

ESF-Advances in Farm Animal Genomic Resources-Exchange Grant:

Novel genomic resources for sole (*Solea solea* L.) breeding

Eveline Diopere

SCIENTIFIC REPORT

1. Aims of the visit

The marine flatfish sole (*Solea solea* L.) is fished commercially in the northeast Atlantic ocean and is considered for aquaculture in several European countries. It is currently the target of a broad scale genetic analysis with the aim to protect natural populations against overfishing (EU FP7 project FishPopTrace, 2008-2011). Additionally, it is the focus of a well-thought aquaculture strategy aiming at improving breeding strategies, growth rate, developing sustainable feed and increasing disease resistance. The application of novel genomic tools is of great importance to increase production efficiency while maintaining broodstock diversity in the long term. Recently, new genomic data and markers (> 300,000 ESTs and several hundred SNPs) from natural populations have been generated within a EU project framework. A first step to identify QTL regions for marker assisted selective breeding is the development of a linkage map from these novel genomic data.

The aim of my visit to the lab of Prof. Martien Groenen, Animal Breeding and Genomics Centre (ABGC) at Wageningen University, was first to gain more insight in bioinformatics and genomics, while performing advanced analyses to construct the first SNP linkage map of sole. The ABGC has developed expertise in three interrelated areas: (1) Animal Breeding: definition of breeding objectives, estimation of genetic parameters and design of selection schemes. (2) Statistical genetics and genomics. (3) Molecular genetics and bioinformatics. Prof. M. Groenen is the head of the Genomics group. Increasing the understanding of the genotype-phenotype relationships of complex traits is a major research theme in this group and an important aim of my early scientific career. Besides poultry and pigs, the group also investigates fish species such as sole (*Solea solea*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sole is the species of interest of my PhD and also of this exchange project.

The proposed exchange project consisted of the following three scientific aims:

- 1) **Testing the inheritance of the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)** developed by High Throughput Sequencing of Expressed Sequence Tags (ESTs) at the K.U.Leuven. The genotyping of two families from Wageningen UR breeding facilities has been completed (two full sib families, 96 samples), constituting a strong asset for controlling the inheritance of SNPs validated in natural outbred sole populations.
- 2) The technological transition of genetic markers from microsatellites (SSRs) to SNPs includes some challenges concerning the statistical power of both markers in specific questions. Pedigree analyses are for instance difficult to perform in marine organisms because of the lack of families. Through the comparative analysis of 100 % pedigreed individuals and several pedigreed individuals with lower accuracy based on SSR

markers (available from ABGC), we wanted to **assess the power of pedigree analysis using SNPs using controlled breeding populations of sole**. The minimum number of SNP markers was defined to reach the highest assignment levels.

- 3) EST-based SNP genotyping of natural and aquaculture populations gives a broad scan of the transcriptome and as such it is highly relevant for future aquaculture applications in sole (for example to study the genotype-phenotype axis through association analysis). As a first step towards Quantitative Trait Loci (QTL) mapping in sole, we performed a **linkage analysis using the above mentioned families to develop a novel SNP Linkage map**.

2. Description of the work carried out during the visit

2.1. Quality control

At the beginning of this exchange project, the genotypes of 1536 SNPs (generated by Illumina's GoldenGate™ assay) of two aquaculture families were available (FS1=49, FS2=46). Based on SSRs it was not clear for some individuals in FS2 if they really belonged to this family, so first the pedigree was checked with SNPs (with the software program CERVUS (Marshall, 1998-2007)). Secondly, the GenomeStudio™ v1.0 Genotyping Module was used for visual inspection of the genotypes. Three aspects were studied: (1) the quality of the SNPs and individuals, (2) the inheritance of the markers and (3) how informative they are for both parentage and linkage analysis.

2.2. Power of SNPs compared to SSRs for parentage analysis

To see if SNPs perform better than SSRs for pedigree reconstruction, the resolution of both markers was evaluated with the software program CERVUS. The minimum number of SNPs and SSRs was defined to perform parentage analysis with high accuracy. These results were compared to evaluate the advantages and disadvantages of both marker types. The parentage analysis based on SNPs was also performed with two other software programs: PAPA (Duchesne, 2005) and COLONY (Wang, 2008). The first method uses categorical allocation (based on exclusion and likelihood), similar to CERVUS. This program was used to verify if different programs with the same method obtain the same results. The latter one is based on sibship reconstruction and can be used if no parental information is available. This program was tested to see how SNPs deal with missing information. The power analysis was done in collaboration with master student, Jonas Bylemans (K.U.Leuven) under my supervision with input of Dr. Robbert Blonk (WUR).

2.3. Linkage and comparative mapping for sole

The main focus of the exchange project was the construction of the first linkage map for sole. Only SNPs with informative meioses (if one can identify whether or not the gamete is recombinant) and correct inheritance were used for mapping (see 2.1.). Besides SNPs, 11 SSRs were also screened for linkage. The map was built with the program CRIMAP (Green *et al.*, 1990). SNPs located within the same contig were first combined into haplotypes using the program PEDPHASE (Li, 2009). This was done because haplotypes are more informative than separate markers when a small number of families (or SNPs) are studied. The map was built with the program CRIMAP. The initial grouping of the markers was carried out using the *twopoint* and *autogroup* option of CRIMAP. Secondly, the position of the SNPs/SSRs within the groups was determined with the *build* option of CRIMAP. Finally marker order was calibrated using the *flips* option. The map was drawn in the program MAPCHART (Voorrips, 2002).

