

# Literatuurstudie naar de moleculaire kennis rond de balans tussen vegetatieve-generatieve groei van aardbeiplanten

Shanna Bastiaan-Net  
Wouter G. van Doorn  
Bert Evenhuis  
Jurriaan J. Mes

Rapport nr. 1303

# Colofon

Titel	Literatuurstudie naar de moleculaire kennis rond de balans tussen vegetatieve-generatieve groei van aardbeiplanten
Auteur(s)	Shanna Bastiaan-Net, Wouter G. van Doorn, Bert Evenhuis, Jurriaan J. Mes
Nummer	1303
ISBN-nummer	978-94-6173-255-2
Publicatiedatum	30 januari 2012
Vertrouwelijk	Nee
OPD-code	--
Goedgekeurd door	Janneke de Kramer

Wageningen UR Food & Biobased Research  
P.O. Box 17  
NL-6700 AA Wageningen  
Tel: +31 (0)317 480 084  
E-mail: [info.fbr@wur.nl](mailto:info.fbr@wur.nl)  
Internet: [www.wur.nl](http://www.wur.nl)

Wageningen UR Praktijkonderzoek Plant & Omgeving  
P.O. Box 430  
NL-8200 AK Lelystad

Dit project is gefinancierd door Productschap Tuinbouw.

© Wageningen UR Food & Biobased Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, hetzij mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten of onvolkomenheden.

*All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system of any nature, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher. The publisher does not accept any liability for inaccuracies in this report.*

## **Abstract**

De situatie waarbij de aanleg van blad en bloem in goed evenwicht is, zodat de gewenste fysiologische en productieve stadia van de plant bereikt worden, is van groot belang voor de aardbeien sector. In opdracht van het Productschap Tuinbouw en onder begeleiding en advies van Plantum is een literatuurstudie uitgevoerd naar de moleculaire kennis op dit gebied bij planten in het algemeen en de vertaling ervan naar meerjarige aardbei planten. Recent onderzoek op dit gebied heeft geleid tot de identificatie van een aantal sleutelgenen die de regulatie van bloemaanleg en ontwikkeling bepalen. De familie van regulatie-genen zoals CO (Constans), FT (Flowering locus T), TFL (Terminal Flower) en MFT (Mother of FT), SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1), AP1 (Apetala 1), LFY (Leafy) zijn daarin zeer cruciaal. Intrigerend is vooral het florigen FT eiwit die vanuit het blad naar het topmeristeem kan migreren en daar de celdeling en differentiatie naar type organen (vegetatieve en generatieve) kan reguleren. Op deze punten komen verschillende externe signalen zoals licht, daglengte, temperatuur, stress en beschikbare nutriënten samen in hun regulatie van de bloem-blad verhouding.

De literatuurstudie geeft een goede basis voor vervolgtrajecten naar de toepassingen van deze kennis richting veredeling (zoals vroegtijdig bepalen van de vruchtperiode), de bepaling van de kwaliteit van het uitgangsmateriaal (oogsttijdstip bepaling, productie potentie) en de sturing van de vruchtproductie (merkers voor bijsturen tijdens teelt).

# Inhoudsopgave

<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>5</b>
<b>2 Basiskennis aardbei</b>	<b>8</b>
2.1 Achtergrond van de plant	8
2.2 Rankvorming (Runner formatie)	8
2.3 Typen bloeiers	11
2.4 Effecten van milieufactoren op de bloei-initiatie van aardbei	12
<b>3 Moleculaire basis van bloei regulatie in Arabidopsis</b>	<b>14</b>
3.1 Algemeen	14
3.2 Invloed fotoperiode, en dag (circadian) ritme	18
3.3 Invloed licht kwaliteit op de bloei inductie bij Arabidopsis [dit is erg dubbel en kan weg, of naar boven]	20
3.4 Ontwikkeling van bloem en vrucht	20
<b>4 Relevante moleculaire kennis aardbei</b>	<b>23</b>
<b>5 Conclusies voor de praktijk</b>	<b>29</b>
<b>6 Methoden voor praktisch vervolg onderzoek</b>	<b>32</b>
<b>7 Conclusies</b>	<b>35</b>
<b>Literatuur</b>	<b>37</b>
<b>Bijlage 1</b>	<b>41</b>
<b>Bijlage 2</b>	<b>44</b>
<b>Bijlage 3: BLAST data</b>	<b>49</b>
<b>Bijlage 4: Powerpoint presentatie zoals gehouden op Plantum vergadering van de Gewasgroep Aardbei op 1 november 2012.</b>	<b>56</b>

# 1 Inleiding

De sector die zich bezig houdt met de vermeerdering van aardbeienplanten, het uitgangsmateriaal voor de aardbeiproductie, zoekt continu naar de beste methoden om de teelt van de aardbeienplanten zo goed mogelijk te sturen en kwalitatief hoogwaardige planten te leveren. Ondanks alle praktijkkennis zijn er nog een aantal factoren die verdere optimalisatie behoeven. De sector heeft aangegeven op een aantal punten hun producten verder te kunnen en willen verbeteren en kwaliteit te garanderen indien zij meer inzicht zou hebben in de factoren die leiden tot de variatie in de productie.

De plant tot plant variatie die leidt tot variatie in uitgroei, blad-bloem balans en productie is deels gebaseerd op knopaanleg. Deze zorgt voor het aantal reproductieve stelen en het aantal bloemen per tros. Bij junidragers vindt deze aanleg plaats in de periode na de langste dag en wel vanaf ongeveer begin September. Onder invloed van daglengte, temperatuur, stress en bemestingstoestand van de plant zal de omslag van vegetatieve naar generatieve groei vroeger of later dan normaal plaatsvinden. De planten komen niet allemaal op hetzelfde moment in de generatieve toestand. Onder invloed van externe factoren zoals klimaatcondities en bemesting verloopt het proces van tros- en bloemaanleg sneller of langzamer. Onbekend is vaak wanneer de knopaanleg volledig is, zich dus niet verder ontwikkelt en de planten dan eigenlijk klaar zijn voor het oogsten, zodat deze als wachtbedplaten, trayplanten of A+planten voor de productieteelt doorverkocht kunnen worden. Door berekening van de temperatuursom (groeigradurenvanaf het moment van omslag naar de generatieve fase is wel enig inzicht te verkrijgen over bloem- en tros ontwikkeling en het moment waarop de plant oogstrijp is. DLV heeft hiervoor het SQMS (strawberry quality monitoring systeem) ontwikkeld waarin de teler de benodigde gegevens registreert en het programma het rendement berekend. Met meer detailkennis van de fysiologische en moleculaire verandering in de plant zal het zeer waarschijnlijk mogelijk zijn het proces van bloemaanleg te beïnvloeden en bij te sturen, bijvoorbeeld door middel van teeltmethoden, behandelingen tijdens de teelt, oogsttijdstip, en naoogst behandelingen.

In de praktijk is het belangrijk om de productie met zo homogeen mogelijk uitgangsmateriaal te starten. Bij sommige teeltwijzen is een beperkt aantal trossen, met weinig spreiding in bloei gewenst. In andere teeltwijzen is juist een groot aantal trossen met een grote spreiding in bloei gewenst. Het uiteindelijke planttype wordt al in de opkweek van het uitgangsmateriaal bepaald. De strategieën die het gewenst planttype oplevert vragen meer kennis van het fysiologisch mechanisme van de bloemaanleg, waardoor actiever gestuurd kan worden. Naast vervroeging of verlaten die nu door plantmoment wordt geregeld zou er met meer kennis van het bloeimechanisme ook tussentijdse bijsturing mogelijk kunnen zijn. Daarnaast kunnen verbeterde inzichten gebruikt worden om de algehele plantkwaliteit van geleverd uitgangsmateriaal te verbeteren, zodat productiebedrijven niet voor verrassingen komen te staan. Voor de praktijk geldt dus: hoe preciezer het moment van omslag, tros- en bloemaanleg is vast te stellen hoe eerder je kunt starten met het ingrijpen en sturen naar de gewenste kwaliteit, bijvoorbeeld door het opvoeren van de bemesting om de trossaanleg te bevorderen. Bovendien kan deze kennis een verbetering opleveren voor de groeigraduur of SQMS modellen omdat dan ook vroegtijdige fysiologische veranderingen in de plant meegenomen kunnen worden die mogelijk een directere en geïntegreerd effect geven van de actuele plant status.

Een van de concrete onderzoeksvragen is daarom: zou je met een toets (moleculair, biochemisch of immunologisch) de start van de knopaanleg eerder en beter kunnen waarnemen dan met een microscoop. Met name zou de toets moeten aangeven wanneer de knopaanleg begint, en wanneer deze klaar is. De toets zou de aanleg tijdens de teelt moeten kunnen volgen. Bovendien levert dit mogelijk informatie op over aantal te verwachten trossen en de spreiding van de bloemaanleg.

De aardbei-productie kent een aantal variaties in planttype (junidragers en doordragers) en vermeerderingsmethoden. De productie van aardbei verloopt altijd in een aantal fasen. Het begint meestal met ziektevrij, raszuiver uitgangsmateriaal van de NAK tuinbouw, tenzij er gewerkt wordt kruisingsmateriaal. Bij een ras als Elsanta worden na een aantal vermeerderingsronden de planten vervolgens geplant op het veld. De (moeder) planten maken ranken (runners) die lateraal over de bodem groeien, wortel schieten, en scheuten produceren. De uitlopers kunnen worden geroid (wachtbedplanten), gestekt (trayplanten), of voort worden gekweekt voor de productie van A+ planten. In het najaar wordt vermindering van de bemesting gebruikt om de switch van vegetatief naar generatief te ondersteunen. De dochterplanten waarin de bloemen en trossen in het najaar zijn aangelegd voor de productie van aardbeien worden geroid en bewaard (in een vriescel). Ze worden het volgende jaar uitgeplant voor de productie van vruchten.

De bloeiaanleg kent een aantal fasen: in de eerste wordt de bloei geïnduceerd, in de tweede is er bloemaanleg, in de derde is er semi-rust, en in de vierde vindt er uitgroei van de knoppen plaats. Elk van deze fasen dient optimaal te verlopen om een goede vruchtzetting te krijgen. Voor elk van deze fasen is er mogelijk een toets nodig om het proces goed in te schatten en een teelt beter te begeleiden. De bestaande microscopische methode kan ingezet worden om na te gaan of er knopvorming heeft plaatsgevonden. Moleculaire verandering in activatie van genen op cel of weefsel niveau kunnen verandering in een vroeger stadium aantonen. Met moleculaire of biochemische methoden zou het misschien mogelijk zijn om ook iets te zeggen over de duur van de aanleg periode en daarmee sneller en betrouwbaarder het aantal knoppen en de uitgroei potentie van de knoppen vast te stellen. Mogelijk kan daarbij de fysiologische staat van de plant (bv zoals de rustfase aan het eind van het teelt seizoen) ook meegenomen worden.

De praktijk heeft dus als vraag: is het met de huidige kennis vanuit de literatuur mogelijk aanwijzingen te vinden of een dergelijke toets voor verbetering van de teeltbegeleiding haalbaar is.

Deze literatuurstudie is bedoeld om de kennis te verzamelen over hetgeen bekend is omtrent het fysiologische werkingsmechanismen en betrokken hormonen, eiwitten en genen bij de volgende processen:

1. Regulatie en timing van de bloeiaanleg (hoofdstuk 2)
2. Voltooien van de bloeiaanleg en het tijdstip dat de plant semi-rust periode ingaat (hoofdstuk 3)
3. De uitloop en productie van reeds aangelegde knoppen (hoofdstuk 4)

Daarnaast zal de literatuur bestudeerd worden om te zien of deze kennis ook zou kunnen leiden tot het ontwikkelen van nieuwe teeltmaatregelen die de plantkwaliteit positief zouden kunnen beïnvloeden (Hoofdstuk 5). Gedacht wordt aan sturing in fotoperiode, kou-behandeling, hormoon-behandeling, of behandelingen met andere componenten die betrokken fysiologische processen in planten kunnen beïnvloeden.

Tevens zal in de literatuur gezocht worden naar de kennis rond de genetische achtergrond van junidragers versus doordragers (hoofdstuk 6). Tijdens de veredeling van aardbei is er bij sommige nakomelingen namelijk verwarring over de genetische aanleg van een nakomeling. Specifieke kennis op DNA niveau of over de expressie van relevante genen kan misschien gebruikt worden om vroegtijdig de potentie van zo'n nieuwe nakomeling te bepalen en daarmee rekening te houden bij het telen en beoordelen van de nakomelingen. Indien er genetische markers zijn om de potentiële genetische aanleg te detecteren kan dit de veredeling en de selectie ondersteunen.

Bij de literatuurstudie is zoveel mogelijk gebruik gemaakt van relevante informatie van aardbei. Hierbij staat de kennis van de octoploide cultuuraardbei voorop. Voorts is ook gekeken naar de kennis omtrent de diploide wilde aardbei. Bij de meer onbekende gebieden is er ook gekeken naar de kennis die beschikbaar is over zandraket (*Arabidopsis*) omdat dit het modelgewas is voor veel genetisch onderzoek, en gebruikt wordt om algemene principes van fysiologische processen in de plant op te helderen. .

## 2 Basiskennis aardbei

### 2.1 Achtergrond van de plant

Aardbeien worden al van oudsher geteeld om hun zoete en aromatische rode vruchten. De aardbei plant behoort tot de familie van de *Rosaceae*. Alle bestaande aardbeirassen behoren tot het genus *Fragaria* en ze komen van nature op verschillende continenten voor, van Noord- en Zuid-Amerika tot Europa en Azië (Darrow 1936, Hancock en Luby 1993).

Genetisch gezien bestaan er verschillende ploidy varianten. Het ploidy getal geeft aan hoeveel kopieën van het genetisch materiaal er voorkomen in de plant. Hoe hoger het ploidy getal hoe genetisch complexer de plant is. *Fragaria* heeft 7 chromosomen als genetische basis en er zijn wilde aardbeisoorten geïdentificeerd die diploïd ( $2x=14$ ), tetraploïd ( $4x=28$ ), hexaploïd ( $6x=42$ ), octaploïd ( $8x=56$ ) en zelfs als decaploïd ( $10x=70$  chromosomen) zijn (Hancock en Luby 1993, Hummer *et al* 2009).

De huidige gecultiveerde aardbei (*Fragaria x ananassa*), een octaploïd, en lijkt ontstaan uit een toevallige kruising tussen *F. virginiana* (uit Canada) en *F. chiloensis* (uit Chili), waarschijnlijk rond 1700 in Frankrijk. Op dat moment kwamen er, van nature, geen octaploïde aardbeiplanten in Europa voor (Darrow 1936).

De diploïde aardbeicultivars worden tegenwoordig nog nauwelijks voor de teelt gebruikt, -de planten produceren alleen kleine vruchten. Niettemin worden de diploïde rassen worden door onderzoekers zeer gewaardeerd om hun relatief simpele genetische samenstelling, waardoor complexe genetische overervingsstudies in aardbei makkelijker te bestuderen zijn dan in de gecultiveerde octaploïde cultivars (Shulaev *et al* 2011).

Voordat de jonge plant knoppen kan aanleggen zal de plant eerst vanuit de runner gevormd moeten worden. Daarna is vooral de fotoperiode betrokken bij de knopaanleg. Recente overzichtsartikelen over de bloei van aardbei zijn geschreven door Taylor (2002) en Stewart en Folta (2010). De bloei kent drie belangrijke fasen: bloei-inductie (ook wel aanleg genoemd), initiatie en differentiatie. Inductie betreft de processen die plaatsvinden in de bladeren na een stimulus uit de omgeving die de transitie van vegetatief naar generatief in het apicale meristeem bewerkstelligt. Initiatie is een term voor de veranderingen die plaatsvinden in het apicale meristeem, na de inductie. Differentiatie is de ontwikkeling van bloei organen, tot het open gaan van de bloemknoppen.

### 2.2 Rankvorming (Runner formatie)

Aardbeiplanten kunnen zich op twee manieren vermeerderen, via generatieve vermeerdering (zaadsetting via vruchten) en via vegetatieve vermeerdering. Bij slechts enkele bedrijven wordt gebruikgemaakt van generatief verkregen uitgangsmateriaal, de overgrote meerderheid gebruikt de vegetatieve vermeerdering. Bij de vegetatieve vermeerdering worden meerdere uitlopers gevormd waaruit per uitloper meerdere plantjes groeien. Deze uitlopers worden hier vanaf nu runners genoemd.

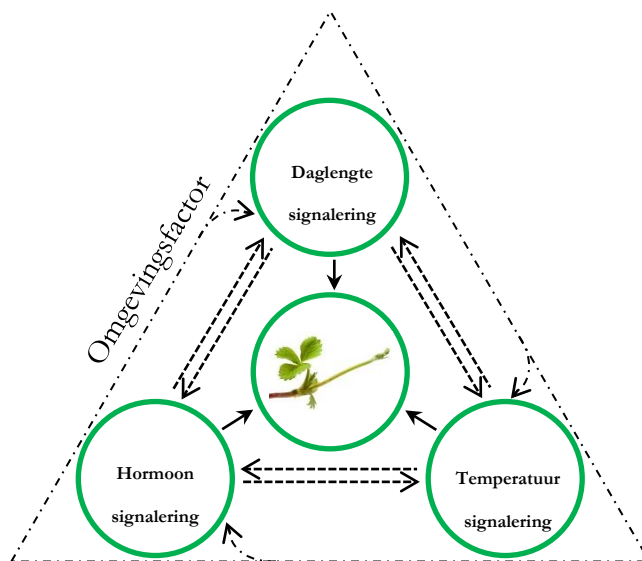
Doordat de stekjes eenzelfde genetische samenstelling hebben als de ouderplant wordt deze vorm van vermeerdering veelvuldig gebruikt voor reproductiedoeleinden en om bepaalde aardbeirassen en genetische eigenschappen in stand te houden.



Runner initiatie is afhankelijk van fotoperiode en temperatuur: runners worden alleen gevormd bij hoge temperatuur en lange dag (Darrow 1936, Durner *et al* 1984). De remming onder korte dag lijkt gerelateerd te zijn aan het hormoon gibberelline (Figuur 3; Bradford *et al* 2010).

Het plantenhormoon gibberelline (GA) is zeer belangrijk voor een normale groei van de meeste organen. Gibberelline stuurt het proces van celdeling en celstrekking en induceert belangrijke ontwikkelingen zoals zaadkieming, bloei-inductie en vruchtzetting.

In aardbei speelt GA een belangrijke rol zowel bij de bloei-inductie als bij de inductie van runners.. Een korte daglengte (SD) is de primaire factor voor bloei-inductie in juni-dragers , hoewel dit in sterke samenhang gebeurt met hogere temperatuur. Wanneer SD planten aan een korte dag blootgesteld worden, worden bloemtrossen gevormd, terwijl blootstelling aan een lange dag leidt tot runner initiatie.



Figuur 3. Model van runnerstimulatie. Vegetatieve vermeerdering in aardbei is afhankelijk van verschillende omgevingsfactoren en signaalroutes in de plant (gebaseerd op Pruneda-Paz en Kay 2010, <http://www.123rf.com>)

Hytönen *et al* (2009) toonden aan dat een blootstelling van SD aardbeiplanten aan de GA biosynthese inhibitor Pro-Ca (prohexadione-calcium) hetzelfde effect gaf als een korte dagbehandeling. Er werden in beide gevallen bloemtrossen gevormd. Het gehalte aan GA<sub>1</sub> in groeipunten bleek door een Pro-Ca en korte dagbehandeling af te nemen terwijl de precursors van GA<sub>1</sub>, GA<sub>20</sub> en GA<sub>19</sub>, in concentratie toenamen. Tevens bleek dat de lengte van de fotoperiode invloed had op de gevoeligheid van de groeipunten voor GA: een korte dag plus toegevoegde GA behandeling leidde niet tot de overgang naar runner-initiatie. Alleen wanneer planten met een additionele GA behandeling werden blootgesteld aan een lange dag werd de overgang naar runnerinitiatie waargenomen. Dit is in tegenspraak met Guttridge en Thompson, 1959. Die vonden runner initiatie onder SD als de planten herhaaldelijk met GA werden behandeld; dit effect was doseringsafhankelijk. De verschillen in resultaat zouden kunnen liggen aan een ander genotype of andere klimaat omstandigheden.

Verschillende GA biosynthese genen in aardbei zijn geïdentificeerd, zoals GA 20-oxidase (*FaGA20ox*), GA-3 oxidase (*FaGA3ox*), en GA-2-oxidase (*FaGA2ox*) (Hytönen *et al* 2009, Aharoni en O'Connel 2002). Maar naast de aanmaak van de GAs zijn er ook andere factoren van belang die het signaal versterken of remmen. GAs moeten waargenomen worden door receptoren die vervolgens in de cel het GA signaal omzetten in het aanschakelen van genen. Hierbij zijn mogelijk genen als GA signaal repressor *FaRGA* (Hytönen *et al* 2009), GA signalerings homologe genen *Sly1*, *SPY* en *GAI*, en twee mogelijke GA receptoren *GID1b* en *GID1c*, *XERICO* en *FaGAST* betrokken.

Pro-Ca behandelde planten hadden in de groeipunten van de runners een verlaagd GA<sub>1</sub> gehalte, een verhoogde expressie van *FaGA3ox* en een verlaagde expressie van *FaGA2ox*. De expressie van *FaGA20ox* bleef gelijk bij een Pro-Ca behandeling. Daarnaast waren er ook andere genen uit de GA signaal route veranderd (Hytönen *et al* 2009).

Fotoperiode behandelingen gaven een ander resultaat dan de Pro-Ca behandelingen. Ongedifferentieerde knoppen vertoonden geen verschil in GA oxidase genexpressies tussen SD en LD behandelingen.

Bij SD behandeling gedifferentieerde groeiknoppen was de *FaGA3ox* en *FaGA2ox* expressie verlaagd ten opzichte van LD behandelde groeiknoppen. In tegenstelling tot de Pro-Ca behandeling was de expressie van *FaGA3ox* verlaagd wat aangeeft dat regulatie van dit gen primair door fotoperiode beïnvloed wordt en niet door een GA feedback mechanisme.

De conclusie van het artikel was dan ook dat *FaGA3ox* en *FaGA2ox* expressie niet wordt beïnvloed door de fotoperiode in runner weefsel terwijl de expressie van deze oxidase genen gereduceerd wordt in SD behandelde groeipunten welke differentiëren naar bloemtrossen. Dit was ook zichtbaar in niet-gedifferentieerde groeipunten, terwijl de GA<sub>1</sub> levels daar nog niet verlaagd waren.

In aardbei speelt GA een cruciale rol in de differentiatie van vegetatieve knoppen tot bloemknoppen of tot runners. Hytönen *et al* (2009) toonde aan dat de GA biosynthese genen *FaGA3ox* en *FaGA2ox* in runner weefsels niet beïnvloed worden door de fotoperiode terwijl de expressie van deze genen gereduceerd wordt in SD gedifferentieerde bloemtrossen. Een nog onbekende fotoperiode gereguleerde factor of factoren reguleert de biosynthese van gibberelline waarbij SD behandeling leidt tot een verlaagd GA<sub>1</sub> niveau (differentiatie naar bloemknoppen) en LD behandeling leidt tot een onveranderd GA<sub>1</sub> niveau (differentiatie naar runners).

De initiatie van runners in diploide aardbei lijkt genetisch gelinkt aan phosphoglucoisomerase (PGI-2) allozymen (1). Vijf allelen zijn toegeschreven aan PGI-2: *Pgi-2a*, *Pgi-2b*, *Pgi-2c*, *Pgi-2d* en *Pgi-2e(3-4)*. Het *Pgi-2a* allel, uniek voor de alpine aardbei, bleek te correleren met de 'bushy branching' en niet-runner vormende fenotype typische voor de alpina aardbei variëteiten. Op de genetische kaart van aardbei liggen het monogene recessieve gen locus *r* en het *Pgi-2* locus op  $18.9 \pm 1.6$  cM. Uit deze studie kon men echter niet met zekerheid zeggen of het 'nonrunning' en 'bushy branching' bij twee dichtbij elkaar liggende genen worden veroorzaakt of dat het verschillende varianten zijn van hetzelfde gen. Het 'bushy branching' type wordt in het algemeen geassocieerd met meer vruchtdragende kronen; dus dergelijke genetische achtergronden kunnen betrekking hebben op opbrengst. Daarom werd geopperd om de PGI-2 genotypes ook in de octoploid aardbei te bestuderen. Aangezien de alpine rassen doordragers zijn door een monogene recessief allel zou er mogelijk een genetisch link bestaan tussen flowering type en variatie in of rond het PGI-2 locus.

Samenvattend kan dus geconcludeerd worden dat verschillende behandelingen leiden tot veranderingen in GA concentraties en signalering. Hormoonbalansen zijn zeer delicaat en effecten staan in relatie met omgevingsfactoren waardoor onverwachte effecten van behandelingen zouden kunnen ontstaan. Meer kennis van deze gecombineerde effecten, ondersteund met GA kwantificatie in specifieke weefsel types (effecten kunnen soms door hele lokale concentraties ontstaan), en moleculaire analyse van betrokken genen zou kunnen helpen dit mechanisme te ontrafelen. Belangrijk is wel de genetische variatie daarbij te betrekken omdat het mechanisme bij verschillende rassen iets anders zou kunnen zijn.

