



iholland
hogeschool

People Plants Possibilities

lectorale rede
Dr. C.M. Kreike

People Plants Possibilities

Dr. C. M. Kreike

Publicatie bij de rede, uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt als lector Green Biotechnology aan Hogeschool Inholland te Amsterdam op 20 mei 2015 door Dr. C.M. Kreike.

Omslagfoto: © Michael Gäbler

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Polished_slice_of_petrified_wood.jpg

CC-by-3.0

Self-made Scan with "Epson Perfection 4490 Photo" from the middle part (size 15,34 × 18,04 cm) of a polished slice of petrified wood from Arizona.

Copyright © 2015 Hogeschool Inholland

Alle rechten voorbehouden. Niets van deze uitgave mag worden vermenigvuldigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt worden, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opname of op enige andere manier, zonder vooraf schriftelijke toestemming van de uitgever: Hogeschool Inholland.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van artikel 16b en 17 Auteurswet 1912 dient met de daarvoor wettelijke vergoeding te voldoen aan Stichting Reprorecht, Postbus 882, 1180 AW Amstelveen. Voor het overnemen van een of enkele gedeelte(n) uit deze uitgave in bloemlezing, readers of andere compilatiewerken dient men zich tot de uitgever te wenden.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without prior permission of the publisher.

ISBN/EAN: 978-90-77812-48-8

If you are planning for a year, sow rice;
if you are planning for a decade, plant trees;
if you are planning for a lifetime,
educate people – chinese proverb

Inhoud

1. Inleiding	8
Aanleiding	8
Werkveld	8
Vakgebied moleculaire veredeling en groene biotechnologie	9
2. Lectoraat Green Biotechnology	10
Missie	10
Doelstellingen	10
Keuze voor techniek	12
Samenwerkingsverbanden	13
3. People	15
Versterking van het onderwijs	15
Onderwijsvernieuwing	15
Onderzoek in het onderwijs	16
Cursus 'Novel Breeding Tools'	17
4. Plants	19
Modelplant petunia	19
Technologische ontwikkelingen	21
Een groene revolutie	21
Moleculaire plantenveredeling: moleculaire merkers en merker gestuurde selectie	22
Moleculaire plantenveredeling: DNA sequencen	24
Groene biotechnologie: genetische modificatie en genoom editing	27
5. Possibilities	30
Uitvoering van het onderzoek	30
Onderzoeksprogramma	31
Praktijkgericht onderzoek	31
Innovatief onderzoek en techniek ontwikkeling	32
6. Toekomst: 'Design your own plant'	36
7. Lijst met afkortingen	38
8. Referenties	39
Een leven met planten	44
Dankwoord	47

1. Inleiding

Aanleiding van het lectoraat

Het lectoraat Green Biotechnology is ontstaan naar aanleiding van de vraag uit het bedrijfsleven om de mismatch tussen onderwijs en arbeidsmarkt te verkleinen. Deze bedrijfstak van de zaadtechnologie en plantenveredeling is zeer specialistisch, gebruikt 'high tech' methoden en is zeer succesvol in Nederland. De bedrijven uit de Seedvalley, zoals Enza Zaden, Bejo Zaden en Syngenta Seeds, maar ook de Greenports Aalsmeer, Noord-Holland Noord, Zuid Holland, de Universiteit van Amsterdam en de Amsterdam Economic Board (Kerngroep Tuinbouw) onderstrepen deze noodzaak; er is een groot tekort aan 'groene biotechnologen' die in deze sector kunnen werken. Dit tekort heeft deels te maken met de snelle ontwikkelingen in het vakgebied van de moleculaire veredeling en groene biotechnologie, deels met het imago van de sector en deels met onvoldoende praktijkgerichte kennis op HBO niveau. Vanwege deze laatste reden hebben bovengenoemde organisaties en bedrijven samen met Hogeschool Inholland een aanvraag ingediend voor een Groene Plus Lectoraat 'Green Biotechnology'. Het lectoraat Green Biotechnology heeft als doel een bijdrage te leveren aan de versterking van de duurzame concurrentiepositie van de zaadtechnologie- en plantenveredelings-bedrijven. Dat kan enerzijds door het opleiden van gekwalificeerd HBO personeel en anderzijds door het uitvoeren van onderzoek.

Werkveld

Het Nederlandse plantenveredelings-bedrijfsleven is te verdelen in twee sectoren, de groenteveredeling en de sierteeltveredeling. Internationaal staan de Nederlandse zaad- en groente-veredelingsbedrijven aan de top, mede door de toepassing van de nieuwste moleculaire technieken in hun veredelings-programma's. Deze bedrijfstak heeft een zeer innovatief onderzoeksprogramma om de sterke concurrentie positie in de toekomst te kunnen blijven behouden. Ook de sierteelt veredelingsbedrijven uit Nederland hebben een leidende positie in de internationale markt. Deze toppositie is juist gebaseerd op een brede kennis van teeltmanagement. De nieuwste technieken op het gebied van de moleculaire plantenveredeling worden, anders dan in de groenteveredeling, in de veredeling van siergewassen nog maar weinig toegepast. Het gevaar bestaat dat de sierteelt veredelingsbedrijven deze huidige goede positie zouden kunnen verliezen als ze niet in deze nieuwe technologieën investeren.

Vakgebied moleculaire plantenveredeling en groene biotechnologie

In het vakgebied van de moleculaire plantenveredeling en groene biotechnologie wordt nieuwe kennis met betrekking tot de moleculaire biologie, plantenfysiologie, genetica, bio-informatica, celkweektechnieken en applicatietechnologie ontwikkeld en toegepast. Een moleculaire plantenveredelaar kan je omschrijven als iemand die DNA technieken gebruikt om de juiste plant te selecteren en zo sneller tot een verbeterd gewas te komen. Een groene biotechnoloog is iemand die in staat is, door het DNA van een plant te modificeren, om een product of proces te veranderen en beter te maken. Het is duidelijk dat deze twee vakgebieden veel overeenkomst vertonen, beiden zijn bezig met productverbetering ten behoeve van de plantenveredeling en beiden doen dat via moleculaire DNA technieken.

In het vakgebied van de moleculaire veredeling en groene biotechnologie hebben de laatste jaren vele ontwikkelingen plaatsgevonden en nieuwe technieken hun intrede gedaan. Deze innovaties worden snel in het veredelingsproces geïntegreerd en dat maakt dit vakgebied op dit moment zo interessant en dynamisch. Het is aan de lector Green Biotechnology deze ontwikkelingen voor de beroepspraktijk te signaleren en deze in het onderwijs van de opleiding en onderzoek in het lectoraat te integreren. Ik ben van mening dat de toekomstige HBO analist bedreven moet zijn met het toepassen van de nieuwste DNA technieken en begrip moet hebben van de processen in de plant, die van belang zijn voor de veredeling van nieuwe, verbeterde gewassen. De HBO analist die straks afstudeert als moleculaire plantenveredelaar/groene biotechnoloog kan dan aan de slag bij de zaadveredelings- en plantenveredelingsbedrijven, of gaan werken aan de universiteiten en instituten waar meer fundamenteel plantenonderzoek plaatsvindt.

In de volgende hoofdstukken zal ik de missie en doelstellingen van het lectoraat kort beschrijven en mijn plannen voor het onderwijs en onderzoek uiteenzetten. In Hoofdstuk 2, **Lectoraat Green Biotechnology**, wil ik de algemene lijnen voor de versterking van het onderwijs en onderzoek uiteenzetten. Hoe het onderwijs versterkt kan worden, zal ik bespreken in Hoofdstuk 3, **People**. Daarnaast is het voor het biologisch onderwijs en onderzoek gewenst om aan een modelgewas te werken. Welke keuze ik gemaakt heb beschrijf ik in hoofdstuk 4, **Plants**. In datzelfde hoofdstuk geef ik tevens een kort historisch overzicht van de beschikbare DNA technieken, die gebruikt worden in het vakgebied van de moleculaire veredeling en groene biotechnologie. In hoofdstuk 5, **Possibilities**, zal ik de DNA technieken die ik van belang vind voor het onderwijs van de opleiding Biotechnologie en de gekozen onderzoeksthema's van het lectoraat toelichten. Bovendien zal ik het voorgenomen onderzoeksprogramma van het lectoraat Green Biotechnology presenteren. Tenslotte zal ik in hoofdstuk 6, **Toekomst**, een kijkje in de keuken willen laten zien van wat er in de toekomst nog meer mogelijk is.

2. Lectoraat Green Biotechnology

In dit hoofdstuk beschrijf ik de missie van het lectoraat Green Biotechnology en zal ik de doelstellingen voor de versterking van het onderwijs en onderzoek door het lectoraat kort uiteenzetten. Vervolgens zal ik mijn keuze voor de focus in het onderzoek van het lectoraat op het ontwikkelen en toepassen van DNA technieken bespreken. Tenslotte zal ik de samenwerkingsverbanden met verschillende partijen aangeven.

Missie

Het lectoraat heeft als doel een bijdrage te leveren aan de versterking van de duurzame concurrentiepositie van de zaadtechnologie- en plantenveredelingsbedrijven. Dat kan enerzijds door het opleiden van gekwalificeerd HBO personeel en anderzijds door het uitvoeren van onderzoek.

Het opleiden van gekwalificeerd personeel voor het veredelingsbedrijfsleven is mogelijk door het plantenonderwijs te blijven innoveren en door studenten in hun opleiding in contact te laten komen met en te enthousiasmeren voor het planten(veredelings)onderzoek. Als lector ben ik nauw betrokken bij de innovatie van het plantenonderwijs en het initiëren van het onderzoek. Hieronder volgt een uiteenzetting van de doelstellingen die ik als lector gesteld heb voor het lectoraat Green Biotechnology ten aanzien van het plantenonderwijs en -onderzoek van de opleiding.

Doelstellingen voor het onderwijs

- *Introductie van een modelplant ten behoeve van het onderwijs en onderzoek.*
Allereerst moet een bruikbare modelplant uitgekozen worden ten behoeve van de verdelingssector voor groente, fruit, planten en bloemen. Deze modelplant wordt geïntroduceerd in het plantenonderwijs en in het onderzoek. Ik ben op zoek naar een pre-competitieve modelplant die breed inzetbaar is.
- *Innovatie van het onderwijs: introductie van het vakgebied van de moleculaire plantenveredeling en groene biotechnologie in het curriculum*
Nadat de modelplant is gekozen, wil ik deze invoeren in het onderwijs en zo de nieuwste DNA technieken in het onderwijs introduceren. Deze innovatie van het onderwijs zorgt voor meer herkenbaarheid van de moleculaire plantenveredeling en groene biotechnologie in het curriculum en zorgt tevens voor een betere aansluiting van de HBO-er op het werkveld.
- *Opzetten van een doorlopende leerlijn van MBO - HBO - WO*
Tijdens de innovatie van het onderwijs zal ik ook de aansluiting van het groene MBO op het HBO onderwijs en de aansluiting van het groene biotechnologie HBO onderwijs op de groene WO opleidingen nagaan en waar nodig verbeteren.

- *Kenniscirculatie en opzetten van bij- en na- scholingscursus voor het veredelingsbedrijfsleven*

Een belangrijke doelstelling is de verspreiding van de kennis omtrent nieuwe technologieën naar het bedrijfsleven. Dat kan via publicaties en lezingen maar ook via scholingsactiviteiten voor het bedrijfsleven.

Ik zal een actieve rol blijven spelen bij het onderwijs, door deel te nemen in de curriculumcommissie, betrokken te zijn bij de actualisering en verdere vernieuwing van het onderwijsprogramma, en door het verzorgen van colleges en masterclasses.

Doelstellingen voor het onderzoek

Het onderzoek binnen het HBO valt mijns inziens uiteen in twee niveaus. Ten eerste is er het praktijkgerichte onderzoek waarin verschillende DNA technieken toegepast worden om vragen uit het bedrijfsleven op te lossen. Via het praktijkgerichte onderzoek wordt de verbinding tussen het onderwijs en het bedrijfsleven versterkt. Ten tweede is er het innovatieve onderzoek waarin nieuwe technieken geoptimaliseerd en uitgetest worden en waarmee een brug geslagen wordt tussen het fundamentele onderzoek aan de universiteiten en het toegepaste onderzoek binnen het bedrijfsleven. Deze techniekontwikkeling is pre-competitief van aard en uiteindelijk gericht op toepassing in de plantenveredeling.

