

## **Inbouwen van resistentiegenen tegen *Phytophthora infestans* in diploïde aardappelen.**

Aardappel wordt meer en meer een belangrijke speler in de voedselproductie. De ontwikkeling van nieuwe variëteiten is echter erg langzaam, de inefficiënte veredeling is het gevolg van de genetische complexiteit van tetraploïde aardappelen. Moderne technieken, zoals hybride veredeling en de introgressie van specifieke genen in een bekende achtergrond worden niet toegepast in aardappel.

De laatste jaren is er veel onderzoek gedaan naar diploïde aardappelen die goed moeten kunnen presteren en die homozygoot gemaakt kunnen worden omdat zelfbestuiving mogelijk is. In een demonstratieproject zijn vier verschillende resistentiegenen tegen *Phytophthora infestans* (veroorzaker van 'late blight'/aardappelziekte). in homozygote, diploïde aardappel lijnen gebracht.

Deze opgave gaat niet over alle problemen in de transitie van tetraploïde aardappelen naar diploïde aardappelen maar over de extra mogelijkheden die met diploïden in de aardappelveredeling mogelijk zijn.

Wereldwijd zijn veel resistentiegenen gekarakteriseerd tegen *Phytophthora infestans*. Sommige zijn gekloneerd, van andere is de regio bekend waar het resistentiegen gelokaliseerd is.

## Vragen:

- *Phytophthora infestans* is een oömyceet die vaak resistenties doorbreekt (de resistenties zijn niet duurzaam). Niet alle resistentiegenen werken op dezelfde manier. Het doel is twee verschillende genen in te bouwen (introgressie), is het dan belangrijk hoe deze genen werken? Wat zou het grote voordeel zijn als je verschillende sets van resistentiegenen tot je beschikking hebt?
- In de buurt van de resistentiegenen kunnen ongewenste genen aanwezig zijn, hoe verklein je de kans dat dergelijke genen meegeselecteerd worden?
- Om het gebied rondom het gewenste gen zo klein mogelijk te maken wil je recombinaties aan beide kanten van het gen. Dubbele recombinaties komen echter niet frequent voor in dezelfde arm van een chromosoom, hierdoor komt het maar heel zelden voor dat er twee recombinaties aan beide kanten van een gen plaatsvinden. Hoe kan je toch twee recombinaties flankerend aan het gen krijgen?
- Beschrijf de meest voor de hand liggende en snelste procedure om een recurrent parent van een diploïde aardappel te krijgen met een ingebouwd resistentiegen. Er kunnen twee generaties opgegroeid en geselecteerd worden per jaar.
- Achtergrondselectie versnelt het veredelingsprogramma. Hoe veel terugkruisingen zijn theoretisch nodig om genotypen te krijgen met minder dan 2% van de donor plant? Er zijn vele resistentiegenen beschreven die al dan niet op dezelfde locatie op het chromosoom liggen. Kunnen resistentiegenen die op dezelfde plek liggen een probleem veroorzaken?
- Na een aantal terugkruisingen wordt een zelfbestuiving gedaan. Waarom is dit noodzakelijk? Kan deze zelfbestuiving ook nog een rol spelen in het homozygoot maken van de recurrent ouder.
- Er zijn vele resistentiegenen beschreven die soms op dezelfde locatie op het chromosoom liggen. Is het gemakkelijk een hybride te maken met twee resistentiegenen die op dezelfde plek liggen? Is dit ook mogelijk met drie, vier of vijf genen? Wanneer veroorzaakt dat een probleem?
- Aan het eind wil een veredelaar weten of de geselecteerde planten resistent zijn en liefst ook hoe lang ze resistent blijven. Onder welke condities zou je dit testen?

## Appelveredeling

In oude appelboomgaarden groeien appelbomen ook echt uit tot bomen. Vanwege de hoogte van de bomen is een ladder nodig om de appel te oogsten. In een moderne appelboomgaard worden appels geënt op een groeistam die ervoor zorgt dat de bomen compact blijven en dicht op elkaar geplant kunnen worden. Ze kunnen zo makkelijker worden geoogst met een hoge opbrengst per hectare. Het blijft wel noodzakelijk om de bomen geregeld te snoeien.

In 1964 werd een compacte scheut van het appelras 'McIntosh' ontdekt, die naar de ontdekker Anthony Wijcik werd genoemd. Deze 'Wijcik' scheut werd verder vermeerderd en bleek een interessante 'kolomachtige' groeiwijze te hebben. 'Wijcik' appelbomen hebben een dikke stam, een kleine afstand tussen de internodiën en ze vertakken heel weinig. In plaats van laterale takken worden korte uitlopers gevormd die vrucht dragen. Op deze wijze ontstaat een stevige, compacte, boom met een hoge opbrengst. De boom hoeft nauwelijks gesnoeid te worden. De 'kolomeigenschap' wordt stabiel overgeërfd door nakomelingen en dmv. moleculaire merkers is bepaald dat het Co (columnar) locus in een gebied op chromosoom 10 ligt.



