



**Genetwister
Technologies**

MERKERS VOOR ROOITIJDS TIP IN TULP

Productschap  **Tuinbouw**

PRODUCTSCHAP TUINBOUW
Project PT10316

Gegevens:

Financier: Productschap Tuinbouw

PT projectnummer: 10316

Projectleider: Simon Langeveld (GT)

Onderzoeksperiode: 2001-2006

Begeleidingscommissie:

Peter Raven (LTO Groeiservice)

Joh Schouw (Luce)l

Willy Schutte (bedrijfsleven)

Carine Anker (PT, Voorzitter)

Projectmedewerkers:

GeertJan Naus

Simon Langeveld

Douwe de Boer

INHOUDSOPGAVE

Inhoudsopgave.....	3
Samenvatting.....	4
Inleiding.....	4
Methodiek.....	4
Resultaten.....	5
Conclusie.....	7

Samenvatting

Bij tulpen is het rooimoment van belang voor de kwaliteit en opbrengst van dit bolgewas. Indien te vroeg wordt gerooid is de opbrengst lager en vindt er ook in de broei uitval plaats ten gevolge van ziektes en slechte beworteling. Indien te laat wordt gerooid is de opbrengst weliswaar goed maar kan bij ongunstige weersomstandigheden veel uitval optreden door ziektes. Het is dus van belang om op het optimale tijdstip te rooien. In dit project is door Genetwister Technologies BV in samenwerking met PPO te Lisse onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van een toets gebaseerd op bio-merkers om dit tijdstip te kunnen bepalen. De resultaten uit een set van referentie-cultivars die over vele seizoenen verzameld werden, bevestigden de betrouwbaarheid van de bio-merkers. Uitvoerbaarheid en reproduceerbaarheid van de ontwikkelde toets zijn in een applicatielaboratorium aangetoond. De toets gebaseerd op deze bio-merkers blijkt voor een uitgebreide selectie van tulpencultivars geschikt.

Inleiding

Bij tulpen is het rooimoment van belang voor de kwaliteit en opbrengst van dit bolgewas. Indien te vroeg wordt gerooid is de opbrengst lager en vindt er ook in de broei uitval plaats ten gevolge van ziektes en slechte beworteling. Indien te laat wordt gerooid is de opbrengst weliswaar goed maar kan bij ongunstige weersomstandigheden veel uitval optreden door ziektes. Het is dus van belang om op het optimale tijdstip te rooien. In dit project is door Genetwister Technologies BV in samenwerking met PPO te Lisse onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van een toets om dit tijdstip te kunnen bepalen.

Door Genetwister Technologies BV (GT) zijn biomerkers ontwikkeld waarmee het rooitijdstip van tulpenbollen bepaald kan worden dat tot optimale resultaten in de broeierij leidt. Het biomarker onderzoek is uitgevoerd aan drie economisch belangrijke tulpencultivars. De biomerkertoets is voor applicatielaboratoria geschikt gemaakt en de algemene bruikbaarheid in een breder assortiment van tulpencultivars is onderzocht. In dit onderzoek heeft PPO-Lisse onder auspiciën van GT als applicatielaboratorium voor de toets gefungeerd. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de biomerkers op een enkele uitzondering na, op een brede selectie van cultivars toepasbaar zijn.

Methodiek

Algemeen

GT is gespecialiseerd in de ontwikkeling van toetsen op basis van bio-merkers die een relatie hebben met de kwaliteit van land- en tuinbouwproducten. De door GT toegepaste technologie is gebaseerd op de relatie die bestaat tussen het gedrag van de genen en de gemeten kwaliteit van het product. In bollen die op verschillende momenten en op verschillende plaatsen en grondsoorten gerooid werden, is op grond van genexpressieanalyse studies een collectie merkers geselecteerd die een relatie hebben met de rijpheid van de bol. Voor de objectieve beoordeling van de rijpheid werden door het PPO-Lisse bloeioproeven uitgevoerd met de veldmonsters die ook in de genexpressie-analyses gebruikt werden. De beoordeling van de uitbloei kwaliteit werd bepaald aan de hand van een getal dat berekend werd uit de lengte en het gewicht van de bloem op een gedefinieerd moment van de uitbloei. Dit getal, dat vooral een maat is voor de stevigheid van de bloem, werd als parameter voor de broeikwaliteit gehanteerd.

