

Vermeerdering van Tulp met Behulp van Weefselkweek

Verslag van project PT-36197, PPO-330511; looptijd 2000-2004

Auteur van verslag: Dr. G.J. de Klerk, PRI

Voorwoord

In dit verslag wordt het onderzoek samengevat dat van 2000 tot eind 2004 verricht is aan weefselkweekvermeerdering van tulp. Dit onderzoek was een vervolg op een eerder project aan weefselkweekvermeerdering van tulp. De resultaten hiervan staan beschreven in het rapport “Toepassing van weefselkweek en embryogenese bij vermeerdering en veredeling van tulp” (auteurs Langens-Gerrits, Bouman en Custers). In het voorgaand onderzoek was een protocol ontwikkeld dat voldoende perspectief bood voor toepassing in bedrijven. Het onderzoek gepresenteerd in dit verslag was een verdere uitwerking van dit protocol en werd uitgevoerd in samenwerking met enkele bedrijven, te weten SBW (2000-2004), VCI (2000-2002), VLZ (2000-2001) en VZR (2002-2004). Gedurende de eerste twee jaren werden verschillende kleinere experimenten uitgevoerd. In de volgende twee-drie jaar werden enkele grote experimenten uitgevoerd waarbij ook verschillende malen werd doorvermeerderd. In het rapport wordt het gedeelte van PPO meer uitvoerig beschreven en worden de resultaten van de bedrijven kort gedocumenteerd. Tot november 2002 was Ir. M. Langens-Gerrits de projectleider. Omdat vanaf het voorjaar 2002 twee grote, langlopende experimenten zijn uitgevoerd, zijn alle experimenten van haar hand. Het projectleiderschap werd na haar vertrek overgenomen door Ing. A. Paffen. De proeven zijn opgezet in nauw overleg met de deelnemende weefselkweekbedrijven.

De opbouw van het verslag is:

- Inleiding (waarin een samenvatting van de voornaamste resultaten van voorgaand onderzoek.
- Experimenten Initiatie
- Experimenten Doorvermeerdering
- Experimenten Bolvorming
- Experimenten Uitplanten
- Experimenten Vermeerdering via meristematische clusters
- Discussie, conclusie en perspectieven

Inhoudsopgave

1	Samenvatting	5
2	Algemene inleiding	6
3	Initiatie	7
3.1	Inleiding	7
	Type uitgangsmateriaal	7
	‘Loze’ scheuten	7
	Experimenten in het huidige project	7
3.2	Materiaal en methodes	7
3.2.1	Plant materiaal	7
3.2.2	Media	8
3.2.3	Cultuurcondities	8
3.2.4	Waarnemingen :	8
3.3	Resultaten	9
3.3.1	Resultaten bij verschillende laboratoria	9
3.3.2	Resultaten verschillende cultivars	9
3.3.3	Effect van verschillende media	10
3.3.4	Positie in de bloemstengel	11
3.3.4	Positie in de bloemstengel	12
4	Doorvermeerdering	14
4.1	Inleiding	14
4.2	Materiaal en methoden	14
4.3	Resultaten	15
4.3.1	Effect van uitgangsmateriaal	15
4.3.2	Effect van doorvermeerderingsprocedure	16
4.3.3	Positie in de scheut	16
4.3.4	Effect van entdichtheid	18
4.3.5	Effect van herhaaldelijk medium verversen	18
4.3.6	Groot doorvermeerderingsexperiment: JA en temperatuur(PPO)	19
4.3.7	Groot doorvermeerderingsexperiment: 2,4-D zonder overzetten (SBW en VZR)	21
5	Bolvorming	23
5.1	Inleiding	23
5.2	Materiaal en methoden	23
5.3	Resultaten	23
5.3.1	Effect van de vermeerderingscondities	23
5.3.2	Effect van bolvormingsmedium	26
6	Uitplanten	27
6.1	Inleiding	27
6.2	Materiaal en Methoden	27
6.3	Resultaten	27
6.3.1	Effect van gewicht bij uitplanten en cultivar	27
6.3.2	Effect van het vermeerderingsmedium	29
7	Vermeerdering via meristematische clusters	30
7.1	Inleiding	30
7.2	Materiaal en methoden	30

