTAG



Ieder verschil kan een bruikbare merker opleveren

- 1 letter verschil
- een stukje extra
- een stukje verdwenen

Merkers: gebruiken van DNA verschillen

Hoe groot is de kans op toevallig dezelfde volgorde:

AAGATGCAATAC?

Voor iedere letter 4 kansen (A, T, C, G) dus ¼ dat er een A staat bijvoorbeeld.

Voor deze 12 letters op rij is dat ¼ * ¼ * ¼ etc =

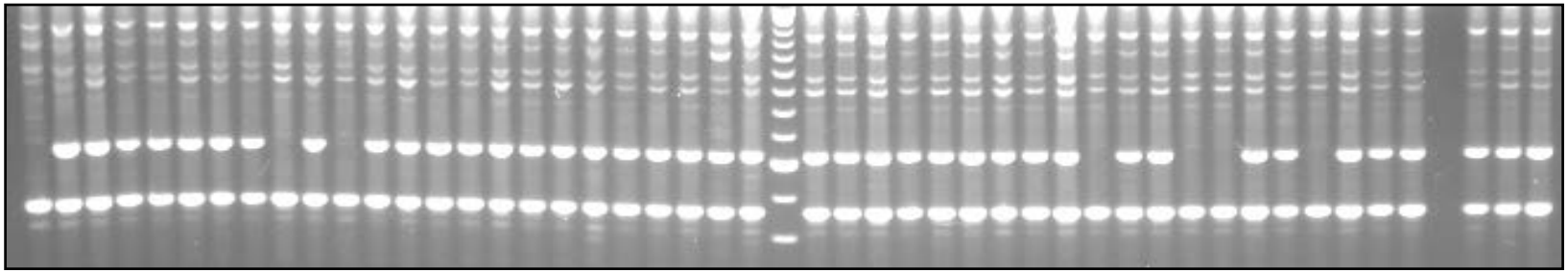
1 op 20 miljoen…

DNA merker

Een **verschil** in het DNA van b.v. twee ouderlijnen kan zichtbaar gemaakt worden met technieken zoals

- DNA-gelelectroforese
- smeltcurve analyse
  - of
- SNP-detectie.

