

Eindverslag project 11903: Merkers voor detectie van afwijkingen
in planten uit weefselkweek.

Opstellers: Rolf Mank, Keygene NV
Simon Langeveld, Genetwister Technologies BV
Piet van der Linde, SBW International BV

Deelnemende instellingen:

Anthura BV
Florist de Kwakel BV
Geerlings & Zonen BV
Genetwister Technologies BV
Keygene NV
Praktijkonderzoek Plant en Omgeving – Bloembollen
Productschap Tuinbouw
SBW International BV

Projectperiode: 1 juli 2004 – 31 december 2005

31 mei 2006

Inhoudsopgave

1. Probleemstelling	3
2. Doelstelling	3
3. Te verwachten resultaten	4
4. Voorgestelde plan van aanpak	4
5. Resultaten	5
a. Bepaling van variatie	5
b. Verschillen in genexpressie	6
c. Verschillen in DNA-methylatiepatronen	9
6. Conclusies	16
7. Aanbevelingen	16

1. Probleemstelling

Weefselkweek wordt in toenemende mate gebruikt voor het vermeerderen van uitgangsmateriaal in de land- en tuinbouw wereldwijd. De weefselkweektechnologie heeft zich de afgelopen decennia zeer sterk ontwikkeld, waardoor steeds meer gewassen door middel van weefselkweek worden geproduceerd. De toepassing van de techniek wordt soms gehinderd door het optreden van afwijkingen in het geproduceerde materiaal. Dit wordt over het algemeen somaclonale variatie genoemd. In Gerbera en Zantedeschia heeft dit in het begin van deze eeuw tot aanzienlijke schade geleid, waardoor het vertrouwen in weefselkweek als productietechniek voor uitgangsmateriaal voor de teelt is geschaad.

De totale omvang van de schade door afwijkingen in materiaal uit weefselkweek moeilijk te bepalen. Bij Gerbera's is al honderduizenden euro's door de kwekersrechthouders aan schadeloosstellingen betaald aan telers, die geconfronteerd werden met afwijkend bloeiende planten. Bij Zantedeschia's zijn volledige partijen van vele honderduizenden planten voor de boementeel onbruikbaar geworden. Bij Anthurium gaat het veelal om lijnselectie van cultivars die nog geïntroduceerd moeten worden. De kosten die hiermee gepaard gaan zijn enorm. Van alle lijnen van een cultivar moeten planten in de kas worden geteeld voor minimaal 1,5 jaar, voordat duidelijk is welke lijnen goed zijn. De commerciële introductie kan derhalve niet eerder plaats vinden. Ook bij andere gewassen spelen afwijkende planten in door weefselkweek geproduceerd materiaal een rol. Denk hierbij aan de miljoenschade die is ontstaan door het "mantled phenotype" bij oliepalmen, de dwergplanten bij banaan, de te kleine vruchten bij aardbei, het vegetatief blijven van fruitbomen, etc. Daarnaast zijn uit ervaring beperkingen gesteld aan de aantallen planten, die betrouwbaar geproduceerd kunnen worden door weefselkweek in bijvoorbeeld Cymbidium en Limonium. Om geen problemen met afwijkingen te krijgen wordt de duur van de vermeerdering in weefselkweek sterk besperkt. Bij Delphinium wordt dit ook gedaan vanwege het teruglopen van de bewortelbaarheid. Door deze oorzaken worden voor diverse gewassen veel extra kosten gemaakt voor het regelmatig opstarten van nieuwe cultures in weefselkweek. De totale economische schade door deze problemen loopt dus in de miljoenen euro's.

Het moment dat de variatie geconstateerd kan worden is pas nadat het geproduceerde materiaal is uitgeplant, uitgegroeid of zelfs pas op het moment van bloei (en soms zelfs geen bloei), dat voor sommige gewassen pas enkele jaren na uitplanten plaatsvindt. Hierdoor vindt de definitieve selectie plaats bij de afnemer van het weefselkweekbedrijf. Vanuit het beheersen van de kwaliteit van het weefselkweekplantje is dit uiteraard niet aanvaardbaar, doch op dit moment wel onontkoombaar, daar tijdens het weefselkweekproces zelf niet op dit type variatie te selecteren is. Tot nu toe ontbraken de technieken om tijdens het weefselkweekproces op niet zichtbare variatie te selecteren. Met dit project is onderzocht in hoeverre met moderne merkertechnieken een selectie op ontstane en niet zichtbare variatie tijdens het weefselkweekproces wel uitvoerbaar is.

2. Doelstelling

Het doel van dit project was het onderzoeken of de ontwikkeling van een betaalbare, betrouwbare en voor massatoetsing geschikte toets op niet-zichtbare variatie in weefselkweekplanten van 3 gewassen (Anthurium, Gerbera en Zantedeschia) mogelijk is. Hiervoor werden 2 benaderingen gebruikt:

- 1^e Het isoleren van een set van moleculaire merkers uit weefselkweekplantjes op basis van kwantitatieve analyse van genexpressie en
- 2^e Het analyseren van kwantitatieve veranderingen in DNA-methylatie in weefselkweekplanten.

Het project moest gezien worden als een haalbaarheidsstudie van 3 jaar door een beperkte bedrijvencombinatie van 2 technologie-ontwikkelaars, 1 weefselkweekproducent, 1 onderzoekinstelling en 3 grote afnemers van weefselkweek. Het was uitdrukkelijk de bedoeling, dat bij gebleken haalbaarheid het project een vervolg krijgt met sectorbrede deelname van weefselkweekbedrijven en afnemers van weefselkweek.

3. Te verwachten resultaten

De uitvoerders streefden ernaar om aan het einde van de projectperiode de volgende vragen beantwoord te hebben.

- a. Kunnen er uit een modelgewas biomerkers geïsoleerd worden uit dan wel DNA-methylatieveranderingen vastgesteld worden in planten in weefselkweek, die een relatie vertonen met de waargenomen variatie in de zelfde planten na uitgroeien in de kas ? Zo ja;
- b. Zijn deze biomerkers dan wel veranderingen in DNA-methylatiepatronen bruikbaar voor het opsporen van niet-zichtbare afwijkingen in weefselkweekplanten van het modelgewas ? Zo ja;
- c. Kunnen deze merkers dan wel veranderingen in DNA-methylatiepatronen gebruikt worden voor het opsporen van soortgelijke biomerkers dan wel DNA-methylatiepatronen in andere gewassen dan het modelgewas en zijn deze dan ook bruikbaar voor het opsporen van niet-zichtbare afwijkingen in deze gewassen ?

4. Voorgestelde plan van aanpak

Fase 1: In eerste instantie wordt het gewas Anthurium worden gebruikt als modelgewas. Dit gewas wordt in weefselkweek gebracht via regeneratie van scheuten uit bladstukjes. De lijnen die hieruit voortkomen worden op kwantitatieve veranderingen in bladvorm geanalyseerd. Omdat het maken van lijnen voor het betrokken weefselkweekbedrijf een continu proces is, staan zeer veel bruikbare lijnen en oorspronkelijke moederplanten al in de kas en in weefselkweek, zodat het project direct van start kan gaan. De corresponderende planten in weefselkweek zullen worden gebruikt om de gevonden bladvormveranderingen in de kas te relateren aan veranderingen in genexpressiepatronen (Genetwister) en DNA-methylatiepatronen (Keygene). Uit deze analyse zal een set merkers en/of methylatieveranderingen vastgesteld moeten worden, die informatief is voor de gevonden bladvormveranderingen. Tevens zal vastgesteld moeten worden in hoeverre deze bruikbaar is voor het diagnostiseren van bladvormveranderingen in andere lijnen van Anthurium.

