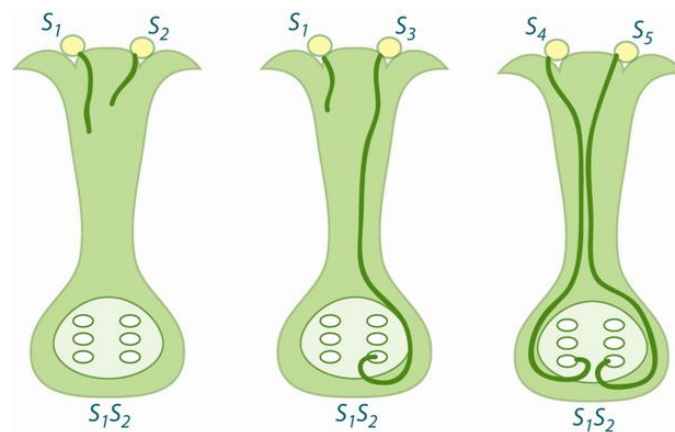


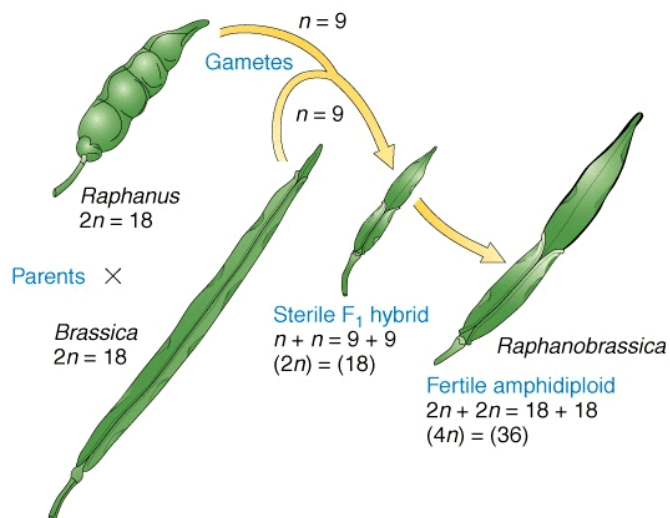
Dictaat

Kruisingsbarrières

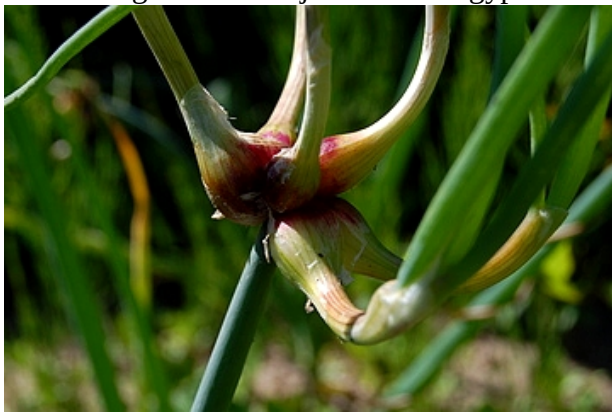


Inhoudsopgave

1. Inleiding	1
De ontwikkelingen in de land- en tuinbouw gaan snel. De behoefte aan betere rassen neemt toe als gevolg van een toenemende bevolkingspopulatie, een afnemende hoeveelheid vruchtbare grond (steden worden meestal gebouwd en uitgebreid in gebieden met vruchtbare grond) en een ander gebruik van vruchtbare grond bijvoorbeeld voor biobrandstoffen. De verwachting is dat de wereldbevolking in 2050 gestegen is met 50% tot 9 mld. De grootste bevolkingsgroei vindt in Azië plaats, waar op veel locaties de bevolking verdubbelt. Technische innovaties vragen om, daaraan aangepaste rassen. Ondanks de onbegrensd lijkende mogelijkheden van genetisch gemanipuleerde planten (GMO's), blijft een traditionele kruising gevolgd door traditionele selectiemethoden de basis voor nieuwe rassen.1 De behoefte aan kruising met verre verwanten van cultuurgewassen in verband met het inbouwen van resistenties en stresstolerantiegeenen, kan leiden tot een toename van kruisingsproblemen.	1
2. Kruisingsbarrières	2
In dit hoofdstuk wordt ingegaan op de belangrijkste problemen, signaleringsmethoden en oplossingen.	2
2.1 Inleiding	2
Gewassen die door zaad vermeerderd werden of nog worden, zullen relatief gemakkelijk binnen de soort met elkaar gekruist kunnen worden. Afhankelijk van het effect van de evolutie op de verschillende soorten binnen een geslacht, zijn soorten relatief makkelijk onderling te kruisen (sla, tomaat, kool) of moeilijk (komkommer). Soms is het zelfs mogelijk geslachten te kruisen. Een voorbeeld van het commercieel maken van een geslachtskruising is Raphanobrassica, die als groenbemester wordt gebruikt. Bij de vegetatief vermeerderde gewassen, waar meestal niet is geselecteerd op generatieve vermeerdering, kunnen problemen in de generatieve fase de veredeling lastig maken. Zo zijn er voorbeelden van planten die nooit bloeien (Egyptische ui die een bloeiwijze lijkt te maken, maar die uitsluitend nieuwe bollen bevat die door hun gewicht op de grond terechtkomen en de volgende generatie vormen, sommige knoflookrassen die niet bloeien, bamboe die afhankelijk van de soort slechts eens per 100 jaar bloeit), planten die helemaal steriel zijn (banaan, de tulp Apeldoorn, <i>Calathea crocata</i>), maar ook normaal zaad producerende voorbeelden (Pelargonium, roos) en zelfs voorbeelden van planten waarbij kruisingen tussen verschillende geslachten nog mogelijk zijn (orchideeën, Cruciferae).....	2
Afbeelding 2: Ontstaan van Raphanobrassica (www.mun.ca).....	2



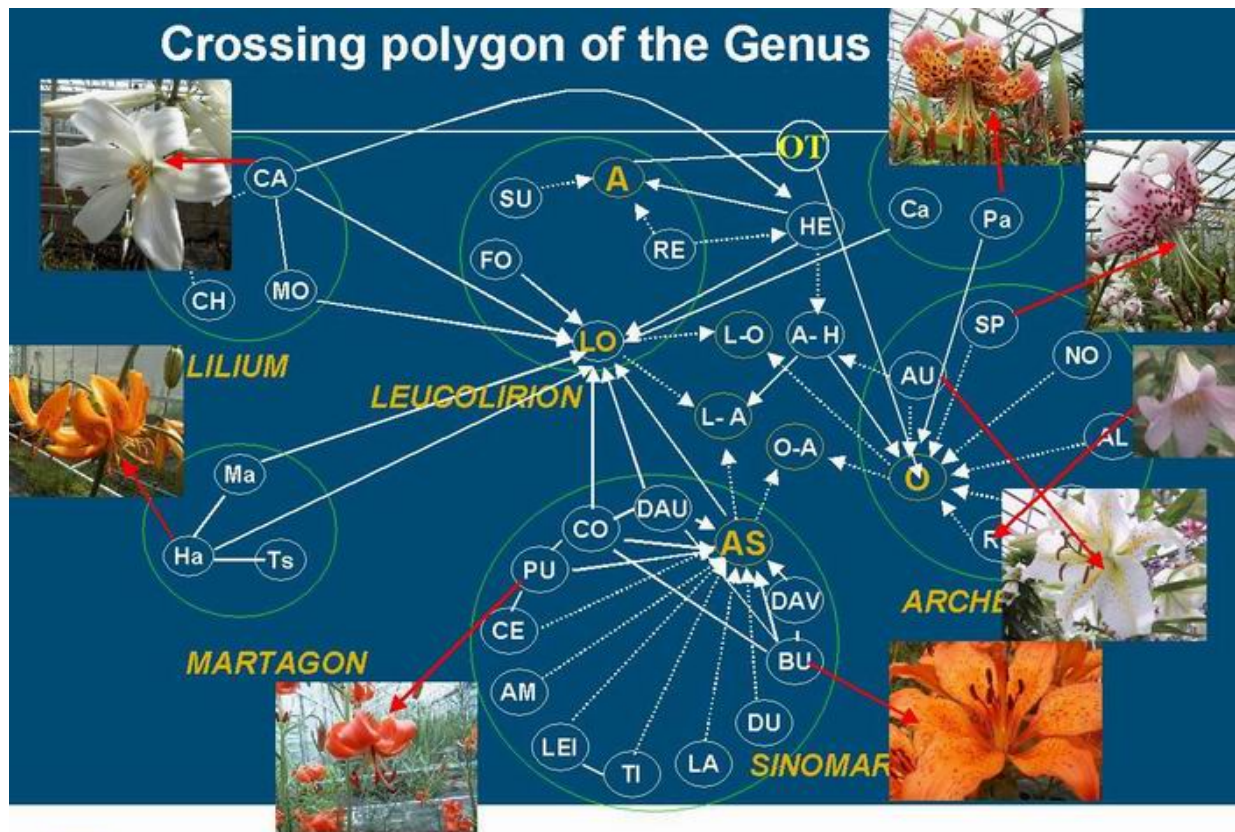
Afbeelding 3: 'Bloeiwijze' van de Egyptische ui (www.vergetengroenten.be). 2



3

Van een aantal belangrijke gewassen is de verwantschap behoorlijk in kaart gebracht. De veredelaar weet dan in ieder geval welke kruisingen technisch mogelijk moeten zijn. Soms zijn daarbij technieken gebruikt die verderop in dit hoofdstuk zijn beschreven. Uit publicaties die ten grondslag liggen aan de verwantschapsfiguren kan worden herleid of de kruisingen normaal zijn uitgevoerd of dat er bijzondere technieken voor nodig waren. Een voorbeeld van een verwantschapsfiguur van lelie komt uit het onderzoek van Jaap van Tuyl en collega's. In dit soort figuren wordt door het ontbreken van lijnen aangegeven dat kruisingen niet lukken, met gestippelde lijnen dat kruisingen moeilijk zijn en alleen met behulp van bijzondere technieken als embryo-rescue slagen. Hoe dikker de lijn des te makkelijker de kruising. Ook is meestal aangegeven in welke richting(en) de kruising lukt. 3

Afbeelding 4: Kruisingsmogelijkheden bij lelie (<http://www.liliumbreeding.nl/polygon.htm>) 4



PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

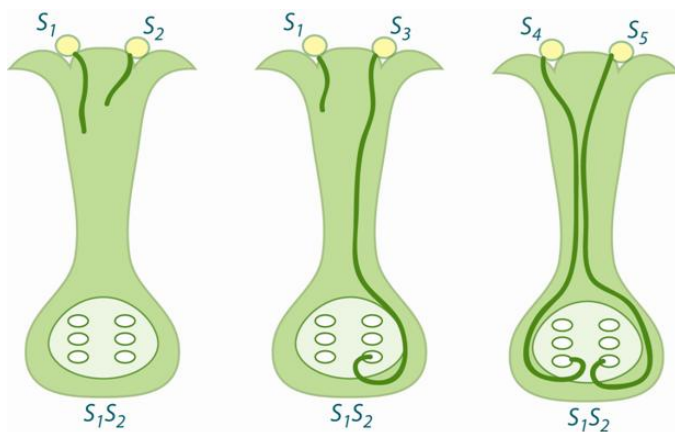
.....	4
In dit hoofdstuk worden de belangrijkste problemen die zich kunnen voordoen bij het maken van kruisingen besproken, wordt gekeken naar het voorkomen van de problemen en het oplossen daarvan en worden enkele technieken besproken om de problemen te signaleren.	4
2.2 Bloei-inductie	4
Veel gewassen gaan snel vanzelf bloeien omdat de omstandigheden waaronder ze groeien blijkbaar gunstig zijn voor bloei. Zelfs bij dit soort gewassen kan het nuttig zijn eens te kijken naar de mogelijkheden van kunstmatige bloei-inductie op de generatieduur. Hoe korter de generatieduur, des te sneller de veredeling kan verlopen. De kortere generatieduur kan wel consequenties hebben voor de selectiemogelijkheden in die generatie; als sla direct gaat schieten, kun je niet op kropeigenschappen selecteren.	4
Wanneer gewassen niet vanzelf gaan bloeien, kan het zijn dat ze in de juveniele fase zitten. In die fase is het onmogelijk bloei te induceren. Veel door zaad vermeerderde gewassen hebben een korte juveniele fase, maar bijvoorbeeld een appel- of tulpenzaailing kan er wel 5-10 jaar over doen voordat bloemen/vruchten ontstaan. Dat vertraagt de veredeling natuurlijk enorm en kan ertoe leiden dat wanneer je je veredelingsdoel eindelijk bereikt, het niet meer actueel is. Willen consumenten over 30 jaar nog steeds fris-zure appels met een mooie rode blos? Als de resistentie voor vuur over 25 jaar in onze tulpen zit, is die dan nog niet doorbroken?	4
Afbeelding 5: Vuur (<i>Botrytis tulipae</i>) in tulp (www.wur.nl).	5



2.3 Ongelijke bloei	5
Ongelijke bloei is vooral lastig bij planten die zelden bloeien (bamboe) en planten die maar weinig bloemen maken en kort bloeien (een extreem voorbeeld is de reuzenaronskelk). Die bloei is vaak ook nog eens niet echt te sturen.	5
Afbeelding 6: Reuzenaronskelk in bloei (www.nos.nl).	5



Ook bij de gewassen die door zaad worden vermeerderd kan ongelijke bloei een probleem zijn. Dat speelt zowel in de veredeling wanneer de te kruisen ouders niet gelijk bloeien, als in de zaadteelt van hybriderassen. Er zijn verschillende hybriden uiteindelijk niet geïntroduceerd omdat het niet mogelijk was voldoende, kwalitatief goed zaad te produceren vanwege bloei problemen.	5
2.4 Incompatibiliteit	5
Bij kruisbevruchtende gewassen komen verschillende, natuurlijke systemen voor om zelfbevruchting en inteelt te voorkomen en kruisbevruchting en genetische recombinatie te bevorderen. Een van die systemen is incompatibiliteit, ook wel zelfincompatibiliteit genoemd. Het voorkomt zelfbevruchting en bevruchting door nauw verwante individuen. Genotypen met dezelfde genetische informatie voor incompatibiliteit (dezelfde S-allelen) zijn niet compatibel en kruisen dus niet met elkaar. Zelfincompatibele planten zijn gewoon fertiel.	5
Afbeelding 7: Principe van incompatibiliteit (www.bio.psu.edu)	6



- Incompatibiliteit berust op zogenaamde S-allelen. Er zijn verschillende incompatibiliteits-systemen bekend, waarvan het gametofytische en het sporofytische systeem het meest voorkomen. Bij gametofytische incompatibiliteit wordt de reactie bepaald door de haploïde kern van de stuifmeelkorrels en de diploïde kernen in de stamper en bij sporofytische incompatibiliteit wordt de reactie bepaald door beide genomen van de vaderplant en de diploïde kernen van de stamper..... 6
- Gametofytische incompatibiliteit komt onder andere voor bij de familie van de Rosaceae. Vanwege de incompatibiliteit staan er in boomgaarden met appel, peer, pruim en kers bestuivers tenzij gebruik is gemaakt van specifiek zelfbestuivende rassen. Bij appel doet zich het vreemde verschijnsel voor dat triploïde rassen als Jonagold en Schone van Boskoop toch vruchten produceren, terwijl je zou verwachten dat ze steriel zouden zijn. Natuurlijk zijn het geen goede bestuivers..... 6
- Afbeelding 8: Bestuivingschema pruim (www.vandiepen.nl) 6
- Afbeelding 9: Bestuivingschema appel 7
- (http://www.marechal.be/foto/bestuivingstabel_appel.jpg) 7

Appel

 Wordt bestoven door	Alkmene	Court Pendu	Cox Orange Pippin	Discovery	Dubbele BelleFleur	Elstar	Gloster	Golden Delicious	James Grieve	Jacques Lebel	Jonagold	Jonathan	Lomberts Calville	Notarisappel	Reinette Etoilée	Rode Boskoop	Schone Boskoop
Alkmene			x	x			x	x	x			x					x
Cox Orange Pippin	x			x			x	x	x			x	x				x
Dubbele BelleFleur								x			x				x		
Elstar	x			x		x	x	x	x		x		x		x		
Gloster	x		x	x			x	x	x						x		
Golden Delicious	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x				
James Grieve	x		x	x		x	x	x	x			x	x				x
Jonagold			x	x	x			x	x		x						
Reinette Etoilée (sterappel)		x			x			x	x								
Rode Boskoop	x		x	x			x		x			x	x			x	
Schone van Boskoop				x			x		x			x	x				
Oogstappel	x		x						x			x					x

- 7
- Sporofytische incompatibiliteit komt onder andere voor bij de familie van de Cruciferae en met behulp van dit systeem zijn bij kool de eerste hybriden gemaakt. 7

Bij een aantal plantensoorten gaat de incompatibiliteit gepaard met een bepaalde bloembouw; heteromorfie. De heteromorfie uit zich meestal in de vorm van heterostylie, het verschijnsel dat binnen de soort verschillende stijllengte voor komt. Bij de zaadteelt van *Primula* maakt men er gebruik van door de planten met de lange stijlen als moeders te gebruiken. Door de incompatibiliteit zullen ze zich niet zelfbevruchten en van de planten met lange meeldraden kan eenvoudig stuifmeel worden verzameld. 7

Afbeelding 10: *Primula veris* met distylie (www-biol.paisley.ac.uk). 7



..... 7

Incompatibiliteit zorgt vooral binnen de soort voor kruisingsproblemen. Het is zelden oorzaak voor het niet kunnen kruisen van planten van verschillende soorten. 7

2.5 Mannelijke steriliteit 8

Mannelijke steriliteit wordt veelgebruikt bij de productie van hybride rassen. Zoals de naam al zegt is de vrouwelijke fertiliteit normaal, maar zijn de mannelijke delen steriel. Op basis van morfologie en anatomie kunnen verschillende vormen van mannelijke steriliteit onderscheiden worden zoals veranderingen van het mannelijk geslachtsapparaat (ontbreken van helmknoppen, reductie van meeldraden tot rudimentaire organen, vervormen van meeldraden tot stamper, vruchtblad of kroonblad (bijvoorbeeld bekend als dubbelbloemigheid bij siergewassen)), functionele mannelijke steriliteit waarbij wel stuifmeel gevormd wordt maar niet vrijkomt, pollensteriliteit waarbij het aanwezige stuifmeel steriel is en tenslotte zou tweehuizigheid als vorm van mannelijke steriliteit gezien kunnen worden. 8

Afbeelding 11: Mannelijk fertiele (links) en steriele (rechts) paprika (Foto J. den Besten). 8



..... 8

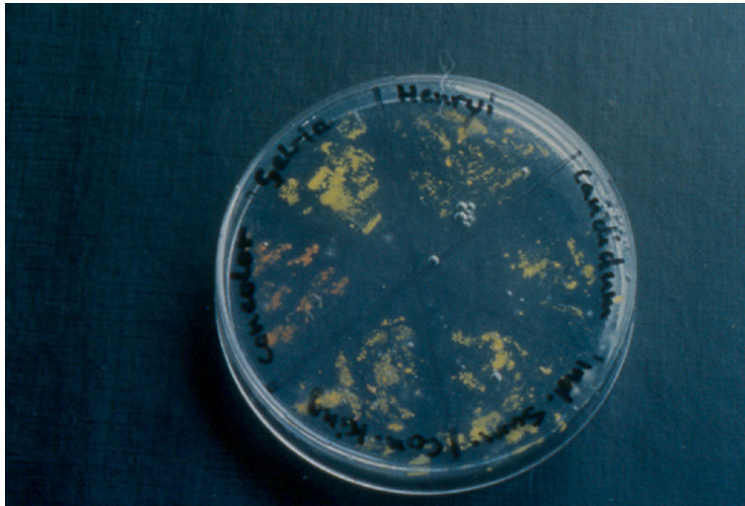
Afbeelding 12: Een dubbelbloemige en dus mannelijk steriele wortelbloem (Foto J. den Besten). 8