DNA gelelectroforese

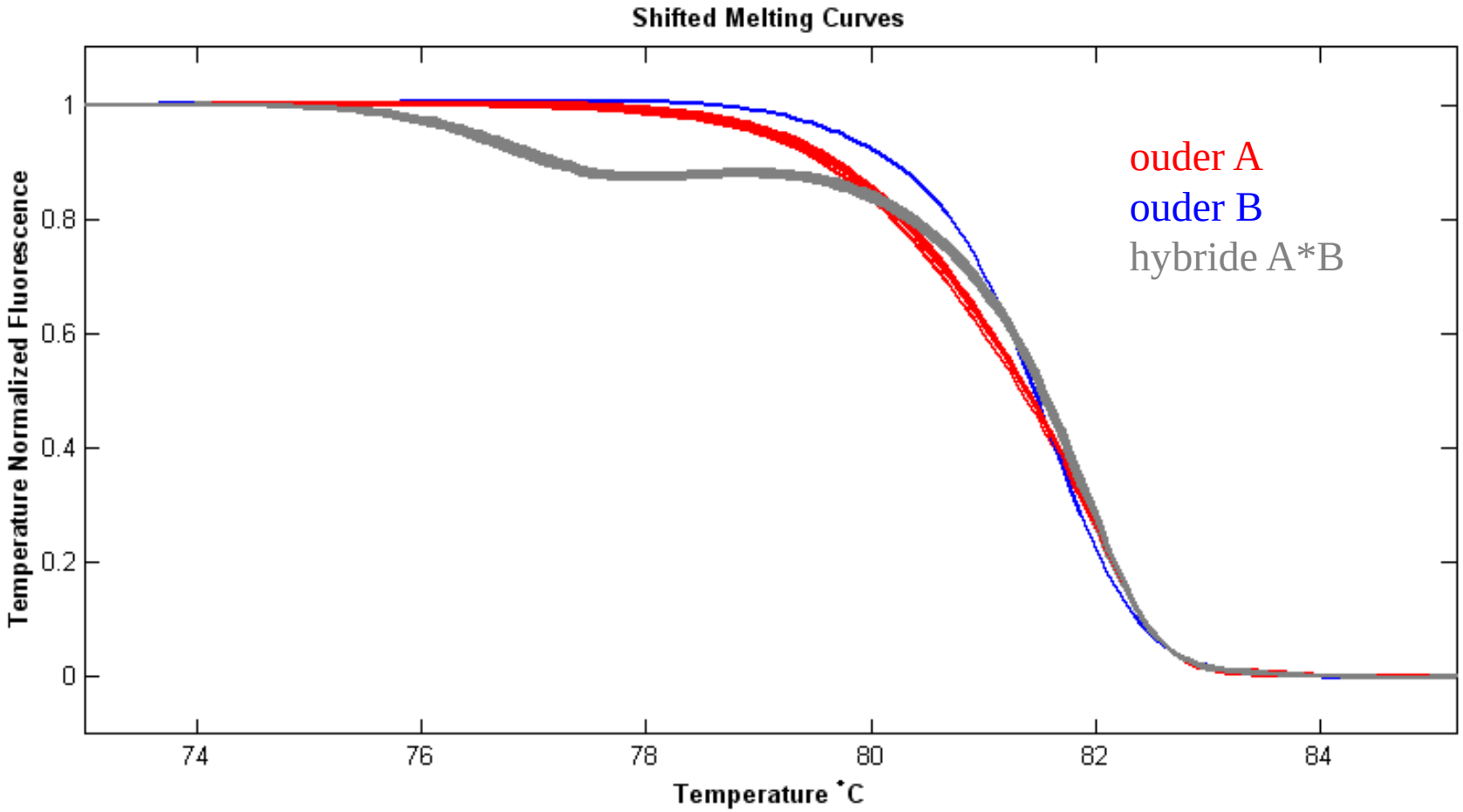


groot