Hieronder volgt een uiteenzetting van de doelstelling die ik als lector gesteld heb voor het opzetten van het plantenonderzoek:

- *Creëren van een onderzoek omgeving waarin studenten hun vakbekwaamheid kunnen verhogen.*

Studenten vinden het enorm stimulerend om zelfstandig onderzoek uit te kunnen voeren en om zo hun vakbekwaamheid te vergroten. Bij het onderzoek hoort ook regelmatig overleg, het geven van presentaties en het houden van discussies tijdens werkbesprekingen en bijeenkomsten. Zo kan een levendige en inspirerende onderzoekomgeving voor deze jonge professionals gecreëerd worden.

- *Uitvoeren van praktijkgericht onderzoek en opzetten van de werkplaats moleculaire veredeling*

Voor het uitvoeren van praktijkgericht onderzoek voor het bedrijfsleven wil ik de werkplaats moleculaire veredeling opzetten. In deze werkplaats kunnen studenten en docenten meer ervaring opdoen in het uitvoeren van toegepast onderzoek en kan het bedrijfsleven zijn onderzoeksvragen op het gebied van de moleculaire plantenveredeling bij het lectoraat neerleggen.

- *Opzetten van innovatief onderzoek*

In het onderzoek binnen het lectoraat Green Biotechnology wil ik me richten op de ontwikkelingen en optimalisatie van DNA technieken, met het uiteindelijke doel de toepassing van deze nieuwe technieken in de plantenveredeling. Via dit innovatieve onderzoek kan kennis uit het fundamentele onderzoek van de universiteiten doorvertaald worden naar het toegepaste onderzoek in het bedrijfsleven.

– *Professionalisering van de docenten*

De snelle ontwikkelingen in het vakgebied van de moleculaire plantenverdeling en groene biotechnologie maken dat ook docenten zich blijvend moeten ontwikkelen. Dit kan gerealiseerd worden door de docenten cursussen te laten volgen, deel te laten nemen aan congressen en door ze mee te laten werken aan toegepast of innovatief onderzoek.

Ik wil een bijdrage leveren aan de kenniscirculatie tussen onderzoek en beroepspraktijk, door het schrijven van publicaties in wetenschappelijke of vakinhoudelijke of publieke tijdschriften en het presenteren van de resultaten van ons onderzoek in seminars en lezingen voor het bedrijfsleven.

Samenvattend is het mijn doel om tezamen met de studenten onderzoek uit te voeren voor het bedrijfsleven. De kennis die daaruit voortkomt wordt weer geïntegreerd in het onderwijs wat op deze manier up-to-date blijft. De studenten zijn door het uitvoeren van onderzoek op de hoogte van de nieuwste kennis en ontwikkelingen en bezitten de juiste vaardigheden bij hun afstuderen om de overstap te kunnen maken naar het veredelingsbedrijfsleven, het fundamentele plantenonderzoek of hun vervolg Master opleiding.

Keuze voor techniek

Ik ben van mening dat de opleiding van HBO analisten vooral praktisch van aard moet zijn en gericht moet zijn op het kunnen toepassen van een breed scala aan technieken waarmee de professional straks aan vele verschillende onderzoeksonderwerpen kan werken. De technieken van het vakgebied van de moleculaire veredeling en groene biotechnologie bevinden zich op het snijvlak van de moleculaire biologie, de biotechnologie en de genetica. Deze technieken vormen de gereedschappen, 'Tools', om verschillende onderwerpen, 'Topics', mee te kunnen bestuderen en te veranderen ten behoeve van de plantenveredeling. Voorbeelden van deze 'Topics' zijn, groei en ontwikkeling, metabolisme, abiotische stress, en interactie van planten met andere organismen. Dit fundamentele onderzoek aan deze 'Topics' gebeurt merendeels aan de wetenschappelijke kennisinstellingen.

In het lectoraat wil ik me juist richten op het ontwikkelen en toepassen van 'Tools' en dan met name de DNA technieken, die gebruikt worden in het vakgebied van de moleculaire veredeling en biotechnologie. Via de 'Tools' wil ik tevens een verbinding maken tussen het fundamentele onderzoek aan de universiteiten en het toegepaste onderzoek binnen de bedrijven (figuur 1).

Zoals hierboven al beschreven zie ik een verschil tussen het praktijkgerichte onderzoek, waarin het toepassen van bestaande technieken centraal staat, en het innovatieve onderzoek, waarin gewerkt wordt aan de ontwikkeling van nieuwe technieken. Het praktijkgerichte onderzoek vindt plaats binnen de werkplaats moleculaire veredeling en het innovatieve onderzoek binnen het lectoraat zelf.



Figuur 1: De rol van het onderzoek van het lectoraat als schakel tussen het fundamentele onderzoek en het toegepaste onderzoek.

Ik zal een keuze moeten maken van de DNA technieken die gebruikt zullen gaan worden in het praktijkgerichte en innovatieve onderzoek van het lectoraat. Sommige technieken zijn te kostbaar om binnen het HLO uit te kunnen voeren, vooral als er specialistische apparatuur bij nodig is. Aanschaf en onderhoud van deze apparatuur is een dure aangelegenheid en het is dan beter om samenwerking te zoeken met instellingen of universiteiten die deze apparatuur wel in huis hebben. Mijn uiteindelijke keuze voor het gebruik van de verschillende DNA technieken voor het onderzoek staat beschreven in het volgende hoofdstuk Plants waarin ik een kort historisch overzicht geef van snelle ontwikkelingen en de hoeveelheid aan DNA technieken in het vakgebied van de moleculaire veredeling en groene biotechnologie.

Samenwerkingsverbanden

Er zijn van oudsher goede contacten tussen de opleiding Life Sciences & Chemistry en de grote veredelingsbedrijven uit de Seedvalley, zoals ENZA, Bejo, Incotec, Monsanto en Syngenta, Deze bedrijven hebben een zeer innovatieve bedrijfscultuur en zijn gespecialiseerd in het toepassen van moderne veredelingstechnieken. Samen met deze bedrijven is het mogelijk om innovatief onderzoek uit te voeren en nieuwe technieken te ontwikkelen die de veredeling vooruit helpen. Kleinere bedrijven komen juist met meer praktische vragen en deze kunnen via de werkplaats moleculaire veredeling en werkplaats analyse (van de opleiding Chemie) beantwoord worden. Het is de taak van de lector om samen met de docenten het netwerk van deze bedrijven verder uit te breiden en onderzoeksprojecten op te zetten.

Daarnaast wordt er contact gezocht met nieuwe markten zoals de bedrijven uit de sierteeltveredeling, waar de moleculaire veredeling en groene biotechnologie nog in de kinderschoenen staan. Mogelijk dat we al wel vraagstukken voor deze bedrijven kunnen oplossen omdat ze zelf de DNA technieken, die hiervoor nodig zijn, nog niet in huis hebben. Om deze bedrijven op de hoogte te brengen van de

mogelijkheden van de nieuwe DNA technieken voor de veredeling, ga ik samen met de Universiteit van Amsterdam (UvA) en de Amsterdam Economic Board en Greenport Aalsmeer, de cursus 'Novel Breeding Tools' opzetten.

Er is zijn ook samenwerkingsverbanden opgezet met de wetenschappelijke kennisinstellingen, zoals de Universiteit van Amsterdam, de Vrije Universiteit (VU) en de Wageningen Universiteit and Research centre (WUR), voor het uitwisselen van onderwijsmateriaal, voor het geven van gastcollege over interessante 'Topics', voor het uitwisselen van studenten om met specialistische apparatuur te kunnen werken (Green Student Lab, UvA) en voor het opzetten van innovatief onderzoek binnen het lectoraat. De oprichting van de Amsterdam Green Campus in de toekomst zal deze samenwerking verstevigen.

Binnen Hogeschool Inholland zoek ik samenwerking met de werkplaats Analyse van de opleiding Chemie en met andere studierichtingen, zoals de opleiding Tuinbouw & Agribusiness en Food Commerce & Technology. Op het gebied van curriculumontwikkeling en onderzoek zoek ik ook samenwerking met andere HBO instellingen die een vergelijkbaar onderwijs hebben, zoals de Hogeschool van Arnhem en Nijmegen waar de specialisatie Moleculaire Plantenbiologie gegeven wordt. In de toekomst hoop ik dat meerdere HBO instellingen met interesse in de (moleculaire) plantenveredeling zich hierbij aan zullen sluiten.

Het is mijn intentie om deze contacten om te zetten in duurzame samenwerkingsverbanden. Een voorbeeld van een multidisciplinair, meerjarig samenwerkingsverband voor het uitvoeren van innovatief onderzoek, is het PACT (Petunia And CRISPR/Cas Technology) consortium. In dit consortium nemen, naast het lectoraat Green Biotechnology, Wageningen UR Plant Breeding, de Hogeschool van Arnhem en Nijmegen en de veredelingsbedrijven Syngenta, Rijk Zwaan en SciENZA, deel.

3. People

In dit hoofdstuk geef ik mijn visie over hoe ik als lector het onderwijs kan versterken, via onderwijsvernieuwing, het uitvoeren van onderzoek in het onderwijscurriculum en het opzetten van de cursus 'Novel Breeding Tools'.

Versterking van het onderwijs

Van oudsher is er een goede band tussen de opleiding Life Sciences & Chemistry en het bedrijfsleven. Studenten gaan al vroeg in hun studie op excursie bij het bedrijfsleven en de bedrijven bieden de studenten de mogelijkheid om in het derde en vierde jaar stage- en afstudeerprojecten uit te voeren (zie figuur 1). Na hun studie kunnen ze weer als werknemer bij de bedrijven terechtkomen. Het bedrijfsleven heeft daarnaast invloed op het curriculum van de opleiding door aan de beroepenveld commissie deel te nemen. Deze wisselwerking tussen onderwijs en beroepspraktijk vormt de basis van het kwaliteitsbeleid voor het onderwijs en is een belangrijke voorwaarde voor het verzorgen van hoogwaardig onderwijs voor toekomstige professionals.

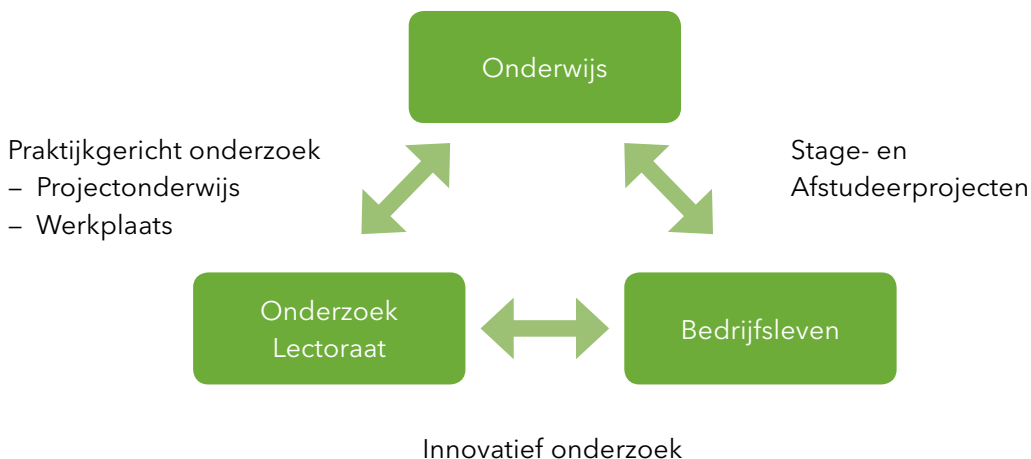
De doelstelling van het lectoraat is het versterken van het onderwijs door middel van onderwijs vernieuwing en het uitvoeren van onderzoek in het onderwijs. In deze paragraaf zet ik uiteen hoe ik dit wil bereiken.

Onderwijsvernieuwing

De onderwijsvernieuwing die ingezet is met behulp van het lectoraat is uitgevoerd met twee doelen in het achterhoofd: Het onderwijs in het tweede jaar moet aansluiten met het groene MBO onderwijs om de doorstroom te verbeteren en in het derde jaar moet het onderwijs verdiepend aansluiten bij de wensen van het werkveld. Er zijn nieuwe theorielessen in het tweede jaar geïntroduceerd met als onderwerp planten-anatomie, genetica, plantengroei en -ontwikkeling. Daarnaast zijn er ook nieuwe praktijklessen aan het tweede jaar toegevoegd zoals weefselkweek en een genetische variatie experiment met moleculaire merkers, dit om de studenten in aanraking te laten komen met de technieken die van belang zijn in de moleculaire veredeling en groene biotechnologie. In het derde jaar wordt de specialisatie minor 'Plantkunde' gegeven en ook hier zijn nieuwe theorielessen en opdrachten in samenwerking met het lectoraat geïntroduceerd over moleculaire achtergronden van groei en ontwikkeling, klassieke veredeling, inhoudsstoffen, moleculaire veredeling en biotechnologie. Daarnaast staan excursies naar de veredelingsbedrijven en het Green Student Lab (UvA) op het programma en zullen de studenten een gastcollege krijgen over plant-pathogeen interacties (UvA).