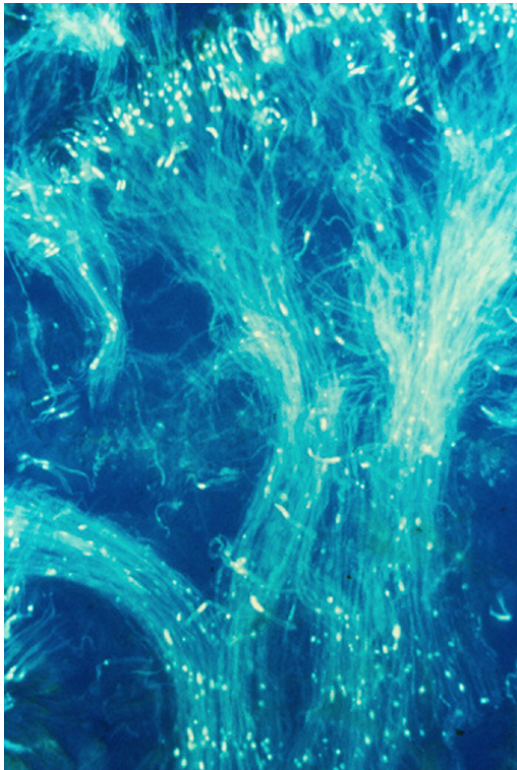
	8
Mannelijke steriliteit kan door uitwendige factoren worden geïnduceerd (gametociden, bestraling, watergebrek, temperatuur) of genetisch van aard zijn als gevolg van een disharmonie tussen de kern (genen) en het plasma. Wanneer de mannelijke steriliteit genetisch van aard is, heet dat cytoplasmatisch-genetische mannelijke steriliteit. Als er alleen verschillende genen zijn (1 plasmatype) spreken we over genetische mannelijke steriliteit en als er verschillende plasmatypen zijn (1 genotype) spreken we over cytoplasmatisch mannelijke steriliteit.	8
2.6 Eenslachtigheid en tweehuizigheid	9
Tweeslachtige bloemen hebben zowel vrouwelijke als mannelijke delen. Eenslachtige bloemen zijn ofwel mannelijk ofwel vrouwelijk, maar meestal komen beide typen bloemen voor op dezelfde plant. Het maken van kruisingen wordt daardoor eenvoudiger, maar het maken van zelfbevruchtingen kan lastig zijn als de mannelijke en vrouwelijke bloemen niet tegelijk bloeien.	9
Tweehuizige planten hebben eenslachtige bloemen die per plant ofwel mannelijk (mannelijke planten) ofwel vrouwelijk (vrouwelijke planten) zijn. Het maken van kruisingen is daardoor wel erg eenvoudig, zelfbevruchting is theoretisch onmogelijk.	9
2.7 Problemen met emasculeren.....	9
Emasculeren is bij veel gewassen geen enkel probleem. Het is een kwestie van kijken op welk moment de meeldraden weggehaald dienen te worden (het stuifmeel dient nog in de helmknoppen te zitten) en te zoeken naar een eenvoudige methode voor het verwijderen van de meeldraden. Vrouwelijke bloemen, mannelijk steriele bloemen en zelfincompatibele bloemen hoeven niet eens geëmasculeerd te worden. Het emasculeren van grote bloemen met relatief weinig meeldraden (bijvoorbeeld lelie) behoeft weinig toelichting. Emasculatie wordt moeilijker naarmate de bloem kleiner is, meer meeldraden bevat of kort bloeit. Aangezien de meeldraden bij veel gewassen dicht bij de stamper staan, kan die door de emasculaties makkelijk beschadigd raken.	9
Een voorbeeld van een gewas met erg kleine bloemen is veldsla. De bloemen ervan zijn zo klein dat emasculaties haast onmogelijk is. Ook sla heeft kleine bloemen die bovendien slechts heel kort te emasculeren zijn. Soms zijn de individuele bloemen nog wel te emasculeren, maar is het zo goed als onmogelijk binnen de hele bloeiwijze alle meeldraden te verwijderen (uien bijvoorbeeld).	9
2.8 Verschillen in ploïdeniveau.....	9
Veel vegetatief vermeerderde gewassen zijn polyploid en verschillende ploïdeniveaus komen binnen 1 soort of geslacht voor.	9
Gewassen die een oneven ploïdeniveau hebben (1x, 3x, 5x enzovoorts) zijn meestal steriel en dus niet kruisbaar. Bekend is dat ‘oneven ploïden’ soms toch nog wat fertil zijn vanwege de	

vorming van ongereduceerde gameten of omdat onevenredige verdeling van chromosomen soms toch fertiele gameten geeft. Meestal neemt de fertiliteit toe met het (oneven) ploïdeniveau, maar blijft op een laag niveau.....	9
Gewassen met een even ploïdeniveau zijn fertiel, maar meestal neemt de fertiliteit af met het ploïdeniveau. Blijkbaar wordt de evenredige verdeling van homologe chromosomen moeilijker en vaak is niet geselecteerd op fertiliteit omdat de planten vegetatief worden vermeerderd.....	9
Het probleem bij het kruisen met verschillende ploïdeniveaus kan zijn dat plasma en chromosomen eigenlijk niet bij elkaar passen met als gevolg chromosoomuitstotingen of embryo-abortie of dat een steriele generatie ontstaat.....	10
Bij veel gewassen neemt de belangstelling voor kruisen met andere soorten toe. Kruising van 2 verschillende, maar (auto-)diploïde soorten, kan ertoe leiden dat de hybride niet meer beschikt over 2 homologe sets chromosomen, maar over chromosomen die niet meer homologoog zijn (allodiploïd). De plant is dan dus steriel vanwege de problemen met de verdeling van homologe chromosomen in de meiose.	10
2.9 Morfologische problemen (stijllengte).....	10
Jaap van Tuyl (WUR) heeft bij lelie veel soortkruisingen gemaakt en soms ging het mis vanwege morfologische verschillen tussen de soorten. Bij lelie is veel variatie in stijllengte en het is logisch te veronderstellen dat lelies met lange stijlen stuifmeel hebben dat in staat is zo'n lange afstand te overbruggen. Lelies met korte stijlen hebben waarschijnlijk heel ander stuifmeel. Het kruisen van langstijlig x kortstijlig geeft natuurlijk eerder problemen dan andersom.	10
2.10 Embryo-abortie.....	10
Hoe minder planten verwant zijn, des te groter de kans dat chromosomen geen homologoog meer hebben en ook mitotische celdelingen fout lopen. Het embryo wordt geaborteerd en als er al zaad wordt gevormd, zal het niet kiemen. Ook als de vaderchromosomen niet bij het cytoplasma van de moeder passen kan het embryo aborteren. De belangrijkste oorzaak van embryo-abortie is waarschijnlijk endospermdegeneratie.	10
2.11 F1-steriliteit en andere complicaties in de F ₁	10
Als weinig verwante planten gekruist worden sterft het embryo soms niet en kiemt het zaad toch. Omdat de chromosomen niet echt homologoog zijn, zal de meiose problemen geven en kan de F ₁ steriel zijn.	10
Omdat de chromosomen van soortkruisingsproducten soms asynchroon mitotisch delen, verdwijnen chromosomen en zelfs genomen. Omdat het plasma via de moeder overerft, kan het ook voorkomen dat de plasmavreemde chromosomen van de vadersoort niet kunnen samenwerken met het plasma van de moedersoort.	10
Als gevolg van een verstoorde genregulatie kunnen allerlei abnormale verschijnselen voorkomen zoals chlorofylgebrek en steriliteit.	10
Wanneer de soorthybriden via zaad nakomelingen produceren, komen soms ongunstige genencombinaties voor die leiden tot gedeeltelijke of gehele 'hybrid break down'. De planten met genencombinaties die het meest op de ouders lijken hebben de grootste overlevingskansen.	10
2.12 Incongruentie.....	11
Incompatibiliteit is het verschijnsel dat planten niet kruisbaar zijn vanwege herkenning tussen weefsel van de stijl en het pollen (meestal op basis S-allelen), incongruentie is het verschijnsel dat planten niet kruisbaar zijn omdat er juist onvoldoende herkenning is. Pollenkorrels zijn erg klein, de weg van stempel naar vruchtbeginsel relatief lang (zeker in vergelijking met de diameter van de pollenkorrel, bij maïs bijvoorbeeld) en interactie tussen moederplant en pollenkorrel is nodig om zo'n weg af te kunnen leggen. Bij stuifmeel dat weinig verwant is, is	

het zelfs mogelijk dat er sprake is van tegenwerking, van barrières die worden opgeworpen door de moederplant. Deze barrières liggen vaak in de stijl.	11
Stuifmeelkorrels kunnen zonder hulp van een moederplant wel kiemen en een redelijk lange pollenbuis maken omdat ze hun inhoud als het ware meenemen naar het voorste deel van de pollenbuis en daar steeds calloseproppen maken om te voorkomen dat het plasma terugloopt. Om echt grote afstanden te overbruggen is meestal wel een positieve interactie tussen pollenkorrel en moederlijk weefsel nodig. Bij een gewas als maïs kunnen de pollenkorrels gemakkelijk de weg door de soms 50 cm of langere stijl afleggen.....	11
Er is sprake van incongruentie als het pollen niet alle genetische informatie bezit, die nodig is om op de stamper te kiemen en door te groeien tot in de zaadknop. Hogenboom heeft de term barriëregen in de stamper en penetratiegenen in het pollen geïntroduceerd. Een plant met een hoge barrière capaciteit en een lage penetratie capaciteit zal met weinig andere soorten kruisbaar zijn. Een plant met een lage barrière capaciteit en een hoge penetratie capaciteit zal met veel andere soorten kruisbaar zijn.	11
In de literatuur wordt vaak de term ‘unilaterale incompatibiliteit’ gebruikt om aan te geven dat kruisingen in de ene richting niet mogelijk zijn terwijl ze in de andere richting wel mogelijk zijn. Beter zou de term ‘unilaterale incongruentie’ zijn. Hoe dan ook is het van belang lastige kruisingen altijd in beide richtingen te maken. <i>Raphanus sativus</i> (radijs) bijvoorbeeld kan als moeder redelijk goed (slagingskans >>10%) gekruist worden met <i>Brassica oleracea</i> (kool), maar omgekeerd lukt dat zelden (<<1%).	11
3. Vroegtijdige signalering van problemen	12
3.1 Inleiding	12
Het maken van kruisingen met steriele vader- of moederplanten heeft niet zoveel zin. Hetzelfde geldt voor het maken van normale kruisingen in geval van incompatibiliteit. Wanneer problemen van deze aard worden verwacht, loont het de moeite om een en ander vroegtijdig te signaleren. Daar zijn verschillende, relatief eenvoudige technieken voor die achtereenvolgens worden behandeld.....	12
3.2. Fertiliteit	12
Het controleren van de fertiliteit van een plant kan opgedeeld worden in het controleren van de vrouwelijke fertiliteit en het controleren van de mannelijke fertiliteit.....	12
De controle van de vrouwelijke fertiliteit gebeurt meestal door een moederplant te bestuiven met een mengsel van stuifmeel en te kijken of er zaad wordt gevormd. Daarbij hoeft niet gewacht te worden tot het zaad rijp is, afhankelijk van het gewas kun je enkele dagen of weken na de bestuiving al zien of er zaad wordt gevormd.	12
De controle van de mannelijke fertiliteit gebeurt deels visueel (zijn er meeldraden, hebben die helmknoppen, zit daar stuifmeel in) en deels via kleuring of kieming van het pollen. Er zijn verschillende kleurstoffen bekend die geschikt zijn om stuifmeel te kleuren. Vervolgens kan onder een microscoop bepaald worden wat het percentage gekleurde stuifmeelkorrels is. Dat is dan een maat voor de hoeveelheid levende stuifmeelkorrels. Dat hoeft niet hetzelfde te zijn als het percentage kiemende stuifmeelkorrels, al zal er wel meestal een duidelijke (positieve) correlatie zijn. Het is ook mogelijk stuifmeelkorrels te laten kiemen op kunstmatige media. Binnen een paar uur is dan duidelijk wat het percentage kiemende stuifmeelkorrels bedraagt.	12
Afbeelding 13: Stuifmeelkieming van lelie in vitro (Foto J. den Besten).....	12



.....	12
3.3 Incompatibiliteit	13
Aantonen van incompatibiliteit is gecompliceerd vanwege het feit dat binnen een gewas veel verschillende S-allelen kunnen voorkomen die niet alle even sterk werken en het milieu een belangrijke rol bij de sterkte van de incompatibiliteitsreactie kan spelen. Wanneer er sprake is van incompatibiliteit, zijn de planten vrouwelijk en mannelijk fertil. Een snelle methode om vast te stellen of er sprake is van incompatibiliteit, is het kijken naar de pollenbuisgroei in de stamper (stijl). Callose in de groeiende pollenbuizen kan met aniline blauw worden gekleurd. In de rondes van een groeiende pollenbuis is een dun laagje callose aanwezig, terwijl deze kamers van tijd tot tijd worden afgesloten met een calloseprop. Door een UV-microscoop licht de callose groen op. Daardoor kan men de doorgroeiende pollenbuis in de stijl eenvoudig waarnemen.	13
Voor het bepalen van het type S-allel (er is meestal sprake van multiple allelie met tot enkele tientallen S-allelen) en het type van sporofytische incompatibiliteit is een reeks referentieplanten nodig waarvan dit bekend is.	13
Afbeelding 14: UV-microscopopname van een compatibele reactie, de pollenbuizen groeien vanaf de stempel (bovenin) naar het vruchtbeginsel van kool (Foto J. den Besten).	13



3.4 Ploïdiebepaling.....	13
In het algemeen kun je zeggen dat met een hoger ploïdeniveau de grootte van de plant toeneemt en het aantal bladeren en bloemen afneemt. Vaak wordt de lengte:breedte-verhouding van bladeren kleiner. Vaak is de toename van de dikte van het blad al een indicatie dat het ploïdieniveau is toegenomen.	14
Afbeelding 15: Diploïde en tetraploïde leeuwenbek (Foto J. den Besten).....	14



.....	14
-------	----

Afbeelding 16: Een van de radijsrassen is tetraploïd (Foto J. den Besten).

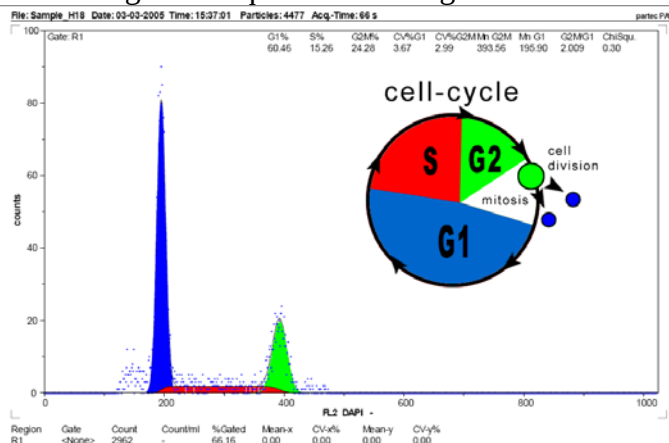


..... 14

Het ploïdeniveau van planten kan bepaald worden door preparaten te maken van de metafase I van de meiose. Een kwestie van het juiste stadium zoeken, de juiste kleuringstechniek gebruiken en kijken hoe de chromosomen in het equatoriale vlak liggen. Heeft elk chromosoom een homolog, dan is er sprake van een autodiploïd. Zo kun je ook diploïden, tetraploïden enzovoorts zien. De beschrijving lijkt eenvoudig, maar de praktijk is wat ingewikkelder. De metafase die je zo graag wilt zien is de kortst durende fase van de celdeling en het maken van de preparaten moet precies op het juiste moment plaatsvinden. Dat is per plant en per seizoen anders en dus niet eenvoudig. Je zult vooral veel interfases zien. Als het wel lukt blijken veel planten hele kleine chromosomen te hebben waar je nauwelijks iets met een lichtmicroscop aan kunt zien of er zo veel te hebben dat de gewenste waarnemingen niet te doen zijn. 14

Behoorlijk precies, maar voor de kleinere, meestal veredelaars in siergewassen nogal duur, is de bepaling met behulp van een flowcytometer. Met een flowcytometer wordt de hoeveelheid DNA bepaald via het meten van de fluorescentieactiviteit van specifiek gekleurde celkernen. De hoeveelheid DNA van een diploïde plant ziet er dan als volgt uit in grafiek..... 15

Afbeelding 17: Frequentieverdeling DNA-hoeveelheid (www.plantcytometrie.nl)..... 15



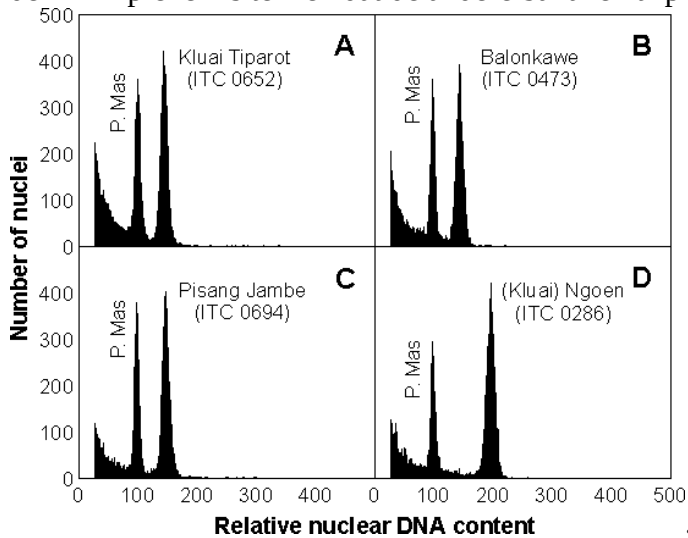
..... 15

Afhankelijk van de fase van celdeling bevatten celkernen vlak voor de verdeling van de chromosomen de dubbele hoeveelheid DNA. 15

Wanneer naast een onbekend monster ook monsters met bekend ploïdeniveau worden geanalyseerd, kan het ploïdeniveau vrij nauwkeurig worden vastgesteld. Wanneer van een groot aantal onbekende planten het ploïdeniveau moet worden bepaald, kan een mengmonster worden geanalyseerd. Geeft dat een beeld vergelijkbaar met bovenstaande figuur, dan hebben alle onbekende planten hetzelfde ploïdeniveau en hoeven de planten niet apart te worden geanalyseerd. 15

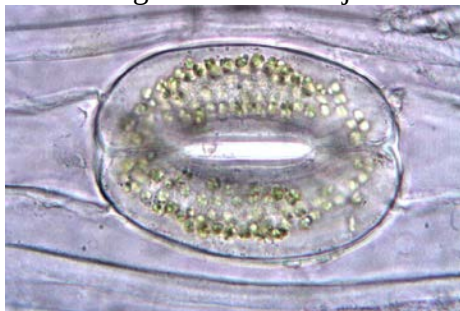
Figuur 18: Flowcytometrische bepaling aan banaan. P. mas is diploïd. Aan de hand van 15

de DNA-pieken is te zien dat de andere bananen triploïd of tetraploïd zijn (FAO)..... 15



Twee relatief eenvoudige andere methoden om iets te zeggen over het ploïdeniveau zijn de chloroplasten in de sluitcellen van de huidmondjes en de kiemporen in de pollenkorrels. Het aantal chloroplasten in de sluitcellen van de huidmondjes is gecorreleerd met het ploïdeniveau. Bij veel gewassen is de epidermis eenvoudig te verwijderen en zijn de sluitcellen onder de microscoop goed zichtbaar en de chloroplasten te tellen. Afhankelijk van het gewas zitten de meeste huidmondjes aan de bovenkant (tuinboon) of onderkant (leeuwenbek) van het blad. Het aantal kiemporen van de pollenkorrels is ook gerelateerd aan het ploïdeniveau. Door de pollenkorrels in een reagens te doen dat als het ware de inhoud naar buiten trekt, worden de kiemporen zichtbaar als uitstulpingen. Van grote aantallen pollenkorrels kan snel het aantal kiemporen worden bekeken. Dit soort methoden is een redelijk betrouwbare eerste screening, waarna voor de zekerheid monsters gestuurd kunnen worden naar een lab met een flowcytometer..... 16

Afbeelding 19: Huidmondje met chloroplasten bij hyacint (www.ronaldschulte.nl). 16



4. Oplossingen voor kruisingsbarrières 16

4.1 Inleiding 17

In theorie kunnen heel veel kruisingen niet die in de praktijk soms toch lukken. Steriele planten maken soms toch eicellen en/of pollenkorrels. De minivarianten van het potplantje *Exacum affine* worden gestekt omdat ze steriel zijn. Als je het stuifmeel onder een microscoop bekijkt zie je al snel naast de vele lege pollenkorrels een paar goed gevulde. Die blijken rood te kleuren na behandeling met tetrazolium en leven dus. Als je zelfbevruchtingen maakt, krijg je vaak toch een paar zaden. Zaai je die uit, dan krijg je het grote type, dat door zaad wordt vermeerderd. Blijkbaar is er sprake van zowel ongereduceerde eicellen als pollenkorrels. We vinden het ook normaal dat er (triploïde!) appelvruchten zijn, zoals bij de Jonagold en

Goudreinette (Schone van Boskoop). Deze rassen zijn slechte bestuivers en bevatten ook weinig zaad.....	17
Het doorbreken van kruisingsbarrières vraagt doorzettingsvermogen en creativiteit. Elk gewas is anders en er kan vaak meer dan je op basis van boeken denkt. In dit onderdeel worden verschillende voorbeelden gegeven van soms heel creatieve oplossingen.	17
4.2 Bloei-inductie	17
Wanneer het gewas uit de juveniele fase is, komt het vanzelf in bloei, gestuurd via ouderdomsprocessen en de daarbij behorende veranderende verhouding tussen groeiregulators. Sommige gewassen gaan pas bloeien nadat de bloei geïnduceerd is, veelal via daglengte of temperatuur. Bij veel gewassen is wel te achterhalen wanneer de plant in het oorsprongsgebied bloeit en hoe de inductie moet verlopen.	17
Na de bloei-inductie dient de bloei nog gerealiseerd te worden. Meestal lukt dat onder normale omstandigheden wel, soms helpt het de plant flink stress te geven (generatief sturen).	17
Als het niet mogelijk is bloei te induceren en te kruisen, wordt de veredeling erg lastig. Mutatieveredeling is nogal ongericht en onzeker. Genetische transformatie is niet wereldwijd toepasbaar (vooral in de Westerse wereld niet). Verzamelen en vergelijken van materiaal van zoveel mogelijk verschillende bronnen, kan leiden tot het vinden van het beste genotype. Ook kan het zijn dat binnen bestaande rassen spontane mutaties zijn opgetreden en dan kan selectie binnen 1 ras (dat eigenlijk vanwege de vegetatieve vermeerdering genetisch uniform zou moeten zijn) toch leiden tot een verbeterd type. Voor dit soort ‘afgeleide’ rassen dient een deel van de royalty’s aan de originele eigenaar afgedragen te worden.....	17
4.3 Ongelijke bloei	17
Bij de meeste gewassen is ongelijke bloei alleen maar lastig, maar oplossingen als gespreid over de tijd zaaien, stekken en bloei induceren liggen voor de hand. Ook verschillende klimaatinstellingen kunnen de bloei recht trekken. Gaat het echt mis, dan is stuifmeelbewaring de enige oplossing. De bewaarbaarheid van stuifmeel verschilt van gewas tot gewas. Het nadeel is natuurlijk dat je de eerst-bloeiende ouder alleen als vader kunt gebruiken en dat je eventuele cytoplasmatische kenmerken kwijtraakt uit dit materiaal.....	17
Afhankelijk van de soort, kan stuifmeel korter of langer worden bewaard. Vers stuifmeel van slechte kwaliteit is natuurlijk heel slecht bewaarbaar omdat de kiemkracht tijdens de bewaring afneemt.	18
Stuifmeel kun je in het algemeen enkele dagen bij kamertemperatuur bewaren in bijvoorbeeld een petriglas dat niet helemaal is afgesloten.. In een excicator met een lage relatieve luchtvochtigheid kun je het vaak enkele weken goed houden, in de huishouddiepvries lukt dat maanden en in de vloeibare stikstof jaren. Van verschillende gewassen is in de literatuur wel te vinden hoe de procedure precies moet verlopen. Het invriezen zelf is meestal geen probleem, het ontdooien lijkt lastiger.....	18
Afbeelding 20: Bewaring van stuifmeel in een excicator (Foto J. den Besten).	18