In order to provide additional valuable information about the structural and functional organization of the genome, comparative gene mapping was used. As the SNPs were discovered from ESTs (Expressed Sequence Tags), the assembled contigs were used as queries to perform a local blast against the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) genome (<http://genome.ucsc.edu/>). A BLASTN analysis was performed with NCBI-Blast (E-value < 10^{-10}).

To gain more insight in bioinformatics, CRIMAP was run in a Linux operating system and several PERL and PYTHON scripts were prepared to build the input file for CRIMAP and link the output of the Blast-results with the contig names and linkage groups.

3. Main results

3.1. *Quality control*

It was confirmed with SNPs that 9 individuals of the doubtful family were half-sibs or did not belong to this family at all. They were excluded from further analysis. For three other individuals the genotyping assay did not work well, so they were not used for the linkage analysis.

In total, 318 of the 1536 SNPs could not be used for further analysis because the assay failed (297 SNPs) or Mendelian inheritance could not be confirmed (21 SNPs). Unfortunately, 749 of the 1218 good quality SNPs were not informative within the two families (homozygous). A final 469 SNPs were properly genotyped and informative to perform both parentage and linkage analysis.

3.2. *Power of SNPs compared to SSRs for parentage analysis*

It was shown that a minimum of 4 SSRs and 21 SNPs is necessary to perform reliable parentage analysis based on categorical allocation (Table 1). This number of SNPs was identical for both programs based on categorical allocation, namely CERVUS and PAPA. The only disadvantage of PAPA is the restricted number of markers (maximum 50). If no genetic information of the parents is available 21 SNPs are insufficient for pedigree reconstruction (Figure 1, left) and at least 50 SNPs are required (Figure 1, right). Two individuals were not assigned to the correct mother due to poor performance of the genotyping assay (see 3.1.). As they are highly polymorphic, SSRs are suitable tools for pedigree reconstruction. However, SNPs can be used as well, when using a higher, but still reasonable, number of markers. In parentage analysis it is important to produce high quality genotypes (e.g. low percentage of null alleles) which is the case for SNP genotyping. Using the SNP dataset dubious offspring was detected immediately (see 3.1.).

Table 1: Percentage correct assigned offspring calculated with CERVUS (left: for SNPs, right: for SSRs)

# SNPs	% correct assigned offspring	# SSRs	% correct assigned offspring
50	100%	10	100%
30	100%	9	100%
21	100%	8	100%
20	98%	7	100%
16	96%	6	100%
15	89%	5	100%
10	26%	4	100%
5	0%	3	95%

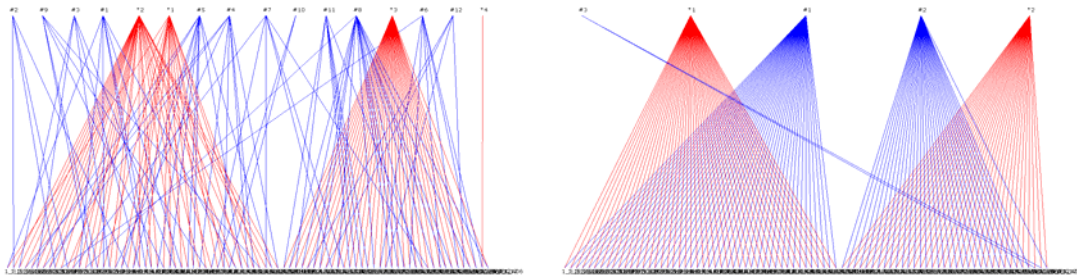


Figure 1: Pedigree of the two aquaculture families drawn by PEDIGREE VIEWER (Kinghorn, 1990-2010). Left: based on 21 SNPs. Right: based on 50 SNPs. Blue: candidate mothers, red: candidate fathers.

3.3. Linkage and comparative mapping for sole

The 469 informative SNP markers were distributed across 321 single-marker contigs and 60 contigs with two to six SNPs. Of those SNPs and the 11 SSRs (480 markers in total), 454 were initially grouped with the *Autogroup* option. So far, the linkage map is based on 429 markers (421 SNPs and 8 SSRs) and is constituted of 35 linkage groups with a total length of 1233.8 cM (see Appendix). Preliminary Blast-results (with this first draft map) showed multiple areas of conserved synteny between sole and stickleback, providing evidence of the quality of the first map. Some small linkage groups mapped within the same chromosome, indicating that a significant fraction of the genome is not covered by the current map based on available markers. Adding additional markers in the future will enable the merging of these small linkage groups.

4. Future collaboration with the host institution

- In order to enhance collaboration, first I introduced my research to the team at ABGC (on Tuesday 17 May 2011): Molecular adaptation in time and space in a highly exploited marine species (*Solea solea* L.).
- In the near future, we will use the technology of ABGC, namely the Veracode genotyping technology (Illumina) for another project. The GoldenGate Genotyping assay is being developed at this moment and 192 SNPs will be genotyped in 480 soles in the context of Fisheries Genetics applications (Fisheries Induced Evolution and Traceability). In order to gain more insight in the protocol, I received a training of two days (6-7 July 2011).
- In the context of SNP pedigree analyses, the K.U.Leuven and the host institution will work further on the analysis of additional sole broodstock to define a broadly applicable SNP panel for parentage analysis.
- Continuing the initiated linkage and comparative genomics analysis in sole is one of the key collaboration plans between both institutions. Besides further SNP analyses on GXE interactions in sole stocks raised under semi-natural conditions, we aim at performing a fine-mapping analysis on phenotyped F1 individuals using next-generation sequencing strategies, to detect with precision relevant QTLs or even QTNs for important traits.