Als lector zal ik ook een aantal gastcolleges verzorgen, met name over domesticatie en klassieke veredeling van planten, en over de moleculaire veredeling met DNA markers. Tevens ben ik betrokken bij de beoordeling van de eindpresentaties over het toepassen van biotechnologie in de plantenveredeling.

In de voorgaande jaren was het aantal studenten dat afstudeerde binnen de opleiding Biotechnologie, en deelnam aan de specialisatie minor 'Plantkunde', teleurstellend laag, maar 0 tot 4 studenten per jaar. Door de vernieuwing van het onderwijs en de introductie van de modelplant, is de zichtbaarheid en herkenbaarheid van de opleiding groene biotechnologie beter geworden en dat heeft geresulteerd in een toename van het aantal studenten dat de specialisatie minor 'Plantkunde' volgt, naar ongeveer 15 per jaar. Ik hoop, dat als de onderwijsvernieuwing helemaal klaar is en het onderzoek zijn plek in het curriculum gevonden heeft, dat dit aantal zich in de toekomst nog zal verdubbelen.



Figuur 2: Relaties tussen het onderwijs, het bedrijfsleven en het onderzoek van het lectoraat.

Onderzoek in het onderwijs

De werkzaamheden van een HLO analist zijn zeer technisch van aard. De studenten zullen daarom allereerst bepaalde basisvaardigheden en basistechnieken moeten beheersen voordat ze aan het uitvoeren van onderzoek kunnen beginnen. De eerste 1,5 jaar van de opleiding staan in het teken van het verkrijgen van deze basisvaardigheden en de innovaties in het onderwijs met betrekking tot de moleculaire veredeling en groene biotechnologie in het theorie- en praktijkonderwijs staan hierboven beschreven.

In het curriculum is er ook ruimte voor het uitvoeren van onderzoek door de studenten (figuur 2). Dit is een belangrijke kwaliteitsimpuls voor het onderwijs en als lector wil ik de invulling van het onderzoek vorm geven. Halverwege het tweede jaar krijgen de studenten de mogelijkheid om onderzoek te doen in het projectonderwijs. De studenten Biotechnologie werken dan aan deelprojecten van grotere onderzoeksvragen uit het praktijkgerichte onderzoek of uit het innovatieve onderzoek. In veel van deze deelprojecten, die door de lector uitgeschreven worden, komt het modelgewas weer naar voren. Het gaat in deze deelprojecten veelal om optimalisatie van protocollen en het uitvoeren van pilot-experimenten. De studenten voeren dit onderzoek in duo's uit en worden tijdens de praktijklessen begeleid door een docent biotechnologie. Bij de beoordeling van de eindpresentaties van de studenten in dit projectonderwijs ben ik, als expert, betrokken.

In de toekomst is het wenselijk dat het praktijkgerichte onderzoek van de werkplaats moleculaire veredeling een plaats krijgt in het onderwijs van het derde jaar. Ik zou het een aanvulling op het onderwijs vinden als de derdejaars studenten in de werkplaats moleculaire veredeling zelfstandig zouden kunnen werken aan het oplossen van vragen uit het bedrijfsleven. De studenten kunnen zo ervaring opdoen met enkele moleculaire veredelingstechnieken en vraagstukken omtrent genetische variatie, ouder-identificatie, of gen-test ontwikkeling, oplossen met moleculaire merkers of eenvoudige DNA technieken. De studenten zullen daarbij begeleid worden door een docent/onderzoeker. Het samenvoegen van de theorielessen van de specialisatie minor 'plantkunde' en het praktische onderzoek van de werkplaats moleculaire veredeling, zal een verdere versterking zijn van het onderwijs. Misschien is het ook beter om de naam van deze specialisatie minor 'Plantkunde' om te dopen in 'Moleculaire veredeling en Biotechnologie'.

In het begin van het derde jaar en aan het einde van het vierde jaar gaan de studenten tijdens hun stage en afstuderen onderzoek uitvoeren buiten de Hogeschool, bij bedrijven en Universiteiten. Als lector ondersteun ik de studenten bij het zoeken naar een geschikte plek en wijst op mogelijkheden door haar netwerk in te zetten. Nieuw is de mogelijkheid voor de studenten om stage- en afstudeerprojecten uit te voeren bij het lectoraat Green Biotechnology. De studenten kunnen werken aan praktijkgerichte vragen uit het bedrijfsleven, of aan het innovatieve onderzoek dat door het lectoraat opgezet wordt. Het innovatieve onderzoek is meer risicovol en de projecten zijn meerjarig. De studenten worden in dit onderzoek begeleid door een docent/onderzoeker of een deskundige onderzoeker.

Cursus 'Novel Breeding Tools'

Naar aanleiding van wensen uit het sierteeltveredelingsbedrijfsleven om meer geïnformeerd te worden over de mogelijkheden van moleculaire DNA technieken ('Tools') in het plantenveredelings-onderzoek, gaat het lectoraat Green Biotechnology in samenwerking met de Universiteit van Amsterdam en gefinancierd door de Greenport Aalsmeer, een nascholingscursus opzetten genaamd 'Novel Breeding Tools'. In deze cursus komen de nieuwste moleculaire verdelingstechnieken, zoals moleculaire merkers, 'whole genome sequencing' en genetische modificatie en genoom editing, aan bod. Ook wordt aandacht besteed aan belangrijke onderwerpen ('Topics') in de verdeling zoals resistentieverdeling, de aanwezigheid van inhoudsstoffen en andere kwaliteitsaspecten. De allereerste cursus wordt gegeven voor werknemers uit de tulpen- en rozen veredelings-bedrijven en gaat in het voorjaar van 2015 van start.

4. Plants

Het besluit om in het onderzoek te kiezen voor innovatieve techniekontwikkeling en het toepassen van DNA technieken voor de moleculaire veredeling en groene biotechnologie, maakt het noodzakelijk om in het onderwijs en onderzoek te kiezen voor een modelplant. In dit hoofdstuk wordt allereerst de modelplant die in het onderwijs en onderzoek gebruikt gaat worden voorgesteld. Vervolgens worden de huidige uitdagingen in de plantenveredeling aangestipt die om een tweede groene revolutie vragen. Daarna wordt een kort historisch overzicht gegeven van de bestaande DNA technieken in het vakgebied van de moleculaire veredeling en de groene biotechnologie en worden de 'Tools' uitgekozen die gebruikt kunnen worden om de huidige uitdagingen op te pakken om zo een bijdrage kunnen leveren aan het vinden van oplossingen.

Modelplant

Voor de innovatie van het onderwijs en de introductie van moleculaire veredeling en groene biotechnologie in het onderzoek, heb ik besloten om een modelplant uit te kiezen. In het biologisch onderzoek is het gebruikelijk om experimenten uit te voeren met modelorganismen. Een modelorganisme is een planten- of diersoort die gebruikt wordt om bepaalde biologische fenomenen te bestuderen, zoals bijvoorbeeld in de genetica of tijdens groei en ontwikkeling. Het is de verwachting dat ontdekkingen die gedaan worden met een modelorganisme ook inzicht geven in de werkingsmechanismen van andere organismen. Tevens worden modelorganismen gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe technieken, zodat de ontwikkelde techniek later eenvoudig toe te passen is op andere organismen. Meestal is aan een modelorganisme al veel onderzoek verricht, waardoor er al veel kennis over opgedaan is en het eenvoudig is om mee te werken. Het gebruik van een modelplant zal tevens zorgen voor herkenbaarheid en samenhang in het onderwijs en onderzoek van de opleiding. Voorbeelden van modelorganismen in het plantenonderzoek zijn onder andere mais, tabak en natuurlijk de zandraket, beter bekend in het onderzoek als *Arabidopsis*.¹ Toch heb ik voor een andere plant als modelorganisme gekozen, namelijk de petunia (*Petunia x hybrida*). Daar zijn een viertal redenen voor.

Ten eerste behoort de petunia tot de plantenfamilie van de Solanaceae waartoe ook belangrijke voedselgewassen zoals de aardappel, tomaat, rode peper, paprika en aubergine behoren. Petunia zou aldus als pre-competitief modelsysteem voor deze belangrijke gewassen van het Nederlandse groente en zaad veredelingsbedrijfsleven kunnen dienen en zo een antwoord kunnen geven op verschillende onderzoeksvragen. Ten tweede wordt de petunia ook gebruikt in het fundamentele plantenonderzoek in Nederland². Aan de Universiteit van Amsterdam (UvA) wordt

onder andere onderzoek gedaan naar de kleur- en geurvorming van petunia.^{3,4} De UvA en de veredelingsbedrijven ondersteunen het onderwijs en onderzoek van het lectoraat Green Biotechnology met kennis en plantmaterialen. Ten derde is petunia een siergewas en zou zo ook een modelfunctie kunnen vervullen voor de sierteeltveredeling. Deze bedrijfstak is nog niet gespecialiseerd in de moleculaire veredeling en de petunia zou zo een herkenbaar uithangbord kunnen zijn van de mogelijkheden met de nieuwe verdelingstechnieken. Als laatste is de petunia een aantrekkelijke plant, zie figuur 3, waar de studenten met veel plezier en bewondering onderzoek aan doen, het oog wil tenslotte ook wat.



Figuur 3: *Petunia x hybrida*

Samengevat, een modelplant zorgt voor herkenbaarheid in het onderwijs en onderzoek, en door voor petunia te kiezen, wordt het makkelijker om nieuwe technieken die geoptimaliseerd zijn in het innovatieve onderzoek, te implementeren in het onderwijs en door te vertalen naar het bedrijfsleven.

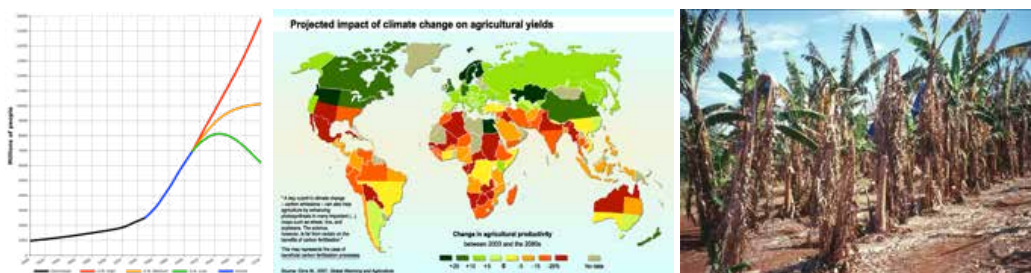
Technologische ontwikkelingen

Het vakgebied van de moleculaire veredeling en groene biotechnologie is sterk in beweging dankzij de ontwikkeling van nieuwe, revolutionaire technieken. De laatste jaren is er veel veranderd in het vakgebied en in deze paragraaf wil ik een beknopt historisch overzicht geven van de technologische ontwikkelingen van de afgelopen 30 jaar. Deze ontwikkelingen gaan gepaard met nieuwe mogelijkheden en bieden uitzonderlijke kansen voor de veredeling van nieuwe gewassen. Allereerst wil ik in het kort de eerste groene revolutie van de plantenveredeling beschrijven en de uitdaging van de hedendaagse plantenveredeling aangeven. Daarna beschrijf ik enkele technologische ontwikkelingen binnen de moleculaire veredeling, het genoom sequenzen en de groene biotechnologie. Ik ben van mening dat kennis van de uitdagingen van de hedendaagse veredeling en inzicht in de technologische ontwikkelingen van de laatste jaren, van belang zijn om tot de juiste keuze te komen van de DNA technieken die gebruikt kunnen worden in het praktijkgerichte onderzoek en van de DNA technieken die verder ontwikkelt moeten worden in het innovatieve onderzoek.

Een groene revolutie

De eerste Groene Revolutie vond plaats in de jaren 1940-1960 in Amerika. Gedreven door de explosieve groei van de populatie en de dreigende hongersnood werden initiatieven ontplooid ter verbetering van de landbouw met als centrale inzet de veredeling van planten. Norman Borlaug (1914-2009) stond aan de wieg van de veredeling van nieuwe dwerg-variëteiten van tarwe, die een hoge opbrengst hadden en ziekteresistent waren. Daarnaast werden ook de landbouw methodes verbeterd door gebruik te maken van kunstmest, pesticiden en irrigatietechnieken wat eveneens bijdroeg aan de opbrengstverhoging. Het gebruik van dwerg-variëteiten werd later ook toegepast in rijst, waardoor de rijstoogst explosief steeg en hongersnood in India werd voorkomen. Norman Borlaug kreeg in 1970 de Nobelprijs voor de Vrede, voor zijn bijdragen aan de wereld voedselvoorziening.⁵

Op dit moment staat de plantenveredeling voor een nieuwe uitdaging om de voedselvoorziening te verhogen vanwege de wereldwijde bevolkingsgroei, het verlies van landbouwareaal door de klimaatveranderingen en de bedreiging van de oogsten door ziekten en plagen (figuur 4).