Fase 2: Wanneer fase 1 met goed resultaat is afgesloten kan begonnen worden met vinden van soortgelijke veranderingen in genexpressiepatronen en/of DNA-methylatieveranderingen in 2 andere gewassen met afwijkingen na weefselkweek: Zantedeschia en Gerbera. Voor Zantedeschia wordt gebruik gemaakt van het lopende onderzoek naar het ontstaan van afwijkingen in weefselkweek onder leiding van Han Bouman en Paul van Leeuwen. Hierbij worden dit jaar planten op diverse manieren in weefselkweek vermeerderd en daarna uitgeplant, waarna de mate van variatie in het geproduceerde materiaal wordt vastgesteld. Voor Gerbera zullen ook de bestaande lijnen en moederplanten in weefselkweek en in de kas worden gebruikt voor het uitvoeren van het onderzoek.

Fase 3: Voor alle gewassen zullen de gevonden verschillen in genexpressiepatronen en/of DNA-methylatiepatronen getoetst worden op hun voorspellende waarde voor het vinden van bladvormveranderingen in onbekende lijnen of plantpopulaties in weefselkweek van de betrokken gewassen. Deze validatiestap is essentieel voor het bepalen van de waarde van de

gevonden verschillen voor het opzetten van een toets op praktijkschaal. Voor Anthurium zal deze stap al in jaar 2 kunnen plaatsvinden. Voor de beide andere gewassen in jaar 3.

5. Resultaten

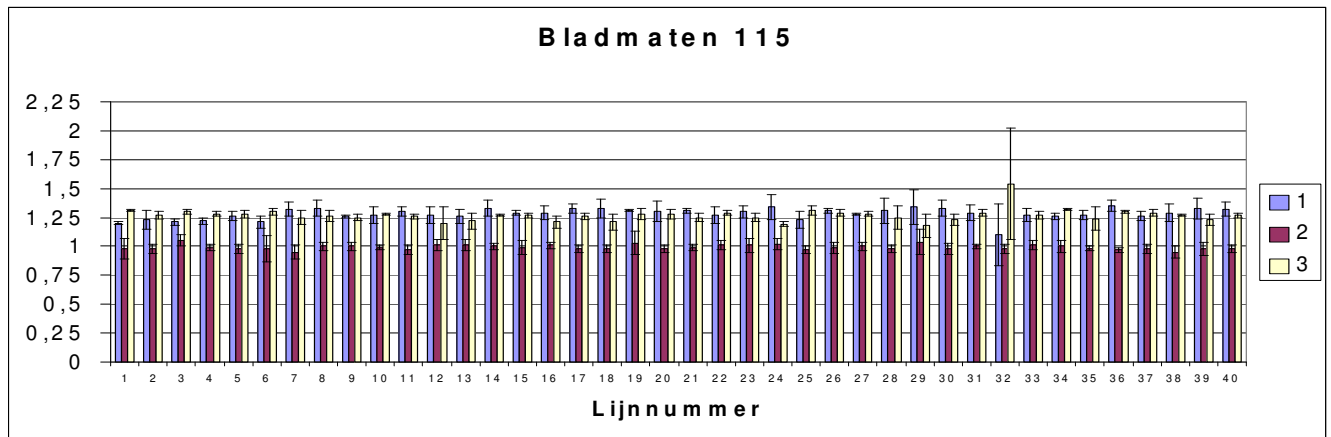
5a. Bepaling van de variatie

Voor het vaststellen van variatie in planten in de kas voortkomend uit weefselkweek werd gekozen voor analyse van de bladvorm. Allereerst werd gekeken of rassen van een gewas op bladvorm onderscheiden konden worden. Als bladvorm werd gebruikt de verhouding tussen de lengte en breedte van het blad (langwerpigheid), de mate van hartvormigheid (bij Anthurium en Zantedeschia), de symmetrie van het blad en de plaats ten opzichte van de top waar het blad zijn grootste breedte bereikt (bij Gerbera). Met deze parameters en hun variatiecoëfficiënt konden rassen van deze gewassen onderscheiden worden.

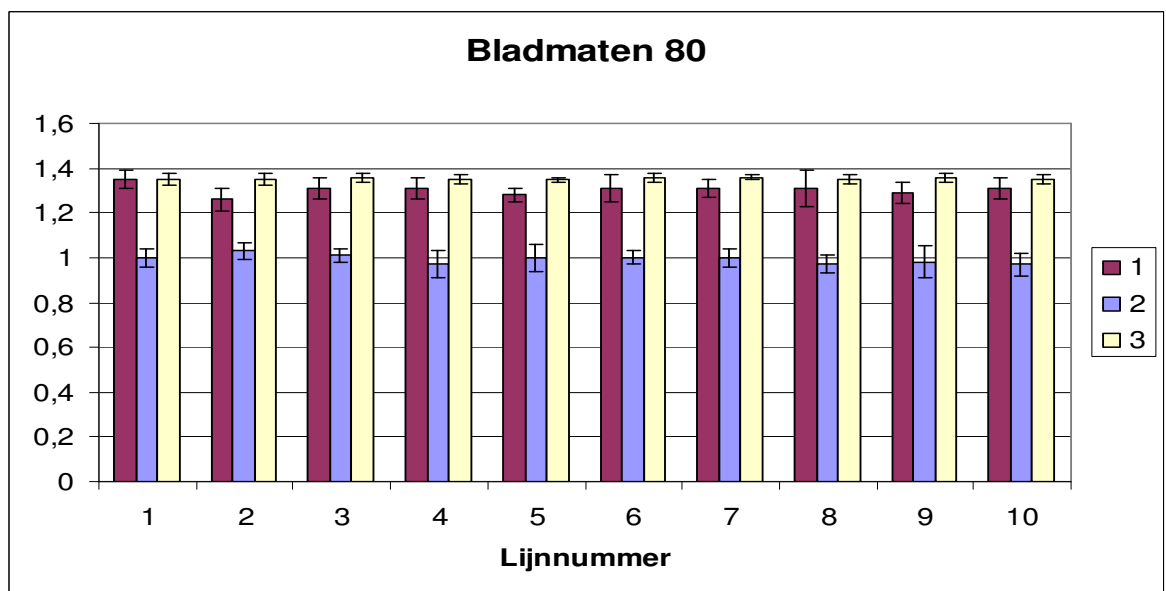
Vervolgens werd gekeken of met deze set aan parameters binnen een ras goede van afwijkende planten gescheiden konden worden. Voor de 3 onderzochte rassen (2 Zantedeschia en 1 Gerbera) bleek dit het geval. Daarnaast werd aangetoond, dat de variatiecoëfficiënt in bladvormen bij Anthurium groter is voor een ras dat te maken heeft met veel afwijkende planten uit weefselkweek. Een in weefselkweek stabiel ras vertoonde een veel kleinere variatiecoëfficiënt. Bij Zantedeschia was de variatiecoëfficiënt hoger naarmate de planten in weefselkweek op een extreme cytokinineconcentratie hadden gestaan.