5. Publications resulting from this grant

The output of this training will be written down in one major and potentially one smaller paper: (1) a combined SNP/SSR linkage map for sole and (2) a power analysis of SNPs and SSRs for pedigree reconstruction in sole. The first one is in preparation (for details see below) and the second paper is tentative and needs additional information from additional broodstocks.

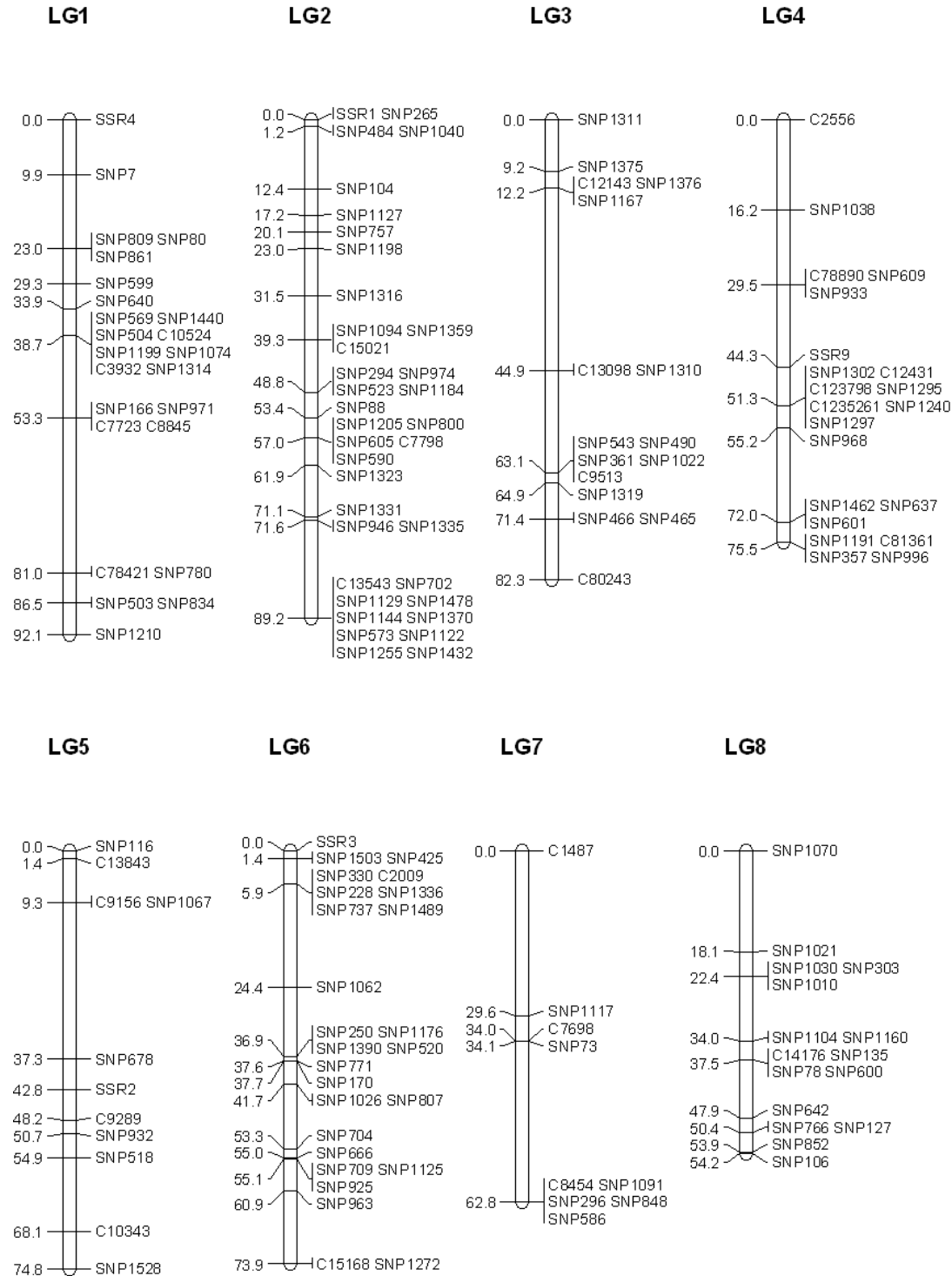
(1): A combined SNP/microsatellite linkage map and comparative mapping in sole (*Solea solea* L.)