Figuur 4: Links: Groei van de wereldbevolking.⁶

Midden: Impact van klimaatsverandering op de opbrengst van de landbouw.⁷

Rechts: Panama ziekte bedreigt de bananenoogst.⁸

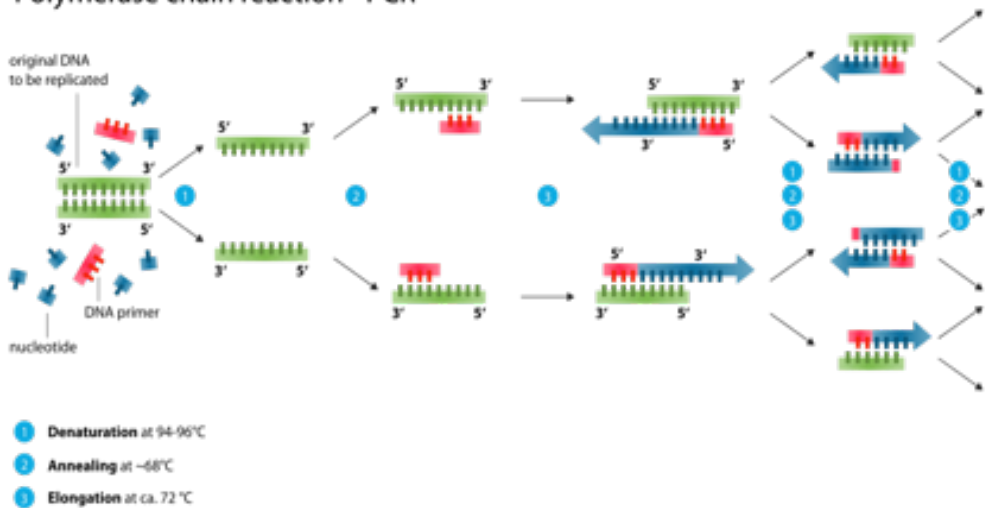
Een tweede groene revolutie kan plaatsvinden door het toepassen van moleculaire DNA technieken in de plantenveredeling, zoals moleculaire merkers, eventueel ondersteund door het sequencen van het genoom, of door gebruik te maken van genetische modificatie en de nieuwste genoom editing technieken.

Hieronder volgt een beknopt historisch overzicht van de belangrijkste DNA technieken die gebruikt worden in de moleculaire plantenveredeling en groene biotechnologie.

Moleculaire plantenveredeling: moleculaire merkers en merker gestuurde selectie

De allereerste DNA merker werd 35 jaar geleden beschreven en is een techniek die uitgaat van Restrictie Fragment Lengte Polymorfismen (RFLPs).⁹ De RFLP techniek werd vervolgens toegepast bij planten om fylogenetische relaties en de genetische variatie van gewassen zoals mais en tomaat te onderzoeken.^{10, 11} Deze studies en de genetische kaarten die vervolgens gemaakt werden met de RFLP techniek, vormden een opmaat naar nieuwe concepten zoals merker gestuurde selectie om het veredelingsproces te ondersteunen. Dit houdt in dat de planten met de juiste eigenschappen geselecteerd worden aan de hand van hun moleculaire merker patronen. De RFLP techniek was echter zeer tijdrovend, de gehele procedure duurde een week en de hybridisatie technologie die eraan ten grondslag lag, was zeer kostbaar en vereiste het werken met radioactief ³²P. Gelukkig werd aan het eind van de jaren 80 een methode beschreven waarmee veel sneller DNA fragmenten aangetoond kon worden, de Polymerase Chain Reaction (PCR), zie figuur 5. Gary Mullis kreeg in 1993 de Nobelprijs voor de ontwikkeling van deze techniek.¹²

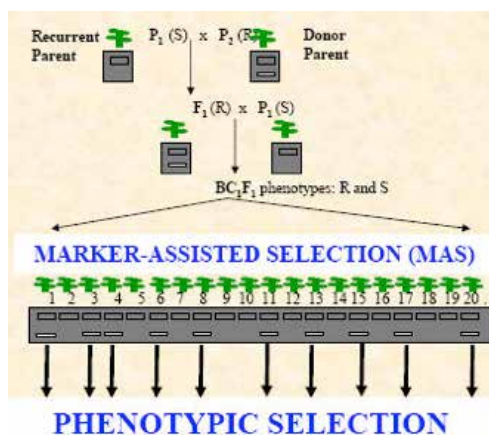
Polymerase chain reaction - PCR



Figuur 5: Schematische voorstelling van de vermeerdering van DNA met behulp van de PCR techniek¹²

Naar aanleiding van deze PCR technologie werden verscheidene andere merker technieken ontwikkeld die veel sneller en vooral goedkoper waren dan RFLP techniek zoals, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Simple Sequence Repeat (SSRs), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Expressed Sequence Tags (ESTs) en Single Nucleotide Polymorphism (SNP) technieken.¹³

De implementatie van de DNA merkertechnieken in het veredelingsonderzoek is de laatste jaren enorm hard gegaan en DNA markers hebben ondertussen hun geschiktheid bewezen in verschillende stadia van het veredelingsproces, zoals het vaststellen van de genetische variatie, het uitvoeren van fylogenetische analyses, het uitkiezen van de geschikte ouderplanten voor het maken van (terug) kruisingen.¹⁴ Via genetische koppelingenanalyses konden onderzoekers deze

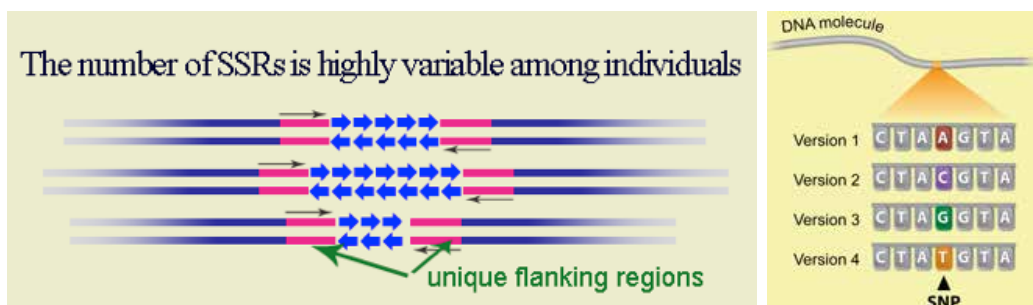


moleculaire markers koppelen aan planteigenschappen en dat maakte de weg vrij voor het selecteren van planten met de juiste eigenschappen met behulp van de moleculaire merker technologie. Dit proces wordt merker gestuurde veredeling ofwel 'Marker Assisted Selection' (MAS) genoemd, zie figuur 6.¹⁵

Figuur 6: Voorbeeld van merker-gestuurde selectie (MAS).¹⁶

Het concept 'Breeding by Design' sluit hierbij aan en gaat uit van het in handen hebben van alle allelische variatie van genen die agronomisch van belang zijn. Dankzij de merkertechnologie kunnen de gewenste genvarianten bij elkaar in een plant gecombineerd worden. Afhankelijk van de generatietijd van een gewas kunnen met deze merker gestuurde selectie strategie nieuwe superieure variëteiten in veel kortere tijd gerealiseerd worden dan met conventionele veredelings methoden.¹⁷ Op dit moment wordt voor de toegepaste moleculaire veredeling voornamelijk met de SSR en SNP analyse techniek gewerkt (figuur 7).

Voor de detectie van de SSRs en SNPs zijn een aantal commerciële methoden ontwikkeld, zoals Fluidigm¹⁸, KASP¹⁹ en High Resolution Meltingcurve (HRM) analyse²⁰. Deze snelle en 'high-throughput' screenings methoden zorgen ervoor dat de concepten van MAS en 'Breeding by Design' succesvol toegepast kunnen worden. Met Fluidigm is het nu mogelijk om binnen 3 uur de genotypen te bepalen van 96 planten op basis van 96 verschillende SNPs. Het gebruik van moleculaire merkers wordt ondertussen routinematig toegepast bij de veredeling van belangrijke landbouwgewassen zoals tarwe, mais, rijst en soja, maar ook bij groentegewassen, zoals aardappel, tomaat, komkommer en paprika.²³ Vanwege de eenvoud van de techniek, de snelheid in het gebruik en de beschikbaarheid van informatie in vele gewassen, kies ik voor het toepassen van deze SSR en SNP technieken in het onderwijs en het praktijkgerichte onderzoek. De detectie van de DNA fragmenten zou in het huidige onderwijs en onderzoek versneld en verbeterd kunnen worden door gebruik te gaan maken van een HRM analyse.



Figuur 7: Links: Overzicht van de variabiliteit van de SSRs.²¹
Rechts: Overzicht van de variabiliteit bij SNPs.²²

Moleculaire plantenveredeling: DNA sequencen

De DNA 'sequencing' techniek kan naast de bovengenoemde moleculaire merker technieken ook gebruikt worden om verschillen in DNA fragmenten aan te tonen. Het bepalen van de nucleïnezuur volgorde van een DNA of RNA molecuul wordt sequencen genoemd (figuur 8). Nucleotiden zijn de bouwstenen van het DNA en worden weergegeven met de letters A,C,G,T. In 1977 werd een techniek

beschreven door Fred Sanger, waarmee de volgorde van korte stukken DNA (ongeveer 200 nucleotiden) konden worden bepaald.²⁴ Voor de ontwikkeling van de 'sequencing' techniek kreeg hij in 1980 de Nobelprijs. Heel toepasselijk wordt deze methode ook 'Sanger sequencing' genoemd.



Figuur 8: Sequenzen is het bepalen van de volgorde van de nucleotiden A,T,C en G in het DNAmolecuul²⁵

Tijdens het sequencen van het Menselijke genoom, het 'Human Genome Project'²⁶, werd samengewerkt door een groot aantal onderzoekslaboratoria in verschillende landen om de nucleotidevolgorde van het menselijke DNA te bepalen.²⁷ Gedurende dit onderzoek, dat uiteindelijk 11 jaar zou duren, vonden veel technologische vernieuwingen plaats, waaronder het automatiseren van de 'Sanger sequencing' techniek. Hierdoor werd het veel eenvoudiger om grote hoeveelheden DNA in kortere tijd te sequencen en kwam het onderzoek in een stroomversnelling terecht. Dit resulteerde uiteindelijk in de, vervroegde, publicatie van de sequentie van het Humane genoom in 2001.^{28, 29} Een gebeurtenis die als 'A Milestone for Humanity' door president Bill Clinton werd aangekondigd (figuur 9).

Dit 'Human Genome Project' heeft uiteindelijk 3 miljard dollar gekost, wat neerkomt op ongeveer 1 dollar per nucleotide (het humane genoom bestaat uit 3,2 miljard nucleotiden). In 2002 werd een nieuw initiatief opgezet om, door middel van een prijsvraag, de kosten voor het sequencen van een genoom te verlagen naar 1000 dollar.³¹ Dankzij de ontwikkeling van 'second -' en 'third generation sequencing' technologieën zoals 454/Roche, Illumina/Solexa, Solid, Helicos, Lontorrent, MinION en SMRT is dit doel bijna bereikt.³² Tegelijkertijd is de snelheid en capaciteit van de nieuwe sequencing technologieën enorm gestegen, tegenwoordig kan een genoom van een mens in een middag gesequencet worden.³³



Figuur 9: Pers conferentie naar aanleiding van de publicatie van het humane genoom in 2001 met van links naar rechts: Craig Venter, President Bill Clinton en Francis Collins.³⁰

Ondertussen is het belang van het sequencen van genomen ook in de plantenwereld doorgedrongen. Hier ligt echter een nieuwe uitdaging omdat de genomen van planten en van veel van onze gewassen vaak nog groter zijn dan het genoom van de mens. Het genoom van de lelie is bijvoorbeeld ongeveer 10x groter dan dat van de mens! Daarom is er voor het sequencen van het eerste plantengenoom gekozen voor het kleine genoom van de modelplant *Arabidopsis thaliana*, dat ongeveer 30x kleiner is dan het menselijke genoom.³⁴ Hierna werden de DNA sequenties van twee rijstgenomen gepubliceerd.^{35, 36} Op dit moment is de DNA sequentie van tientallen economisch belangrijke gewassen zoals, aardappel, tomaat, soja, druif en citrus bekend.^{37, 38} Echter, er zijn in de wereld nog zoveel verschillende gewassen en planten waarvan het genoom nog niet gesequencet is, waardoor het bepalen van de nucleotidenvolgorde van het DNA molecuul nog een lange tijd actueel zal blijven in de plantenonderzoek.

