

Resistentieveredeling met S-Genen in Solanaceae gewassen

Een literatuuronderzoek naar S-genen die kunnen worden gebruikt ten behoeve van de resistentieveredeling van Solanaceae gewassen.



Afstudeerwerkstuk

Bert-Jan Roegholt

Augustus-2017

Resistentieveredeling met S-Genen in Solanaceae gewassen

Een literatuuronderzoek naar S-genen die kunnen worden gebruikt ten behoeve van de resistentieveredeling van Solanaceae gewassen.

Colofon:

Dit rapport is geschreven als
afstudeerwerkstuk voor de opleiding Toegepaste
Biologie bij de Aeres Hogeschool.

Opdrachtgever
PACT-Consortium

Afstudeerdocent
Roos van Maanen

Externe begeleider
Nelleke Kreike

Auteur
Naam: Bert-Jan Roegholt
Opleiding: Toegepaste Biologie
Student-nummer: 3018216

Almere, 14 augustus 2017

DISCLAIMER

Dit rapport is gemaakt door een student van Aeres Hogeschool als onderdeel van zijn/haar opleiding. Het is géén officiële publicatie van Aeres Hogeschool. Dit rapport geeft niet de visie of mening van Aeres Hogeschool weer. Aeres Hogeschool aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade voortvloeiend uit het gebruik van de inhoud van dit rapport.

Voorwoord

Beste lezer,

Mijn naam is Bert-Jan Roegholt en als kleine jongen was ik al geïnteresseerd in planten. Ik heb op latere leeftijd dan ook besloten toegepaste biologie te studeren en het zal u niet verbazen dat ik voor de specialisatie richting plant heb gekozen. Voor mijn minor ben ik naar Nijmegen gegaan, waar ik mij heb verdiept in de moleculaire plantenbiologie.

Dit afstudeerwerkstuk schrijf ik naar aanleiding van mijn afstudeerstage bij de hogeschool Inholland, waar ik werkzaam was binnen het lectoraat groene biotechnologie. Dit lectoraat werkte samen met het Petunia And CRISPR/Cas Technology (PACT) consortium in Amsterdam. Eerder, tijdens mijn minor, ben ik in aanraking gekomen met Nelleke Kreike. Zij hield zich binnen het PACT-consortium bezig met het bepalen van de toepasbaarheid van de CRISPR/Cas techniek op Petunia. Ik heb haar gevraagd of zij een stageplek beschikbaar had, waarin ik meer kennis kon opdoen over mutagenese met de CRISPR/Cas techniek en of ik over dit onderwerp ook een afstudeerwerkstuk kon schrijven.

Dit onderzoeksrapport komt dus voort uit samenwerking tussen InHolland, het PACT-consortium en mij als student van de AERES hogeschool in Almere. Het onderzoeksrapport legt een theoretische basis voor het gebruik van geschikte genen in de resistentieveredeling van voedselgewassen uit de familie van de Solanaceae. In het onderzoek wordt gezocht naar genen, die na het aanbrengen van mutaties met een moleculaire techniek, de resistentie van deze gewassen kunnen bevorderen. Enkele belangrijke gewassen binnen deze familie zijn: de aardappel (*Solanum tuberosum*), de aubergine (*Solanum melongena*), de tabak (*Nicotiana tabacum*) en de tomaat (*Solanum lycopersicum*).

Mijn dank gaat uit naar eenieder die mij heeft gesteund tijdens het schrijven van deze literatuurstudie. In het bijzonder wil ik Nelleke Kreike bedanken voor de mogelijkheid om mijn afstudeerwerkstuk te schrijven over dit interessante onderwerp en Roos van Maanen voor de begeleiding.

Bert-Jan Roegholt

Almere, 2017

Inhoudsopgave

Samenvatting.....	2
Abstract	3
1 Inleiding	5
2 Onderzoeksmethode	9
3 Resultaten.....	13
4 Analyse	21
5 Discussie	25
Literatuurlijst	29
BIJLAGE I Tabel 4, 5, 6.....	33
BIJLAGE II Overzicht van ziektes bestudeerd tijdens dit onderzoek	37

Samenvatting

De resistentieveredeling, het ontwikkelen van resistentie tegen pathogenen bij planten, is noodzakelijk om grote gewasverliezen te voorkomen. Een resistentie-gen (R-gen) verhindert infectie met een pathogeen bij een plant. Bij klassieke veredeling wordt gebruik gemaakt van het inkruisen van dominante R-genen. Dit is een langdurig proces en door adaptatie van het pathogeen wordt de plant na verloop van tijd wederom vatbaar. Een snellere en meer duurzame methode is het verkrijgen van resistentie via vatbaarheids-genen (S-genen). S-genen maken infectie met een pathogeen juist mogelijk, of zijn van essentieel belang voor het pathogeen om infectie te kunnen bewerkstelligen. Deze S-genen kunnen met behulp van moleculaire technieken, zoals CRISPR/Cas, worden uitgezet, waarmee ook resistentie verkregen kan worden. Deze vorm van resistentieveredeling is sneller toe te passen en de verkregen resistentie houdt langer stand. Het uitschakelen van S-genen kan echter ook negatieve gevolgen hebben voor de ontwikkeling van de plant. De hoofdvraag van dit onderzoek luidt daarom: Welke S-genen zijn het meest veelbelovend voor gebruik bij de resistentieveredeling van Solanaceae gewassen?

In deze literatuurstudie is gezocht naar S-genen in Solanaceae gewassen waarvan de uitschakeling of expressievermindering tot resistentie heeft geleid en weinig of geen negatieve effecten met zich meebracht. Tevens is onderzocht of uitschakeling van deze genen ook in een ander gewas uit de Solanaceae familie of in *Arabidopsis thaliana* tot resistentie heeft geleid. Op basis van de bovengenoemde gegevens zijn vervolgens scores aan de S-genen toegekend. De meest veelbelovende genen per pathogeen zijn vervolgens in een overzichtstabel gezet. Uit de analyse blijkt dat een aantal genen interessant zijn voor verder onderzoek naar recessieve resistentie tegen verschillende pathogenen in Solanaceae gewassen, omdat een uitschakeling of expressievermindering van deze genen zorgt voor resistentie tegen meerdere pathogenen. Deze genen zijn: MLO, DND, DMR6, NtTOM 1-3 en ELF4E1-2.

Voor toekomstige literatuurstudies naar veelbelovende S-genen wordt aangeraden om te zoeken naar studies waarbij expressievermeerdering van een S-gen tot een vermeerderde vatbaarheid heeft geleid. In eventuele experimentele vervolgstudies met één of meerdere van de veelbelovende S-genen hier onderzocht, wordt aangeraden om in acht te nemen dat uitschakeling in andere gewassen mogelijk andere effecten met zich mee kan brengen, ook bij planten binnen dezelfde familie. Daarnaast kan het uitschakelen van een combinatie van bepaalde genen wellicht een verhoogde resistentie opleveren.

Abstract

The development of pathogen resistant cultivars is an important feature in plant breeding and is necessary to prevent major crop losses. Resistance genes (R-genes) prevent pathogen infections in plants. Classic breeding techniques use sexual recombination to cross dominant R-genes into cultivars. Because of pathogen adaptation however, the plant will soon become susceptible to the pathogen again when using this method. Susceptibility genes (S-genes) provide a faster and more durable method of obtaining pathogen resistance. The presence of active S-genes make it possible for pathogens to achieve successful infection. With the use of molecular techniques like CRISPR/Cas, these genes can be knocked out or silenced, which can lead to long-term pathogen resistance in a much shorter time period. However, some mutations in S-genes can negatively affect the development of the plant. The research question is: What are the most promising S-genes for obtaining resistance in the cultivation of Solanaceae species.

In this review a list of S-genes was made of which knocking-out or silencing has led to pathogen resistance, with few or no negative effects on plant development, in one or more Solanaceae crops or in *Arabidopsis thaliana*. Based on the level of resistance obtained and any negative effects caused to the plant, each possible gene was graded. The most interesting genes were summarized per pathogen. Analysis showed several interesting genes, that gave high-level resistance to multiple pathogens in their recessive forms, with no or few side-effects. These genes are: MLO, DND, DMR6, NtTOM 1-3 and ELF4E1-2.

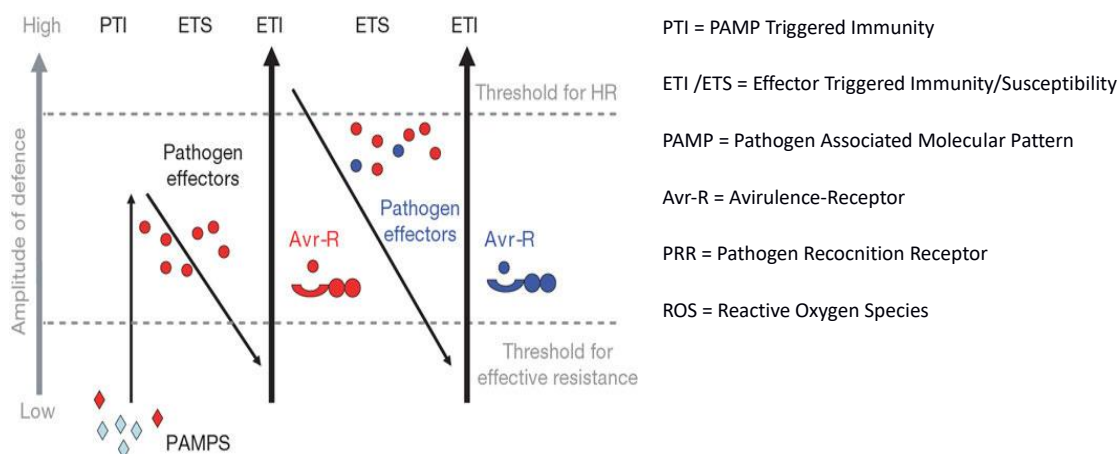
In future similar studies on possibly interesting S-genes, it is advised to look for genes in which *higher* expression led to *higher* pathogen susceptibility. In future experimental research it should be kept in mind that the use of S-genes that are successful in one crop, might give either better or worse results in another crop. Also, a combination of genes could lead to a more complete pathogen resistance.

1 Inleiding

Het verkrijgen van resistentie tegen pathogenen is een essentieel onderdeel van de veredeling van voedselgewassen. In het verleden hebben verschillende pathogenen geleid tot massale gewasverliezen. Een bekend probleem deed zich voor tijdens de Ierse hongersnood (1845-1850), toen de schimmel *Phytophthora infestans* grote delen van de aardappeloogst aantastte, met grote gewasverliezen en hongersnood als gevolg. Hedendaags wordt wereldwijd bijna 20% van de opbrengstverliezen veroorzaakt door ziektes en plagen (Oerke, 2006). Om ervoor te zorgen dat belangrijke voedselgewassen in de toekomst vrij zullen zijn en vrij zullen blijven van ziekte en plagen, is het noodzakelijk om te blijven innoveren in de resistentieveredeling van voedselgewassen. Om hier een bijdrage aan te leveren wordt in dit rapport gezocht naar nieuwe mogelijkheden om de resistentie van *Solanaceae* gewassen te bevorderen. Tot deze familie behoren veel van de belangrijkste voedselgewassen, waaronder aardappel (*Solanum tuberosum*) tomaat (*Solanum lycopersicum*) en paprika (*Capsicum annuum*).