Vervolgens werden van 4 rassen van Anthurium met verschillen in gevoeligheid voor weefselkweekvermeerdering wat betreft het voorkomen van afwijkende planten 10 lijnen in de kas geanalyseerd op bladvorm. Tevens werd door de veredelaar aangegeven, welke lijnen soortrecht waren en welke afwijkend. Statistische analyse van de bladvormen van deze lijnen toonde slechts geringe verschillen in bladvorm tussen de lijnen van een ras. De uitersten tussen de lijnen van 2 rassen werden gebruikt voor het opsporen van biomerkers. Hiervan werd in-vitro plantmateriaal bemonsterd voor analyse. Later bleek dat de genoemde lijnen geen echte lijnen waren, maar groepen van 4 lijnen. Tevens bleek bij AFLP-analyse, dat de lijnen genetisch gezien niet homogeen waren. Derhalve werd naar ander uitgangsmateriaal gezocht.

Van 2 nieuwe Anthuriumrassen werden echte lijnen in de kas op bladvorm geanalyseerd. Het ene ras (80, stabiel) vertoonde nooit afwijkende planten uit weefselkweek en het andere ras was zeer variabel uit weefselkweek (115, labiel). Van het stabiele ras werden 10 lijnen geanalyseerd en van het labiele ras 40. Van elke lijn werden 10 planten opgemeten. In het stabiele ras konden nauwelijks significante verschillen tussen de bladvormen van de lijnen worden aangetoond. Alleen in de mate van langwerpigheid konden de 10 lijnen in 2 homogeniteitsgroepen worden verdeeld. Duidelijk significante verschillen werden wel gevonden tussen bladvormen van lijnen van de labiele cultivar, zowel voor de mate van langwerpigheid als voor hartvormigheid. Op basis van hartvormigheid konden 10 homogeniteitsgroepen worden onderscheiden. Hierbij bleek er tevens een omgekeerde relatie te bestaan tussen de mate van hartvormigheid van het blad en de kans op het voorkomen van afwijkende lijnen binnen deze groepen, zoals deze door de veredelaar werden beoordeeld. Besloten werd van dit plantmateriaal het corresponderende in vitro materiaal te bemonsteren en te gebruiken voor het opsporen van merkers.



Figuur 1: Bladvorm in 40 lijnen van een labiele cultivar (115) van Anthurium: 1 = langwerpigheid (breedte/lengthe), 2 = symmetrie (breedte links/breedte rechts) en 3 = hartvormigheid (lengthe top – slippunt/lengthe bladschijf langs nerf).

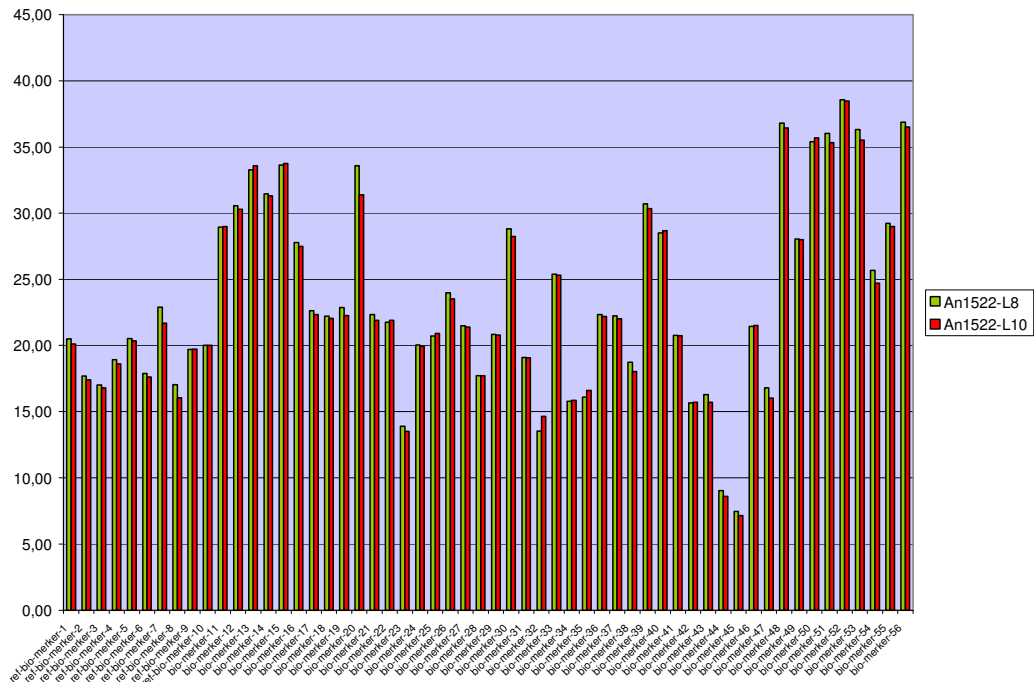


Figuur 2: Bladvorm in 10 lijnen van een stabiele cultivar (80) van Anthurium: 1 = langwerpigheid (breedte/lengthe), 2 = symmetrie (breedte links/breedte rechts) en 3 = hartvormigheid (lengthe top – slippunt/lengthe bladschijf langs nerf).