Anders dan in het begin van het genomonderzoek wordt het sequencen nu vaak uitgevoerd in daarvoor gespecialiseerde laboratoria. Twee voorbeelden hiervan zijn het Joint Genome Institute (JGI) in Amerika en het Beijing Genome Institute (BGI, Shenzhen) in China.³⁵ Het uitbesteden van genoom sequencing onderzoek maakt het minder risicovol en ook goedkoper. Het sequencen van het genoom is tegenwoordig in zeer korte tijd uit voeren. Echter, het in elkaar

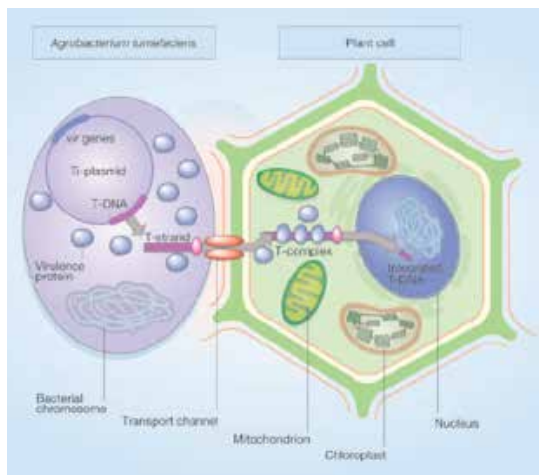
puzzelen van de losse sequenties tot een genoom ('assembly') en het zoeken naar de aanwezige genen ('annotatie') kost vooral bij planten meer tijd. Dat komt doordat plantengenomen gedurende de evolutie en domesticatie meermalen een genoomverdubbeling (polyploidisatie) hebben doorgemaakt, waardoor het hele genoom of delen van het genoom verveelvoudigd zijn. Plantengenomen kunnen daarom zeer groot zijn en hebben daarnaast ook veel repetitieve sequenties en transposons die de analyse van de DNAsequenties bemoeilijken. Dit alles maakt het sequencen van plantengenomen nog een hele uitdaging.³⁹

De genoom sequenties worden in de plantenveredeling gebruikt om nieuwe SSR of SNP merkers te ontwikkelen en deze te koppelen aan agronomisch belangrijke genen. De beschikbaarheid van grote aantallen merkers, dankzij het sequencen van genomen, maakt het in kaart brengen van eigenschappen gemakkelijker en het uitvoeren van merker gestuurde veredeling nog beter mogelijk.^{37,40} Het is duidelijk dat het sequencen van genomen van planten en het re-sequencen van variëteiten binnen een gewas in het wetenschappelijk onderzoek een grote vlucht heeft genomen en dat de inzichten die daar uit voortkomen weer toegepast worden in de plantenveredeling.^{41,42}

Ondanks de verscheidenheid aan veelbelovende DNA sequentie technieken, kan ik deze techniek niet in het onderzoek binnen de werkplaats moleculaire veredeling of het lectoraat inzetten. De specialistische apparatuur die hiervoor nodig is, is veel te duur en we hebben ook niet de beschikking over gespecialiseerd personeel die deze apparatuur kan onderhouden en bedienen. Wel kunnen we kleine DNA fragmenten die verkregen worden met de SSR, SNP en PCR technieken goedkoop door commerciële bedrijven laten sequencen, zodat we de data analyse weer zelf uit kunnen voeren. Gelukkig kunnen onze studenten tijdens hun opleiding toch ervaring opdoen met deze voor de plantenveredeling zeer belangrijke technieken, als zij bijvoorbeeld stage- of afstudeerprojecten uitvoeren bij het Green Student Lab van de UvA, waar we mee samenwerken.

Groene biotechnologie: genetische modificatie en genoom editing

Naast het uitvoeren van moleculaire veredeling met behulp van moleculaire merkers is het ook mogelijk om met biotechnologische technieken het DNA van organismen te modificeren of aan te passen. In de jaren tachtig van de vorige eeuw is het gelukt om met de bodembacterie *Agrobacterium tumefaciens* voor het eerst een nieuw stukje DNA in te bouwen in het genoom van een plant.^{43,44} *Agrobacterium* veroorzaakt van nature een plantenziekte die 'crown gall disease' wordt genoemd, waarbij ongeremde celdeling plaatsvindt en tumoren in de plant gevormd worden.



Figuur 10: Overdracht van het T-DNA, dat gelegen is op het bacteriële Ti plasmide, naar de plantencel en integratie van het T-DNA in het plantengenoom. Verschillende virulentie genen (vir genes) spelen een rol bij dit transport.⁴⁵

De ziekte ontstaat doordat de bacterie een stuk van zijn eigen DNA (het transfer DNA of T-DNA) overbrengt naar de plant, en dat vervolgens op een willekeurige plaats in het genoom van de plant genesteld wordt. Op dit T-DNA liggen onder andere genen die voor de tumorvorming zorgen. Het hele proces van DNA overdracht is ondertussen ontrafeld, zie figuur 10, en door aanpassingen aan het T-DNA is het nu mogelijk om deze bacterie als vector te gebruiken om zo gewenste genen in het planten genoom te brengen.⁴⁶ Dit proces noemen we genetische modificatie.

Voorbeelden van de allereerste gewassen die rond 1995 op de markt verschenen en die genetisch gemodificeerd zijn, zijn de FLAVR SAVR tomaat⁴⁶ en de gouden rijst⁴⁷ (figuur 11).



Figuur 11: Links: De FLAVR SAVR tomaat.⁴⁶
Rechts: Golden Rice.⁴⁷

Het toevoegen van nieuwe eigenschappen aan gewassen door de introductie van een of meerdere genen, die onmogelijk met conventionele veredeling in zijn te kruisen, is een nieuwe stap in de veredeling van planten en de mogelijkheden zijn eindeloos! Enkele voorbeelden van planten die de laatste jaren gemaakt zijn met behulp van genetische modificatie zijn: paarse tomaten die veel gezonder zijn en

kunnen beschermen tegen kanker⁴⁸, planten die medicijnen kunnen produceren, zoals het ebola medicijn ZMapp⁴⁹, bloemen met nieuwe kleuren, zoals de blauwe roos⁵⁰, of bomen waarvan het hout beter bruikbaar is als bio-brandstof⁵¹, zie figuur 12.

Helaas is er in Europa veel tegenstand tegen de genetische modificatie van planten, waardoor het gebruik van deze veelbelovende techniek in de plantenveredeling in Europa achterblijft. Er wordt daarom veel onderzoek uitgevoerd naar de verbetering van deze techniek. Nieuwe ontwikkelingen zijn merker vrije selectie⁵², waarbij het gebruik van antibiotica resistentie genen niet meer nodig is en cisgenese⁵³, waarbij alleen gebruik gemaakt wordt van DNA materiaal van de eigen soort of van kruisbare soorten.



Figuur 12: Links: Paarse tomaat.⁴⁸

Midden links: Productie van ebola medicijn ZMapp in tabaksplanten.⁴⁹

Midden rechts: Blauwe roos.⁵⁰

Rechts: Genetisch gemodificeerde populier.⁵¹

Een ander nadeel is de willekeurige insertie van het T-DNA in het plantengenoom. Onderzoek om dit probleem op te lossen heeft geleid tot een explosie van nieuwe technieken die een gen heel specifiek op een vooraf bepaalde plaats, in het genoom kunnen integreren, zoals de Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator Like Effector Nuclease (TALEN) en Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated nuclease (CRISPR/Cas) technieken.⁵⁴ Vanwege de hoge mate van precisie van de CRISPR/Cas techniek om mutaties in het genoom aan te brengen, spreken we niet meer van genoom modificatie maar van genoom editing.

De CRISPR/Cas technologie, die nog maar kortgeleden beschreven is, beschouw ik als een van de meest veelbelovende technieken voor de plantenveredeling en ik vind het een uitdaging om innovatief onderzoek naar de ontwikkeling en toepassing van deze CRISPR/Cas techniek op te zetten zodat het bedrijfsleven deze techniek kan gebruiken voor de genetische modificatie van planten. Als we deze techniek ontwikkeling aan onze modelplant petunia uitvoeren wordt het ook eenvoudig om de CRISPR/Cas techniek in het onderwijs te introduceren.

In het volgende hoofdstuk, **Possibilities**, zal ik deze techniek en de mogelijkheden hiervan voor het onderwijs en onderzoek uitgebreider beschrijven.

5. Possibilities

In dit hoofdstuk wil ik mijn plannen voor het uitvoeren van praktijkgericht en innovatief onderzoek uitwerken en zal ik in het onderzoeksprogramma voorbeelden geven van onderwerpen waaraan we gaan werken. De DNA technieken die ik zou willen gebruiken voor het praktijkgerichte onderzoek in de werkplaats moleculaire veredeling zijn de SSR en SNP moleculaire merkertechnieken en voor het innovatieve onderzoek wil ik me richten op de CRISPR/Cas techniek voor genoom editing.

Als onderzoeksthema's heb ik gekozen voor de moleculaire veredeling en de groene biotechnologie, die samen een goede aansluiting vormen op de vraagstukken vanuit de beroepspraktijk. Voor het uitvoeren van onderzoek is samenwerking met partners uit bedrijfsleven, kennisinstellingen en overheden uitermate belangrijk.¹ Het uitvoeren van praktijkgericht en innovatief onderzoek moet een structurele plaats in het onderwijsprogramma krijgen en kan zo zorgdragen voor de kenniscirculatie.

Uitvoering van het onderzoek.

Het doel van het lectoraat Green Biotechnology is om de verbinding tussen het onderwijs en het onderzoek te versterken en deze dichter aan te laten sluiten bij de actuele beroepspraktijk. Samen met de opleiding Life Sciences & Chemistry willen we een wetenschappelijke omgeving creëren waarin praktijkgericht onderzoek verricht kan worden en waarin studenten en docenten samen onderzoek uitvoeren aan de hand van vragen uit het bedrijfsleven. Ik wil vanuit het lectoraat Green Biotechnology een verbinding maken tussen het bedrijfsleven en het fundamentele onderzoek aan de universiteiten door het uitvoeren van innovatief onderzoek gericht op de ontwikkeling en toepassing van nieuwe technieken voor het veredelingsbedrijfsleven.

Voor de uitvoering van het onderzoek zijn studenten en docenten onontbeerlijk. Studenten kunnen op verschillende momenten in het curriculum en op verschillende kennisniveaus participeren in het onderzoek. Allereerst in het project onderwijs in het tweede jaar, waarin eenvoudige deelvragen van grotere onderzoeksprojecten onderzocht worden, vervolgens in het derde jaar bij de werkplaats moleculaire veredeling of door middel van stage- en afstudeerprojecten binnen het innovatieve onderzoek van het lectoraat, waarin middels zelfstandig onderzoek een antwoord gezocht wordt op complexere vragen. Door de deelname van docenten aan het onderzoek, de werkbeprekingen en de literaturodiscussies, die georganiseerd worden door het lectoraat, kan tevens bijgedragen worden aan de professionalisering van de docenten.

Onderzoeksprogramma

Het onderzoeksprogramma van het lectoraat Green Biotechnology valt zoals gezegd uiteen in twee niveaus. Ten eerste het vraag-gestuurde, praktijkgerichte onderzoek dat in de werkplaats moleculaire veredeling uitgevoerd wordt en het innovatieve onderzoek naar de ontwikkeling en toepassing van nieuwe DNA technieken voor de veredelingspraktijk zoals dat in het lectoraat plaatsvindt. Hieronder worden voorbeelden gegeven van onderzoeken die met de gekozen DNA technieken uitgevoerd kunnen worden.