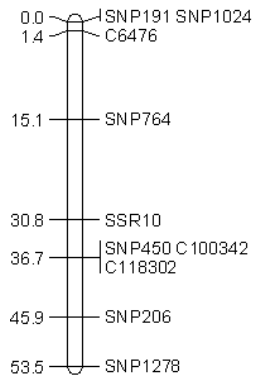
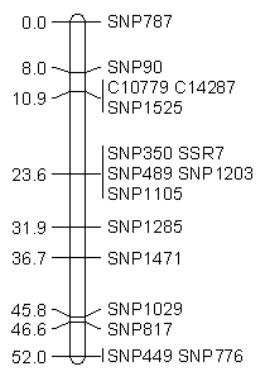
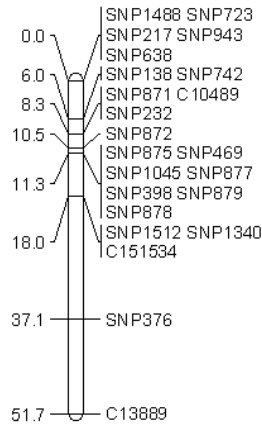
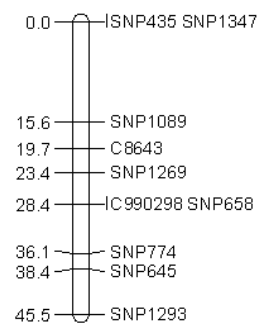
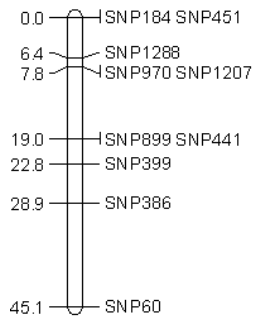
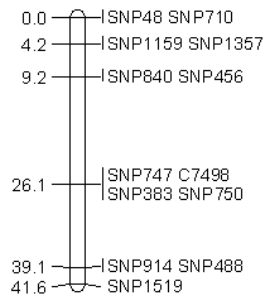
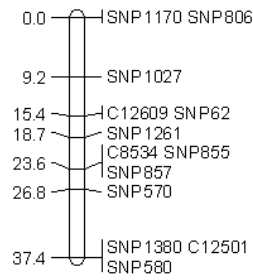
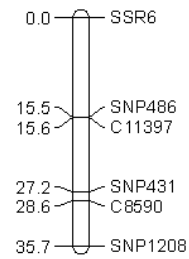
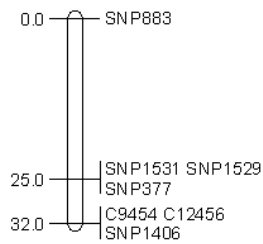
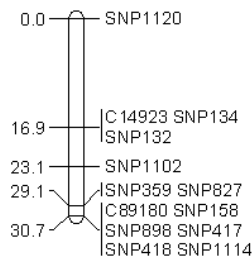
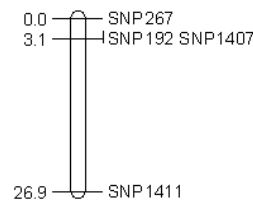
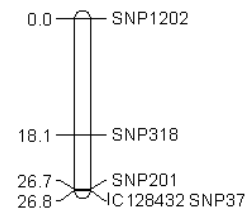
Authors: Diopere E., Maes G.E, Komen H., Volckaert F.A.M., Groenen M.A.M.

Journal: BMC Genomics, Heredity, Genetics Selection Evolution, Marine biotechnology, Genome, Animal Genetics, Genetics, Aquaculture... (to be discussed)

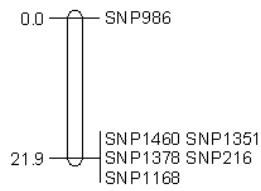
In PREP

Appendix: Sex-averaged linkage map for sole (*Solea solea* L.). Map distances are shown in Kosambi centimorgans

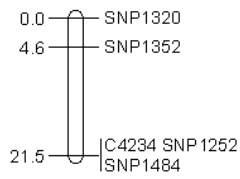


LG9**LG10****LG11****LG12****LG13****LG14****LG15****LG16****LG17****LG18****LG19****LG20**

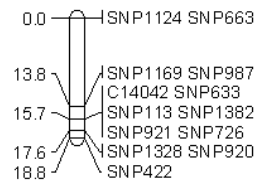
LG21



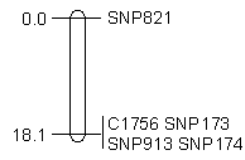
LG22



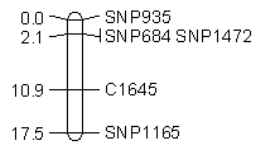
LG23



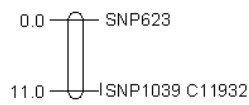
LG24



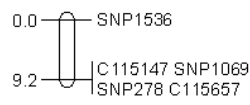
LG25



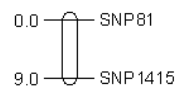
LG26



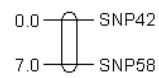
LG27



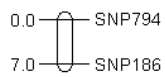
LG28



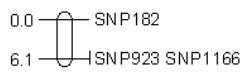
LG29



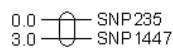
LG30



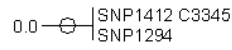
LG31



LG32



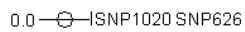
LG33



LG34



LG35



Travel costs

1. 9 April 2011 (start date), journey to Wageningen (Lawickse Allee 70, NL-6707 AK Wageningen) **by car**
9 July 2011 (end date), return back home (Kappelleweg 68, B-8480 Eernegem) **by car**
 - ➔ 84,80 euro x 2 = **169,60 euro** (See reimbursement form NMBS Mobility, document from 8 August 2011: 1st class from Oostende to Ede-Wageningen (return). I hope this document is ok? It took me a lot of effort to obtain this document as the NMBS never had this request before.
 - ➔ Number of kilometers covered where no train is available: **28.5 km** (from home to Oostende: 18.5 km, from Ede-Wageningen to Lawickse Allee 70: 10 km)
2. Travel costs for midterm evaluation (coupled to a congress) in Leuven (as agreed in the application form) **by train** (6-5-2011 and 16-5-2011): 21,50 euro x 2 = **43 euro**
3. Due to unforeseen circumstances I had to travel back home some weekends. To suppress travel costs I carpooled with a Belgian colleague, but the return to Wageningen I did by car. I hope these four other tickets (21,50 euro x 4 = **86 euro**) can be reimbursed as well?