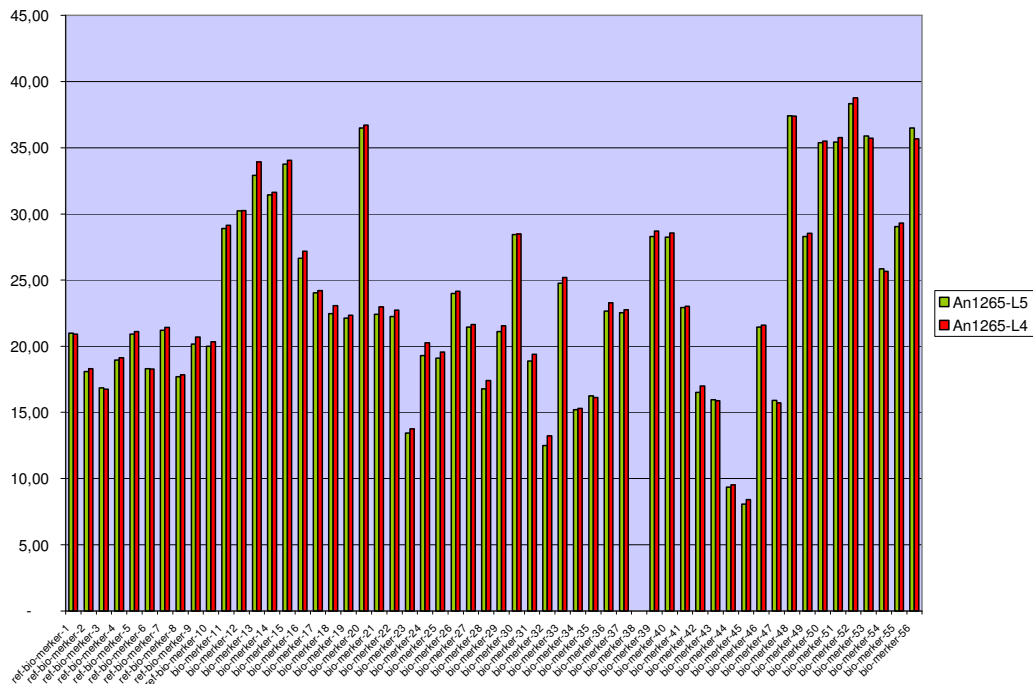
5b. Verschillen in genexpressie

Van de verschillende Anthurium cultivars is een gencollectie gemaakt voor identificatie van biomerkers. Deze is later met zuivere weefselkweeklijnen nog verder uitgebreid. De totale gencollectie die voor de identificatie van biomerkers in Anthurium werd gebruikt is afkomstig uit drie verschillende cultivars van Anthurium en omvat ruim 4000 genen. Uit deze collectie zijn ruim 70 potentiële biomerken na informatica-analyse naar voren gekomen. Van deze merkers is het expressieniveau gekwantificeerd in normale en afwijkende planten afkomstig van verschillende Anthurium cultivars en lijnen. De resultaten van de analyses zijn per cultivar weergegeven in de figuren 3-5. Bij een verschil van tenminste 2 eenheden is er

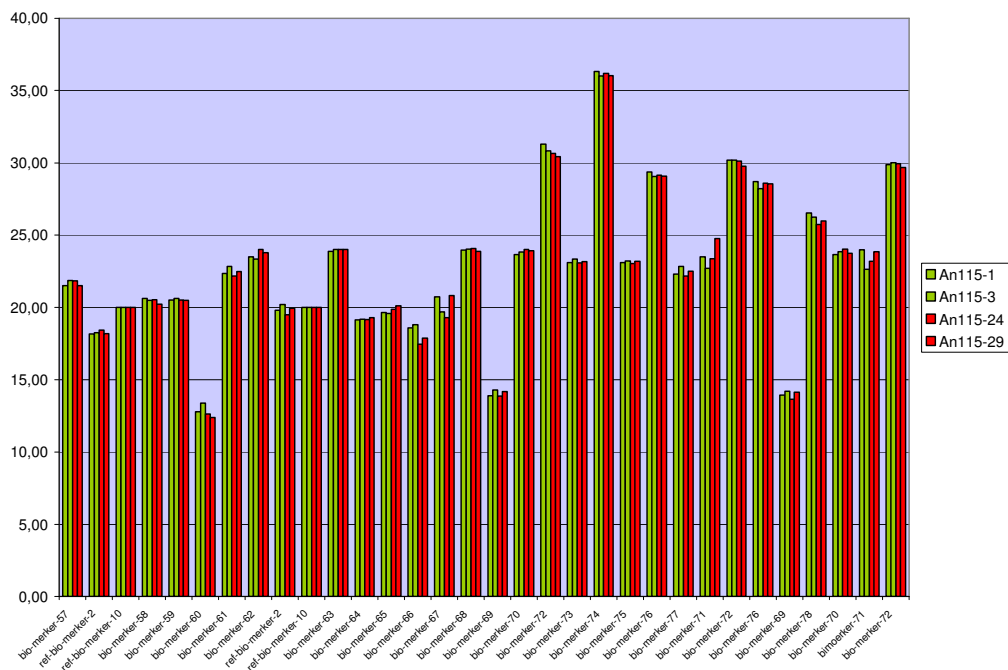
sprake van een significant verschil. Uit de analyses blijkt dat er geen significante verschillen gevonden worden tussen normale en afwijkende lijnen. Alle biomerkers gedragen zich identiek in zowel normale als afwijkende lijnen van verschillende cultivars. Onder de biomerkers die uit de collectie naar voren kwamen bevinden zich verschillende merkers die op grond van overeenkomst met genen uit modelorganismen waaronder Arabidopsis betrokken zijn bij de bepaling van de bladvorm.



Figuur 3. Analyse van 56 bio-merkers afkomstig van 1265 en 1522 op lijn 1522-L8 (niet-afwijkend, groen) en de lijn 1522-L10 (afwijkend, rood). Bio-merker-20 vertoont een grotere variatie in de metingen. De verschillen tussen de normale en afwijkende lijnen vallen binnen de meetvariatie. De Y-as geeft het voorkomen van de bio-merkers weer in arbitraire eenheden.



Figuur 4. Analyse van 56 bio-merkers afkomstig van 1265 en 1522 op lijn 1265-L5 (niet-afwijkend, groen) en de lijn 1265-L4 (afwijkend, rood). De verschillen tussen de normale en afwijkende lijnen vallen binnen de meetvariatie. De Y-as geeft het voorkomen van de bio-merkers weer in arbitraire eenheden.



Figuur 5. Analyse van bio-merkers afkomstig van 115, 1265 en 1522 op lijn 115-1 en 3 (niet-afwijkend, groen) en de lijn 115-24 en 29 (afwijkend, rood). De verschillen tussen de normale en afwijkende lijnen vallen binnen de meetvariatie. De Y-as geeft het voorkomen van de bio-merkers weer in arbitraire eenheden.

5c. Verschillen in DNA-methylatiepatronen.

Allereerst zijn optimalisatie-experimenten uitgevoerd om betere ^mAFLP-fingerprints te krijgen met methylatiegevoelige restrictie-enzymen. De AFLP-extensie werd daartoe gewijzigd van +2/+3 naar +3/+3. Vervolgens werden van de gebruikte rassen *EcoRI/MseI* fingerprints geproduceerd om de genetische homogeniteit te onderzoeken. 4 rassen (314, 319, 1265, 1522) lieten enige heterogeniteit zien. 1 ras (115) liet nagenoeg geen heterogeniteit zien (1 band gedetecteerd in 7 AFLP primer combinaties, PCs).

Uit de 1^e vier rassen is een selectie van 32 individuen gemaakt. Per ras is 1 afwijkende en 1 niet afwijkende lijn gekozen; de lijnen zelf bestaan uit 4 individuen. Voor ras 319 zijn twee niet afwijkende lijnen gekozen, omdat in dit ras geen afwijkende planten geïdentificeerd zijn.