### 2.3 Typen bloeiers

Cultivars worden vaak gegroepeerd op basis van hun bloeipatroon, dat overigens zeer variabel is. Junebearers' (JB) produceren één serie bloemen. De oogst is meestal in de vroege zomer. 'Everbearers' (EB) maken meerdere vluchten bloemen.

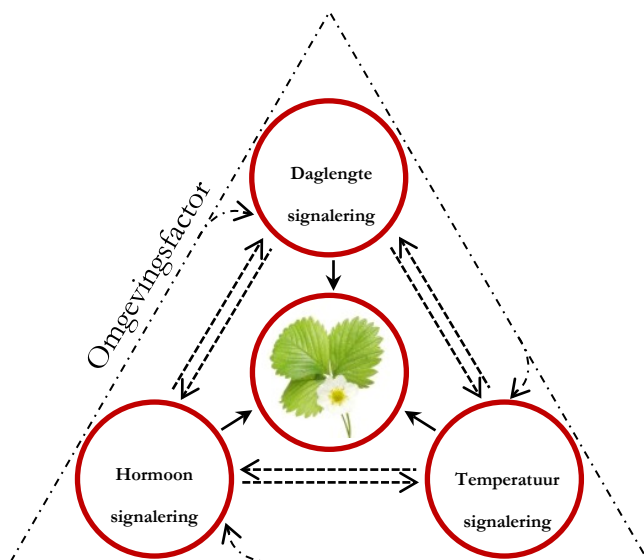
Als je een doordrager goed behandelt zou je in principe het hele teeltseizoen kunnen oogsten; de praktijk is wel dat er oogstpieken en dalen voorkomen. Een derde type wordt 'day-neutral' (DN) genoemd. Dit type is verschillend van EB cultivars omdat ze ongevoelig zijn voor de lengte van de fotoperiode.

Andere cultivars staan daar tussenin. Deze meervoudigheid van het bloeipatroon is waarschijnlijk te wijten aan de octoploïde karakter van de plant. De net voorouders (*F. virginiana* en *F. chiloensis*) zijn overigens ook octoploïde. De wilde diploïde soort *F. vesca* heeft daarentegen enkele bloei (*F. vesca*) of terugkerende bloei (*F. vesca* ssp. *semperflorens*), zonder types die daar tussenin liggen (zie meer hierover later in dit rapport).

De bloemaanleg en vruchtproductie in planten is sterk afhankelijk van de hoeveelheid licht en de temperatuur. Vooral de daglengte, van nu af aan fotoperiode genoemd, speelt een grote rol in bloei-inductie. Aardbeiplanten worden, afhankelijk bij welke fotoperiode ze bloeien, ingedeeld in 3 klassen: Juni-dragers of korte dag (SD) planten, lange dag (LD) planten en dag neutrale (DN) planten. SD planten bloeien alleen als ze opgroeien bij een korte dag behandeling en LD planten bloeien alleen bij een lange dag behandeling. DN planten bloeien onafhankelijk van de lengte van de dag. LD en DN planten worden ook wel doorbloeiers (maar in de praktijk meestal doordragers) genoemd omdat ze meerdere keren per jaar tot bloei komen (Darrow 1936, Darrow en Waldo 1934 en Bringhurst en Voth 1978). De bloei die door de fotoperiode wordt geïnduceerd wordt echter ook beïnvloed door de temperatuur waardoor indeling complexer wordt (Darrow 1936, Bradford *et al* 2010):

- Als de temperatuur laag genoeg is (lager dan 15°C) bloeien SD planten ongeacht de fotoperiode (Guttridge 1985).
- Doordragers (LD) gedragen zich als LD planten tussen de 10°C en 25°C en als DN planten onder de 10°C (Sónsteby en Heide 2007).
- Bij te hoge temperaturen bloeien geen van alle typen, ongeacht de fotoperiode (Serçe en Hancock 2005).

De waarneming van omgevingsfactoren, zoals temperatuur- en lichtperceptie, sturen verschillende signaalroutes aan welke de initiatie van bloei beïnvloeden: de signaalroute van de fotoperiode, hormonen, en temperatuur (figuur2).



Figuur 2. Model van bloeistimulatie. Bloei in aardbei is afhankelijk van verschillende omgevingsfactoren en signaalroutes in de plant (gebaseerd op Prundea-Paz en Kay 2010, <http://www.123rf.com>)

#### 2.4 Effecten van milieufactoren op de bloei-initiatie van aardbei

Van belang zijn vooral de fotoperiode en de temperatuur. Minerale voeding en de hoeveelheid water hebben een kleiner effect. Naast een effect op de bloei hebben fotoperiode en temperatuur eveneens een effect op het aantal bloemen.

Het effect van de fotoperiode wordt met name bepaald door de bladeren, die stimulerende of remmende signalen geven naar het apicale meristeem. Gibberellines (GAs) lijken een rol te spelen in de effecten van daglengthe op de bloei, via de groei van ‘runners’ (lange stelen) of bloemtrossen (korte steel). De groei van de eerste wordt gestimuleerd door lange dag (LD), en van de tweede door korte dag (SD). De vorming van kroontakken is noodzakelijk voor voldoende bloei, omdat de runners nog geen bloeiende bloemen geven. De SD zorgt voor een vermindering van het GA<sub>1</sub> gehalte. Overzetten van GA<sub>3</sub>-behandelde planten van SD naar LD gaf een normale ‘runner’ formatie. Dit gebeurde niet in planten die niet met GA<sub>3</sub> waren behandeld. GA is daarom nodig voor runnervorming. Remming van GA biosynthese leidt tot de vorming van kroontakken (Hytönen et al. 2009).

Fotoperiode en temperatuur vertonen interactie. Elke JB cultivar heeft zijn eigen kenmerkende fotoperiode x temperatuur respons. JB cultivars zijn facultatieve korte dag (SD) planten, die SD nodig hebben bij een temperatuur boven ongeveer 15°C. Ze kunnen ook in de bloei komen bij een lagere temperatuur, maar zijn dan onafhankelijk van de fotoperiode. Een lijst met cultivar-specifieke gegevens is te vinden in Guttridge (1969, 1985) en Larson (1994).

Hierin worden genoemd: kritieke fotoperioden, minimum aantal SD, het effect van gebroken nachten, de hoeveelheid en de kwaliteit van het licht, en kritieke temperaturen en minimum aantal cycli met koude temperaturen. Andere bronnen zijn: Morishita and Yamakawa (1991) and Sønsteby and Nes (1998).

Dit is in contrast met EB/DN cultivars waarvan tot heden nog weinig bekend is. Een aantal cultivars gaven bloei onder SD (9 uur donker) of LD (3 uur donker) bij vier verschillende temperaturen. In een andere studie werd een factorial design toegepast met vier fotoperioden (4, 8, 12 en 16 uur) en drie temperaturen (20, 25 en 30°C). Dit gaf in alle gevallen bloei, maar een geruim aantal bloemknoppen viel af bij de 30°C behandeling. Het effect van lage temperaturen (minder dan 10°C) geeft in veel cultivars remming van de bloei.

Brown en Waring (1965) demonstreerde dat de doordrager-eigenschap in diploide aardbeien veroorzaakt wordt door een enkel recessief locus. Bij octaploiden zou dit door een partieel dominant locus worden veroorzaakt. Twee RAPD markers, op 11.8 en 15.8 cM van het dominante doordrager locus, zijn gevonden in een Japanse octoploide populatie (Sugimoto et al., 2005) terwijl in diploide aardbei level twee sterkt gekoppelde SCAR markers (1.7 en 3.0 cM) zijn geïdentificeerd rond het doordrager recessieve locus (Albani et al., 2004). Veredelaars die geïnteresseerd zijn in het vroegtijdig analyseren van nakomelingen op deze eigenschap zouden deze markers kunnen gebruiken. Inmiddels kan in plaats van een marker die met de eigenschap geassocieerd is eigenlijk direct het coderende gen en de mutaties in dit gene gebruikt worden indien deze geïdentificeerd is zoals deze eigenschap (zie verder op in dit rapport)

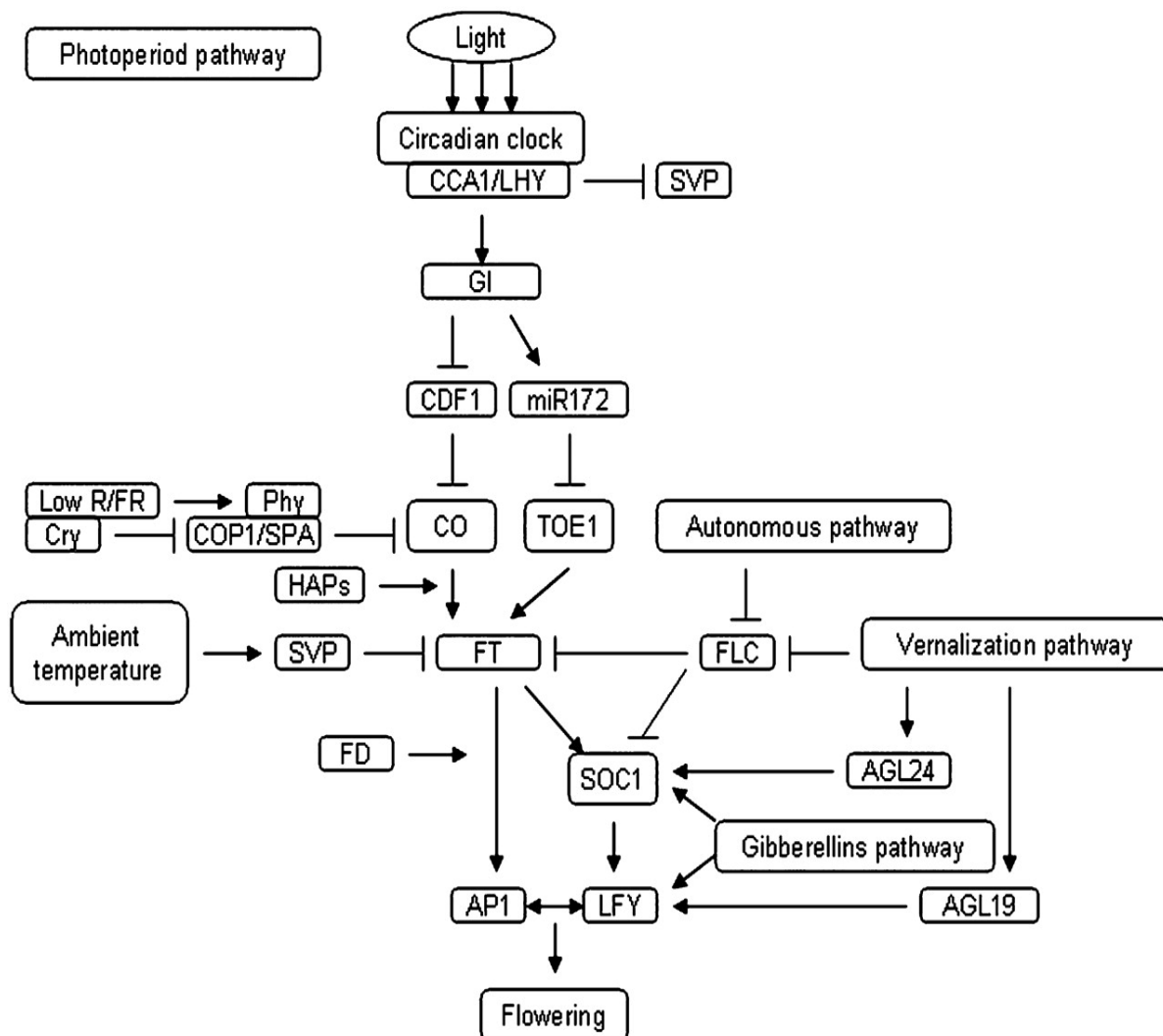
### 3 Moleculaire basis van bloei regulatie in Arabidopsis

#### 3.1 Algemeen

De laatste jaren is het mechanisme dat leidt tot bloei grotendeels opgehelderd. Hier wordt een overzicht gegeven uit Li et al. (2010). Figuur 3 geeft een schematisch overzicht van de relaties tussen de belangrijkste betrokken genen. In de figuur zijn de genen gegroepeerd naar omgevingsfactoren die de bloei bepalen: fotoperiode, lichtkwaliteit, temperatuur, en vernalisatie (koude periode). Daarnaast bestaat een autonome, dus endogene, signaalroute.

Zoals blijkt uit Figuur 3 staat de overgang van vegetatieve naar generatieve apicale meristemen onder invloed van de genen AP1 (APETA 1) en LFY (LEAFY). De expressie (hoe hard het gen aanstaat en dus biologisch actief eiwit maakt) van AP1 wordt bevorderd door FT (FLOWERING LOCUS T) en FD (FLOWERING LOCUS D). FT staat bekend als een eiwit die in de bladeren wordt aangemaakt en dan naar het meristeem wordt getransporteerd om daar andere genen aan te zetten die betrokken zijn bij meristeemformatie. FD is een bZip transcriptie factor wat betekent dat het eiwit aan het DNA bindt om op die manier de expressie (aan en uitstaan) van genen betrokken bij meristeemvorming te reguleren. Het is waarschijnlijk dat in tegenstelling tot FT dit eiwit heel lokaal in of rond meristemen wordt geproduceerd. De expressie van LFY wordt verder nog bevorderd door SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1), en ook door AGL19 (AGAMOUS-LIKE 19). SOC1 expressie wordt bevorderd door FT, en ook door AGL 24 (AGAMOUS-LIKE 24). De expressie van AGL19 en AGL24 wordt bevorderd door vernalisatie.

Ook blijkt uit Figuur 3 dat vernalisatie de expressie remt van FLC (FLOWERING LOCUS C, een MADS transcriptie factor). FLC op zijn beurt remt zowel SOC1 als FT. FT wordt eveneens geremd door SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE), een gen dat wordt gestimuleerd door de temperatuur. FT wordt daarenboven gestimuleerd door CO (CONSTANS) en TOE1 (TARGET OF EAT1), TOE2 en TOE3. De TOE genen worden geremd door miR172 (microRNA 172), die op zijn beurt wordt gestimuleerd door GI (GIGANTEA). GI remt eveneens CDF1 (CYCLING OF Dof factor 1), hetgeen resulteert in de beëindiging van de repressie van FT door CO. Het gen GI staat onder invloed van licht en de dagritme klok (circadian clock). Het gen CO staat ook onder invloed van de lichtkwaliteit (onder andere de rood en verrood verhouding).



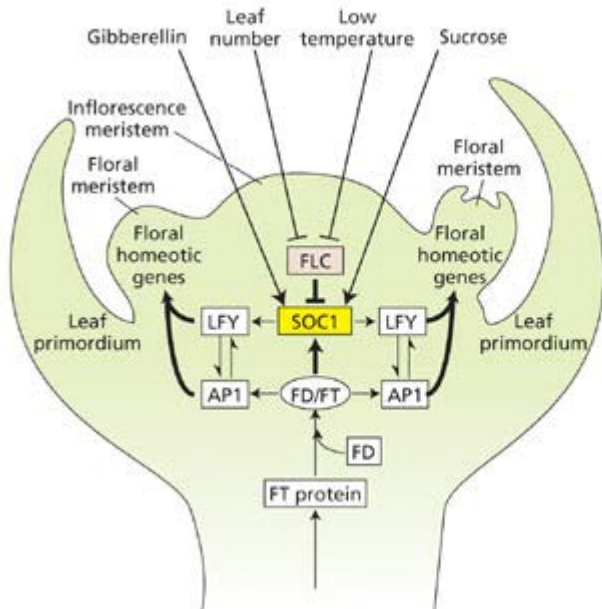
**Fig. 3.** Model van het bloei-inductie networks in *Arabidopsis*. Pijlen geven aan dat de interactie activatie geeft, de andere lijnen geven aan dat de interactie uitremming bestaat. (Li et al. 2010).

Tot dusver zijn er 118 genen geïdentificeerd die een bijdrage leveren aan de bloei van *Arabidopsis*. Er zijn echter wel een aantal centrale spelers waar signaalroutes zoals fotoperiode, vernalisatie en temperatuur bij elkaar komen: met name bij FT, SOC, LFY en AP-1. Dit zijn dus belangrijke genen waar veranderingen in gensequenties (door bijvoorbeeld mutaties) of expressie veranderingen door externe factoren grote gevolgen hebben. Ze zijn potentieel goede merker genen voor een fysiologische toestand.

Het FT eiwit wordt als een van de meest cruciale factoren gezien in de aanleg en initiatie van de bloei. Lang was het het meest gezocht 'bloeihormoon' in de bloeiregulatie nadat eerder uit genetische studies en entingsexperimenten bekend was geworden dat het een enkel recessief gen betrof, ook wel het florigen genoemd, die via het phloem getransporteerd kon worden (Chailakhyan, 1985). Pas veel later werd het gen en eiwit ontdekt waarvan nu wordt aangenomen dat het mRNA, maar meer waarschijnlijk het FT eiwit, getransporteerd wordt van het blad naar het groeimeristeem (Notaguchit et al, 2008). Het FT eiwit wordt gereguleerd door CONSTANS (CO).

In *Arabidopsis* wordt het CO mRNA geproduceerd ongeveer 12 uur na aanbreeken van de dag als onderdeel van de biologische klok. Het mRNA wordt dan omgezet naar CO eiwit wat alleen stabiel is in het licht. In een korte dag periode blijft het niveau van CO eiwit dus laag en bij lange dag periode kan het slechts actief zijn vlak voor zonsondergang. Pas dan kan het de aanzet van FT eiwit reguleren. Vervolgens kan het FT eiwit via het floem getransporteerd worden naar de groeitop waar het andere genen activeert die weer op hun beurt de bloemmeristeam genen activeert. Volgens sommige hypothesen zou naast het FT eiwit mogelijk ook het TSF eiwit (Twin Sister of FT) een rol spelen (Truck et al, 2008). Het FT eiwit is echter in veel studies moeilijk aantoonbaar gebleken, waarschijnlijk door de zeer lage concentraties die nodig zijn voor een efficiënte initiatie. Ook genexpressie van FT is vaak laag en blijft beperkt tot de cellen rond de nerven. Voor een goede detectie is het dus belangrijk een goed monster van het blad te nemen, waaronder veel nerfweefsel.

Een andere belangrijke integrator in de signaalroute van de bloei-inductie is SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1, Lee et al 2000). SOC1 integreert verschillende externe omgevingsignalen, zoals fotoperiode, temperatuur en hormoon- en leeftijd-gerelateerde signalen (Lee en Lee 2010). Hierbij werkt SOC1 samen met de twee andere integrators LEAFY (LFY) en FT (Parcy 2005). De totale som van de signalen die worden opgevangen via de genen/eiwitten SOC1, LFY en FT bepalen de verandering van het bladmeristeam naar een bloemmeristeam. Het bloemmeristeam wordt gevormd door aansturing vanuit de bloemmeristeam identiteitsgenen, waartoe AP1 en ook LFY behoren. Wanneer het bloemmeristeam voldoende ontwikkeld is komt de ontwikkeling van de bloemorganen op gang (Coen en Meyerowitz 1991).

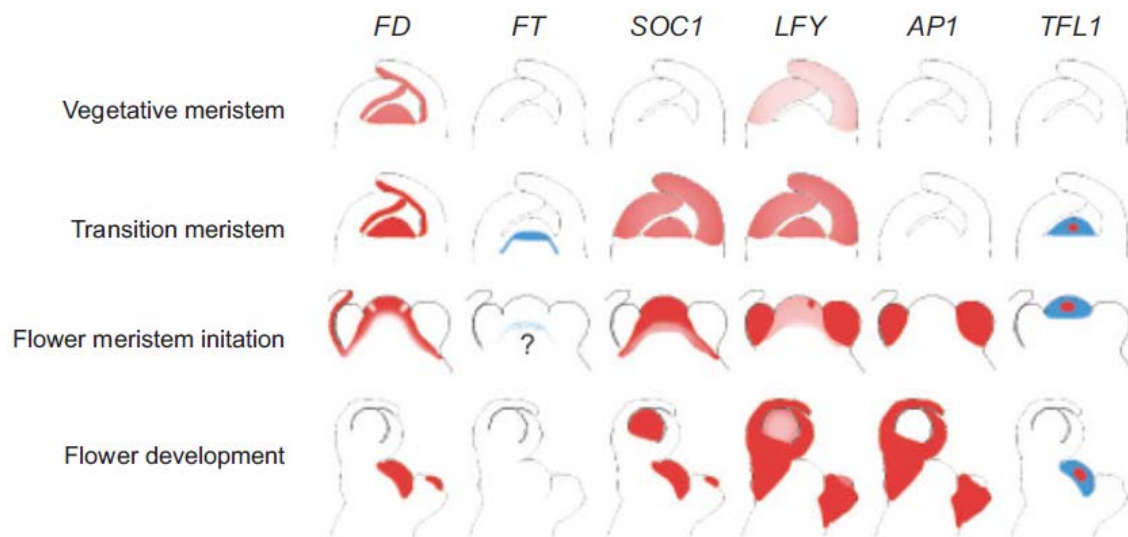


Figuur 5. De integratie van omgevingsfactoren in de signaalroute en de bloemmeristeam identiteitsgenen en hun effect op bloei-inductie.

Door de dynamiek van deze genen of eiwitten te bestuderen kan je dus veel over het ontwikkelingsstadium van het groei/bloei meristeam te weten komen. In figuur 6 zijn hier een aantal voorbeelden van weergegeven.

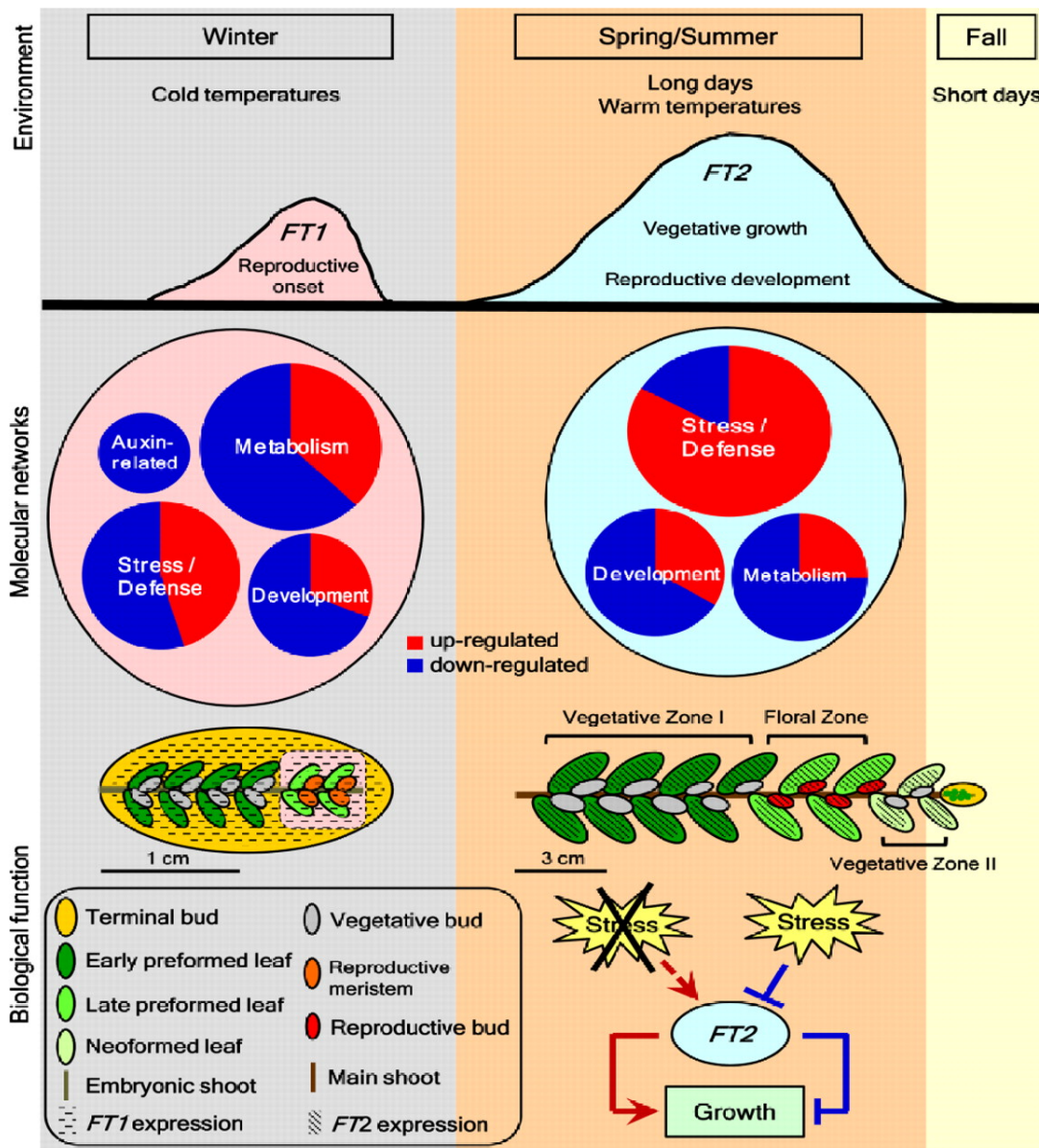


Zo is te zien dat in de transitie fase er fenotypisch aan het meristeem nog niets te zien is maar dat SOC1 en LFY duidelijk anders actief zijn dan in de vegetatieve fase. In de bloemmeristeeminitiatie fase, die zich vaak microscopisch moeilijk laat onderscheiden, blijkt AP1 weer een duidelijke marker te zijn daar er in eerdere fases nog geen expressie van AP1 te vinden is. Kortom, door gerichte analyse van de genen in verschillende stadia van meristeemontwikkeling, aangevuld met genen in het blad zoals CO en GIGANTAE (betrokken bij biologische klok) is het waarschijnlijk dat er al vroeg een uitspraak is te doen over de regulatie van de bloeiaanleg.