Voor het verkrijgen van resistentie is het van belang te begrijpen hoe resistentie bij planten werkt. Planten hebben van nature een sterk afweermechanisme tegen pathogenen. De eerste verdedigingslaag bevindt zich aan de buitenkant, deze bestaat uit haren (trichomen) en een dikke waslaag (cuticula). Deze verdedigingslaag biedt de plant globale afweer tegen zowel biotische als abiotische stress en voorkomt het binnendringen van pathogenen. Wanneer een pathogeen deze laag van verdediging passeert worden moleculaire structuren van het pathogeen (PAMPS: Pathogen Associated Molecular Patterns) herkend door receptoren in de plant (PRRs: Pathogen Recognition Receptors). Deze receptoren behoren tot de tweede laag van het afweermechanisme van de plant. Hierna vindt een constante concurrentiestrijd plaats tussen plant en pathogeen. Doordat de plant wisselend resistent tegen het pathogeen of vatbaar voor het pathogeen is, ontstaat een zigzag-model (zie figuur 1).

Na herkenning van de PAMPS zal de plant antimicrobiële stoffen uitscheiden (ROS: Reactive Oxygen Species), die de celwand van het pathogeen afbreken, alsmede stoffen die de celwand van de plant verstevigen. Deze vorm van resistentie wordt ook wel PAMP Triggered Immunity (PTI) genoemd en deze herkenning werkt tegen een breed scala aan pathogenen.



Figuur 1: The Plant immune system (PDF Download Available). Geraadpleegd op: <https://www.researchgate.net/publication/6688798> The Plant immune system

Pathogenen zullen deze PTI proberen te omzeilen en hebben hiervoor effectormoleculen ontwikkeld en deze worden gecodeerd door avirulente genen (avr-genen). Deze effectormoleculen binden aan de eiwitten die voor herkenning van het pathogeen zorgen en veranderen op deze wijze hun activiteit. Hierdoor is de plant wederom vatbaar voor het pathogeen (ETS: Effector Triggered Susceptibility). De plant moet in dat geval opnieuw op zoek naar resistentie en doet dit door de aanmaak van eiwitten, i.e. Avirulent-Receptors (Avr-R's), gecodeerd door de Resistentiegenen (R-genen). Deze eiwitten herkennen de effectormoleculen van het pathogeen en de veranderingen in het eigen eiwit bewerkstelligd door de effectormoleculen, waardoor (wederom) resistentie ontstaat (ETI: Effector Triggered Immunity). Deze vorm van resistentie werkt, vergeleken met PTI, zeer specifiek.

ETI wordt in de plantveredeling het meest gebruikt en wordt daarom ook 'klassieke veredeling' genoemd. De veredelaars kruisen de resistente planten, de planten in het bezit van een of meerdere dominante R-genen, met planten die voor ons de gewenste eigenschappen bezitten. Dit is een tijdrovende klus, maar het biedt slechts een tijdelijke oplossing: door natuurlijke mutaties in de avr-genen van het pathogeen zal de plant na verloop van tijd wederom vatbaar worden. Het verkrijgen van resistentie met R-genen is dus niet erg duurzaam (Van Schie & Takken, 2014).

Resistentie kan ook op een alternatieve manier worden verkregen. Wanneer een plant-gen juist een infectie met een pathogeen mogelijk maakt, of wanneer dit gen van essentieel belang is voor het pathogeen om een infectie te kunnen bewerkstelligen, dan wordt dit een vatbaarheids- of Susceptibility (S-gen) genoemd. Wanneer deze genen worden uitgezet, zal het pathogeen een geheel nieuwe functie moeten ontwikkelen om de plant te kunnen infecteren. Het ontwikkelen van dergelijke nieuwe functies is aanzienlijk moeilijker dan het verliezen van reeds bestaande functies (Sun et al., 2016a). Met het uitzetten van S-genen kan daarom meer langdurige resistentie worden bereikt dan dat mogelijk is met het inkruisen van R-genen (Gawehns, Cornelissen & Takken, 2013). Daarnaast neemt het uitschakelen van S-genen met moleculaire technieken relatief weinig tijd in beslag.

De geschiedenis van resistentieveredeling met S-genen begon in 1942 met de ontdekking van een meeldauw-resistent gerstas (*Hordeum vulgare*). Rond 1970 werd ontdekt dat een mutatie in een S-gen hier verantwoordelijk voor is, het Mildew resistance Locus O (MLO) gen, dit gen levert in een homozygoot recessieve toestand resistentie op. Mutaties in Mlo homologen van zandraket (*Arabidopsis thaliana*) AtMlo2, erwten (*Pisum sativum*) PsMlo1 en tomaat (*Solanum lycopersicum*) SlMlo1 resulteerden in homozygoot recessieve toestand ook in resistentie tegen verschillende meeldauwsoorten. Dit zijn dus waarschijnlijk orthologe genen van elkaar, d.w.z. genen met een gemeenschappelijke herkomst, die vaak dezelfde functie hebben (Jørgensen, 1992). Inmiddels kunnen S-genen worden onderverdeeld in de volgende drie groepen: 'S-genes allowing basic compatibility', 'S-genes encoding immunity suppressors' en 'S-genes allowing sustained compatibility' (van Schie & Takken, 2014).

Het uitschakelen van 'S-genes allowing basic compatibility' vermindert de kans op infectie met een pathogeen. Deze genen geven namelijk een signaal af waardoor het pathogeen de plant als een goede gastheer herkent. Een voorbeeld uit deze groep is het bovengenoemde Mlo gen dat resistentie biedt tegen meeldauw. Bij aanwezigheid van het MLO eiwit in de celwand, is een succesvolle infectie van meeldauw mogelijk. De sporen van de schimmel kunnen dan de celwand binnendringen en hier vervolgens een haustorium aanleggen (Panstruga, 2005).

De tweede groep S-genen, 'S-genes encoding immunity suppressors', zorgt voor onderdrukking van de immuniteitsreactie. Planten onderdrukken de immuunreactie wanneer geen pathogeen aanwezig is om energie te besparen. Wanneer deze S-genen worden uitgeschakeld, staat het afweermechanisme van de plant voortdurend aan. Hierdoor produceert de plant grote hoeveelheden fytohormoon salicylzuur (SA). SA speelt een essentiële rol in het afweermechanisme tegen biotrofe pathogenen en hemibiotrofe pathogenen. De eerste hebben een levende gastheer nodig om in leven te blijven, de tweede kunnen verder leven na het overlijden van de gastheer. SA bevordert ook de aanmaak van secundaire metabolieten, waaronder anti-pathogeen gerelateerde eiwitten (Wang et al., 2007). De aanwezigheid van hoge SA-waarden leidt vaak tot hypersensitieve reactie (HR). Dit is een afweerreactie waarbij geïnfecteerde plantcellen afsterven, om zo verspreiding van het pathogeen te voorkomen. Arabidopsis planten met een mutatie in het SA-3 gen dat noodzakelijk is voor de hydroxylase van SA naar 2,3-DHBA, waren minder vatbaar voor de schimmel *Pseudomonas syringae* dankzij hun hoge SA waarden (Song et al., 2008).

De derde groep, 'S-genes allowing sustained compatibility', is voornamelijk van belang voor het metabolisme van het pathogeen in de plant. Een goed voorbeeld hiervan zijn de SWEET-genen die voor eiwitten in het plasmamembraan coderen. Deze eiwitten zijn noodzakelijk voor suikertransport naar de apoplastische ruimte van de cel, waar het pathogeen de suikers kan opnemen. Wanneer het OsSWEET11 eiwit in rijst (*Oryza sativa*) niet meer aangemaakt wordt door een mutatie in een SWEET-gen zijn er minder voedingsstoffen beschikbaar voor het pathogeen (Chen et al., 2010).

Met de CRISPR/Cas technologie kunnen deze S-genen worden uitgezet om de plant op deze drie verschillende wijzen resistent te maken tegen pathogenen. CRISPR/Cas stelt veredelaars namelijk in staat om op een vooraf bepaalde plaats in het DNA te knippen. De cel zal hierop proberen het DNA te repareren. Echter, wanneer de reparatie mislukt, ontstaat een mutatie waardoor functieverlies van het eiwit kan optreden (SiA, 2015). Vergeleken met eerdere technieken kunnen met CRISPR/Cas sneller en preciezer mutaties worden aangebracht. Voordat CRISPR/Cas bestond is er veel gebruik gemaakt van RNA interferentie (RNAi), waarbij de genexpressie wordt verminderd maar niet volledig wordt uitgezet. In tegenstelling tot RNAi, zorgt CRISPR/Cas voor een volledige uitschakeling van het gen, waardoor er een betere resistentie kan worden verkregen dan bij andere technieken. Hedendaags is het gebruik van GMO's (Genetic Modified Organisms) in Nederland niet toegestaan. Omdat de wetgeving in de toekomst kan versoepelen en om concurrentie uit het buitenland te voorkomen, wordt er door Nederlandse zaad- en plantenveredelingsbedrijven toch onderzoek gedaan naar deze innovatieve manier van resistentieontwikkeling.

Het PACT-consortium is een project waarin Nederlandse veredelingsbedrijven (o.a. ENZA Zaden, Rijk Zwaan en Syngenta) samenwerken met onderwijsinstellingen om de potentie van CRISPR/Cas techniek bij de veredeling van *Solanaceae* gewassen vast te stellen. Ze passen de techniek toe op Petunia (*Petunia hybrida*) omdat deze plant in wetenschappelijk onderzoek fungeert als modelgewas voor de *Solanaceae* familie (Gerats, Vandenbussche, 2005).

In opdracht van het PACT-consortium wordt in dit adviesrapport een overzicht gemaakt van reeds bekende S-genen uit de *Solanaceae* familie. Hieruit wordt een selectie gemaakt van de meest veelbelovende S-genen, zodat deze gebruikt kunnen worden in experimenteel onderzoek met CRISPR/Cas in petunia. De hoofdvraag van dit onderzoek luidt daarom: Welke S-genen zijn het meest veelbelovend voor gebruik bij de resistentieveredeling van *Solanaceae* gewassen?

2 Onderzoeksmethode

Dit onderzoek is een literatuurstudie. De volgende databases zijn gebruikt bij het verzamelen van literatuur: Google Scholar, Science direct en Wiley. Tevens zijn er een aantal artikelen door het PACT-consortium aangeleverd.

Afbakening

Omdat er in dit rapport is gekozen voor een oriënterende literatuurstudie worden alleen S-genen onderzocht die al in eerdere studies zijn uitgeschakeld of tot expressievermindering zijn gebracht. De uitschakeling van een bepaald S-gen heeft niet per definitie dezelfde gevolgen voor alle Solanaceae planten die dit S-gen ook hebben. Zelfs wanneer dit wel het geval is kunnen de sterkte van de effecten sterk verschillen van gewas tot gewas. Aangezien een analyse van deze verschillen experimenteel onderzoek vereist wordt hier in dit rapport niet bij stilgestaan.

Hoofdvraag: Welke S-genen zijn het meest veelbelovend voor gebruik bij de resistentieveredeling van Solanaceae gewassen?

Om een antwoord te kunnen geven op de hoofdvraag, zijn de volgende deelvragen opgesteld:

1. Welke mutaties in S-genen uit de Solanaceae familie zijn in eerdere studies onderzocht?
2. Van welke S-genen uit deelvraag 1 is bekend dat ze orthologe genen zijn van andere Solanaceae gewassen of van *Arabidopsis thaliana*?
3. Welke pathogenen zijn afhankelijk van deze S-genen?
4. In welke mate wordt de resistentie bevorderd door uitschakeling of expressievermindering van deze S-genen?
5. Welke negatieve effecten hebben de uitschakeling of expressievermindering van deze S-genen op de plant? Hoe sterk zijn deze effecten?

Na het beantwoorden van de deelvragen, zijn tabellen opgesteld waarin de gevonden genen per pathogeen (schimmel, bacterie of virus) zijn beoordeeld op de werkzaamheid en de negatieve effecten. Na de analyse van deze tabellen volgt een hoofdtabel waarin per pathogeen het meest veelbelovende S-gen wordt beschreven. Deze S-genen zijn mogelijk interessant voor het verkrijgen van resistentie in Solanaceae gewassen

Deelvraag 1: Welke mutaties in S-genen uit de Solanaceae familie zijn in eerdere studies onderzocht?

