

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

antwoorden:

- *Phytophthora infestans* is een oömyceet die vaak resistenties doorbreekt (maw 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?

Het is niet zo nuttig om identiek werkende genen te gebruiken, hoewel twee resistentiegenen die identiek werken misschien wel robuuster zijn maar ze kunnen tegelijkertijd doorbroken worden. Met diploïde cultivars is het ook mogelijk in dezelfde achtergrond verschillende sets merkers te maken.

- In de buurt van de resistentiegenen kunnen ongewenste genen aanwezig zijn, hoe verklein je de kans dat dergelijke genen meegeselcteed worden?

Recombinaties dicht bij het gen zoeken die zorgen dat er weinig genen meegesleept kunnen 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?

Dit kan door in twee stappen te selecteren, in de eerste terugkruising wordt een recombinatie aan één kant van het gen gezocht en in de tweede terugkruising gebruik je de plant met deze recombinatie en zoek je een plant met een overkruising aan de andere kant van het gen.

- Beschrijf de meest voor de hand liggend 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.

Eerst moet de donor met de recurrent parent gekruist worden. In de twee eerste terugkruisingen moeten de overkruisingen geïdentificeerd worden. Belangrijk dat hier ook een achtergrond screening gebruikt wordt. Na de zelfbestuiving wil je planten met het resistentiegen homozygoot en kan je ook nog selecteren op de homozygotie. Als er nog twee stukken heterozygoot zijn (naast het resistentiegen) dan kunnen de heterozygote stukken wegeselecteerd worden (1 op de 8 planten heeft dan theoretisch het resistentiegen homozygoot en de twee stukken homozygoot recurrent ouder. Als laatste stap moeten de hybrides gemaakt worden.

- De achtergrond screening versnelt het veredelingsprogramma. Hoe veel 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 als dat er theoretisch verwacht wordt. Hoeveel tijd win je? Denk eraan dat de generatietijd een half jaar is.

Theoretisch percentage donor % van donor: BC1 50%, BC2 25% BC3 12.5% BC4 6.25% BC5 3.1% BC6 1.5%. Dus 6 generaties om onder de 2% te komen. Als met een achtergrond screening meer planten een 20% hoger percentage donor geselecteerd kunnen worden dan BC1 30%, BC2 12%, BC3 4.8% , BC4 1.9% Dus 2 generaties en 1jaar sneller op de markt (van de 30% verwacht je 50 % donor DNA dus 15 %, je selecteert op 20% minder donor dus 12%)

- 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?

Er zijn alleen problemen als er meer dan twee resistentiegenen in hetzelfde gebied liggen of zelfs op dezelfde plaats dan levert dat problemen als je ze wilt combineren omdat ze in een diploïde aardappel ingebouwd moeten worden.

- Aan het eind wil een veredelaar weten of de geselecteerde planten resistent zijn en hoe lang ze resistent blijven. Onder welke condities zou je dit testen?

Liefst in het verschillende velden onder verschillende condities. Misschien ook in opeenvolgende jaren. Voor de zekerheid kunnen de planten ook geïnoculeerd worden met sporen suspensies van *Phytophthora infestans*

Appelveredeling

antwoorden:

- **Het ontwikkelen van een nieuw appelras kan tientallen jaren duren, waarom duurt dit zo lang?**

Appel groeit langzaam en bloeit pas voor het eerst na 3-7 jaar. Bepaalde eigenschappen kunnen pas na jaren beoordeeld worden (kolomgroei, vruchtkwaliteit). Terugkruisen is niet mogelijk in appel, waardoor het resultaat van een kruising lastig te voorspellen is

- **Kolomgroei is een dominante eigenschap en heterozygoot in 'Wijcik'. Was dit te verwachten?**

Ja, dat was te verwachten, een mutatie zal niet zo vlug twee allelen veranderen. Een mutatie met een recessief effect wordt 'gemaskeerd' door het andere allel en zou daardoor onopgemerkt blijven.

- **Kan het helpen om merkers te gebruiken om een nieuw ras met kolomgroei te ontwikkelen?**

In de eerste jaren van groei is kolomgroei nog niet duidelijk te zien. Door een merker te gebruiken kun je in zaailingen al bepalen of ze tot kolombomen uit zullen groeien. Hierdoor valt direct de helft van de nakomelingen van een kruising af, wat veel tijd en ruimte scheelt (appelbomen nemen veel ruimte in en moeten onderhouden worden, bovendien hoeven de bomen die afvallen niet op andere eigenschappen beoordeeld te worden).

- **Is het erg dat er af en toe een vergissing zorgt dat een boom niet de voorspelde kolomgroei geeft in een veredelingsprogramma?**

Geen probleem, dat herken je later wel en dan kan die bepaalde nakomeling verwijderd worden.