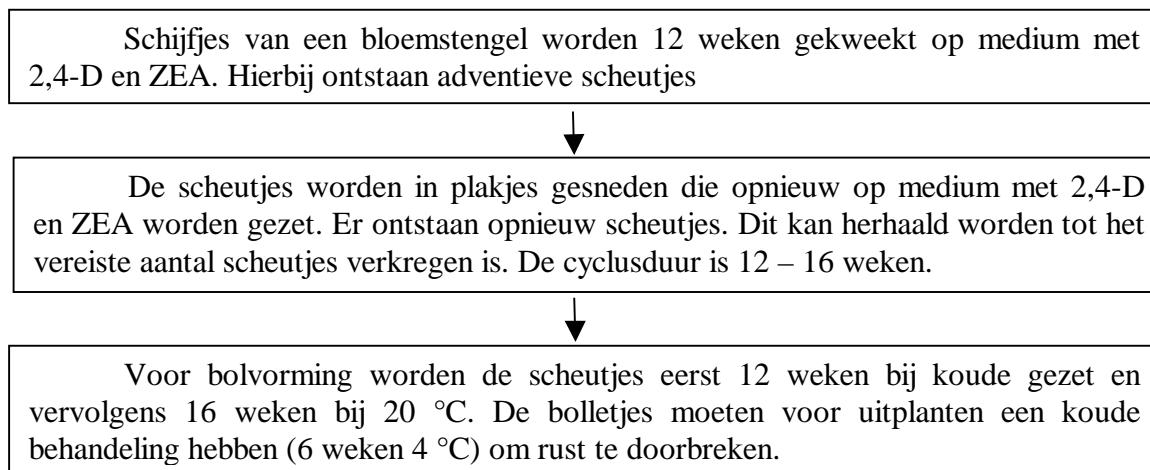
7.3	Resultaten	30
7.3.1	Bacterietoetsen	30
7.3.2	Resultaten met verschillende cultivars	31
8	Discussie, conclusie en perspectieven.....	32
8.1	De verschillende stappen in het protocol.....	32
8.1.1	Initiatie	32
8.1.2	Doorvermeerdering.....	32
8.1.3	Bolvorming	32
8.1.4	Conclusie	32
8.2	Perspectieven	35
8.2.1	Initiatie	35
8.2.2	Doorvermeerderen.....	36
8.2.3	Bolvorming	36
8.2.4	Uitplanten.....	36
8.2.5	Tenslotte.....	37
9	Output.....	38
10	Afkortingen:.....	39

1 Samenvatting

Er zijn bij een reeks cultivars experimenten uitgevoerd aan de verschillende stappen in de vermeerderingsprocedure. In de conclusie wordt een protocol aangegeven dat bij de meeste cultivars voldoende vermeerdering geeft. Volgens de ontwikkelde procedure worden na enige optimalisatie in vijf jaar uit één bol na twee jaar weefselkweek (4 vermeerderingscycli en een bolvormingsbehandeling) en drie jaar groei in het veld 1000 – 100.0000 nieuwe bollen van normaal plantgoed formaat geproduceerd (aantallen zijn cultivar-afhankelijk).

Bij de hier ontwikkelde procedure wordt een bevredigende doorvermeerdering verkregen door gebruik van een relatief hoge concentratie 2,4-D. Waarschijnlijk kunnen met een hoge 2,4-D concentratie ook genotypen die tot nu toe enigszins recalcitrant zijn, tot vermeerdering aangezet worden. Dit is nog onvoldoende onderzocht. Een vermeerderingsfactor van ca. 3 of meer in een cyclus van 16 weken is waarschijnlijk voor de meeste genotypen goed mogelijk. Per cultivar moet de meest optimale procedure worden vastgesteld. De bolletjes die in weefselkweek zijn geproduceerd hebben nog eens drie jaar groei in het veld nodig om de afmetingen van normaal plantgoed te verkrijgen. Er zijn in de verschillende stappen tal van verbeteringen mogelijk die nader onderzocht dienen te worden.

De procedure is in grote lijnen:



Het protocol werkt maar kan waarschijnlijk significant verbeterd worden middels verschillende aanpassingen. Hierdoor kan de productie verveelvoudigd worden en kan de kostprijs flink omlaag gaan. In het laatste hoofdstuk worden deze mogelijkheden aangegeven.

2 Algemene inleiding

Tulp is het belangrijkste bloembolgewas in Nederland met een areaal van 11050 ha in 2004, bijna 50% van het totale bloembollen areaal. Veredeling gaat echter erg langzaam omdat het gewas sterk heterozygoot is en een lange generatiecyclus heeft. Bovendien gaat vermeerdering op het veld zeer langzaam Als gevolg hiervan duurt het lang voordat nieuwe cultivars op de markt gebracht kunnen worden: Een veredelingsprogramma van tulp duurt 20-25 jaar. Verschuivingen in het sortiment kunnen dus maar langzaam gebeuren. Versnelling van het proces is essentieel om adequaat in te kunnen spelen op veranderende verlangens van maarschappij (vraag naar rassen die geteeld kunnen worden met minder milieubelasting en die minder kwetsbaar zijn voor milieuveranderingen) en markt (nieuwe kleuren en vormen).