Voor het beantwoorden van deze deelvraag werd gezocht naar artikelen waarin S-genen zijn uitgezet of tot expressievermindering zijn gebracht bij planten binnen de *Solanaceae*. Een aantal technieken dat werd gebruikt voor het uitschakelen of het verminderen van genexpressie van S-genen waren: Zinc Finger Nuclease (Zhang et al., 2010), Virus Induced Gene Silencing (Bai et al., 2008), Ethyl methanesulfonate (Jiang & Wilde, 2016a) RNA interference (Sun et al., 2016b; Huibers et al., 2013) en CRISPR/Cas (De Toleda Thomazella, 2016).

Deze technieken werden tijdens dit onderzoek gebruikt als zoekterm om een overzicht te maken van vatbaarheids-genen in Solanaceae gewassen. Voor elk van deze genen, zijn de deelvragen 2, 3, 4 en 5 beantwoord en verwerkt in drie tabellen (bacteriën, schimmels, virussen). Per tabel wordt beschreven welke genen zijn gevonden, tegen welke soorten de genen werkzaam zijn en wat de negatieve effecten op de plant zijn van de uitschakeling of de expressievermindering van deze S-genen.

Deelvraag 2: Van welke S-genen uit deelvraag 1 is bekend dat ze orthologe genen zijn van andere Solanaceae gewassen of van *Arabidopsis thaliana*?

Orthologe-genen zijn geëvolueerd vanuit een gemeenschappelijke voorouder. Normaal gesproken behouden deze genen dezelfde functie in de verschillende soorten. Het is interessant om hier onderzoek naar te verrichten, omdat de genen mogelijk ook in andere gewassen werkzaam kunnen zijn en daarmee mogelijke kandidaten zijn als geschikt S-gen. Wanneer meer over een S-gen bekend was of hier meer onderzoek naar is verricht, kreeg het S-gen een hogere waarde als geschikte kandidaat voor de resistentieveredeling met S-genen.

Deelvraag 3: Welke pathogenen zijn afhankelijk van deze S-genen?

Per artikel staat in veel gevallen duidelijk beschreven met welk pathogeen de plant is geïnoculeerd en of de pathogenen gebruik maken van de S-genen. Meestal geeft het gen, na uitschakeling, resistentie tegen een grote groep binnen dezelfde familie van het pathogeen (Van Schie en Takken, 2014). Dit is voornamelijk te zien bij meeldauw. Meeldauw is een verschijnsel van een ziekte, dat door meerdere pathogenen kan worden veroorzaakt. Ook is het mogelijk dat er meerdere S-genen voor vatbaarheid kunnen zorgen tegen een specifiek pathogeen (Pavan et al., 2010). In deze deelvraag werden de genen uit deelvraag 1 uitgebreid door per S-gen te onderzoeken tegen welke pathogenen vatbaarheid ontstond.

Deelvraag 4: In welke mate wordt de resistentie bevorderd door uitschakeling of expressievermindering van deze S-genen?

Wanneer de uitschakeling of de expressievermindering van het S-gen een groot effect had op resistentie tegen bepaalde pathogeeninfecties, kreeg het S-gen een hogere waarde dan wanneer er alleen een vermeerdering van resistentie zichtbaar was. Aan het eind werd gekeken welke S-genen er na uitschakeling hebben gezorgd voor resistentie tegen meerdere pathogenen. Wanneer de uitschakeling van een S-gen resistentie tegen een grote groep bevordert, kreeg het een hogere waarde toegekend en beschreven als meest veelbelovende S-gen.

Deelvraag 5: Welke negatieve effecten heeft de uitschakeling of expressievermindering van deze S-genen op de plant? Hoe sterk zijn deze effecten?

Een groot probleem voor resistentieveredeling door middel van de uitschakeling van S-genen houdt in dat deze genen vaak meerdere functies hebben binnen de plant. Deze functies zijn in veel gevallen cruciaal en juist daarom maken pathogenen van deze genen gebruik. Met deze deelvraag werd onderzocht of de uitschakeling van de S-genen gepaard gaat met pleiotrope effecten en/of fitnesskosten. Sommige effecten van pleiotropie kunnen nadelig zijn en kunnen zelfs lethaal zijn. Tijdens de studie van Sun et al. (2016a) werden verschillende S-genen uitgeschakeld in *S. tuberosum*. Na de uitschakeling van het StDMR1-gen hadden de planten last van een verminderde groei en bij de StDND-1 uitgeschakelde genen waren auto-necrotische plekken alleen op oudere delen van het blad te zien. Van de verkregen resultaten uit deelvraag 1 is onderzocht wat de negatieve effecten op de groei en de ontwikkeling van de planten waren na de uitschakeling of de expressievermindering van een gen en vervolgens werden deze effecten beoordeeld met een waarde.

3 Resultaten

Er is gezocht naar S-genen die in Solanaceae gewassen zijn uitgeschakeld of tot expressievermindering zijn gebracht en mogelijk geleidt hebben tot een verhoogde ziekteresistentie tegen bepaalde pathogenen. Per artikel wordt onderzocht tegen welk pathogeen dit gen effectief is. Ook wordt gekeken naar de negatieve effecten op de ontwikkeling van de plant na de uitschakeling of de expressievermindering van dit gen. Tevens wordt onderzocht of de genen orthologe genen zijn van *A. thaliana* of andere Solanaceae gewassen.

MLO (Mildew Locus O)

MLO Vatbaarheidsgenen behoren tot de S-genen die coderen voor eiwitten die zich in het plasmamembraan van de plant bevinden en voor vesikel-gerelateerd transport zorgen. Wanneer functionele MLO eiwitten afwezig zijn, of in mindere mate aanwezig, zullen veel schimmels die meeldauw veroorzaken er niet in slagen om de gastheer te infecteren (Panstruga, 2005). Het merendeel van de fungiciden die gebruikt worden zijn gericht op de bestrijding van meeldauw (Hewitt, 1998). Om deze reden is het van belang is het belangrijk om te zoeken naar S-genen en op deze wijze een alternatieve manier te vinden voor de bestrijding van meeldauw.

Natuurlijke mutaties van het MLO gen zorgen voor complete resistentie tegen verschillende meeldauw soorten in gerst (*Hordeum vulgare*: Jørgensen, 1992), tomaat (*Solanum lycopersicum*: Bai et al., 2008) en erwt (*Pisum sativum*: Humphry et al., 2011). Functieverlies van het eiwit door mutatie in het HvMLO gen van gerst zorgt voor resistentie tegen de schimmels *Blumeria graminis* en *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Mutanten van dit gen vertoonden enkel een vermindering van de zaadproductie 5-15% (Schwarzbach, 1976). Doordat weinig negatieve effecten aanwezig waren die de opbrengst van het gewas beïnvloeden, worden deze mutanten al sinds 1979 gebruikt in de gerstenteelt (Lyngkjær et al., 2000). In tomaat (*S. lycopersicum* var. *Cerasiforme*) hebben natuurlijke mutaties van het SIMLO gen (Genbankaccession: NP001234814) geleid tot resistentie tegen *Oidium neolycopersici* en waren geen pleiotrope effecten zichtbaar. Omdat natuurlijke mutatie in het MLO gen resistentie geeft, wordt onderzoek gedaan naar resistentie in andere gewassen. Hieronder worden enkele studies naar resistentie via het MLO gen beschreven.

In de studie van Zheng et al. (2013) zijn lijnen van het tomatenras 'Moneymaker' met verschillende allelen in het SIMLO gen geïnoculeerd met de schimmel *Leveillula taurica* en *O. neolycopersici*. SIMLO mutanten gaven complete resistentie tegen *O. neolycopersici*. Zij gaven echter, geen resistentie tegen *L. taurica*. In hetzelfde artikel wordt via Virus Induced Gene Silencing (VIGS) het MLO gen van peper (*Capsicum annuum*) uitgezet en worden de ontstane mutanten vervolgens geïnoculeerd met *L. taurica*. Eerder in deze studie is gezocht naar de gelijkenis met het MLO gen in tomaat. Een fylogenetische analyse van Expressed Sequence Tag (EST) van *A. thaliana*, tomaat en peper, bewijst dat CaMLO2 (accession number: JW054099) dichterbij SIMLO1 staat dan CaMLO1. Na uitschakeling door middel van VIGS in zowel CaMLO1 als CaMLO2 in peper waren de planten meer resistent tegen de schimmel *L. taurica*. Hierbij was CaMLO2 effectiever dan CaMLO1. Zowel CaMLO1 als CaMLO2 zouden kunnen bijdragen aan ziekteresistentie tegen *L. taurica* in peper. De mutanten van beide groepen vertoonden geen abnormale groei of uiterlijke kenmerken. Na overexpressie van het CaMLO2-gen in tomaat werden de mutanten wederom vatbaar voor *O. neolycopersici*, maar juist meer vatbaar voor *L. taurica* in vergelijking met de controle groep. Dit wijst er op dat dit gen ortholoog is van peper en mogelijk in meer gewassen binnen de Solanaceae werkzaam.

Ook in *Petunia hybrida* leidt een vermindering van de genexpressie met RNAi op het MLO1 gen tot een verhoogde resistentie tegen meeldauw. In de studie van Jiang et al. (2016b), is het MLO gen (PhMLO1: Genbankaccession: KT833172) tot expressievermindering gebracht. Hierbij is gebruik gemaakt van exon 15 en vervolgens zijn de planten geïnoculeerd met de schimmel *Podosphaera*

xanthii. De planten hadden, in vergelijking met de controle groep, een vertraging van ziekteverschijnselen. Er waren 12 dagen na de inoculatie sporen van de schimmel aanwezig en bij de controle groep vanaf 8 dagen. Het negatieve effect op de plant was een afname van 50% van de zaadproductie. Van de zaden ontkiemde 24%, terwijl in de controle groep het kiemingspercentage 87% was. Ook ontstond een vermindering in de groei bij de uitgeschakelde planten.

Doordat er duidelijke bewijzen waren voor de correlatie tussen de uitschakeling en de resistentie tegen meeldauw (Bai. et al., 2008; Zheng et al., 2013; Jiang et al., 2016b), is door Appiano et al. (2015) gezocht naar orthologen van het MLO gen in andere gewassen binnen de Solanaceae. Via de Polymerase Chain Reaction (PCR) is er naar het MLO gen gezocht in aubergine (*Solanum melongena*), tabak (*Nicotianum tabacum*) en aardappel, die vervolgens SmMLO1 (Genbankaccession: KM244717), NtMLO1 (Genbankaccession: KM244716) en StMLO1 (Genbankaccession: KM2244715) zijn genoemd. De genen toonden in al deze gewassen een gelijkheid van 81,4-94,8%, wat suggereert dat de MLO genen ortholoog zijn. Na overexpressie van deze genen op de tomaat mutant SIMlo1, verhoogde wederom de vatbaarheid voor *O. neolyopersici*. Hierdoor bestaat een grote kans dat de uitschakeling van deze genen in andere Solanaceae gewassen kan leiden tot resistentie tegen verschillende meeldauw soorten. Ook wordt hier vermeld dat een verandering van een enkele nucleotide in het gen leidt tot functieverlies. Vervolgstudies zouden uitgevoerd moeten worden om resistentie via Mlo in deze gewassen te bepalen.

Resistentie met Mlo is een van de best beschreven S-genen en is reeds sinds 1940 bekend. In vrijwel alle artikelen wordt door middel van een mutatie of een expressievermindering in MLO een duidelijke resistentievermeerdering verkregen. Dit maakt het MLO gen een veelbelovende kandidaat in de resistentieveredeling van Solanaceae gewassen.