.....	18
4.4 Incompatibiliteit	18
Incompatibiliteit is vroeger veel in kool gebruikt bij het maken van hybriden. Een probleem daarbij is dat de veredelaar enerzijds een sterk incompatibiliteitsysteem wil hebben zodat er weinig inteeltplanten in de hybriden zullen zijn, maar anderzijds de inteeltlijnen wel wil kunnen intelen. Er zijn verschillende manieren ontwikkeld om de incompatibiliteit te omzeilen.	18
De Japanse onderzoeker Kakizaki heeft ontdekt dat het incompatibiliteitsysteem het beste werkt rondom het moment van bloei. In jonge bloemknoppen werkt de incompatibiliteit minder terwijl de stamper wel enigszins receptief is. Ook in oude bloemen werkt het systeem minder goed terwijl de stamper nog wel bestoven kan worden. Veredelaars maken hiervan gebruik door jonge bloemen te bestuiven; knopbestuiving.....	18
Ook is bekend dat het milieu in het algemeen van invloed kan zijn op het incompatibiliteit - systeem. Licht, temperatuur, luchtvochtigheid, samenstelling van de lucht kunnen de sterkte van het systeem beïnvloeden. Bij kool heft een zogenaamde CO ₂ -narcose de incompatibiliteit voor een belangrijk deel op. Op deze wijze wordt het vaak mogelijk voldoende zaad te maken van de inteeltlijnen voor de uiteindelijke productie van hybridezaad.....	18
Als deze technieken niet voldoende resultaat geven, bestaat nog de mogelijkheid om in te telen via isogene lijnen, die steeds met elkaar gekruist worden:	19
$S1S1 \times S2S2 \rightarrow \frac{1}{4} S1S1 + \frac{1}{2} S1S2 + \frac{1}{4} S2S2$	19
$S1S1$ wordt weer gekruist met $S2S2$ enzovoorts. Op de S-allelen na worden de planten hetzelfde, de zogenaamde isogene lijnen.	19
4.5 Mannelijke steriliteit	19
Wanneer sprake is van mannelijke steriliteit, is die in het algemeen niet op te heffen. Slechts in het geval van functionele mannelijke steriliteit, is door het openen van helmknoppen op eenvoudige wijze toch stuifmeel te krijgen. Ook wanneer de mannelijke steriliteit veroorzaakt is door milieu-invloed, is door het creëren van een ander milieu mogelijk toch stuifmeel te krijgen. In alle andere gevallen kan de mannelijk steriele plant niet als vader gebruikt worden. Uiteraard is het wel mogelijk de mannelijk steriele plant als moeder te gebruiken in kruisingen in de veredeling en hybridezaadteelt. Bij bijvoorbeeld paprika (<i>Capsicum annuum</i> L.) komt genetische en cytoplasmatische mannelijke steriliteit voor. Afhankelijk van de te oogsten delen van de hybride (vruchten bij paprika of niet-generatieve delen zoals bij peen (<i>Daucus carota</i> L.) moet rekening gehouden worden met de fertiliteit van de hybride.	19
Zelfbevruchten lukt natuurlijk ook niet als er sprake is van mannelijke steriliteit. Ook nu kan gebruik worden gemaakt van isogene lijnen. Een mannelijk steriele plant wordt steeds gekruist met een fertiele, die zo is geselecteerd dat in de volgende generatie weer mannelijk steriele planten voor komen, die weer met fertiele worden gekruist, enzovoorts. Afhankelijk	

van het type mannelijke steriliteit wordt de vaderlijn via zelfbevruchting vermeerderd of splitst hij uit na de kruising.	19
4.6 Eenslachtigheid en tweehuizigheid	19
Wanneer sprake is van tweehuizigheid, heeft de veredelaar een probleem wanneer hij wil intelen. De snelste manier van intelen is zelfbevruchting en dat is uitgesloten bij strikt tweehuizigen. De veredelaar zal dan overgaan op het herhaald kruisen van broertjes en zusjes (full sibs) waardoor het langer duurt voordat homozygotie wordt bereikt.....	19
In de praktijk blijkt dat veel tweehuizige planten aan het eind van de bloei bloemen van een ander geslacht vormen. Dat is onder andere het geval bij spinazie, waar de vrouwelijke planten nog enkele mannelijke bloemen produceren, vooral als er geen of weinig zaad is gezet.	19
Soms is het commercieel aantrekkelijke rassen te produceren die geheel vrouwelijk zijn (komkommer) of geheel mannelijk zijn (asperge). Geheel vrouwelijke rassen van komkommer worden geproduceerd door twee vrouwelijke lijnen met elkaar te kruisen. Dat lukt natuurlijk alleen wanneer een van beide lijnen mannelijke bloemen gaat produceren. De geslachtsexpressie is afhankelijk van de verhouding tussen gibberelline en ethyleen. Door te spuiten met gibberelline of ethyleen weg te vangen via bespuiting met zilveroplossingen, gaan geheel vrouwelijke lijnen toch enige tijd mannelijke bloemen produceren en worden ze geschikt als vader. Bij asperge zie je in het najaar vaak enkele bessen aan de geheel mannelijke planten zitten.... In de veredeling maakt men gebruik van zogenaamde super-mannetjes (YY-planten) om de geheel mannelijke hybriden te produceren.	19
4.7 Problemen met emasculeren.....	20
Wanneer problemen met de emasculaties optreden, is het zaak de morfologie en de ontwikkeling van de bloem goed te bestuderen.	20
Bij de eerder genoemde veldsla levert dat helaas niet veel echte oplossingen op. Veldsla is een strikte zelfbevruchter en als je zonder emasculeren veel kruisingen maakt, vallen de sporadisch voorkomende kruisingen relatief makkelijk op tussen de vele zelfbevruchtingen. Dat is helemaal het geval wanneer de vader een makkelijk herkenbaar is en een dominante eigenschap heeft. Daarnaast valt te overwegen met behulp van gametociden bepaalde planten mannelijk steriel te spuiten.....	20
Bij sla blijkt de stamper 's morgens vroeg door een krans van meeldraden te groeien en zichzelf op deze manier te bestuiven. De bloemen bloeien slechts één dag en alleen op de dag dat bloem opengaat kan geëmasculeerd worden. 's Morgens vroeg worden de bloemetjes geopend en wordt met een pincet de kans van meeldraden verwijderd voordat de stamper zo hoog in de bloem zit dat die ook gaat afbreken. Vooral 's zomers is het moment van emasculeren erg vroeg en al snel kan niet meer worden geëmasculeerd. Door de sla in potten te planten en 's nachts in een koude en donkere cel te plaatsen, kun je de volgende dag de planten een voor een emasculeren en bestuiven. Zowel de grootte van de bloeiende slaplant als het aantal bloeiende planten kunnen een probleem vormen voor het gebruik van een koelcel. Het is ook mogelijk een poging te doen stuifmeel van de net geopende stampers te spoelen of om planten mannelijk steriel te spuiten.	20
Hoewel het kruisen van tomaat in het algemeen geen probleem is, kun je door goed naar de bloem te kijken, in plaats van de meeldraden een voor een te verwijderen ook de kans van kroonbladeren, waarop de meeldraden ingeplant staan, in één keer verwijderen.....	20
Afbeelding 21: Bloeiende sla en veldsla (Foto J. den Besten).....	20

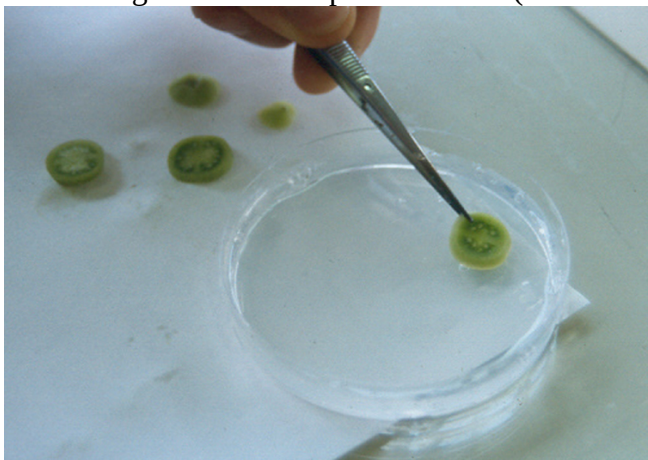


.....	20
4.8 Verschillen in ploëdeniveau.....	21
4.8.1 Inleiding	21
Om de problematiek goed te begrijpen die wordt veroorzaakt door verschillen in ploëdieniveau, is het nodig om de genetische achtergrond en de terminologie te herhalen/bespreken. Daarna wordt ingegaan op meer praktische oplossingen voor ploëdieproblemen.....	21
4.8.2 Terminologie en notatie	21
Hoewel in de literatuur verschillende typen notatie gevonden kunnen worden, is de meest logische vorm van noteren van het ploëdieniveau voor een diploëde tomaat $2n = 2x = 24$	21
$2n$ en n : Met $2n$ wordt aangegeven dat het gaat om het somatische aantal.....	21
chromosomen, het aantal chromosomen dat je kunt zien/tellen in de.....	21
metafase van de mitose in gewone cellen, in de diploëde fase van een plant. Met n wordt aangegeven dat het gaat om de chromosomen in de haploëde fase van de plant, om geslachtcellen. Hoewel we het bij hogere planten daar niet zoveel over hebben, hebben ze in feite net als mossen en varens een generatiewisseling. Het verschil is dat we normaal gesproken geen haploëde hogere planten hebben, maar slechts haploëde pollenkorrels en eicellen.	21
x , $2x$, $3x$...: Met x wordt een complete set chromosomen aangegeven, een genoom.	21
Diploëde planten hebben in hun pollen en eicellen 1 genoom ($n = x$) en.....	21
in hun gewone lichaamcellen 2 genomen ($2n = 2x$). Planten kunnen ook haploëd ($2n = x$), triploëd ($2n = 3x$), tetraploëd ($2n = 4x$), penta-, hexa-, hepta- of octoploid zijn.....	21
Aantal chromosomen:In dit voorbeeld heeft een tomaat 24 chromosomen, 2 sets van 12. Elk	21
chromosoom heeft een homolog ofwel elk chromosoom komt 2 maal voor. Een complete set chromosomen, het genoom, van tomaat bestaat uit 12 chromosomen. Het aantal chromosomen in het genoom varieert per soort en zit bij planten vaak tussen de 5 en 15. Plantensoorten kunnen hetzelfde aantal chromosomen in hun genoom hebben, maar geheel verschillende waardoor ze niet kruisbaar zijn. Kruisbaarheid is natuurlijk ook een probleem als de chromosoomaantallen van het genoom ongelijk zijn.	21
Het ploëdieniveau van de plant wordt aangeduid met het aantal genomen:	21
Haploëd $2n = x$ bijvoorbeeld een niet-verdubbelde haploëde plant uit de	21
antherencultuur.....	21
Diploëd $2n = 2x$ de meeste door zaad vermeerderde gewassen.....	21

Triploïd	$2n = 3x$ banaan en zaadloze watermeloen.....	21
Tetraploïd	$2n = 4x$ aardappel, veel rozen.....	21
Pentaploïd	$2n = 5x$	21
Hexaploïd	$2n = 6x$ chrysant	22
Heptaploïd	$2n = 7x$	22
Octoploïd	$2n = 8x$ aardbei	22
De planten met de even ploëdeniveaus zijn fertiel en maken de volgende gameten:		22
Haploïd	$n=x$ (van een diploïde plant).....	22
Diploïd	$n=2x$ (van een tetraploïde plant).....	22
Triploïd	$n=3x$ (van een hexaploïde plant)	22
Tetraploïd	$n=4x$ (van een octoploïde plant).....	22
Autoploïden zijn planten die een bepaald aantal genomen van de eigen soort hebben, van autohaploïd tot auto-octoploïd oplopend. Het kenmerk van deze planten is dat de even ploëdie niveaus fertiel zijn (weliswaar afnemend met het ploëdieniveau) en dat de oneven ploëdeniveaus steriel zijn (met het toenemen van het ploëdieniveau neemt de fertiliteit meestal iets toe). Binnen de Autoploïden worden de genomen meestal niet met een letter gecodeerd omdat de genomen toch hetzelfde zijn.		22
Alloploïden zijn planten met genomen van verschillende soorten, van allohaploïd tot allo-octoploïd. De genomen kunnen van meer dan 2 soorten afkomstig zijn. Vaak wordt met hoofdletters aangegeven van welke soorten welke genomen afkomstig zijn. De allodiploïd AB heeft dan dus een genoom van soort A en van soort B, de allotetraploïd AABB heeft dan 2 genomen van soort A en 2 van soort B, de hexaploïd AABBCC heeft 2 genomen van de soorten A, B en C. De hexaploïd AAABBB heeft 3 genomen van de soorten A en B. Theoretisch denkbaar is een octoploïd ABCDEFGH met 8 verschillende genomen.		22
Of Alloploïden fertiel of steriel zijn, hangt af van de aan- of afwezigheid van homologe chromosomen. De genoomtypen AABB, AABBCC, AAAABBBB, AABBCCC zijn fertiel omdat er steeds homologen zijn in de meiose. AB, AAABBB, ABCC, ABCDEFGH zijn steriel omdat er geen homologen zijn. Sommige fertiele alloploïden worden ook wel amphiploïd genoemd, waarmee wordt aangegeven dat er homologen zijn. AABB is een allotetraploïd ofwel een amphidiploïd (splitst namelijk uit als een diploïd), AAAABBBB is een allo-octoploïd ofwel een amphitetraploïd (tetraploïde uitsplitsing).		22
Aneuploïden zijn auto- of alloploïden met 1 of meer extra of minder chromosomen. Bij planten zijn deze meestal wel levensvatbaar en fertiel, bij mensen is het effect vaak heftiger. Denk maar aan de trisomie voor chromosoomnummer 21 die bij mensen leidt tot het syndroom van Down (mongooltjes). Euploïden hebben complete sets chromosomen.....		22
4.8.3 Genetische achtergrond		23
Wanneer we kijken naar de monofactoriële F ₂ -plitsing van een (auto-)diploïde plant, dan zien we de bekende 1:2:1-verhouding van de genotypen AA, Aa en aa. Omdat er slechts 2 homologe chromosomen zijn, kunnen die maar op 1 manier worden verdeeld. In de meiose ontstaan voor de helft A- en voor de helft a-gameten. Dat geldt voor zowel eicellen als voor de pollenkorrels. In het bekende gametencombinatieschema dat tot de F ₂ leidt, is de 1:2:1-verhouding eenvoudig af te lezen.....		23
Afbeelding 22: Gametencombinatieschema leidend tot een F ₂ bij een monofactoriële uitsplitsing.		23
Mannelijke gameten:		23
Vrouwelijke gameten:		23
$\frac{1}{2}$ A		23
$\frac{1}{2}$ a		23
$\frac{1}{2}$ A		23
$\frac{1}{4}$ AA		23

$\frac{1}{4}$ Aa	23
$\frac{1}{2}$ a	23
$\frac{1}{4}$ Aa	23
$\frac{1}{4}$ aa	23
Bij een bifactoriële splitsing van een autodiploïd ontstaat: $\frac{1}{16}$ AABB + $\frac{2}{16}$ AABb + $\frac{1}{16}$ AAbb + $\frac{2}{16}$ AaBB + $\frac{4}{16}$ AaBb + $\frac{2}{16}$ Aabb + $\frac{1}{16}$ aaBB + $\frac{2}{16}$ aaBb + $\frac{1}{16}$ aabb (controleer dat).	23
Autotriploïden zijn in principe steriel maar vormen soms toch gameten die dan 2x of x kunnen zijn.	23
Autotetraploïden hebben viertallen homologe chromosomen die volgens toeval verdeeld worden.	23
AAAA vormt uiteraard alleen AA-gameten en aaaa alleen aa-gameten.	23
AAAa vormt voor de helft AA- en voor de andere helft Aa-gameten, aaaA voor de helft aa en voor de andere helft Aa.	23
AAaa vormt $\frac{1}{6}$ AA, $\frac{4}{6}$ Aa en $\frac{1}{6}$ aa. Met behulp van deze informatie kun je via gametencombinatieschema's kijken hoe een F2 er uit zou zien.	23
Allotetraploïden (amphidiploïd) splitsen als autodiploïden uit en aan de uitsplitsing in de F2 kun je via een chikwadraattoets zien waar je mee te maken hebt.	23
Het zal duidelijk zijn dat in de veredeling van polyploïden de kans op de aanwezigheid van volledig homozygoot dominanten of recessieven veel kleiner is als bij diploïden. Als je die typen wilt hebben (bijvoorbeeld omdat er geen sprake is van volledige dominantie), zul je dus met grotere aantallen in je programma's moeten werken.	23
4.8.4 Ontstaan van ongereduceerde gameten	23
Ongereduceerde gameten ontstaan doordat er in de metafase I of metafase II genetisch materiaal bij elkaar blijft, dat normaal gesproken over 2 cellen wordt verdeeld. In een normale meiose gaan eerst de homologe chromosomen uit elkaar (voordat dat gebeurt is overkruising mogelijk) en vervolgens worden de chromatiden van elk chromosoom verdeeld over 2 cellen.	23
Bij een onvolledige eerste deling (FDR ofwel First Division Restitution) blijven de homologe chromosomen bij elkaar en worden de chromatiden in de tweede meiotische deling verdeeld. Uitgaande van een heterozygote plant ontstaan ongereduceerde gameten met genotype Aa (zonder overkruising) en een deel (<50%) van de geproduceerde ongereduceerde gameten zal AA en aa zijn.	24
Bij een onvolledige tweede deling (SDR ofwel Second Division Restitution) worden de homologe chromosomen over 2 cellen verdeeld maar blijven de chromatiden in de tweede meiotische deling bij elkaar. Uitgaande van een heterozygote plant ontstaan ongereduceerde gameten met genotype AA en aa en als er overkruising is zal een deel Aa zijn.	24
4.8.5 Praktische oplossingen voor ploïdieproblemen.	24
Als oudersoorten verschillen in aantal chromosomen dan is het vaak beter de soort met de meeste chromosomen als moeder te nemen. Vaak lukt de kruising beter en ontstaan er beter gevormde zaden. Er zijn echter ook uitzonderingen (petunia, roos, aardappel), zodat het de moeite waard is, zeker in eerste instantie, de kruisingen ook reciprook te maken.	24
Wanneer 2 fertiele planten verschillende ploïdeniveaus hebben, kan dat leiden tot chromosomale problemen en steriliteit van de F1. Problemen met chromosomen worden soms veroorzaakt door doordat het plasma niet goed past bij de chromosomen. Soms is het probleem bij de reciproke kruising verholpen.	24
In theorie kun je de chromosomen van de steriele nakomeling verdubbelen en is het probleem opgelost. In de praktijk is het verdubbelen van chromosomen met colchicine en oryzaline niet zo eenvoudig (lage slagingskansen). Het is handiger om de ouders (waar meer materiaal van	

beschikbaar is) te verdubbelen dan die mogelijk ene F1-plant. Dan nog is de vraag of je verder kunt, want bij de volgende kruising komt het probleem waarschijnlijk terug.	24
Planten met oneven ploïdeniveaus waarvan je verwacht dat ze steriel zijn, blijken in de praktijk nogal eens enige mannelijke en vrouwelijke steriliteit te bezitten. Haploïden produceren soms ongereduceerde en dus haploïde ($n=x$) gameten. Triploïden maken vaak zowel $n=x$ als $n=2x$ gameten. Bij roos bleek het $2x$ -stuifmeel het beter te doen dan het x -stuifmeel. X - en $2x$ -eicellen bleken echter even succesvol te zijn.	24
Het is overigens zo dat soorten met even ploïdeniveaus ook ongereduceerde gameten produceren. Daarvan zou je gebruik kunnen maken bij het kruisen van bijvoorbeeld een diploïd met een tetraploïd. De onderzoeksgroep van J. van Tuyl heeft hiervan gebruik gemaakt door leliestuifmeel te zeven om de frequentie ongereduceerde gameten te verhogen.	24
In de praktijk van soortkruisingen, maar ook van ploïdiekruisingen is de ervaring zeer divers en de uitkomst vaak onvoorspelbaar. Soms ontstaat makkelijk en veel zaad, maar is het van slechte kwaliteit. Ook gebeurt het dat het bijna onmogelijk is zaad te krijgen, maar kiemt het vervolgens gemakkelijk.	24
Op http://www.nkvf.nl/utc/ver/fertiliteit.htm kun je informatie vinden over de veredeling van Fuchsia met betrekking tot ploïdie en fertiliteit.	24
4.9 Morfologische problemen	25
Verschillen in stijlengte zoals bij lelie voorkomen, zijn soms eenvoudig te omzeilen door de soort met de lange stijlen als vader te gebruiken. Het kan zijn dat de soort met de korte stijl toch als vader moet worden gebruikt. De stijl van de moeder kan dan worden ingekort en het stuifmeel kan zelfs in het vruchtbeginsel worden geïnsemineerd. Deze techniek kan ook oplossing bieden voor barrières in de stijl van andere aard.	25
4.10 Embryo-abortie.....	25
Embryo-abortie kan voorkomen worden door het embryo uit het vruchtbeginsel te halen voordat het embryo is afgestorven. Het moment wordt, gewasafhankelijk, zo gekozen dat het embryo niet te klein meer is, maar nog wel leeft. Het uitprepareren van een embryo is bij de meeste gewassen vanwege de grootte van het embryo niet eenvoudig en tijdrovend. Het embryo wordt in/op een medium geplaatst dat zorgt voor verdere uitgroei. Bij sommige gewassen is het mogelijk plakken van het vruchtbeginsel te snijden en dat op een medium te zetten. Soms lukt het zelfs met hele vruchtbeginsels. De zaden groeien dan in het vruchtbeginsel in vitro uit.	25
Afbeelding 23: Ovarium-plak-methode (Foto M. Mooij).	25



Afhankelijk van de achtergrond van de ouders, levert embryocultuur vaak steriele planten op waarmee niet zomaar verder kan worden gekruist. Verder komen planten uit het lab nogal eens op momenten die niet goed passen in het kruisingsseizoen. Toch kan embryocultuur, vooral bij vegetatief vermeerderde gewassen, wel degelijk bruikbare rassen opleveren.