Vermeerdering met behulp van weefselkweek, kan de introductie van nieuwe cultivars aanmerkelijk versnellen. Bij vermeerdering op het veld worden 2-3 nieuwe bollen per uitgeplante bol verkregen (het aantal nieuwe bollen verschilt per cultivar). Er is de afgelopen jaren door verschillende groepen in binnen- en buitenland onderzoek gedaan aan weefselkweekvermeerdering van tulp en ook bij het LBO/COWT is vermeerdering van tulp met behulp van weefselkweek onderzocht. Dit heeft geresulteerd in een protocol dat evenwel nog niet geheel uitgekristalliseerd was. In weefselkweek kunnen op plakjes gesneden van de jonge bloemstengel van één bol, grote aantallen scheutjes ontstaan (zo'n 30 scheutjes per bloemstengeltje). Deze scheutjes kunnen vervolgens weer gebruikt worden voor verdere doorvermeerdering en zo kunnen in een jaar in principe duizenden plantjes worden verkregen. Er was nog weinig aandacht geschonken aan integratie van de verschillende onderdelen van het proces (initiatie, doorvermeerderen, bolvorming, rustdoorbreking en uitplanten).

Het huidige project had als doelen: (1) optimalisatie van het protocol en validatie bij een reeks van cultivars, (2) integratie van de verschillende stappen van het protocol en (3) implementatie bij bedrijven. Het onderzoek wijkt enigszins af van de oorspronkelijke opzet. Er is met name meer aandacht gekomen voor de doorvermeerderingsfase. Deze aanpassing heeft plaatsgevonden in overleg met het bedrijfsleven.

3 Initiatie

3.1 Inleiding

Type uitgangsmateriaal

Voor initiatie kunnen verschillende weefsels gebruikt worden. Het meest geschikt zijn jonge bloemstengels. Normaal worden stengels gebruikt uit bollen waarbij de bloemknop net uit de bol begint te komen. Er zijn in het verleden uitgebreid experimenten gedaan met bolrokweefsel. Een probleem daarbij was dat de bollen alleen kort (maximaal 3 maanden) na de oogst gebruikt konden worden.

'Loze' scheuten

Bij initiatie ontstaan scheutjes. Een groot probleem, zowel bij regeneratie uit bloemstengels als bij regeneratie uit bolrokweefsel, was dat deze scheutjes geen meristeem bevatten. Deze scheuten waren daardoor onbruikbaar bij bolvorming en uitplanten. Er is bij de initiatie van scheutjes op bloemstengelschijfjes een grote reeks factoren onderzocht en hierbij bleek dat toediening van het hormoon methyljasmonaat / jasmonzuur het percentage 'goede' scheuten verhoogde van 20 naar 80. Over de achtergrond van het fenomeen 'loze' scheuten is weinig bekend. Er lijken twee mogelijkheden. (1) Er ontstaan geen adventieve scheuten maar adventieve blaadjes. De dedifferentiatie van het stengelweefsel of de inductie is mogelijk niet/onvoldoende gelukt en de cellen konden alleen bladeren en geen scheuten vormen. (2) Wat betreft de 2^e mogelijkheid moet eerst opgemerkt worden dat zygotische embryo's van tulp eveneens geen meristemen hebben; voor meristeemvorming moeten ze eerst een koudebehandeling ondergaan. Er zouden dan volgens de 2^e optie geen scheutmeristemen zijn gevormd maar (somatische) embryo's die doorgeschoten zijn. Er zijn geen experimenten gedaan om te verifiëren of de 'loze' scheuten gebruikt kunnen worden voor doorvermeerdering maar – vooruitlopend op de resultaten- het lijkt er op dat dit goed mogelijk is en dat 'loze' scheuten geen probleem zijn, noch als startmateriaal bij een nieuwe vermeerderingscyclus, noch als materiaal dat een bolvormingsbehandeling krijgt en vervolgens wordt uitgeplant.

Experimenten in het huidige project

Er wordt in de huidige experimenten onderzocht in hoeverre de eerder beschreven initiatie methode werkt bij verschillende cultivars en in verschillende laboratoria. Daarnaast zijn enkele mediumaanpassingen onderzocht en de positie van het explantaat in de bloemstengel.

