NLT samenvatting Battle of the Genes

Herbivoren = planteneters

Carnivoren = planteneters

Omnivoren = alleseters

**De aardappel als gewas**

Aardappel Solanum tuberosum

Hoog zetmeelgehalte in hun zaden. Zetmeel is een belangrijke voedingsstof. Oorspronkelijk uit Andesgebergte. Nachtschadefamilie samen met tomaat, paprika en aubergine.

Wilde aardappel = natuuraardappel. Gekweekte aardappel = cultuuraardappel

Pootaardappel (moederknol) in de grond, daaruit stengels met balderen en bloemen, na de bloei: groene bessen met daarin zaden, ondergronds zijstengels (stolonen), uiteinden van stolonen vormen zich opzwellingen -> aardappelen

**Vegetatieve voortplanting**: knol in grond stoppen, nieuwe aardappelplanten

Van koolhydraat naar zetmeel

Reservestoffen (zetmeel) in aardappelknol leveren energie om nieuwe plant te laten groeien. Zetmeel = koolhydraat, fotosynthese geproduceerd als glucosemolecuul, voor transport: glucose omgezet in sacharose (**disacharide**, combi van glucose en fructosemolecuul), in knol sacharose omgezet in zetmeel (lange ketens glucose eenheden; **polysacharide**)

Typen aardappelen

1. Pootaardappelen; moederknollen, ploegen, bemesten, ruggen (heuveltjes maken) **poten**= ondiep in aarde, plant start met kiemen, ruggen verhoogd m.b.v. ruggenfrees, (extra: bemesten tijdens groeiseizoen, gewasbescherming) oogsten = **rooien**,
2. consumptieaardappelen
3. zetmeelaardappelen; viscositeit (stroperigheid) van belang, variatie hierin komt door ontstaan en verbreken van onderlinge bindingen tussen ketens.

Zetmeel vele toepassingen: soepen, levensmiddelen, monosachariden-> suikerwaren, plakmiddel, papier en textiel verharden

Vormen van landbouw

1. Gangbare landbouw
2. Biologische landbouw: geen kunstmest maar organisch mest, geen chemische gewasbeschermingsmiddelen maar gebruik van resistente rassen of vroeg in jaar poten

Aardappelziektes en plagen

Op bladeren bruine vlekken omringd door witte sporendragers van P.infestans. Ook andere factoren zoals micro-organsimen, insecten, aaltjes of onkruiden kunnen het gewas belagen

**Bedreiging en afweer**

**Resistent**: plant kan weerstand bieden aan een ziekteverwekker. Er ontstaan geen negatieve symptomen na besmetting.

**Vatbaar**: tegenovergestelde van resistent
 *Afweermechanismen:* zorgen ervoor dat planten resistent zijn.

1. Constitutieve afweer: altijd aanwezig en werkzaam in een plant en bestaat uit fysieke afweer en/of chemische afweer
**Fysieke afweer**: beschermingslagen
celniveau: stevige celwand (tegenhouden schimmels), produceren kruklaag
orgaanniveau: doornen (tegenhouden herbivoren)
daar tussen: v.b. cuticula (beschermende waslaag) vermindert verdamping. Trichomen (beschermende waslaag op het blad) vermindert voeding insecten

**Chemische afweer**: productie afweerstoffen
Directe afweer: gifstoffen die zorgen voor bittere smaak
Indirecte afweer: lokstoffen, plantbelagers aantrekken, die de belagers opeten
2. Geïnduceerde afweer: opwekken van heftige-reacties als plaag of ziekteverwekker is opgemerkt. Niet altijd aanwezig, dat zou te veel energie kosten. Ook kunnen cellen worden aangezet om plantenhormonen te produceren, andere weefsels worden zo geactiveerd om ook afweerstoffen te produceren.
Start zodra bepaalde karakteristieke kenmerken van belager op moleculair niveau door receptoren van de plant herkend worden.
**Receptor** is een eiwit op de buitenkant van cel (herkent moleculen van buitenaf).
 v.b. Chitine = molecuul van buitenaf
**Signaaltransductie** = doorgeven signalen binnen cel. Chitine uit celwand van schimmel bindt aan receptoren op de plantencellen. Receptoreiwit geeft signaal af naar binnenkant van de cel, en wordt doorgegeven richting celkern. Start van afweerreactie; enzym (chitinase) geproduceerd dat chitine afbreekt.
 **Wapenwedloop** tussen plant en schimmel: plant herkent de schimmel d.m.v. receptoren, scheidt enzym uit om schimmel af te breken. Sommige schimmels maken een soort schild, waardoor receptoren daar een beschermende eiwit voor moeten maken, en sommige schimmels maken de eiwitten zelf onzichtbaar voor de plant.
**Hypersensitive Response (HR)** = leidt tot geprogrammeerde celdood. Meest effectieve manier om verdere kolonisatie door indringer tegen te gaan. Cel produceert giftige stoffen waardoor de cel zelf en omringende cellen afsterven.