Total: 298,6 euro + extra kilometres

DNF: PCLVSWR
 Afrecode: ****
 Tikttaal: Nederlands
 Betaalwijze: Onbekend

Totaal bedrag: 169.60
 Naverkoopkosten: 0.00
 Betaald: 0.00
 Te onttrengen: 169.60

Verkoop Naverkoop Individuele passagiers Betalingshistoriek

	Gamma	Van	Naar	Via	Datum	Trein	Vertr.	Aank.	Kl.	Tarief	ReCo	#	#	Type	R	St	Prijs
<input type="checkbox"/>	1.1	TCV	BEOST	NLEDW	06/08				1	BUSA1		1	0			H	84.80
<input type="checkbox"/>	1.2	TCV	NLEDW	BEOST	06/08				1	BUSA1		1	0			H	84.80

Zoeken slant Corporate contact Gelijde verkoop Ontvangst

Segment Info

Van EDE-WAGENINGEN naar OOSTENDE

Tariefgamma: TCV - Klasseke trein / Biljet

Datum: ma 08/08/11

Reisweg: Roosendaal(Fr)


Reizigers Info

Reizigerstype	Tarief	Reis
Volwassene	Standaard Biljet 1e klas	

1 08:39:21 - Prijsaanvraag: Voltooid
 1 08:39:29 - Kopieer orderlijn: Voltooid
 * 08:39:37 - Boeken: Fout (JITI.DOSSIER.0510): Er zijn meerdere reiswegen mogelijk, gelieve er één te selecteren.
 1 08:39:37 - Prijsaanvraag: Voltooid
 1 08:39:38 - Bewaar reisweg: Voltooid
 1 08:39:39 - Boeken: Voltooid
 1 08:39:40 - Prijsaanvraag: Voltooid
 1 08:39:43 - Zet de orderlijnen opzij: Voltooid
 1 08:39:50 - Orderlijn(en) annuleren: Voltooid

Start A01X04 [Prod-BE-SL... NMB5/SNCE - Mobil... BENE - Direct Mod... Treinplanner - Wind... Internationale Trein... 08:39

N.M.B.S. Mobility
 08 AUG. 2011
 Station Brugge





(B)		VERVOERBEWIJS BILLET		Diopere,Eveline	
CIV 1088				01 JONGERE	
Geldig:06/05/2011					
		VERTREK	-> AANKOMST		
*	*	EDE-WAGENINGEN	-> ZONE ANTWERPEN	*	*
*	*			*	*
VIA [1184]*ROOSENDAAL(FR)[1088]*****					
JONGEREN/JEUNES			NS : OP WERKDAGEN GELDIG VANAF 9 U. JULI EN AUGUSTUS ONBEPERKT GELDIG		
			PRIJS: EUR ****21.50 *** *****		
			DNR:PBBFIRB Ref:Internet		
			4E5303245072		
020511		74E53		HB	

Gebruiksvoorwaarden:

- Dit vervoerbewijs is onderworpen aan de bepalingen van de Uniforme Regels betreffende de Overeenkomst van Internationaal Spoorwegvervoer van Reizigers en Bagage (CIV), aan de voorwaarden verbonden aan de gekozen reisformule en aan volgende speciale voorwaarden die u hebt aanvaard bij aankoop van dit vervoerbewijs:
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig als het is afgedrukt -in kleur of in zwart-wit- op wit A4 papier, leeg aan beide zijden, in portretformaat (verticaal) zonder aanpassing van de printgrootte, op een laser- of inkjetprinter. Het kan in geen enkel geval worden aangeboden op een andere drager (elektronisch, scherm, enz.).
- Een goede afdrukkwaliteit is noodzakelijk. Vervoerbewijzen die slecht werden afgedrukt, die beschadigd, onleesbaar of slechts gedeeltelijk zichtbaar zijn, worden aan boord geweigerd en als ongeldig beschouwd. Bij technische fouten of een ondermaatse kwaliteit van de afdruk moet het pdf-bestand opnieuw worden uitgeprint.
- Dit vervoerbewijs is niet omwisselbaar.
- Dit vervoerbewijs is terugbetaalbaar volgens de terugbetalingsvoorwaarden van het betrokken tarief.
Voor de dag van vertrek is het biljet onmiddellijk terugbetaalbaar.
- De terugbetaling moet steeds bij het oorspronkelijke verkooppunt worden aangevraagd (dus niet mogelijk in stations).
- Dit vervoerbewijs is persoonlijk en niet overdraagbaar. Bij controle moet een geldig identiteitsdocument met foto worden voorgelegd: identiteitskaart of paspoort.
- Voor dit vervoerbewijs geldt een identificatieplicht vanaf 12 jaar.
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig voor de reisweg, de datum en de klasse die op het ticket worden vermeld. Als de aangegeven reisformule een verplichte terugreis veronderstelt, dan moet de reiziger bij controle aan boord beide vervoerbewijzen (heen en terug) kunnen voorleggen.
- Dit vervoerbewijs moet worden bewaard tot bij de uitgang van het station van bestemming.
- Als de bovenvermelde regels niet worden nageleefd, dan wordt dit vervoerbewijs als ongeldig beschouwd.



CNR: XHSH NHHAAB KJGPXE
JSIITG



qmcd jcwp vpjl hgf

Barcode(s) niet vouwen a.u.b.