314_L2P en 314_L8P, lijn 8 afwijkend

319_L1P en 319_L5P, beide niet afwijkend

1522_L8P en 1522_L10P, lijn 10 afwijkend

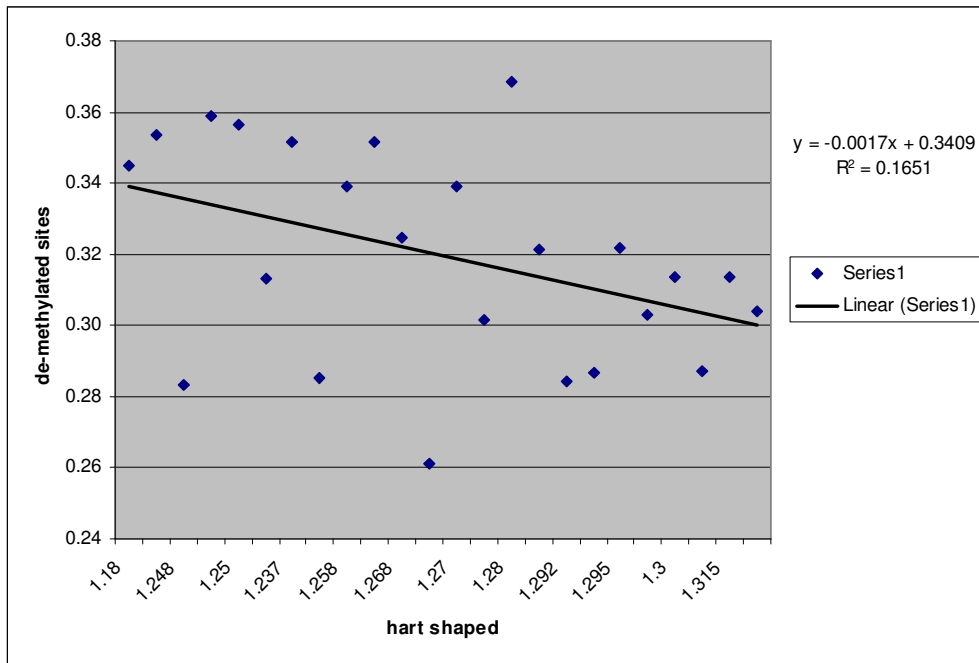
1265_L4P en 1265_L5P, lijn 4 afwijkend

Op de selectie van 32 is het ^mAFLP-protocol uitgevoerd. Er werd een indicatie gevonden voor methylatiereductie in de afwijkende planten voor twee van de 4 lijnen, namelijk in lijn 314 en lijn 1265. Het betreft hier een lichte daling van de methylatiegraad. Omdat het gemiddeld 15 banden per sample betreft is dit niet statistisch te onderbouwen. Lijn 1265 laat geen onderscheid in de methylatieniveau zien en lijn 319 heeft geen fenotypisch afwijkende planten. Tevens is standaard AFLP uitgevoerd met de enzymcombinatie *HpaII/MseI*. *HpaII* is een methylatie gevoelig enzym en genereert een AFLP-fragment als de AFLP-knipsite niet gemethyleerd is. Analyse van de *HpaII/MseI* data leverde geen aantoonbare trend op. Omdat in dit materiaal de genetische variatie niet te onderscheiden is van epi-genetische variatie zijn deze data niet verder geanalyseerd.

Op materiaal van 115 is een standaard AFLP uitgevoerd met enzymcombinaties *EcoRI/MseI* en *HpaII/MseI*. Een eerste analyse op een beperkte dataset liet geen correlatie zien tussen losse *HpaII/MseI* merkers dan wel tussen het aantal *HpaII/MseI* banden en hartvormigheid, welke de mate van afwijkendheid weergeeft.

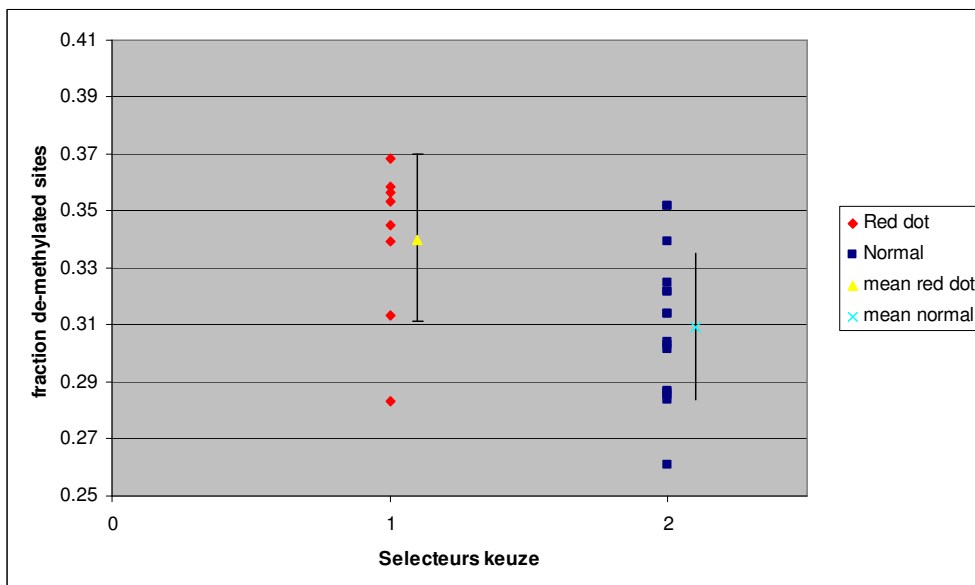
Vervolgens is voor het vinden van gekoppelde merkers aan hartvormigheid een “Bulk Segregant Analysis” (BSA) screening (*HpaII/MseI*) uitgevoerd op twee pools. Een ‘afwijkende’ pool met sample 115-24, 115-29, 115-35 en een ‘niet-afwijkende’ pool bestaande uit sample 115-1, 115-3, 115-6, 115-22, 115-34 en 115-37. De BSA screening maakt het mogelijk om een groot aantal PCs te screenen op verschillen die poolafhankelijk zijn. Uit de BSA screening met 36 PCs (*HpaII/MseI*) zijn 96 kandidaat merkers geselecteerd. Dit aantal is hoger dan werd verwacht. Met behulp van de BSA resultaten, verificatie van 20 kandidaat merkers, en daarnaast 348 apart verkregen *HpaII/MseI* merkers (20 PCs) die zijn gescoord op een selectie van 24 samples van 115 leverde geen specifieke merkers op die gekoppeld zijn aan hartvormigheid en/of aan de selectie van afwijkende planten door de selecteur. Dit ondersteunt de hypothese dat somaclonale variatie veroorzaakt wordt door een combinatie van de-methylering sites.

Een eerste Analyse van de *HpaII/MseI* AFLP-data levert een trend op tussen hartvormigheid en de-methylatie (zie Figuur 6).



Figuur 6. De fractie de-methylatie (Y-as) uitgezet tegen hartvormigheid van het blad (X-as) bij 24 lijnen van 115.

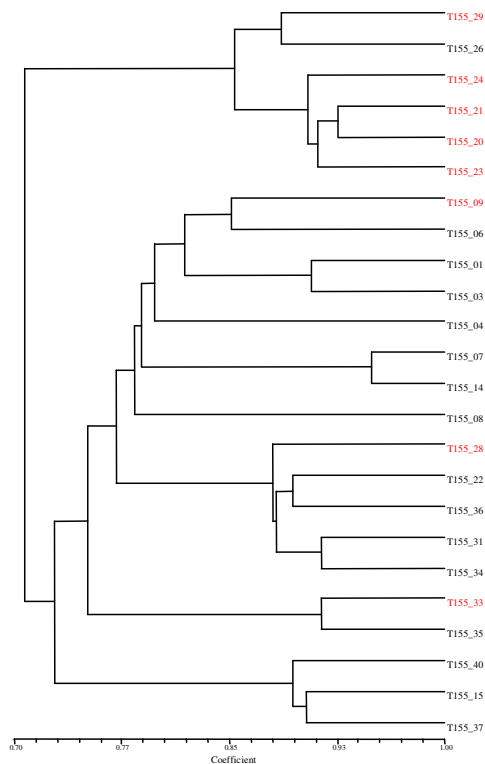
Deze trend wordt duidelijker, indien we de de-methylatie uitzetten tegen de beoordeling afwijkend/normaal van de selecteur (zie Figuur 7).