- **Kunnen twee bomen hetzelfde genotype hebben?**

In de hele procedure van in stand houden van de nakomelingen worden weleens vergissingen gemaakt waardoor bepaalde genotypen dubbel voorkomen.

- **Zou je eerst op algemene kenmerken selecteren of eerst op het kolomtype?**

Kolomgroei kan al direct in zaailingen bepaald worden met merkers. Voor andere eigenschappen zijn misschien geen goede merkers, waardoor het nuttig kan zijn om eerst op kolomgroei te selecteren en daarna op andere eigenschappen.

- **Kan het nuttig zijn om meerdere resistentiegenen tegen appelschurft te combineren?**

Ja, dit kan tot een sterkere of meer duurzame resistentie leiden

- **Is het nuttig om gebruik te maken van merkers voor het ontwikkelen van een appelras met resistentie tegen appelschurft? En waarom?**

Niet perse, als je met een ziektoets ook in zaailingen al kunt testen of ze vatbaar zijn voor appelschurft is het niet nodig om merkers te gebruiken. Het is afhankelijk van hoe je veredelingsprogramma eruitziet. Bij het combineren van verschillende resistentie genen heeft het wel een duidelijke toegevoegde waarde. Bij kwantitatieve resistentie is het lastig om de effecten van verschillende genen precies van elkaar te onderscheiden

in een ziekte-toets. Bij kwalitatieve resistentie is er in een ziekte-toets geen verschil tussen de nakomelingen met een enkel resistentiegen of meerder resistentiegenen.

- **Wat zijn de valkuilen bij het combineren van resistentiegenen tegen schurft?**

Er is veel kennis nodig van de individuele resistentiegenen, verschillen ze in werkzaamheid? Duurzaamheid resistentie is een moeilijk te bepalen eigenschap.

- **Wilde kruisbare verwanten van appel kunnen donoren zijn voor schurftresistentie. Wat is het nadeel van het gebruik van wilde verwanten?**

Negatieve eigenschappen van soorten uit het wild worden ook ingekruist (linkage drag), hier moet je weer vanaf zien te komen (terugkruisen met rassen) en dat kan erg lang duren.

- **Kunnen merkers helpen bij het ontwikkelen van een appelras met vruchten met een goede smaak/uiterlijk?**

Dit zijn complexe eigenschappen die door een heleboel verschillende genen bepaald worden. Voor specifieke aspecten (zoetheid, kleur) zou het wel nuttig kunnen zijn, als er betrouwbare merkers beschikbaar zijn.

Trips/Capsicum

antwoorden

Waarom wordt dit effect een QTL (Quantitatief Trait Locus) genoemd en niet een enkelgenskenmerk?

QTLs worden vaak gevonden in moeilijker te fenotyperen complexere eigenschappen. Dit maakt het moeilijker om precies te bepalen waar een gen ligt. Er zijn vaak ook meerdere genen betrokken wat het mappen moeilijker maakt (een combinatie van positieve factoren resp. en negatieve factoren, en ook een combinatie van belangrijke en minder belangrijke factoren. In een bepaald QTL kunnen ook meerdere genen in het gevonden gebied iets met de resistentie te maken hebben.

Wat zijn de ouders van de karteringspopulatie en wat is de voorwaarde dat dit QTL ook naar ander Capsicums overgebracht kan worden?

C. annuum CGN16795 en *C. chinense* CGN17219. De verschillende accessies moeten kruisbaar zijn (al dan niet met behulp van embryo rescue of andere technieken zoals brugkruisingen)

Wat is de grootte van het uiteindelijke doelgebied waar de QTL verwacht wordt, welk percentage is dat van chromosoom 6 (grootte chromosoom 6 ~ 60 Mbp).

0.67 % van chromosoom 6

Wanneer is het belangrijk deze regio nog kleiner te maken? Hoe maak je het gebied kleiner, kan het kleiner maken van het gebied ertoe leiden het resistentiegen te kloneren

Als door linkage drag het resistentie gen niet optimaal tot uiting komt. Zoeken van resistenties. Het kan tot het resistentiegen leiden als er in de regio nog maar een enkel gen aanwezig is.

Is het belangrijk het uiteindelijk verantwoordelijke gen te vinden?

Dit kan van belang zijn voor het testen van de functionaliteit van een gen en misschien ooit voor de toepassing met genetische modificatie technieken.

Trips is de vector van het TSWV-virus, betekent dit als de tripsresistentie overgebracht wordt de Capsicum ook geen last van trips zal hebben.

Nee, dit QTL maakt de plant niet absoluut resistent (effect 50%). Ligt ook aan de fase en hoe het virus overgebracht wordt.

Beschrijf de methodologie waarop je deze resistentie in kunt bouwen in een succesvolle vatbare cultivar. Gebruik als donor de oorspronkelijke resistente *C. annuum* CGN16795.