Naast groeiwijze is ook ziekteresistentie van belang in de appelteelt. Een belangrijke ziekte van appel is appelschurft, veroorzaakt door de schimmel *Venturia inaequalis*. Zowel in de gangbare als biologische teelt wordt geregeld gespoten tegen appelschurft. Er zijn verschillende resistentiegenen tegen appelschurft bekend en hiervoor zijn ook

merkers beschikbaar. Wilde verwanten van appel kunnen een goede bron van resistentie zijn. Vatbaarheid voor appelschurft kan al in zaailingen bepaald worden.

Tot slot is de smaak van appel natuurlijk belangrijk. Consumenten hebben tegenwoordig een voorkeur voor een harde, knapperige en zoete appel - het liefst rood en niet melig.

Vragen:

- Het ontwikkelen van een nieuw appelras kan tientallen jaren duren, waarom duurt dit zo lang?
- Kolomgroei is een dominante eigenschap en heterozygoot in 'Wijcik'. Was dit te verwachten?
- Is het erg dat er af en toe een vergissing zorgt dat een boom niet de voorspelde kolomgroei geeft in een veredelingsprogramma?
- Kan het helpen om merkers te gebruiken om een nieuw ras met kolomgroei te ontwikkelen?
- Kunnen twee bomen hetzelfde genotype hebben?
- Zou je eerst op algemene kenmerken selecteren of eerst op het kolomtype?
- Kan het nuttig zijn om meerdere resistentiegenen tegen appelschurft te combineren?
- Is het nuttig om gebruik te maken van merkers voor het ontwikkelen van een appelras met resistentie tegen appelschurft? Waarom?
- Wat zijn de valkuilen bij het combineren van resistentiegenen tegen schurft?
- Kunnen merkers helpen bij het ontwikkelen van een appelras met vruchten met een goede smaak/uiterlijk?

## En belangrijk trips resistentie QTL in *Capsicum* is fijngekarteerd/fine-mapped in een regio van 0.4 Mbp

Met dank aan Pauline van Haperen, Ben Vosman

Een belangrijke trips resistentie (Quantitative Trait Locus gecorreleerd met trips resistentie) in *Capsicum* is fijngekarteerd in een gebied van 0.4 Mbp (op chromosoom 6). De karteringspopulatie was gebaseerd op een *C. annuum* CGN16795 x *C. chinense* CGN17219 kruising. Er is onderzoek gedaan om achter het mechanisme van de resistentie te komen, maar dat wordt hier niet besproken. Resistentie tegen trips is een belangrijke eigenschap voor pepertelers. Trips veroorzaakt veel schade bij vatbare planten op bloemen, vruchten en bladeren onder zowel veld als kascondities. Het fijn gekarteerde QTL is 0.4 Mbp groot en bevat nog 15 genen. Drie van deze genen, i.e. een acid phosphatase 1 (APS1), een cation/carnitine transporter 7 (OCT7) en een ongekaracteriseerd gen zijn de meest waarschijnlijke genen die een rol zouden kunnen spelen bij de resistentie.

Vragen:

- Waarom wordt dit effect een QTL (Quantitatief Trait Locus) genoemd en geen enkelgenskenmerk?
- Wat zijn de twee verschillende soorten waarmee gekruist is? Wat is de voorwaarde dat dit QTL ook naar ander *Capsicums* overgebracht kan worden?
- Wat is het voornaamste criterium of een QTL belangrijk is of niet en wat zou eventueel een oplossing zijn om extra genen te vinden die een rol spelen bij de resistentie?
- Wat is de grootte van de uiteindelijke doel locus? Welk percentage is dat van chromosoom 6 (de grootte van chromosoom 6 is ongeveer 60 Mbp)?
- Wanneer is het belangrijk deze regio nog kleiner te maken? Hoe zou je dat doen?
- Is het belangrijk om het verantwoordelijke gen te vinden?
- Trips is de vector van het TSWV-virus. Betekent dit dat als de trips resistentie overgebracht wordt, de *Capsicum* ook geen last van TSWV zal hebben?
- Beschrijf de methodologie waarop je deze resistentie in kunt bouwen in een succesvolle vatbare cultivar. Gebruik als donor de oorspronkelijke resistente *C. annuum* CGN16795.
- Wanneer moeten er validatie experimenten gedaan worden? wat ga je precies vergelijken in zo'n validatie experiment? Wat heb je nodig om de plant te infecteren?
- Is het een vereiste dat een soort gesequenced is om nieuwe merkers te vinden of maakt dat het alleen maar gemakkelijker? Naast het hebben van een sequentie, wat maakt het vinden van nieuwe merkers gemakkelijker?