Bijzondere soortkruisingen kunnen via embryocultuur soms gered worden en kunnen als ras soms meteen worden geïntroduceerd.	25
Vanwege de hierboven geschetste complexiteit van het proces van embryoescue, is het de moeite waard te proberen embryoescue te voorkomen. De inhoudsstoffen uit het embryoescue-medium kunnen, toegediend aan het vruchtbeginsel, leiden tot op ‘natuurlijke’ wijze uitgroeien van embryo’s in het zaad. Op vergelijkbare wijze kun je proberen om het embryo in ieder geval zover te laten groeien dat het te redden valt.	25
4.11 F ₁ -steriliteit en andere complicaties in de F ₁	26
Als er geen of onvoldoende homologe chromosomen zijn, treden problemen in de meiose op, met als gevolg steriliteit. Dit soort planten groeit vaak ook wat minder goed omdat de chromosomen niet zo goed bij elkaar passen, of niet bij het plasma passen. Spontaan kunnen chromosomen worden uitgestoten en na verloop van tijd zouden meer homologe chromosomen kunnen overblijven en de groei en fertiliteit weer hersteld kunnen worden.....	26
Een alternatief is chromosoomverdubbeling met behulp van colchicine of oryzaline. Colchicine is een zeer giftige stof die eigenlijk beter aangrijpt in dierlijke en menselijke cellen, terwijl oryzaline bestanddeel is van sommige onkruidbestrijdingsmiddelen en eigenlijk alleen werkt in plantaardige cellen. Het oplosmiddel voor oryzaline (DMSO) is helaas wel giftig.	26
Het probleem met chromosoomverdubbeling is dat de slagingskans erg klein is. Het heeft dan ook geen enkele zin die ene steriele plant van vele soortkruisingen te verdubbelen. De plant zal eerst vermeerderd moeten worden tot enkele honderden of duizenden planten die behandeld kunnen worden. Het is waarschijnlijk makkelijker om dat met de kruisingsouders zelf te doen, omdat die in grote aantallen beschikbaar zijn.....	26
Door de behandeling raakt de mitotische celdeling in de war en worden allerlei fouten gemaakt. Als gevolg daarvan zullen behandelde delen afsterven, overleven maar slecht groeien of ontsnappen. Cellen waarin wel chromosoomverdubbeling optreedt maar geen logisch daarop volgende verdeling van chromosomen, zijn de cellen die we graag willen hebben. Als die in het bladpuntje zitten of ergens anders ver van de groeipunten hebben we er nog niets aan. Het is zaak om groeipunten te behandelen die uit zo weinig mogelijk cellen bestaan.	26
Per gewas is dit anders. Sommige gewassen regenereren relatief makkelijk en daar zou je zelfs losse cellen kunnen behandelen, die je vervolgens regeneert tot plant die dan ofwel verdubbeld is of niet. Een natuurlijk alternatief is het behandelen van bladstekken (Kalanchoë, Begonia). De plantjes die uitgroeien aan de bladsteel zijn zogenaamde adventief spruiten. Ze zijn ontstaan uit 1 cel die wel of niet is verdubbeld. Bij veel gewassen lukt dit echter niet en worden zaden of groeipunten behandeld. Het voordeel van werken met zaad is, dat je er makkelijk over kunt beschikken, het werken ermee eenvoudig is en grote aantallen genomen kunnen worden. Nadeel is dat het groeipunt meercellig is en de slagingskans dus laag. Groeipunten in planten bevatten waarschijnlijk nog meer cellen dan die in het zaad en zijn dus niet zo geschikt. Het gebruik van jonge groeipunten, bijvoorbeeld ontstaan na het verwijderen van het hoofdgroeipunt, is aan te bevelen.	26
Afbeelding 24: Bladstek (adventief-spruitmethode) bij Sinningia in combinatie met bestraling en een celcultuur (Foto J. den Besten).	27



De planten die er verdubbeld uitzien (groter blad, andere lengte-breedte-verhouding, grotere maar minder bloemen) kun je testen op polyploidie met de in de paragraaf 'Ploidiebepaling' beschreven methoden. 27

Abeelding 25: In welke rij moet je de tetraploïde radijs zoeken (zaad behandeld met colchicine)? (Foto J. den Besten) 27



..... 27

4.12 Incongruentie..... 27

Wanneer planten echt onverwant zijn, is de kans dat de kruising op de een of andere manier toch gaat lukken heel erg klein. Oplossingen kunnen dan worden gezocht in de sfeer van genetische transformatie en mutatie. 27

Genetische transformatie is relatief duur en heeft alleen zin als de eigenschap in een verder heel goed ras wordt gezet. Kennis van de genen is onontbeerlijk. De meeste tuinbouwgewassen zijn genetisch helaas nog niet in kaart gebracht. Mutaties zijn ongericht en worden eigenlijk alleen standaard toegepast in gewassen waarvan we weten wat we ermee kunnen, zoals kleurmutaties in chrysant. Daarnaast worden wel mutaties opgewekt om te kijken of er nieuwe eigenschappen ontstaan. Grote, gemuteerde populaties worden daarvan fenotypisch gescreend, in biotoetsen getest en met merkers getypeerd. 27

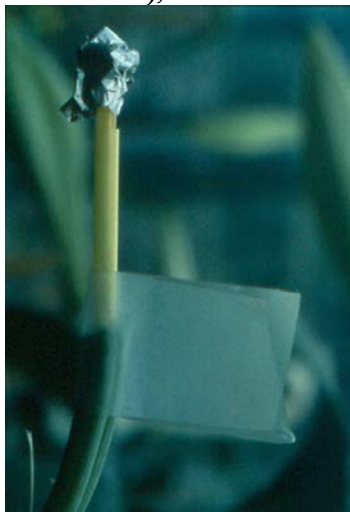
Wanneer de planten wel enigszins verwant zijn, kan een van de technieken die in dit hoofdstuk beschreven zijn uitkomst bieden. Er kunnen er nog een paar aan worden toegevoegd. 28

Stuifmeel injecteren in het vruchtbeginsel kan een manier zijn om de kruisingsbarrières in de stijl te omzeilen. 28

Twee andere oplossingen zijn het gebruik van mentorpollen en pionierpollen. Bij de mentorpollentechniek maakt men gebruik van eigen, bestraald stuifmeel dat nog wel kiemt maar niet meer bevrucht. Dat wordt samen met het stuifmeel van de kruisingsvader opgebracht. Bij de pionierpollentechniek wordt een gering deel eigen stuifmeel gemengd met

een overmaat aan stuifmeel van de kruisingsvader gebruikt. In beide gevallen maakt het eigen stuifmeel als het ware de weg vrij voor het ‘vreemde stuifmeel’. Een laatste truc is het maken van een zelfbestuiving gevolgd door het afsnijden van de stijl en die op de stijl van de moeder enten. 28

Afbeelding 26: Incongruentie bij lelie omzeilen met de geënte stijltechniek, tevens is de ‘inhulling’ van de stempel tegen ongewenste bestuiving met aluminiumfolie te zien (Foto J. den Besten), 28



..... 28

5. Afsluitende opmerkingen 29

Het is zelfs, met alle technieken die we hebben om kruisingsbarrières te slechten, de vraag of we niet meer energie moeten steken in GMO's. Klassieke non-GMO-veredeling kan, vooral met allerlei trucs, een heleboel maar de snelheid van de veredeling is gering. In appel zouden we graag resistenties tegen schurft, meeldauw en kanker inbouwen en dat gebeurt ook. Dat soort programma's duurt het echter 20-30 jaar en wellicht zijn tegen die tijd de oorspronkelijke veredelingsdoelen minder urgent of is de resistentie al doorbroken. In India en omgeving wordt veel kool geteeld en zijn enorme problemen met insecten in het algemeen en bijvoorbeeld de koolmot (diamond-back moth) in het bijzonder. 29

Afbeelding 27: Rupsen van de koolmot (diamond-back moth) op kool. 29



..... 29

6. Practicum stuifmeelkieming en –kleuring..... 31

6.1 Inleiding 31

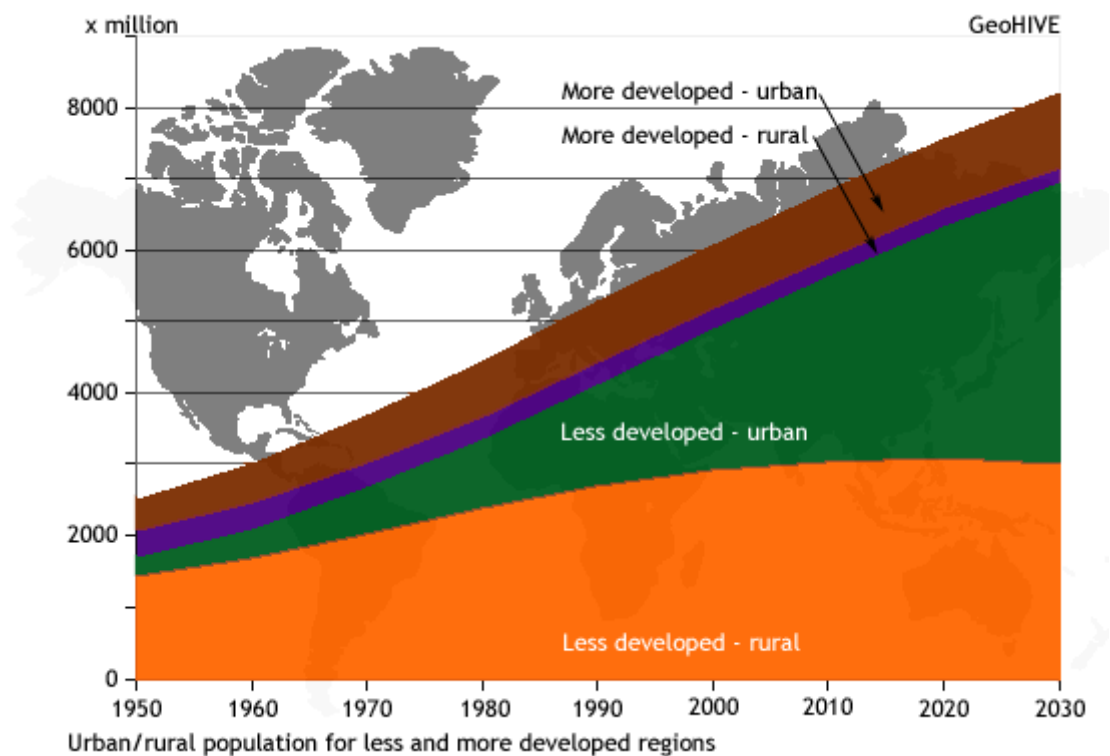
6.2 Doel van het practicum 31

6.3. Materiaal.....	31
6.4 Methode.....	32
6.5 Waarnemingenblad.....	33
7. Practicum ploëdiebepaling.....	34
7.1 Inleiding	34
7.2 Doel van het practicum	34
7.3. Materiaal.....	34
7.4. Methode.....	34
7.5 Waarnemingen blad.....	36
8. Practicum <i>Exacum affine</i>	39
8.1 Inleiding	39
8.2 Materiaal.....	39
8.3 Uitvoering.....	39

1. Inleiding

De ontwikkelingen in de land- en tuinbouw gaan snel. De behoefte aan betere rassen neemt toe als gevolg van een toenemende bevolkingspopulatie, een afnemende hoeveelheid vruchtbare grond (steden worden meestal gebouwd en uitgebreid in gebieden met vruchtbare grond) en een ander gebruik van vruchtbare grond bijvoorbeeld voor biobrandstoffen. De verwachting is dat de wereldbevolking in 2050 gestegen is met 50% tot 9 mld. De grootste bevolkingsgroei vindt in Azië plaats, waar op veel locaties de bevolking verdubbelt. Technische innovaties vragen om, daaraan aangepaste rassen. Ondanks de onbegrensd lijkende mogelijkheden van genetisch gemanipuleerde planten (GMO's), blijft een traditionele kruising gevolgd door traditionele selectiemethoden de basis voor nieuwe rassen.

Afbeelding 1: Urban and rural development 1950-2030 for less developed regions and more developed regions



source: Population Division, UN: *World Population Prospects: The 2004 Revision* and *World Urbanization Prospects: The 2003 Revision*.

note: More developed regions; they comprise all regions of Europe plus Northern America, Australia/New Zealand and Japan.

Less developed regions; they comprise all regions of Africa, Asia (excluding Japan), Latin America and the Caribbean plus Melanesia, Micronesia and Polynesia.

De behoefte aan kruising met verre verwanten van cultuurgewassen in verband met het inbouwen van resistenties en stresstolerantiegenen, kan leiden tot een toename van kruisingsproblemen.

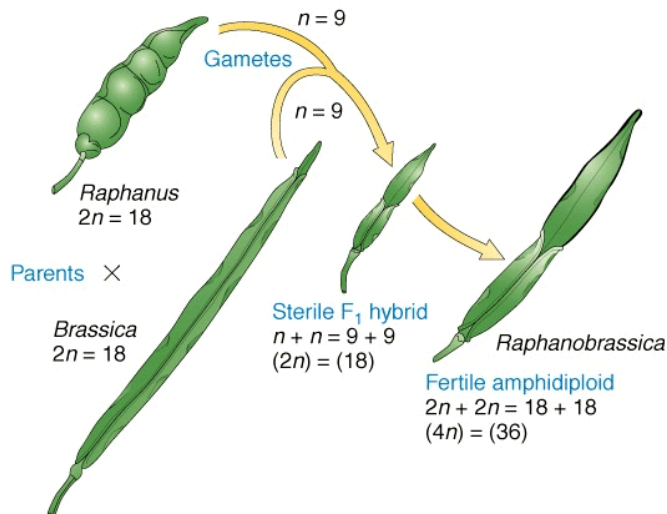
2. Kruisingsbarrières

In dit hoofdstuk wordt ingegaan op de belangrijkste problemen, signaleringsmethoden en oplossingen.

2.1 Inleiding

Gewassen die door zaad vermeerderd werden of nog worden, zullen relatief gemakkelijk binnen de soort met elkaar gekruist kunnen worden. Afhankelijk van het effect van de evolutie op de verschillende soorten binnen een geslacht, zijn soorten relatief makkelijk onderling te kruisen (sla, tomaat, kool) of moeilijk (komkommer). Soms is het zelfs mogelijk geslachten te kruisen. Een voorbeeld van het commercieel maken van een geslachtskruising is *Raphanobrassica*, die als groenbemester wordt gebruikt. Bij de vegetatief vermeerderde gewassen, waar meestal niet is geselecteerd op generatieve vermeerdering, kunnen problemen in de generatieve fase de veredeling lastig maken. Zo zijn er voorbeelden van planten die nooit bloeien (Egyptische ui die een bloeiwijze lijkt te maken, maar die uitsluitend nieuwe bollen bevat die door hun gewicht op de grond terechtkomen en de volgende generatie vormen, sommige knoflookrassen die niet bloeien, bamboe die afhankelijk van de soort slechts eens per 100 jaar bloeit), planten die helemaal steriel zijn (banaan, de tulp Apeldoorn, *Calathea crocata*), maar ook normaal zaad producerende voorbeelden (Pelargonium, roos) en zelfs voorbeelden van planten waarbij kruisingen tussen verschillende geslachten nog mogelijk zijn (orchideeën, Cruciferae).

Afbeelding 2: Ontstaan van *Raphanobrassica* (www.mun.ca).

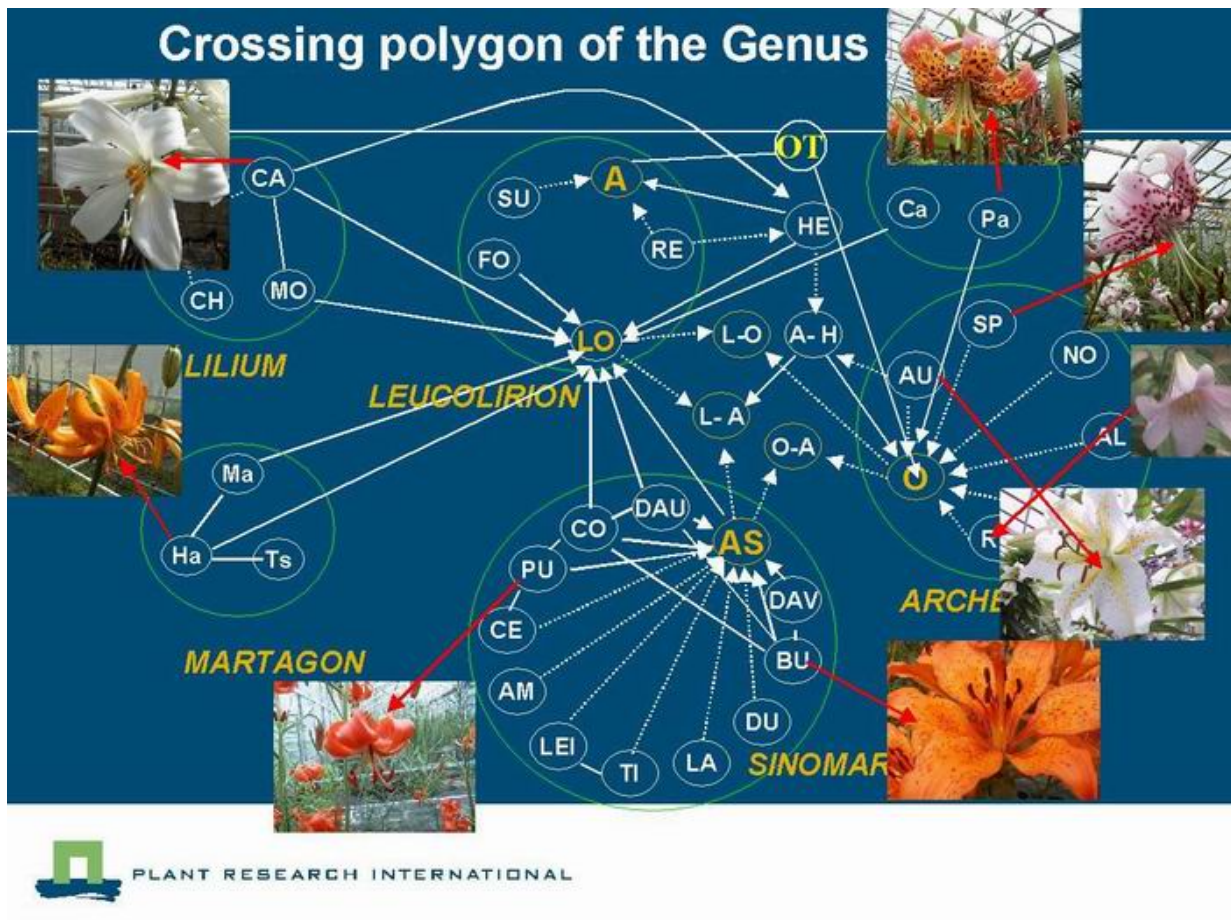


Afbeelding 3: 'Bloeiwijze' van de Egyptische ui (www.vergetengroenten.be).