PMR & DMR (Powdery/Downy mildew resistance)

Functieverlies van PMR en DMR werken evenals het MLO gen tegen verschillende vormen van meeldauw. DMR1 codeert voor een homoserine kinase, dat als katalysator fungeert bij de aanmaak van O-phospho-homoserine uit homoserine in *A. thaliana* (Van Damme et al., 2009). PMR4 codeert voor de aanmaak van callose, wat wordt afgezet in de papillae. De functie van papillae is nog niet bekend (Hückelhoven, 2014).

Via RNAi is de expressie van de SIPMR4 en SIDMR1 genen in tomaat (cv. Moneymaker) verminderd en vervolgens voor beide getest op de schimmel *O. neolyopersici* (Huibers et al., 2013). Bij de SIPmr4 groep was, 8 dagen na de inoculatie, de ontwikkeling van de schimmel aanzienlijk minder dan de ontwikkeling van de schimmel in de controle groep. Twaalf weken na uitschakeling van dit gen waren geen verschillen in de groei of afwijkingen van de bladvorm zichtbaar. Het gemiddelde van de stamdiameter was in deze groep echter lichtelijk verminderd, maar niet significant aantoonbaar. In de SIDmr1 groep waren minder duidelijke resistentie verschillen te zien. Hier was pas sprake van resistentie wanneer de transcript levels meer dan 4 keer waren verminderd. De planten produceerden minder nakomelingen en vertoonden een drastische groeivermindering. In dezelfde studie werd onderzocht of deze genen ortholoog zijn, door ze te vergelijken met de genen van *A. thaliana*. In *A. thaliana* gaven deze genen, na uitschakeling door middel van ethylmethaansulfonaat (EMS) resistentie tegen verschillende bacteriën en schimmels (Van Damme et al., 2005). De gelijkheid was voor PMR (AtPMR4: Genbankaccession: AEE82336.1) 76% en voor DMR (AtDMR1 Genbankaccession: AEC06605.1) 71%. Omdat *A. thaliana* ook gastheer kan zijn voor de schimmel *O. neolyopersici* (Göllner, et al., 2008), is daarom onderzocht of na expressievermindering van deze orthologe genen in zowel *A. thaliana* als tomaat resistentie ontstaat. In beide

mutantgroepen is resistentie verkregen, wat duidt op een mogelijke resistentie bevorderende werking in andere Solanaceae gewassen.

Ook in aardappel (cv. Désirée) zijn zowel PMR als DMR tot genexpressievermindering gebracht, door middel van RNAi. In de studie van Sun et al. (2016a) zijn ze vervolgens getest op *P. infestans*. De expressievermindering van StPMR4 resulteerde in een verminderde vatbaarheid zonder verdere negatieve effecten. Expressievermindering van StPmr5 en StPmr6 zorgde niet voor verminderde vatbaarheid. In tegenstelling tot bij tomaat (Huibers et al., 2013), ontstond er een duidelijkere resistentie bij de StDmr1 groep. Hierbij was echter sprake van lichte dwerggroei en de bladeren waren lichter van kleur. Dit kan er mogelijk mee te maken hebben dat dit gen pleiotropie vertoont met de aanmaak van bladgroen. Ook in de StDmr6 groep resulteerde RNAi in resistentie, hier waren geen negatieve fenotypische effecten zichtbaar. Dit artikel laat hiermee zien dat deze genen de orthologe genen zijn van het onderzoek van Huibers et al (hetzelfde RNAi construct is gebruikt). Zowel StPmr als StDmr resulteerden in resistentie. Ook in *A. thaliana* resulteerden deze genen in resistentie tegen *P. infestans*. Omdat in *A. thaliana* andere fenotypische effecten zichtbaar waren, is het mogelijk dat de fenotypische effecten per plant verschillen.

Met behulp van CRISPR-Cas is het DMR6 gen (exon 2 & 3) in tomaat uitgeschakeld (De Toleda Thomazella et al., 2016). Via het CRISPR-Cas9 construct is het SIDMR6 gen (Solys03g080190) geknipt in exon 2 en 3. Vervolgens zijn de mutanten geïnoculeerd met de bacteriën: *Xanthomonas gardneri*, *X. perforans* en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en met de Oömyceet *Phytophthora capsici*. De bovengenoemde bacteriën en schimmel, zijn voor tomatentelers zeer problematisch en resistentie is daarom zeer wenselijk. Na inoculatie met de bacteriën vertoonden de mutanten een verhoogde resistentie. Bij de Oömyceet waren ziekteverschijnselen bij de mutanten later zichtbaar. Uit een eerder onderzoek in *A. thaliana* is gebleken dat mutanten van het DMR6 gen resistent waren tegen verschillende pathogenen (Zeilmaker et al., 2015). De mutanten vertoonden geen significante afwijkingen. De mutanten vertoonden echter een verhoogde SA waarde, wat correleert met resistentie tegen *P. syringae*, *P. parasitica* en *Cercospora nicotianae* (Delaney et al., 1994).

Net als het MLO gen is veel onderzoek verricht naar resistentie tegen meeldauw met DMR en PMR. Deze resistentie zorgt vaak voor een bijna volledige resistentie tegen verschillende meeldauw soorten en is daarom veelbelovend als S-gen voor telers van Solanaceae gewassen.

SR/CAMTA (Ca²⁺/calmodulin-binding transcription factor)

St/CAMTA eiwitten spelen een belangrijke rol in het plantdefensiemechanisme tegen biotische en abiotische stress. De exacte manier waarop dit gebeurt is tot nog toe niet bekend (Li et al., 2014). De uitschakeling van AtSR1 in *A. thaliana* gaf een vermeerdering van SA en kan dus tot een verhoogde resistentie leiden tegen verschillende pathogenen (Du et al., 2009).

Expressievermindering door middel van VIGS in tomaat (cv. Suving 2003) resulteerde in een verhoogde resistentie tegen de schimmel *Botrytis cinerae* en de bacterie *P. syringae* (Li et al., 2014). Verschillende SISR-genen zijn met behulp van VIGS getarget, alleen bij de SISR1 (Genbankaccession: GU170838) of SISR3L (Genbankaccession: JN566051) genen ontstond een vermeerderde resistentie. Beide groepen toonden vier dagen na de inoculatie met *B. cinerae* een duidelijke vermindering (35-

51%) van ziektesymptomen in vergelijking met de controle groep. Na de inoculatie met *P. syringae* waren de ziektesymptomen verminderd met een factor 10. Negatieve effecten waren alleen zichtbaar bij de SISR1 groep, waarbij een verminderde droogtestress tolerantie en overtollig waterverlies in de bladeren te zichtbaar was. Voor zowel de SISR1 als de SISR3I groep kan worden gesteld dat zij resistentie bieden tegen *B. cinerea* en *P. syringae*.

In de eerder genoemde studie van Sun et al. (2016a), waarbij 11 orthologe genen van *A. thaliana* in aardappel (cv. Désirée) tot expressievermindering zijn gebracht met RNAi, gaf de expressievermindering van het StSR1 gen (Sotub01g012330) een verhoogde resistentie tegen de bacterie *P. infestans*. In deze studie kwam naar voren dat de expressievermindering geen negatieve effecten had op de planten.

Doordat deze genen, in de gewassen van de bovengenoemde studies, een grote overeenkomst vertoonden en als orthologe genen zijn beschreven, kunnen dit veelbelovende genen zijn voor de teelt van Solanaceae gewassen.

CESA (Cellulose is synthesized by cellulose synthases)

CESA's zijn eiwitstructuren in het plasmamembraan, die nodig zijn voor de secundaire celwand formatie. Een mutatie in dit gen zorgt voor een verhoogde resistentie in *A. thaliana* tegen de bacterie *Ralstonia solanacearum* en de schimmel *Plectosphaerella cucumerina* (Hernández-Blanco et al., 2007)

In aardappel leidt een expressievermindering van het StCesa3 gen tot een verhoogde resistentie tegen de schimmel *P. infestans*. Via RNAi is het StCesa3 tot expressievermindering gebracht. De RNAi-groep vertoont zeven dagen na inoculatie nog geen ziektesymptomen en de controle groep vertoonden reeds ziektesymptomen na vier dagen. Het CESA gen is afkomstig uit eerder onderzoek in *A. thaliana*. Omdat dit gen ook werkzaam is in aardappel, kan worden gesteld dat dit gen ortholoog is.

DND (Defense No Death)

Het DND gen codeert voor de aanmaak van cyclic nucleotide-gated cation channels (CNGC's). Deze CNGC's spelen een rol bij het transporteren van Ca^{2+} in plantcellen (Clough et al., 2000). Eerder, heeft expressievermindering van het DND gen in *A. thaliana*, geleid tot resistentie tegen verschillende schimmels, bacteriën en virussen (Sun et al., 2016b).

In tomaat (cv. Monneymaker) en aardappel (cv. Désirée) heeft een expressievermindering, door middel van RNAi op het DND1 gen, geleid tot resistentie tegen *P. infestans* en gedeeltelijke resistentie tegen de schimmels *Golovinomyces orontii* en *O. neolicopersici* (Sun et al., 2016b). Het *A. thaliana* DND1 gen (Genbankaccession: BAE99132) werd hierbij gebruikt als template voor het RNAi construct. In zowel aardappel als in de tomaat waren 10 dagen na inoculatie met *P. infestans* significant minder sporen te zien vergeleken met de controle planten (afhankelijk van de agressiviteit van de schimmel). Dit kan mogelijk voor complete resistentie zorgen. Enkele dagen na de inoculatie van de schimmels *G. orontii* en *O. neolicopersici* waren sporen zichtbaar op de RNAi DND1 planten. Echter waren sporen later aanwezig dan op de controlegroep. Ook is geïnoculeerd met de nematode *Globodera rostochiensis* en het aardappelviurs Y (PVY). Op de wortels van de aardappelen waarvan de genexpressie zwaar was verminderd, waren niet significant minder cysten van *G. rostochiensis* aanwezig dan op de controle groep en alle aardappelen waren nog steeds vatbaar voor PVY. Negatieve effecten van expressievermindering in de aardappel waren een lichte vorm van autonecrose op oude bladeren. De negatieve effecten van genexpressievermindering in tomaat zorgden voor mannelijke steriliteit, dwerggroei en een sterke vorm van autonecrose op zowel jonge als oude bladeren. DND1 resulteerde in minder negatieve effecten in aardappel dan in tomaat.

In het boven genoemde onderzoek is ook onderzocht of deze genen orthologe genen zijn van het DND gen in *A. thaliana* (AtDND1). De overeenkomsten waren voor tomaat 75% (Soly02gg088560) en voor aardappel 99% (Sotub02g034320). Dit zijn veelbelovende overeenkomsten en op basis hiervan kan worden voorspeld dat deze genen ook aanwezig zijn in andere gewassen binnen de Solanaceae.

SYR (plasma membrane-localized) SYNTAXIN-RELATED

In het onderzoek van Eschen-Lippold et al. (2012) is het SYR1 gen in aardappel (cv. Désirée) met RNAi tot expressievermindering gebracht en vervolgens geïnoculeerd met *P. infestans* en *Botrytis cinerea*. Na inoculatie met *P. infestans* vertoonden de StSyr1 groep drie dagen na de inoculatie, een vermeerdering van de SA waarden. Negatieve effecten in deze groep waren een vroegtijdige veroudering van de bladeren en een spontane ontwikkeling van chlorose en necrose. De groei van *P. infestans* in de StSyr1 groep was 35% minder dan de groei in de controle groep. Dit kan volgen uit het feit dat de vermeerdering van autonecrose wordt geactiveerd op geïnvesteerde delen. Er was geen sprake van resistentie tegen *B. cinerea*. In dit onderzoek komt niet duidelijk naar voren of deze genen ortholoog zijn met de genen van *A. thaliana*.