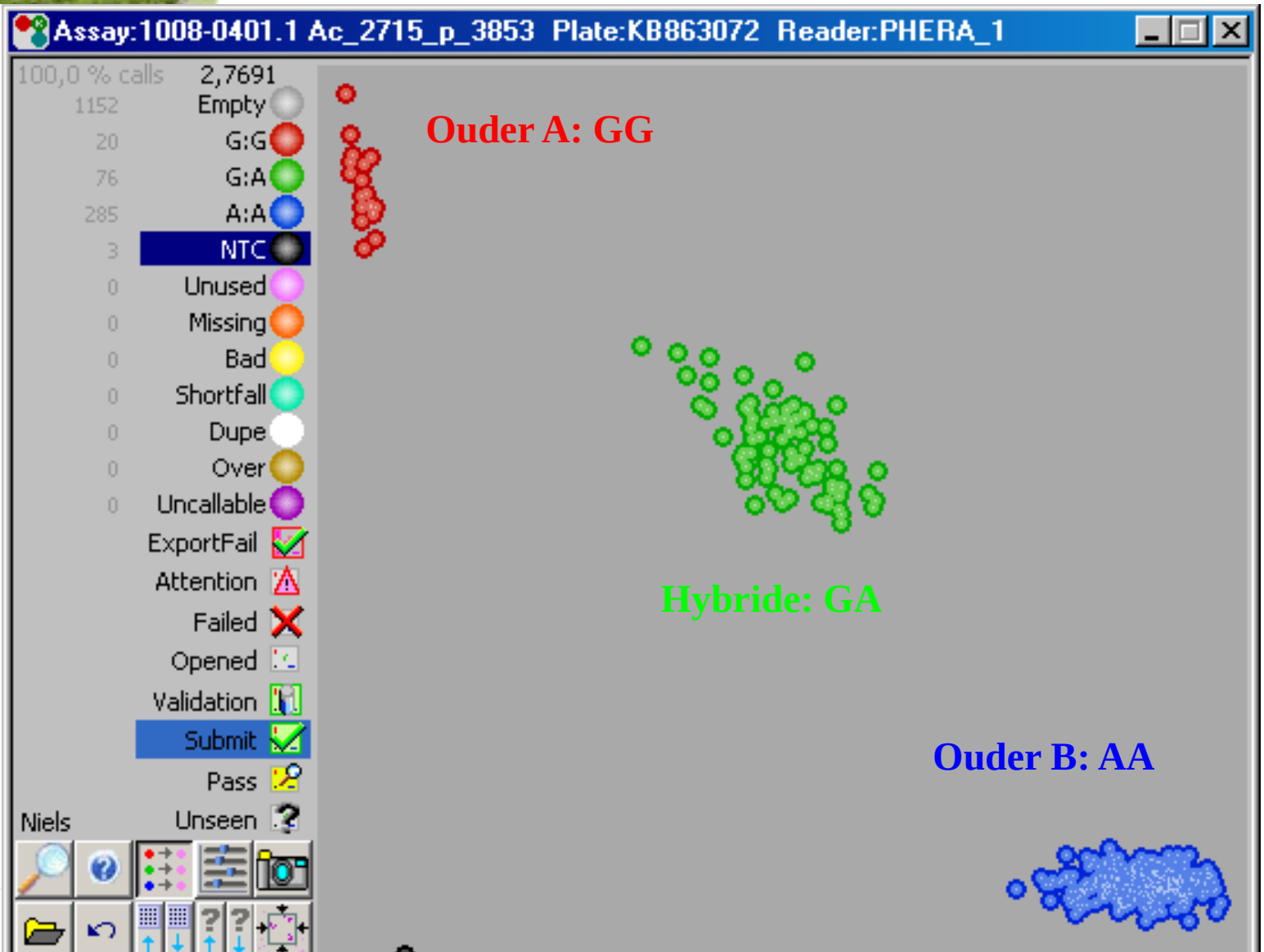
klein

Iedere plant zijn eigen band….