Figuur 7. Fractie de-methylatie (Y-as) uitgezet tegen wel (1) of niet afwijkend (2) beoordeeld door de selecteur (X-as) bij 24 planten van 115. Significant verschil: T-test = 0,015 (p-waarde 95% = 0,05).

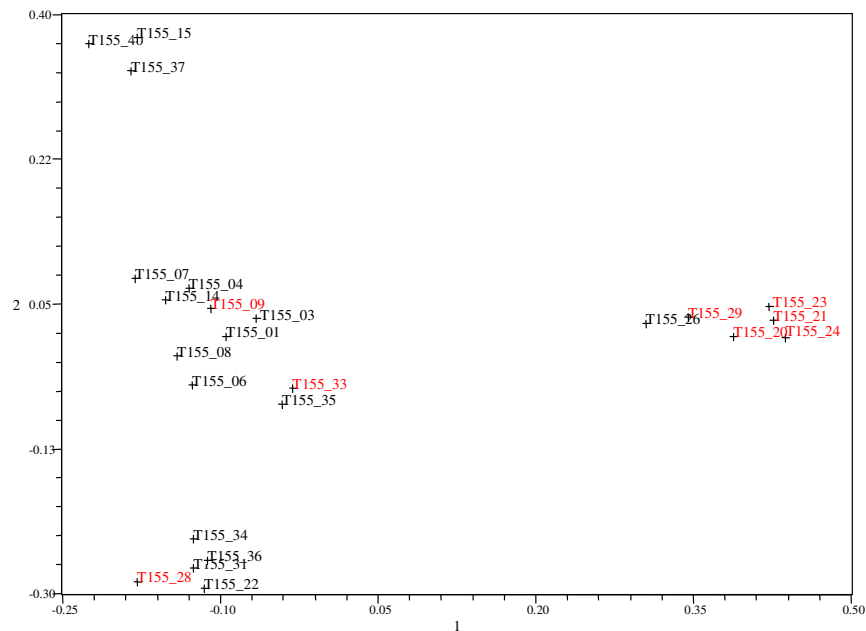
Op basis van deze resultaten is er een significant verschil tussen de door de selecteur onderscheiden planten en de fractie van de-methylatie (T-test = 0,015; p-waarde 95% = 0,05). Indien 2 van de 8 afwijkende planten en 2 van de 16 normale fenotypen worden gedefinieerd als uitbijters dan zijn er twee duidelijke groepen te onderscheiden.

Met behulp van een clusteranalyse is vervolgens de verwantschap tussen de verschillende lijnen bepaald (zgn. epi-genetische verwantschapsanalyse). In deze epi-genetische verwantschapsanalyse zijn twee groepen duidelijk zichtbaar (zie Figuur 8), waarbij in de kleinste groep van zes individuen vijf afwijkende lijnen zijn te vinden.



Figuur 8. Dendrogram gebaseerd op de dataset gegeneerd op 24 115 lijnen, berekend middels de “Simple Matching” similariteitscoëfficiënt. Afwijkende planten zijn in rood weergegeven.

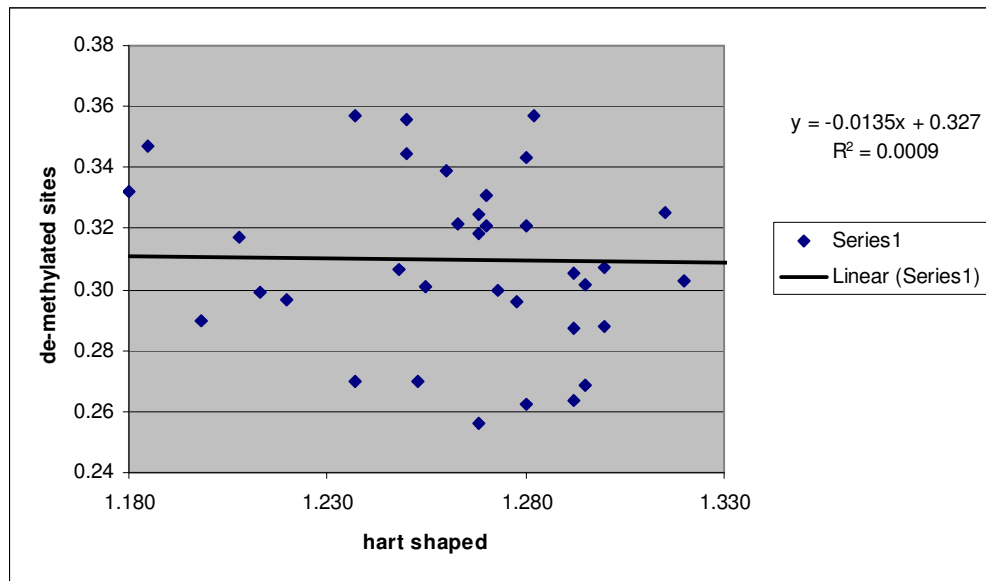
De zogenaamde cofenetische correlatie index ($R = 0,91$) is hoog, wat aangeeft dat het dendrogram een zeer goede weergave van de similariteitsmatrix is. Soortgelijke resultaten worden gevonden met een Principal Co-ordinate analysis (PCO) op deze zelfde dataset (zie Figuur 9). In deze analyse wordt de grootste groep samples uit de clusteranalyse nog eens in drie groepen opgedeeld.



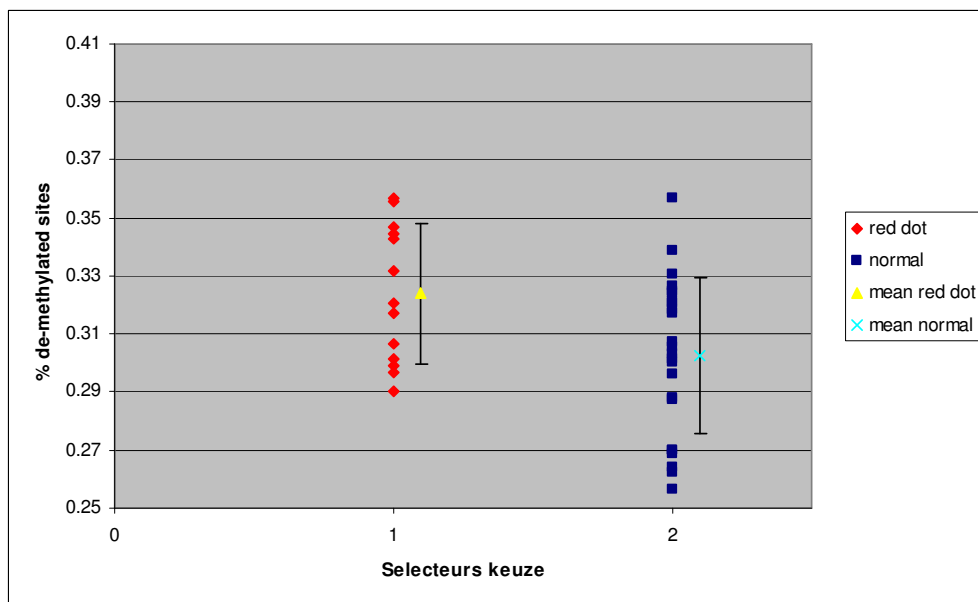
Figuur 9. Principal co-ordinate analysis op de data set gegeneerd op 24 115-lijnen, berekend middels de “Simple Matching” similariteitscoëfficiënt. Afwijkende planten zijn in rood weergegeven. De eerste component (X-as) en de tweede component (Y-as) verklaren respectievelijk 22,0 % en 13,5 % van de totale variatie.