**Biotroof** = ziektewekkers die uitsluitend voedingstoffen kunnen onttrekken aan levende plantencellen.

Planten hebben in de evolutie geleerd om ziekteverwekkers te herkennen door mutaties die gevolgd zijn door natuurlijke selectie (Survival of the Fittest)

P. infestans
**Mycelium** = netwerk van schimmelachtige draden op en in het plantenweefsel die geïnfecteerd is door P.infestans.

Groep van de oömyceten= verwant met bruine algen

Mycelium is diploïd, cellulose in celwand. Geen schimmel want: celwand bevat geen chitine, maar cellulose, en mycelium is diploïd. Veelzijdige manier van voortplanten zorgt voor snelle uitbreiding, zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk.
**Ongeslachtelijke voortplanting** bij P.infestans lijkt op de manier van schimmels, het mycelium vormt **sporangiën** (sporen) die door de wind of de regen verspreid worden. Deel van plant beworteld, genotype van nakomelingen gelijk aan ouderplant.
Sporangiën
De sporen worden al kort na infectie geproduceerd via mitose, geen lange levensduur, actief wanneer het in water komt.

1. lage temperatuur: **Indirecte kieming**  = kieming via zoösporen. Vanuit sporangium moeten eerst zoösporen gevormd worden die daarna pas gaan kiemen.
Sporangiën deelt zich in 6 tot 8 zwemsporen(**zoösporen**). Zoösporen hebben 2 zweepharen, leeft slecht enkele uren, bij oppervlak van aardappel wordt kiembuis gevormd waarmee hij een plantencel binnendringt.
2. Hoge temperatuur (>14C): **Directe kieming** = ontstaat uit het sporangium direct een kiembuis die de plantencel penetreert. Directe kieming (sporangium kan maar 1 plantencel infecteren) minder kans op succes dan indirecte kieming (8 zoösporen die allemaal plantencel kunnen infecteren)

Veel zonlicht voor oömcyeet ongunstig: sporangiën en zoösporen sterven

**Geslachtelijke voortplanting** bij P. Infestans wordt slechts eenmaal per groeiseizoen volbracht.

Stuifmeel op een stempel van een bloem (kruising), zodat een eicel bevrucht wordt en de vrucht uitgroeit met daarin de zaden.

Infectie

Sporen van de ziekteverwekker P.infestans kunnen met de kiembuis via de huidmondjes, via een beschadiging of door de cellen heen de plant in groeien, vormen daar een mycelium dat voedingsstoffen onttrekt aan de plant. Genoeg energie verzameld?-> groeit P.infestans door de huidmondjes naar buiten en vormt hij opnieuw sporangiën die door de wind of de regen verspreid kunnen worden.

P.infestans kan m.b.v. een specifiek receptorgen (dat voor receptoreiwit zorgt)herkend worden, geïnduceerde afweer komt op gang, HR-proces, ziekteverwekker plant niet verder kan koloniseren

Genetische aanpassing aan omgevingsfactoren:
Aanpassing door kruising of mutatie
Extra mutatie: milieufactoren; fouten bij meiose, stressomstandigheden, straling, licht, virussen, bacteriën en zware metalen.

**Veredeling van een gewas**

Erfelijkheid

Geslachtelijk voortplanting: door crossing-over en bevruchting ontstaat er een nieuw uniek genoom tijdens meiose. Dit soort voor genetische diversiteit, mutaties dragen ook hieraan bij.

**Meiose:** vorming bij geslachtscellen. 1 cel (diploïd) verdeeld over 4 haloïde cellen (de gameten). **Gameten**: eicellen en zaadcellen (pollenkorrels, stuifmeelkorrels).

**Recombinatie:** ontstaan van nieuwe genencombinaties:Nieuwe genencombinaties door combinatie genen bij bevruchting en door vorming van geslachtscellen (door crossing-over)

*Crossing-over*: in profase I aan het begin van de meiose, delen van homologe chromosomen binnen één oudergenoom worden uitgewisseld.
*Bevruchting* pollenkorrel versmelt met eicel gelegen in dei stamper -> ontstaat diploïde cel.