Gebruikte cultivars, locaties en rooiseizoenen

In het onderzoek is gebruik gemaakt van een set referentie-cultivars, te weten cvs 'Apeldoorn', 'Prominence' en 'Leen vd Mark'. Deze cultivars vertegenwoordigen tezamen in volume een belangrijk deel van het tulpenassortiment. Deze cultivars zijn in elk seizoen van het merkeronderzoek meegenomen. Het bolmateriaal is aangeleverd door PPO-Lisse. De cultivars 'Apeldoorn' en 'Prominence' werden geteeld op percelen in eigendom van PPO-Lisse en de cultivar 'Leen vd Mark' werd geteeld op een bedrijf in Nieuw Vennep (gem. Haarlemmermeer). Het gebruikte bolmateriaal voor het onderzoek is afkomstig uit de teelt gedurende de seizoenen 2001, 2003 en 2004. In 2005 is de toets geschikt gemaakt voor toepassing in een applicatielaboratorium. Voor deze uitontwikkelingsfase van de rooirijpheidstoets werd in overleg met vertegenwoordigers uit de bloembollenteelt een lijst opgeteld van genetisch sterk uiteenlopende cultivars die een goede afspiegeling vormen van het commerciële broeierij assortiment (zie tabel I).

Sampling

De monsternamen van de bollen voor de ontwikkeling van de toets is uitgevoerd in samenwerking met PPO-Lisse. In de ontwikkelfase van de toets zijn de monsters telkens op drie posities binnen een bed genomen. De omvang van de monsters bedroeg telkens minimaal 25 en maximaal 50 bollen voor toetsontwikkeling en eenzelfde hoeveelheid voor uitbroei per positie in het bed op verschillende tijdstippen voor, tijdens en na het door de teler gekozen rooimoment. Voor elke cultivar en bemonsteringstijdstip is de toestand van het gewas op foto vastgelegd.

Tabel 1.

cultivar	lokatie
Viking	Zeeland
Kees Nelis	Zeewolde
Oranje Monarch	Zeewolde
Rococo	Nagele
Brilliant Star	Zwaagdijk
World's Favorite	Hillegom
Leen vd Mark	Nagele
Prominence	Lisse
Apeldoorn	Zeeland
Elegant Lady	St Maarten
Silver Dollar	Almere

Bedrijven die in de uitontwikkelingsfase voor toelevering van betreffende bollen werden geselecteerd, lagen verspreid over verschillende teeltgebieden in Nederland. Dit om het eventuele effect van klimaat en bodemgesteldheid te kunnen meten. Voor de bepaling van het verloop van de bolrijping zijn deze cultivars gedurende een periode van 3 weken rond het verwachte rooitijdstip vier maal bemonsterd. De bollen zijn na bemonstering op het veld, daags daarop in het lab van PPO-Lisse verwerkt en verdeeld in een monster voor merkeranalyse en een voor de bepaling van de broeikwaliteit. Voor de merkeranalyse zijn bollen van ongeveer gelijke grootte geselecteerd en werden uit de buitenste bolrok ponsjes genomen. De apparatuur die nodig is voor de uitvoering van de merkeranalyse is door het PPO aangeschaft en de toets werd uitgevoerd volgens het protocol dat door GT werd opgesteld. De toets is in '96-wells' format uitgevoerd. Platen met merkerspecifieke componenten zijn door Genetwister samengesteld en aan PPO-Lisse geleverd voor uitvoering van de toetsen. De ruwe data afkomstig uit de toetsen zijn door PPO-Lisse opgestuurd naar Genetwister die de dataverwerking en analyses heeft uitgevoerd.