Van een aantal belangrijke gewassen is de verwantschap behoorlijk in kaart gebracht. De veredelaar weet dan in ieder geval welke kruisingen technisch mogelijk moeten zijn. Soms zijn daarbij technieken gebruikt die verderop in dit hoofdstuk zijn beschreven. Uit publicaties die ten grondslag liggen aan de verwantschapsfiguren kan worden herleid of de kruisingen normaal zijn uitgevoerd of dat er bijzondere technieken voor nodig waren. Een voorbeeld van een verwantschapsfiguur van lelie komt uit het onderzoek van Jaap van Tuyl en collega's. In dit soort figuren wordt door het ontbreken van lijnen aangegeven dat kruisingen niet lukken, met gestippelde lijnen dat kruisingen moeilijk zijn en alleen met behulp van bijzondere technieken als embryo-rescue slagen. Hoe dikker de lijn des te makkelijker de kruising. Ook is meestal aangegeven in welke richting(en) de kruising lukt.

Afbeelding 4: Kruisingsmogelijkheden bij lelie (<http://www.liliumbreeding.nl/polygon.htm>)



In dit hoofdstuk worden de belangrijkste problemen die zich kunnen voordoen bij het maken van kruisingen besproken, wordt gekeken naar het voorkomen van de problemen en het oplossen daarvan en worden enkele technieken besproken om de problemen te signaleren.

2.2 Bloei-inductie

Veel gewassen gaan snel vanzelf bloeien omdat de omstandigheden waaronder ze groeien blijkbaar gunstig zijn voor bloei. Zelfs bij dit soort gewassen kan het nuttig zijn eens te kijken naar de mogelijkheden van kunstmatige bloei-inductie op de generatieduur. Hoe korter de generatieduur, des te sneller de veredeling kan verlopen. De kortere generatieduur kan wel consequenties hebben voor de selectiemogelijkheden in die generatie; als sla direct gaat schieten, kun je niet op kropeigenschappen selecteren.

Wanneer gewassen niet vanzelf gaan bloeien, kan het zijn dat ze in de juveniele fase zitten. In die fase is het onmogelijk bloei te induceren. Veel door zaad vermeerderde gewassen hebben een korte juveniele fase, maar bijvoorbeeld een appel- of tulpenzaailing kan er wel 5-10 jaar over doen voordat bloemen/vruchten ontstaan. Dat vertraagt de veredeling natuurlijk enorm en kan ertoe leiden dat wanneer je je veredelingsdoel eindelijk bereikt, het niet meer actueel is. Willen consumenten over 30 jaar nog steeds fris-zure appels met een mooie rode blos? Als de resistentie voor vuur over 25 jaar in onze tulpen zit, is die dan nog niet doorbroken?

Afbeelding 5: Vuur (*Botrytis tulipae*) in tulp (www.wur.nl).



2.3 Ongelijke bloei

Ongelijke bloei is vooral lastig bij planten die zelden bloeien (bamboe) en planten die maar weinig bloemen maken en kort bloeien (een extreem voorbeeld is de reuzenaronskelk). Die bloei is vaak ook nog eens niet echt te sturen.

Afbeelding 6: Reuzenaronskelk in bloei (www.nos.nl).

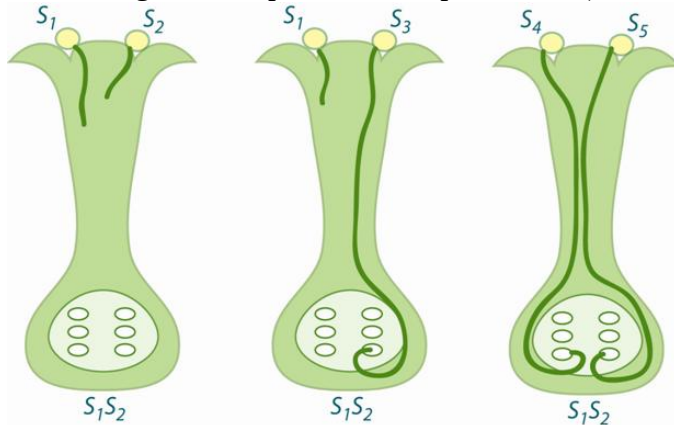


Ook bij de gewassen die door zaad worden vermeerderd kan ongelijke bloei een probleem zijn. Dat speelt zowel in de veredeling wanneer de te kruisen ouders niet gelijk bloeien, als in de zaadteelt van hybriderassen. Er zijn verschillende hybriden uiteindelijk niet geïntroduceerd omdat het niet mogelijk was voldoende, kwalitatief goed zaad te produceren vanwege bloei problemen.

2.4 Incompatibiliteit

Bij kruisbevruchtende gewassen komen verschillende, natuurlijke systemen voor om zelfbevruchting en inteelt te voorkomen en kruisbevruchting en genetische recombinatie te bevorderen. Een van die systemen is incompatibiliteit, ook wel zelfincompatibiliteit genoemd. Het voorkomt zelfbevruchting en bevruchting door nauw verwante individuen. Genotypen met dezelfde genetische informatie voor incompatibiliteit (dezelfde S-allelen) zijn niet compatibel en kruisen dus niet met elkaar. Zelfincompatibele planten zijn gewoon fertil.

Afbeelding 7: Principe van incompatibiliteit (www.bio.psu.edu)



Incompatibiliteit berust op zogenaamde S-allelen. Er zijn verschillende incompatibiliteits-systemen bekend, waarvan het gametofytische en het sporofytische systeem het meest voorkomen. Bij gametofytische incompatibiliteit wordt de reactie bepaald door de haploïde kern van de stuifmeelkorrels en de diploïde kernen in de stamper en bij sporofytische incompatibiliteit wordt de reactie bepaald door beide genomen van de vaderplant en de diploïde kernen van de stamper.

Gametofytische incompatibiliteit komt onder andere voor bij de familie van de Rosaceae. Vanwege de incompatibiliteit staan er in boomgaarden met appel, peer, pruim en kers bestuivers tenzij gebruik is gemaakt van specifiek zelfbestuivende rassen. Bij appel doet zich het vreemde verschijnsel voor dat triploïde rassen als Jonagold en Schone van Boskoop toch vruchten produceren, terwijl je zou verwachten dat ze steriel zouden zijn. Natuurlijk zijn het geen goede bestuivers.

Afbeelding 8: Bestuivingschema pruim (www.vandiepen.nl)

	Anne Späth	+	Avalon	Belle de Louvain	Bloue de Belgique	Czar	Excalibur	Jubiléum	Monseur Hâtif	Opal	Reine Claude d'Althan	Sanctus Hubertus	Valor	Victoria	Voyageur
Anne Späth	X														
Avalon	X	X													
Belle de Louvain		X	+												
Bloue de Belgique	+	X			X										
Czar	+	X			+	+									
Excalibur		X	X				X								
Jubiléum		X	X	+				+							
Monsieur Hâtif	+	X		^	+				X						
Opal	+	X	^	+	+	+		+	v	+					
Reine Claude d'Althan	+	X	^	+	+	+			^	^	X				
Sanctus Hubertus	+	X	^	+	+	+	^		+	+	v	+			
Valor		v	X				^		X		X	^	X		
Victoria	+	X		+	+	+	^		+	+	+	^		+	
Voyageur	+	X								+			+	+	+

+	Beide rassen bestuiven elkaar prima
< / >	Ras bestuift enkel het andere ras waarna de richting van het pijltje staat
	Onbekend
X	Bestuiven elkaar niet

Afbeelding 9: Bestuivingsschema appel

(http://www.marechal.be/foto/bestuivingstabel_appel.jpg)

Appel

 Wordt bestoven door	Alkmene	Court Pendu	Cox Orange Pippin	Discovery	Dubelle BelleFleur	Elstar	Gloster	Golden Delicious	James Grieve	Jacques Lebel	Jonagold	Jonathan	Lomberts Calville	Notarisappel	Reinette Etoilée	Rode Boskoop	Schone Boskoop
Alkmene			x	x			x	x	x			x					x
Cox Orange Pippin	x			x			x	x	x			x	x				x
Dubbele Bellefleur								x			x				x		
Elstar	x			x		x	x	x	x		x		x		x		
Gloster	x		x	x			x	x	x						x		
Golden Delicious	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x				
James Grieve	x		x	x		x	x	x	x			x	x				x
Jonagold			x	x	x			x	x		x						
Reinette Etoilée (sterappel)		x			x			x	x								
Rode Boskoop	x		x	x			x		x			x	x			x	
Schone van Boskoop				x			x		x			x	x				
Oogstappel	x		x						x			x					x

Sporofytische incompatibiliteit komt onder andere voor bij de familie van de Cruciferae en met behulp van dit systeem zijn bij kool de eerste hybriden gemaakt.

Bij een aantal plantensoorten gaat de incompatibiliteit gepaard met een bepaalde bloembouw; heteromorfie. De heteromorfie uit zich meestal in de vorm van heterostylie, het verschijnsel dat binnen de soort verschillende stijllengte voor komt. Bij de zaadteelt van *Primula* maakt men er gebruik van door de planten met de lange stijlen als moeders te gebruiken. Door de incompatibiliteit zullen ze zich niet zelfbevruchten en van de planten met lange meeldraden kan eenvoudig stuifmeel worden verzameld.

Afbeelding 10: *Primula veris* met distylie (www-biol.paisley.ac.uk).



Incompatibiliteit zorgt vooral binnen de soort voor kruisingsproblemen. Het is zelden oorzaak voor het niet kunnen kruisen van planten van verschillende soorten.

2.5 Mannelijke steriliteit

Mannelijke steriliteit wordt veelgebruikt bij de productie van hybride rassen. Zoals de naam al zegt is de vrouwelijke fertiliteit normaal, maar zijn de mannelijke delen steriel. Op basis van morfologie en anatomie kunnen verschillende vormen van mannelijke steriliteit onderscheiden worden zoals veranderingen van het mannelijk geslachtsapparaat (ontbreken van helmknoppen, reductie van meeldraden tot rudimentaire organen, vervormen van meeldraden tot stamper, vruchtblad of kroonblad (bijvoorbeeld bekend als dubbelbloemigheid bij siergewassen)), functionele mannelijke steriliteit waarbij wel stuifmeel gevormd wordt maar niet vrijkomt, pollensteriliteit waarbij het aanwezige stuifmeel steriel is en tenslotte zou tweehuizigheid als vorm van mannelijke steriliteit gezien kunnen worden.

Afbeelding 11: Mannelijk fertiele (links) en steriele (rechts) paprika (Foto J. den Besten).



Afbeelding 12: Een dubbelbloemige en dus mannelijk steriele wortelbloem (Foto J. den Besten).



Mannelijke steriliteit kan door uitwendige factoren worden geïnduceerd (gametociden, bestraling, watergebrek, temperatuur) of genetisch van aard zijn als gevolg van een disharmonie tussen de kern (genen) en het plasma. Wanneer de mannelijke steriliteit genetisch van aard is, heet dat cytoplasmatisch-genetische mannelijke steriliteit. Als er alleen verschillende genen zijn (1 plasmatype) spreken we over genetische mannelijke steriliteit en

als er verschillende plasmatypen zijn (1 genotype) spreken we over cytoplasmatisch mannelijke steriliteit.

2.6 Eenslachtigheid en tweehuizigheid

Tweeslachtige bloemen hebben zowel vrouwelijke als mannelijke delen. Eenslachtige bloemen zijn ofwel mannelijk ofwel vrouwelijk, maar meestal komen beide typen bloemen voor op dezelfde plant. Het maken van kruisingen wordt daardoor eenvoudiger, maar het maken van zelfbevruchtingen kan lastig zijn als de mannelijke en vrouwelijke bloemen niet tegelijk bloeien.

Tweehuizige planten hebben eenslachtige bloemen die per plant ofwel mannelijk (mannelijke planten) ofwel vrouwelijk (vrouwelijke planten) zijn. Het maken van kruisingen is daardoor wel erg eenvoudig, zelfbevruchting is theoretisch onmogelijk.

2.7 Problemen met emasculeren

Emasculeren is bij veel gewassen geen enkel probleem. Het is een kwestie van kijken op welk moment de meeldraden weggehaald dienen te worden (het stuifmeel dient nog in de helmknoppen te zitten) en te zoeken naar een eenvoudige methode voor het verwijderen van de meeldraden. Vrouwelijke bloemen, mannelijk steriele bloemen en zelfincompatibele bloemen hoeven niet eens geëmasculeerd te worden. Het emasculeren van grote bloemen met relatief weinig meeldraden (bijvoorbeeld lelie) behoeft weinig toelichting. Emasculatie wordt moeilijker naarmate de bloem kleiner is, meer meeldraden bevat of kort bloeit. Aangezien de meeldraden bij veel gewassen dicht bij de stamper staan, kan die door de emasculaties makkelijk beschadigd raken.

Een voorbeeld van een gewas met erg kleine bloemen is veldsla. De bloemen ervan zijn zo klein dat emasculaties haast onmogelijk is. Ook sla heeft kleine bloemen die bovendien slechts heel kort te emasculeren zijn. Soms zijn de individuele bloemen nog wel te emasculeren, maar is het zo goed als onmogelijk binnen de hele bloeiwijze alle meeldraden te verwijderen (uien bijvoorbeeld).

2.8 Verschillen in ploïdeniveau

Veel vegetatief vermeerderde gewassen zijn polyploid en verschillende ploïdeniveaus komen binnen 1 soort of geslacht voor.

Gewassen die een oneven ploïdeniveau hebben (1x, 3x, 5x enzovoorts) zijn meestal steriel en dus niet kruisbaar. Bekend is dat 'oneven ploïden' soms toch nog wat fertil zijn vanwege de vorming van ongereduceerde gameten of omdat onevenredige verdeling van chromosomen soms toch fertiele gameten geeft. Meestal neemt de fertiliteit toe met het (oneven) ploïdeniveau, maar blijft op een laag niveau.

Gewassen met een even ploïdeniveau zijn fertil, maar meestal neemt de fertiliteit af met het ploïdeniveau. Blijkbaar wordt de evenredige verdeling van homologe chromosomen

moeilijker en vaak is niet geselecteerd op fertiliteit omdat de planten vegetatief worden vermeerderd.

Het probleem bij het kruisen met verschillende ploïdeniveaus kan zijn dat plasma en chromosomen eigenlijk niet bij elkaar passen met als gevolg chromosoomuitstotingen of embryo-abortie of dat een steriele generatie ontstaat.

Bij veel gewassen neemt de belangstelling voor kruisen met andere soorten toe. Kruising van 2 verschillende, maar (auto-)diploïde soorten, kan ertoe leiden dat de hybride niet meer beschikt over 2 homologe sets chromosomen, maar over chromosomen die niet meer homologoog zijn (allodiploïd). De plant is dan dus steriel vanwege de problemen met de verdeling van homologe chromosomen in de meiose.

2.9 Morfologische problemen (stijllengte)

Jaap van Tuyl (WUR) heeft bij lelie veel soortkruisingen gemaakt en soms ging het mis vanwege morfologische verschillen tussen de soorten. Bij lelie is veel variatie in stijllengte en het is logisch te veronderstellen dat lelies met lange stijlen stuifmeel hebben dat in staat is zo'n lange afstand te overbruggen. Lelies met korte stijlen hebben waarschijnlijk heel ander stuifmeel. Het kruisen van langstijlig x kortstijlig geeft natuurlijk eerder problemen dan andersom.

2.10 Embryo-abortie

Hoe minder planten verwant zijn, des te groter de kans dat chromosomen geen homologoog meer hebben en ook mitotische celdelingen fout lopen. Het embryo wordt geaborteerd en als er al zaad wordt gevormd, zal het niet kiemen. Ook als de vaderchromosomen niet bij het cytoplasma van de moeder passen kan het embryo aborteren. De belangrijkste oorzaak van embryo-abortie is waarschijnlijk endospermdegeneratie.

2.11 F₁-steriliteit en andere complicaties in de F₁

Als weinig verwante planten gekruist worden sterft het embryo soms niet en kiemt het zaad toch. Omdat de chromosomen niet echt homologoog zijn, zal de meiose problemen geven en kan de F₁ steriel zijn.

Omdat de chromosomen van soortkruisingsproducten soms asynchroon mitotisch delen, verdwijnen chromosomen en zelfs genomen. Omdat het plasma via de moeder overerft, kan het ook voorkomen dat de plasmavreemde chromosomen van de vadersoort niet kunnen samenwerken met het plasma van de moedersoort.

Als gevolg van een verstoorde genregulatie kunnen allerlei abnormale verschijnselen voorkomen zoals chlorofylgebrek en steriliteit.

Wanneer de soorthybriden via zaad nakomelingen produceren, komen soms ongunstige genencombinaties voor die leiden tot gedeeltelijke of gehele 'hybrid break down'. De planten met genencombinaties die het meest op de ouders lijken hebben de grootste overlevingskansen.

2.12 Incongruentie

Incompatibiliteit is het verschijnsel dat planten niet kruisbaar zijn vanwege herkenning tussen weefsel van de stijl en het pollen (meestal op basis S-allelen), incongruentie is het verschijnsel dat planten niet kruisbaar zijn omdat er juist onvoldoende herkenning is. Pollenkorrels zijn erg klein, de weg van stempel naar vruchtbeginsel relatief lang (zeker in vergelijking met de diameter van de pollenkorrel, bij maïs bijvoorbeeld) en interactie tussen moederplant en pollenkorrel is nodig om zo'n weg af te kunnen leggen. Bij stuifmeel dat weinig verwant is, is het zelfs mogelijk dat er sprake is van tegenwerking, van barrières die worden opgeworpen door de moederplant. Deze barrières liggen vaak in de stijl.

Stuifmeelkorrels kunnen zonder hulp van een moederplant wel kiemen en een redelijk lange pollenbuis maken omdat ze hun inhoud als het ware meenemen naar het voorste deel van de pollenbuis en daar steeds calloseproppen maken om te voorkomen dat het plasma terugloopt. Om echt grote afstanden te overbruggen is meestal wel een positieve interactie tussen pollenkorrel en moederlijk weefsel nodig. Bij een gewas als maïs kunnen de pollenkorrels gemakkelijk de weg door de soms 50 cm of langere stijl afleggen.

Er is sprake van incongruentie als het pollen niet alle genetische informatie bezit, die nodig is om op de stamper te kiemen en door te groeien tot in de zaadknop. Hogenboom heeft de term barrièregenen in de stamper en penetratiegenen in het pollen geïntroduceerd. Een plant met een hoge barrièrecapaciteit en een lage penetratiecapaciteit zal met weinig andere soorten kruisbaar zijn. Een plant met een lage barrièrecapaciteit en een hoge penetratiecapaciteit zal met veel andere soorten kruisbaar zijn.

In de literatuur wordt vaak de term 'unilaterale incompatibiliteit' gebruikt om aan te geven dat kruisingen in de ene richting niet mogelijk zijn terwijl ze in de andere richting wel mogelijk zijn. Beter zou de term 'unilaterale incongruentie' zijn. Hoe dan ook is het van belang lastige kruisingen altijd in beide richtingen te maken. *Raphanus sativus* (radijs) bijvoorbeeld kan als moeder redelijk goed (slagingskans $\gg 10\%$) gekruist worden met *Brassica oleracea* (kool), maar omgekeerd lukt dat zelden ($\ll 1\%$).

3. Vroegtijdige signalering van problemen

3.1 Inleiding

Het maken van kruisingen met steriele vader- of moederplanten heeft niet zoveel zin. Hetzelfde geldt voor het maken van normale kruisingen in geval van incompatibiliteit. Wanneer problemen van deze aard worden verwacht, loont het de moeite om een en ander vroegtijdig te signaleren. Daar zijn verschillende, relatief eenvoudige technieken voor die achtereenvolgens worden behandeld.

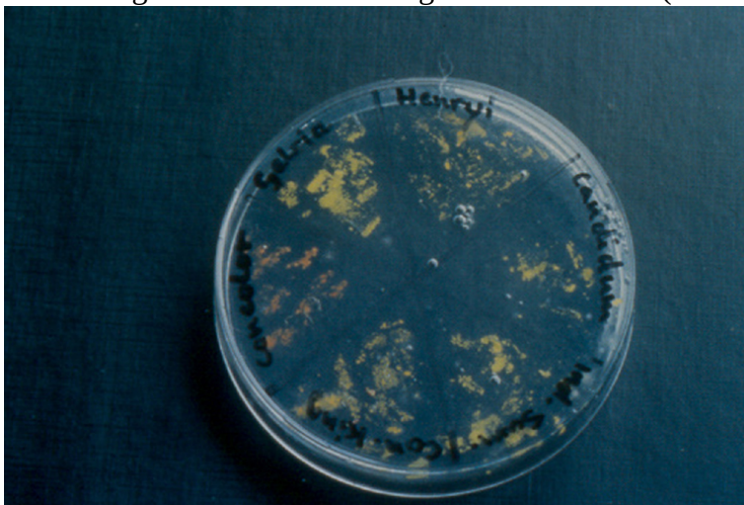
3.2. Fertiliteit

Het controleren van de fertiliteit van een plant kan opgedeeld worden in het controleren van de vrouwelijke fertiliteit en het controleren van de mannelijke fertiliteit.

De controle van de vrouwelijke fertiliteit gebeurt meestal door een moederplant te bestuiven met een mengsel van stuifmeel en te kijken of er zaad wordt gevormd. Daarbij hoeft niet gewacht te worden tot het zaad rijp is, afhankelijk van het gewas kun je enkele dagen of weken na de bestuiving al zien of er zaad wordt gevormd.