Ongeslachtelijke voortplanting (**Vegetatieve voortplanting**): ongeslachtelijke vermeerdering. Het genoom (erfelijk materiaal) onveranderd.

 v.b.: stekken, enten en afleggen

Diploïd = twee chromosomensets per celkern, één uit de stuifmeelkorrel en één uit de eicel.

Cultuuraardappel is tertraploïd.

Veredeling

Plantenveredeling is het naar de behoefte van de mens ontwikkelen van nieuwe rassen uit bestaande rassen. Veredelaars proberen eigenschappen te verbeteren naar de wensen van actoren.
Gewassen kruisen is makkelijker bij diploïde gewassen (wilde soorten) dan bij tetra- of polyploïde gewassen (huidige geteelde gewassen).

Aardappelplant verkocht aan telers -> produceren pootgoed -> geteelde aardappels verkocht aan fabrieken of supermarkten -> consument

**Actoren**: deelnemers aan een ritueel. De gewenste eigenschappen worden bepaald door verschillende actoren:
tijdstip van afrijping, knolvorm, oogdiepte, kook- en bakeigenschappen, houdbaarheid, vleeskleur, schilkleur, zetmeelgehalte, resistentie tegen ziektes en plagen.

**Introgressieveredeling**: inkruisen van een eigenschap vanuit een wilde soort of primitieve cultuursoort. Het aandeel afkomstig van de wilde aardappel wordt steeds kleiner. Ontstaan van nieuw ras, doordat een resistentie gen uit wilde aardappel in cultuuraardappel kan worden gebracht.

Bij F1 begin je met 50% cultuuraardappel en 50% wilde aardappel. Bij BC1 (backcross1) wordt 75% cultuuraardappel en 25% wilde aardappel met de gewenste geselecteerde eigenschappen teruggekruist. Steeds worden de planten geselecteerd met de gewenste eigenschappen. Bij de BC7 is het percentage DNA cultuuraardappel 99,6%.

Lastig proces omdat er bij de F1 veel ongewenste wilde genen komen die lastig kwijt te raken zijn door terugkruisen en selectie.

Lang proces, de veredelaars moeten ook de gewassen op veel verschillende plaatsen testen. Het veredelingsprogramma (kruisen, selecteren en testen) duur vele jaren.

**Linkage drag**: probleem bij plantenveredeling; een gen dat codeert voor een ongewenste eigenschap komt samen met het gewenst gen in nakomelingen terecht, bij kleine afstand tussen beide genen op chromosoom.

**Biotechnologie**

Merker-technologie

**Locus**: de plaats van een gen op het chromosoom.

Indirecte methode -> moleculaire merkers -> vaststellen gen in het chromosoom.

**Moleculaire merker**: stukje DNA dat dichtbij een specifiek gen ligt en daardoor na het kruisen steeds samen met het gen in de nakomelingen komt: ‘gekoppeld’ aan het gen.

**DNA polymorfisme**: variaties in het DNA binnen dezelfde soort (zeldzaam). De moleculaire merker bevat een DNA polymorfisme dat in de buurt van het locus van een gen is gelegen. De **DNA-sequentie** (nucleotide volgorde) kan variëren: nucleotide verwisseld, deletie of insertie. Als insertie van 5 basenparen (bp) aanwezig is in resistente aardappel, dan is de resistentie in de buurt van het locus van een resistentie-gen op hetzelfde chromosoom.

Kans op recombinatie door crossing-over tussen merker en het gen is erg klein.

**Recombinatie- analyse**: uit recombinatiefrequentie de grootte bepalen van de afstand tussen een merker en het locus van een gen.

% recombinatie gen-merker weergegeven in de maat centiMorgan (cM)

**Linkage maps**: (koppelingskaarten) staat waar de merkers op het chromosoom liggen ten opzicht van elkaar

**Merker-geassisteerde selectie**: m.b.v. een moleculaire merker planten selecteren op aanwezigheid van bepaalde gewenste genen. Dit gebeurt na ‘klassieke’ kruising. Conclusie betrouwbaarder naarmate de merker dichter in de buurt van het gewenste gen ligt. Door vroege analyse kunnen nakomelingen zonder gewenst gen meteen uit veredelingsprogramma verwijderd worden, bespaart ruimte, arbeidsuren en dus geld.

Isolatie

Chemische stoffen scheiden DNA van andere onderdelen van de cel, omdat stoffen als chlorofyl en eiwitten storen bij verdere DNA bewerking.