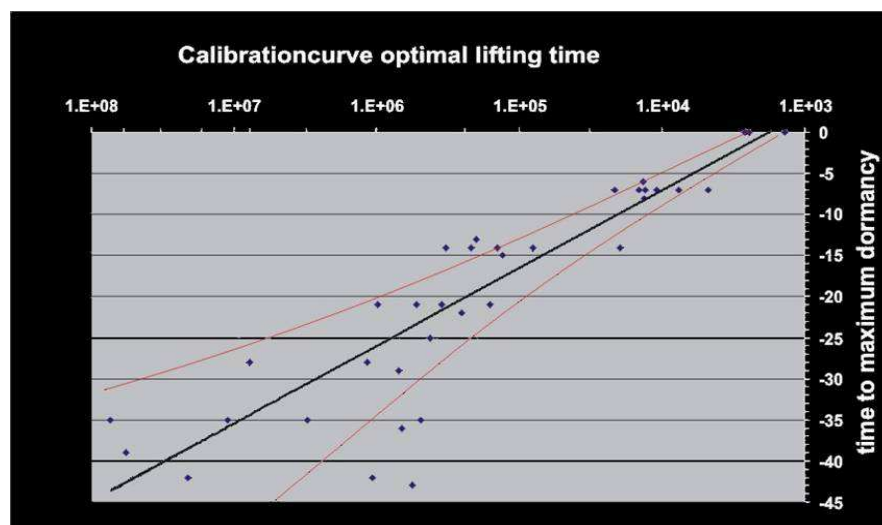
Broeiproeven

De uitbloeioproeven zijn uitgevoerd door het PPO-Lisse volgens het daar geldende protocol. De uitbloeioproeven zijn uitgevoerd met bollen uit de monsters die in de merkeranalyses gebruikt werden. De opplant van de bollen is per maat uitgevoerd.

Resultaten

Ontwikkeling van de merkers

In 2001 en 2002 werd een omvangrijke collectie merkers geïdentificeerd die als basis fungeerde voor de ontwikkeling van de rooijsheidstoets. Het gedrag van de merkers tijdens de afrijping van de bollen in het veld en de kwaliteit na uitbloeien werden gedurende deze jaren met de drie referentiecultivars 'Apeldoorn', 'Prominence' en 'Leen vd Mark' gemeten. Op basis van deze resultaten werd in 2003 de definitieve validatie van een geselecteerde set merkers uitgevoerd en werden vijf merkers geselecteerd voor uitontwikkeling van de toets. Met deze merkers bleek het verloop van de rijping vanaf 1 à 2 weken voor het optimale rooitijdstip voor de broei te voorspellen. Naarmate dit tijdstip nadert blijkt het rooitijdstip op grond van de merkers nauwkeuriger te bepalen (Zie figuur 1).



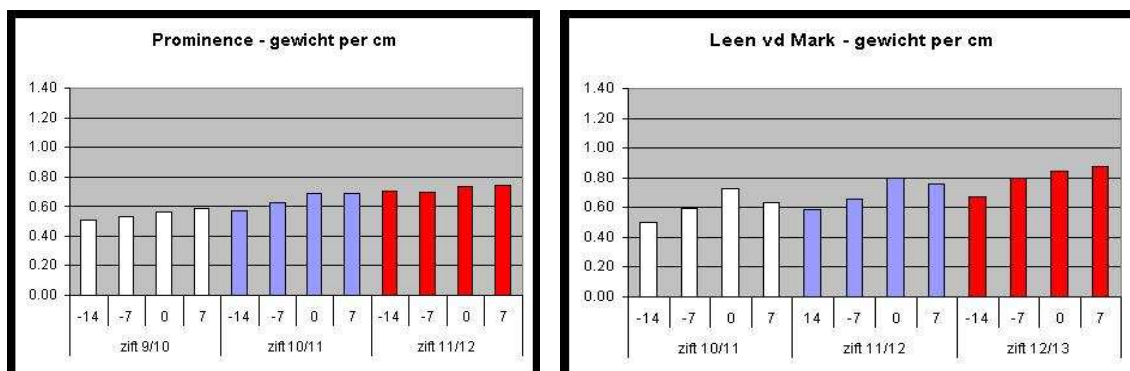
Figuur 1. De merker waarden (horizontale as) uitgezette in de tijd (verticale as). Naarmate het optimale rooi moment (waarde D op verticale as) nadert, neemt de spreiding in de merkerwaarden af (rode lijnen).