Praktijkgericht onderzoek

Het praktijkgerichte onderzoek vindt plaats binnen de werkplaats moleculaire veredeling. Hier wordt gewerkt aan vragen en opdrachten uit het bedrijfsleven. De werkplaats moleculaire veredeling is nog in oprichting, maar er is al een begin gemaakt met enkele kleine projecten. Typische onderwerpen zijn het onderzoeken van de genetische variatie of de identificatie van ouderlijnen ten behoeve van de veredeling of fylogenetisch onderzoek. Ik heb gekozen voor de SSRs en SNPs merker technieken, die vaak in dit type onderzoek gebruikt worden en die vrij eenvoudig zijn toe te passen in het onderzoek dat uitgevoerd wordt door onze studenten. De detectie van de DNA fragmenten zou verbeterd kunnen worden door gebruik te gaan maken van een HRM analyse en deze methode gaan we ook zeker uitproberen en optimaliseren. Daarnaast wil ik ook onderzoek doen aan het ontwerpen van PCR-testen, die bijvoorbeeld de aanwezigheid van bepaalde genen of allelen kunnen aantonen. Dit onderzoek kan in de werkplaats moleculaire veredeling door studenten uitgevoerd kan worden.

De integratie van de werkplaats moleculaire veredeling in het curriculum is mogelijk via het projectonderwijs in het tweede jaar, waar studenten werken aan deelvragen van een groter onderzoeksproject. Tevens zie ik mogelijkheden om de studenten meer zelfstandig in het derde jaar tijdens hun specialisatie minor 'Plantkunde' aan projecten van de werkplaats moleculaire veredeling te laten werken. Daarnaast zijn er ook stage- en afstudeerprojecten mogelijk, al naar gelang de duur en complexiteit van het onderzoek. In de kortlopende projecten zullen de studenten begeleid worden door docenten/onderzoekers die tijdelijk aan dit onderzoek verbonden zijn. Het zou mooi zijn als in de toekomst de uitvoering van sommige technieken routinematig kan plaatsvinden in de werkplaats, als service verlening voor het bedrijfsleven.

Het lectoraat werkt voor het uitvoeren van praktijkgericht onderzoek ook samen met de werkplaats analyse van de opleiding Chemie. Planten zijn namelijk een rijke bron van allerlei inhoudsstoffen die voor mensen van grote waarde zijn en die gebruikt worden in de medische en farmaceutische industrie. Samen met de werkplaats analyse wil het lectoraat de isolatie en kwantificatie van deze inhoudsstoffen onderzoeken om in de toekomst planten te kunnen modificeren die

juist meer of minder van deze stoffen produceren. Op dit moment worden de eerste gezamenlijke projecten voor de analyse van kleur-, geur- en medicinale stoffen uit planten uitgevoerd door Chemie en Life Sciences studenten in de werkplaats analyse.

Daarnaast werkt het lectoraat ook samen met de opleiding Tuinbouw & Agribusiness op het gebied van de teelt en veredeling van voedselgewassen. Op dit moment geef ik een jaarlijks een gastcollege over genetische modificatie in deze opleiding. Daarnaast zijn we bezig om samen een onderzoeksproject op te zetten wat in de werkplaats moleculaire veredeling uitgevoerd kan worden. Het virus resistentie onderzoek aan paprika en het project over de inhoudstoffen van de paprika zijn voorbeelden van cross-over projecten binnen het domein Agri, Food & Life Sciences van Hogeschool Inholland. Het is mijn intentie om de samenwerkingen tussen de opleidingen in de toekomst te versterken en uit te breiden, waardoor we samen in de toekomst interdisciplinair onderzoek uit kunnen gaan voeren. Hiermee kunnen we een voortrekkersrol vervullen in het groene HBO.

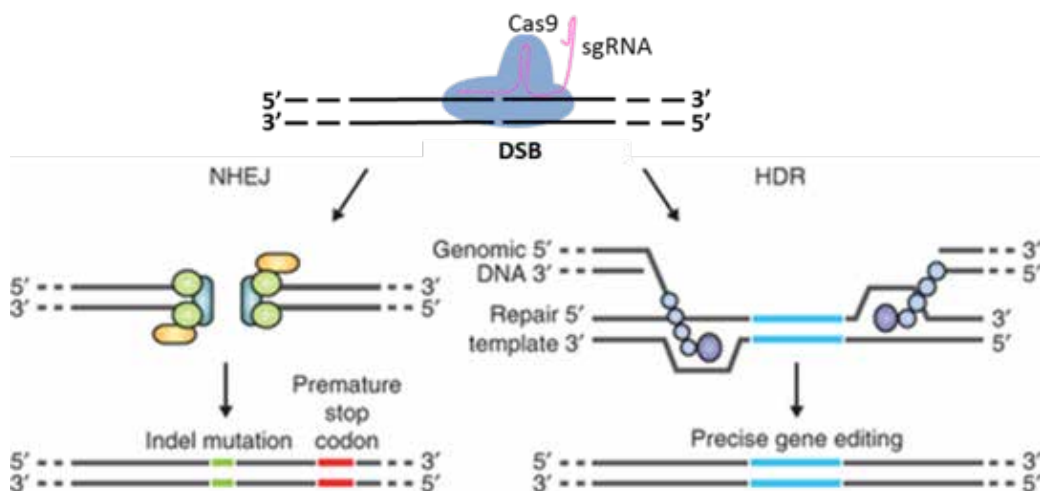
Innovatief onderzoek en Techniekontwikkeling

Innovatief onderzoek wordt samen met een wetenschappelijke onderwijsinstelling en het bedrijfsleven uitgevoerd en heeft een meerjarig karakter. Met dit type onderzoek wil ik een brug slaan tussen het fundamentele onderzoek aan de universiteiten en het toegepaste onderzoek in het bedrijfsleven. In het innovatieve onderzoek richten we ons op techniekontwikkeling van bijvoorbeeld de genoom editing techniek CRISPR/Cas, zodat de geteste en geoptimaliseerde techniek later in het veredelingsbedrijfsleven toegepast kan worden. De resultaten van dit type onderzoek kunnen ook weer terugvloeien naar het onderwijs als onderdeel van de innovatie van het curriculum en als een bijdrage aan de professionalisering van de docenten.

De CRISPR/Cas techniek is nog maar kortgeleden beschreven en heeft de potentie om een belangrijke 'Tool' voor de plantenveredeling te worden. De veredelingsbedrijven hebben een grote behoefte aan een nieuwe verdelingsmethode waarmee plaats-specifieke (targeted) mutaties aangebracht kunnen worden in het DNA, ook wel genoom editing genoemd. Met deze CRISPR/Cas techniek zou er nog veel preciezer en sneller veredeld kunnen worden, waardoor de veredeling op een hoger niveau gebracht kan worden. Deze innovatie van het veredelingsproces kan ervoor zorgen dat de wereldwijde goede concurrentie positie van de Nederlandse veredelingsbedrijven behouden kan blijven. De laatste jaren zijn verschillende technieken beschreven waarmee dit bereikt zou kunnen worden zoals ZFN, TALENs en CRISPR/Cas, waarvan de laatste techniek het meest veelbelovend is.² Deze techniek maakt het mogelijk om op een eenvoudige wijze en heel specifiek, één mutatie op één plaats in het genoom te maken. Daar komt bij dat deze nieuwe techniek relatief goedkoop is en betrekkelijk eenvoudig is om mee te werken, in

De introductie van dubbelstrengs breuken (DSB) door het Cas9/sgRNA complex induceert het herstel van genomisch DNA door endogene DNA herstelmechanismen. Herstel vindt plaats door ofwel 'homology directed repair' (HDR) ofwel door 'non-homologous end joining' (NHEJ), zie figuur 14. Bij NHEJ is het mogelijk dat enkele nucleotiden rond de breuk verloren gaan of toegevoegd worden, waardoor de herstelde breuk een mutatie introduceert.⁶ Herstel van het genoom kan daarom leiden tot de introductie van plaats specifieke mutaties, waarmee het experimenteren met, en het veredelen van, gewassen immens versneld kan worden ten opzichte van ongerichte mutagenese.²

Na de mutagenese kan de selectie van mutanten eenvoudig uitgevoerd worden door het ontwerpen van sgRNA moleculen die restrictie-enzym kniplocaties omvatten of daaraan grenzen. De detectie van mutaties doormiddel van PCR gevolgd door restrictie-enzym analyse heeft als voordeel dat er geen geavanceerde apparatuur nodig is en de kosten laag zijn. Andere nieuwere technieken zoals de 'high resolution melting curve' (HRM) analyse en het sequencen van het DNA, kunnen ook gebruikt worden om mutaties in het DNA aan te tonen in grote hoeveelheden samples.⁷



Figuur 14: De door Cas9 geïntroduceerde DSB in het genomische DNA kan op twee manieren hersteld worden. Door het foutgevoelige NHEJ en door een het kopiëren van een template via HDR. Aangepast op basis van Ran et al., 2013.⁶

Met het CRISPR/Cas systeem zijn mutaties in het genoom van verschillende modelplanten, zoals *Arabidopsis thaliana* en tabak en enkele voedselgewassen zoals rijst en tarwe geïntroduceerd, waarmee vaststaat dat deze techniek toegepast kan worden in een breed scala aan planten.^{8,9,10} Door het gemak in het gebruik en de geringe materialen die nodig zijn voor het uitvoeren van de plaats-specifieke mutaties met behulp van het CRISPR/Cas systeem, heeft deze techniek grote potentie om toepassingsgericht ingezet te kunnen worden bij de veredeling van planten.

In figuur 14 is tevens te zien dat naast het introduceren van plaats-specifieke mutaties ook plaats-specifieke genoom integraties van transgenen mogelijk zijn. Er wordt ook al gewerkt aan plaats-specifieke modificaties van het epigenoom om gen expressie in de toekomst te kunnen reguleren.¹¹

De interesse van het bedrijfsleven voor de CRISPR/Cas technologie ligt in het feit dat deze technologie een nieuwe mogelijkheid biedt voor het maken van mutaties. De planten waarvan het DNA is veranderd met behulp van de CRISPR/Cas technologie, zijn niet te onderscheiden van planten die gemaakt zijn via conventionele veredelings technieken of via chemische of fysische mutagenese. Deze laatste groep mutante planten zijn vrijgesteld van de regelgeving voor Genetische Gemodificeerde Organismen (GGO) volgens de EU richtlijnen. Dat zou betekenen dat mutante planten die gemaakt zijn met behulp van de CRISPR/Cas technologie mogelijk ook vrijgesteld worden van de GGO regelgeving. Deze vrijstelling zal een aanvullende, zeer positieve invloed hebben op de ontwikkeling van de plantenbiotechnologie en de toepassing van de CRISPR/Cas techniek in de veredelingssector.

De integratie van dit innovatieve onderzoeksproject in het curriculum vindt plaats via het projectonderwijs in het tweede jaar, waar aan deelvragen van dit project door de studenten gewerkt wordt. Vanwege het vernieuwende aspect en de complexiteit van dit meerjarige onderzoek is het voor de studenten ook interessant om tijdens hun stage en afstudeerproject mee te werken aan dit onderzoek. De studenten zullen in dit onderzoek begeleid worden door gespecialiseerde onderzoekers of docent/onderzoekers die voor langere tijd aan dit onderzoek verbonden zijn.

6. Toekomst: 'Design your own plant'

In de nabije toekomst zullen we de nieuwe veredelingstechnieken voor de verbetering van planten moeten gebruiken om de groeiende wereld populatie van voedsel te kunnen blijven voorzien en het hoofd te kunnen bieden aan de klimaatveranderingen en plantenziekten. Ik heb in Hoofdstuk 4, **Plants** en 5, **Possibilities**, de nieuwste technieken beschreven en aangegeven welke technieken we in het onderzoek bij het lectoraat gaan gebruiken om de veredeling van gewassen en planten te ondersteunen.

In de iets verdere toekomst zullen we niet alleen planten veredelen maar ook planten met totaal nieuwe eigenschappen kunnen ontwerpen. In de biologie zijn er twee opkomende vakgebieden, de 'systems biology' en de 'synthetic biology', die als uitgangspunt het ontwerpen van nieuwe organismen hebben. De in hoofdstuk 4, **Plants** en 5, **Possibilities** beschreven technieken, DNA sequenzen en CRISPR/Cas, spelen in deze vakgebieden een grote rol. Ik zal deze nieuwe vakgebieden en hun potentie hieronder kort toelichten.