Een ^mAFLP analyse(ABC protocol *PstI/MseI*) op de 24 115-lijnen zou kunnen aantonen dat werkelijk alle variatie veroorzaakt wordt door methylatievariatie. Dit is nu een aanname daar de niet-methylatiegevoelige enzymcombinatie *EcoRI/MseI* geen variatie vertoonde. Wegens een gebrek aan middelen is deze ^mAFLP analyse(ABC protocol *PstI/MseI*) niet op de 115-lijnen uitgevoerd.

Voor de verificatie van het bovengenoemde significante verschil tussen de fractie van de-methylatie en de selecteurskeuze kwamen uiteindelijk 36 van de in totaal 40 c115-lijnen beschikbaar (3 lijnen zijn niet geleverd en van lijn 32 is de variatie in hartvormigheid tussen individuele planten zeer groot en dehalve niet betrouwbaar). Er is een dataset gegeneerd waarvan 269 merkers in het merendeel van de individuen kon worden gescoord. Overigens zijn alleen die banden die ‘polymorf’ zijn tussen de onderzochte lijnen gescoord. Analyse van de *HpaII/MseI* AFLP data op 36 lijnen laat de gevonden trend tussen de-methylatiefractie en hartvormigheid niet zien (zie figuur 10). De correlatie tussen de-methylatiepercentage en hartvormigheid kan derhalve niet eenduidig worden aangetoond. Wel blijft er een significant verschil tussen de fractie de-methylatie en de beoordeling afwijkend/normaal van de selecteur (T-test = 0.022; p-waarde 95% = 0.05, zie figuur 11).

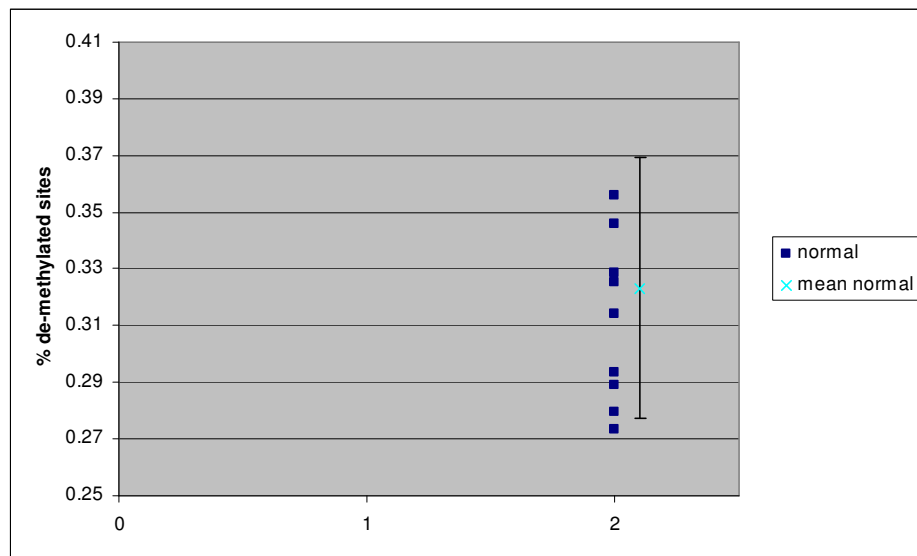


Figuur 10. Fractie de-methylatie sites (Y-as) tegen hartvormigheid van het blad (X-as) voor 36 lijnen van 115.



Figuur 11. Fractie de-methylatie (Y-as) uitgezet tegen wel (1) of niet (2) afwijkend (X-as) voor 36 lijnen van cultivar 115. Significant verschil: T-test = 0,022 (p-waarde 95% = 0,05)

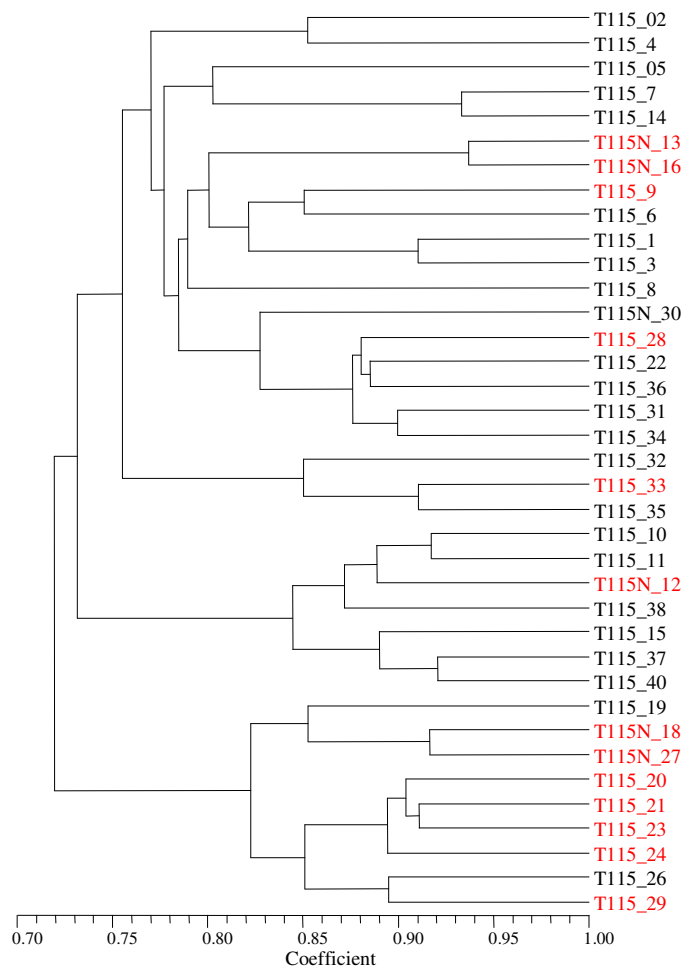
Van cultivar 80 zijn 10 lijnen geanalyseerd. Aangezien in deze cultivar geen afwijkende planten zijn gevonden en geen significante afwijkingen in hartvormigheid zijn geconstateerd, kunnen we alleen concluderen dat cultivar 80 variatie laat zien in het percentage de-methylatie sites (zie figuur 12). De grootte van de variatie is vergelijkbaar met die gevonden voor de niet afwijkende lijnen van cultivar 115.