De controle van de mannelijke fertiliteit gebeurt deels visueel (zijn er meeldraden, hebben die helmknoppen, zit daar stuifmeel in) en deels via kleuring of kieming van het pollen. Er zijn verschillende kleurstoffen bekend die geschikt zijn om stuifmeel te kleuren. Vervolgens kan onder een microscoop bepaald worden wat het percentage gekleurde stuifmeelkorrels is. Dat is dan een maat voor de hoeveelheid levende stuifmeelkorrels. Dat hoeft niet hetzelfde te zijn als het percentage kiemende stuifmeelkorrels, al zal er wel meestal een duidelijke (positieve) correlatie zijn. Het is ook mogelijk stuifmeelkorrels te laten kiemen op kunstmatige media. Binnen een paar uur is dan duidelijk wat het percentage kiemende stuifmeelkorrels bedraagt.

Afbeelding 13: Stuifmeelkieming van lelie in vitro (Foto J. den Besten).

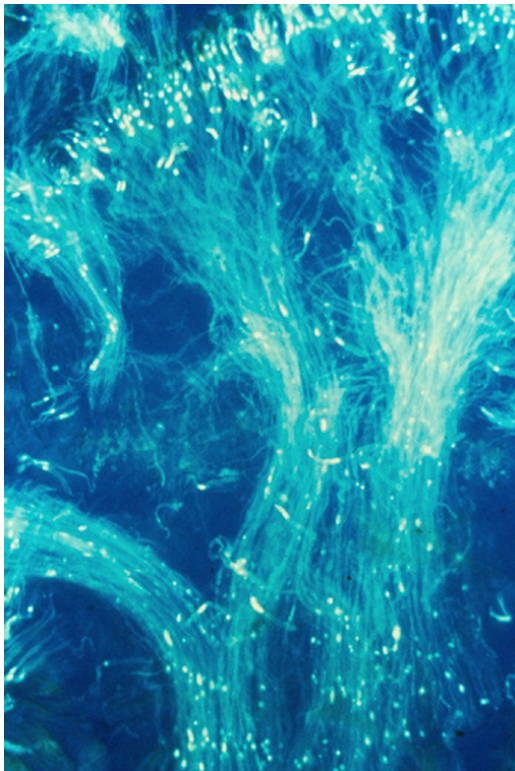


3.3 Incompatibiliteit

Aantonen van incompatibiliteit is gecompliceerd vanwege het feit dat binnen een gewas veel verschillende S-allelen kunnen voorkomen die niet alle even sterk werken en het milieu een belangrijke rol bij de sterkte van de incompatibiliteitsreactie kan spelen. Wanneer er sprake is van incompatibiliteit, zijn de planten vrouwelijk en mannelijk fertil. Een snelle methode om vast te stellen of er sprake is van incompatibiliteit, is het kijken naar de pollenbuisgroei in de stamper (stijl). Callose in de groeiende pollenbuizen kan met aniline blauw worden gekleurd. In de rondes van een groeiende pollenbuis is een dun laagje callose aanwezig, terwijl deze kamers van tijd tot tijd worden afgesloten met een calloseprop. Door een UV-microscoop licht de callose groen op. Daardoor kan men de doorgroeiende pollenbuis in de stijl eenvoudig waarnemen.

Voor het bepalen van het type S-allel (er is meestal sprake van multiple allelie met tot enkele tientallen S-allelen) en het type van sporofytische incompatibiliteit is een reeks referentieplanten nodig waarvan dit bekend is.

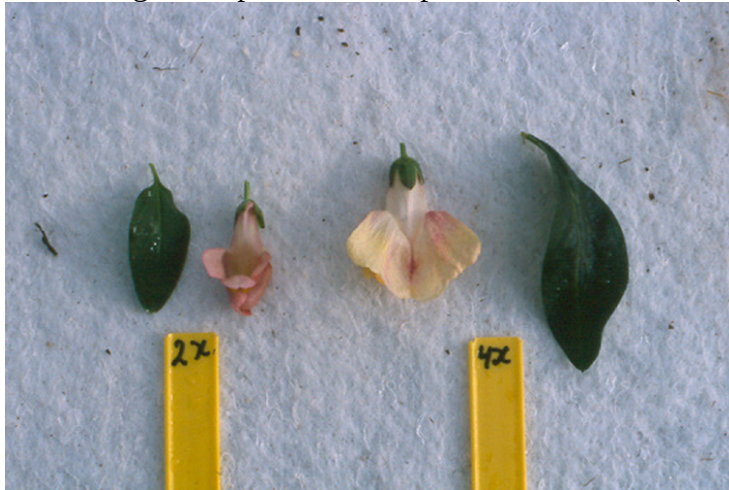
Afbeelding 14: UV-microscopopname van een compatibele reactie, de pollenbuizen groeien vanaf de stempel (bovenin) naar het vruchtbeginsel van kool (Foto J. den Besten).



3.4 Ploïdiebepaling

In het algemeen kun je zeggen dat met een hoger ploïdeniveau de grootte van de plant toeneemt en het aantal bladeren en bloemen afneemt. Vaak wordt de lengte:breedte-verhouding van bladeren kleiner. Vaak is de toename van de dikte van het blad al een indicatie dat het ploïdieniveau is toegenomen.

Afbeelding 15: Diploïde en tetraploïde leeuwenbek (Foto J. den Besten).



Afbeelding 16: Een van de radijsrassen is tetraploïd (Foto J. den Besten).

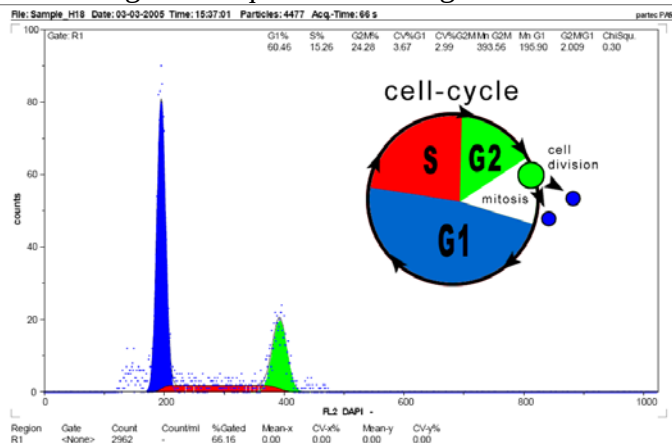


Het ploïdeniveau van planten kan bepaald worden door preparaten te maken van de metafase I van de meiose. Een kwestie van het juiste stadium zoeken, de juiste kleuringstechniek gebruiken en kijken hoe de chromosomen in het equatoriale vlak liggen. Heeft elk chromosoom een homoloog, dan is er sprake van een autodiploïd. Zo kun je ook diploïden, tetraploïden enzovoorts zien. De beschrijving lijkt eenvoudig, maar de praktijk is wat ingewikkelder. De metafase die je zo graag wilt zien is de kortst durende fase van de celdeling en het maken van de preparaten moet precies op het juiste moment plaatsvinden. Dat is per plant en per seizoen anders en dus niet eenvoudig. Je zult vooral veel interfasen zien. Als het wel lukt blijken veel planten hele kleine chromosomen te hebben waar je nauwelijks iets met

een lichtmicroscop aan kunt zien of er zo veel te hebben dat de gewenste waarnemingen niet te doen zijn.

Behoorlijk precies, maar voor de kleinere, meestal veredelaars in siergewassen nogal duur, is de bepaling met behulp van een flowcytometer. Met een flowcytometer wordt de hoeveelheid DNA bepaald via het meten van de fluorescentieactiviteit van specifiek gekleurde celkernen. De hoeveelheid DNA van een diploïde plant ziet er dan als volgt uit in grafiek.

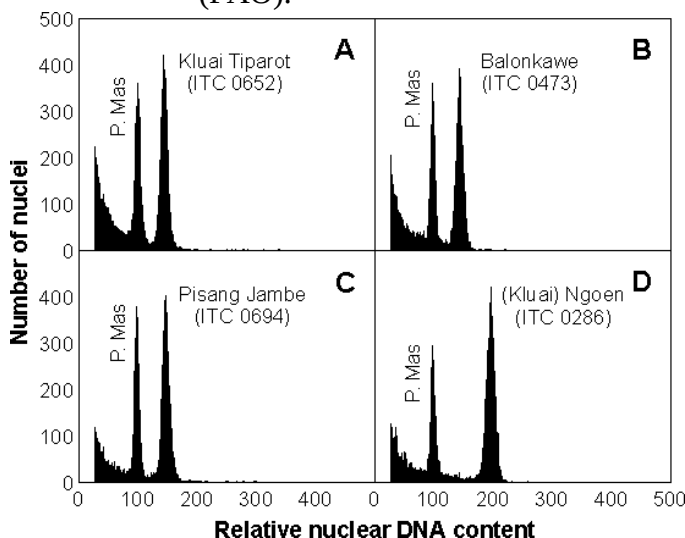
Afbeelding 17: Frequentieverdeling DNA-hoeveelheid (www.plantcytometrie.nl)



Afhankelijk van de fase van celdeling bevatten celkernen vlak voor de verdeling van de chromosomen de dubbele hoeveelheid DNA.

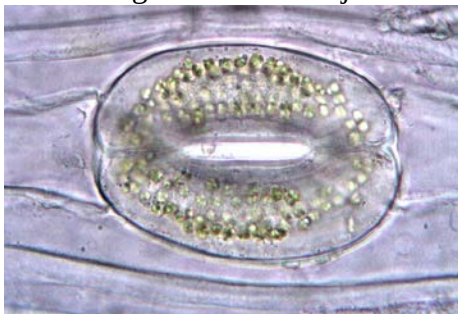
Wanneer naast een onbekend monster ook monsters met bekend ploïdeniveau worden geanalyseerd, kan het ploïdeniveau vrij nauwkeurig worden vastgesteld. Wanneer van een groot aantal onbekende planten het ploïdeniveau moet worden bepaald, kan een mengmonster worden geanalyseerd. Geeft dat een beeld vergelijkbaar met bovenstaande figuur, dan hebben alle onbekende planten hetzelfde ploïdeniveau en hoeven de planten niet apart te worden geanalyseerd.

Figuur 18: Flowcytometrische bepaling aan banaan. P. mas is diploïd. Aan de hand van de DNA-pieken is te zien dat de andere bananen triploïd of tetraploïd zijn (FAO).



Twee relatief eenvoudige andere methoden om iets te zeggen over het ploïdeniveau zijn de chloroplasten in de sluitcellen van de huidmondjes en de kiemporen in de pollenkorrels. Het aantal chloroplasten in de sluitcellen van de huidmondjes is gecorreleerd met het ploïdeniveau. Bij veel gewassen is de epidermis eenvoudig te verwijderen en zijn de sluitcellen onder de microscoop goed zichtbaar en de chloroplasten te tellen. Afhankelijk van het gewas zitten de meeste huidmondjes aan de bovenkant (tuinboon) of onderkant (leeuwenbek) van het blad. Het aantal kiemporen van de pollenkorrels is ook gerelateerd aan het ploïdeniveau. Door de pollenkorrels in een reagens te doen dat als het ware de inhoud naar buiten trekt, worden de kiemporen zichtbaar als uitstulpingen. Van grote aantallen pollenkorrels kan snel het aantal kiemporen worden bekeken. Dit soort methoden is een redelijk betrouwbare eerste screening, waarna voor de zekerheid monsters gestuurd kunnen worden naar een lab met een flowcytometer.

Afbeelding 19: Huidmondje met chloroplasten bij hyacint (www.ronaldschulte.nl).



4. Oplossingen voor kruisingsbarrières

4.1 Inleiding

In theorie kunnen heel veel kruisingen niet die in de praktijk soms toch lukken. Steriele planten maken soms toch eicellen en/of pollenkorrels. De minivarianten van het potplantje *Exacum affine* worden gestekt omdat ze steriel zijn. Als je het stuifmeel onder een microscoop bekijkt zie je al snel naast de vele lege pollenkorrels een paar goed gevulde. Die blijken rood te kleuren na behandeling met tetrazolium en leven dus. Als je zelfbevruchtingen maakt, krijg je vaak toch een paar zaden. Zaai je die uit, dan krijg je het grote type, dat door zaad wordt vermeerderd. Blijkbaar is er sprake van zowel ongereduceerde eicellen als pollenkorrels. We vinden het ook normaal dat er (triploïde!) appelvruchten zijn, zoals bij de Jonagold en Goudreinette (Schone van Boskoop). Deze rassen zijn slechte bestuivers en bevatten ook weinig zaad.

Het doorbreken van kruisingsbarrières vraagt doorzettingsvermogen en creativiteit. Elk gewas is anders en er kan vaak meer dan je op basis van boeken denkt. In dit onderdeel worden verschillende voorbeelden gegeven van soms heel creatieve oplossingen.

4.2 Bloei-inductie

Wanneer het gewas uit de juveniele fase is, komt het vanzelf in bloei, gestuurd via ouderdomsprocessen en de daarbij behorende veranderende verhouding tussen groeiregulators. Sommige gewassen gaan pas bloeien nadat de bloei geïnduceerd is, veelal via daglengte of temperatuur. Bij veel gewassen is wel te achterhalen wanneer de plant in het oorsprongsgebied bloeit en hoe de inductie moet verlopen.

Na de bloei-inductie dient de bloei nog gerealiseerd te worden. Meestal lukt dat onder normale omstandigheden wel, soms helpt het de plant flink stress te geven (generatief sturen).

Als het niet mogelijk is bloei te induceren en te kruisen, wordt de veredeling erg lastig. Mutatieveredeling is nogal ongericht en onzeker. Genetische transformatie is niet wereldwijd toepasbaar (vooral in de Westerse wereld niet). Verzamelen en vergelijken van materiaal van zoveel mogelijk verschillende bronnen, kan leiden tot het vinden van het beste genotype. Ook kan het zijn dat binnen bestaande rassen spontane mutaties zijn opgetreden en dan kan selectie binnen 1 ras (dat eigenlijk vanwege de vegetatieve vermeerdering genetisch uniform zou moeten zijn) toch leiden tot een verbeterd type. Voor dit soort ‘afgeleide’ rassen dient een deel van de royalty's aan de originele eigenaar afgedragen te worden.

4.3 Ongelijke bloei

Bij de meeste gewassen is ongelijke bloei alleen maar lastig, maar oplossingen als gespreid over de tijd zaaien, stekken en bloei induceren liggen voor de hand. Ook verschillende klimaatinstellingen kunnen de bloei rechttrekken. Gaat het echt mis, dan is stuifmeelbewaring de enige oplossing. De bewaarbaarheid van stuifmeel verschilt van gewas tot gewas. Het

nadeel is natuurlijk dat je de eerst-bloeiende ouder alleen als vader kunt gebruiken en dat je eventuele cytoplasmatische kenmerken kwijtraakt uit dit materiaal.

Afhankelijk van de soort, kan stuifmeel korter of langer worden bewaard. Vers stuifmeel van slechte kwaliteit is natuurlijk heel slecht bewaarbaar omdat de kiemkracht tijdens de bewaring afneemt.

Stuifmeel kun je in het algemeen enkele dagen bij kamertemperatuur bewaren in bijvoorbeeld een petriglas dat niet helemaal is afgesloten.. In een excicator met een lage relatieve luchtvochtigheid kun je het vaak enkele weken goed houden, in de huishouddiepvries lukt dat maanden en in de vloeibare stikstof jaren. Van verschillende gewassen is in de literatuur wel te vinden hoe de procedure precies moet verlopen. Het invriezen zelf is meestal geen probleem, het ontdooien lijkt lastiger.

Afbeelding 20: Bewaring van stuifmeel in een excicator (Foto J. den Besten).



4.4 Incompatibiliteit

Incompatibiliteit is vroeger veel in kool gebruikt bij het maken van hybriden. Een probleem daarbij is dat de veredelaar enerzijds een sterk incompatibiliteitsysteem wil hebben zodat er weinig inteeltplanten in de hybriden zullen zijn, maar anderzijds de inteeltlijnen wel wil kunnen intelen. Er zijn verschillende manieren ontwikkeld om de incompatibiliteit te omzeilen.

De Japanse onderzoeker Kakizaki heeft ontdekt dat het incompatibiliteitsysteem het beste werkt rondom het moment van bloei. In jonge bloemknoppen werkt de incompatibiliteit minder terwijl de stamper wel enigszins receptief is. Ook in oude bloemen werkt het systeem minder goed terwijl de stamper nog wel bestoven kan worden. Veredelaars maken hiervan gebruik door jonge bloemen te bestuiven; knopbestuiving.

Ook is bekend dat het milieu in het algemeen van invloed kan zijn op het incompatibiliteit - systeem. Licht, temperatuur, luchtvochtigheid, samenstelling van de lucht kunnen de sterkte van het systeem beïnvloeden. Bij kool heft een zogenaamde CO₂-narcose de incompatibiliteit

voor een belangrijk deel op. Op deze wijze wordt het vaak mogelijk voldoende zaad te maken van de inteeltlijnen voor de uiteindelijke productie van hybridezaad.

Als deze technieken niet voldoende resultaat geven, bestaat nog de mogelijkheid om in te telen via isogene lijnen, die steeds met elkaar gekruist worden:

$$S1S1 \times S2S2 \rightarrow \frac{1}{4} S1S1 + \frac{1}{2} S1S2 + \frac{1}{4} S2S2$$

$S1S1$ wordt weer gekruist met $S2S2$ enzovoorts. Op de S -allelen na worden de planten hetzelfde, de zogenaamde isogene lijnen.

4.5 Mannelijke steriliteit

Wanneer sprake is van mannelijke steriliteit, is die in het algemeen niet op te heffen. Slechts in het geval van functionele mannelijke steriliteit, is door het openen van helmknoppen op eenvoudige wijze toch stuifmeel te krijgen. Ook wanneer de mannelijke steriliteit veroorzaakt is door milieu-invloed, is door het creëren van een ander milieu mogelijk toch stuifmeel te krijgen. In alle andere gevallen kan de mannelijk steriele plant niet als vader gebruikt worden. Uiteraard is het wel mogelijk de mannelijk steriele plant als moeder te gebruiken in kruisingen in de veredeling en hybridezaadteelt. Bij bijvoorbeeld paprika (*Capsicum annuum* L.) komt genetische en cytoplasmatische mannelijke steriliteit voor. Afhankelijk van de te oogsten delen van de hybride (vruchten bij paprika of niet-generatieve delen zoals bij peen (*Daucus carota* L.) moet rekening gehouden worden met de fertiliteit van de hybride.

Zelfbevruchten lukt natuurlijk ook niet als er sprake is van mannelijke steriliteit. Ook nu kan gebruik worden gemaakt van isogene lijnen. Een mannelijk steriele plant wordt steeds gekruist met een fertiele, die zo is geselecteerd dat in de volgende generatie weer mannelijk steriele planten voor komen, die weer met fertiele worden gekruist, enzovoorts. Afhankelijk van het type mannelijke steriliteit wordt de vaderlijn via zelfbevruchting vermeerderd of splitst hij uit na de kruising.

4.6 Eenslachtigheid en tweehuizigheid

Wanneer sprake is van tweehuizigheid, heeft de veredelaar een probleem wanneer hij wil intelen. De snelste manier van intelen is zelfbevruchting en dat is uitgesloten bij strikt tweehuizigen. De veredelaar zal dan overgaan op het herhaald kruisen van broertjes en zusjes (full sibs) waardoor het langer duurt voordat homozygotie wordt bereikt.

In de praktijk blijkt dat veel tweehuizige planten aan het eind van de bloei bloemen van een ander geslacht vormen. Dat is onder andere het geval bij spinazie, waar de vrouwelijke planten nog enkele mannelijke bloemen produceren, vooral als er geen of weinig zaad is gezet.

Soms is het commercieel aantrekkelijke rassen te produceren die geheel vrouwelijk zijn (komkommer) of geheel mannelijk zijn (asperge). Geheel vrouwelijke rassen van komkommer worden geproduceerd door twee vrouwelijke lijnen met elkaar te kruisen. Dat lukt natuurlijk alleen wanneer een van beide lijnen mannelijke bloemen gaat produceren. De geslachtsexpressie is afhankelijk van de verhouding tussen gibberelline en ethyleen. Door te spuiten met gibberelline of ethyleen weg te vangen via bespuiting met zilveroplossingen, gaan geheel vrouwelijke lijnen toch enige tijd mannelijke bloemen produceren en worden ze

geschikt als vader. Bij asperge zie je in het najaar vaak enkele bessen aan de geheel mannelijke planten zitten.... In de veredeling maakt men gebruik van zogenaamde super-mannetjes (YY-planten) om de geheel mannelijke hybriden te produceren.

4.7 Problemen met emasculeren

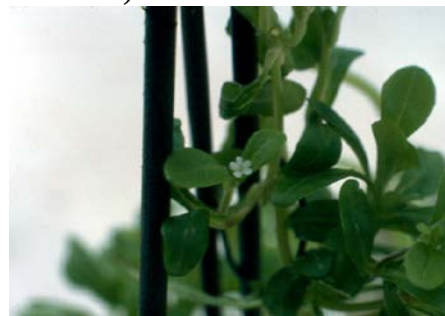
Wanneer problemen met de emasculaties optreden, is het zaak de morfologie en de ontwikkeling van de bloem goed te bestuderen.

Bij de eerder genoemde veldsla levert dat helaas niet veel echte oplossingen op. Veldsla is een strikte zelfbevruchter en als je zonder emasculeren veel kruisingen maakt, vallen de sporadisch voorkomende kruisingen relatief makkelijk op tussen de vele zelfbevruchtingen. Dat is helemaal het geval wanneer de vader een makkelijk herkenbaar is en een dominante eigenschap heeft. Daarnaast valt te overwegen met behulp van gametociden bepaalde planten mannelijk steriel te spuiten.