SNAP (SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR PROTEIN)

In hetzelfde onderzoek van Eschen-lippold et al. (2012) is met behulp van RNAi ook het SNAP (stSNAP33) gen tot expressievermindering gebracht. Hierdoor was even als in de stSyr1 groep een vermeerdering van SA waarden te zien en ook hier waren symptomen van vroegtijdige veroudering en een spontane ontwikkeling van chlorose en necrose zichtbaar. Bij StSNAP33-RNAi lijnen was geen verschil in pathogeenvermindering zichtbaar bij *P. infestans* vergeleken met de controle groep. Bij de infectie met de schimmel *B. cinerea* waren de planten niet zichtbaar minder vatbaar.

TOM (Tobamovirus Multiplication)

De bovengenoemde S-genen geven vooral resistentie tegen schimmels en bacteriën. Ook veel virussen veroorzaken grote gewasverliezen. Het Tobacco mosaic virus (TMV) en het tomato mosaic virus (ToMV) worden veel gebruikt als representatieve virussen in onderzoek naar RNA virussen in planten. TMV is verantwoordelijk voor grote gewasverliezen in tabak, tomaat en peper (Sikora et al., 1998). Vermeerdering van virussen, waaronder tobamovirussen, heeft waarschijnlijk te maken met verschillende eiwitten in het membraan. TOM1 en TOM3 zijn vooral aanwezig in het membraan van de vacuole en nodig voor de vermeerdering van virussen (Hagiwara et al., 2008). In *A. thaliana* gaf een gelijktijdige expressievermindering van AtTom1 en AtTom3 complete resistentie (Yamanaka et al., 2002).

Bij expressievermindering met RNAi van NtTOM1 (Genbankaccession: AB193039) en NtTOM3 (Genbankaccession: AB193040) in tabak (cv. Samsun), waren significant minder mozaïek symptomen zichtbaar na inoculatie met ToMV (Asano et al., 2005). Hierbij is gebruik gemaakt van homologe sequenties uit *A. thaliana*. Wanneer alleen NtTOM1 tot expressievermindering is gebracht, waren duidelijk minder virus eiwitten (coding protein: CP) aanwezig dan de controle planten. Ziektesymptomen verschenen in de bovenste bladeren, maar verschenen enkele dagen later. De expressievermindering van NtTom3 resulteerde niet significant in een vermindering van ToMV. Dit kan het geval zijn omdat er een kleine gelijkenis tussen NtTOM1 en NtTOM3 (57,9 %) bestaat, met een maximum van 14 gelijke opeenvolgende nucleotiden. Bij gelijktijdige expressievermindering van NtTOM1 en NtTOM3 waren 13 dagen na de inoculatie vrijwel geen CP's aanwezig. Bij de controle groep waren 4 dagen na de inoculatie al CP's zichtbaar. De bladeren van de groepen, waarbij de

expressie van zowel TOM1 als TOM3 was gebracht zagen er gezond uit. Na meer dan 40 dagen waren CP's lichtelijk aanwezig en waren milde mozaïek symptomen zichtbaar. ToMV vermeerdering is sterk verminderd wanneer tom1 en tom3 gelijktijdig zijn uitgeschakeld. Het virus kan zich echter nog steeds vermeerderen, maar de aanmaak van CP's is drastisch verminderd. Ook gaf deze groep een sterke en bijna complete resistentie tegen andere tobamovirussen die voorkomen in Solanaceae gewassen, waaronder PMMoV (pepper mottle mosaic virus) en TMGMV (tobacco mild green mosaic virus). Na inoculatie met CMV (cucumber mosaic virus) was geen resistentie zichtbaar. Dit komt overeen met de bevindingen van het onderzoek naar CMV in *A. thaliana* waarbij gelijktijdig AtTOM1 en AtTOM3 tot expressievermindering zijn gebracht (Yamanaka et al., 2002).

De expressievermindering van TOM1 en TOM3 in tabak, met het RNAi construct van peper, leidt ook tot resistentie tegen TMV (Kumar et al., 2012). Na de bevindingen van Asano et al. (2005), waarin gezocht is naar orthologen van het TOM gen in rijst en meloen (*Cucumis melo*), is in deze studie onderzocht of het RNAi construct, gebaseerd op het TOM gen in peper, resistentie kan geven in tabak. Na de sequentieanalyse kwam naar voren dat het CaTOM1 gen in peper voor 85% overeenkwam met *Nicotiana tabacum* NtTOM1 en *S. lycopersicum* SITOM1 (Genbankaccession: AB193041). Voor CaTOM3 was de overeenkomst 82,7% met NtTOM3. Het RNAi construct was ontwikkeld op CaTOM1 en CaTOM3 en was vervolgens NtTOM1 en NtTom3 genoemd omdat ze getest zijn op *N. tabacum* (cv. Samsun) en *Nicotiana glutinosa*. Twee weken na de inoculatie met TMV waren geen CP's aanwezig in de eiwit extracties van zowel de NtTom1 als in de NtTom3 planten in vergelijking met de controle groep. Ook waren in beide groepen geen ziektesymptomen zichtbaar. In de NtTom1 groep waren geen necrotische plekken zichtbaar en in de NtTom3 groep waren enkele necrotische plekken zichtbaar. Omdat in beide groepen complete resistentie werd verkregen, kan dit er mogelijk op wijzen dat TOM genen orthologe genen zijn en in meerdere planten binnen de Solanaceae werkzaam zullen zijn wanneer er homologe genen gebruikt worden van nauw verwante soorten. Het is echter niet bekend of het product van deze genen (de eiwitten) in alle planten dezelfde functie heeft.

EIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E)

Virussen maken gebruik van de gastheer om zichzelf voort te planten. Deze mechanismen worden host factoren genoemd. Een mutatie in een van deze host factoren resulteert vaak in recessieve resistentie tegen virussen uit de familie van de potyviridae. Potyvirussen zijn zeer destructief en 30% van alle plantvirussen zijn potyvirussen (Kang et al., 2005a). Van deze potyvirussen komen 5 soorten veel voor in peper: potato virus Y (PVY), pepper mottle virus (PepMoV), tobacco etch virus (TEV) pepper vein mottle virus (PVMV) en chili vein mottle virus (ChiVMV) (Kyle & Palloix, 1997). In peper zorgt een natuurlijke mutatie in het elf4E gen voor resistentie tegen bepaalde soorten van PVY en TEV (Ruffel et al., 2002). In *A. thaliana* geeft een mutatie in elf(iso)4E resistentie tegen TEV (Lellis et al., 2002). Een mutatie in het pvr1 allel zorgt voor functieverlies van elf4E (Kang et al., 2005b).

Het elf4E gen behoort tot een familie van genen die voorkomen in zowel *Arabidopsis* als in tomaat en peper (Duprat et al., 2002; Ruffel et al., 2002). Sequentie analyse wijst op een gelijkheid in sequentie tussen deze soorten van 86,6% en de soorten zijn daarmee ortholoog van elkaar. Hiermee is het mogelijk dat deze genen ook in andere gewassen binnen de Solanaceae familie aanwezig zullen zijn en tot resistentie tegen potyvirussen kunnen leiden (Ruffel et al., 2005).

In de studie van Hwang et al. (2009) is gezocht naar resistentie tegen het potyvirus ChiVMV in peper. In dit onderzoek is naar voren gekomen dat de expressievermindering met VIGS op het pvr1 allel in het CaEIF4E gen (Genbankaccession: AY723733) niet voldoende is om resistentie te verkrijgen tegen ChiVMV. De expressievermindering van enkel CaEIF4E zorgt voor een vermindering van 50%. Naast EIF4E is een allel gevonden (pvr6) dat zorgt voor functieverlies van het EIF(iso)4E gen. De expressievermindering van alleen EIF(iso)4E zorgt voor 80% minder virus eiwitten. De

expressievermindering van beide genen zorgt voor complete resistentie tegen ChiVMV en er waren geen negatieve effecten zichtbaar tijdens de groei en de ontwikkeling van de planten.

In tomaat gaf een mutatie in EIF4E1 (Genbankaccession: AY723733) resistentie tegen enkele PVY en PepMoV virussen (Piron et al., 2010). Via EMS zijn verschillende lijnen ontstaan met mutaties in het eIF4E gen. De planten met een homozygote mutatie in SlEIF4E1 waren resistent tegen PVY-LYE90 en PepMov-Texas, maar waren vatbaar voor andere PVY en TEV virussen. Tijdens deze studie waren geen negatieve effecten zichtbaar bij de mutanten.

In de studie van Mazier et al. (2011), zijn de genen eIF4E1/EIF4E2 en elf(iso)4EE (Genbankaccession: BT014561) in tomaat (cv. WVA106) met RNAi tot expressievermindering gebracht. Wanneer gelijktijdig SlEIF4E1 en SlEIF4E2 tot expressievermindering zijn gebracht, gaf dit resistentie tegen een breed spectrum van de potyvirussen PVY en TEV. In deze groepen was een klein verschil zichtbaar in de groei (75% en 62%) en de vruchtbaarheid vergeleken met de controle planten. RNAi-eIF(iso)4E lijnen gaven geen resistentie en vertoonden een groei van 13% vergeleken met de controle groep.

4 Analyse

Uit de resultaten komen enkele genen naar voren die veelbelovend kunnen zijn om resistentie te verkrijgen tegen verschillende ziektes. Uit vrijwel alle bovenstaande onderzoeken blijkt dat deze genen ortholoog zijn en eerder zijn onderzocht in ofwel *A. thaliana* of in andere gewassen (deelvraag 2). Bij de twee S-genen waarbij dit niet het geval was er in de studies ook geen resistentiebevordering zichtbaar. Hiermee wordt de kans op het verkrijgen van mogelijke resistentie in andere gewassen vergroot.

Daarnaast is duidelijk dat mutaties in het ene gen zorgen voor complete resistentie, wat soms gepaard kan gaan met sterke negatieve bijeffecten, terwijl mutaties in andere genen kunnen zorgen voor vermeerderde resistentie zonder negatieve groeiverschijnselen. Hieronder worden de waarden die zijn toegekend aan de verschillende effecten beschreven en gerechtvaardigd.

De negatieve groei-effecten worden becijferd met een waarde van 0, 1, 2 of 3, waarbij 0 betekent dat er geen negatief effect optrad (tabel 1). Licht-negatieve effecten op de plant resulteerden in een waarde van 1, ernstige negatieve effecten in een waarde van 3. Wanneer het effect van een mutatie beoordeeld is met een 3, wordt het desbetreffende gen niet meegenomen als potentieel interessant S-gen.

Tabel 1: waarden van negatieve effecten op de plant na de uitschakeling of de expressievermindering van het S-gen.

Waarde	Effect op plant
1	Eén of meer van de volgende effecten: ○ Groeivermindering en lichter blad ○ Minder tolerantie voor droogtestress ○ Lichte vorm van autonecrose op oude bladeren ○ Enkele necrotische plekken
2	Eén of meer van de volgende effecten: ○ Groeivermindering ○ Afname zaadproductie, afname kiemkracht ○ Minder nakomelingen ○ Vroegtijdige veroudering van de bladeren ○ Spontane ontwikkeling van chlorose en necrose
3	Eén of meer van de volgende effecten: ○ Minder nakomelingen en een drastische groeivermindering ○ Mannelijke steriliteit ○ Sterke vorm van autonecrose op jonge en oude bladeren.