Figuur 6. Dynamiek van genexpressie in het meristeem bij een transitie van vegetatief naar generatief (uit Truck et al, 2008).

Het mechanisme van bloeiregulatie zoals gevonden bij *Arabidopsis* blijkt een basaal werkingsmechanisme te zijn die zich ook makkelijk laat vertalen naar andere plantensoorten, ook naar meerjarige gewassen. Natuurlijk zijn er variaties op hetzelfde thema bijvoorbeeld omdat er meerdere homologen zijn van hetzelfde gen die elkaarswerking kunnen versterken of juist antagonistisch zijn om dat ze elkaar kunnen beconcurreren in hun werking. Bij populier is bijvoorbeeld gevonden dat er 2 FT genen zijn elk een ander expressie patroon door het seizoen geven (Hsu et al 2011). FT1 blijkt voornamelijk in actief aan het eind van de winter bij het aanzetten van de generatieve meristemen terwijl FT2 juist het meest actief is aan het eind van het voorjaar, begin zomer, en vooral de vegetatieve groei en de ontwikkeling van het generatieve weefsels lijkt te reguleren. Vooral FT2 lijkt de factor betrokken bij de stress geïnduceerde regulatie van groei en de vegetatieve en generatieve zones aan een tak (zie figuur 7).



Figuur 7. Overzicht van expressie en potentiële functie van FT genen bij populier. (uit Hsu et al, 2011)

De studie van Hsu et al (2011) bevat nog meer belangrijke inzichten omdat er gekeken is naar weefsel specificiteit van de genen en naar de expressie als gevolg van dag-nacht ritme. Hieruit is te concluderen dat deze genen variëren door de dag heen met pieken in de ochtend (tussen 8-10 uur) en begin van de nacht. Hier moet dus rekening mee gehouden worden bij het opzetten van diagnostische toetsen die op basis van genexpressie voorspellingen over activiteit moeten doen.

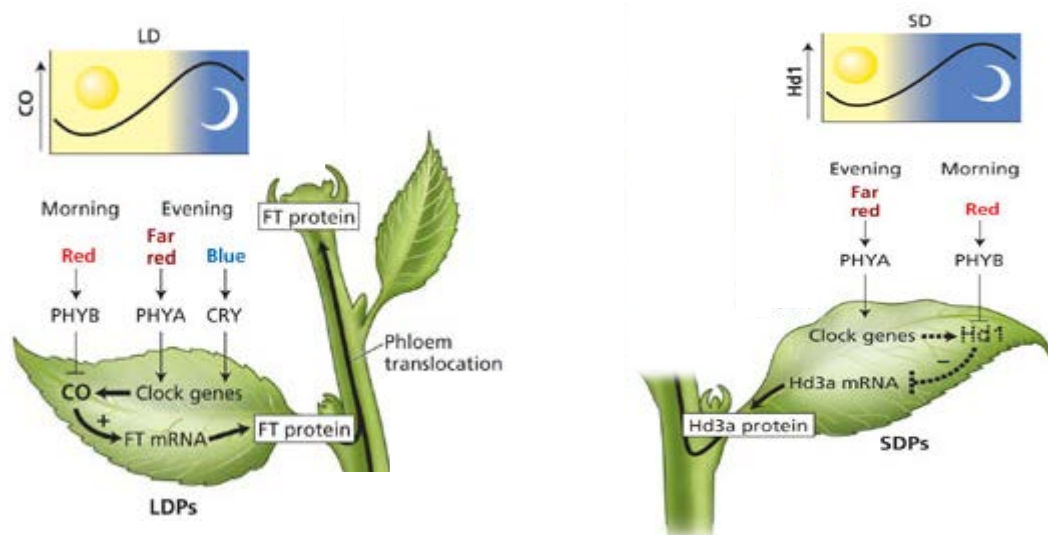
### 3.2 Invloed fotoperiode, en dag (circadian) ritme

Zoals uit het bovenstaande blijkt is het dag/nacht ritme en de biologische klok een belangrijke factor die de gen expressie, stabiliteit van eiwitten en dus de bloeiaanleg mede bepalen. *Arabidopsis* bezit 5 fytochroom receptoren *PHYA* tot *PHYE*. *PHYA* absorbeert voornamelijk ver-rood licht terwijl *PHYB tot PHYE* rood licht absorberen (Quail et al 1995).

Blauw en ultraviolet licht wordt waargenomen door de cryptochroomreceptoren CRY1 (Koorneef et al 1980, Ahmad en Cashmore 1993) en CRY2 (Lin et al 1998). De fotoreceptoren sturen verschillende signaalroutes aan waarbij ze de bloei kunnen stimuleren of juist onderdrukken. Genen betrokken in deze signaalroutes worden de “flowering-time” genen genoemd. Zij beïnvloeden de zogenaamde “bloemmeristeem identiteitsgenen” en bepalen hiermee of een vegetatief meristeem (een groep punt dat bladeren ontwikkelt) verandert in een generatief meristeem (een groep punt dat bloemen ontwikkelt)

Bloei komt alleen tot stand wanneer de signaaltransductie vanuit de circadian klok (het afstemmen van het dag- en nacht ritme) samenvalt met de signaaltransductie vanuit de fotoreceptoren. De circadian klok stuurt bepaalde flowering-time genen aan welke, afhankelijk van het seizoen, geactiveerd of gedeactiveerd worden door de fotoreceptoren.

Het belangrijkste flowering-time gen is CONSTANS (CO; Putterill *et al* 1995). De eiwitproductie van CO wordt geactiveerd door de circadian klok en vindt voornamelijk tegen de avond plaats. Echter het CO eiwit is onstabiel en wordt afgebroken in het donker, maar ook gedurende de ochtend en middag. Ochtendlicht bevat veel rood licht dat opgevangen wordt door PHYB (en PHYD en E). PHYB bevordert de afbraak van CO terwijl ver-rood licht en blauw licht (opgevangen door PHYA en CRY1/2) het CO eiwit juist stabiliseren. De hoeveelheden ver-rood licht en blauw licht nemen toe naarmate de dag vordert en heeft zijn piek rond de schemering. In LD planten stimuleert CO de productie van het FT gen. Wanneer LD planten onder lange dag omstandigheden worden geteeld, is er voldoende ver-rood licht en blauw licht aanwezig om het CO eiwit te stabiliseren en FT productie op gang te brengen. Wordt een LD plant echter onder korte dag omstandigheden geteeld dan wordt het CO eiwit pas geproduceerd als het al donker is. In dat geval wordt er geen of te weinig ver-rood/blauw licht opgevangen en zal CO afgebroken worden gedurende de nacht en het rode licht in de ochtend (zie figuur 8 maar voor een meer gedetailleerd overzicht zie appendix 1).



Figuur 8. De signaaltransductie vanuit de fotoreceptoren PHYA/B en CRY1/2 in *A. thaliana* onder LD- en SD-omstandigheden. Een LD stimuleert de productie van CO en dus de productie van FT eiwit. Figuur gebaseerd op Zeevaart, 2007.

Terwijl in *Arabidopsis* de bloei afhankelijk is van de CO eiwitproductie door de circadian klok en stabilisatie van dit eiwit door de fotoreceptoren lijkt het mechanisme voor SD planten anders te verlopen. Over het moleculaire mechanisme achter de bloei-inductie bij SD planten is veel minder bekend dan over dat bij LD planten. Hoewel de inductie tot bloei anders verloopt lijkt het mechanisme via de circadian vrij geconserveerd te zijn in planten. In de SD plant rijst (*Oryza sativa*) zijn verschillende bloei-inducerende genen teruggevonden die ook in *Arabidopsis* voorkomen zoals *Heading date 1 (Hd1)*; een ortoloog van CO, *OsGI*; een ortoloog van GI en *Heading date 3a (Hd3a)*; een ortoloog van FT (Hayama *et al* 2003 en 2002, Yano *et al* 2000 en Kojima *et al* 2002). Ortologe genen zijn genen die genetisch en qua functie op elkaar lijken maar voorkomen in verschillende organismen.

### 3.3 Invloed licht kwaliteit op de bloei inductie bij *Arabidopsis*

[dit is erg dubbel en kan weg, of naar boven]

In planten speelt licht een cruciale rol in de energiehuishouding (fotosynthese) en in fotomorfogenese (Chen *et al.* 2004). Hoe licht waargenomen wordt hangt af van de golflengte. Het moleculair mechanisme achter lichtperceptie, de signaaltransductie en bloei-inductie is het best onderzocht in de modelplant *Arabidopsis thaliana* (reviews door Lin 2000, en Carvalho *et al.* 2011). Hoewel de signaaltransductie via de fotoreceptoren in aardbei anders kan verlopen dan bij *Arabidopsis* – dit is een lange dag plant (LD) – vormt het een goede basis om fotoperceptie en bloei-inductie in aardbei te onderzoeken en te begrijpen.

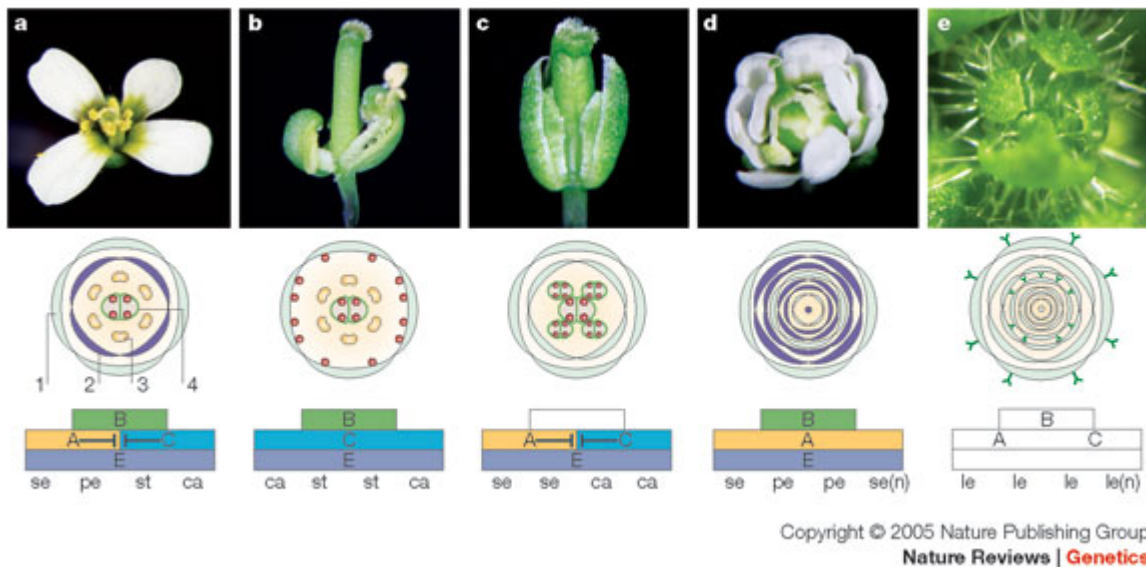
### 3.4 Ontwikkeling van bloem en vrucht

Een normale bloemontwikkeling is belangrijk voor een goede vruchtzetting en afrijping en dus voor een goede oogst. De gemiddelde aardbeibloem bestaat uit meerdere kelkbladen, 5 of meer kroonbladen, verschillende meeldraden en een samengestelde stamper. Qua architectuur lijkt de bloem veel op de bloemarchitectuur van de modelplant *Arabidopsis* en theoretisch zou de bloemontwikkeling in aardbei via hetzelfde ABCE-model voor bloemorgaanidentiteit als in *Arabidopsis* kunnen plaatsvinden.

Het ABCE-model in *Arabidopsis* beschrijft welke soort genen belangrijk zijn voor een normale bloem- en vruchtontwikkeling. De verschillende bloemorganen, van kelkbladen tot meeldraden, worden aangelegd door de expressie van identiteitsgenen (de floral-organ identity genes) welke onderverdeeld worden in klasse A, B, C en E genen. Voor sommige organen is het belangrijk dat slechts één type identiteitsgenen in een bepaald weefsel tot expressie komen (kelkbladen en stamper) terwijl voor de andere organen juist de samenwerking tussen verschillende type genen belangrijk is. Het onderstaande figuur geeft de bloemorgaanontwikkeling in *Arabidopsis* weer. De expressie van alleen klasse A genen, waaronder de *APETALA 1 (AP1)* en *APETALA 2 (AP2)* genen vallen, zorgen voor de ontwikkeling van kelkbladen. Enkel klasse C genexpressie (zoals het gen *AGAMOUS* en *PLENA*) stimuleert de aanleg van de stamper. Gelijktijdige expressie van klasse A met klasse B genen, zoals *APETALA 3 (AP3)* en *PISTILLATA (PI)*, initieert de ontwikkeling van bloembladen en de gelijktijdige expressie van klasse B met klasse C genen initieert de ontwikkeling van de meeldraden. De klasse E genen, de *SEPALLATA (SEP)* genen, komen in ieder van de bloemorganen tot expressie (Krizek en Fletcher 2005).

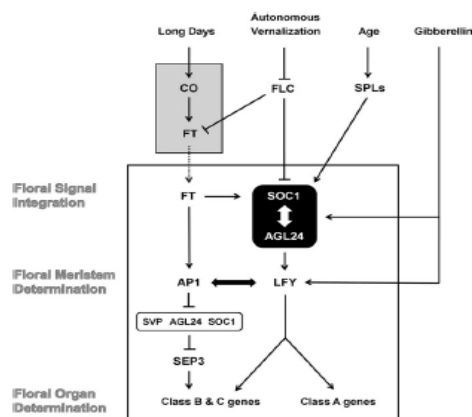
Wanneer één van de identiteitsklassen ontbreekt, bijvoorbeeld door een genmutatie, dan heeft dit een abnormale bloemontwikkeling tot gevolg (figuur 9).

Maar ook wanneer de aanleg van bepaalde onderdelen niet helemaal compleet is verlopen tijdens de ontwikkeling kunnen er kleine afwijkingen zijn in bloembodems of meeldraden waardoor de vrucht niet symmetrisch is.

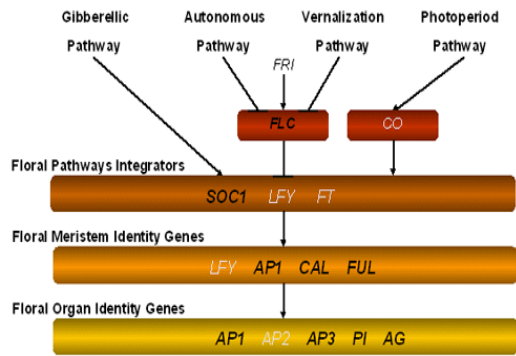


Figuur 9. Het ABCE-model in Arabidopsis. Se staat voor sepal (kelkblad), pe staat voor petal (kroonblad), st staat voor stamen (meeldraad), ca staat voor carpel (stamper) en le staat voor leaf (blad).

Deze floral-identity genen zijn ook teruggevonden in verschillende soorten in de Rosaceae zoals appel (*MdAP1*) en perzik (*PpAG1* en *PpPLENA*) maar ook in aardbei: een homoloog voor *AGAMOUS*, *StAG1* (Kototda *et al* 2000, Martin *et al* 2006, Tani *et al* 2007, Rosin *et al* 2003). Genetisch gezien lijken aardbei en perzik erg veel op elkaar. Orthologen van floral-identity genen, belangrijk voor bloem- en vruchtontwikkeling, zouden dus via een sequentie-analyse in het genoom van perzik gezocht kunnen worden waarna vertaling naar aardbei mogelijk is. Het tot expressie brengen van deze floral-identiteitsgenen wordt gereguleert door de bloei-regulator genen (flowering pathway integrators). In figuur 10 is weer gegeven hoe de AP1, LFY en andere genen vervolgens de verschillende type A, B en C genen beïnvloed.







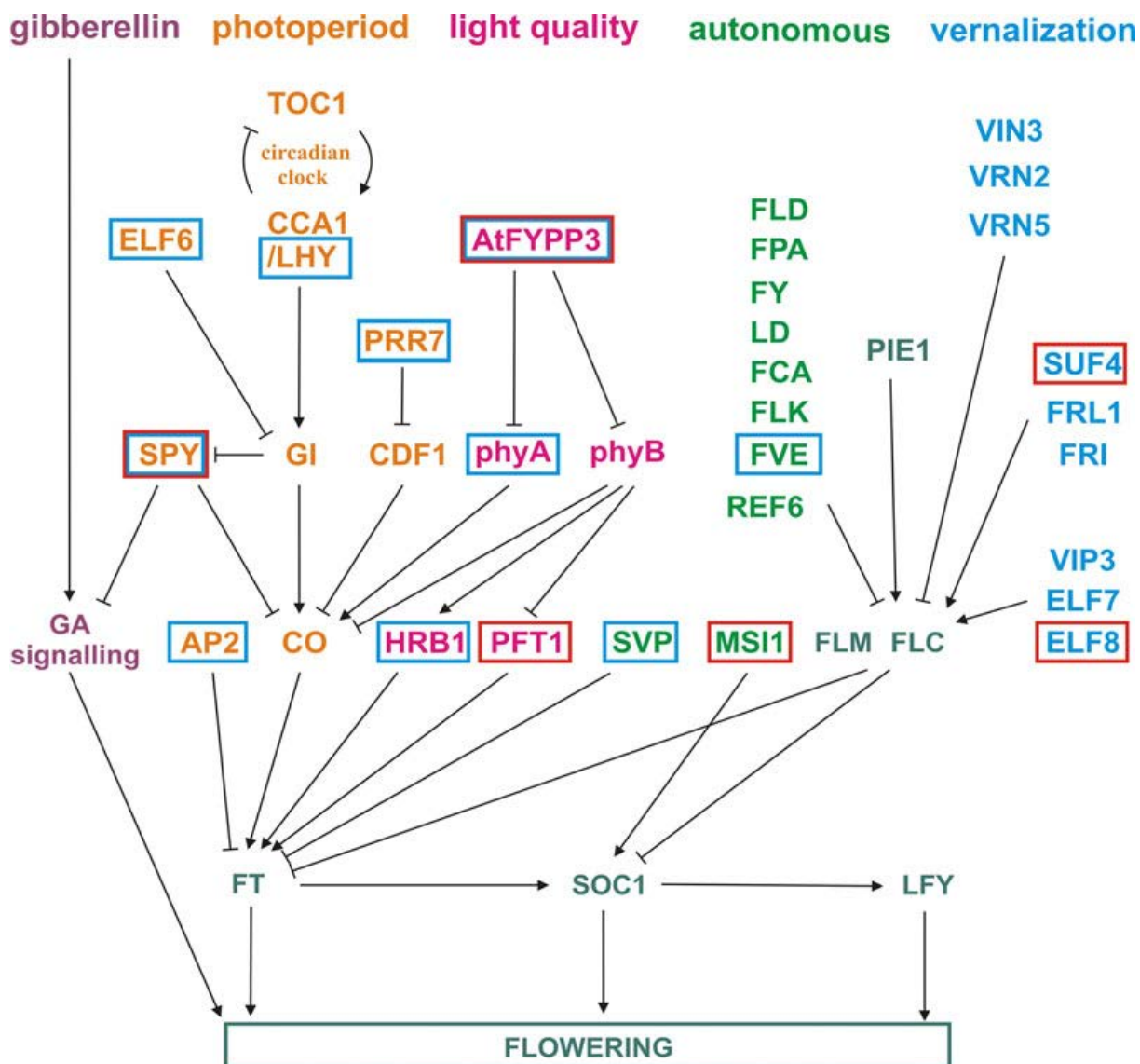
Figuur 10. De link van bloeiinductie genen naar de genen die de bloemorgaanaanleg verder reguleren. (uit <http://www.clcbio.com/scienceimages/Pathways.gif>)

## 4 Relevante moleculaire kennis aardbei

Tot nu toe is er relatief weinig bekend over de bloei-genen in de geteelde aardbei. Iets meer is er bekend over de genen rond bloei-regulatie bij de wilde aardbei (*F. vesca*; beide ondersoorten). Een van de beste studies is die van Mouhu et al. (2009) en de thesis van Timo Hytonen (<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/20738/regulati.pdf?sequence=1>).

De groep uit Finland zoekt naar genen in aardbei die homoloog zijn aan de 118 reeds bekende *Arabidopsis* bloei-gerelateerde genen. Figuur 11 geeft een overzicht van hetgeen bekend is in aardbei en geeft aan met gekleurde blokken of de genen gevonden zijn in korte dag planten (SD) of doordragers (EB). Daarnaast zijn ook andere manieren gebruikt om homologe genen op te sporen. In de lijst met gevonden homologe genen (totaal 66) komen ook genen voor die niet omgeven zijn door een box in figuur 11 (zie ook de genenlijsten in tabel 1, 2 en 3). Voor 2009 kon al gezegd worden dat er grote overeenkomsten waren tussen aardbei en *Arabidopsis* in bloei-regulatie. Echter er ontbraken toen nog een aantal cruciale genen FT, TFL, FLC waardoor er gespeculeerd kon worden over een mogelijk afwijkende bloei-regulatie. In de studie van Mouhu et al. (2009) is ook de expressie van 25 van deze genen onderzocht. Hieruit bleek dat er verschil in expressie was tussen SD en EB rassen. Afhankelijk van het tijdstip waarop deze verschillen al te detecteren zijn met behulp van de gen expressie methode kan dat interessant zijn voor de praktijk die bij een nieuw ras snel wilt weten of de plant als SD of als EB beoordeelt dient te worden. In de praktijk levert de veredelaar die kennis aan met het ras maar ook voor de veredelaar is het handig deze kennis efficiënt te verzamelen en niet door veel trial en error proeven.

In de studie van Mouhu et al (2009) vertoonden de aardbei homologen van *AP1* and *LFY* co-gereguleerd expressie, vroeg tijdens de bloei-inductie. *AP1* mRNA accumuleerde specifiek in de groeipunten waar zich de bloeimeristemen vormen van het continu bloeiende EB genotype. Deze gen expressie verschillen kunnen dus gebruikt worden om type bloeiers uit elkaar te halen en bloeimeristemen aanleg te volgen.



Figuur 11. Overzicht van de genen van *Arabidopsis* en de homologen die gevonden zijn in de wilde aardbei waarbij de genen gevonden in SD planten een blauwe box hebben gekregen en genen gevonden in EB met een rode box zijn omkaderd. De namen van de genen en hun functie worden vermeld in Tabel 1-3. (Mouhu et al, 2009)



**Tabel 1.** Lijst van genen betrokken bij de photoperiode geregleerde bloei waarin een homologoog bij *F.vesca* zijn gevonden in de studie van Mouhu (+) en welke nog ontbraken (-).

Gene	AT Locus	Name	<i>F. vesca</i>
<i>Photoreceptors and clock input</i>			
PhyA	AT1G09570	Red light photoreceptor	+
PhyB	AT2G18790	Red light photoreceptor	-
CRY1	AT4G08920	Blue light photoreceptor	-
CRY2	AT1G04400	Blue light photoreceptor	+
ZTL	AT5G57360	F-box protein/blue light photoreceptor	+
FKF1	AT1G68050	F-box protein/blue light photoreceptor	+
ELF3	AT2G25920	Unknown	+
FYPP3	AT1G50370	Ser/Thr-specific protein phosphatase 2A	+
SRR1	AT5G59560	Unknown	+
<i>Circadian clock</i>			
LHY	AT1G01060	Myb domain TF	+
CCA1	AT2G46830	Myb domain TF	-
TOC1	AT5G61380	Pseudo-response regulator	+
LUX	AT3G46640	Myb TF	+
ELF4	AT2G40080	Unknown	+
GI	AT1G22770	Unknown	-
PRR5	AT5G24470	Pseudo-response regulator	+
PRR7	AT5G02810	Pseudo-response regulator	+
ELF6	AT5G04240	Jumonji/zinc finger-class TF	+
<i>Output pathway</i>			
CO	AT5G15840	putative zinc finger TF	+
CDF1	AT5G62430	Unknown	-
FT	AT1G65480	Phosphatidylethanolamine binding	-
TFL1	AT5G03840	Phosphatidylethanolamine binding	-
FD	AT4G35900	bZIP TF	+
COP1	AT2G32950	E3 ubiquitin ligase	+
SPA1	AT2G46340	WD domain protein	-
SPA3	AT3G15354	WD domain protein	+
SPA4	AT1G53090	WD domain protein	+
RFI2	AT2G47700	Ring domain zinc finger	-
HAP3b	AT5G47640	CCAAT-binding TF	+

**Tabel 2:** Lijst van genen betrokken bij de koude geïnduceerde geregleerde bloei waarin een homologoog bij *F.vesca* zijn gevonden in de studie van Mouhu (+) en welke nog ontbraken (-).