Normale procedure: kruisen, terugkruisen, selecteren met screening of gekoppelde merkers etc. etc.

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?

Een goede methode om gesynchroniseerde (zelfde leeftijd) tripsen te krijgen en een goede assay

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.

Een goede sequentie van een soort is gemakkelijk om te hebben want dan kan je in de fysieke buurt van een merker naar sequenties zoeken, deze door middel van de PolymeraseChainReactie te vermenigvuldigen (bijvoorbeeld een fragment van een aantal basen) en deze fragmenten van beide ouders te vergelijken en er een Single Nucleotide Polymorfisme assay van te maken.

Het vinden van nieuwe merkers is uiteraard gemakkelijker als de frequentie van verschillen hoger is maar dit is door de ontwikkeling van de sequentie technologie niet meer zo belangrijk. Er kunnen lange stukken sequentie vergeleken worden.

De resistentie komt minder tot uiting in nakomelingen van de nieuwe kruising met dezelfde donor. Hoe kan dat?

Er kunnen andere genen die een invloed op het resistentieniveau (al dan niet homozygoot) aanwezig zijn in de verschillende recipienten.

De merkers uit de eerste kruising kunnen niet gebruikt worden in een tweede kruising. Hoe komt dat en hoe kan je dat oplossen?

De SNPs tussen de ouders van een bepaalde kruising hoeven geen verschillen te geven in een andere kruising. Om weer verschillen te vinden moeten in de fysieke buurt van de merker fragmenten gesequenced worden en de sequenties moeten dan vergeleken worden om verschillen te vinden.

De fysieke buurt van merkers kan bekend zijn op basis van genomsequenties en het is ook mogelijk om vanuit de sequenties nabijgelegen sequenties te bepalen.

Ui/valse meeldauw

antwoorden:

- **Waarom is het belangrijk dat *Allium cepa* en *Allium roylei* kruisbaar zijn?**

Als ze niet kruisbaar zijn dan verzeil je snel in genetische modificatie als het lukt het resistentiegen te kloneren. En GMO is nog steeds controversieel en goedkeuring kost veel geld en is voor veel gewassen daarom niet haalbaar.

- **Waarom moet het resistentiegen homozygoot zijn in de resistente ouder van de hybride**

Als het niet homozygoot is zal 50% van de hybriden niet resistent zijn. Homozygotie is nodig om de hybriden uniform resistent te maken

- **Is het veredelen goed gelukt? Het veredelen was gebaseerd op de aanwezigheid van resistentie en de veredelaar (breeders eye die beoordeelde welke planten in de nakomelingenpopulaties het meest op ui leken)**

Het is erg goed gelukt, in een BC5 is het merendeel van de plant ui en zijn er nog maar op 1 of 2 plekken introgressies. Dit alles zonder gebruik van merkers (alleen selectie op resistentie en uiterlijk).

- **GISH is een mooie methode en hielp met een verklaring van de gevonden resultaten. Inmiddels is ui gesequenced (ook het gebied rondom het resistentiegen) op chromosoom 3. Hoe zou nu het meest efficiënt het resistentiegen gevolgd kunnen worden, zou dit veel tijd besparen en waarom?**

Dit maakt het efficiënter, er kan op de aanwezigheid van het resistentiegen geselecteerd worden en op overkruisingen tussen het resistentiegen en de lethaliteitsfactor. Een resistentietoets kan altijd misgaan en moet dan over. En daar moet maar tijd voor zijn.

- **Ui is een tweejarig gewas wat het veredelen een langdurige bezigheid maakt. Hoe zou je dit proces korter kunnen maken?**

Selectie op de achtergrond met een bepaald aantal merkers die over het genoom verspreid liggen. Bijvoorbeeld 48 merkers voor de 8 uienchromosomen.

- **Hoe veel 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 als dat er theoretisch verwacht wordt. Hoeveel tijd win je? Denk eraan dat de generatietijd twee jaar is**

Theoretisch percentage donor % van donor: BC1 50%, BC2 25% BC3 12.5% BC4 6.25% BC5 3.1% BC6 1.5%. Dus 6 generaties om onder de 2% te komen.

Als met een achtergrond screening meer planten een hoger percentage donor geselecteerd kunnen worden dan BC1 30%, BC2 12%, BC3 4.8% , BC4 1.9% Dus 4 generaties en 4 jaar sneller op de markt.

(van de 30% verwacht je 50 % donor DNA dus 15 %, je selecteert op 20% minder donor dus 12%)

- **Kan de zelfbestuiving ook nog gebruikt worden om minder donor DNA te krijgen?**

Ja dat kan, de heterozygote regio splitst ook uit na zelfbestuiving (50% zal homozygoot recipient worden).