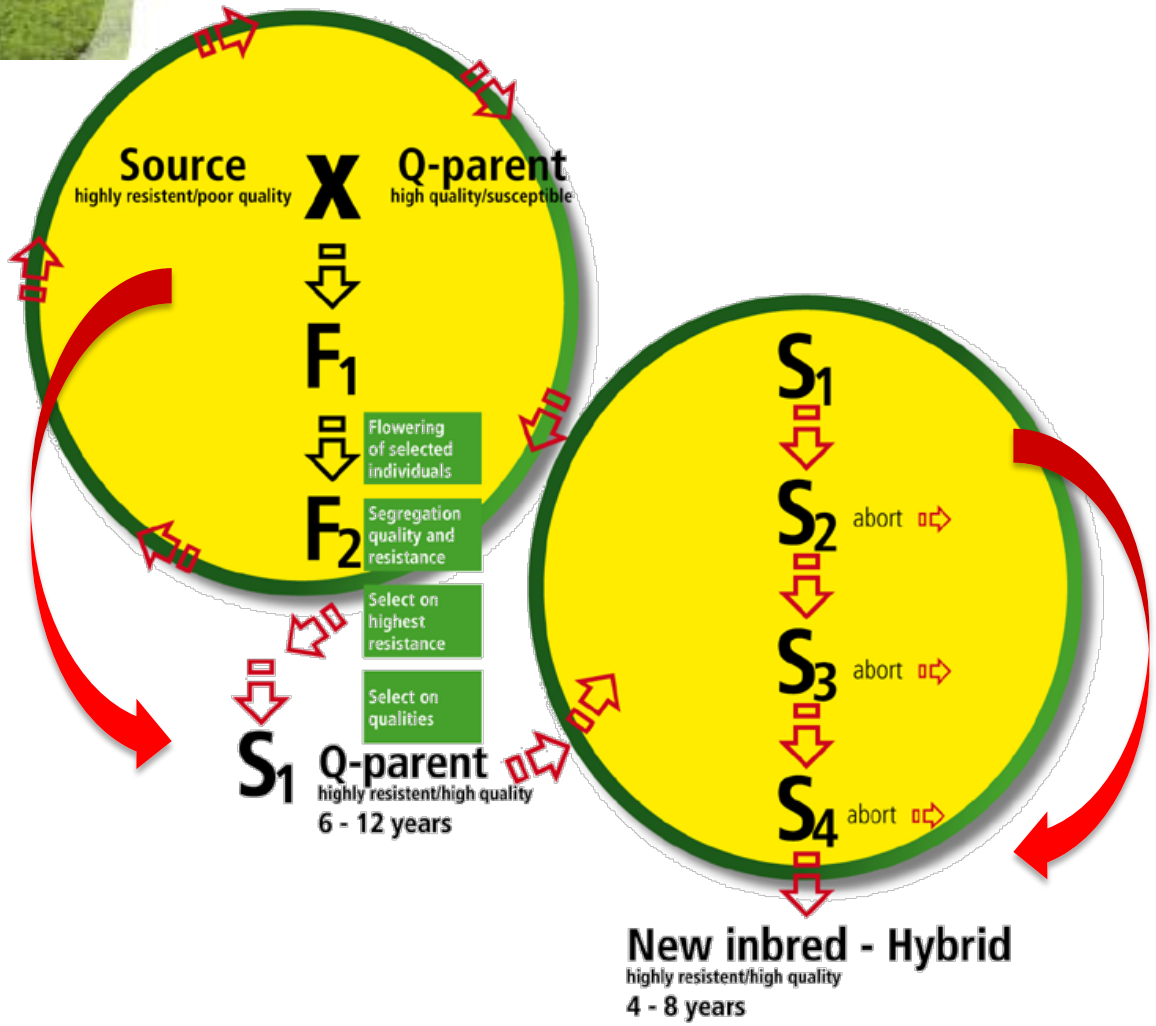
Analyse van een smeltcurve



SNP-analyse


Assay:1008-0401.1 Ac_2715_p_3853 Plate:KB863072 Reader:PHERA_1
100,0 % calls
2,7691
1152 Empty
20 G:G
76 G:A
285 A:A
3 NTC
0 Unused
0 Missing
0 Bad
0 Shortfall
0 Dupe
0 Over
0 Uncallable
ExportFail
Attention
Failed
Opened
Validation
Submit
Pass
Niels
Unseen
Ouder A: GG
Hybride: GA
Ouder B: AA

Gebruik merkers



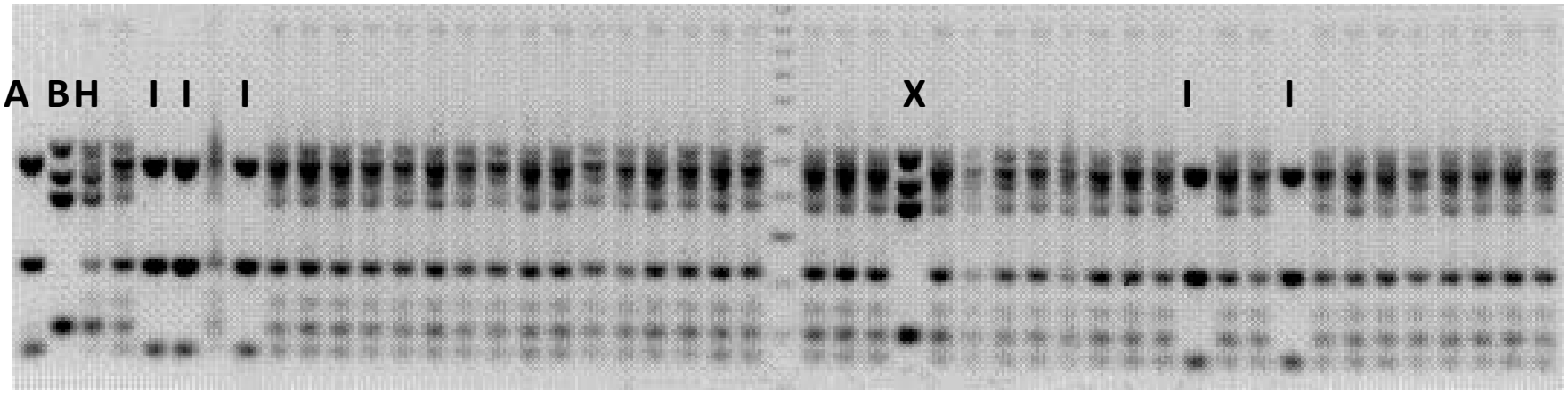
DH techniek

20 jaar – 4 jaar – 4 jaar = 12 jaar

Toepassing kwaliteitscontrole

Op verzoek van de afdeling Voorraad- & Kwaliteit wordt onderzoek gedaan aan partijen zaad. Voor elke partij worden een aantal plantjes geanalyseerd m.b.v. merkers.

Uit de analyse blijkt hoeveel inteelt er in de partij zit (I: moederplant heeft zichzelf bestoven) en of er afwijkende plantjes in zitten (X: bastaard).