Gene	AT Locus	Name	<i>F. vesca</i>
FLC	AT5G10140	MADS-box TF	-
MAF1/FLM	AT1G77080	MADS-box TF	-

<i>Fri complex</i>			
FRI	AT4G00650	Unknown, enhancer of FLC	-
FRL1	AT5G16320	Unknown, enhancer of FLC	+
FRL2	AT1G31814	Unknown, enhancer of FLC	+
FES1	AT2G33835	CCCH zinc finger protein	-
SUF4	AT1G30970	putative zinc finger containing TF	+
<i>Swr complex</i>			
PIE	AT3G12810	ATP-dependent chromatin-remodelling factor	-
SEF1/SWC6	AT5G37055	Component of chromatin remodelling complex	+
ARP6/ESD1	AT3G33520	Component of chromatin remodelling complex	-
ATX1	AT2G31650	Putative SET domain protein	+
<i>Paf1 complex</i>			
ELF7	AT1G79730	RNA polymerase 2 associated factor 1 -like	-
ELF8	AT2G06210	RNA polymerase 2 associated factor -like	+
VIP4	AT5G61150	RNA polymerase 2 associated factor -like	+
VIP3	AT4G29830	RNA polymerase 2 associated factor -like	+
EFS/SDG8	AT1G77300	putative histone H3 methyltransferase	-
<i>VRN2-PRC2 complex</i>			
VRN2	AT4G16845	Polycomb group zinc finger	-
CLF	AT2G23380	Polycomb group protein	-
SWN1/EZA	AT4G02020	Polycomb group protein	+
FIE	AT3G20740	Polycomb group protein	+
VIN3	AT5G57380	PHD domain protein	+
LHP1	AT5G17690	epigenetic silencing	+
VRN1	AT3G18990	DNA binding protein	+

**Tabel 3:** Lijst van genen betrokken bij de autonome en gibberelline gereguleerde bloei waarin een homoloog bij *F. vesca* zijn gevonden in de studie van Mouhu (+) en welke nog ontbraken (-).

Gene	AT Locus	Name	<i>F. vesca</i>
<i>Autonomous pathway</i>			
FCA	AT4G16280	RRM-type RNA binding domain containing	-
FPA	AT2G43410	RRM-type RNA binding domain containing	-
FLK	AT3G04610	KH-type RNA binding domain containing	+
FY	AT5G13480	mRNA 3' end processing factor	+
SKB1	AT4G31120	Arginine methyltransferase	-
FVE	AT2G19520	retinoblastoma associated	+
LD	AT4G02560	DNA/RNA binding homeodomain protein	+
FLD	AT3G10390	component of histone deacetylase complex	-
LDL1/SWP1	AT1G62830	Histone H3-Lys 4 demethylase-like	+
LDL2	AT3G13682	Histone H3-Lys 4 demethylase-like	+

#### *Gibberellin pathway*

GAI	AT1G14920 putative transcriptional repressor	+
RGA	AT2G01570 putative transcriptional repressor	+
SPY	AT3G11540 O-linked N-acetylglucosamine transferase	+
DDF1	AT1G12610 AP2-like TF	+
DDF2	AT1G63030 AP2-like TF	-
AtMYB33	AT5G06100 MYB TF	+
FPP1	AT5G24860 Unknown	+
<i>Other</i>		
SVP	AT2G22540 MADS-box TF	+
AP2	AT4G36920 AP2 TF	+
PFT1	AT1G25540 vWF-A domain protein	+
HRB1	AT5G49230 ZZ type zinc finger protein	+

---

#### ***Fragaria vesca* genoom sequence bekend**

In 2011 is het volledige *F. vesca* genoom gesequenced en gepubliceerd (Shulaev et al. 2011). Dit betekent dat nu nog beter dan in de studie van Mouhu naar homologen gezocht kan worden. Gebruikmakend van de eiwit sequenties van het Arabidopsis FT gen en de genen van mais en rijst die qua functie dezelfde rol vervullen als FT in Arabidopsis is er een BLAST uitgevoerd op het genoom van de wilde aardbei. Zeker 4 homologe sequenties zijn er in het genoom voor CZN8 en 5 homologen voor de FT/Hd3a/b genen. Deze waren in de studie Mouhu et al (2009) nog niet geïdentificeerd. Indien er meerdere homologen voorkomen zal uitgezocht moeten worden welke de meest waarschijnlijk functionele homologe is. Deze analyse was reeds voor de zomer van 2011 uitgevoerd, al voor de publicatie van Laurie et al (2011) bekend was waarin een volledige vergelijking werd gepubliceerd van de FT genen van veel soorten planten, inclusief die van families in de Rosales. Deze studie onderbouwde de eerdere stelling dat FT het sleutelgenen is voor regulatie van de bloeiperiode. Ook voor enkele andere genen zijn deze BLAST studies uitgevoerd en voor bijna elk van de cruciale genen lijkt er nu een homologe aan te wijzen. De beschikbaarheid van het volledige genoom zal de kennis rond moleculaire mechanismen van aardbei versnellen. Met de beschikbaarheid van een volledige genoom wordt het ook makkelijker stukjes genoom of expressie van genen uit gerelateerde soorten naast deze volledige sequentie te leggen en naar verschillen te zoeken. Te denken is aan een aanpak waarbij ook van verschillende cultuur aardbeien random sequenties worden bepaalde van genen die tot expressie komen zodat onderzocht kan worden welke variatie er zit in deze genen en hoe hun expressie niveaus zijn.

#### 2.2.4 Fotoperiodische signaaltransductie in Aardbei

Iwata et al. (2011) hebben het gen voor doordragen (daglengte neutraliteit) in aardbei, in samenwerking met het INRA in Frankrijk, geïdentificeerd. Gebruikmakend van genetische populaties die uitsplitsen voor doorbloeiende eigenschap en ervan uitgaande dat het florigen van aardbei en roos waarschijnlijk een FT achtige gen zal zijn hebben ze inderdaad aangetoond dat dit het geval is. Ook in deze studie hebben ze op basis van het *F. vesca* genoom alle homologen geïdentificeerd en naar verwantschap in sequenties gepositioneerd (zie Figuur 12).



## 5 Conclusies voor de praktijk

We wilden met deze literatuurstudie inzicht krijgen in de kennis rond:

1. Regulatie en timing van de bloeiaanleg
2. Voltooien van de bloeiaanleg en de periode waarbij de plant in semi-rust gaat
3. De uitloop en productie van reeds aangelegde knoppen
4. Mogelijkheden tot het ontwikkelen van nieuwe teeltmaatregelen
5. De kennis rond de genetische achtergrond van Junidragers versis doordragers

### Ad 1. Regulatie en timing van de bloeiaanleg

De complexiteit en de vele invloeden van externe factoren zal het nodig maken om meerdere genen (en metabolieten) in de beschouwing te betrekken. Gen expressie geeft een dynamisch beeld van een product op een bepaald moment. Bij de balans tussen vegetatieve en generatieve plantdelen zal er sprake zijn van cumulatieve effecten die uiteindelijk de meristemen in de juiste fase brengen. Mogelijk dat een dergelijke ontwikkelingsfase te typeren is door verhoudingen tussen de expressie van bepaalde genen te gebruiken.

### Ad 2. Voltooien van de bloeiaanleg en start van de semi-rust periode

Er zijn verschillende studies gedaan naar de effecten van temperatuur en photoperiode op de veranderingen in de plant. Hierbij zijn verschillende morfologische kenmerken gevolgd zoals de lengte van de bladsteel, het bladoppervlak, de verouderingssnelheid van een blad, en de plastochronduur (tijdsinterval tussen verschijnen van twee opeenvolgende bladeren). Uit deze studies is duidelijk dat elke cultivar zijn eigen programma heeft bij het verminderen van de groei in het najaar (referenties nodig). Bij veel rassen, zoals Elsanta, gaat de groei al vanaf september hard achteruit waarbij het minimum tussen oktober en november plaatsvindt. Daarna neemt de bladgroei weer toe. De kou doorbreekt de winterrust. Planten die in december naar LD worden geplaatst gaan dan weer sneller bloeiwijzen/trossen te vormen met een eveneens kortere “emergence” tijd.

Er zijn geen studies gevonden waarbij dergelijke analyses gepaard gaan met moleculaire analyses en interne hormoon balansen. Wel blijkt dat een juiste bepaling van de dormancy fase significant is voor de productie van koelbewaarde planten en dat alleen planten in volle rust een lange koude bewaring kunnen doorstaan.

Genen die genoemd worden in het kader van bloeiregulatie spelen ook een rol bij bloemaanleg endodormancy (najaarsgereguleerde rust), zoals FT, SVP, AGL24, CENL1, Constans en andere MADSbox TF, (Horvath et al. 2010). Verder worden bij veel bomen, vooral bij knopaanleg en rustdoorbreking dehydrines genoemd als belangrijke indicator. Dehydrines zouden bij sommige soorten ook sterk gecorreleerd zijn aan winterhardheid, een kwaliteitseigenschap die goed past bij een van de doelen van het vinden van markers: vaststellen van het tijdstip waarop de planten gereed zijn voor lange koude bewaring. Uitgebreide expressie studies zoals uitgevoerd bij heksenmelk (*Euphorbia esula*) geven een overzicht van mogelijk betrokken genen. Het betreft vooral circadian clock genen (CCA1, ELF3, ELF4-like, FKF1, GI, ZTL), licht-geïnduceerde regulatoren (COP1, HY5, PHYA), dehydratie/koude respons genen waaronder de vaak genoemde C repeat/dehydration response element binding factor (CBF) (Dogramaci et al, 2010).

Hieruit is te concluderen dat er voor het vinden van markers voor de winterrust en koude hardheid een benadering gevolgd kan worden waarbij gezocht wordt naar homologen in aardbei van genen als CBF, dehydrines, enz. De genexpressie zou dan gecorreleerd moeten worden aan de gewenste fysiologische toestand van de plant, die leidt tot goede kwaliteit van de planten na verschillende perioden van gekoelde bewaring.

#### Ad 3. De uitloop en productie van reeds aangelegde knoppen

Uitgangsmateriaal dat in potentie goed is kan een slechte opbrengst leveren door verkeerde temperatuur, slechte lichtcondities, onvoldoende water- en voedingsgiften, ziekten etc. Het vaststellen van de uitloop en de productie is alleen mogelijk voor bepaalde vaste teeltcondities.

De potentiële opbrengst van junidragers wordt primair bepaald door het aantal aangelegde trossen en het aantal bloemen per tros in het najaar. Voor de bepaling van plantvitaliteit zijn vele genen denkbaar zoals die betrokken bij fotosynthese, of huishoudgenen voor energievoorziening. Deze merkers, die overigens ook fysiologisch of biochemisch kunnen zijn, kunnen mogelijk ook gebruikt worden om de bewaring te optimaliseren, de volgorde van uitleveren van batches vanuit de koeling te bepalen en misschien een kwaliteitsgarantie naar de afnemer te kunnen geven (zie projectvoorstel van Fytagoras en NSure).

Naast de plantvitaliteit zou er gezocht moeten worden naar merkers die de uitloop en productie zouden moeten voorspellen, onder vaste condities. Na een standaard bewaarperiode is er al veel aanleg van de bloeimeristemen. Dit kan via de microscopische methode vastgesteld worden. De vraag is of er daarnaast nog andere merkers zijn die de potentiële groei aangeven. Te denken is misschien aan GA niveaus in blad of bloemknop die een belangrijke bijdrage leveren aan het uitlopen van de knoppen. Ook zouden mogelijk genen betrokken bij celdeling en celstrekking, die de eerste dagen na acclimatisering vanuit de koeling aangeschakeld worden, gebruikt kunnen worden als potentiële merker voor de groei. De vraag hoe betrouwbaar en voorspelbaar dergelijke merkers zullen zijn in de praktijk zal uitgezocht moeten worden.

#### Ad 4. Mogelijkheden tot het ontwikkelen van nieuwe teeltmaatregelen voor de sturing van bloei-inductie en bloemaanleg

Naast de reeds gebruikte sturing van teelt met licht en temperatuur zijn er experimenten gedaan met hormoonoedieningen. Zover bekend heeft het behandelen met hormonen als GA3 niet tot verbeteringen in de teelt geleid. Indien er goede merkers voor fysiologische stadia en de regulatie van meristemen ontwikkeld worden, is het misschien mogelijk de GA3 behandelingen beter te timen en doseren waardoor wel de gewenste sturing van het gewas behaald kan worden.

Het FT eiwit dat aangemaakt wordt in de bladeren en getransporteerd naar de meristemen, en daar de differentie reguleert, is daarbij mogelijk interessant. Indien een dergelijk stabiel eiwit gesynthetiseerd zou kunnen worden dat door de wortels of bladeren opgenomen kan worden en via het floem naar de meristemen getransporteerd wordt kan dit een hele nieuwe manier zijn om de bloemaanleg te vervroegen. Een ander idee is om de plant het FT eiwit zelf te laten maken door het FT gen via een (virale of Agrobacterium tumefaciens) infectie tijdelijk of stabiel in de plant aan te brengen. Dergelijke strategieën zijn ook denkbaar met een genoomconstruct waardoor de aanmaak door een andere stimulus dan licht aangezet wordt.

Het FT gen van Arabidopsis is gepatenteerd voor het maken van transgenen planten met vervroegde of verlate bloei, indien het gen tot overexpressie wordt gebracht in een plant of indien de expressie wordt uitgeschakeld (patent US 6713663).

Dergelijke patenten zijn er ook gevonden bij andere genen die de aanleg van bloem en meristeem bepalen, zoals SVP (20080263726). In dergelijke patenten worden ook vaak sequenties geclaimd van andere organismen met een zekere mate van homologie met het gepatenteerde gen (minstens 90% homologie, minstens 80% homologie etc). Met deze claims dient rekening te worden gehouden.

#### Ad5. De kennis rond de genetische achtergrond van Junidragers versis doordragers

Er wordt vaak veredeld met 'everbearing' (doordragende) genotypes omdat deze ook in de herfst nog vruchten kunnen produceren onder natuurlijke teeltcondities. Maar binnen deze groep van doordragende cultivars zijn er een aantal variaties. Sterk doordragende variëteiten zullen vaak een arbeidsintensieve teelt en pluk vergen, zeker om de vegetatieve groei te onderdrukken. Zwakke doordragers kunnen daarentegen een onstabiele productie hebben. Er is studie verricht om eigenschappen te identificeren die een onderscheid kunnen maken tussen sterke en zwakke doordragers (Honjo et al, 2011). Tijdstip van eerste bloei datum en het aantal bladeren tussen voorjaar en zomer bloeiwijzen gaven een relatie met de sterkte van het doordragers karakter.

Mouhu et al. (2009) hebben gen expressie analyse verricht zowel op SD en LD planten. Genen als PFT1 en SPY 1, belangrijke genen voor de bloei-inductie, zijn hierbij in het bank van de EB geïdentificeerd en niet in de SD genotype.

De studie van Iwata et al. (2011) heeft bij *F. vesca* vastgesteld dat de verschillen tussen continu bloeiers (doordragers) en eenmalige bloeiers (June bearing) door het Terminal Flower 1 gen bepaald wordt. Het is daarom mogelijk dat bij de cultuuraardbei juist in dit gen verschillende mutaties zijn, waardoor er allerlei tussenvormen ontstaan. Nieuwe genotypen zouden dus met behulp van sequencing van dit gen, aangevuld met gen expressie analyse, geïdentificeerd kunnen worden.

## 6 Methoden voor praktisch vervolg onderzoek

We wilden met deze literatuurstudie inzicht krijgen in de kennis rond:

1. Regulatie en timing van de bloeiaanleg
2. Voltooien van de bloeiaanleg en de periode waarbij de plant in semi-rust gaat
3. De uitloop en productie van reeds aangelegde knoppen
4. Mogelijkheden tot het ontwikkelen van nieuwe teeltmaatregelen
5. De kennis rond de genetische achtergrond van Junidragers versis doordragers

### Ad 1. Regulatie en timing van de bloeiaanleg

De complexiteit en de vele invloeden van externe factoren zal het nodig maken om meerdere genen (en metabolieten) in de beschouwing te betrekken. Gen expressie geeft een dynamisch beeld van een product op een bepaald moment. Bij de balans tussen vegetatieve en generatieve plantdelen zal er sprake zijn van cumulatieve effecten die uiteindelijk de meristemen in de juiste fase brengen. Mogelijk dat een dergelijke ontwikkelingsfase te typeren is door verhoudingen tussen de expressie van bepaalde genen te gebruiken.

### Ad 2. Voltooien van de bloeiaanleg en start van de semi-rust periode

Er zijn verschillende studies gedaan naar de effecten van temperatuur en photoperiode op de veranderingen in de plant. Hierbij zijn verschillende morfologische kenmerken gevolgd zoals de lengte van de bladsteel, het bladoppervlak, de verouderingssnelheid van een blad, en de plastochronduur (tijdsinterval tussen verschijnen van twee opeenvolgende bladeren). Uit deze studies is duidelijk dat elke cultivar zijn eigen programma heeft bij het verminderen van de groei in het najaar (referenties nodig). Bij veel rassen, zoals Elsanta, gaat de groei al vanaf september hard achteruit waarbij het minimum tussen oktober en november plaatsvindt. Daarna neemt de bladgroei weer toe. De kou doorbreekt de winterrust. Planten die in december naar LD worden geplaatst gaan dan weer sneller bloeiwijzen/trossen te vormen met een eveneens kortere “emergence” tijd.

Er zijn geen studies gevonden waarbij dergelijke analyses gepaard gaan met moleculaire analyses en interne hormoon balansen. Wel blijkt dat een juiste bepaling van de dormancy fase significant is voor de productie van koelbewaarde planten en dat alleen planten in volle rust een lange koude bewaring kunnen doorstaan.

Genen die genoemd worden in het kader van bloeiregulatie spelen ook een rol bij bloemaanleg endodormancy (najaarsgereguleerde rust), zoals FT, SVP, AGL24, CENL1, Constans en andere MADSbox TF, (Horvath et al. 2010). Verder worden bij veel bomen, vooral bij knoiaanleg en rustdoorbreking dehydrines genoemd als belangrijke indicator. Dehydrines zouden bij sommige soorten ook sterk gecorreleerd zijn aan winterhardheid, een kwaliteitseigenschap die goed past bij een van de doelen van het vinden van markers: vaststellen van het tijdstip waarop de planten gereed zijn voor lange koude bewaring. Uitgebreide expressie studies zoals uitgevoerd bij heksenmelk (*Euphorbia esula*) geven een overzicht van mogelijk betrokken genen.



Het betreft vooral circadian clock genen (CCA1, ELF3, ELF4-like, FKF1, GI, ZTL), lichtgeïnduceerde regulatoren (COP1, HY5, PHYA), dehydratie/koude respons genen waaronder de vaak genoemde C repeat/dehydration response element binding factor (CBF) (Dogramaci et al, 2010).

Hieruit is te concluderen dat er voor het vinden van markers voor de winterrust en koude hardheid een benadering gevolgd kan worden waarbij gezocht wordt naar homologen in aardbei van genen als CBF, dehydrines, enz. De genexpressie zou dan gecorreleerd moeten worden aan de gewenste fysiologische toestand van de plant, die leidt tot goede kwaliteit van de planten na verschillende perioden van gekoelde bewaring.

#### Ad 3. De uitloop en productie van reeds aangelegde knoppen

Uitgangsmateriaal dat in potentie goed is kan een slechte opbrengst leveren door verkeerde temperatuur, slechte lichtcondities, onvoldoende water- en voedingsgiften, ziekten etc. Het vaststellen van de uitloop en de productie is alleen mogelijk voor bepaalde vaste teeltcondities.

De potentiële opbrengst van junidragers wordt primair bepaald door het aantal aangelegde trossen en het aantal bloemen per tros in het najaar. Voor de bepaling van plantvitaliteit zijn vele genen denkbaar zoals die betrokken bij fotosynthese, of huishoudgenen voor energievoorziening. Deze merkers, die overigens ook fysiologisch of biochemisch kunnen zijn, kunnen mogelijk ook gebruikt worden om de bewaring te optimaliseren, de volgorde van uitleveren van batches vanuit de koeling te bepalen en misschien een kwaliteitsgarantie naar de afnemer te kunnen geven (zie projectvoorstel van Fytagoras en NSure).

Naast de plantvitaliteit zou er gezocht moeten worden naar merkers die de uitloop en productie zouden moeten voorspellen, onder vaste condities. Na een standaard bewaarperiode is er al veel aanleg van de bloeimeristemen. Dit kan via de microscopische methode vastgesteld worden. De vraag is of er daarnaast nog andere merkers zijn die de potentiële groei aangeven. Te denken is misschien aan GA niveaus in blad of bloemknop die een belangrijke bijdrage leveren aan het uitlopen van de knoppen. Ook zouden mogelijk genen betrokken bij celdeling en celstrekking, die de eerste dagen na acclimatisering vanuit de koeling aangeschakeld worden, gebruikt kunnen worden als potentiële merker voor de groei. De vraag hoe betrouwbaar en voorspelbaar dergelijke merkers zullen zijn in de praktijk zal uitgezocht moeten worden.

#### Ad 4. Mogelijkheden tot het ontwikkelen van nieuwe teeltmaatregelen voor de sturing van bloei-inductie en bloemaanleg

Naast de reeds gebruikte sturing van teelt met licht en temperatuur zijn er experimenten gedaan met hormoonbehandelingen. Zover bekend heeft het behandelen met hormonen als GA3 niet tot verbeteringen in de teelt geleid. Indien er goede merkers voor fysiologische stadia en de regulatie van meristemen ontwikkeld worden, is het misschien mogelijk de GA3 behandelingen beter te timen en doseren waardoor wel de gewenste sturing van het gewas behaald kan worden.

Het FT eiwit dat aangemaakt wordt in de bladeren en getransporteerd naar de meristemen, en daar de differentie reguleert, is daarbij mogelijk interessant.

Indien een dergelijk stabiel eiwit gesynthetiseerd zou kunnen worden dat door de wortels of bladeren opgenomen kan worden en via het floem naar de meristemen getransporteerd wordt kan dit een hele nieuwe manier zijn om de bloemaanleg te vervroegen. Een ander idee is om de plant het FT eiwit zelf te laten maken door het FT gen via een (virale of *Agrobacterium tumefaciens*) infectie tijdelijk of stabiel in de plant aan te brengen. Dergelijke strategieën zijn ook denkbaar met een genoomconstruct waardoor de aanmaak door een andere stimulus dan licht aangezet wordt.

Het FT gen van *Arabidopsis* is gepatenteerd voor het maken van transgenen planten met vervroegde of verlate bloei, indien het gen tot overexpressie wordt gebracht in een plant of indien de expressie wordt uitgeschakeld (patent US 6713663). Dergelijke patenten zijn er ook gevonden bij andere genen die de aanleg van bloem en meristeem bepalen, zoals SVP (20080263726). In dergelijke patenten worden ook vaak sequenties geclaimd van andere organismen met een zekere mate van homologie met het gepatenteerde gen (minstens 90% homologie, minstens 80% homologie etc). Met deze claims dient rekening te worden gehouden.

#### Ad5. De kennis rond de genetische achtergrond van Junidragers versis doordragers

Er wordt vaak veredeld met 'everbearing' (doordragende) genotypes omdat deze ook in de herfst nog vruchten kunnen produceren onder natuurlijke teeltcondities. Maar binnen deze groep van doordragende cultivars zijn er een aantal variaties. Sterk doordragende variëteiten zullen vaak een arbeidsintensieve teelt en pluk vergen, zeker om de vegetatieve groei te onderdrukken. Zwakke doordragers kunnen daarentegen een onstabiele productie hebben. Er is studie verricht om eigenschappen te identificeren die een onderscheid kunnen maken tussen sterke en zwakke doordragers (Honjo et al, 2011). Tijdstip van eerste bloei datum en het aantal bladeren tussen voorjaar en zomer bloeiwijzen gaven een relatie met de sterkte van het doordragers karakter.

Mouhu et al. (2009) hebben gen expressie analyse verricht zowel op SD en LD planten. Genen als PFT1 en SPY 1, belangrijke genen voor de bloei-inductie, zijn hierbij in het bank van de EB geïdentificeerd en niet in de SD genotype.

De studie van Iwata et al. (2011) heeft bij *F. vesca* vastgesteld dat de verschillen tussen continu bloeiers (doordragers) en eenmalige bloeiers (June bearing) door het Terminal Flower 1 gen bepaald wordt. Het is daarom mogelijk dat bij de cultuuraardbei juist in dit gen verschillende mutaties zijn, waardoor er allerlei tussenvormen ontstaan. Nieuwe genotypen zouden dus met behulp van sequencing van dit gen, aangevuld met gen expressie analyse, geïdentificeerd kunnen worden.

## 7 Conclusies

Er is geruime kennis omtrent de regulatie van de balans tussen vegetatieve en generatieve delen in diverse gewassen. Er is daarbij een geruime mate van overeenkomst gevonden tussen plantensoorten. Dit duidt erop dat deze fundamentele kennis is te vertalen naar toepassingen voor een optimale teelt of veredeling van aardbei. Bovendien zal de beschikbaarheid van de sequentie van het *F. vesca* genoom dit onderzoek sterk vereenvoudigen.

Voor de opkweek van uitgangsmateriaal van aardbei zijn een aantal processen van belang

- De omslag van vegetatieve groei naar generatieve groei
- De aanleg en spreiding van trossen
- Het in de semi-rust gaan van de plant en daaraan gekoppeld het optimale rooimoment

Een juiste bepaling van het moment van omslag kan voorkomen dat te lang gewacht wordt met het bijmesten voor trossaanleg, wat de productie vermindert. Anderzijds kan het ook voorkomen dat te vroeg wordt begonnen met bijmesten wat de omslag vertraagt hetgeen ook productie kost. Daarnaast zal rekening moeten worden gehouden met de grote variatie die optreedt tussen planten. Er is dus niet één moment van omslag, maar een periode waarin alle planten ‘omgaan’. Door kennis omtrent het onderliggende mechanisme kan het moment van omslag waarschijnlijk vroegtijdig bepaald worden. Dit geeft wellicht ook de mogelijkheid een uniformere partij aardbeiplanten te produceren.