Er wordt onderscheid gemaakt tussen drie categorieën van resistentiebevordering, bereikt door uitschakeling of expressievermindering: volledig, verhoogd of afwezig (deelvraag 4). Deze informatie wordt gecombineerd met die van de intensiteit van de negatieve effecten (deelvraag 3), in de variabele R; een inschatting van hoe veelbelovend dit gen is voor resistentieveredeling. Wanneer er sprake is van een vrijwel complete resistentie en de plant geen negatief effect ervaart of een waarde van 1 heeft gekregen (zie boven), zal aan dit gen de waarde R++ worden toegekend (tabel 2). Wanneer er alleen een verhoogde resistentie is en/of een waarde van 1 of 2 werd toebedeeld, wordt dit beoordeeld met R+. Een waarde van 3 zorgt automatisch voor R (verlies van +) en wordt verder niet meegenomen

als zijnde interessant S-gen. Dit omdat deze waarde te veel schade aan de plant oplevert. Bij sommige onderzoeken wordt gekeken of de verhoging van een expressie bijdraagt aan een verhoogde vatbaarheid. Dit kan erop wijzen dat de uitschakeling leidt tot een verhoogde resistentie. Deze genen krijgen in de tabel een waarde van SS toegekend en kunnen bij uitschakeling interessant zijn voor vervolgonderzoek.

Tabel 2: Waarde van de mate van resistentie, in combinatie met negatieve effecten (tabel 1).

Waarde	Resistentie	Negatief effect
R++	volledig / bijna compleet	geen, 1
R+	verhoogde resistentie	geen, 1, 2 2
R	verhoogde resistentie	3 3
SS	vatbaarder bij overexpressie van S-gen	nvt
S	Geen effect op resistentie	nvt
SR	alleen resistent tegen een bepaalde soort	nvt

Na het bepalen van de waarden is er een samenvatting van de literatuur gemaakt waarin deze waarde per studie zijn meegenomen. Vervolgens is er per gevonden ziekte een samenvatting gemaakt van welk gen hiertegen het meest effectief is en potentieel interessant kan zijn voor het verkrijgen van ziekteresistentie in Solanaceae gewassen (tabel 3).

Uit de analyse blijkt dat een aantal genen interessant zijn voor verder onderzoek naar recessieve resistentie tegen verschillende pathogenen in Solanaceae gewassen. Deze genen zijn: MLO, DND, DMR6, NtTOM 1-3 en ELF4E1-2 Een uitschakeling of een expressievermindering van deze genen zorgt voor resistentie tegen meerdere pathogenen.

Tabel 3: Meest interessante S-gen voor het verkrijgen van resistentie tegen een bepaald pathogeen.

Pathogeen	Plant	Gen	Genbank accession
Schimmel			
<i>Botrytis cinerae</i>	Tomaat	<i>SISR3I</i>	JN566051
<i>Golovinomyces orontii</i>	Aardappel	<i>StDnd1</i>	BAE99132
<i>Leveillula taurica</i>	Peper	<i>CaMlo2</i>	JW054099
<i>Oidium neolicopersici</i>	Aardappel	<i>StDnd1</i>	BAE99132
	Tomaat	<i>SIPmr4</i>	AEE82336.1
	Tomaat	<i>SIMlo1</i>	NP001234814
<i>Podosphaera xanthii</i>	Petunia	<i>PhMlo1</i> * ¹	KT833172
<i>Phytophthora capsici</i>	Tomaat	<i>SIDmr6</i>	Solys03g080190
<i>Phytophthora infestans</i>	Aardappel	<i>StDnd1</i>	BAE99132
Bacterie			
<i>Pseudomonas syringae</i>	Tomaat	<i>SIDmr6</i>	Solys03g080190
<i>Xanthomonas gardneri</i>	Tomaat	<i>SIDmr6</i>	Solys03g080190
<i>Xanthomonas gardneri</i>	Tomaat	<i>SIDmr6</i>	Solys03g080190
Virussen			
<i>Chilli Veinal Mottle Virus</i>	Peper	CaElf4e/ CaElf(iso)4e	AY723733 BT014561
<i>Pepper Mottle Mosaic Virus</i>	Tabak	NtTom1 NtTom3	AB193039 AB193040
* ² <i>PepMov-Texas</i>	Tomaat	<i>SIElf4E1</i>	AY723733
<i>Potato Virus Y</i>	Tomaat	<i>SIElf4E1 SIElf4E2</i>	AY723733 n.d.
<i>Tobacco Etch Virus</i>	Tomaat	<i>SIElf4E1 SIElf4E2</i>	AY723733 n.d.
<i>Tobacco Mild Green Mosaic Virus</i>	Tabak	NtTom1 NtTom3	AB193039 AB193040
<i>Tobacco Mosaic Virus</i>	Tabak	NtTom1	AB193039
<i>Tomato Mosaic Virus</i>	Tabak	NtTom1 NtTom3	AB193039 AB193040

*

*¹ Waarde 2 bij negatieve effecten

*² Alleen resistent tegen PepMov var. Texas

De uitschakeling of expressievermindering van de S-genen zijn getest op verschillende pathogenen: bacteriën, schimmels en virussen. In tabel 3 worden de resultaten samengevat, zie bijlage 1 voor meer gedetailleerde overzichten (tabel 4 ,5 & 6).

5 Discussie

De doelstelling van dit literatuuronderzoek betrof het onderscheiden van veelbelovende S-genen die na uitschakeling of een expressievermindering voor een verhoogde ziekteresistentie hebben gezorgd in Solanaceae gewassen.

Deze literatuurstudie is bedoeld als oriëntatie voor vervolgonderzoek. Er is bij deze studie een groot aantal verschillende bronnen gebruikt die andere waarden geven aan de geconstateerde effecten, met een verschillende mate van precisie. Zo staat er tijdens de studies niet altijd duidelijk vermeld hoe groot de verhoging van resistentie precies is. Daarom kan het zijn dat sommige genen minder zijn beoordeeld terwijl ze in werkelijkheid meer resistentie opleveren. Uiteindelijk zijn er enkele S-genen aangeraden die voor een duidelijk- verhoogde ziekteresistentie hebben geleid en tegen meerdere pathogenen effectief zijn.

Tijdens deze literatuurstudie heb ik een duidelijker inzicht verkregen, in dat het ook mogelijk is om te bepalen of een S-gen veelbelovend is via overexpressie van S-genen. Wanneer de overexpressie van een gen voor verhoogde vatbaarheid zorgt, suggereert dit sterk dat bij uitschakeling het tegenovergestelde effect optreedt.

Door de gevonden studies te bundelen in een tabel, waarin het betreffende S-gen met bijbehorende pathogeen(en) en negatieve effecten staan vermeld, is er een duidelijk overzicht ontstaan waardoor er bepaalde waarde aan de genen toegekend konden worden. Hierbij is een waarde van 2 nog aanvaardbaar en een waarde van 3 niet meer winstgevend. Echter, kan mannelijke steriliteit in sommige gewassen binnen de veredeling als voordelig worden ervaren omdat dit bijvoorbeeld (kruis)bestuiving kan voorkomen.

De uitschakeling van S-genen met behulp van CRISPR/Cas heeft in een van de gevonden studies niet geleid tot *complete* resistentie tegen het betreffende pathogeen, terwijl natuurlijke mutaties in S-genen wel tot volledige resistentie hebben geleid tegen soorten die meeldauw veroorzaken. Dit suggereert dat deze soort meerdere S-genen gebruikt om infectie te bewerkstelligen. Echter, Sluit dit niet uit dat de CRISPR/Cas technologie veelbelovend kan zijn tijdens het ontwikkelen van resistentie in voedselgewassen.

6 Conclusie & Aanbevelingen

Dit afstudeerwerkstuk is geschreven in de vorm van een adviesrapport over veelbelovende S-genen voor verder onderzoek naar het verkrijgen van recessieve resistentie in Solanaceae gewassen. Deze S-genen geven, na uitschakeling of expressievermindering, een verhoogde resistentie tegen verschillende pathogenen en zijn daarmee interessant voor de teelt van belangrijke voedselgewassen zoals tomaat (*Solanum lycopersicum*) en aardappel (*Solanum tuberosum*). In dit onderzoek zijn bekende S-genen uit de Solanaceae familie gebundeld en hebben deze genen een waarde gekregen op basis van de mate van toename van ziekteresistentie en op basis van de negatieve effecten na de uitschakeling of de expressievermindering van dit gen. Vervolgens is onderzocht of de genen ortholoog zijn (genen met een gemeenschappelijke voorouder) en mogelijk hetzelfde effect hebben in andere gewassen binnen de Solanaceae familie. Hierna is per pathogeen onderzocht welk gen de hoogste resistentie oplevert en de minst negatieve effecten met zich meebrengt. Deze genen zijn beschreven als de meest veelbelovende S-genen voor de resistentieveredeling van Solanaceae gewassen. Dit zijn de volgende genen: MLO, DND, DMR6, NtTOM 1-3 en ELF4E1-2. Veel van deze genen zijn tot expressievermindering gebracht met RNAi. Door middel van de vrij nieuwe CRISPR/Cas methode zou dit gen volledig uitgeschakeld kunnen worden en mogelijk tot een hogere resistentie kunnen leiden. In het onderzoek van De Toledo homazella et al. (2016), waarin de CRISPR/Cas methode is toegepast, was echter geen volledige resistentie tegen *Phytophthora capsici* zichtbaar. Een mogelijke oorzaak hiervan kan zijn dat het pathogeen meerdere manieren heeft om infectie te bewerkstelligen. Verder onderzoek is noodzakelijk om te bepalen welke S-genen of combinaties van S-genen voor volledige resistentie zorgen tegen specifieke pathogenen. Een vermindering van de pathogenen zal het gebruik van pesticiden echter reeds kunnen doen afnemen.

Aanbevelingen

Voor vervolgstudies naar veelbelovende S-genen, wordt aangeraden om te zoeken naar studies waarbij expressievermeerdering van een S-gen voor een vermeerderde vatbaarheid heeft gezorgd. In vervolgonderzoek naar het verkrijgen van ziekteresistentie met S-genen dient erop te worden gelet dat het verkrijgen van ziekteresistentie in andere gewassen met een S-genen een beter of slechter resultaat kan opleveren dan het hier beschreven resultaat, of dat een combinatie van bepaalde genen een verhoogde resistentie kan opleveren. Het is mogelijk dat binnen dit gen een ander exon of meerdere exonen nodig zijn voor het bereiken van het gewenste resultaat. Voor het verkrijgen van ziekteresistentie via S-genen is vervolg onderzoek nodig om vast te stellen welke genen kunnen bijdragen aan een zodanig verhoogde resistentie dat het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen aanzienlijk verminderd kan worden of niet meer nodig is. Het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen tegen meeldauw is verantwoordelijk voor grote hoeveelheden fungiciden die gebruikt worden. Om deze reden is het gebruik van S-genen mogelijk interessant en van belang om de kosten voor de teler te besparen en milieuvervuiling tegen te gaan.

Literatuurlijst

- Appiano, M., Pavan, S., Catalano, D., Zheng, Z., Bracuto, V., Lotti, C., ... & Bai, Y. (2015). Identification of candidate MLO powdery mildew susceptibility genes in cultivated Solanaceae and functional characterization of tobacco NtMLO1. *Transgenic research*, 24(5), 847-858.
- Asano, M., Satoh, R., Mochizuki, A., Tsuda, S., Yamanaka, T., Nishiguchi, M., ... & Ishikawa, M. (2005). Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS letters*, 579(20), 4479-4484.
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N. F., Reinstädler, A., Lotti, C., ... & Theres, K. (2008). Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(1), 30-39.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., ... & Chermak, D. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527-532.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I. C., Lippok, B., Smith, R. K., & Bent, A. F. (2000). The Arabidopsis dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9323-9328.
- Van Damme, M., Andel, A., Huibers, R. P., Panstruga, R., Weisbeek, P. J., & Van den Ackerveken, G. (2005). Identification of Arabidopsis loci required for susceptibility to the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(6), 583-592.
- Van Damme M, Zeilmaker T, Elberse J, Andel A, de Sain-van der Velden M, et al., (2009) Downy mildew resistance in Arabidopsis by mutation of HOMOSERINE KINASE. *Plant Cell* 21: 2179–2189.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., & Friedrich, L. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266(5188), 1247.
- Du, L., Ali, G. S., Simons, K. A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A. S. N., & Poovaiah, B. W. (2009). Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, 457(7233), 1154.
- Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C (2002) The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 32:927–934
- Eschen-Lippold, L., Lübken, T., Smolka, U., & Rosahl, S. (2012). Characterization of potato plants with reduced StSYR1 expression. *Plant signaling & behavior*, 7(5), 559-562.
- Gawehns, F., Cornelissen, B. J., & Takken, F. L. (2013). The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microbial biotechnology*, 6(3), 223-229.
- Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2005). A model system for comparative research: Petunia. *Trends in plant science*, 10(5), 251-256.
- Göllner, K., Schweizer, P., Bai, Y., & Panstruga, R. (2008). Natural genetic resources of Arabidopsis thaliana reveal a high prevalence and unexpected phenotypic plasticity of RPW8-mediated powdery mildew resistance. *New Phytologist*, 177(3), 725-742.