PCR-techniek Biotechnologie

(polymerase chain reaction)

DNA vermenigvuldigen

Stuk DNA met merker vermeerderd (geamplificeerd) m.b.v. primers die binden aan het DNA op de plaats van de merker (na uitelkaar gaan van helix structuur). Het enzym DNA-polymerase vormt vanaf de plaats van de primer een nieuwe streng DNA met de complementaire basenvolgorde van de bestaande streng. 30 keer herhaald.

Knip-techniek Biotechnologie

**Restrictie-enzym**: knipt een DNA streng bij een specifieke nucleotide-sequentie.

 **DNA-digestie**: het knippen

(Gel)-elektroforese: Biotechnologie
d.m.v. fragmenten op grootte scheiden na gaan of het DNA-fragment met de gewenste lengte aanwezig is. Felle kleur aan DNA, DNA op agarose-gel, elektrische spanning, - DNA naar + pool via de poriën in gel, kleine delen verplaatsen sneller richting de + pool.

Merker vinden dicht in de buurt van resistentie-gen

Resistentie gen geplant met vatbare plant, wetten van Mendel komt het resistentie-gen tot uiting bij vast %, DNA van vatbare nakomelingen vergeleken met resistentie nakomelingen, zoeken naar kleine stukjes DNA die wel bij de resistentie groep maar niet bij andere groep voorkomen

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Biotechnologie

Tijdrovend en duur

Zoeken naar onderdelen uit totale DNA-vingerafdruk die uniek zijn voor resistente nakomelingen. Merker gevonden? -> omzetten in eenvoudige merker die gebruikt kan worden

Identificatietechniek om het genoom van verschillende organismen van elkaar te onderscheiden

1. Digestie: DNA van ouderplanten van vatbare en resistente nakomelingen geïsoleerd. Door 2 restrictie-enzymen ontstaan er fragmenten met verschillende lengtes maar met zelfde nucleotiden aan uiteinden (knipplaatsen).
2. Ligase: Aan uiteinden **adapters** geligeerd (geplakt) met enzym ligase.
3. Vermenigvuldiging: delen genoom geamplificeerd door PCR met **primers** die binden aan de sequentie van de adapters en de bijbehorende knipplaats.
4. Scheiding: ontstane mengsel van NDA-fragmenten (AFLP-fragmenten) op grootte gescheiden m.b.v. gel-elektroforese, gezien worden als een fingerprint.
5. Identificatie: gezocht naar onderdelen van AFLP-fragmenten die alleen voorkomen in resistente planten.

AFLP methode gebruiken om eenvoudig type moleculaire merker te maken. AFLP-fragment uit gel gesneden, DNA-sequentie van dit fragment bepaald, specifieke primers gemaakt die passen op dit stukje van het genoom van resistente plant.

**Genetische transformatie**

GMO = genetisch gemodificeerd organisme

Van een plant een GMO maken door in het genoom van plant een gen van buitenaf te brengen.

Het isoleren van een gen

**Sequencen** van een DNA-fragment is het bepalen van de nucleotidenvolgorde ervan. Genen isoleren en vermeerderen. Start en stopcodes zijn herkenningspunten voor computersoftware.

Het kloneren van een resistentie gen m.b.v. een BAC bank

Met restrictie-enzymen knipt genoom in fragmenten, gezochte gen bevindt zich in één van de stukken DNA, de genoomfragmenten worden geligeerd (geplakt) in plasmiden (=BAC= Bacterial Artificial Chromosomes), bacterie vermenigvuldigd? -> plasmide gekopieerd.

Plasmiden tegenwoordig kunstmatig geconstrueerd en bevatten **multi cloning site**, daar zit een specifieke DNA-sequentie zodat restrictie-enzymen het DNA kunnen knippen, vervolgens kunnen op die plaats DNA-stukken worden geligeerd met wel een miljoen baseparen.

Alle verschillende fragmenten worden in plasmiden geplakt, stroomstoot zorgt ervoor dat de plasmiden door het celmembraan heen in de E.coli bacteriën komen. Bacteriën worden opgebracht op een voedingsbodem waar ze gaan groeien, als ze delen worden de BAC’s ook gedeeld. Gekoppelde moleculaire merker gebruikt om gewenste gen te achterhalen. Alle bacteriën gescreend, gezochte gen vermeerderd, gewenste genen met restrictie-enzymen uit plasmide geknipt, genen in vatbare aardappelplant ingebracht (transformatie), resistent? Juist

Verschil kloneren en PCR:

kloneren in vivo die bij eigen deling ook het toegevoegde DNA vermeerderd

PCR in vitro in machine waarin bouwstoffen worden toegevoegd

Transformeren Biotechnologie

Inbrengen gen in aardappelplant

**Transformatie**: Kunstmatig veranderen van genoom van plant

Na isoleren en vermeerderen van gen komt inbrengen.