 CIV 1088 Geldig:16/05/2011		VERVOERBEWIJS BILLET		Diopere,Eveline 01 JONGERE	
				VERTREK -> AANKOMST	
* *	* *	ZONE ANTWERPEN -> EDE-WAGENINGEN	* *	* *	2 *
VIA [1088]*ROOSENDAAL(FR)[1184]*****					
JONGEREN / JEUNES			NS : OP WERKDAGEN GELDIG VANAF 9 U. JULI EN AUGUSTUS ONBEPERKT GELDIG		
			PRIJS: EUR ***21.50 *** *****		
4E5303245173			DNR:PBBFIRB Ref:Internet		
020511		74E53		HB	

16.05.09 12:26

Gebruiksvoorwaarden:

- Dit vervoerbewijs is onderworpen aan de bepalingen van de Uniforme Regels betreffende de Overeenkomst van Internationaal Spoorwegvervoer van Reizigers en Bagage (CIV), aan de voorwaarden verbonden aan de gekozen reisformule en aan volgende speciale voorwaarden die u hebt aanvaard bij aankoop van dit vervoerbewijs:
 - Dit vervoerbewijs is alleen geldig als het is afgedrukt -in kleur of in zwart-wit- op wit A4 papier, leeg aan beide zijden, in portretformaat (verticaal) zonder aanpassing van de printgrootte, op een laser- of inkjetprinter. Het kan in geen enkel geval worden aangeboden op een andere drager (elektronisch, scherm, enz.).
 - Een goede afdrukkwaliteit is noodzakelijk. Vervoerbewijzen die slecht werden afgedrukt, die beschadigd, onleesbaar of slechts gedeeltelijk zichtbaar zijn, worden aan boord geweigerd en als ongeldig beschouwd. Bij technische fouten of een ondermaatse kwaliteit van de afdruk moet het pdf-bestand opnieuw worden uitgeprint.
 - Dit vervoerbewijs is niet omwisselbaar.
 - Dit vervoerbewijs is terugbetaalbaar volgens de terugbetalingsvoorwaarden van het betrokken tarief.
- Voor de dag van vertrek is het biljet onmiddellijk terugbetaalbaar.
- De terugbetaling moet steeds bij het oorspronkelijke verkooppunt worden aangevraagd (dus niet mogelijk in stations).
 - Dit vervoerbewijs is persoonlijk en niet overdraagbaar. Bij controle moet een geldig identiteitsdocument met foto worden voorgelegd: identiteitskaart of paspoort.
 - Voor dit vervoerbewijs geldt een identificatieplicht vanaf 12 jaar.
 - Dit vervoerbewijs is alleen geldig voor de reisweg, de datum en de klasse die op het ticket worden vermeld. Als de aangegeven reisformule een verplichte terugreis veronderstelt, dan moet de reiziger bij controle aan boord beide vervoerbewijzen (heen en terug) kunnen voorleggen.
 - Dit vervoerbewijs moet worden bewaard tot bij de uitgang van het station van bestemming.
 - Als de bovenvermelde regels niet worden nageleefd, dan wordt dit vervoerbewijs als ongeldig beschouwd.



CNR: OJCB EHQDTK GIKJCB
KTRHW



gods zekx nikh nni

Barcode(s) niet vouwen a.u.b.





 VERVOERBEWIJS BILLET		Diopere,Eveline	
		01 JONGERE	
CIV 1088 Geldig:25/04/2011			
		VERTREK	-> AANKOMST
*	*	ZONE ANTWERPEN	-> EDE-WAGENINGEN
*	*		
VIA [1088]*ROOSENDAAL(FR)[1124]*****			
JONGEREN / JEUNES		NS : OP WERKDAGEN GELDIG VANAF 9 U. JULI EN AUGUSTUS ONBEPERKT GELDIG	
		PRIJS: EUR ***21.50 *****	
		DNR:XFRSGDZ Ref:Internet	
		3FF903360596	
		180411 73FF9 HB	

25.04.1607
2156

Gebruiksvoorwaarden:

- Dit vervoerbewijs is onderworpen aan de bepalingen van de Uniforme Regels betreffende de Overeenkomst van Internationaal Spoorwegvervoer van Reizigers en Bagage (CIV), aan de voorwaarden verbonden aan de gekozen reisformule en aan volgende speciale voorwaarden die u hebt aanvaard bij aankoop van dit vervoerbewijs:
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig als het is afgedrukt -in kleur of in zwart-wit- op wit A4 papier, leeg aan beide zijden, in portretformaat (verticaal) zonder aanpassing van de printgrootte, op een laser- of inkjetprinter. Het kan in geen enkel geval worden aangeboden op een andere drager (elektronisch, scherm, enz.).
- Een goede afdrukkwaliteit is noodzakelijk. Vervoerbewijzen die slecht werden afgedrukt, die beschadigd, onleesbaar of slechts gedeeltelijk zichtbaar zijn, worden aan boord geweigerd en als ongeldig beschouwd. Bij technische fouten of een ondermaatse kwaliteit van de afdruk moet het pdf-bestand opnieuw worden uitgeprint.
- Dit vervoerbewijs is niet omwisselbaar.
- Dit vervoerbewijs is terugbetaalbaar volgens de terugbetalingsvoorwaarden van het betrokken tarief.
Voor de dag van vertrek is het biljet onmiddellijk terugbetaalbaar.
- De terugbetaling moet steeds bij het oorspronkelijke verkooppunt worden aangevraagd (dus niet mogelijk in stations).
- Dit vervoerbewijs is persoonlijk en niet overdraagbaar. Bij controle moet een geldig identiteitsdocument met foto worden voorgelegd: identiteitskaart of paspoort.
- Voor dit vervoerbewijs geldt een identificatieplicht vanaf 12 jaar.
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig voor de reisweg, de datum en de klasse die op het ticket worden vermeld. Als de aangegeven reisformule een verplichte terugreis veronderstelt, dan moet de reiziger bij controle aan boord beide vervoerbewijzen (heen en terug) kunnen voorleggen.
- Dit vervoerbewijs moet worden bewaard tot bij de uitgang van het station van bestemming.
- Als de bovenvermelde regels niet worden nageleefd, dan wordt dit vervoerbewijs als ongeldig beschouwd.