Nadat bij de referentie-cultivars in de jaren 2001-2004 werd bepaald hoe het rijpingsproces van de bol met een set van samengestelde merkers in kaart kon worden gebracht, is onderzocht hoe breed deze merkers toepasbaar zijn op het gehele assortiment.

Ontwikkeling van de toets

Om het gedrag van de merkers in relatie tot het rijpingsproces en de broeikwaliteit in kaart te brengen werden op vier tijdstippen rond het oogstmoment metingen uitgevoerd. De teler schatte het optimale rooimoment en vervolgens werd 1 en 2 weken voor dit moment, op dit moment zelf en een week daarna bemonsterd. De referentie-cultivars werden ter controle meegenomen. Twee van deze cultivars, cvs 'Apeldoorn' en 'Prominence' werden op drie verschillende locaties binnen een teeltperceel bemonsterd.

De merkertoets is uitgevoerd met een samengestelde set merkers en uiteenlopende controles. Bij GT werden de aan het PPO-Lisse uitgeleverde platen vooraf gecontroleerd op kwaliteit. De toetsresultaten van de referentie-cultivars zijn eerst bepaald. Hieruit bleek dat deze volledig overeenkwamen met die in voorafgaande jaren, de intensiteit en het verloop van de waarden (ijklijn) waren volledig vergelijkbaar. De resultaten van cv 'Leen van de Mark' lieten wel een grotere variatie zien dan in voorafgaande jaren en ten opzichte van de waarden gemeten bij de twee andere cultivars ook een grotere variatie. De resultaten van de nieuwe cultivars bleken op twee uitzonderingen na van zeer goede kwaliteit. In een geval was het geschatte rooimoment niet juist, dit heeft tot gevolg dat voor cv 'Viking' een te beperkt aantal meetpunten in de merkeranalyse beschikbaar is voor een nauwkeurige voorspelling van het juiste rooimoment. Echter op grond van de meetwaarde die overeenkomt met het optimale rooimoment kon ook voor deze cultivar een voorspelling gedaan worden mbt het rooimoment in relatie tot broeikwaliteit. Het criterium dat voor de bepaling van de broeikwaliteit gehanteerd werd, is het gewicht/cm, aangeduid met stevigheid. Uit de broeieresultaten blijkt dat volgens dit criterium het optimum bij de referentie cultivars cvs 'Prominence' en 'Leen vd Mark' varieert met de bolmaat zie figuur 2.



Figuur 2. Weergave van de broeikwaliteit per ziftmaat op verschillende tijdstippen rond het door de teler geschatte rooimoment (waarde 0 op horizontale as) bij de cultivars Prominence (links) en Leen vd Mark (rechts). (Resultaten PPO-Lisse)

Ook bij een meerderheid van de nieuwe cultivars blijkt dit het geval. Op grond van de merkeranalyse is een voorspelling van het optimale rooitijdstip gedaan nog voordat de resultaten van de broeierij bekend waren. Tenslotte zijn de voorspellingen gebaseerd op de merkeranalyse vergeleken met de optimale rooitijdstippen op grond van de broeieresultaten. Deze vergelijking is weergegeven in tabel 2.