Bij sla blijkt de stamper 's morgens vroeg door een krans van meeldraden te groeien en zichzelf op deze manier te bestuiven. De bloemen bloeien slechts één dag en alleen op de dag dat bloem opengaat kan geëmasculeerd worden. 's Morgens vroeg worden de bloemetjes geopend en wordt met een pincet de kans van meeldraden verwijderd voordat de stamper zo hoog in de bloem zit dat die ook gaat afbreken. Vooral 's zomers is het moment van emasculeren erg vroeg en al snel kan niet meer worden geëmasculeerd. Door de sla in potten te planten en 's nachts in een koude en donkere cel te plaatsen, kun je de volgende dag de planten een voor een emasculeren en bestuiven. Zowel de grootte van de bloeiende slaplant als het aantal bloeiende planten kunnen een probleem vormen voor het gebruik van een koelcel. Het is ook mogelijk een poging te doen stuifmeel van de net geopende stampers te spoelen of om planten mannelijk steriel te spuiten.

Hoewel het kruisen van tomaat in het algemeen geen probleem is, kun je door goed naar de bloem te kijken, in plaats van de meeldraden een voor een te verwijderen ook de kans van kroonbladeren, waarop de meeldraden ingeplant staan, in één keer verwijderen.

Afbeelding 21: Bloeiende sla en veldsla (Foto J. den Besten).



4.8 Verschillen in ploëdeniveau

4.8.1 Inleiding

Om de problematiek goed te begrijpen die wordt veroorzaakt door verschillen in ploëdieniveau, is het nodig om de genetische achtergrond en de terminologie te herhalen/bespreken. Daarna wordt ingegaan op meer praktische oplossingen voor ploëdieproblemen.

4.8.2 Terminologie en notatie

Hoewel in de literatuur verschillende typen notatie gevonden kunnen worden, is de meest logische vorm van noteren van het ploëdieniveau voor een diploëde tomaat $2n = 2x = 24$.

$2n$ en n : Met $2n$ wordt aangegeven dat het gaat om het somatische aantal chromosomen, het aantal chromosomen dat je kunt zien/tellen in de metafase van de mitose in gewone cellen, in de diploëde fase van een plant. Met n wordt aangegeven dat het gaat om de chromosomen in de haploëde fase van de plant, om geslachtcellen. Hoewel we het bij hogere planten daar niet zoveel over hebben, hebben ze in feite net als mossen en varens een generatiewisseling. Het verschil is dat we normaal gesproken geen haploëde hogere planten hebben, maar slechts haploëde pollenkorrels en eicellen.

x , $2x$, $3x$... Met x wordt een complete set chromosomen aangegeven, een genoom. Diploëde planten hebben in hun pollen en eicellen 1 genoom ($n = x$) en in hun gewone lichaamcellen 2 genomen ($2n = 2x$). Planten kunnen ook haploëd ($2n = x$), triploëd ($2n = 3x$), tetraploëd ($2n = 4x$), penta-, hexa-, hepta- of octoploid zijn.

Aantal chromosomen: In dit voorbeeld heeft een tomaat 24 chromosomen, 2 sets van 12. Elk chromosoom heeft een homoloog ofwel elk chromosoom komt 2 maal voor. Een complete set chromosomen, het genoom, van tomaat bestaat uit 12 chromosomen. Het aantal chromosomen in het genoom varieert per soort en zit bij planten vaak tussen de 5 en 15. Plantensoorten kunnen hetzelfde aantal chromosomen in hun genoom hebben, maar geheel verschillende waardoor ze niet kruisbaar zijn. Kruisbaarheid is natuurlijk ook een probleem als de chromosoomaantallen van het genoom ongelijk zijn.

Het ploëdieniveau van de plant wordt aangeduid met het aantal genomen:

Haploëd	$2n = x$	bijvoorbeeld een niet-verdubbelde haploëde plant uit de antherencultuur
Diploëd	$2n = 2x$	de meeste door zaad vermeerderde gewassen
Triploëd	$2n = 3x$	banaan en zaadloze watermeloen
Tetraploëd	$2n = 4x$	aardappel, veel rozen
Pentaploëd	$2n = 5x$	

Kruisingsbarrières

Hexaploïd	$2n = 6x$	chrysant
Heptaploïd	$2n = 7x$	
Octoploïd	$2n = 8x$	aardbei

De planten met de even ploëdeniveaus zijn fertiel en maken de volgende gameten:

Haploïd	$n=x$	(van een diploïde plant)
Diploïd	$n=2x$	(van een tetraploïde plant)
Triploïd	$n=3x$	(van een hexaploïde plant)
Tetraploïd	$n=4x$	(van een octoploïde plant)

Autoploïden zijn planten die een bepaald aantal genomen van de eigen soort hebben, van autohaploïd tot auto-octoploïd oplopend. Het kenmerk van deze planten is dat de even ploëdie niveaus fertiel zijn (weliswaar afnemend met het ploëdieniveau) en dat de oneven ploëdeniveaus steriel zijn (met het toenemen van het ploëdieniveau neemt de fertiliteit meestal iets toe). Binnen de Autoploïden worden de genomen meestal niet met een letter gecodeerd omdat de genomen toch hetzelfde zijn.

Alloploïden zijn planten met genomen van verschillende soorten, van allohaploïd tot allo-octoploïd. De genomen kunnen van meer dan 2 soorten afkomstig zijn. Vaak wordt met hoofdletters aangegeven van welke soorten welke genomen afkomstig zijn. De allodiploïd AB heeft dan dus een genoom van soort A en van soort B, de allotetraploïd AABB heeft dan 2 genomen van soort A en 2 van soort B, de hexaploïd AABBCC heeft 2 genomen van de soorten A, B en C. De hexaploïd AAABBB heeft 3 genomen van de soorten A en B. Theoretisch denkbaar is een octoploïd ABCDEFGH met 8 verschillende genomen.

Of Alloploïden fertiel of steriel zijn, hangt af van de aan- of afwezigheid van homologe chromosomen. De genoomtypen AABB, AABBCC, AAAABBBB, AABBCCC zijn fertiel omdat er steeds homologen zijn in de meiose. AB, AAABBB, ABCC, ABCDEFGH zijn steriel omdat er geen homologen zijn. Sommige fertiele alloploïden worden ook wel amphiploïd genoemd, waarmee wordt aangegeven dat er homologen zijn. AABB is een allotetraploïd ofwel een amphidiploïd (splitst namelijk uit als een diploïd), AAAABBBB is een allo-octoploïd ofwel een amphitetraploïd (tetraploïde uitsplitsing).

Een en ander lijkt gecompliceerd en enigszins theoretisch, maar de gemiddelde Nederlander eet $2x$ per dag producten van allohexaploïde planten in de vorm van ons dagelijkse brood. Gewone tarwe of broodtarwe is hexaploïd met 42 chromosomen ($2n = 6x = 42$) en ontstaan uit verschillende voorouders. In een ver verleden is diploïde eenkoorn ($2n = 2x = 14$) gekruist met een diploïde wilde grassoort, mogelijk *Aegilops speltoides* ($2n = 2x = 14$). De hieruit ontstane hybride heeft het dubbele aantal chromosomen gekregen via spontane verdubbeling (*Triticum turgidum*, $2n = 4x = 28$). De niet-verdubbelde hybriden zijn waarschijnlijk steriel en dus verdwenen. Van deze hybride stammen de emmertarwe en de harde tarwe, macaronitarwe of durumtarwe *Triticum durum* af. De emmertarwe is gekruist met de diploïde *Aegilops tauschii* ook wel *Aegilops squarrosa* (synoniem) ($2n = 2x = 14$) genoemd. Ook deze hybride heeft zich verdubbeld, omdat anders geen fertiele plant ontstaat. Dit zijn dus de uiteindelijke hexaploïde tarwe's gewone tarwe en spelt.

Aneuploïden zijn auto- of alloploïden met 1 of meer extra of minder chromosomen. Bij planten zijn deze meestal wel levensvatbaar en fertiel, bij mensen is het effect vaak heftiger. Denk maar aan de trisomie voor chromosoomnummer 21 die bij mensen leidt tot het syndroom van Down (mongooltjes). Euploïden hebben complete sets chromosomen.

4.8.3 Genetische achtergrond

Wanneer we kijken naar de monofactoriële F₂-splitsing van een (auto-)diploïde plant, dan zien we de bekende 1:2:1-verhouding van de genotypen AA, Aa en aa. Omdat er slechts 2 homologe chromosomen zijn, kunnen die maar op 1 manier worden verdeeld. In de meiose ontstaan voor de helft A- en voor de helft a-gameten. Dat geldt voor zowel eicellen als voor de pollenkorrels. In het bekende gametencombinatieschema dat tot de F₂ leidt, is de 1:2:1-verhouding eenvoudig af te lezen.

Afbeelding 22: Gametencombinatieschema leidend tot een F₂ bij een monofactoriële uitsplitsing.

Mannelijke gameten:	$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{2} a$
Vrouwelijke gameten:		
$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{4} AA$	$\frac{1}{4} Aa$
$\frac{1}{2} a$	$\frac{1}{4} Aa$	$\frac{1}{4} aa$

Bij een bifactoriële splitsing van een autodiploïd ontstaat: $\frac{1}{16} AABB + \frac{2}{16} AABb + \frac{1}{16} AAbb + \frac{2}{16} AaBB + \frac{4}{16} AaBb + \frac{2}{16} Aabb + \frac{1}{16} aaBB + \frac{2}{16} aaBb + \frac{1}{16} aabb$ (controleer dat).

Autotriploïden zijn in principe steriel maar vormen soms toch gameten die dan 2x of x kunnen zijn.

Autotetraploïden hebben viertallen homologe chromosomen die volgens toeval verdeeld worden.

AAAA vormt uiteraard alleen AA-gameten en aaaa alleen aa-gameten.

AAAa vormt voor de helft AA- en voor de andere helft Aa-gameten, aaaA voor de helft aa en voor de andere helft Aa.

AAaa vormt $\frac{1}{6} AA$, $\frac{4}{6} Aa$ en $\frac{1}{6} aa$. Met behulp van deze informatie kun je via gametencombinatieschema's kijken hoe een F₂ er uit zou zien.

Allotetraploïden (amphidiploïd) splitsen als autodiploïden uit en aan de uitsplitsing in de F₂ kun je via een chikwadraattoets zien waar je mee te maken hebt.

Het zal duidelijk zijn dat in de veredeling van polyploïden de kans op de aanwezigheid van volledig homozygoot dominanten of recessieven veel kleiner is als bij diploïden. Als je die typen wilt hebben (bijvoorbeeld omdat er geen sprake is van volledige dominantie), zul je dus met grotere aantallen in je programma's moeten werken.

4.8.4 Ontstaan van ongereduceerde gameten

Ongereduceerde gameten ontstaan doordat er in de metafase I of metafase II genetisch materiaal bij elkaar blijft, dat normaal gesproken over 2 cellen wordt verdeeld. In een normale meiose gaan eerst de homologe chromosomen uit elkaar (voordat dat gebeurt is overkruising mogelijk) en vervolgens worden de chromatiden van elk chromosoom verdeeld over 2 cellen.

Bij een onvolledige eerste deling (FDR ofwel First Division Restitution) blijven de homologe chromosomen bij elkaar en worden de chromatiden in de tweede meiotische deling verdeeld. Uitgaande van een heterozygote plant ontstaan ongereduceerde gameten met genotype Aa (zonder overkruising) en een deel (<50%) van de geproduceerde ongereduceerde gameten zal AA en aa zijn.

Bij een onvolledige tweede deling (SDR ofwel Second Division Restitution) worden de homologe chromosomen over 2 cellen verdeeld maar blijven de chromatiden in de tweede meiotische deling bij elkaar. Uitgaande van een heterozygote plant ontstaan ongereduceerde gameten met genotype AA en aa en als er overkruising is zal een deel Aa zijn.

4.8.5 Praktische oplossingen voor ploëdieproblemen

Als oudersoorten verschillen in aantal chromosomen dan is het vaak beter de soort met de meeste chromosomen als moeder te nemen. Vaak lukt de kruising beter en ontstaan er beter gevormde zaden. Er zijn echter ook uitzonderingen (petunia, roos, aardappel), zodat het de moeite waard is, zeker in eerste instantie, de kruisingen ook reciprook te maken.

Wanneer 2 fertiele planten verschillende ploëdieniveaus hebben, kan dat leiden tot chromosomale problemen en steriliteit van de F1. Problemen met chromosomen worden soms veroorzaakt door doordat het plasma niet goed past bij de chromosomen. Soms is het probleem bij de reciproke kruising verholpen.

In theorie kun je de chromosomen van de steriele nakomeling verdubbelen en is het probleem opgelost. In de praktijk is het verdubbelen van chromosomen met colchicine en oryzaline niet zo eenvoudig (lage slagingskansen). Het is handiger om de ouders (waar meer materiaal van beschikbaar is) te verdubbelen dan die mogelijk ene F1-plant. Dan nog is de vraag of je verder kunt, want bij de volgende kruising komt het probleem waarschijnlijk terug.

Planten met oneven ploëdieniveaus waarvan je verwacht dat ze steriel zijn, blijken in de praktijk nogal eens enige mannelijke en vrouwelijke steriliteit te bezitten. Haploïden produceren soms ongereduceerde en dus haploïde ($n=x$) gameten. Triploïden maken vaak zowel $n=x$ als $n=2x$ gameten. Bij roos bleek het $2x$ -stuifmeel het beter te doen dan het x -stuifmeel. X - en $2x$ -eicellen bleken echter even succesvol te zijn.

Het is overigens zo dat soorten met even ploëdieniveaus ook ongereduceerde gameten produceren. Daarvan zou je gebruik kunnen maken bij het kruisen van bijvoorbeeld een diploïd met een tetraploïd. De onderzoeksgroep van J. van Tuyl heeft hiervan gebruik gemaakt door leliestuifmeel te zeven om de frequentie ongereduceerde gameten te verhogen.

In de praktijk van soortkruisingen, maar ook van ploëdiekruisingen is de ervaring zeer divers en de uitkomst vaak onvoorspelbaar. Soms ontstaat makkelijk en veel zaad, maar is het van slechte kwaliteit. Ook gebeurt het dat het bijna onmogelijk is zaad te krijgen, maar kiemt het vervolgens gemakkelijk.

Op <http://www.nkvf.nl/utc/ver/fertiliteit.htm> kun je informatie vinden over de veredeling van Fuchsia met betrekking tot ploëdie en fertiliteit.

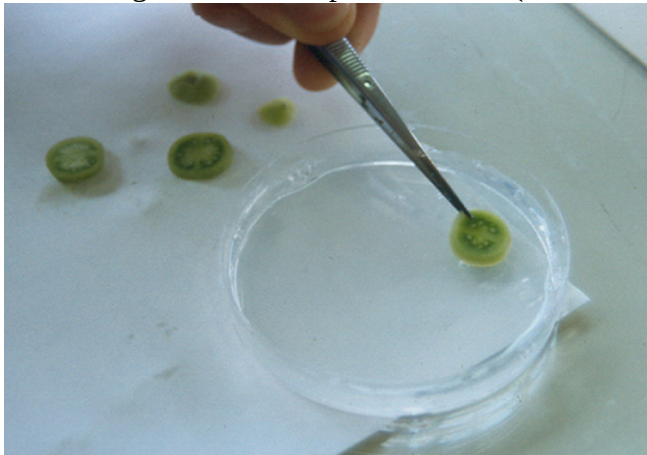
4.9 Morfologische problemen

Verschillen in stijlengte zoals bij lelie voorkomen, zijn soms eenvoudig te omzeilen door de soort met de lange stijlen als vader te gebruiken. Het kan zijn dat de soort met de korte stijl toch als vader moet worden gebruikt. De stijl van de moeder kan dan worden ingekort en het stuifmeel kan zelfs in het vruchtbeginsel worden geïnsemineerd. Deze techniek kan ook oplossing bieden voor barrières in de stijl van andere aard.

4.10 Embryo-abortie

Embryo-abortie kan voorkomen worden door het embryo uit het vruchtbeginsel te halen voordat het embryo is afgestorven. Het moment wordt, gewasafhankelijk, zo gekozen dat het embryo niet te klein meer is, maar nog wel leeft. Het uitprepareren van een embryo is bij de meeste gewassen vanwege de grootte van het embryo niet eenvoudig en tijdrovend. Het embryo wordt in/op een medium geplaatst dat zorgt voor verdere uitgroei. Bij sommige gewassen is het mogelijk plakken van het vruchtbeginsel te snijden en dat op een medium te zetten. Soms lukt het zelfs met hele vruchtbeginsels. De zaden groeien dan in het vruchtbeginsel in vitro uit.

Afbeelding 23: Ovarium-plak-methode (Foto M. Mooij).



Afhankelijk van de achtergrond van de ouders, levert embryo cultuur vaak steriele planten op waarmee niet zomaar verder kan worden gekruist. Verder komen planten uit het lab nogal eens op momenten die niet goed passen in het kruisingsseizoen. Toch kan embryo cultuur, vooral bij vegetatief vermeerderde gewassen, wel degelijk bruikbare rassen opleveren. Bijzondere soortkruisingen kunnen via embryo cultuur soms gered worden en kunnen als ras soms meteen worden geïntroduceerd.

Vanwege de hierboven geschetste complexiteit van het proces van embryo rescue, is het de moeite waard te proberen embryo rescue te voorkomen. De inhoudsstoffen uit het embryo rescue-medium kunnen, toegediend aan het vruchtbeginsel, leiden tot op ‘natuurlijke’ wijze uitgroeien van embryo's in het zaad. Op vergelijkbare wijze kun je proberen om het embryo in ieder geval zover te laten groeien dat het te redden valt.

4.11 F₁-steriliteit en andere complicaties in de F₁

Als er geen of onvoldoende homologe chromosomen zijn, treden problemen in de meiose op, met als gevolg steriliteit. Dit soort planten groeit vaak ook wat minder goed omdat de chromosomen niet zo goed bij elkaar passen, of niet bij het plasma passen. Spontaan kunnen chromosomen worden uitgestoten en na verloop van tijd zouden meer homologe chromosomen kunnen overblijven en de groei en fertiliteit weer hersteld kunnen worden.

Een alternatief is chromosoomverdubbeling met behulp van colchicine of oryzaline. Colchicine is een zeer giftige stof die eigenlijk beter aangrijpt in dierlijke en menselijke cellen, terwijl oryzaline bestanddeel is van sommige onkruidbestrijdingsmiddelen en eigenlijk alleen werkt in plantaardige cellen. Het oplosmiddel voor oryzaline (DMSO) is helaas wel giftig.

Het probleem met chromosoomverdubbeling is dat de slagingskans erg klein is. Het heeft dan ook geen enkele zin die ene steriele plant van vele soortkruisingen te verdubbelen. De plant zal eerst vermeerderd moeten worden tot enkele honderden of duizenden planten die behandeld kunnen worden. Het is waarschijnlijk makkelijker om dat met de kruisingsouders zelf te doen, omdat die in grote aantallen beschikbaar zijn.

Door de behandeling raakt de mitotische celdeling in de war en worden allerlei fouten gemaakt. Als gevolg daarvan zullen behandelde delen afsterven, overleven maar slecht groeien of ontsnappen. Cellen waarin wel chromosoomverdubbeling optreedt maar geen logisch daarop volgende verdeling van chromosomen, zijn de cellen die we graag willen hebben. Als die in het bladpuntje zitten of ergens anders ver van de groeipunten hebben we er nog niets aan. Het is zaak om groeipunten te behandelen die uit zo weinig mogelijk cellen bestaan.

Per gewas is dit anders. Sommige gewassen regenereren relatief makkelijk en daar zou je zelfs losse cellen kunnen behandelen, die je vervolgens regeneert tot plant die dan ofwel verdubbeld is of niet. Een natuurlijk alternatief is het behandelen van bladstekken (*Kalanchoë*, *Begonia*). De plantjes die uitgroeien aan de bladsteel zijn zogenaamde adventief spruiten. Ze zijn ontstaan uit 1 cel die wel of niet is verdubbeld. Bij veel gewassen lukt dit echter niet en worden zaden of groeipunten behandeld. Het voordeel van werken met zaad is, dat je er makkelijk over kunt beschikken, het werken ermee eenvoudig is en grote aantallen genomen kunnen worden. Nadeel is dat het groeipunt meercellig is en de slagingskans dus laag. Groeipunten in planten bevatten waarschijnlijk nog meer cellen dan die in het zaad en zijn dus niet zo geschikt. Het gebruik van jonge groeipunten, bijvoorbeeld ontstaan na het verwijderen van het hoofdgroeipunt, is aan te bevelen.

Afbeelding 24: Bladstek (adventief-spruitmethode) bij *Sinningia* in combinatie met bestraling en een celcultuur (Foto J. den Besten).



De planten die er verdubbeld uitzien (groter blad, andere lengte-breedte-verhouding, grotere maar minder bloemen) kun je testen op polyploidie met de in de paragraaf 'Ploidiebepaling' beschreven methoden.

Afbeelding 25: In welke rij moet je de tetraploïde radijs zoeken (zaad behandeld met colchicine)? (Foto J. den Besten)



4.12 Incongruentie

Wanneer planten echt onverwant zijn, is de kans dat de kruising op de een of andere manier toch gaat lukken heel erg klein. Oplossingen kunnen dan worden gezocht in de sfeer van genetische transformatie en mutatie.