Door de onderliggende mechanismen te bestuderen kan mogelijk ook de tros- en bloemaanleg beter beïnvloed worden. Ideaal gezien zou het mogelijk moeten zijn om op aantal trossen en spreiding te sturen. Weersinvloeden zullen hier echter een cruciale rol spelen.

Aardbeiplanten (wachtbed & tray) worden 3 tot 8 maanden bewaard. Tijdens de bewaring gaat de kwaliteit van het plantmateriaal langzaam achteruit, zelfs als het bewaarproces op zich goed verloopt. Hoe beter de kwaliteit van de plant die de bewaring ingaat des te beter zal de kwaliteit zijn aan het einde van de bewaarperiode. Voor een goede bewaring is het noodzakelijk dat de aardbeiplanten in semi-rust verkeren. Door een toets te ontwikkelen die deze toestand kan bepalen kan objectief vastgesteld worden welke partij planten op welk moment geschikt is om geroid te worden. Mogelijk zal zelfs een voorspelling over de bewaarheid kunnen worden gedaan.

Plant materiaal wordt met de gesuggereerde methoden in een betere conditie, hetgeen een grote betrouwbaarheid geeft aan de partijen, verkopers, kopers en de uiteindelijke productie. Belangrijke beslissingen tijdens de productie, zoals nutriënten giften, rooien, de selectie prepareren voor vroege productie, etc. zijn dan beter te nemen. Hierbij dient alleen aan het uitgangsmateriaal te worden gedacht. Ook tijdens de productie kan met de juiste moleculaire en fysiologische toetsmethoden een schatting worden gemaakt van de balans tussen blad en knoppen, waarschijnlijk ver voordat het fenotypisch aan de plant is te zien. Moleculaire toetsen zullen dus worden uitgevoerd in een lab. De teler kan zelf een monster van het materiaal nemen en dat monster per post naar een lab sturen. Met de huidige technieken kan het antwoord van de analyse met bijbehorend advies binnen 2 dagen bij de teler terug zijn.

Een bredere toepassing van de kennis is ook denkbaar. Te denken valt bijvoorbeeld aan een toepassing met het FT eiwit als een bloeihormoon. Mogelijk is hiermee het moment van trosaanleg te sturen, en kan daarmee de spreiding in de plant en tevens het aantal trossen per plant worden verminderd. Ook kan de expressie van genen gebruikt worden om gericht te zoeken naar de condities, bijvoorbeeld licht, die de balans in de gewenste richting kunnen sturen. En natuurlijk kan de kennis gebruikt worden voor het ondersteunen van de veredeling want een goede aardbeiplant begint bij een goed ras.

## Literatuur

- Aharoni A. and O'Connell A.P. 2002. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. Exp. Bot.* 53: 2073-2087.
- Ahmad M. and Cashmore A.R. 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 336: 162-166.
- Albani M.C. Battey N.H. and Wilkinson M.J. 2004. The development of ISSR-derived SCAR markers around SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theor. Appl. Genet.* 109: 571-579.
- Bradford E., Hancock J.F. en Warner R.M. 2010. Interactions of temperature and photoperiod determine expression of repeat flowering in strawberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135(2); 102-107.
- Bringhurst R.S. and Voth V. 1978. Origin and evolutionary potentiality of the day-neutral trait in octoploid *Fragaria*. *Genetics* 90:510.
- Brown T. and Wareing P.F. 1965 The genetical control of the everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica* 14:97-112.
- Carvalho R.F., Takaki M. and Azevedo R.A. 2011. Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiol Plant* 33: 241-248.
- Chailakhyan, M.K. 1985. "Hormonal regulation of reproductive development in higher plants". *Biologia Plantarum* 27 (4-5): 292-302.
- Chen M., Chory J. and Frankhauser C. 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38: 87-117.
- Coen E.S. en Meyerowitz E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Darrow G.M. 1936. Interrelation of temperature and photoperiod in the production of fruit-buds and runners in the strawberry. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 34:360-363.
- Darrow G.M. en Waldo G.F. 1934. Responses of strawberry varieties and species to duration of the daily light period. U.S. Dept. Agr. Tech. Bul. 453.
- Doğramacı M, Horvath DP, Chao WS, Foley ME, Christoffers, MJ, Anderson JV 2010. Low temperatures impact dormancy status, flowering competence, and transcript profiles in crown buds of leafy spurge. *Plant Mol Biol* 73:207-226
- Durner E.F., Barden J.A., Himelrick D.G. en Poling E.B. 1984. Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, Junebearing, and everbearing strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:396-400.
- Guttridge, C.G. 1969. *Fragaria*. In: *The Induction of Flowering* (Evans L.T., ed.), MacMillan, Melbourne, pp. 247-267. Guttridge, C.G. 1985. *Fragaria x ananassa*. In: *CRC Handbook of Flowering*, Vol. III (Halevy A., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 16-33.
- Guttridge en Thompson, 1959. Effect of gibberellic acid on length and number of epidermal cells in petioles of strawberry. *Nature* 183, Issue: 4655, Pages: 197-198
- Hancock and Luby, 1993. Genetic resources at our doorstep: The wild strawberries. *Bioscience* 43: 141-147.

- Hayama R., Izawa T., Shimamoto K. 2002. Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol* 43: 494-504.
- Hayama R., Yokoi S., Tamaki S., Yano M en Shimamoto K. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422: 719-722.
- Hoffmann T.G., Kalinowski G., Schwab W (2006) RNAi induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J* 48:818-826.
- Horvath DP, Sung S, Kim D, Chao W, Anderson J. 2010. Characterization, expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX genes from leafy spurge. *Plant Mol Biol.* 73(1-2):169-79.
- Hsu CY, Adams JP, Kim H, No K, Ma C, Strauss SH, Drnevich J, Vandervelde L, Ellis JD, Rice BM, Wickett N, Gunter LE, Tuskan GA, Brunner AM, Page GP, Barakat A, Carlson JE, DePamphilis CW, Luthe DS, Yuceer C. 2011. FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(26):10756-61.
- Hummer K.E., Nathewet P. en Yanagi T. 2009. Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 96(3): 713-716.
- Hytönen T, Elomaa P, Moritz T, Junttila O. 2009. Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *BMC Plant Biology* 9:18. doi:10.1186/1471-2229-9-18
- Ishikawa R., Aoki M., Kurotani K., Yokoi S., Shinomura T., Takano M. en Shimamoto K. 2011. Phytochrome B regulates *Heading date 1 (Hd1)*-mediated expression of rice florigen *Hd3a* and critical day length in rice. *Mol Genet Genomics* 285: 461-470.
- Izawa T., Oikawa T., Sugiyama N., Tanisaka T., Yano M en Shimamoto K 2002. Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering in rice. *Genes Dev* 16: 2006-2020.
- Iwata H, Gaston A, Remay A, Thouroude T, Jeauffre J, Kawamura K, Oyant LH, Araki T, Denoyes B, Foucher F. 2012. The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant J.* 69(1):116-25.
- Kobayashi Y. en Weigel D. 2007. Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev* 21: 2371-2384.
- Kojima S., Takahashi Y., Kobayashi Y., Monna L, Sasaki T., Araki T en Yano M. 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant and Cell Physiol* 43: 1096-1105.
- Kojima S., Shingle D.L. en Green C.B. 2011. Post-transcriptional control of circadian rhythms. *Journal of Cell Science* 124 (3):311-320.
- Koornneef M., Rolff E. and Spruit C.J.P. 1980. Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Pflanzenphysiol Bd* 100: 147-160

- Kotoda N., Wada M., Komori S., Kidou S., Abe K., Masuda T. and Soejima J. 2000. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes LEAFY and AP1 during flower development in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 398-403.
- Krizek B.A. en Fletcher J.C. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature reviews.* 6: 688-697.
- Larson, K.D. 1994. Strawberry. In: *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. Volume I, Temperate Crops* (Schaffer B, and Anderson P.C., Eds). CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 271-297.
- Laurie RE, Diwadkar P, Jaudal M, Zhang L, Hecht V, Wen J, Tadege M, Mysore KS, Putterill J, Weller JL, Macknight RC. 2011. The Medicago FLOWERING LOCUS T homolog, MtFTa1, is a key regulator of flowering time. *Plant Physiol.* 156(4):2207-24.
- Lee H., Suh S.S., Park E., Cho E., Ahn J.H., Kim S.G., Lee J.S., Kwon Y.M. en Lee I. 2000. The *AGAMOUS-LIKE 20 MADS* domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes and development* 14: 2366-2376.
- Lee J. en Lee I. 2010. Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* 61(9): 2247-2254.
- Li J, Li Y, Shen S, An L. 2010. Involvement of brassinosteroid signals in the floral-induction network of Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 61: 4221-4230.
- Lin C. 2000. Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiology* 123: 39-50.
- Lin C., Yang H., Guo H., Mockler T., Chen J. and Cashmore A.R. 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2686-2690.
- Martin T., Hu M., Labbé H., McHugh S., Svircev A. Miki B. 2006. *PpAG1*, a homolog of *AGAMOUS*, expressed in developing peach flowers and fruit. *Canadian Journal of Botany* 84: 767-776.
- McWatters H.G. en Devlin P.F. 2011. Timing in plants – A rhythmic arrangement. *FES letters* 585: 1474-1484.
- Morishita, M. and Yamakawa, O. 1991. Varietal differences in the sensitivity to short-day and low temperature treatment in June-bearing strawberry cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60: 539-546.
- Mouhu K, Hytönen T, Folta K, Rantanen M, Paulin L, Auvinen P, Elomaa P. 2009. Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biol.* 9: 122 doi:10.1186/1471-2229-9-122.
- Notaguchi, Michitaka; Mitsutomo Abe, Takahiro Kimura, Yasufumi Daimon, Toshinori Kobayashi, Ayako Yamaguchi, Yuki Tomita, Koji Dohi, Masashi Mori, Takashi Araki 2008) Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* 49(11):1645-58.
- Parcy F. 2005. Flowering: a time for integration. *Intern. Journal of Development Biology* 49: 585-593.
- Pruneda-Paz J.L. en Kay S.A. 2010. An expanding universe of circadian networks in higher plants. *Trends in Plant Science* 15 (5): 259-265.

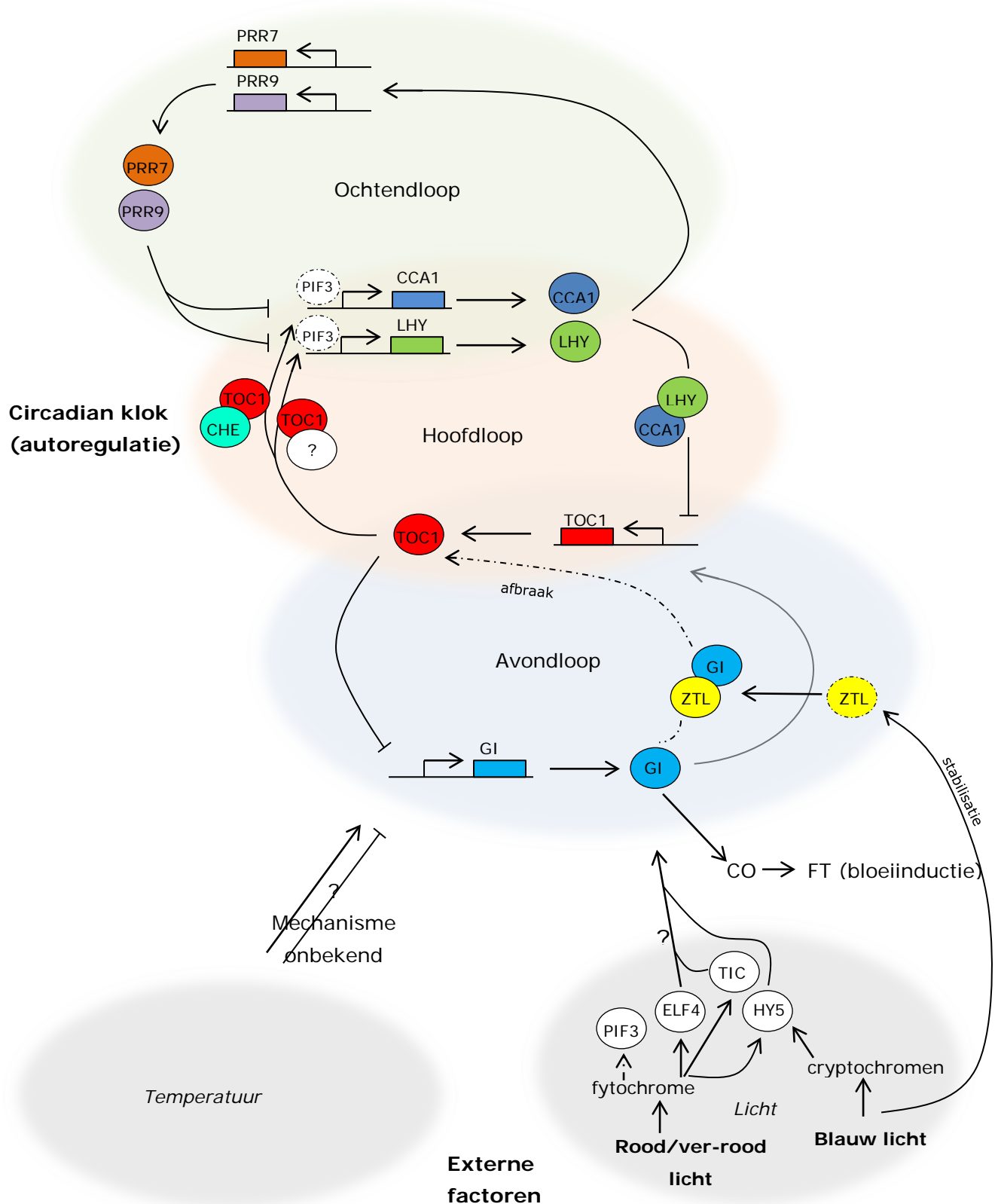
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. 1995. The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*. 80(6):847-57.
- Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., Xu Y. and Wagner D. 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675-680.
- Rosin M.F., Aharoni A.S., Salentijn E.M.J., Schaart J.G., Boone M.J. and Hannapel D.J. 2003. Expression patterns of a putative homolog of *AGAMOUS*, *STAG1*, from strawberry. *Plant Science* 165: 959-968.
- Serçe, S. en Hancock J.F. 2005. Inheritance of day-neutrality in octoploid species of *Fragaria*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130:580–584.
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, et al 2011 The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet.* 43(2):109-16.
- Sønsteby A. en Heide O.M. 2008. Flowering physiology of populations of *Fragaria virginiana*. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 83: 641–647.
- Sønsteby, A. and Nes, A. 1998. Short days and temperature effects on growth and flowering in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *J. Hort. Sci. and Biotech.* 73:730-736.
- Stewart PJ, Folta KM. 2010. A review of photoperiodic flowering research in strawberry (*Fragaria* spp.). *Critical Reviews in Plant Science* 29: 1–13.
- Sullivan J.A. and Deng X.W. 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol.* 260: 289-297.
- Sugimoto T, Tamaki K, Matsumoto J, Yamamoto Y., Shiwaku K. and Watanabe K. 2005. Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. *Plant breeding* 124: 498-501.
- Tani E., Polidoros A.N. and Tsiftaris A.S. 2007. Characterization and expression analysis of *FRUITFULL*- and *SHATTERPROOF*-like genes from peach (*Prunus persica*) and their role in split-pit formation. *Tree. Physiology* 27: 649-659.
- Taylor DR. 2002. The physiology of flowering in strawberry. *Acta Hort.* 567: 245-251.
- Thomas B. and Vince-Prue D. 1997. *Photoperiodism in Plants*. Academic Press, New York.
- Turck F, Fornara F, Coupland G. 2008. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol.* 59:573-94.
- Yano M., Katayose Y., Ashikari M., Yamanouchi U., Monna L., Fuse T., Baba T., Yamamoto K., Umehara Y., Nagamura Y., Sasaki T. 2000. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2484.
- Zeevaart, J.A.D. (2007). "FT Protein, not mRNA, is the Phloem-Mobile Signal for Flowering". *Plant Physiology Online*. <http://4e.plantphys.net/article.php?ch=&id=398>



## Bijlage 1

### Het moleculaire mechanisme achter de Circadian klok (Arabidopsis)

De circadian klok voor *A. thaliana* bestaat uit 3 in elkaar gehaakte feedback loops, bestaande uit de hoofdloop en de ochtend- en avondloop, waarin eiwitten hun eigen regulatie (autoregulatie) regelen.



Figuur 13: de invloed van externe factoren, zoals licht en temperatuur op de moleculaire regulatie van de circadian klok in *A. thaliana*.

De gehele klok wordt dagelijks gereset door externe factoren, zoals licht en temperatuur, om de klok gelijk te laten lopen aan de seizoenen. Lichtregulatie vindt plaats via de verschillende fotoreceptoren, de fytochroom- en cryptochroomreceptoren. Hoe dagelijkse temperatuurschommelingen worden waargenomen en gereguleerd is nog niet bekend.

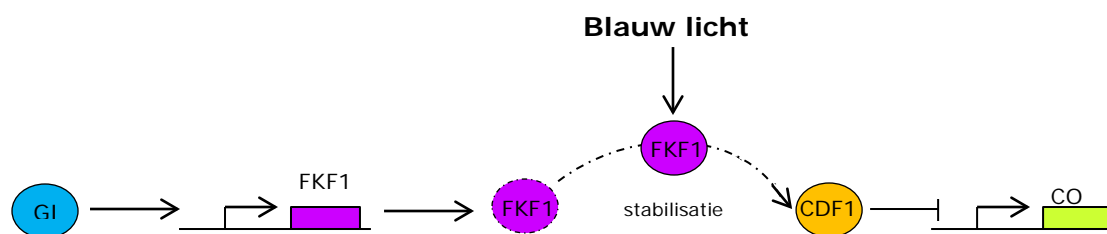
De hoofdloop bestaat uit twee negatieve regulatoren, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) en LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), en een positieve regulator TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1). CCA1 en LHY reguleren de expressie van TOC1 via inhibitie. De eiwitproductie van CCA1 en LHY neemt toe in de ochtend. Tegen de middag en avond worden deze twee eiwitten gefosforyleerd door caseïne kinases en afgebroken waardoor de eiwitexpressie van TOC1 op gang komt. TOC1 bevordert op dat moment, via een TOC1-CHE complex de expressie van CCA1 en via een nog onbekend TOC1-complex de expressie van LHY, waardoor de loop gesloten is (figuur 13).

De eiwitexpressie van CCA1 en LHY welke in de ochtend op gang komt is vervolgens negatief gereguleerd door PSEUDORESPONSE REGULATOR 7 EN 9 (PRR7 EN PRR9) in de zogenoemde ochtendloop. De avondloop reguleert de eiwitexpressie van TOC1 via GIGANTEA (GI). GI stimuleert de eiwitproductie van TOC1 maar wordt zelf geremd door TOC1.

Hoe de invloed van fytochroomreceptoren en cryptochroomreceptoren precies verloopt is nog niet bekend. Wel is bekend dat de ochtendexpressie van ACC1 en PHY lichtafhankelijk is. Zowel ACC1 als PHY bezitten een G-box bindingsplaats voor het eiwit PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3). PIF3 zou zich aan de ACC1/PHY promoter kunnen hechten wanneer het donker is en hierdoor het op gang komen van de eiwitproductie kunnen voorkomen. PIF3 wordt door licht geactiveerd fytochroom (PHYB?) afgebroken waardoor ACC1 en PHY eiwitproductie in de ochtend weer op gang zou kunnen komen. Dit mechanisme is echter nog niet bewezen. Ook ELONGATED HYPOCOTYL (HY5), TIME FOR COFFEE (TIC) en EARLY FLOWERING 3 en 4 lijken een rol te spelen in de signaleringsroute van de fotoreceptoren maar hoe dit precies plaatsvindt en welke invloed deze eiwitten uitoefenen op de aansturing van de circadian klok wordt nog onderzocht.

Bloei wordt, in LD planten gereguleerd door CO. Het klokeiwit GI stimuleert de productie van CO welk eiwit alleen lichtstabiel is. Omdat het CO gen alleen laat op de dag actief is (aangestuurd door het ritme van de circadian klok) kan het eiwit alleen gestabiliseerd worden als de dag lang genoeg is en PHYA en CRY1/CRY2 nog geactiveerd kunnen worden door het rode/blauwe licht. Tijdens SD-omstandigheden komt het CO gen te laat tot expressie en wordt het eiwit in het donker afgebroken. Hoe het eiwit CO gestabiliseerd wordt is nog niet geheel duidelijk. Aangenomen wordt dat het FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX PROTEIN 1 (FKF1) aan CDF1 (CYCLING DOF FACTOR), een inhibitor van CO, bindt en hiermee de eiwitproductie op gang brengt.

FKF1 is een klok-gen en wordt zowel door de circadian klok als door extern licht aangestuurd. Het FKF1 eiwit wordt tegen de avond geproduceerd en moet door blauw licht geactiveerd worden om aan CDF1 te kunnen binden (figuur 14).



Figuur 14: de gezamenlijke invloed van de circadian klok en fotoperiode op de expressie van CO.

Wanneer CO stabiel blijft is het in staat om de eiwitexpressie van FT te stimuleren, welke cruciaal is voor bloeiïnductie. Het is niet uitgesloten dat FT, naast CO, ook direct door FKF1 gestimuleerd kan worden (reviews Pruneda-Paz en Steve 2010, McWatters en Devlin 2011, Kojima *et al* 2011 en de daarin vermelde referenties en figuren).

## Bijlage 2.

Enkele van de relevante patenten op het gebied van gebruik van bloemgenen

**Publication Number:** [Order PDF US6713663B2](#)

**Title:** Flowering locus T (FT) and genetically modified plants having delayed flower development

**Title - DWPI:** New flowering locus T polypeptide that regulates flowering time, particularly used to accelerate flowering

**Assignee/Applicant:** The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA

**Priority Date:** 1998-04-15 | 2001-04-30

**Publication Date:** 2004-03-30

### **Abstract:**

The present invention provides a gene, termed "FT" for flowering locus T, and a polypeptide encoded by FT that modulates flower development in plants. FT is useful in methods of the invention for producing genetically modified plants characterized as having the phenotypic trait of modulated flower development, for example early or delayed flowering. Such plants can be genetically modified by nucleic acids encoding functional FT peptides; at least one antisense nucleic acid for FT; a structural gene that encodes wild-type FT polypeptide; or a structural gene that encodes dominant negative polypeptides, for example, in order to modulate flowering in the plant.

### **Abstract - DWPI Novelty:**

A purified flower locus T (FT) polypeptide (I) is new.

### **Abstract - DWPI Detailed Description:**

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: an isolated nucleic acid (II) encoding (I); a recombinant expression vector (V1) containing (II); host cells containing this vector; an antibody (Ab) that binds to (I) or its antigenic fragments; genetically modified plants (III) having, in the genome, at least one exogenous nucleic acid containing an FT-encoding sequence and characterized by

modulated flower development; cells or tissue from, and seeds that develop into, these plants; genetically modified plant (IV) in which a transgene disrupts, or interferes with, expression of an FT gene, integrated into the plant genome; a method for producing (IV); a 814 bp antisense sequence (3); and method for identifying compounds (A) that affect FT activity or expression.

**Abstract - DWPI Activity:**

Plant growth regulating.

**Abstract - DWPI Mechanism:**

None given.

**Abstract - DWPI Use:**

Modulation of (I) activity and/or expression is used to delay or accelerate flowering time (claimed) in a wide range of mono- or dicotyledonous plants. Specifically to accelerate flowering, FT activity or expression is increased, optionally also LFY activity or expression (claimed). To delay flowering, FT activity or expression is inhibited, e.g. using an FT antisense or dominant-negative sequence, or by gene disruption, and/or TFL1 activity or expression is increased (claimed). Nucleic acid (II) that encodes (I) is used for recombinant production of (I) (claimed) and as source of antisense, ribozyme or triplex-forming sequences. (I) can also be used to raise antibodies and to screen for modulators or cellular binding proteins (claimed).

**Abstract - DWPI Advantage:**

Flowering can now be controlled or induced, regardless of geographical situation or environmental conditions, permitting production of crops at any time of the year.

**Publication Number:** [Order PDF](#) [WO1997010339A1](#)

**Title:** FLOWERING GENES | GENES DE FLORAISON

**Title - DWPI:** Antirrhinum majus centroradialis gene and Arabidopsis homologue, Tfl1 control switching of apical meristem to floral fate, useful in plant hybridisation and in control of growing season

**Assignee/Applicant:** JOHN INNES CENTRE,GB

**Priority Date:** 1995-09-13 | 1996-09-13

**Publication Date:** 1997-03-20

**Abstract:**

The cen gene of Antirrhinum has been cloned, also homologues from Arabidopsis (tfl1) and rice. Flowering characteristics of transgenic plants, especially switching of apical meristem to a floral fate and the timing of flowering, may be manipulated by regulating gene expression. The promoter of the cen gene may be used to drive tissue-specific expression, specifically in the apical meristem of plants.