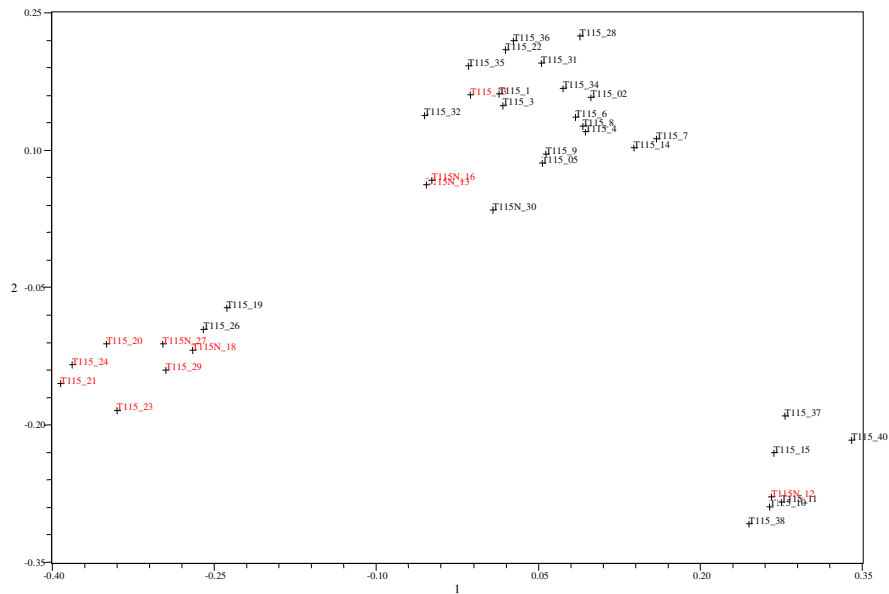
Figuur 12. Fractie de-methylatie (Y-as) uitgezet tegen wel (1) of niet (2) afwijkend (X-as) voor 10 lijnen van cultivar 80.

De clusteranalyse van de totale set van 37 lijnen van cultivar 115 geeft een soortgelijk beeld als met de 24 lijnen. In deze epi-genetische verwantschapsanalyse zijn nu drie duidelijke groepen zichtbaar (zie figuur 13), waarbij één groep zeven afwijkende lijnen bevat en slechts twee normale (selecteurskeuze). De zogenaamde cofenetische correlatie index ($R = 0,84$) is hoog, wat aangeeft dat het dendrogram een goede weergave van de similariteitsmatrix is. Soortgelijke resultaten worden gevonden met een PCO-analyse op deze zelfde data set (zie figuur 14). In deze analyse wordt de scheiding van de groepen nog duidelijker. Dit resultaat is mogelijk te verklaren doordat er pedigree verschillen zijn tussen de verschillende lijnen (staan er drie sublijnen aan de basis van het cv-115 materiaal?). Op deze vraag kan alleen het betrokken bedrijf antwoord geven. Indien dit het geval is, is de vraag of de mate van de-methylatie overerfbaar is. Of zijn er specifieke regio's waar de-methylatie plaatsvindt en is de-methylatie dus niet random? En zo ja, zijn er dan toch specifieke merkers of merkersets te vinden die de somaclonale variatie verklaren? Het maakt pas zin om dit verder te analyseren als het gebruik van de sublijnen is uit te sluiten.

Om de significantie verder te bepalen zou de dataset van de 115 lijnen mogelijk statistisch nog verder geanalyseerd kunnen worden.



Figuur 13. Dendrogram gebaseerd op de dataset gegeneerd op 37 lijnen van cultivar 115, berekend middels de “Simple Matching” similariteitscoëfficiënt. Afwijkende planten zijn in rood weergegeven.



Figuur 14. Principal co-ordinate analysis op de dataset gegeneerd op 37 lijnen van cultivar 115, berekend middels de “Simple Matching” similariteitscoëfficiënt. Afwijkende planten zijn in rood weergegeven. De eerste component (X-as) en de tweede component (Y-as) verklaren respectievelijk 17,7% en 12,2% van de totale variatie.

6. Conclusies

Variatie in plantmateriaal uit weefselkweek is meetbaar aan de hand van de bladvorm in het uitgeplante materiaal. Op deze manier konden in enkele gewassen rassen onderscheiden worden en konden afwijkende van niet afwijkende planten binnen een ras onderscheiden worden. Tevens bleek de gemeten variatie tussen lijnen van een in weefselkweek stabiel ras van Anthurium (80) veel minder dan die tussen lijnen van een in weefselkweek labiel ras (115). Van enkele Anthuriumrassen werden samples in weefselkweek bemonsterd voor analyse op verschillen in genexpressie en DNA-methylatie.

Voor het analyseren van verschillen in genexpressie werd gekeken naar een groot aantal geselecteerde potentiële biomerkers, waarvan bekend is dat ze in blad tot expressie komen. Deze lieten in de verschillende analyses van gepoolde en zuivere lijnen geen verschil zien tussen niet-afwijkende en afwijkende lijnen van de Anthurium cultivars die voor het onderzoek beschikbaar waren. Op grond van de moleculaire analyses wordt geconcludeerd dat er geen aantoonbaar moleculair verschil bestaat op het niveau van de expressie van de geselecteerde genen tussen niet-afwijkende en afwijkende lijnen in de cultivars 1265, 1522 en 115.

Gebruik makend van het geoptimaliseerde ^mAFLP-protocol kon variatie in methylatiepatronen van DNA tussen lijnen van Anthuriumcultivars in weefselkweekplanten worden aangetoond. Deze variatie vertoont echter geen relatie met de gemeten variatie in de vorm van het blad tussen de lijnen in de kas. Wel werd er een significant verschil gevonden in methylatiegraad tussen niet afwijkende en afwijkende planten van cultivar 115. De gevonden verschillen bieden echter geen aanknopingspunten waarmee op korte termijn merkers geselecteerd kunnen worden, die bruikbaar zijn voor de ontwikkeling van een toets op afwijkende planten in weefselkweek; het uiteindelijke doel van het project.

Op basis van deze conclusies is het project na fase 1 gestopt.

7. Aanbevelingen

In de nabespreking van dit project werd uitvoerig ingegaan op de bevindingen en de mogelijkheden om verder onderzoek te kunnen doen. Geconcludeerd werd, dat de benaderingswijze in dit project wellicht een stap te ver is geweest door uit te gaan van fenotypische analyses aan opgeplant materiaal en te zoeken naar merkers in het corresponderende materiaal in weefselkweek. In een vervolgstudie zou eerst gekeken kunnen worden naar een relatie tussen verschillen in genexpressie en/of DNA-methylatiepatronen en bladmorfologie in het opgeplante materiaal. Wanneer hierin betrouwbare verschillen gevonden worden, die tevens een relatie vertonen met de fenotypische analyse (kwantitatieve bladmetingen enerzijds of wel/niet afwijkend beoordeeld door de selecteur anderzijds), dan zou vervolgens gekeken kunnen worden of deze verschillen al in het corresponderende weefselkweekmateriaal tot expressie komen. Hiermee wordt dan in eerste instantie naar merkers voor de gevonden fenotypische verschillen in opgeplant materiaal gezocht, waarna gekeken wordt of deze merkers al in weefselkweek aantoonbaar zijn. Dergelijk vervolgonderzoek past in het kader van het Technologisch Top Instituut Groene Genetica. Daarnaast zouden aan de huidige ^mAFLP-data (*HpaII/MseI*) eventueel additionele statistische analyses plaats kunnen vinden in relatie tot het wel of niet afwijkend zijn van lijnen zoals vastgesteld door de selecteur.