Trouble shooting

- De resistentie komt minder tot uiting in nakomelingen van een nieuwe kruising met dezelfde donor. Hoe kan dat?
- De merkers uit de eerste kruising kunnen niet gebruikt worden in een tweede kruising. Hoe komt dat en hoe kan je dat oplossen?

In een ander experiment wordt een QTL tegen luizen gevonden (zie tabel). Er is zowel een effect op overleving als op reproductie van luizen (een groot effect en een klein effect).

**Table 1** QTL effect of resistance-related traits after the infestation with *M. persicae* determined in the F<sub>2</sub> population

Traits	QTL name	Marker at QTL peak	Chromosome	Position (cM) <sup>a</sup>	LOD	Additive effect <sup>b</sup>	Dominance effect <sup>c</sup>	% Explained variance
Aphid survival <sup>d</sup>	<i>Rmpas-1</i>	C_an-c02_139432948	2	42.0	5.47	0.16	0.32	14.7
Aphid reproduction <sup>-1e</sup>	<i>Rmprp-1</i>	C_an-c02_139432948	2	42.0	18.76	0.66	- 0.09	41.9
	<i>Rmprp-2</i>	C_an-04_30341348	4	46.3	4.06	0.26	0.25	6.4

Sun et al. *Theoretical and applied Genetics* 2020

- Zijn deze resultaten genoeg om een veredelingsproject op te zetten om pepers te krijgen met een verhoogde luizenresistentie?

## Ui (*Allium cepa*) / valse meeldauw (downy mildew, DM)

Valse meeldauw in ui kan grote verliezen veroorzaken.

Tegenwoordig zijn uicultivars hybriden. Resistentie tegen valse meeldauw is gevonden in een wilde verwant van ui, *A. roylei*. *A. roylei* is kruisbaar met ui en geeft een fertiele F1 plant. De resistentie komt door een enkel gen en is dominant. (dus 3:1 segregatie in een splitsende F2 populatie).

Met GISH (Genomic *in situ* hybridisatie) is het mogelijk genomen specifiek te kleuren, de verdeling van het uingenoom en het *Allium roylei* genoom kon zo in een hybride zichtbaar gemaakt worden. Het veredelingsbedrijf dat de DM-resistentie aan het inbouwen was wilde in een BC5S1 populatie zien hoe het veredelen vorderde. Door een gebrek aan een goed functionerende merker werd dit bepaald met ziekte-toetsen. Twee derde van de BC5S1 planten was resistent. Een aantal resistente BC5S1 planten werd zelfbestoven, maar geen enkele van de BC5S2 populaties was in zijn geheel resistent.

GISH toonde aan dat alle resistente BC5S1 planten heterozygoot waren (CR) en geen enkele homozygoot resistent (RR). Hierna werd verder veredeld om homozygoot resistente planten te vinden. Dat lukte in een groot opgezet experiment waarin veel nakomelingen werden getoetst.

Vragen:

- Waarom is het belangrijk dat *Allium cepa* en *Allium roylei* kruisbaar zijn?
- Waarom moet het resistentiegen homozygoot zijn in de resistente ouder van de hybride?
- Is het veredelen goed gelukt? Het veredelen was gebaseerd op de aanwezigheid van resistentie en de veredelaar (breeders eye en de beoordeling welke planten in de nakomelingenpopulaties het meest op ui leken)
- GISH is een mooie methode en hielp de gevonden resultaten te verklaren. Inmiddels is ui gesequenced (ook het gebied rondom het resistentiegen op chromosoom 3). Hoe zou nu het best het resistentiegen gevolgd kunnen worden, zou dit veel tijd besparen en waarom?
- Ui is een tweejarig gewas, wat het veredelen een langdurige bezigheid maakt. Hoe zou je dit proces korter kunnen maken?
- Hoeveel terugkruisingen zijn theoretisch nodig om genotypen te krijgen met minder dan 2% van de donor plant. En hoeveel terugkruisingen als je planten kan selecteren met 20% meer van de donor plant dan dat er theoretisch verwacht wordt? Hoeveel tijd win je? Denk eraan dat de generatietijd twee jaar is.
- Kan de zelfbestuiving ook nog gebruikt worden om minder donor DNA te krijgen?