'Systems biology' gaat een stap verder dan de moleculaire veredeling en maakt gebruik van 'next generation sequencing' (NGS) technieken. Hiermee wordt naar het hele genoom van de plant gekeken en zo kunnen de genotypen met de gewenste eigenschappen uitgezocht worden en de genotypen met de ongewenste eigenschappen verwijderd worden. De MAS die nu nog met moleculaire merkers wordt uitgevoerd zal zich ontwikkelen naar 'genotyping by sequencing' (GBS). Het steeds goedkoper worden van de technieken om DNA te sequenzen en het kleiner worden van de apparatuur, zal uiteindelijk resulteren in het direct sequenzen van de planten in het veld.¹ Daarnaast zal in de toekomst de 'systems biology' uitgebreid worden met informatie over gen-expressie en gen-regulatie netwerken, en samen met de epigenetische informatie een rol spelen bij het voorspellen van het fenotype en de prestatie van een gewas in het veld.²

'Synthetic biology' bouwt voort op de groene biotechnologie en deze heeft als doel het creëren van geheel nieuwe organismen. De nieuwe planten kunnen voor vele verschillende doeleinden gebruikt worden, zoals voor de productie van stoffen die waardevol zijn voor de medische en farmaceutische industrie of voor het maken van planten met compleet nieuwe eigenschappen en biochemische routes. De CRISPR/Cas technologie biedt de synthetische biologie het gereedschap om deze nieuwe planten te kunnen maken. Naast het maken van plaats-specifieke mutaties is het

ook mogelijk om met deze techniek stukken DNA en genen te verwijderen of om plaats-specifiek nieuw DNA en genen in het plantgenoom te integreren. Daarnaast is het mogelijk om met de CRISPR/Cas technologie de transcriptieniveaus van plantengenen aan te passen door middel van veranderen van het epigenoom.³ Voorbeelden van de synthetische biologie projecten bij planten zijn het veranderen van de expressie van aromatische stoffen of suikers in fruitplanten⁴ of het rijst C4 project waarbij biochemische routes aangepast worden zodat de fotosynthese van rijst compleet opnieuw ontworpen wordt om een hogere efficiëntie te bereiken⁵. Daarnaast is er het stikstof fixatie project voor granen, waarin planten worden ontworpen die in staat zijn om atmosferisch stikstof op te nemen.⁶

Het up-to-date blijven in een snel veranderend werkveld is een hele uitdaging, niet alleen voor het onderzoek maar ook voor het onderwijs. De student van de toekomst moet getraind worden in verschillende wetenschapsgebieden en technologieën waaronder de genetica, plantenveredeling, 'genomic engineering', sequenzen, biometrie, en bio-informatica.⁷ We zullen daarnaast een flexibel curriculum moeten samenstellen dat in toenemende mate de interactie met het werkveld mogelijk maakt en waarin het uitvoeren van praktijkgericht en innovatief onderzoek mogelijk is. Een goede samenwerking met het bedrijfsleven en met kennisinstellingen is de sleutel tot succes van het onderzoek en onderwijs binnen het HBO. Het zou mooi zijn als onze laboratoria in de toekomst ook op een steenworp afstand van elkaar staan en we een doorlopende leerlijn MBO-HBO-WO kunnen creëren.

De rol van de docent als onderzoeker gaat nog belangrijker worden in het onderwijs en als onderzoeker krijgt de docent nieuwe rollen, als kennismakelaar, procesmanager, inspirator, expert en beoordelaar. Het uitbouwen van deze expertise van de docent en verdere professionalisering kan binnen het onderzoek van het lectoraat en de werkplaats plaatsvinden.

In de toekomst zal het mogelijk zijn om planten precies zo te maken als je zelf wil, voedselgewassen met verbeterde eigenschappen en siergewassen, met nieuwe vormen en bloeiwijzen. Het team van het lectoraat Green Biotechnology zal alle ontwikkelingen in het spannende vakgebied van moleculaire veredeling en groene biotechnologie op de voet blijven volgen en zich als onderdeel van het cluster Life Sciences & Chemistry en het domein AFL inspannen om een klimaat te creëren waarin de studenten kunnen floreren zodat ze opgeleid worden tot professionals die de nieuwe planten kunnen maken. Ik ben zeer benieuwd naar al die planten van de toekomst!

7. Lijst met afkortingen

AFLP	amplified fragment length polymorphism
Bt	Bacillus thuringiensis
CRISPR/Cas	clustered regularly interspersed short palindromic repeats/ CRISPR associated nuclease
DNA	deoxyribonucleic acid
Domein AFL	Domein Agri, Food & Life Science
DSB	double strand breaks
EST	expressed sequence tag
EU	Europese Unie
GBS	genotyping by sequencing
GGO	genetisch gemodificeerd organisme
HDR	homology directed repair
HRM analysis	high resolution melting curve analysis
KASP	KBioscience competitive allele-specific polymerase chain reaction
MAS	marker assisted selection
NGS	next generation sequencing
NHEJ	non-homologous end joining
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
sgRNA	single guide ribonucleic acid
SMRT sequencing	single molecule real time sequencing
SNP	single nucleotide polymorphism
SSR	simple sequence repeat
TALEN	transcription activator like effector nuclease
UvA	Universiteit van Amsterdam
VU	Vrije Universteit
WGS	whole genome sequencing
WUR	Wageningen University and Research centre
ZFN	zinc finger nuclease

8. Referenties

Hoofdstuk 4: Plants

- 1 Endersby J. A Guinea Pig's History of Biology (2007).
- 2 Gerarts T and Strommer J. Eds. *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics* (2009)..
- 3 Torielli G, Koes R, Quattrocchio F. The Genetics of Flower Color. Chapter 13 from *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics* (2009). Gerarts T and Strommer J. Eds.
- 4 Clark DG, Pichersky E, Verdonk J, Dudareva N, Haring M, Klahre U, Schuurink R. Benzenoids dominate the fragrance of petunia flowers. Chapter 3 from *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics* (2009). Gerarts T and Strommer J. Eds
- 5 Kingsbury N. *Hybrid: The History & Science of Plant Breeding.* (2009)
- 6 <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/56/World-Population-1800-2100.svg/2000px-World-Population-1800-2100.svg.png>
- 7 [http://en.wikipedia.org/wiki/Climate_change_and_gender#mediaviewer/File:Projected_impact_of_climate_change_on_agricultural_yields_by_the_2080s,_compared_to_2003_levels_\(Cline,_2007\).png](http://en.wikipedia.org/wiki/Climate_change_and_gender#mediaviewer/File:Projected_impact_of_climate_change_on_agricultural_yields_by_the_2080s,_compared_to_2003_levels_(Cline,_2007).png)
- 8 <http://media.padil.gov.au/species/136609/6010-large.jpg>. Panama disease of banana's.
- 9 Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* (1980) May; 32(3):314-31.
- 10 Melchinger AE, Messmer MM, Lee M, Woodman WL and Lamkey KR. Diversity and Relationships among U.S. Maize Inbreds Revealed by Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Crop Science* (1991) Vol. 31 No. 3, p. 669-678 doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100030025x
- 11 Miller JC, Tanksley SD. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* (1990) Volume 80, Issue 4, pp 437-448.
- 12 Bartlett, JMS, Stirling, D. "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology* (2003) 226 (2nd ed.). pp. 3-6. doi:10.1385/1-59259-384-4:3. ISBN 1-59259-384-4.
- 13 Meerow AW., *Molecular Genetic Characterization of New Floriculture Germplasm* (2005) Proc. Vth IS on New Flor. Crops. Eds.: A.F.C. Tombolato and G.M. Dias-Tagliacozzo. *Acta Hort.* 683, ISHS 2005.
- 14 Varshney RK, Hoisington DA, Nayak SN, Graner A. *Molecular Plant Breeding: Methodology and Achievements. Methods in Molecular Biology™* (2009) Volume 513, pp 283-304.

- 15 Collard BCY et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and Marker-assisted selection for crop improvement: The Basic concepts/ *Euphytica* (2005) 142: 169-196 DOI: 10.1007/s10681-005-1681-5.
- 16 <http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/image97.jpg>
- 17 Peleman JD, van der Voort JR. Breeding by design. *Trends Plant Sci.* (2003) Jul;8(7):330-4.
- 18 www.fluidigm.com
- 19 www.lgcgroup.com
- 20 www.biorad.com
- 21 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/IMG/SSR.png>
- 22 <http://learn.genetics.utah.edu/content/pharma/snips/images/snp-quick-ref.jpg>
- 23 Collard BCY and Mackill DJ. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2008) 363, 557-572.
- 24 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1977). 74 (12): 5463-7. doi:10.1073/pnas.74.12.5463. PMC 431765. PMID 271968.
- 25 https://www.my46.org/sites/www.my46.org/files/pictures/07My46_Gen101_DNAseq_final.png
- 26 <http://www.genome.gov/10001772>
- 27 Shreeve J. *The Genome War* (2004)
- 28 Lander ES et al. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* (2001) 409, 860-921 | doi:10.1038/35057062
- 29 Venter JC et al. The Sequence of the Human Genome, *Science* (2001) 291(5507): 1304-1351.
- 30 http://2.bp.blogspot.com/_x543HLSEoFE/S7ZPUhHrul/AAAAAAAAAo4/syal3D6Mr7c/s1600/664319.jpg
- 31 Lander ES Initial impact of the sequencing of the human genome *Nature* (2011) 470, 187-197 (10 February 2011) doi:10.1038/nature09792.
- 32 Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation, *Nature Reviews Genetics* (January 2010) 11, 31-46 | doi:10.1038/nrg2626
- 33 <http://www.theguardian.com/science/2012/feb/17/dna-machine-human-sequencing>
- 34 The Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". *Nature* 408 (6814): 796-815.
- 35 Yu J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L. ssp. indica*). *Science*. 2002 Apr 5;296(5565):79-92.
- 36 Goff, SA et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L. ssp. japonica*) *Science*. 2002 Apr 5;296(5565):92-100.
- 37 Bevan MW and Uauy C. Genomics reveals new landscapes for crop improvement. *Genome Biology* (2013) 14:206 <http://genomebiology.com/2013/14/6/206>

- 38 https://genomeevolution.org/wiki/index.php/Sequenced_plant_genomes.
- 39 Hamilton JP, Buell CR. Advances in plant genome sequencing. *Plant J.* (2012) Apr;70(1):177-90. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04894.x.
- 40 Varshney RK et al. Next generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* (2009) vol 27 no 9: 522-530.
- 41 Aflitos S et al. The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium. *The Plant Journal* (2014) Volume 80, Issue 1, pages 136-148.
- 42 SOL-100 sequencing project: <http://solgenomics.net/organism/sol100/view>
- 43 Herrera-Estrella L, Depicker A; Van Montagu M, Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303 (1983) (5914): 209-13. doi:10.1038/303209a0
- 44 De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO journal* (1984) 3 (8): 1681-9.
- 45 Gelvin SB. Agricultural biotechnology: Gene exchange by design. *Nature* (2005) 433, 583-584. doi:10.1038/433583a
- 46 "Tomatoes ARS". Licensed under Public Domain via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tomatoes_ARS.jpg#mediaviewer/File:Tomatoes_ARS.jpg
- 47 <http://www.flickr.com/photos/ricephotos/5516789000/in/set-72157626241604366>. Licensed under CC BY 2.0 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Golden_Rice.jpg#mediaviewer/File:Golden_Rice.jpg
- 48 <https://www.jic.ac.uk/staff/cathie-martin/purple-tomatoes.html>
- 49 <http://en.wikipedia.org/wiki/ZMapp>
- 50 "Blue Rose APPLAUSE" by Blue Rose Man - 本人購入物撮影. Licensed under CC0 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blue_Rose_APPLAUSE.jpg#mediaviewer/File:Blue_Rose_APPLAUSE.jpg
- 51 <http://www.vib.be/en/news/Pages/Field-trial-with-lignin-modified-poplars-shows-potential-for-bio-based-economy,-but-also-that-work-still-needs-to-be-done.aspx>
- 52 Puchta H. Marker-free transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2003): 123-134
- 53 www.cisgenesis.com
- 54 Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods.* (2013) Oct 11;9(1):39. doi: 10.1186/1746-4811-9-39.

Hoofdstuk 5: Possibilities

- 1 Strategische onderzoeksagenda Hogeschool Inholland: Praktijkgericht onderzoek verbindt (2012)
- 2 Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*. (2013) Oct 11;9(1):39. doi: 10.1186/1746-4811-9-39.
- 3 Puchta H, Fauser F, Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J*. (2014) Jun;78(5):727-41. doi: 10.1111/tpj.12338. Epub 2013 Nov 5.
- 4 Horvath P, Barrangou R, CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. (2010) Jan 8;327(5962):167-70. doi: 10.1126/science.1179555.
- 5 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. (2012) Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28.
- 6 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. (2013) Nov;8(11):2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. Epub 2013 Oct 24.
- 7 Bel C, Magor, G, Gillinder K, Perkins C. A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *Genomics* (2014), Nov 20; 15:1002. doi: 10.1186/1471-2164-15-1002
- 8 Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J, Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*. (2013) Aug;31(8):688-91. doi: 10.1038/nbt.2654
- 9 Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu LJ, Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*. (2013) Oct;23(10):1233-6. doi: 10.1038/cr.2013.123. Epub 2013 Sep 3.
- 10 Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*. (2013) Nov 1;41(20):e188. doi: 10.1093/nar/gkt780. Epub 2013 Sep 2.
- 11 Sander JD & Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes, *Nature Biotechnology* (2014) 32, 347-355 doi:10.1038/nbt.2842

Hoofdstuk 6: Toekomst

1. Varshney RK, Terauchi R, McCouch SR. Harvesting the Promising Fruits of Genomics: Applying Genome Sequencing Technologies to Crop Breeding. *PLoS Biol* (2014) 12(6): e1001883. doi:10.1371/journal.pbio.1001883.