- Hagiwara-Komoda, Y., Hirai, K., Mochizuki, A., Nishiguchi, M., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2008). Overexpression of a host factor TOM1 inhibits tomato mosaic virus propagation and suppression of RNA silencing. *Virology*, 376(1), 132-139.
- Hernández-Blanco, C., Feng, D. X., Hu, J., Sánchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., ... & Anderson, L. K. (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant Cell*, 19(3), 890-903.
- Hewitt, H. G. (1998). *Fungicides in crop protection*. Cab International.
- Hückelhoven, R. (2014). The effective papilla hypothesis. *New Phytologist*, 204(3), 438-440.
- Huibers, R. P., Loonen, A. E., Gao, D., Van den Ackerveken, G., Visser, R. G., & Bai, Y. (2013). Powdery mildew resistance in tomato by impairment of SIPMR4 and SIDMR1. *PLoS One*, 8(6), e67467.
- Humphry, M., Reinstaedler, A., Ivanov, S., Bisseling, T. O. N., & Panstruga, R. (2011). Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *er1* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. *Molecular plant pathology*, 12(9), 866-878.
- Hwang, J., Li, J., Liu, W. Y., An, S. J., Cho, H., Her, N. H., ... & Kang, B. C. (2009). Double mutations in *elF4E* and *elFiso4E* confer recessive resistance to Chilli veinal mottle virus in pepper. *Molecules and cells*, 27(3), 329.
- Jiang, P., Chen, Y., & Wilde, H. D. (2016a). Identification and mutagenesis of disease susceptibility genes of *Petunia hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 117-125.
- Jiang, P., Chen, Y., & Wilde, H. D. (2016b). Reduction of MLO1 expression in petunia increases resistance to powdery mildew. *Scientia Horticulturae*, 201, 225-229.
- Jørgensen, J. H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. In *Breeding for disease resistance* (pp. 141-152). Springer Netherlands.
- Kang, B.C., Yeam, I., and Jahn, M.M. (2005a). Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* QP, 581-621.
- Kang, B.C., Yeam, I., Frantz, J.D., Murphy, J.F., and Jahn, M.M. (2005b). The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor *elF4E* that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J.* QO, 392-405.
- Kumar, S., Dubey, A. K., Karmakar, R., Kini, K. R., Mathew, M. K., & Prakash, H. S. (2012). Inhibition of TMV multiplication by siRNA constructs against TOM1 and TOM3 genes of *Capsicum annuum*. *Journal of virological methods*, 186(1), 78-85.
- Kyle, M. M., & Palloix, A. (1997). Proposed revision of nomenclature for potyvirusresistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*, 97(2), 183-188.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., & Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for *elF (iso) 4E* during potyvirus infection. *Current Biology*, 12(12), 1046-1051.

- Li, X., Huang, L., Zhang, Y., Ouyang, Z., Hong, Y., Zhang, H., ... & Song, F. (2014). Tomato SR/CAMTA transcription factors SISR1 and SISR3L negatively regulate disease resistance response and SISR1L positively modulates drought stress tolerance. *BMC plant biology*, 14(1), 286.
- Lyngkjær, M., Newton, A., Atzema, J., & Baker, S. (2000). The barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source. *Agronomie*, 20(7), 745-756.
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolaï, M., Sarnette, V., & Caranta, C. (2011). Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS One*, 6(12), e29595.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(01), 31-43.
- Panstruga, R. (2005). Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi.
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G., & Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding*, 25(1), 1.
- Piron, F., Nicolaï, M., Minoïa, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., ... & Bendahmane, A. (2010). An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS one*, 5(6), e11313.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., & Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *The Plant Journal*, 32(6), 1067-1075.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L., & Caranta, C. (2005). The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(4), 346-353.
- van Schie, C. C., & Takken, F. L. (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, 52, 551-581.
- van Schie, C. C., & Takken, F. L. (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, 52, 551-581.
- Schwarzbach, E., 1976. The pleiotropic effects of the ml-o gene and their implications in breeding. In: Gaul, H. (Ed.), *Barley Genetics III*. Karl Thieme Verlag, Munich, pp. 440–445.
- Sikora, E.J., Gudauskas, R.T., Murphy, J.F., Porch, D.W., Andrianfahanana, M., Zehnder, G.W., Bauske, E.M., Kenble, J.M., Lester, D.F., (1998). A multivirus epidemic of tomatoes in Alabama. *Plant Disease* 82, 117–120.
- Song, J. T., Koo, Y. J., Seo, H. S., Kim, M. C., Do Choi, Y., & Kim, J. H. (2008). Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*, 69(5), 1128-1134.
- Sun, K., Wolters, A. M. A., Vossen, J. H., Rouwet, M. E., Loonen, A. E., Jacobsen, E., ... & Bai, Y. (2016a). Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic research*, 25(5), 731-742.
- Sun, K., Wolters, A. M. A., Loonen, A. E., Huibers, R. P., van der Vlugt, R., Goverse, A., ... & Bai, Y.

(2016b). Down-regulation of ArabidopsisDND1 orthologs in potato and tomato leads to broad-spectrum resistance to late blight and powdery mildew. *Transgenic research*, 25, 123.

de Toledo Thomazella, D. P., Brail, Q., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2016). CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *bioRxiv*, 064824

Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M., & Naito, S. (1998). Isolation of an Arabidopsis thaliana mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *The Plant Journal*, 13(2), 211-219.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., & Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, 17(20), 1784-1790.

Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., ... & Ishikawa, M. (2002). Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *Journal of virology*, 76(5), 2491-2497.

Zeilmaker, T., Ludwig, N. R., Elberse, J., Seidl, M. F., Berke, L., Van Doorn, A., ... & Van den Ackerveken, G. (2015). DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 81(2), 210-222.

Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., ... & Joung, J. K. (2010). High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 12028-12033.

Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S., Matsuda, Y., Toyoda, H., ... & Bai, Y. (2013). Loss of function in Mlo orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by Leveillula taurica. *PloS one*, 8(7), e70723.

Websites:

SiA (2015) Nationaal regieorgaan praktijkgericht onderzoek. Geraadpleegd op: <http://www.sia-projecten.nl/projectenbank/project/petunia-and-crisprcas-technology> [mei-2017]

Figuur1:

The Plant immune system (PDF Download Available). Geraadpleegd op: https://www.researchgate.net/publication/6688798_The_Plant_immune_system [april-2017]

BIJLAGE I Tabel 4, 5, 6

Tabel 4: Genen gevonden in Solanaceae getest op schimmels en Oomyceten

<i>Gen</i>	Pathogeen → Plant	<i>B. cin</i>	<i>G. oro</i>	<i>L. tau</i>	<i>O. neo</i>	<i>P. xan</i>	<i>P. cap</i>	<i>P. inf</i>	Verkregen via	Negatieve effecten	Bron
MLO											
<i>SIMlo</i>	Tomaat			S	R++				Natuurlijke lijnen	-	Bai et al. 2008 Zheng et al. 2013
<i>CaMlo1</i>	Peper			R+					VIGS	-	Zheng et al. 2013
<i>CaMlo2</i>	Peper			R+					VIGS	-	Zheng et al. 2013
<i>CaMLO2</i>	Tomaat			SS					U35 promotor		Zheng et al. 2013
<i>PhMlo1</i>	Petunia					R+			RNAi	2	Jiang et al. 2016b
PMR											
<i>SIPmr4</i>	Tomaat				R+				RNAi	-	Huibers et al. 2013
<i>StPmr4</i>	Aardappel							R+	RNAi	-	Sun et al. 2016
DMR											
<i>SIDmr1</i>	Tomaat				R				RNAi	3	Huibers et al. 2013
<i>StDmr1</i>	Aardappel							R+	RNAi	1	Sun et al. 2016
<i>StDmr6</i>	Aardappel							R+	RNAi	-	Sun et al. 2016
<i>SIDmr6</i>	Tomaat						R+ *		CRISPR/Cas	-	De Toleda homazella et al. 2016
SR/camta											
<i>SISr1</i>	Tomaat	R+							VIGS	1	Li et al. 2014
<i>StSr1</i>	Aardappel							R+	RNAi	-	Sun et al. 2016
<i>SISr3l</i>	Tomaat	R+							VIGS	-	Li et al. 2014
CESA											
<i>StCesa3</i>	Aardappel							R+	RNAi	-	Sun et al. 2016
DND											
<i>StDnd1</i>	Aardappel		R+		R+			R++	RNAi	1	Sun et al. 2016
<i>SIDnd1</i>	Tomaat				R			R	RNAi	3	Sun et al. 2016
SYR											
<i>StSyr1</i>	Aardappel	S						R	RNAi	2	Eschen-Lippold et al. 2012
SNAP											
<i>StSnap33</i>	Aardappel	S						S	RNAi	2	Eschen-Lippold et al. 2012

* CRISPR/Cas levert geen totale resistentie: zie discussie over dit onderwerp.

Tabel 5: Genen gevonden in Solanaceae voor resistentie tegen bacteriën

<i>Gen</i>	Pathogeen → Plant	<i>P. syr</i>	<i>X. gar</i>	<i>X. per</i>	Verkregen via	Negatieve effecten	Bron
<i>DMR</i>							
<i>SlDmr6</i>	Tomaat	R+	R+	R+	CRISPR/Cas	-	De Toleda Thomazella et al. 2016
<i>SR/camta</i>							
<i>SlSr1</i>	Tomaat	R+			VIGS	1	Li et al. 2014
<i>SlSr3l</i>	Tomaat	R+			VIGS	-	Li et al. 2014

Tabel 6: Genen gevonden in Solanaceae voor resistentie tegen virussen

Gen	Pathogeen → Plant	ChiVMV	CMV	PMMoV	PVY	TEV	TMGMV	TMV	ToMV	Verkregen via	Negatieve effecten	Bron
DND												
<i>StDnd1</i>	Aardappel				S					RNAi	1	Sun et al. 2016
<i>SlDnd1</i>	Tomaat				S					RNAi	3	Sun et al. 2016
TOM												
<i>NtTom1</i>	Tabak								R	RNAi	-	Asano et al. 2005
<i>NtTom3</i>	Tabak								S	RNAi	-	Asano et al. 2005
<i>NtTom1</i> <i>NtTom3</i>	Tabak		S	R++			R++		R++	RNAi	-	Asano et al. 2005
<i>NtTom1</i>	Tabak							R++		RNAi	-	Kumar et al. 2012
<i>NtTom3</i>	Tabak							R+		RNAi	1	Kumar et al. 2012
ELF(iso) 4E												
<i>CaElf4e</i>	Peper	R+								VIGS	-	Hwang et al. 2009
<i>CaElf</i> <i>(iso)4e</i>	Peper	R+								VIGS	-	Hwang et al. 2009
<i>CaElf4e/</i> <i>CaElf(iso)4e</i>	Peper	R++								VIGS	-	Hwang et al. 2009
<i>SlElf4E1</i>	Tomaat			SR+ *1	SR+ *1	S				EMS lijnen		Piron et al. 2010
<i>SlElf4E1</i> <i>SlElf4E2</i>	Tomaat				R++	R++				RNAi	1	Mazier et al. 2011
<i>Sl-Elf</i> <i>(iso)4e</i>	Tomaat				S	S				RNAi	nd	Mazier et al. 2011