Toepassing kwaliteitscontrole

Een net geproduceerde partij wortelzaad kan in het veld nog niet op kwaliteit (identiteit) gecontroleerd worden.

M.b.v. merkers kan deze partij onderzocht worden en is de identiteit gecontroleerd. Daarna kan er zaad van worden verkocht.

Aspergeplanten zijn mannelijk (MM of Mm) of vrouwelijk (mm); m.b.v. DNA merkers kan het geslacht worden bepaald (snel, bloei –in het 2^{e} jaar- hoeft niet afgewacht)

Bepalen van ~60 S-allelen in kool

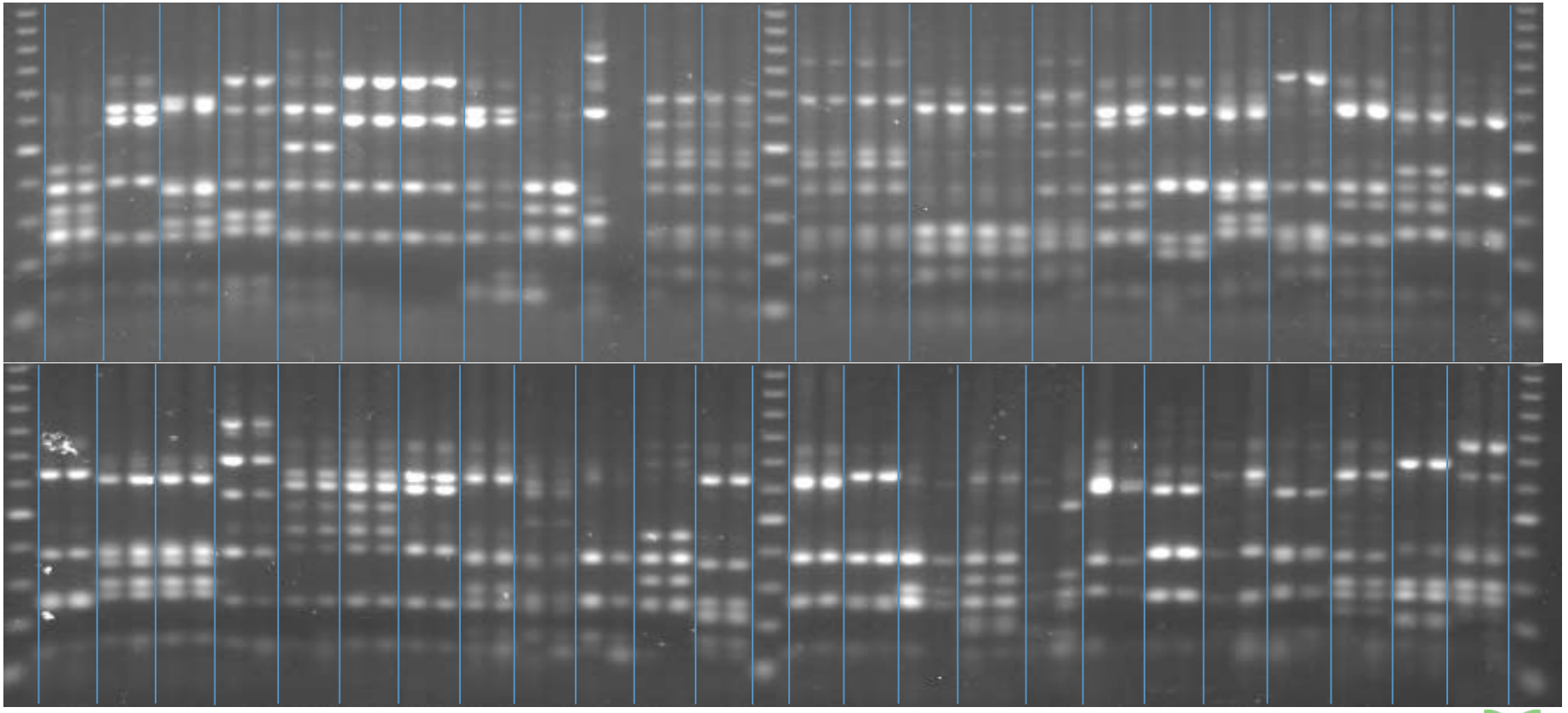
De S factoren bepalen welke soorten kool wel/niet kruisbaar zijn, er zijn zeker 60 verschillende te onderscheiden (!)