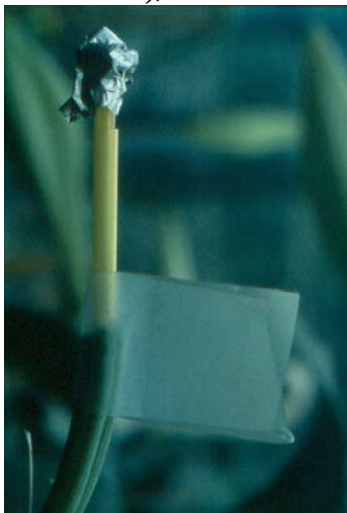
Genetische transformatie is relatief duur en heeft alleen zin als de eigenschap in een verder heel goed ras wordt gezet. Kennis van de genen is onontbeerlijk. De meeste tuinbouwgewassen zijn genetisch helaas nog niet in kaart gebracht. Mutaties zijn ongericht en worden eigenlijk alleen standaard toegepast in gewassen waarvan we weten wat we ermee kunnen, zoals kleurmutaties in chrysant. Daarnaast worden wel mutaties opgewekt om te kijken of er nieuwe eigenschappen ontstaan. Grote, gemuteerde populaties worden daarvan fenotypisch gescreend, in biotoetsen getest en met merkers getypeerd.

Wanneer de planten wel enigszins verwant zijn, kan een van de technieken die in dit hoofdstuk beschreven zijn uitkomst bieden. Er kunnen er nog een paar aan worden toegevoegd.

Stuifmeel injecteren in het vruchtbeginsel kan een manier zijn om de kruisingsbarrières in de stijl te omzeilen.

Twee andere oplossingen zijn het gebruik van mentorpollen en pionierpollen. Bij de mentorpollentechniek maakt men gebruik van eigen, bestraald stuifmeel dat nog wel kiemt maar niet meer bevrucht. Dat wordt samen met het stuifmeel van de kruisingsvader opgebracht. Bij de pionierpollentechniek wordt een gering deel eigen stuifmeel gemengd met een overmaat aan stuifmeel van de kruisingsvader gebruikt. In beide gevallen maakt het eigen stuifmeel als het ware de weg vrij voor het 'vreemde stuifmeel'. Een laatste truc is het maken van een zelfbestuiving gevolgd door het afsnijden van de stijl en die op de stijl van de moeder enten.

Afbeelding 26: Incongruentie bij lelie omzeilen met de geënte stijltechniek, tevens is de 'inhulling' van de stempel tegen ongewenste bestuiving met aluminiumfolie te zien (Foto J. den Besten),



Tenslotte is het mogelijk te zoeken naar soorten die qua verwantschap inzitten tussen de soort waarin het cultuurras zit en de soort die als geniteur van een nieuwe eigenschap wordt gebruikt. Via het gebruik van een of meer van deze zogenaamde brugsoorten is het mogelijk om genetisch materiaal te combineren van soorten die onderling niet kruisbaar zijn. Op deze wijze is het bijvoorbeeld gelukt om de resistentie tegen de luis *Nasonovia ribis nigri* uit de wilde sla *Lactuca virosa* via de als brugsoort fungerende wilde sla *Lactuca serriola* in onze cultuursla *Lactuca sativa* te kruisen. Zoals verwacht bij dit soort kruisingen stierven nogal wat hybridenplanten door necrose (hybrid breakdown), trad er veel mannelijke en vrouwelijke steriliteit op naast allerlei soorten afwijkingen aan pollenkorrels en eicellen, maar na herhaald terugkruisen met cultuursla, werden uiteindelijk redelijk normale *L. sativa* planten gevonden met de gewenste luisresistentie.

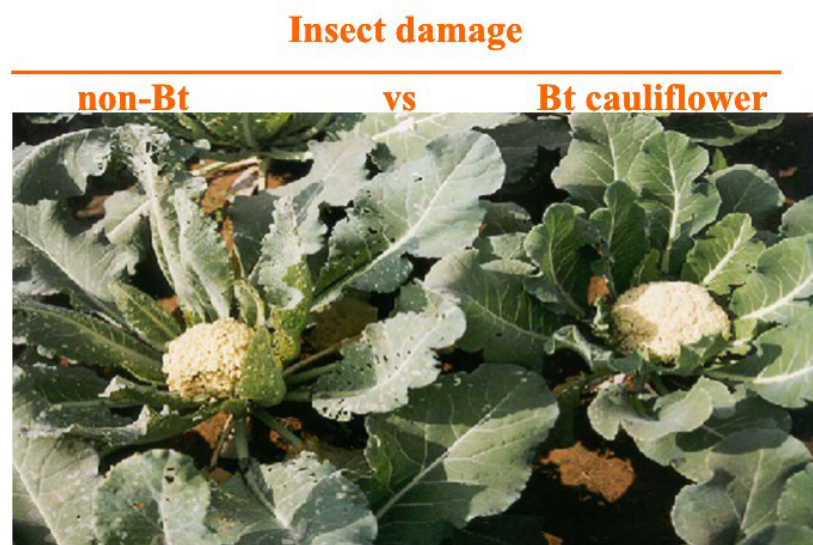
5. Afsluitende opmerkingen

Het is zelfs, met alle technieken die we hebben om kruisingsbarrières te slechten, de vraag of we niet meer energie moeten steken in GMO's. Klassieke non-GMO-veredeling kan, vooral met allerlei trucs, een heleboel maar de snelheid van de veredeling is gering. In appel zouden we graag resistenties tegen schurft, meeldauw en kanker inbouwen en dat gebeurt ook. Dat soort programma's duurt het echter 20-30 jaar en wellicht zijn tegen die tijd de oorspronkelijke veredelingsdoelen minder urgent of is de resistentie al doorbroken. In India en omgeving wordt veel kool geteeld en zijn enorme problemen met insecten in het algemeen en bijvoorbeeld de koolmot (diamond-back moth) in het bijzonder.

Afbeelding 27: Rupsen van de koolmot (diamond-back moth) op kool.

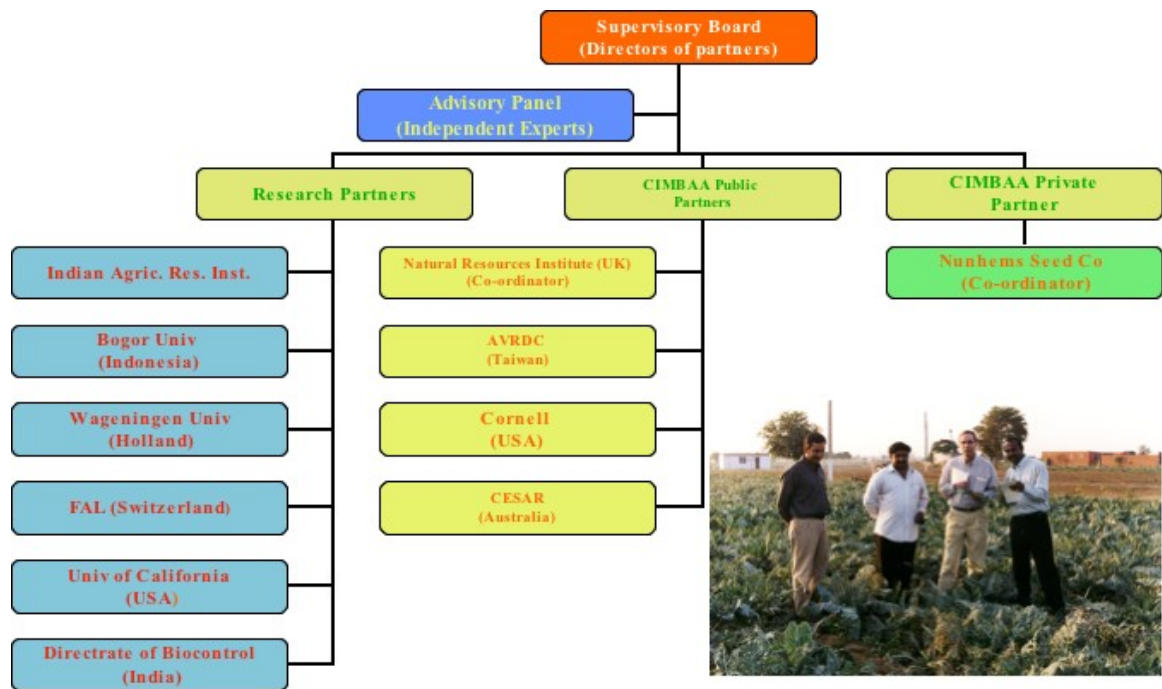


Afbeelding 28: Gewone bloemkool, intensief bespoten (zelfs met DDT) en onbespoten transgene bloemkool.



Tegen GMO's is vooral in de westerse wereld veel bezwaar. In de rest van de wereld wordt volop aan GMO's gewerkt. Veelal gebeurt dit door multinationals met feitelijk maar 1 doel: meer winst. Dat het ook anders kan, kun je zien op de website van het project CIMBAA (Collaboration on Insect Management for Brassicas in Asia and Africa). Daar wordt hightech GMO-werk gecombineerd met IPM en het publiek beschikbaar stellen van patenteerbare producten.

Afbeelding 29: Organisatie van het Cimbba project (www.cimbaa.org).



6. Practicum stuifmeelkieming en –kleuring

6.1 Inleiding

In de plantenveredeling worden bewust verschillende planten met elkaar gekruist. Bij het maken van kruisingen kan het wenselijk zijn om te weten of het stuifmeel kiemkrachtig is. Vooral na soort- en geslachtskruisingen laat de stuifmeelkwaliteit vaak te wensen over vanwege het ontbreken van voldoende homologie van de chromosomen van de verschillende soorten of geslachten. Ook in de commerciële zaadproductie kan het van belang zijn de stuifmeelkwaliteit te kennen. Vanwege de lage kosten vindt hybridenzaadproductie bijvoorbeeld plaats in China. Omdat in China soms rassen illegaal worden nagemaakt, wordt daar vaak alleen de moederlijn neergezet. Het stuifmeel van de vaderlijn wordt in Nederland geproduceerd en opgestuurd. Het heeft weinig zin dat te doen met kwalitatief slecht stuifmeel.

Er zijn verschillende methoden om de kwaliteit van stuifmeel vast te stellen. De snelste methode is de kleuring van stuifmeel met bijvoorbeeld karmijnazijnzuur, tetrazoliumzouten, of lactofenolzure fuchsine. Wanneer er een fluorescentiemicroscoop aanwezig is, kunnen pollenkorrels ook worden gekleurd met FDA (Fluoresceinediacetaat). Met deze kleurstoffen worden levende weefsels gekleurd. Omdat "niet-dode" stuifmeelkorrels niet altijd kunnen of zullen kiemen, kan de betrouwbaarheid van de toets soms tegenvallen.

Een betrouwbaarder en redelijk snelle methode is de stuifmeelkieming in vitro. Meestal kiemt het stuifmeel van planten die trinucleaat stuifmeel vormen moeilijker dan het stuifmeel van planten die binucleaat stuifmeel hebben. De leeftijd van de plant en van het stuifmeel, de temperatuur en de hoeveelheid licht en waarschijnlijk ook andere milieufactoren, kunnen invloed hebben op de stuifmeelkwaliteit.

6.2 Doel van het practicum

Het doel van het practicum is te leren op welke wijze de stuifmeelkwaliteit bepaald kan worden en de stuifmeelkwaliteit van verschillende gewassen te bepalen. Bekeken kan worden of er inderdaad een verschil is tussen de kieming van binucleaat en trinucleaat stuifmeel. Ook wordt gekeken naar de correlatie van de resultaten van de verschillende methoden.

6.3. Materiaal

Plantmateriaal:

Bloeiende planten van Brassica.

Bloeiende planten van Impatiens.

Diverse andere bloeiende planten.

Overige materialen:

De normale materialen voor microscoopwerk zoals object glazen, dekglazen, prepareernaalden.

Kruisingsbarrières

Lactofenolzure fuchsine:

20 g fenol

20 ml melkzuur (90%)

40 ml glycerine (98%)

20 ml water

8 ml fuchsine (1%)

Oplossing bewaren in bruine druppelflessen

NB Het werken met fenolen dient zoveel mogelijk! Onderstaande alternatieven werken ook.

Tetrazoliumoplossing:

0,5% tetrazoliumzout opgelost in water.

Karmijnazijnzuur:

3 delen azijnzuur (2%) op 1 deel zwavelzuur (98%) met 0,5% karmijn.

Kiemingsmedium:

gedestilleerd water

0,5-2 % agar

20-100 dpm boorzuur (H_3BO_3)

100-300 dpm calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)

sacharose in een reeks met respectievelijk 0, 5, 10, 20 en 30%

6.4 Methode

Per objectglas wordt van 1 van de kleurstoffen 1 druppel aangebracht op een objectglas. Stuifmeel wordt verzameld of verstrekt. De stuifmeelkorrels worden op de kleurstoffen gestrooid. Het geheel wordt afgedekt met een dekglas. Zo nodig wordt de overtollige vloeistof met filtreerpapier verwijderd. Na enkele minuten wordt het percentage gekleurde pollenkorrels waargenomen aan 100 pollenkorrels.

Het kiemingsmedium wordt aangeboden in petrischalen. Met een watervaste viltstift wordt de petrischaal aan de onderkant in 8 taartpunten verdeeld. Elke student heeft 5 petrischalen met verschillende concentraties sacharose. In elk van de acht taartpunten wordt stuifmeel van 1 van de beschikbare gewassen aangebracht. Na 10 minuten, 30 minuten, 1, 2 en 3 uur worden waarnemingen gedaan aan 100 pollenkorrels per gewas.

Van alle studenten worden de resultaten van de beste kleuringmethoden en de beste kiemingsmethoden verzameld. Met behulp van die gegevens wordt de correlatiecoëfficiënt berekend.

6.5 Waarnemingenblad

Waarnemingen: lengte van de pollenbuis na bepaalde tijden in aantal keren de pollendiameter, percentage kieming op de verschillende media, % gekleurde pollenkorrels.

Gewas/ Tijd	Lengte pollenbuis	% medium 1	% medium 2	% medium 3	% medium 4	% medium 5	% ge- kleurd pollen
Brassica: 10 min. 30 min. 1 uur 2 uur 3 uur	1 1-5 >5	1 1-5 >5	1 1-5 >5	1 1-5 >5	1 1-5 >5	1 1-5 >5	
Impatiens: 10 min. 30 min. 1 uur 2 uur 3 uur							
10 min. 30 min. 1 uur 2 uur 3 uur							
10 min. 30 min. 1 uur 2 uur 3 uur							
10 min. 30 min. 1 uur 2 uur 3 uur							
10 min. 30 min. 1 uur 2 uur 3 uur							

7. Practicum ploëdiebepaling

7.1 Inleiding

De meeste cultuurgewassen die door zaad worden vermeerderd zijn diploïd. Veel vegetatief vermeerderde gewassen zijn polyploïd. Heel vaak zijn het ook nog eens soortkruisingsproducten. Al met al levert dat nogal eens fertiliteits- en kruisingsproblemen op.

Bij de vegetatief vermeerderde gewassen levert verhoging van het ploëdieniveau (binnen bepaalde grenzen) planten met grotere bladeren, bloemen en vruchten, met andere woorden de sierwaarde wordt verbeterd. Aan de andere kant zal het aantal bladeren, bloemen en vruchten afnemen. Wanneer op een bepaald moment juist een trend heerst voor snijbloemen rassen met veel kleine bloemen, zou je dus juist moeten denken aan het verlagen van het ploëdieniveau. Verhoging van het ploëdieniveau kan verder wenselijk zijn na het verkrijgen van steriele kruisingsproducten waarmee men verder wil kruisen of na het verkrijgen van haar bloeiende planten uit de antherencultuur.

Bij de door zaad vermeerderde gewassen, komt polyploëdie niet veel voor. In het verleden is er een tetraploëd radijsras geweest en er zijn bijvoorbeeld tetraploëde leeuwenbekken.

Een verdubbeling van chromosomen kan met verschillende chemische stoffen plaatsvinden zoals colchicine van de plant herfsttijloos of met oryzaline, een bestanddeel van sommige onkruidbestrijdingsmiddelen.

7.2 Doel van het practicum

In dit practicum wordt het ploëdieniveau vastgesteld van verschillende rassen van leeuwenbek door middel van tellen van chloroplasten in de sluitcellen van de huidmondjes en het tellen van het aantal kiemporen in de pollenkorrels.

7.3. Materiaal

Bloemen en bladeren van diploëde en tetraploëde leeuwenbekken en mogelijke andere gewassen.

Plastidenreagens: 2% I, 2% KI, 0,02% fastgreen

Kiemporenreagens: 3 delen azijnzuur (2%) op 1 deel zwavelzuur (98%) met 0,5% karmijn.

7.4. Methode

Plastidentelling in de sluitcellen van de huidmondjes.

Door de plastiden te tellen wordt een aardig beeld gekregen van het ploëdieniveau in de L1-laag van de plant. Elke student bekijkt 10 huidmondjes en telt het totaal aantal plastiden in beide sluitcellen van elk huidmondje.

Kruisingsbarrières

De werkwijze is als volgt:

- breng op een objectglas een druppel plastidenreagens aan
- trek met een pincet een vliesje epidermis van het blad
- epidermis met binnenzijde op het reagens leggen
- dek glaasje aanbrengen
- overtollige reagens afvloeien
- tellen van aantallen plastiden

Kiemporentelling.

Het aantal kiemporen in de pollenkorrels is gecorreleerd met het ploïdieniveau van de L3. Van de ongeveer 100 pollenkorrels per plant wordt het aantal kiemporen geteld. Omdat de kiemporen aan alle zijden van de pollenkorrels kunnen zitten, is goed schroeven met de microscoop vereist.

Werkwijze:

- breng op een objectglas een druppel kiemporenreagens aan
- met een prepareernaalden wordt stuifmeel uit een juist geopende helmknop aangebracht op het reagens en verspreid
- wacht 1 minuut
- breng een dekglas op
- verwijder eventueel overtollig reagens
- scoor van 100 pollenkorrels het aantal kiemporen

7.5 Waarnemingen blad

Aantal plastiden in beide sluitcellen van 10 huidmondjes van diploïde en van tetraploïde planten van leeuwenbek.

Huidmondje	Diploïde leeuwenbek	Tetraploïde leeuwenbek
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
Gemiddeld		

Plastidenfrequentie van beide huidmondjes van diploïde en van tetraploïde leeuwenbek (verzamelde resultaten van alle studenten).

Aantal plastiden	Diploïde leeuwenbek	Tetraploïde leeuwenbek
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		

Kruisingsbarrières

Kiemporenfrequentie aan de hand van 100 pollenkorrels van een diploïde en tetraploïde leeuwenbek.

Aantal kiemporen	Diploïde leeuwenbek	Tetraploïde leeuwenbek
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

Voer de gegevens in in Excel en maak er frequentieverdelingen van (grafiek). Ga na of het mogelijk is uit te rekenen of er significante verschillen zijn tussen het aantal plastiden en tussen het aantal kiemporen bij de diploïde en tetraploïde leeuwenbek.

8. Practicum *Exacum affine*

8.1 Inleiding

Exacum affine (aardappelplantje) is een potplant waarvan de bloei in de periode april tot november valt. Er is een onderscheid te maken tussen normale, dubbele en mini-typen. De normale typen worden vermeerderd door zaad en de rassen zijn zeer uniform. De dubbele typen en mini's worden vegetatief vermeerderd.

Een veredelingsbedrijf heeft besloten om te kijken naar de haalbaarheid van door zaad vermeerderde mini-typen.

Door middel van deze case study krijgt de student de kans om praktische veredelingsproblemen te herkennen, te zoeken naar oplossingen en de beste oplossing aan te bevelen.

8.2 Materiaal

Er zijn drie typen *Exacum* aanwezig:

1. Het normale type
2. Het mini-type

Verder kan van alle in het practicumlokaal aanwezige materialen gebruik worden gemaakt.

8.3 Uitvoering

Elke student maakt een lijstje met aandachtspunten voor de veredeling. Voordat de punten worden uitgewerkt, wordt het lijstje met de aandachtspunten besproken met de docent. Zonodig wordt het bijgesteld of aangevuld. Wanneer de lijst is goedgekeurd, start de student met het afwerken van de zaken waarvoor practicum benodigdheden noodzakelijk zijn. Daarna worden de overige zaken afgewerkt met behulp van boeken, dictaten en andere bronnen. Uiteindelijk wordt in een paar bladzijden weergegeven wat de feitelijke veredelingsproblemen zijn, wat daar voor mogelijke oplossingen zijn en wat in dit geval de beste oplossing is.

Checklist voor de docent bij de case study *Exacum*.

Onderstaande punten dienen op het lijstje van de student te staan:

Bloem: bestuderen van de bloem en uitwerken in bloemformule en bloemdiagram

Bestuderen van mannelijk en vrouwelijke geslachtsorganen (zijn die er, is er stuifmeel, Hoe ziet het stuifmeel er uit (meestal is het steriel, maar kun je enkele normale ongere-
duceerde) pollenkorrels vinden)?

Kruising: emasculeren, verzamelen van stuifmeel, tijdstip van bestuiven, wijze van isolatie.

Habitus: verschillen en verklaringen ervoor

Zaadvermeerdering: zijn er op basis van de hierboven bestudeerde punten mogelijkheden voor
zaadproductie op de mini-typen?

Zaadkwaliteit: bij het normale type is er een aanzienlijk verschil in kiemkracht tussen de
donkerbloemige rassen en de witbloeiende rassen. Op welke manieren zou je hier in
verbetering kunnen brengen?

Hybriden: de huidige zaadvaste rassen zijn al zeer uniform, denk je dat hybriden toch nog een
verbetering kunnen zijn?

Mini: de huidige mini's zijn spontaan ontstaan uit zaad dat geoogst is op de normale typen.
Kun je daarvoor een verklaring geven?