Tumorvorming in plant: stukje DNA uit plasmide (Ti-DNA) wordt ingebouwd in DNA van plantencellen en zet de cellen aan tot overmatige celdeling. De dochtercellen van de cellen produceren vervolgens voedingsstoffen voor de bacteriën.

Genenkanon

Het ‘bombarderen’ van de plantencellen met kleine kogeltjes waarvan het opp. is bedekt met DNA dat je wil inbrengen in de plantencel

Planten die dergelijke behandeling hebben ondergaan

Klein percentage werkelijk getransformeerd (0,1 – 4%)

**Selectiemerker**: getransformeerde cellen onderscheiden door dit gen in plasmide

Vaak een antibioticum of herbicide-resistentiegen waardoor na toedienen alleen de cellen met ingebouwde DNA tot plant kunnen uitgroeien.

Soms gewenste resistentie-gen op de plaats van ander gen ingebouwd, negatieve gevolgen voor andere eigenschappen van de plant. Gecontroleerd: genexpressiebepalingen, DNA-sequencing, fenotypisch. Alleen de planten waarbij het gen maar 1 keer is ingebouwd, op de juiste plaats, worden geselecteerd

DuRPh (Duurzame Resistentie tegen Phytophtora infestans)

Duurzame methode om resistente aardappelplanten te ontwikkelen d.m.v. transformatie

**Cis-genese**: alleen genen uit kruisbare soorten worden overbracht in aardappelplant

**Transgenese**: genen uit andere organismen ingebracht

D.m.v. cis-genese een resistentie-gen tegen P.infestans (uit wilde soorten) inbrengen in de huidige aardappelrassen. Aantal verschillende resistentiegenen ingebracht naast elkaar als in een cassette, om te voorkomen dat P.infestans zich snel aanpast en de resistentie omzeilt. Resistentie gebaseerd op meerdere genen, gecombineerd zodat die voor veel verschillende manieren van resistentie zorgen.

Verschillende combinaties van genen in cassettes, verschillende setjes resistentiegenen, deze afwisselen in tijd of locatie, P.infestans kleinere kans om resistentie door te breken, duurzame resistentie.

GM gewassen op de markt

GM = genetisch gemodificeerd

Meeste GM gewassen in: VS, Argentinie, Brazilie, India, Canada, China, Paraguay en Zuid Afrika

**Bt** gewassen: gewassen die resistent gemaakt zijn tegen insecten en onkruidverdelger glyfosaat (Roundup)

 v.b.: mais, soja, katoen en koolzaad

Bt: bacterie die een gif afscheid dat insecten doodt.

Insecten die de plant eten worden door de plant zelf ‘bestreden’, gebruik van conventionele pesticiden(schadelijk mens en dier) minder

Europa importeert veel GM gewassen

Besluitvorming en toelating

De EFSA beoordeelt in de VS de veiligheid van nieuwe GM gewassen voor mens, dier en milieu. Toelatingsprocedure is kostbaar en duurt lang.

De Commissie Genetische Modificatie (COGEM) in Nederland geeft adviezen aan de regering.

**Coexistentie**: telen van GM gewassen naast GM-vrije gewassen van dezelfde soort

 Vermenging kan bij transport of verwerking van oogst

Voedselproduct meer dan 0,9% ingrediënten bevat van GM gewassen -> GM op etiket

 Gebaseerd op politiek compromis

Melk, eieren en vlees van dieren die met GM gewassen worden gevoerd, hoeven geen GM etiket

Bezwaren tegen genetische modificatie

- Tegennatuurlijk, slecht voor mensen, dier en milieu

- GM gewassen in milieu verspreiden, nadelige gevolgen voor het voedselweb en biodiversiteit buiten akkers

- Boeren onkruidbestrijdingsmiddelen omdat herbicideresistente mais er geen last van heeft

- Eten van GM gewassen misschien gevaarlijk voor gezondheid

- Productie GM gewassen kan invloed hebben op de machtsverhoudingen tussen boeren en zaadleveranciers, verslechtert de onderhandelingspositie van boeren

- Biologische boeren bang dat hun gewassen in contact komen met genen uit GM gewassen, dan niet meer als biologisch gecertificeerd.

Eigenschappen van de getransformeerde planten waarop onderzoekers selecteren:

- aanwezigheid van bepaalde selectiemerker

- aanwezigheid van ingebrachte gen

- hoe vaak ingebracht gen voorkomt, afhankelijk van aantal aanwezige kopieën

- eventueel veranderde andere eigenschappen