Belangrijk voor het maken van hybriden, zelfbestuiving uitsluiten

“Vroeger” werd dit met een grote reeks testkruisingen bepaald; wachten op wel/geen zaadzetting; veel mensen nodig

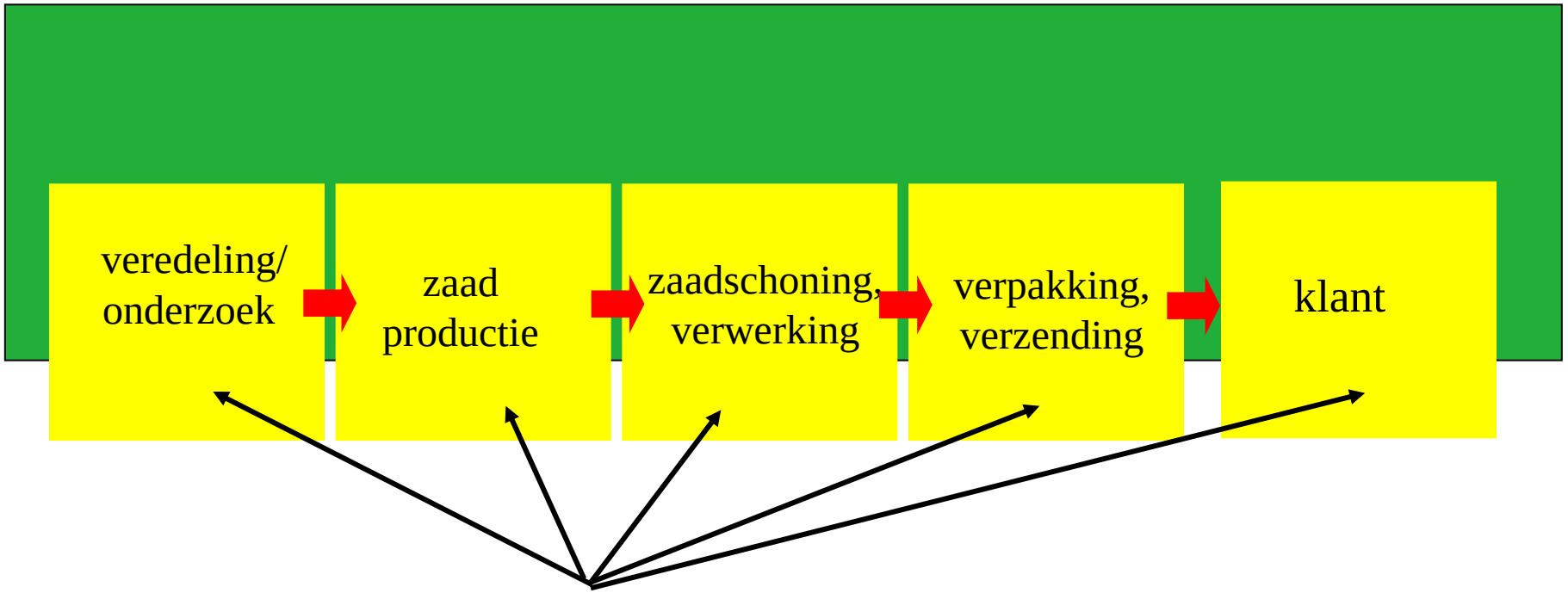
Nu is er een snelle en betrouwbare DNA test beschikbaar:

Bepalen van ~60 S-allelen in kool



Iedere S factor heeft een eigen “streepjescode”

Kwaliteitscontrole door de hele keten



DNA merkers geven de mogelijkheid om de identiteit van plantmateriaal (zaad, zaailing, bloem, blad, wortel…) door de hele keten te controleren

Diagnose zaad

- Inzet PCR merkers voor partijcontrole
  - snel, gevoelig
- Vaststellen of er virus aanwezig is
  - gevoeliger dan Elisa
  - zeer specifieke sequentie
- Determinatie van een aangetroffen bacterie of schimmel
  - niet ieder organisme hoeft pathogeen te zijn!



That's bejo quality