On a réalisé le clonage du gène cen d'Antirrhinum ainsi que d'homologues d'Arabidopsis (tfl1) et du riz. Les caractéristiques de floraison de plantes transgéniques, notamment le passage du méristème apical au devenir floral et le moment de la floraison, peuvent être manipulées par régulation de l'expression génique. Le promoteur du gène cen peut être utilisé pour induire une expression propre à un tissu, spécifiquement dans le méristème apical des plantes.

**Abstract - DWPI Novelty:**

A nucleic acid isolate (I) having a nucleotide coding for a polypeptide (A) which includes the 181 amino acid residue sequence (the centroradialis (CEN) protein of Antirrhinum majus) given in the specification is claimed.

**Abstract - DWPI Use:** USE

The product of (I), its Arabidopsis homologue, or antisense sequences, influence flowering characteristics which include the switching of apical meristem to a floral

fate. The variant product has the ability to inhibit/promote the switching of apical meristem to a floral fate. The variant also has the ability to alter the timing of flowering, either advancing or delaying the flowering in a plant (all claimed). Antibodies against the polypeptides are useful in identification and/or isolation of homologous polypeptides, and then the encoding genes. Probes derived from the nucleotide sequences are also useful in the identification/isolation of homologues. Control of the genes can be used to ensure synchronous flowering of male and female parent lines in hybrid production. Another use is to advance or retard the flowering in accordance with the climate so as to extend or reduce the growing season.

**Publication Number:** [Order PDF WO1997046077A1](#)

**Title:** SEED PLANTS EXHIBITING EARLY REPRODUCTIVE DEVELOPMENT AND METHODS OF MAKING SAME | PLANTES A SEMENCES PRESENTANT UN DEVELOPPEMENT REPRODUCTIF PRECOCE ET LEURS PROCEDES DE PRODUCTION

**Title - DWPI:** Transgenic plant comprising an ectopically expressed floral meristem gene for promoting early reproductive development and controlling the time of seed-derived crop harvest(s) in e.g. grapes, beans, corn, wheat, etc

**Assignee/Applicant:** THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA,US

**Priority Date:** 1996-06-05

**Publication Date:** 1997-12-11

**Abstract:**

The present invention provides a non-naturally occurring seed plant such as a transgenic angiosperm or gymnosperm that contains an ectopically expressible nucleic acid molecule encoding a floral meristem identity gene product. The invention further provides a method of converting shoot meristem to floral meristem in an

angiosperm by ectopically expressing a floral meristem identity gene product in the angiosperm. In addition, the invention provides a method of promoting early reproductive development in a seed plant by ectopically expressing a floral meristem identity gene product in the seed plant.

**Abstract - DWPI Novelty:**

A non-naturally occurring seed plant comprising a first ectopically expressible nucleic acid encoding a first floral meristem identity gene product, is new, provided that the first nucleic acid is not ectopically expressed due to a mutation in an endogenous TERMINAL FLOWER gene. Also new is a method of converting shoot meristem to floral meristem, especially in order to promote early reproductive development, in an angiosperm, comprises introducing a first ectopically expressible nucleic acid molecule encoding a first floral meristem identity gene product into the angiosperm.

**Abstract - DWPI Use: USE**

Ectopic expression of the floral meristem gene product in the shoot meristem tissue of the transgenic plant, allows selection of the time of seed development in the plant which can be useful for manipulating the time of crop harvest in seed-derived crops such as grapes, beans, corn, wheat, rice, hop, etc., or to hasten the breeding of e.g. tree species, for insect or disease resistance.



### Bijlage 3

**BLAST analysis uitgevoerd op enkele genen waar in de study van Mouhu et al (2009) de genen in Arabidopsis nog niet of onvoldoende waren geïdentificeerd**

BLAST de FT homoloog van Mais tegen "Strawberry genome v1.0 ab initio gene proteins"

Sequences producing significant alignments: (bits)  
Value

```
>gene21482-v1.0-ab_initio | mrna21482.1-v1.0-ab_initio |  
GeneMark.hmm | 176_aa  
Length = 176
```

Score = 207 bits (528), Expect = 2e-54  
Identities = 100/159 (62%), Positives = 121/159 (76%), Gaps = 1/159 (0%)

```
Query: 5 DHLVMARVIQDVLDPFTPTIPLRITYNNRLLLPSAELKPSAVVSKPRVDIGGSDMRAFYT 64  
D LV+ RVI DVLDPFT ++ LR+TY ++ + ELKPS VVS+PRVDIGG D+R FYT  
Sbjct: 6 DPLVVGRVIGDVLDPFTKSVSLRVTYTSKEVNNGCELKPSQVVSQPRVDIGGEDLRTFYT 65
```

```
Query: 65 LVLIDPDAPSPSHPSLREYLHWMVTDIPETTSVNFQELIFYERPDRSGIHRFLVFLFR 124  
LV++DPDAPSPS P+L+EYLHW+VTDIP T FGQE++ YE P P +GIHR +FVLFR  
Sbjct: 66 LVMVDPDAPSPSDPNLKEYLHWLVTDIPATAGAVFGQEIVCYESPRPTAGIHRFLVFLFR 125
```

```
Query: 125 QLGRGTVFAPEMRHNFNCRSFARQYHL-SIATATHFNCQ 162  
QLGR TV+AP R NFN R FA Y+L S A +FNCQ  
Sbjct: 126 QLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGSPVAAVYFNCQ 164
```

```
>gene28920-v1.0-ab_initio | mrna28920.1-v1.0-ab_initio |  
GeneMark.hmm | 179_aa  
Length = 179
```

Score = 205 bits (522), Expect = 1e-53  
Identities = 98/160 (61%), Positives = 123/160 (76%), Gaps = 2/160 (1%)

```
Query: 5 DHLVMARVIQDVLDPFTPTIPLRITY-NNRLLLPSAELKPSAVVSKPRVDIGGSDMRAFY 63  
D LV++RVI D+++PFT ++ LR+TY NNR +ELKPS VV +PRVDIGG D+R FY  
Sbjct: 8 DALVVS RVIGDII EPFTKSVSLRMTYINNREF TNGSELKPSHVHRPRVDIGGDDL RNFY 67
```

```
Query: 64 TLVLIDPDAPSPSHPSLREYLHWMVTDIPETTSVNFQELIFYERPDRSGIHRFLVFLFR 123  
TL+++DPDAP+PS P+L+EYLHW+VTDIP TT +FGQE++ YE P P GIHR V VL+  
Sbjct: 68 TLIMVDPDAPNPSEP NLKEYLHWLVTDIPATTGASFGQEIVSYESPRPAMGIHRFVSVLY 127
```

```
Query: 124 RQLGRGTVFAPEMRHNFNCRSFARQYHL-SIATATHFNCQ 162  
RQLGR TV+APE R NFN R FA Y+L S A +FNCQ
```

Sbjct: 128 RQLGRKTVYAPEWRQNFNTRKFAENYNLGPVAAVYFNCQ 167

>gene04645-v1.0-ab\_initio | mrna04645.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 177\_aa  
Length = 177

Score = 200 bits (509), Expect = 3e-52  
Identities = 98/158 (62%), Positives = 119/158 (75%), Gaps = 2/158 (1%)

Query: 7 LVMARVIQDVLDPFTPTIPLRITY--NNRLLLPSAELKPSAVVSKPRVDIGGSDMRAFYTL 65  
LV+ RVI DV++PFT ++ LR+TY NNR + ELKPS V+++PRV IGG D+R FYTL  
Sbjct: 10 LVVGRVIGDVIEPFTKSVSLRMTYSNNREVTSGCELKPSHVINRPRVQIGGDDLRFNYTL 69

Query: 66 VLIDPDAPSPSHPSLREYLHWMVTDIPETTSVNFGQELIFYERPDPDRSGIHRLVFLFRQ 125  
V++DPDAPSPS P+L+EYLHW+VTDIP TT +FGQE++ YE P P GIHR V VLFRQ  
Sbjct: 70 VMVDPDAPSPSDPNLKEYLHHLVTDIPATTGASFGQEIVSYESPRPSIGIHRFVSVLFRQ 129

Query: 126 LGRGTVFAPEMRHNFNCRSFARQYHL-SIATATHFNCQ 162  
LGR TV+AP R NFN R FA Y+L S A FNCQ  
Sbjct: 130 LGRQTVYAPGWRQNFNTREFAENYNLGPVAAVFFNCQ 167

>gene13254-v1.0-ab\_initio | mrna13254.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 171\_aa  
Length = 171

Score = 167 bits (422), Expect = 4e-42  
Identities = 83/160 (51%), Positives = 111/160 (69%), Gaps = 4/160 (2%)

Query: 7 LVMARVIQDVLDPFTPTIPLRITYN--NRLLLLPSAELKPSAVVSKPRVDIGGSDMRAFYT 64  
L + RV+ +V+D FTP++ + + Y+ N+ + E+ PS + +KPRVDIGG DMRA YT  
Sbjct: 4 LTLGRVVGEVDMFTPSVKMNVVYSSCNKQVSNHGHEIMPSVIAAKPRVDIGGEDMRAAYT 63

Query: 65 LVLIDPDAPSPSHPSLREYLHWMVTDIPETTSVNFGQELIFYERPDPDRSGIHRLVFLFR 124  
L++ DPD PSPS P LRE+LHWMVTDIP TT V+FG+E++ YE P P GIHR VF+LF+  
Sbjct: 64 LIMTDPDYSPSDPCLREHLHWMVTDIPGTTDVSFGREVVEYETPKPVVGIHRYVFLLFQ 123

Query: 125 QL-GRGTVFAPEMRHNFNCRSFARQYHLSI-ATATHFNCQ 162  
Q GR TV P R NFN R F+++ L + A +FN Q  
Sbjct: 124 QTRGRQTVRVPASRDNFNTRKFSQENSLGLPVAAVYFNAQ 163

EST BLAST via nucleotide sequentie levert niet snel iets op. Te kleine E-values om serieus op in te gaan.

---

BLAST query met Hd3a [Oryza sativa Japonica Group].  
ACCESSION BAB61030  
VERSION BAB61030.1 GI:14517624  
DBSOURCE accession [AB052944.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB052944.1)

magsgrdrdp lvvgrvvgdv ldafvrstnl kvtygsktvs ngcelkpsmv thqprvevggndmrtfytlv  
mvdpdapsps dpnlreylhw lvt dipgta asfgqevmcy esprptmgihrflvflvqql grqtvyapgw  
rqnfntkdafa elynlgspva avyfnqrea gsggrrvyp

<http://www.rosaceae.org/bio/>

BLAST de FT homoloog van rijst tegen "Strawberry genome v1.0 ab initio gene proteins"

```
>gene21482-v1.0-ab_initio | mrna21482.1-v1.0-ab_initio |  
GeneMark.hmm | 176_aa  
Length = 176
```

Score = 275 bits (702), Expect = 1e-74  
Identities = 125/153 (81%), Positives = 139/153 (90%)

```
Query: 24 FVRSTNLKVITYGSKTVSNGCELKPSMVTHQPRVEVGGNDMRTFYTLVMVDPDAPSPSDPN 83  
F +S +L+VTY SK V+NGCELKPS V QPRV++GG D+RTFYTLVMVDPDAPSPSDPN  
Sbjct: 21 FTKSVSLRVITYTSKEVNNGCELKPSQVVSQPRVDIGGEDLRTFYTLVMVDPDAPSPSDPN 80
```

```
Query: 84 LREYLHHLVTDIPGTTAASFGQEVMCYESPRPTMGIHRLVFLVLFQQLGRQTVYAPGWRQN 143  
L+EYLHHLVTDIP T A FGQE++CYESPRPT GIHR +FVLF+QLGRQTVYAPGWRQN  
Sbjct: 81 LKEYLHHLVTDIPATAGAVFGQEIVCYESPRPTAGIHRFLVFLFRQLGRQTVYAPGWRQN 140
```

```
Query: 144 FNTKDFAEYLNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGRR 176  
FNT+DFAEYLNLGSPVAAVYFNCQRE+GSGGRR  
Sbjct: 141 FNTRDFAEYLNLGSPVAAVYFNCQRESGSGGRR 173
```

```
>gene04645-v1.0-ab_initio | mrna04645.1-v1.0-ab_initio |  
GeneMark.hmm | 177_aa  
Length = 177
```

Score = 254 bits (649), Expect = 2e-68  
Identities = 116/155 (74%), Positives = 141/155 (90%), Gaps = 1/155 (0%)

```
Query: 24 FVRSTNLKVITYGS-KTVSNGCELKPSMVTHQPRVEVGGNDMRTFYTLVMVDPDAPSPSDP 82  
F +S +L+++TY + + V++GCELKPS V ++PRV++GG+D+R FYTLVMVDPDAPSPSDP  
Sbjct: 23 FTKSVSLRMTYSNNREVTSGCELKPSHVINRPRVQIGDDLRFNYTLVMVDPDAPSPSDP 82
```

```
Query: 83 NLREYLHHLVTDIPGTTAASFGQEVMCYESPRPTMGIHRLVFLVLFQQLGRQTVYAPGWRQ 142  
NL+EYLHHLVTDIP TT ASFGQE++ YESPRP++GIHR V VLF+QLGRQTVYAPGWRQ  
Sbjct: 83 NLKEYLHHLVTDIPATTGASFGQEIVSYESPRPSIGIHRFVSVLFRQLGRQTVYAPGWRQ 142
```

```
Query: 143 NFNTKDFAEYLNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGRRV 177  
NFNT++FAE YNLGSPVAAV+FNCQRE+GSGGRR+  
Sbjct: 143 NFNTREFAENYLNLGSPVAAVFFNCQRESGSGGRRM 177
```

```
>gene28920-v1.0-ab_initio | mrna28920.1-v1.0-ab_initio |
```

GeneMark.hmm | 179\_aa  
Length = 179

Score = 243 bits (621), Expect = 3e-65  
Identities = 111/154 (72%), Positives = 133/154 (86%), Gaps = 1/154 (0%)

Query: 24 FVRSTNLKVTY-GSKTVSNGCELKPSMVTHQPRVEVGGNDMRTFYTLVMVDPDAPSPSDP 82  
F +S +L++TY ++ +NG ELKPS V H+PRV++GG+D+R FYTL+MVDPDAP+PS+P  
Sbjct: 23 FTKSVSLRMTYINNREFTNGSELKPSHVVHRPRVDIGDDLRNFYTLIMVDPDAPNPSEP 82

Query: 83 NLREYHLHWLVTDIPGTTAASFGQEVMCYESPRPTMGIHRLVFLVLFQQLGRQTVYAPGWRQ 142  
NL+EYHLHWLVTDIP TT ASFGQE++ YESPRP MGIHR V VL++QLGR+TVYAP WRQ  
Sbjct: 83 NLKEYLHWLVTDIPATTGASFGQEIVSYESPRPAMGIHRFVSVLYRQLGRKTVYAPEWRQ 142

Query: 143 NFNTKDFAELYNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGRR 176  
NFNT+ FAE YNLGSPVAAVYFNCQRE G GGRR  
Sbjct: 143 NFNTRKFAENYNLGSPVAAVYFNCQRETGCGGRR 176

>gene13254-v1.0-ab\_initio | mrna13254.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 171\_aa  
Length = 171

Score = 187 bits (475), Expect = 3e-48  
Identities = 93/155 (60%), Positives = 114/155 (73%), Gaps = 3/155 (1%)

Query: 24 FVRSTNLKVTYGS--KTVSNGCELKPSMVTHQPRVEVGGNDMRTFYTLVMVDPDAPSPSD 81  
F S + V Y S K VSNG E+ PS++ +PRV++GG DMR YTL+M DPD PSPSD  
Sbjct: 17 FTSPVKMNVVYSSCNKQVSNNGHEIMPSVIAAKPRVDIGGEDMRAAYTLIMTDPDYPSPSD 76

Query: 82 PNLREYHLHWLVTDIPGTTAASFGQEVMCYESPRPTMGIHRLVFLVLFQQL-GRQTVYAPGW 140  
P LRE+LHW+VTDIPGTT SFG+EV+ YE+P+P +GIHR VF+LFQQ GRQTV P  
Sbjct: 77 PCLREHLHWMVTDIPGTTDVSFGREVVEYETPKPVVGIHRYVFLLFQQTRGRQTVRVPAS 136

Query: 141 RQNFNTKDFAELYNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGR 175  
R NFNT+ F++ +LG PVAAVYFN QRE + R  
Sbjct: 137 RDNFNTRKFSQENSLGLPVAAVYFNAQRETAARRR 171

>gene21936-v1.0-ab\_initio | mrna21936.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 173\_aa  
Length = 173

Score = 181 bits (458), Expect = 3e-46  
Identities = 90/153 (58%), Positives = 111/153 (72%), Gaps = 1/153 (0%)

Query: 24 FVRSTNLKVTYGS-KTVSNGCELKPSMVTHQPRVEVGGNDMRTFYTLVMVDPDAPSPSDP 82  
F S + VTY S K V NG EL PS VT +P+VEV G DMR+F+TLVM DPD P PSDP  
Sbjct: 21 FTSPVKMTVTYNSSKKVYNGHELYPSSVTVKPKVEVHGGDMRSFFTLVMTDPDVPGPSDP 80

Query: 83 NLREYHLHWLVTDIPGTTAASFGQEVMCYESPRPTMGIHRLVFLVLFQQLGRQTVYAPGWRQ 142  
L+E+LHW+VTDIPGTT +FG+EV+ YE PRP +GIHR VF+LF+Q GRQTV P +

Sbjct: 81 YLKEHLHWIVTDIPGTTDNTFGKEVVKYEMPRPNIGIHRFVFLLFKQKGRQTVIPPPSKD 140

Query: 143 NFNTKDFAEALYNLGGSPVAAVYFNCQREAGSGGR 175

+F+++ FAE G PVAAV+FN QRE + R

Sbjct: 141 HFDSRKFAETNEFGLPVAAVFFNAQRETAARRR 173

---

BLAST query met Hd3b RecName: Full=Protein HEADING DATE 3B; AltName: Full=FT-like protein 1; AltName: Full=FT-like protein B.

ACCESSION Q8VWH2

VERSION Q8VWH2.1 GI:75161185

magsgrddpl vvgrivgdvl dpfvritnls vsygarivsn gcelkpsmvt qqprvvvggndmrtfytlvm  
vdpdapspsn pnlreylhwl vtdipgttga tfgqevmcy sprptmgihrlvfvlfqqlg rqtvyapgwr  
qnfstrnfae lynlgspvat vyfncqreag sggrrvyp

<http://www.rosaceae.org/bio/>

BLAST de FT homoloog van rijst tegen "Strawberry genome v1.0 ab initio gene proteins"

Komen dezelfde resultaten uit als bij BLAST Hd3a.

BLAST query met protein FLOWERING LOCUS T [Arabidopsis thaliana].

ACCESSION AEE34381

VERSION AEE34381.1 GI:332196260

msinirdpli vsrvvgdvld pfnrsitlkv tygqrevtng ldlrpsqvqn kprveigged  
lrnfytlvmv dpdvpspsnp hlreylhwlv tdipattggt fgneivcyen psptagihrv  
vfilfrqlgr qtvyapgwrq nfntrefaei ynlgpvaav fyncqresgc grrrl

<http://www.rosaceae.org/bio/>

BLAST de FT van arabidopsis tegen "Strawberry genome v1.0 ab initio gene proteins"

>gene21482-v1.0-ab\_initio | mrna21482.1-v1.0-ab\_initio |

GeneMark.hmm | 176\_aa

Length = 176

Score = 288 bits (738), Expect = 9e-79

Identities = 130/169 (76%), Positives = 152/169 (89%)

Query: 6 RDPLIVSRVVGDVLDPFNRSITLKVTYQREVINGLDLRPSQVQNKPRVEIGGEDLRNFY 65  
RDPL+V RV+GDVLDPF +S++L+VTY +EV NG +L+PSQV ++PRV+IGGEDLR FY

Sbjct: 5 RDPLVVGVRVIGDVLDPFNRSITLKVTYQREVINGLDLRPSQVQNKPRVEIGGEDLRNFY 64

Query: 66 TLVMVDPDVPSPSNPFLREYLHHLVTDIPATTGTTFGNEIVCYENPSPTAGIHRVVFILF 125  
TLVMVDPD PSPS+P+L+EYLHHLVTDIPAT G FG EIVCYE+P PTAGIHR +F+LF

Sbjct: 65 TLVMVDPDAPSPDPNLKEYLHHLVTDIPATAGAVFGQEIVCYESPRPTAGIHRFLFVLF 124

Query: 126 RQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAEIYNLGLPVAAVFYNCQRESGCGGRR 174  
RQLGRQTVYAPGWRQNFNTR+FAE+YNLG PVAAV++NCQRESG GRR  
Sbjct: 125 RQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGSPVAAVFYNCQRESGSGGRR 173

>gene04645-v1.0-ab\_initio | mrna04645.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 177\_aa  
Length = 177

Score = 275 bits (702), Expect = 1e-74  
Identities = 126/171 (73%), Positives = 152/171 (88%), Gaps = 1/171 (0%)

Query: 6 RDPLIVSRVVGDVLDPFNRSITLKVTYQ-REVTNGLDLRPSQVQNKPRVEIGGEDLRNF 64  
++PL+V RV+GDV++PF +S++L++TY REVT+G +L+PS V N+PRV+IGG+DLRNF  
Sbjct: 7 QEPLVVGRRVIGDVIEPFTKSVSLRMTYSNNREVTSGCELKPSHVINRPRVQIGDDLRNF 66

Query: 65 YTLVMVDPDPVSPSPNPHLREYHLHWLVTDIPATTGTTFGNEIVCYENPSPTAGIHRVVFIL 124  
YTLVMVDPD PSPS+P+L+EYHLHWLVTDIPATTG +FG EIV YE+P P+ GIHR V +L  
Sbjct: 67 YTLVMVDPDAPSPDPNLKEYLHWLVTDIPATTGASFGQEIVSYESPRPSIGIHRFVSVL 126

Query: 125 FRQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAEIYNLGLPVAAVFYNCQRESGCGGRR 175  
FRQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAE YNLG PVAAVF+NCQRESG GRR+  
Sbjct: 127 FRQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAEYNYNLGSPVAAVFFNCQRESGSGGRRM 177

>gene28920-v1.0-ab\_initio | mrna28920.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 179\_aa  
Length = 179

Score = 263 bits (673), Expect = 3e-71  
Identities = 118/170 (69%), Positives = 148/170 (87%), Gaps = 1/170 (0%)

Query: 6 RDPLIVSRVVGDVLDPFNRSITLKVTY-GQREVTNGLDLRPSQVQNKPRVEIGGEDLRNF 64  
+D L+VSRV+GD+++PF +S++L++TY RE TNG +L+PS V ++PRV+IGG+DLRNF  
Sbjct: 7 QDALVVSRRVIGDIIIEPFTKSVSLRMTYINNREFTNGSELKPSHVHRPRVDIGDDLRNF 66

Query: 65 YTLVMVDPDPVSPSPNPHLREYHLHWLVTDIPATTGTTFGNEIVCYENPSPTAGIHRVVFIL 124  
YTL+MVDPD P+PS P+L+EYHLHWLVTDIPATTG +FG EIV YE+P P GIHR V +L  
Sbjct: 67 YTLIMVDPDAPNPSEPNLKEYLHWLVTDIPATTGASFGQEIVSYESPRPAMGIHRFVSVL 126

Query: 125 FRQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAEIYNLGLPVAAVFYNCQRESGCGGRR 174  
+RQLGR+TVYAP WRQNFNTR+FAE YNLG PVAAV++NCQRE+GCGGRR  
Sbjct: 127 YRQLGRKTVYAPEWRQNFNTRKFAENYNLGSPVAAVFYNCQRETGCGGRR 176

>gene21936-v1.0-ab\_initio | mrna21936.1-v1.0-ab\_initio |  
GeneMark.hmm | 173\_aa  
Length = 173

Score = 202 bits (513), Expect = 1e-52  
Identities = 97/170 (57%), Positives = 125/170 (73%), Gaps = 1/170 (0%)

Query: 5 IRDPLIVSRVVGDVLDPFNRSITLKVTYQ-REVTNGLDLRPSQVQNKPRVEIGGEDLRN 63

```

      I DPL+V RV+GDV+D F S+ + VTY ++V NG +L PS V KP+VE+ G D+R+
Sbjct: 4  ISDPLVVGRVIGDVIDCFTPSVKMTVTYNSKKVYNGHELYPSSVTVKPKVEVHGGDMRS 63

Query: 64  FYTLVMVDPDVPSPSNPHLREYHLHWLVTDIPATTGTTFGNEIVCYENPSPTAGIHRVVF 123
      F+TLVM DPDVP PS+P+L+E+LHW+VTDIP TT TFG E+V YE P P GIHR VF+
Sbjct: 64  FFTLVMTDPDVPGPSDPYLKEHLHWIVTDIPGTTDNTFGKEVVKYEMPRPNIGIHRFVFL 123

Query: 124 LFRQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAEIYNLGLPVAAVFYNCQRESGCGGR 173
      LF+Q GRQTV P + +F++R+FAE GLPVAAVF+N QRE+ R
Sbjct: 124 LFKQKGRQTVIPPPSKDHFDSRKFAETNEFGLPVAAVFFNAQRETAARRR 173

```

```

>gene13254-v1.0-ab_initio | mrna13254.1-v1.0-ab_initio |
      GeneMark.hmm | 171_aa
      Length = 171

```

```

Score = 192 bits (489), Expect = 7e-50
Identities = 94/170 (55%), Positives = 123/170 (72%), Gaps = 3/170 (1%)