Uit tabel 2 blijkt dat de voorspellende waarden van de merkeranalyse overeenstemmen met de optima uit de broeieresultaten op twee uitzonderingen na, cv 'Rococo' en cv 'Elegant Lady'. De meetwaarden uit de merkeranalyse van cv 'Rococo' laten een afwijkend verloop zien tov andere cultivars. Daarom kon bij deze cultivar geen goede voorspelling gedaan worden. Bij cv 'Elegant Lady' is een hoge achtergrond in de merkerbepaling gemeten. Dit maakt de voorspelling onbetrouwbaar. De broeieresultaten bij deze cultivar konden niet goed worden bepaald omdat bij geen enkele bolmaat bloei optrad. Het verloop van de meetwaarden in de merkeranalyse levert voor elke cultivar een ijklijn op. Tot nu toe is gebleken dat de helling van de ijklijn per cultivar over de jaren heen en op verschillende locaties niet varieert. Bovendien blijkt de waarde die gecorreleerd is aan het optimale rooitijdstip bij alle cultivars consistent te zijn. Op grond van de ijklijnen en deze waarde blijkt een voorspelling van het optimale oogstmoment een à twee weken van te voren mogelijk. De invloed van de klimaatomstandigheden is met de huidige variatie in de meetwaarden niet nauwkeurig te bepalen.

			-14	-7	0	7
Viking	Zeeland	PPO		X		
		GT	X	X		
Kees Nelis	Zeewolde	PPO			X	X
		GT		X	X	
Or. Monarc	Zeewolde	PPO		X		
		GT		X		
Rococo	Nagele	PPO			X	
		GT				X
Br. Star	Zwaagdijk	PPO			X	X
		GT			X	
Worlds Favourite		PPO			X	X
	Hillegom	GT		X	X	
Leen vd Mark		PPO			X	
	Nagele	GT			X	
Prominen	Lisse	PPO			X	X
		GT			X 14	X 11,13
Golden Apeldoorn		PPO			X	
	Zeeland	GT			X	
Elegant Lady		PPO	niet gebloeid			
	St Maarter	GT		X		
Silver Doll	Almere	PPO			X	
zeer lichte kwaliteit		GT			X	

Tabel 2. Het optimale rooitijdstip per cultivar en lokatie is bepaald aan de hand van broeiresultaten uitgevoerd door PPO-Lisse (PPO) en met merkeranalyse (GT). Bij sommige cultivars (bijv. cvs 'Kees Nelis' en 'Brillant Star') zijn twee optimale rooimomenten aangeduid op basis van broeiresultaten (PPO). In rood zijn de afwijkende resultaten weergegeven van de merkeranalyse (GT). Bij cv 'Prominence' zijn de drie lokaties (11,13 en 14) aangegeven.

Conclusie

De merkerbepalingen uitgevoerd in een applicatielaboratorium tonen aan dat de rooijsheidstoets betrouwbaar kan worden uitgevoerd. De resultaten met de referentie-cultivars verkregen over vele jaren hebben bovendien de betrouwbaarheid van de merkerset bevestigd. De toets blijkt voor een uitgebreide selectie van tulpencultivars geschikt. Uitzondering hierop is cv 'Rococo'. Het is mogelijk dat deze cultivar genetisch verschilt van de andere cultivars. Opmerkelijk is dat het tijdstip van het optimum in de broeikwaliteit afhankelijk blijkt van de bolmaat. Mogelijk kan daarom de variatie in de meetwaarden van de merkeranalyse verklaard worden uit het feit dat bij de selectie van de bollen voor de merkeranalyse geen nauwkeurige zift-maat sortering is uitgevoerd. De variatie veroorzaakt door de bolmaat heeft tot gevolg dat in een praktijkprotocol voor bemonstering rekening gehouden moet worden met het verschil in bolmaten. Bij de uitontwikkeling van de toets die nu van start is gegaan, wordt hiermee rekening mee gehouden.