2. Bevan MW and Uauy C. Genomics reveals new landscapes for crop improvement. *Genome Biology* (2013) 14:206 <http://genomebiology.com/2013/14/6/206>
3. Baltes NJ, Voytas DF. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends in Biotechnology* (2015) vol 33, no 2; 120-131.
4. Kanchiswamy CN, Sargetn DJ, Velasco R, Maffei ME and Malnoy M. Looking forward to genetically edited fruit crops *Trends in Biotechnology*, (2015), vol 33 no 2: 62-64.
5. Von Caemmerer S et al. The development of C4 rice: Current progress and future challenges. *Science* (2013) 336, 1671-1672.
6. Oldroyd, GED and Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotechnol* (2014). 26, 19-24.
7. Fridman E and Zamir D. Next-generation education in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol.* (2012) 15(2):218-23. doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.013.

Een leven met planten

Mijn interesse in planten is begonnen met het boek van Ingrid Gabriel: 'Kruidengids, herkennen, verzamelen en gebruik', dat ik op twaalfjarige leeftijd in de boekenkast van mijn ouders vond. Met dit boekje in de hand determineerde ik de planten in het veld en leerde ik over hun geneeskrachtige werking. Vervolgens nam ik op vakantie een echte 'flora' mee en zette ik de bloemen op de foto.



Ik ben aan de VU (planten)biologie gaan studeren en heb tijdens mijn stages gewerkt met de, op dat moment, allernieuwste technieken; RFLP merkers en *Agrobacterium* transformatie. Met de RFLP merkers onderzocht ik de genetische variatie en verspreiding van plantensoorten en zo is mijn interesse voor het gebruik en toepassen van moleculaire merkers ontstaan. Met *Agrobacterium* heb ik geprobeerd om tomaten te transformeren en dat was een hele uitdaging, maar de mogelijkheden die de transformatie bood om planten te verbeteren vond ik fascinerend. Deze stage bracht me in contact met de plantenveredeling en 'het Wageningse' en ik ben daar, na mijn diploma, aan een onderzoek begonnen naar de verwantschappen tussen mais-inteeltlijnen, waarbij ik weer RFLP merkers gebruikte.^{1,2}

Een jaar later startte ik met mijn promotieonderzoek waarvoor ik een genetische kaart van de aardappel gemaakt heb en QLTs betrokken bij resistentie tegen het aardappelcyste aaltje op de chromosomen heb gelokaliseerd.^{3,4,5,6,7} Wederom heb ik met RFLP merkers gewerkt, alleen had ik ondertussen een niet-radioactieve detectie methode opgezet voor het aantonen van de DNA fragmenten.^{8,9}

Na mijn promotie heb ik 2 jaar met mijn gezin in Philadelphia gewoond en heb ik onderzoek gedaan aan genen betrokken bij de 'phase change' tijdens de ontwikkeling van de maisplant. Ik heb geprobeerd deze genen te cloneren met behulp van 'transposon tagging' en 'map-based cloning', waarvoor ik tijdens het 'fine mappen' met de nieuwere SSR en SNP merkers gewerkt heb. In mijn vrije tijd heb ik de Amerikaanse 'East-Coast' flora bestudeerd en vele mooie botanische tuinen en parken bezocht. Terug in Nederland heb ik weer met andere moleculaire merkers gewerkt, de AFLPs, waarmee ik de genetische variatie van Taro onderzocht, een voedselgewas uit Zuid-Oost Azië.^{10,11} Ondanks de goede resultaten en de mooie plannen voor vervolgonderzoek werd de subsidiekraan dichtgedraaid en werd het onderzoek gestopt. Hierdoor ben ik mijn focus op iets anders gaan leggen dan onderzoek.

Ik had al gauw een nieuwe uitdaging gevonden in de deeltijdstudie tuin- en landschapsinrichting bij Hogeschool Larenstein in Velp. Nu kon ik op een ander manier met planten aan de slag en mijn kennis van de wilde flora uitbreiden met kennis van tuinplanten en bomen, en mezelf bekwamen in het ontwerpen en inrichten van tuinen. Er ging een wereld voor me open. Achteraf verschilde het eigenlijk niet veel van onderzoek doen, ik was nog steeds 'creatief met planten' bezig.

Bijna tegelijkertijd ben ik bij Hogeschool Larenstein begonnen als docent moleculaire genetica bij de opleiding Plantenbiotechnologie. Deze opleiding is 5 jaar later overgegaan naar de Hogeschool van Arnhem en Nijmegen en daar heb ik de nieuwe afstudeerrichting Moleculaire Plantenbiologie mede opgezet, en de tomaat als modelplant ingevoerd. Daarnaast was ik verantwoordelijk voor de inhoud en uitvoering van de modules 'Genetische variatie en modificatie' en 'Moleculaire Plantenbiologie' en ik heb daarin een breed scala aan theorielessen opgezet, o.a. over plantidentificatie (herkennen), plantenevolutie, genetica, plant-pathogeen relaties, groei en ontwikkeling, inhoudsstoffen van planten (gebruik), plantgenoom evolutie, moleculaire veredeling, moleculaire biologie, epigenetica, en plantenbiotechnologie. Heerlijk om me te kunnen verdiepen in al die verschillende onderwerpen binnen de plantenbiologie. Daarnaast heb ik praktijkonderwijs opgezet en gegeven dat gebruik maakte van technieken zoals PCR, clonen, RNAi, moleculaire merkers, *Agrobacterium* transformatie, DNA sequenzen en planten weefselweek. Onderwijs is meer dan het lesgeven alleen, ook als studieloopbaan begeleider, tutor en stagebegeleider heb ik de studenten in hun schooltijd bijgestaan en steeds mijn uiterste best gedaan om studenten te enthousiasmeren voor (het onderzoek aan) planten.

Precies twee jaar geleden ben ik als lector Green Biotechnology begonnen bij Hogeschool Inholland en er is weer nieuwe (model)plant in mijn leven, de petunia, waar ik en de studenten en docenten van Inholland al veel plezier aan beleven. Mijn plannen en wensen voor het plantenonderzoek in het onderwijs bij Inholland heb ik in dit boekje beschreven.

Planten spelen daarnaast nog steeds een grote rol in mijn vrije tijd, als het even kan ben ik bezig in de groentetuin en stippel ik vakanties uit om speciale planten te gaan bekijken, zoals de alpenflora, de sequoia's in Amerika, het unieke 'fynbos' in Zuid Afrika of de fossiele planten die te vinden zijn in steenkool- en leisteen-groeven in Frankrijk. Ondertussen bestudeer ik de invloed van de schoonheid van planten en bloemen in de architectuur en de kunst. Ik hoop nog vele jaren van alle facetten van het plantenleven te kunnen genieten.

Nelleke

1. Kreike CM. DNA fingerprinting in mais. *Prophyta* (1989) 43 (2).
2. Kreike CM. The use of molecular markers for the breeding of maize (*Zea mays*). (1989) Rapport van de Stichting voor Plantenveredeling.
3. Kreike CM, de Koning JRA, Vinke JH, van Ooijen JW, Gebhardt C, Stiekema WJ. Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype *Ro1*. *Theor Appl Genet* (1993) 87: 464-470.
4. Kreike CM, de Koning JRA, Vinke JH, van Ooijen JW, Stiekema WJ. Quantitatively inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor Appl Genet* (1994) 88: 764-769.
5. Kreike CM, Kok-Westeneng AA, Vinke JH, Stiekema WJ. (1996) Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development in *Solanum* sp. *Theor Appl Genet* 92: 463-470.
6. Kreike CM, van Ooijen JW, Stiekema WJ (1997) RFLPmap of potato: Reduced recombination and distorted segregation in a *Solanum tuberosum* (2x) x *S. spegazzinii* (2x) hybrid. *Genome* 40 (2): 180-187.
7. Kreike CM. (1995) Mapping and characterisation of quantitative trait loci conferring nematode resistance in *Solanum spegazzinii*. thesis, LUW.
8. Jacobs J, Kreike N. (1988). RFLPs in de plantenveredeling: vergelijking van radioactieve en niet-radioactieve methoden voor detectie op Southern blots. *Prophyta* 42 (10):272-274.
9. Kreike CM, de Koning JRA, Krens FA. Non-radioactive detection of single copy DNA-DNA hybrids. *Plant Mol Biol Rep* (1990) 8: 172-179.
10. Lebot V, Prana MS, Kreike N, van Eck H, Pardales J, Okpul T, Gendua T, Thongjiem M, Hue H, Viet N, and Yap TC. Characterisation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) genetic resources in Southeast Asia and Oceania. *Genetic Resources and Crop Evolution* (2004) 51 (4): 381-392.
11. Kreike CM, van Eck H, Lebot V. Genetic diversity of Taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, in Southeast Asia and the Pacific. *Theor Appl Genet* (2004) 109: 761-768.

Dankwoord

Allereerst wil ik mijn ouders bedanken voor het bijbrengen van de interesse in de natuur. Mam, bedankt voor de rozen en voor onze gedeelde liefde voor de bloemen en de tuin. Pap, bedankt voor alle plantenboeken die je voor me meenam, vers van de pers, en voor de vele foto's die je genomen hebt van die kleine bloemetjes in het gras.

Als student en als onderzoeker ben ik op vele plaatsen in Nederland en in het buitenland geweest en heb met veel mensen samengewerkt. Ik vind het ontzettend leuk om jullie nu weer tegen te komen bij universiteiten, instellingen, bedrijven en hogescholen, in mijn nieuwe functie als lector. Ik hoop dat ik in de toekomst opnieuw met jullie kan samenwerken.

Verder wil ik mijn collega's van de HAN bedanken voor 12 jaar gezelligheid en collegialiteit. Bedankt dat jullie me geleerd hebben om docent te worden in al zijn facetten. Vooral de plantencollega's, Frans, John, Hannie en Anna wil ik bedanken voor de fijne en inspirerende samenwerking. Frans, we hebben samen een mooie afstudeerrichting Moleculaire Plantenbiologie opgezet en ik hoop in de toekomst nog veel onderzoek samen met je te kunnen doen. Mijn goede ervaringen met het plantenonderwijs bij de HAN vormden tenslotte de springplank naar mijn huidige functie als lector.

Alle studenten wil ik bedanken voor hun inzet tijdens de colleges en opdrachten. Met veel plezier heb ik altijd de colleges over een bepaald onderwerp voorbereid. Tijdens de voorbereiding groeide ook mijn eigen kennis en inzicht. Het is tijdens het literatuur onderzoek voor het college 'Future Breeding' van de HAN dat ik over de CRISPR/Cas technologie las en besloot om die veelbelovende techniek in het onderzoek bij Inholland te gaan gebruiken. Zo leerde ikzelf eigenlijk nog het meest van het geven van de colleges, ik hoop dat jullie er ook wat van geleerd hebben.

Mijn nieuwe collega's bij Inholland en vooral Niek wil ik bedanken voor hun inspiratie en steun bij het opzetten van het nieuwe onderwijs en onderzoek voor de Groene Biotechnologie. Speciaal de plantencollega's Klaas Jan, Paulus en Tamara wil ik bedanken voor hun bijdrage aan het lectoraat Green Biotechnology, het opzetten van nieuwe colleges en practica, het uitzoeken van de CRISPR/Cas technologie en het begeleiden van studenten. Peter wil ik bedanken voor de waardevolle suggesties bij het schrijven van dit boekje en Ellen voor de organisatie van deze middag.

Als laatste bedank ik mijn gezin, Ronald, Jim en Simone, die me onvoorwaardelijk steunen in alles wat ik doe en die me de ruimte geven om mezelf steeds te blijven ontwikkelen. Ronald, ik vind het heerlijk als wij samen eropuit trekken om de natuur te ontdekken en te fotograferen, het is fijn om zo'n grote hobby samen te kunnen delen. Jim, natuurkunde is uiteindelijk ook biologie en ik weet zeker dat we in de toekomst nog veel van elkaar zullen leren. Simone, ik hoop dat je straks aan een mooie studie begint waarmee je van je hobby je beroep kan maken.