```

```

Query: 7  DPLIVSRVVGDLDPFNRSITLKVITYGQ--REVTNGLDLRPSQVQNKPRVEIGGEDLRNF 64
      + L + RVVG+V+D F S+ + V Y ++V+NG ++ PS + KPRV+IGGED+R
Sbjct: 2  ETTLTLGRVVGVEVDMFTPSVKMNVVYSSCNKQVSNGHEIMPSVIAAKPRVDIGGEDMRAA 61

Query: 65  YTLVMVDPDVPSPSNPHLREYHLHWLVTDIPATTGTTFGNEIVCYENPSPTAGIHRVVFIL 124
      YTL+M DPD PSPS+P LRE+LHW+VTDIP TT +FG E+V YE P P GIHR VF+L
Sbjct: 62  YTLIMTDPDYSPSPDPCLREHLHWMVTDIPGTTDVSFGREVVEYETPKPVVGIHRYVFL 121

Query: 125 FRQL-GRQTVYAPGWRQNFNTREFAEIYNLGLPVAAVFYNCQRESGCGGR 173
      F+Q GRQTV P R NFNTR+F++ +LGLPVAAV++N QRE+ R
Sbjct: 122 FQQTRGRQTVRVPASRDNFNTRKFSQENSLGLPVAAVFYFNAQRETAARRR 171

```

**Bijlage 4. De powerpoint presentatie gegeven op gewascommissie  
bijeenkomst.**



## PT Literatuur studie

# Moleculaire kennis rond vegetatieve- generatieve plant-balans aardbei

Shanna Bastiaan-Net, Wouter van Doorn, Bert Evenhuis, Jurriaan Mes



## Aanleiding

- Plantum overleg
- Vraag uit praktijk over kennisniveau regulatie plant-balans
- Japanse literatuur die antwoord zou geven op hoe de planten beter te karakteriseren
- Plantkwaliteit objectief bepalen
- Literatuurstudie gefinancierd door Productschap Tuinbouw
  - Aanzet naar strategisch onderzoeksproject(en)



## Afbakening

- Moleculaire processen
  - Elke cel van een cultivar heeft zelfde DNA maar aan en uit staan van genen bepaald functie en fysiologische toestand
  - Sneller en meer detail dan andere plantkenmerken
- Regulatie en timing van bloeiaanleg
  - Is bloeiaanleg gestart?
  - Hoe beste te sturen tussen blad- en vruchtaanleg?
- Voltooiën aanleg bloemtros, planten in semi-rust
  - Wanneer oproeien van planten?
  - Zijn er indicatoren om semi-rust te bepalen?
- Productie potentie
  - Aantal bloemmeristemen / stelen, en aantal bloemen per steel
  - Volledig uitlopen, voltooiing vruchtzetting (misvorming eerste vruchten)

## Kan je ook iets met die kennis

- Hypothesen ontwikkelen hoe kennis toe te passen in de teelt optimalisatie van huidige rassen
  - Hormoon, licht, temperatuur, bemestings, alternatieve behandelingen
  - Wanneer oogsten
  - Wat is plant kwaliteit/potentie van batch
- Hypothesen ontwikkelen hoe kennis toe te passen bij nieuwe rassen/lijnen
  - Juni- of doordraag eigenschappen
  - Optimaliseren productie en teelt
- Verbeterde kwaliteit dmv diagnostiek tijdens de keten

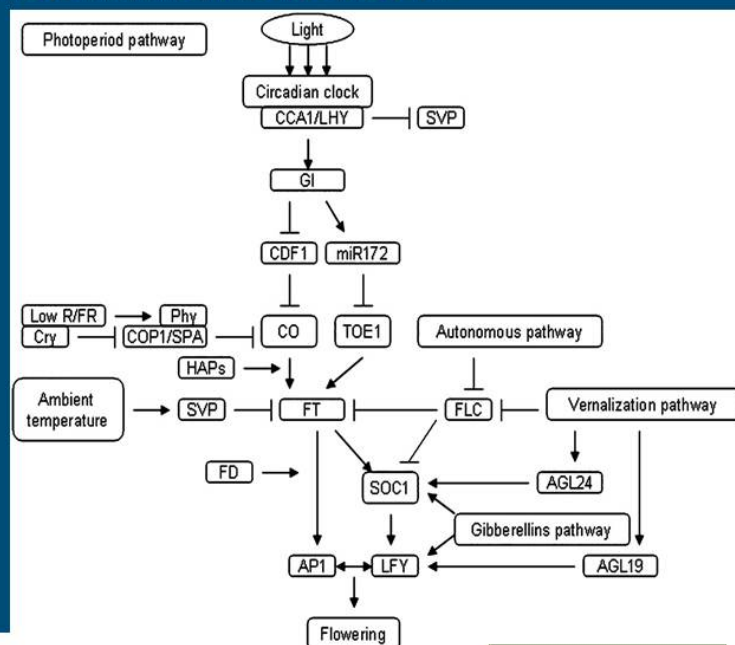
# Zandracket-Arabidopsis

- Model plant voor blad en bloem onderzoek
- Natuurlijke mutanten, genen uitschakelen of extra aanzetten



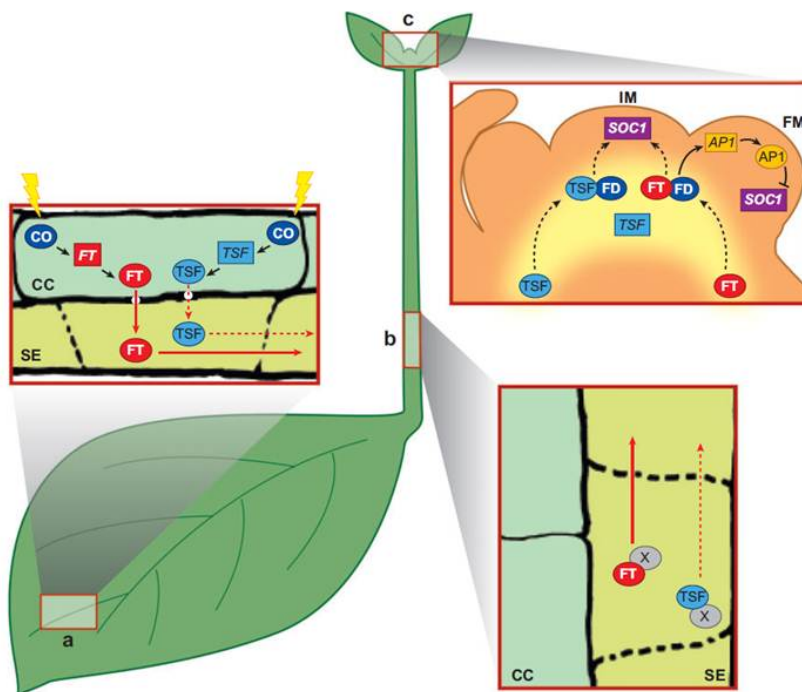
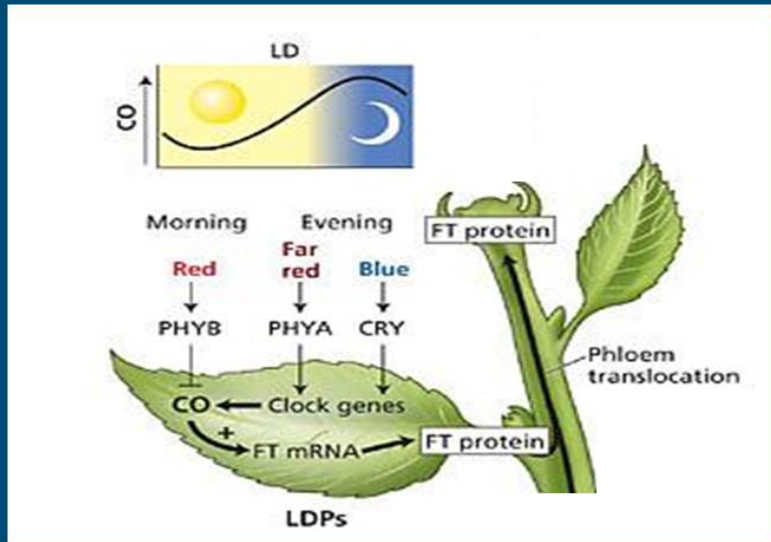
## Veel van bloei mechanisme bekend

- Photoperiode, licht
- Temperatuur
- Koude periode
- Hormonen
- Autonoom
- (Bemesting)





# Gebeurtenissen in blad



Annu Rev Plant Biol. 2008;59:573-94.

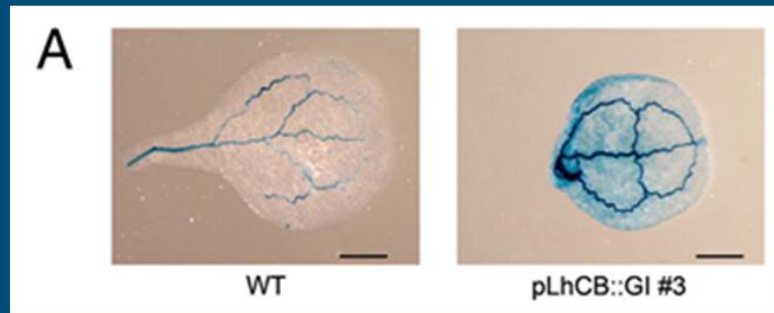
Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage.

Turck F, Fornara E, Coupland G.

Max Planck Institute for Plant Breeding, D 50829 Cologne, Germany.

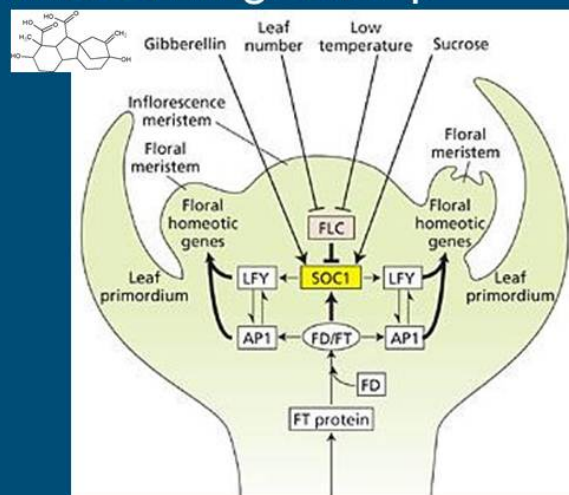
## Genen in het blad

- Meer genen die CO en FT reguleren zoals GIGANTEA



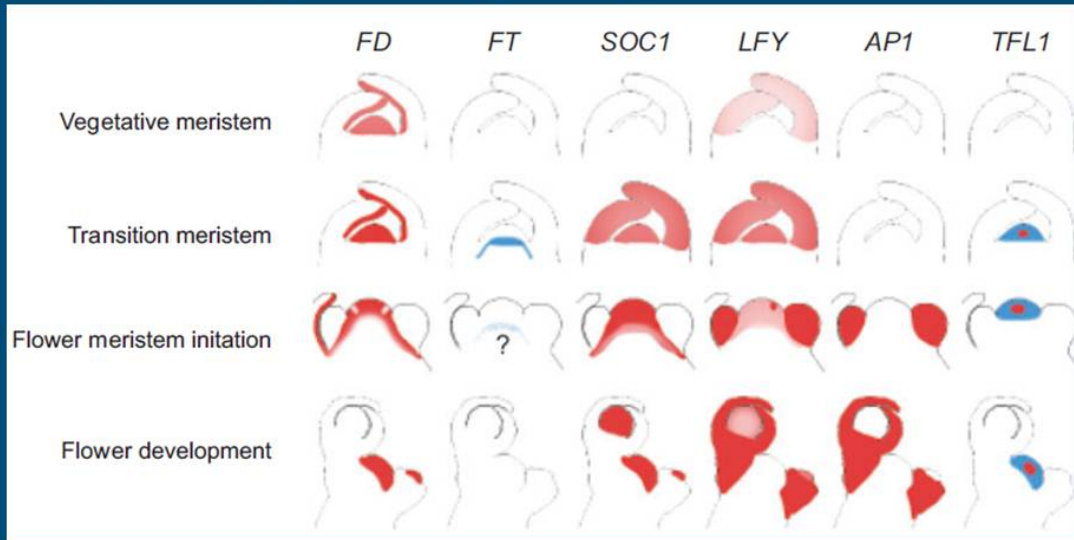
- FT expressie in nerven van blad en via phloem naar apicale groeipunt

## Gebeurtenissen in groei top



- Meerdere signaalroutes komen bijelkaar en bepalen of er een blad of bloemmeristeem wordt gevormd

## Expressie genen in groeitop



Annu. Rev. Plant Biol. 2008;59:573-94.



FOOD & BIOBASED RESEARCH  
WAGENINGEN UR

**Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage.**

Turck F, Fornara F, Coupland G.

Max Planck Institute for Plant Breeding, D 50829 Cologne, Germany.

## Eenjarig versis meerjarig gewas

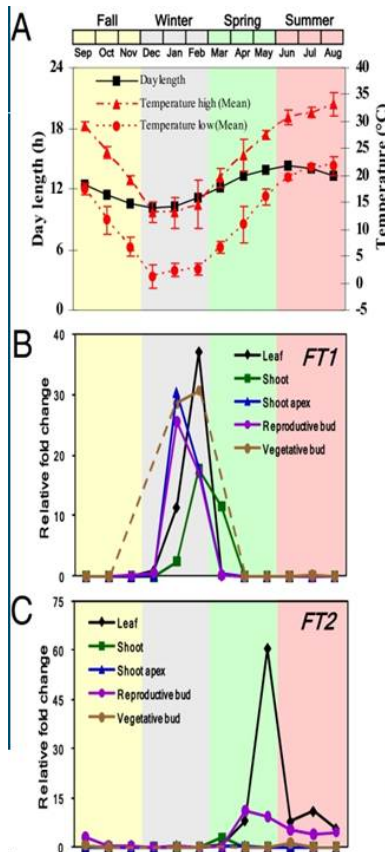
- Arabidopsis – 1 jarig, vanuit zaad
- Populier – meerjarig
  - Veel overeenkomsten met Arabidopsis
  - Kleine variaties
  - Genoom groter, meerdere genen met dezelfde soort functie
- *Arabis alpina* - meerjarig



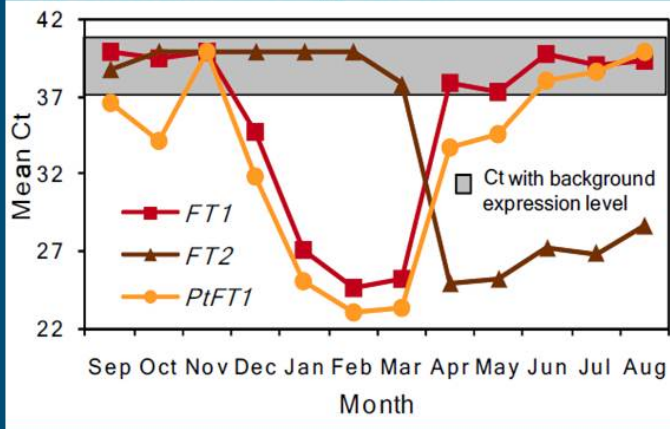
FOOD & BIOBASED RESEARCH  
WAGENINGEN UR







## Populier, 2 FT genen

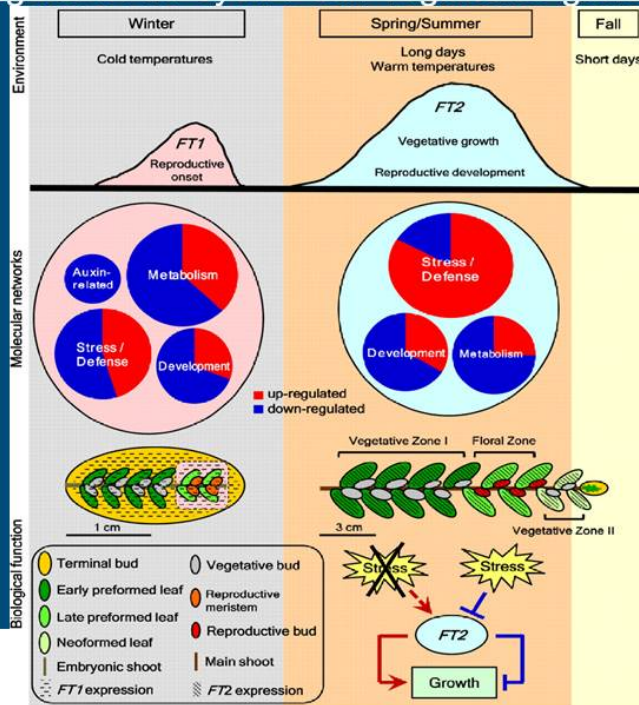


- 2 genen, andere timing gedurende het jaar
- Geven ontwikkeling stadia aan

EARCH  
3 EN UR

Productschap  
Tuinbouw

## FT1/2 reguleren de cycles van vegetatieve-generatie groei

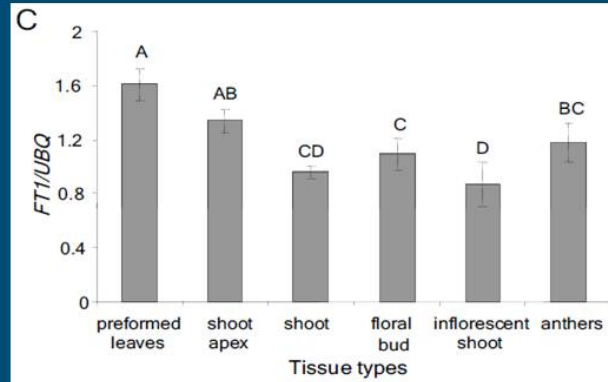


©2011 by National Academy of Sciences

Hsu C et al. PNAS 2011;108:10756-10761

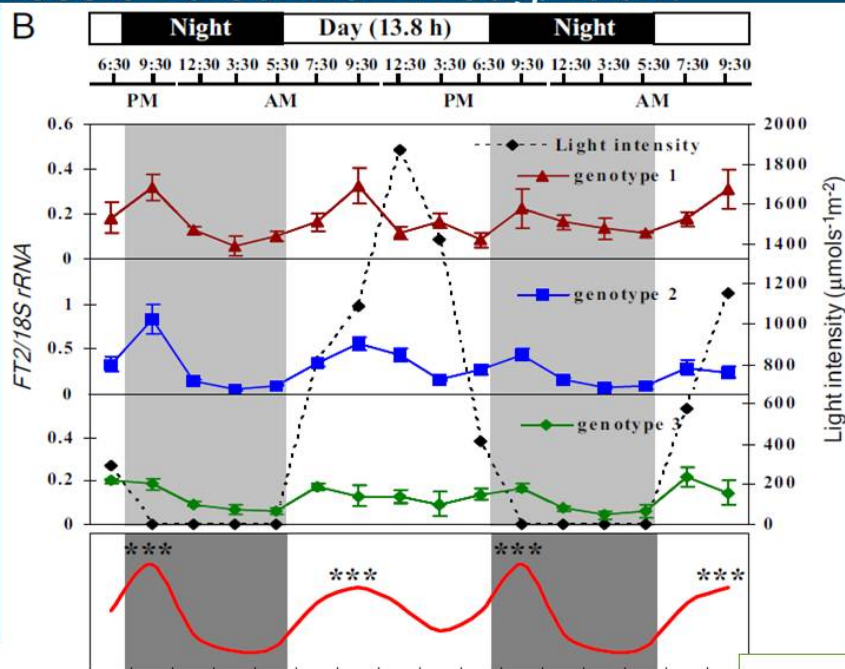
PNAS

## Verschillende weefsels verschillende expressie



- Mogelijk geassocieerd met hoeveelheid nerfweefsel
- Belangrijk bij opzetten dergelijke analyses

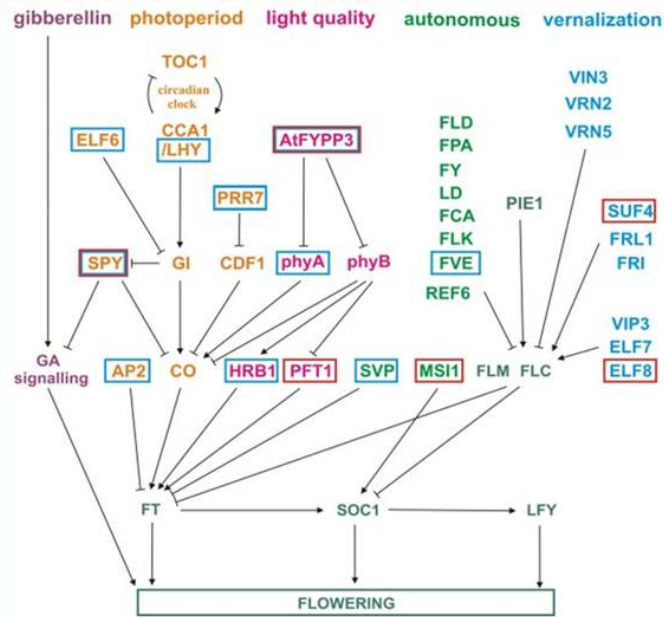
## Expressie verschillen in dag/nacht





# Aardbei, homologie met Arabidopsis

- In 2009 nog onvolledige genoom sequentie
- Veel genen gevonden maar ook nog veel gemist



FOOD & BIOBASED RESEARCH

A simplified chart showing *Arabidopsis* flowering pathways and corresponding gene homologs in *Fragaria*. Gene homologs found in cDNA libraries produced from SD and EB genotypes are surrounded by blue and red boxes, respectively. Arrows indicate positive regulation and bars negative regulation.

Mouhu et al. *BMC Plant Biology* 2009 9:122 doi:10.1186/1471-2229-9-122

## The list of genes belonging to the photoperiodic flowering pathway.

Gene	AT gene locus	Biological function	Act./Repr. +/-	Reference	Fragaria	E-value
<i>Photoreceptors and clock input</i>						
PhyA	AT1G09570	Red light photoreceptor	+	[78]	VES-002-C06	5E-33
PhyB	AT2G18790	Red light photoreceptor	-	[79]	nf	
CRY1	AT4G08920	Blue light photoreceptor	+	[79]	nf	
CRY2	AT1G04400	Blue light photoreceptor	+	[79]	DY669844	2E-110
ZTL	AT5G57360	F-box protein/blue light photoreceptor	+	[80]	EX668764	2E-97
FKF1	AT1G68050	F-box protein/blue light photoreceptor	+	[65]	DY671170	2E-54
ELF3	AT2G25920	Unknown	-	[60]	DY675323	3E-33
FYPP3	AT1G50370	Ser/Thr-specific protein phosphatase 2A	-	[81]	BAR-009-A02	1E-56
SRR1	AT5G59560	Unknown	-	[82]	CO817759	1E-10
<i>Circadian clock</i>						
LHY	AT1G01060	Myb domain TF	-	[7]	VES-005-E09	9E-19
CCA1	AT2G46830	Myb domain TF	-	[6]	nf	
TOC1	AT5G61380	Pseudo-response regulator	-	[5]	DY673134	1E-75
LUX	AT3G46640	Myb TF	-	[83]	DY668516	3E-43
ELF4	AT2G40080	Unknown	-	[84]	EX674323	2E-25
GI	AT1G22770	Unknown	+	[45]	nf	
PRR5	AT5G24470	Pseudo-response regulator	+	[85]	DY676242	3E-56
PRR7	AT5G02810	Pseudo-response regulator	+	[85]	VES-013-D12	5E-52
ELF6	AT5G04240	Jumonji/zinc finger-class TF	-	[86]	VES-002-F05	1E-45
<i>Output pathway</i>						
CO	AT5G15840	putative zinc finger TF	+	[8]	DY672035	2E-45
CDF1	AT5G62430		-	[65]	nf	
FT	AT1G65480	Phosphatidylethanolamine binding	+	[11]	nf	
TFL1	AT5G03840	Phosphatidylethanolamine binding	-	[87]	nf	
FD	AT4G35900	bZIP TF	+	[10]	EX675574	2E-14
COP1	AT2G32950	E3 ubiquitin ligase	-	[46]	DY667888	1E-94
SPA1	AT2G46340	WD domain protein	-	[47]	nf	
SPA3	AT3G15354	WD domain protein	-	[47]	DY671873	3E-24
SPA4	AT1G53090	WD domain protein	-	[47]	DY671245	2E-83
RF12	AT2G47700	RIng domain zinc finger	-	[88]	nf	
HAP3b	AT5G47640	CCAAT-binding TF	+	[89]	EX658204	2E-60