CNR: MDFP JHKTBO KKGUJ
ISJJSW



fwij celq qzem suz

Barcode(s) niet vouwen a.u.b.





		VERVOERBEWIJS BILLET		Diopere,Eveline	
				01 JONGERE	
CIV 1088					
Geldig:23/05/2011					
		VERTREK	-> AANKOMST		
*	*	ZONE ANTWERPEN	-> EDE-WAGENINGEN	*	KLASSE
*	*			*	2
VIA [1088]*ROOSENDAAL(FR)[1184]*****					
JONGEREN/JEUNES			NS : OP WERKDAGEN GELDIG VANAF 9 U. JULI EN AUGUSTUS ONREPERKT GELDIG		
			PRIJS: EUR ***21.50 *****		
			DNR:RBSTARA Ref:Internet		
3FFA03569478					
220511		73FFA		HB	

3102 23.05. 031.201

Gebruiksvoorwaarden:

Dit vervoerbewijs is onderworpen aan de bepalingen van de Uniforme Regels betreffende de Overeenkomst van Internationaal Spoorwegvervoer van Reizigers en Bagage (CIV), aan de voorwaarden verbonden aan de gekozen reisformule en aan volgende speciale voorwaarden die u hebt aanvaard bij aankoop van dit vervoerbewijs:

- Dit vervoerbewijs is alleen geldig als het is afgedrukt -in kleur of in zwart-wit- op wit A4 papier, leeg aan beide zijden, in portretformaat (verticaal) zonder aanpassing van de printgrootte, op een laser- of inkjetprinter. Het kan in geen enkel geval worden aangeboden op een andere drager (elektronisch, scherm, enz.).
- Een goede afdrukkwaliteit is noodzakelijk. Vervoerbewijzen die slecht werden afgedrukt, die beschadigd, onleesbaar of slechts gedeeltelijk zichtbaar zijn, worden aan boord geweigerd en als ongeldig beschouwd. Bij technische fouten of een ondermaatse kwaliteit van de afdruk moet het pdf-bestand opnieuw worden uitgeprint.
- Dit vervoerbewijs is niet omwisselbaar.
- Dit vervoerbewijs is terugbetaalbaar volgens de terugbetalingsvoorwaarden van het betrokken tarief.
Voor de dag van vertrek is het biljet onmiddellijk terugbetaalbaar.
- De terugbetaling moet steeds bij het oorspronkelijke verkooppunt worden aangevraagd (dus niet mogelijk in stations).
- Dit vervoerbewijs is persoonlijk en niet overdraagbaar. Bij controle moet een geldig identiteitsdocument met foto worden voorgelegd: identiteitskaart of paspoort.
- Voor dit vervoerbewijs geldt een identificatieplicht vanaf 12 jaar.
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig voor de reisweg, de datum en de klasse die op het ticket worden vermeld. Als de aangegeven reisformule een verplichte terugreis veronderstelt, dan moet de reiziger bij controle aan boord beide vervoerbewijzen (heen en terug) kunnen voorleggen.
- Dit vervoerbewijs moet worden bewaard tot bij de uitgang van het station van bestemming.
- Als de bovenvermelde regels niet worden nageleefd, dan wordt dit vervoerbewijs als ongeldig beschouwd.



CNR: IYVU JGJTCJ IQPGSL
CGDCWG



oynp woxi aadv zdv

Barcode(s) niet vouwen a.u.b.



(B)		VERVOERBEWIJS BILLET		Diopere,Eveline		
CIV 1088				01 JONGERE		
Geldig:31/05/2011						
		VERTREK	-> AANKOMST			KLASSE
☆	☆	ZONE ANTWERPEN	-> EDE-WAGENINGEN	☆	☆	2
☆	☆			☆	☆	☆
VIA [1088]*ROOSENDAAL(FR)[1184]*****						
JONGEREN/ JEUNES			NS : OP WERKDAGEN GELDIG VANAF 9 U. JULI EN AUGUSTUS ONBEPERKT GELDIG			
			PRIJS: EUR ****21.50 *****			
3FFC03617329			DNR:OHBWQMI Ref:Internet			
300511			73FFC HB			

Gebruiksvoorwaarden:

- Dit vervoerbewijs is onderworpen aan de bepalingen van de Uniforme Regels betreffende de Overeenkomst van Internationaal Spoorwegvervoer van Reizigers en Bagage (CIV), aan de voorwaarden verbonden aan de gekozen reisformule en aan volgende speciale voorwaarden die u hebt aanvaard bij aankoop van dit vervoerbewijs:
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig als het is afgedrukt -in kleur of in zwart-wit- op wit A4 papier, leeg aan beide zijden, in portretformaat (verticaal) zonder aanpassing van de printgrootte, op een laser- of inkjetprinter. Het kan in geen enkel geval worden aangeboden op een andere drager (elektronisch, scherm, enz.).
- Een goede afdrukkwaliteit is noodzakelijk. Vervoerbewijzen die slecht werden afgedrukt, die beschadigd, onleesbaar of slechts gedeeltelijk zichtbaar zijn, worden aan boord geweigerd en als ongeldig beschouwd. Bij technische fouten of een ondermaatse kwaliteit van de afdruk moet het pdf-bestand opnieuw worden uitgeprint.
- Dit vervoerbewijs is niet omwisselbaar.
- Dit vervoerbewijs is terugbetaalbaar volgens de terugbetalingsvoorwaarden van het betrokken tarief.
- Voor de dag van vertrek is het biljet onmiddellijk terugbetaalbaar.
- De terugbetaling moet steeds bij het oorspronkelijke verkooppunt worden aangevraagd (dus niet mogelijk in stations).
- Dit vervoerbewijs is persoonlijk en niet overdraagbaar. Bij controle moet een geldig identiteitsdocument met foto worden voorgelegd: identiteitskaart of paspoort.
- Voor dit vervoerbewijs geldt een identificatieplicht vanaf 12 jaar.
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig voor de reisweg, de datum en de klasse die op het ticket worden vermeld. Als de aangegeven reisformule een verplichte terugreis veronderstelt, dan moet de reiziger bij controle aan boord beide vervoerbewijzen (heen en terug) kunnen voorleggen.
- Dit vervoerbewijs moet worden bewaard tot bij de uitgang van het station van bestemming.
- Als de bovenvermelde regels niet worden nageleefd, dan wordt dit vervoerbewijs als ongeldig beschouwd.

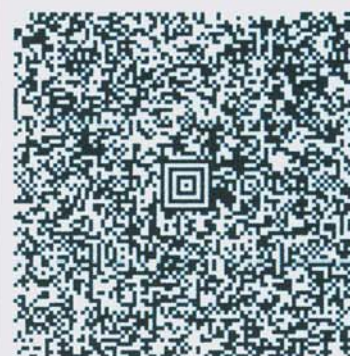


CNR: UDZJ ALFWRB NCQXHI
RWXQMW



burm dzvu qrzw lvd

Barcode(s) niet vouwen a.u.b.



(B)		VERVOERBEWIJS BILLET		Diopere,Eveline	
CIV 1088				01 JONGERE	
Geldig:27/06/2011					
		VERTREK	-> AANKOMST		
☆	☆	ZONE ANTWERPEN	-> EDE-WAGENINGEN	☆	☆
☆	☆			☆	☆
VIA		[1088]*ROOSENDAAL(FR)[1184]*****			
JONGEREN / JEUNES		NS : OP WERKDAGEN GELDIG VANAF 9 U. JULI EN AUGUSTUS ONBEPERKT GELDIG		PRIJS: EUR *****21.50 *****	
		3FFC03758684		DNR:VRHNKJJ Ref:Internet	
		270611 73FFC		HB	

Gebruiksvoorwaarden:

- Dit vervoerbewijs is onderworpen aan de bepalingen van de Uniforme Regels betreffende de Overeenkomst van Internationaal Spoorwegvervoer van Reizigers en Bagage (CIV), aan de voorwaarden verbonden aan de gekozen reisformule en aan volgende speciale voorwaarden die u hebt aanvaard bij aankoop van dit vervoerbewijs:
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig als het is afgedrukt -in kleur of in zwart-wit- op wit A4 papier, leeg aan beide zijden, in portretformaat (verticaal) zonder aanpassing van de printgrootte, op een laser- of inkjetprinter. Het kan in geen enkel geval worden aangeboden op een andere drager (elektronisch, scherm, enz.).
- Een goede afdrukkwaliteit is noodzakelijk. Vervoerbewijzen die slecht werden afgedrukt, die beschadigd, onleesbaar of slechts gedeeltelijk zichtbaar zijn, worden aan boord geweigerd en als ongeldig beschouwd. Bij technische fouten of een ondermaatse kwaliteit van de afdruk moet het pdf-bestand opnieuw worden uitgeprint.
- Dit vervoerbewijs is niet omwisselbaar.
- Dit vervoerbewijs is terugbetaalbaar volgens de terugbetalingsvoorwaarden van het betrokken tarief.
Voor de dag van vertrek is het biljet onmiddellijk terugbetaalbaar.
- De terugbetaling moet steeds bij het oorspronkelijke verkooppunt worden aangevraagd (dus niet mogelijk in stations).
- Dit vervoerbewijs is persoonlijk en niet overdraagbaar. Bij controle moet een geldig identiteitsdocument met foto worden voorgelegd: identiteitskaart of paspoort.
- Voor dit vervoerbewijs geldt een identificatieplicht vanaf 12 jaar.
- Dit vervoerbewijs is alleen geldig voor de reisweg, de datum en de klasse die op het ticket worden vermeld. Als de aangegeven reisformule een verplichte terugreis veronderstelt, dan moet de reiziger bij controle aan boord beide vervoerbewijzen (heen en terug) kunnen voorleggen.
- Dit vervoerbewijs moet worden bewaard tot bij de uitgang van het station van bestemming.
- Als de bovenvermelde regels niet worden nageleefd, dan wordt dit vervoerbewijs als ongeldig beschouwd.



CNR: JBLJ AOBXDK YCJWXW
JMIXVG



rsdo dwdm xseb cik

Barcode(s) niet vouwen a.u.b.