*1 Alleen resistent tegen

BIJLAGE II Overzicht van ziektes bestudeerd tijdens dit onderzoek

Schimmels

Botrytis cinerae = *B.cin*

Golovinomyces orontii = *G.oro*

Leveillula taurica = *L.tau*

Oidium neolicopersici = *O.neo*

Podosphaera xanthii = *P.xan*

Phytophthora capsici = *P.cap*

Phytophthora infestans = *P.inf*

Bacteriën

Pseudomonas syringae = *P.syr*

Xanthomonas gardneri = *X.gar*

Xanthomonas gardneri = *X.per*

Virussen

Cucumber Mosaic virus = *CMV*

Chilli Veinal Mottle Virus = *ChiVMV*

Pepper Mottle Mosaic Virus = *PMMoV*

Potato Virus Y = *PVY*

Tobacco Etch Virus = *TEV*

Tobacco Mosaic Virus = *TMV*

Tobacco Mild Green Mosaic Virus = *TMGMV*

Tomato Mosaic Virus = *ToMV*

Checklist Schriftelijk Rapporteren

Naam:

Klas:

Datum:

Titel verslag/rapport:

Nadat **jij** je verslag/rapport hebt gecontroleerd met behulp van deze checklist, voeg je deze toe als bijlage. Zonder de ingevulde checklist vindt er geen beoordeling plaats. De assessor controleert met deze checklist je rapport/verslag. De beoordelingscriteria die met een * zijn aangegeven, zijn de zogenaamde '*killing points*'. Indien de assessor meer dan vijf '*killing points*' heeft aangekruist, dien je het rapport/verslag op alle onvoldoende onderdelen te verbeteren. Voor de herbeoordeling moet je ook de oude versie inleveren. In het afstudeerwerkstuk zijn geen '*killing points*' toegestaan! **AANVINKEN WAT NIET IN ORDE IS!**

1. Het taalgebruik:

- ☐ Bevat niet meer dan drie grammaticale, spel- en typefouten per duizend woorden*
Bij meer dan drie fouten per duizend woorden is het rapport/verslag afgekeurd!
- ☐ Heeft een adequate interpunctie*
- ☐ Is afgestemd op de gekozen doelgroep (juiste stijl)*
- ☐ Laat een zakelijke en actieve schrijfstijl zien*
- ☐ Bevat geen persoonlijke voornaamwoorden*

2. Het rapport/verslag:

- ☐ Is ingebonden (hard copy)*
- ☐ Is vrij van plagiaat* (zie onderwijsexamenregeling)

3. De omslag:

- ☐ Bevat de titel
- ☐ Vermeldt de auteur(s)

4. De titelpagina/het titelblad:

- ☐ Heeft een specifieke titel*
- ☐ Vermeldt de auteur(s)*
- ☐ Vermeldt de plaats en de datum*
- ☐ Vermeldt de opdrachtgever(s)*

5. Het voorwoord:

- ☐ Bevat de persoonlijke aanleiding tot het schrijven van het rapport/verslag
- ☐ Bevat persoonlijke bedankjes (persoonlijke voornaamwoorden toegestaan)

6. De inhoudsopgave:

- ☐ Vermeldt alle genummerde onderdelen van het rapport/verslag*
- ☐ Vermeldt de samenvatting en de bijlage(n)
- ☐ Is overzichtelijk
- ☐ Heeft een correcte paginaverwijzing

7. De samenvatting:

- ☐ Is een verkorte versie van het gehele rapport/verslag
- ☐ Bevat conclusies
- ☐ Bevat geen persoonlijke mening
- ☐ Is gestructureerd
- ☐ Is zakelijk geschreven
- ☐ Staat direct na de inhoudsopgave

8. De inleiding (toelichting op intranet):

- ☐ Is hoofdstuk 1*
- ☐ Beschrijft het grotere kader en aanleiding
- ☐ Beschrijft inhoudelijke achtergrondinformatie*
- ☐ Formuleert het probleem/de onderzoeksvraag*
- ☐ Vermeldt het doel*
- ☐ Bevat een leeswijzer voor het rapport/verslag*

9. Materiaal en methode:

- ☐ Beschrijft de gevolgde onderzoeksmethode
- ☐ Past bij de onderzoeksvraag/vragen*
- ☐ Beschrijft de variabelen/eenheden
- ☐ Beschrijft de methode van data-analyse

10. De (opmaak van de) kern:

- ☐ Bestaat uit genummerde hoofdstukken en (sub)paragrafen (maximaal drie niveaus)*
- ☐ Deze zijn verschillend in opmaak*
- ☐ De hoofdstukken en (sub)paragrafen hebben een passende titel
- ☐ Een hoofdstuk beslaat ten minste één pagina
- ☐ Een nieuw hoofdstuk begint op een nieuwe pagina
- ☐ De zinnen lopen door (geen 'enter' binnen een alinea gebruiken)
- ☐ De figuren zijn (door)genummerd en hebben een passende titel (onder de figuur)*
- ☐ De tabellen zijn (door) genummerd en hebben een passende titel (boven de tabel)*
- ☐ Tabellen en figuren zijn zelfstandig te begrijpen
- ☐ In de tekst zijn er verwijzingen naar figuren en/of tabellen*
- ☐ De tekst bevat verwijzing naar de desbetreffende bijlage(n)
- ☐ De tekst is ook zonder verwijzingen te begrijpen
- ☐ De pagina's zijn genummerd*

11. De discussie:

- ☐ Bevat een vergelijking met relevante literatuur
- ☐ Geeft de valide argumentatie weer
- ☐ Evalueert de gebruikte onderzoeksmethode
- ☐ Bevat een kritische reflectie op de eigen bevindingen (zie toelichting op intranet)

12. De conclusies en aanbevelingen:

- ☐ De conclusies zijn gebaseerd op relevante feiten
- ☐ De aanbevelingen zijn gebaseerd op relevante feiten
- ☐ Bevatten geen nieuwe informatie*

13. De bronvermelding:

- ☐ In de tekst is conform de geldende APA-normen* (zie toelichting op intranet)

14. De literatuurlijst:

- ☐ Is opgesteld conform de geldende APA-normen* (zie toelichting op intranet)

15. De bijlagen:

- ☐ Zijn genummerd
- ☐ Zijn voorzien van een passende titel
- ☐ Bevatten geen eigen analyse

Checklist Schriftelijk Rapporteren

Naam:

Klas:

Datum:

Titel verslag/rapport:

Nadat **jij** je verslag/rapport hebt gecontroleerd met behulp van deze checklist, voeg je deze toe als bijlage. Zonder de ingevulde checklist vindt er geen beoordeling plaats. De assessor controleert met deze checklist je rapport/verslag. De beoordelingscriteria die met een * zijn aangegeven, zijn de zogenaamde '*killing points*'. Indien de assessor meer dan vijf '*killing points*' heeft aangekruist, dien je het rapport/verslag op alle onvoldoende onderdelen te verbeteren. Voor de herbeoordeling moet je ook de oude versie inleveren. In het afstudeerwerkstuk zijn geen '*killing points*' toegestaan! **AANVINKEN WAT NIET IN ORDE IS!**

1. Het taalgebruik:

- ☐ Bevat niet meer dan drie grammaticale, spel- en typefouten per duizend woorden*
Bij meer dan drie fouten per duizend woorden is het rapport/verslag afgekeurd!
- ☐ Heeft een adequate interpunctie*
- ☐ Is afgestemd op de gekozen doelgroep (juiste stijl)*
- ☐ Laat een zakelijke en actieve schrijfstijl zien*
- ☐ Bevat geen persoonlijke voornaamwoorden*

2. Het rapport/verslag:

- ☐ Is ingebonden (hard copy)*
- ☐ Is vrij van plagiaat* (zie onderwijsexamenregeling)

3. De omslag:

- ☐ Bevat de titel
- ☐ Vermeldt de auteur(s)

4. De titelpagina/het titelblad:

- ☐ Heeft een specifieke titel*
- ☐ Vermeldt de auteur(s)*
- ☐ Vermeldt de plaats en de datum*
- ☐ Vermeldt de opdrachtgever(s)*

5. Het voorwoord:

- ☐ Bevat de persoonlijke aanleiding tot het schrijven van het rapport/verslag
- ☐ Bevat persoonlijke bedankjes (persoonlijke voornaamwoorden toegestaan)

6. De inhoudsopgave:

- ☐ Vermeldt alle genummerde onderdelen van het rapport/verslag*
- ☐ Vermeldt de samenvatting en de bijlage(n)
- ☐ Is overzichtelijk
- ☐ Heeft een correcte paginaverwijzing

7. De samenvatting:

- ☐ Is een verkorte versie van het gehele rapport/verslag
- ☐ Bevat conclusies
- ☐ Bevat geen persoonlijke mening
- ☐ Is gestructureerd
- ☐ Is zakelijk geschreven
- ☐ Staat direct na de inhoudsopgave

8. De inleiding (toelichting op intranet):

- ☐ Is hoofdstuk 1*
- ☐ Beschrijft het grotere kader en aanleiding
- ☐ Beschrijft inhoudelijke achtergrondinformatie*
- ☐ Formuleert het probleem/de onderzoeksvraag*
- ☐ Vermeldt het doel*
- ☐ Bevat een leeswijzer voor het rapport/verslag*

9. Materiaal en methode:

- ☐ Beschrijft de gevolgde onderzoeksmethode
- ☐ Past bij de onderzoeksvraag/vragen*
- ☐ Beschrijft de variabelen/eenheden
- ☐ Beschrijft de methode van data-analyse

10. De (opmaak van de) kern:

- ☐ Bestaat uit genummerde hoofdstukken en (sub)paragrafen (maximaal drie niveaus)*
- ☐ Deze zijn verschillend in opmaak*
- ☐ De hoofdstukken en (sub)paragrafen hebben een passende titel
- ☐ Een hoofdstuk beslaat ten minste één pagina
- ☐ Een nieuw hoofdstuk begint op een nieuwe pagina
- ☐ De zinnen lopen door (geen 'enter' binnen een alinea gebruiken)
- ☐ De figuren zijn (door)genummerd en hebben een passende titel (onder de figuur)*
- ☐ De tabellen zijn (door) genummerd en hebben een passende titel (boven de tabel)*
- ☐ Tabellen en figuren zijn zelfstandig te begrijpen
- ☐ In de tekst zijn er verwijzingen naar figuren en/of tabellen*
- ☐ De tekst bevat verwijzing naar de desbetreffende bijlage(n)
- ☐ De tekst is ook zonder verwijzingen te begrijpen
- ☐ De pagina's zijn genummerd*

11. De discussie:

- ☐ Bevat een vergelijking met relevante literatuur
- ☐ Geeft de valide argumentatie weer
- ☐ Evalueert de gebruikte onderzoeksmethode
- ☐ Bevat een kritische reflectie op de eigen bevindingen (zie toelichting op intranet)

12. De conclusies en aanbevelingen:

- ☐ De conclusies zijn gebaseerd op relevante feiten
- ☐ De aanbevelingen zijn gebaseerd op relevante feiten
- ☐ Bevatten geen nieuwe informatie*

13. De bronvermelding:

- ☐ In de tekst is conform de geldende APA-normen* (zie toelichting op intranet)

14. De literatuurlijst:

- ☐ Is opgesteld conform de geldende APA-normen* (zie toelichting op intranet)

15. De bijlagen:

- ☐ Zijn genummerd
- ☐ Zijn voorzien van een passende titel
- ☐ Bevatten geen eigen analyse