FOOD & BIOBASED RESEARCH

# Eerste qPCR analysis opgezet

The list of PCR primers used in real-time RT-PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
UBI	CAGACCAGCAGAGGCTTATCTT	TTCTGGATATTGTAGTCTGCTAGGG
LFY	CGGCATTACGTTCACTGCTA	CCTGTAACACGCCTGCATC
SOC1	CAGGTGAGGCGGATAGAGAA	AGAGCTTTCCTCTGGGAGAGA
AP1	CGCTCCAGAAGAAGGATAAGG	CATGTGACTGAGCCTGTGCT
AP1	TCTGAAGCAGTAAGGTCTA	ATCCTGATCATAACCTCCAG
LHY	AAAGCTGGAGAAGGAGGCAGTC	CCGAGGATAAAGGATTGCTTGGT
ZTL	TGCATGGGGTAGTAAAACAA	CACCTCCGACAGTGACCTTT
FKF1	ACCCACATCGTTTGTGGTCT	ACATCAGGATCCACCAGAGG
ELF3	TCCTCCAAGGAACAAGATGG	CCATTCCCCTGATTTGAGAG
ELF6	TTCGAAGGCTTGGCAATGG	GCGCCTGAGTTTTATCCAACAG
COL4	GACCGAGAAATCCACTCTGC	CTCTCCGTCGACAAGTAGC
CO	GACATCCACTCCGCCAAC	GTGGACCCCACTATCTG
PFT1	GCGACATGCCAAGTTAGAATT	TCAGGCCTCACACTCTTACAC
HRB1	GAATGGTGGACATCAGCAATCC	CCTCCGAAAGATTGCTCAACA
FYPP3	ACAAAATGGCCCTCATGTG	TGTGCTATGTGTCATGGTGGT
FRL	CGTAGTCAAGGTCGAGGAG	CGACTTCATCTCCATCAGCA
ELF8	GCTCAGAATGCTCCTCCTGT	TGAGTATGCAGCCACTTGC
VRN5	AGCCCTTGATGTCATCAGCTG	CCGATGAATGGTTGGCTAATG
MS11	TCTCACACCTTTGATTGCCA	ACACCATCAGTCTCCTGCCAAG
LHP1	GGAGAGCCAGAACCAGGAG	CTCACCTTCTCCCCTTCT
FVE	GATCCAGCAGCAACCAAGTCTC	CCTCTTGGTGCAACAGAAGGAC
SVP	CGTGCTAAGGCAGATGAATGG	TGAAGCACACGGTCAAGACTTC
SPY	TGCGGTGTCAAATTGCATCA	GGCAACACTCAAGATGGATTGC
GA3ox	CCTCACAATCATCCACCAATCC	CGCCGATGTTGATCACCAA
GA2ox	CACCATGCCAGAGCTTCA	AGGCCAGAGGTGTTGTTGGAT
TFL1	TGCAGAAACAACGAGTTCCG	CCAAGAGCATCGATCATTTGGT
AP2	CCCGAAATCCTTGATTGTTCC	AACACTGCAATCGAACAACAGC



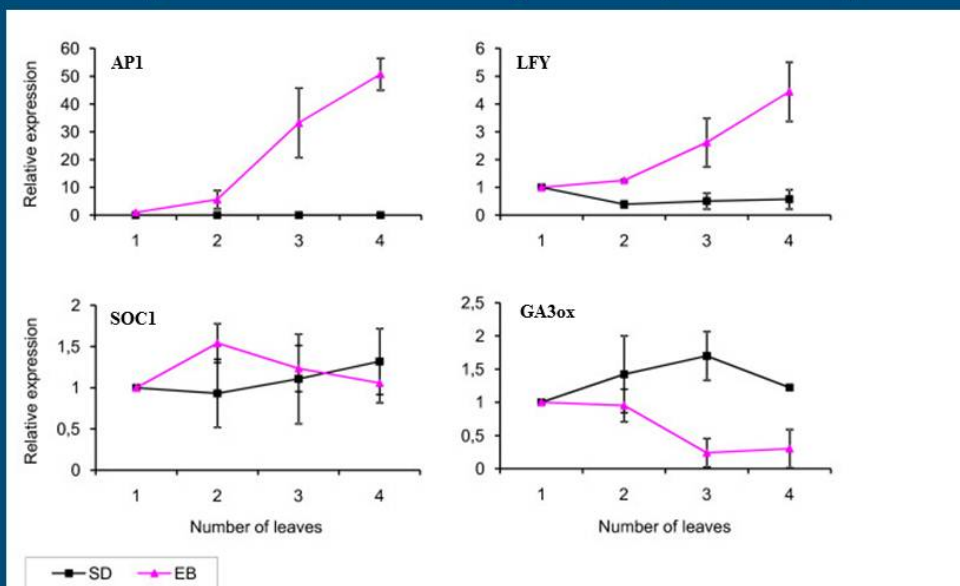
FOOD & BIO

$T_m$  value of the primers is  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Mouhu et al. *BMC Plant Biology* 2009 9:122 doi:10.1186/1471-2229-9-122



## Gene expressie van SD (juni-dr) en EB (doordr)



Mouhu et al. *BMC Plant Biology* 2009 9:122 doi:10.1186/1471-2229-9-122



FOOD & BIOBASED RESEARCH  
WAGENINGEN UR



## In begin van jaar zelf gezocht naar genen

- Genoom van *F. vesca* (2n) open voor iedereen
  - Homologe genen voor FT, CO, SOC1, LFY gevonden
  - Dus genen kunnen bestudeerd worden

### The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*)

Vladimir Shulaev, Daniel J Sargent, Ross N Crowhurst, Todd C Mockler, Otto Folkerts, Arthur L Delcher, Pankaj Jaiswal, Keithanne Mockaitis, Aaron Liston, Shrinivasrao P Mane, Paul Burns, Thomas M Davis, Janet P Slovin, Nahla Bassil, Roger P Hellens, Clive Evans, Tim Harkins, Chinnappa Kodira, Brian Desany, Oswald R Crasta, Roderick V Jensen, Andrew C Allan, Todd P Michael, Joao Carlos Setubal, Jean-Marc Celton *et al.*

Affiliations | Contributions | Corresponding author

*Nature Genetics* 43, 109–116 (2011) | doi:10.1038/ng.740

Received 09 June 2010 | Accepted 02 December 2010 | Published online 26 December 2010

BLAST de FT homolog van Mais tegen "Strawberry genome v1.0 ab initio gene proteins"

```
Sequences producing significant alignments: (bits)
Value
>gene21482-v1.0-ab_initio | mrna21482.1-v1.0-ab_initio |
GeneMark.hmm | 176_aa
Length = 176

Score = 207 bits (528), Expect = 2e-54
Identities = 100/159 (62%), Positives = 121/159 (76%), Gaps = 1/159 (0%)

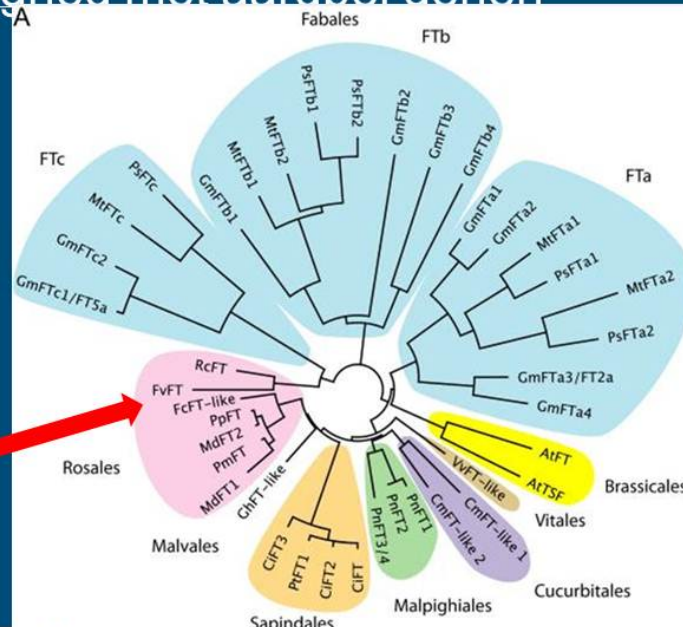
Query: 5  DRLVMARVIQVLDPFTFTIPRAITYNWRLLPSEAEKPSAVVSKFRVDIGSSDMRAFYT 64
          D LV+ RVI DVLDPFT ++ LR+TY ++ + ELKFS VYS+ERVDIGG D+R FYT
Sbjct: 6  DPLVVGRRVIGDVLDPFTKRSVLSRVYTSKEVWNGCELKPSQVVSQRVDIGGEDLRFTY 65

Query: 65 LVLIDPDAPSPSPSLREVLHNMVTDIPETTSVNFQGLIFVYERPDPSGIHRLVFLFR 124
          LV++DPDAPSPS P+L+EYLNH+VTDIP T FGQE++ YE P P +GIHR +FVLF
Sbjct: 66 LVMVDPDAPSPSPDNLEKYLHNLVTDIPATAGAVFGQELVVCYSPRPTAGIHRFLVFLFR 125

Query: 125 QLGRGTVFAPEMRHNFCRSFARQVHL-SIATATHFNQC 162
          QLGR TV+AP R NFN R FA Y+L S A +FNQC
Sbjct: 126 QLGRQTVYAFGWRQNFTRDFAEELNGLSPVAAYVFNQC 164
```

## Medicago aligned met aardbei genen

- Later ook in de publicaties
- 2 FT genen bij wilde aardbei



*Plant Physiol.* 2011 Aug;156(4):2207-24. Epub 2011 Jun 17.

The **Medicago FLOWERING LOCUS T** homolog, **MtFTa1**, is a **key regulator** of flowering time.

Laurie RE, Diwadkar P, Jaudal M, Zhang L, Hecht V, Wen J, Tadege M, Mysore KS, Putterill J, Weiler JL, Macknight RC. Department of Biochemistry, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand.



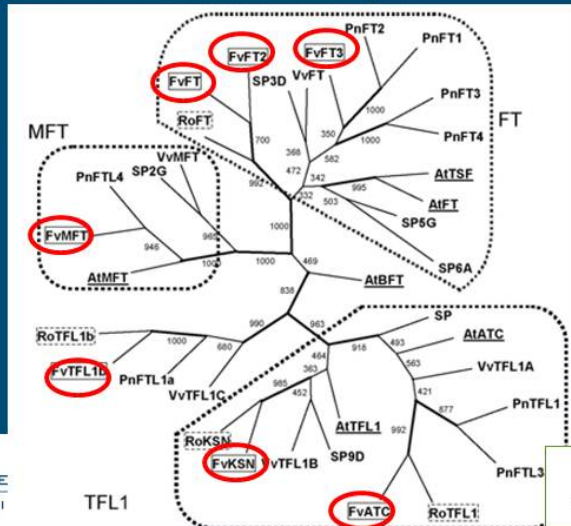
# Recente info van aardbei doordragers

The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry

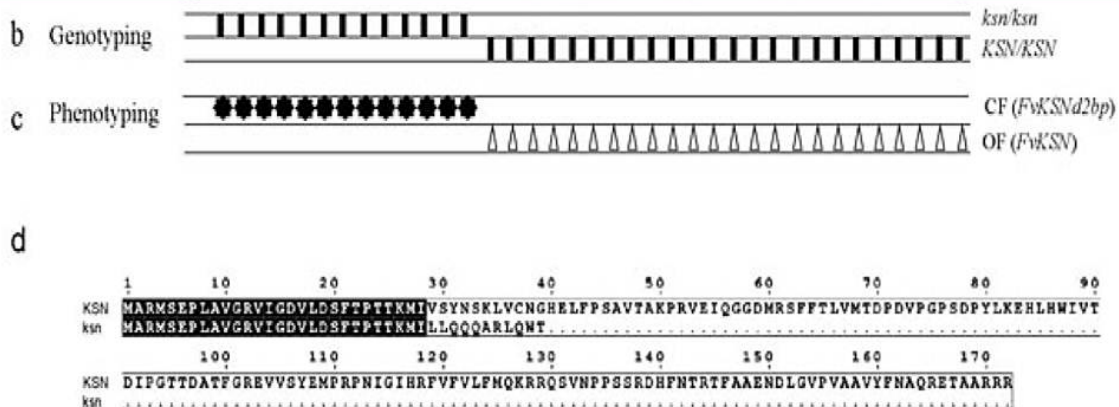
Hikaru Iwata<sup>1,5\*</sup>, Amèlia Gaston<sup>2\*</sup>, Arnaud Remay<sup>3</sup>, Tatiana Thouroude<sup>3</sup>, Julien Jeauffre<sup>3</sup>, Koji Kawamura<sup>3,6</sup>, Laurence Hibrand-Saint Oyant<sup>3</sup>, Takashi Araki<sup>4</sup>, Béatrice Denoyes<sup>2</sup> and Fabrice Foucher<sup>3,7</sup>

Received Date : 12-Apr-2011  
Revised Date : 29-Aug-2011  
Accepted Date : 02-Sep-2011  
Article type : Original Article

- 3 FT genen
- 3 TFL1 genen
- 1 MFT

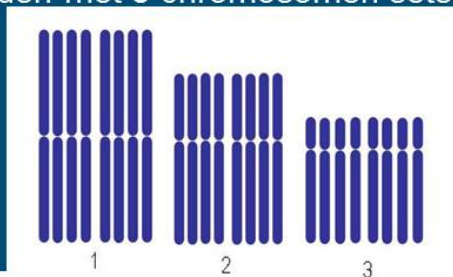


## Doordragen wordt bepaald door fout in FvKSN



## Samenvattend

- Vele genen bekend die plant-balans reguleren
- Vele genen bij aardbei bekend, met beschikbare genoom van *F. vesca* ook makkelijk op te zoeken
  - Kleine verschillen te verwachten tussen *F. vesca* en *F. ananassa*
  - Rekening houden met 8 chromosomen sets



FOOD & BIOBASED RESEARCH  
WAGENINGEN UR

Productschap  Tuinbouw

## Onderzoek naar start bloemaanleg

- Genen als GIGANTEA, CO en vooral FT zullen goede indicatie geven
- Expressie analyse kan uitgevoerd worden ver voordat meristemen zichtbaar zijn
- Denken aan weefsel (nerven), timing op de dag zelf, meerdere homologe genen etc



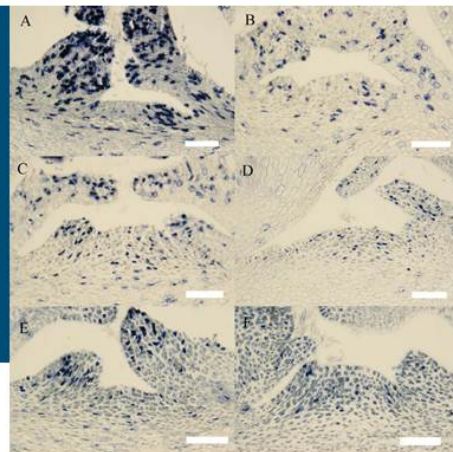
FOOD & BIOBASED RESEARCH  
WAGENINGEN UR

Productschap  Tuinbouw

## Histone H4 gene expression and morphological changes on shoot apices of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during floral induction

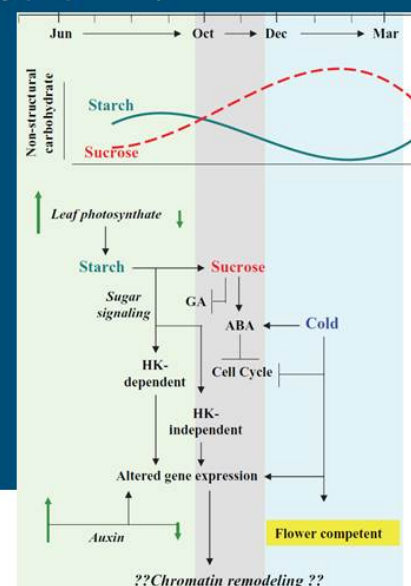
Takeshi Kurokura<sup>a,\*</sup>, Yukio Inaba<sup>b</sup>, Nobuo Sugiyama<sup>a</sup>

- Japanse studie gaf aan dat er een histon gen actief is in groeipunt
- Aanzet dat er iets gaat veranderen in groeipunt



## Onderzoek naar oogstbaar product

- Semi-rust fase, eind van seizoen
  - Mogelijk ook via FT genen (zoals bij populier)
  - SVP, dormany zwarte bes
  - Suiker metabolisme
    - AGPase, HK, SPS, SuSy, UGPase
  - Andere dormancy related genen
    - DAAR, HisH3, XET, Dehydrins





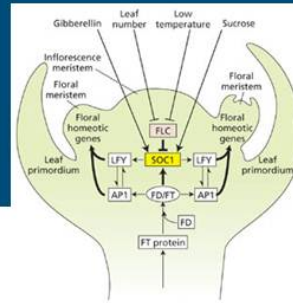
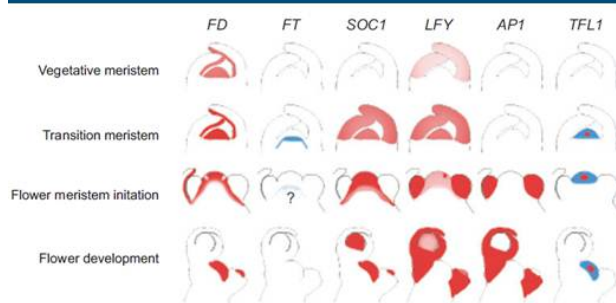
## Onderzoek naar oogstbaar product

### ■ Aantal aangelegde knoppen

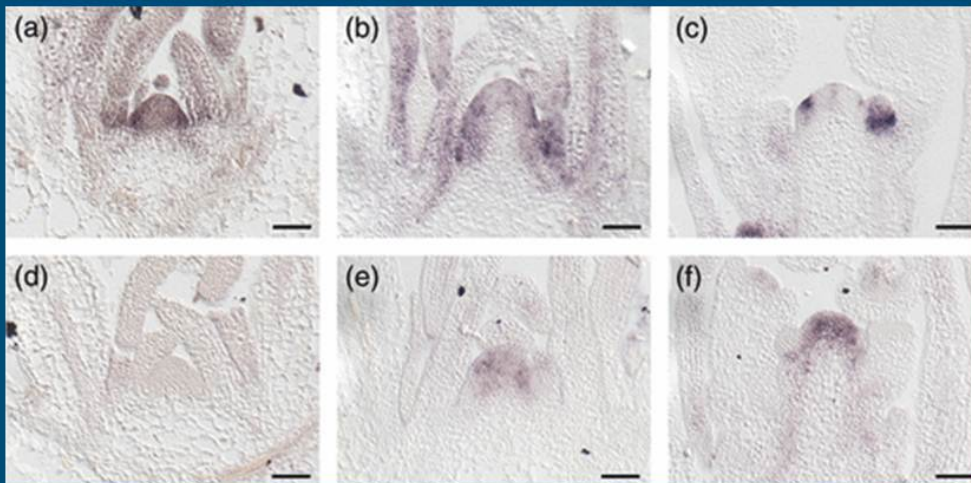
- Genen die in groeitop tot expressie komen (tijdens de groei)
- Gen expressie meristemeen genen mogelijk moeilijker te gebruiken voor (passief) eindresultaat
- Zou de opgestapelde genexpressie moeten weten, veel analysis

### ■ Productie van de knoppen

- Zal ook in van teelt condities afhangen



## Plaatselijke activiteit in groeiknop van Arabidopsis



Zeer plaatselijk, slechts aantal cellen. Moeilijker te gebruiken.

Zullen waarschijnlijk meer algemene genen moeten worden.

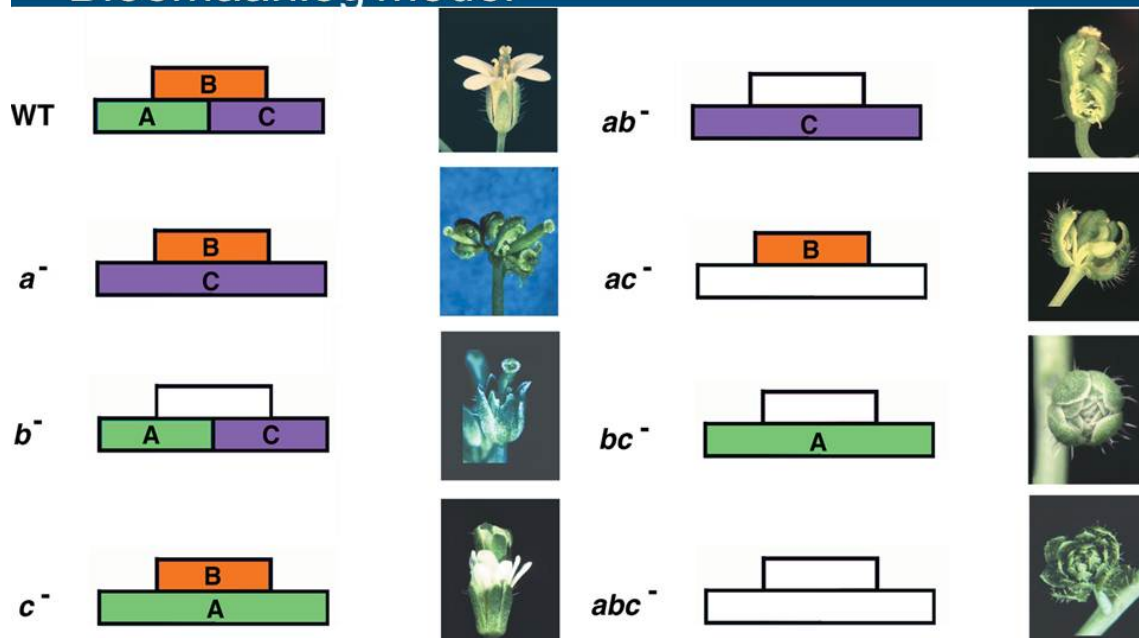
Na bewaring wel genen te gebruiken die juist uitloop van meristemen aangeven.

The Plant Journal  
Volume 60, Issue 4, pages 614-625, 2 SEP 2009 DOI: 10.1111/j.1365-3113.2009.03986.x  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3113.2009.03986.x/full#f6>

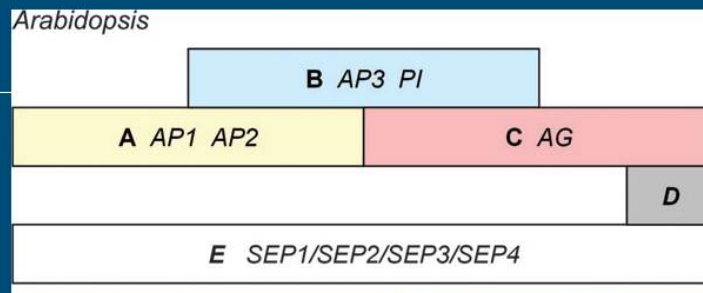
## Bloemknoponderzoek overbodig ?

- Gen expressie is moment opname, gevormde knoppen cumulatief effect
- Afhankelijk van kosten, snelheid en betrouwbaarheid
  - Aantal meristemen makkelijker te bepalen met microscoop
  - Kan niet bepalen of ze ook goed gaan produceren
  - Misschien met bloemgenen/MADSbox genen die bloemen in bloeiwijze reguleren

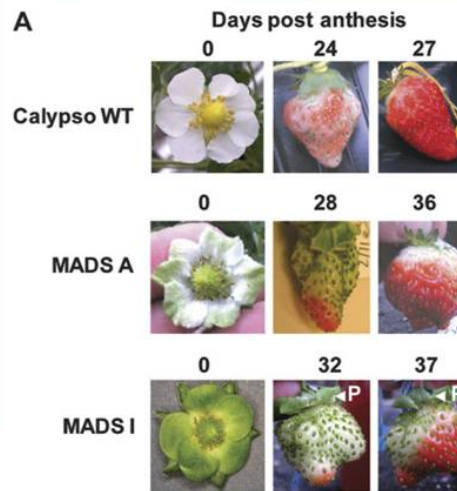
## Bloemaanleg model







- Klasse E genen betrokken bij aardbei morfologie
- Misvormde vruchten door onvolledige expressie/aanleg vruchtweefsels



## Regulatie van plant-balans tijdens vruchtproductie

- Meerdere genen gebruiken om vegetatieve-generatie meristeem aanleg te volgen
  - FT, AP-1, LFY, SOC, ea
- FT belangrijke initiator
  - Geen patent gevonden rond externe applicatie van FT om bloei te reguleren (hormoon behandeling)
  - Opname via wortels en/of blad misschien lastig (wel interessante onderzoeksrichting)
- Merkers om behandelingen (licht, temperatuur, GA, nutrientgifte) mee te fijn tunen

## Bepalen dragerstype nieuw genotype

- Analyse van TFL (KSN) gen expressie en gen sequentie
- Samenwerking mogelijk met Beatrice Denoyes (INRA) huidige partner in EUberry

## Gevoel na literatuurstudy

- Moment van omslag vegetatief-generatief -> ja
- Moment van semi rust -> ja
- Spreiding in trosaanleg -> waarschijnlijk
- Aantal bloemen per tros -> onzeker, mogelijk
- Knophoogte, vroegheid bij start productie -> mogelijk
- Nog geen pasklare diagnostische methoden, zullen dus ontwikkeld moeten worden

## Beschikbare tool box voor verder onderzoek

- Genoom informatie *F.vesca* makkelijk vertaalbaar naar *F. ananassa*
- Gebruikmakend van veel genetische variatie, populaties, behandelingsmethoden etc
- Octaploid genome vraagt waarschijnlijk om allele specifieke gen expressie op basis van enkele mutaties tussen genen
- Transformatie (overexpressie, uitschakelen) mogelijk (in samenwerking met PRI)

## Vervolg literatuur studie

- Graag input
- Discussie
- Commentaar
  
- Uitwerken tot verslag (2/3 klaar)
- Januari 2012



## Vervolg

- Gezamenlijke onderzoeksprojectaanvraag
  - PLANTUM
  - Productschap Tuinbouw
  - Provincie
  - (TTiGG)
  - EU, Capacity for the SME
  - TopSectoren
    - WUR geld vrijgegeven om te matchen met industrie gelden (60/40)
    - Voorwaarden (cash/in kind, IP rechten etc) nog niet bekend
- Hoe organiseren
  - wie belangstelling (welke richting)
  - wie lead/aanspreekpunt vanuit industrie

# Bedankt voor de aandacht