3.2 Materiaal en methodes

3.2.1 Plant materiaal

Van elk bloemstengeltje werden alle plakjes tot het begin van de bloem ingezet behalve het meest basale plakje dat werd weggesneden na de sterilisatie. De plakjes werden met de fysiologische onderkant op het medium gelegd (basaal) m.u.v. Apeldoorn (bij deze cultivar werden de plakjes juist met de bovenkant op het medium gelegd, dus "omgekeerd"; dit op basis van voorgaand onderzoek waarbij deze werkwijze een beter resultaat gaf). De plakjes van één bloemstengeltje werden over zoveel mogelijk media verdeeld. Daarbij werd er op gelet dat bijvoorbeeld niet alle onderste plakjes op één medium terecht kwamen. Er werden 4 keer scheutjes geogst van de explantaten: na 12, 16, 20 en 24 weken. Alle oorspronkelijke

stengelplakjes werden bij de iedere oogst teruggezet op vers medium met dezelfde samenstelling als het medium waar ze vandaan kwamen om opnieuw scheutjes uit te laten groeien.

De deelnemende laboratoria onderzochten ieder drie cultivars naast Gander en Apeldoorn als referentie:

PPO :	Ad Rem, Top Parrot en Yellow Flight
VLZ :	Carmen, Sevilla en Hollandia
VCI :	Blue Diamond, Mondial en Strong Gold
SBW :	Passionale, Purple Prince en Purple Flag

3.2.2 Media

Bij inzettingen werd als standaardmedium gebruikt:

Murashige and Skoog macro- en micro-elementen	4.3 g per liter
Sucrose 3%	30 g per liter
Caseïne hydrolysaat	500 mg per liter
Myo-inositol	100 mg per liter
Nicotinezuur	0.5 mg per liter
Pyridoxine-HCl	0.5 mg per liter
Thiamine-HCl	0.1 mg per liter
Agar (BBL granulated) 0.6 %	6 g per liter
pH 6.0 voor autoklaveren	

Aan dit medium werden toegevoegd:

M1 :	basismedium met 5 μ M NAA, 15 μ M ZEA en 3 μ M JA
M2 :	basismedium met 5 μ M NAA, 15 μ M ZEA en 10 μ M JA
M3 :	basismedium met 5 μ M NAA, 15 μ M ZEA en 30 μ M JA
M4 :	basismedium met 5 μ M 2,4-D en 0.5 μ M BA ; na 3w zonder 2,4-D maar met 0.5 μ M BA
M5 :	basismedium met 50 μ M 2,4-D en 0.5 μ M BA ; na 2w zonder 2,4-D maar met 0.5 μ M BA
M6 :	basismedium met 5 μ M 2,4-D en 15 μ M ZEA ; na 3w zonder 2,4-D maar met 15 μ M ZEA
M7 :	basismedium met 50 μ M 2,4-D en 15 μ M ZEA ; na 2w zonder 2,4-D maar met 15 μ M ZEA

3.2.3 Cultuurcondities

De cultures werden gekweekt bij 20 °C en onder drie TL-33 buizen.

3.2.4 Waarnemingen :

Waargenomen werden:

- Aantal besmette stengelplakjes
- Aantal reagerende stengelplakjes (plakjes met scheutjes)
- Aantal dode stengelplakjes
- Aantal geregenereerde scheutjes groter dan 0.5 cm.

3.3 Resultaten

3.3.1 Resultaten bij verschillende laboratoria

PPO en de drie bedrijfslaboratoria die in dit onderzoek participeerden hadden ieder als referentie de cultivars Apeldoorn en Gander ingezet op verschillende media. Deze media waren ofwel gebaseerd op NAA + JA (M1 – M3) ofwel op 2,4-D (M4 – M7). Ter illustratie is een foto van geregenereerde scheutjes weergegeven in foto 3.1. In Tabel 3.1 zijn de resultaten van de NAA+JA groep en de 2,4-D groep voor het overzicht gepoold. Er waren geen verschillen wat betreft besmetting (het percentage besmetting was bij de verschillende labs 20 tot 40%) en het aantal schijfjes dat afstierf (10 tot 20%). Uit de Tabel blijkt dat er een groot verschil was tussen de verschillende labs. De verschillen waren echter niet consistent. De oorzaak is niet duidelijk maar ligt waarschijnlijk aan een opeenstapeling van kleine factoren. Bij één van de deelnemende laboratoria, bijv., waren de cultures te koud weggezet (in een 20 °C cel maar bij de chiller).

Tabel 3.1. Het aantal scheutjes per overlevend stengelschijfje in de verschillende participerende labs. De schijfjes werden ingezet ofwel op medium gebaseerd op NAA + ZEA + MeJA ofwel op medium met 2,4-D + BA.

		PPO	VLZ	VCI	SBW
Apeldoorn	NAA	0.7	2.2	1.8	0.7
	2,4-D	6.6	3.4	0.7	1.4
Gander	NAA	5.6	3.1	1.9	1.4
	2,4-D	5.8	2.5	1.4	1.0

3.3.2 Resultaten verschillende cultivars

De verschillende laboratoria zetten alle vier naast de referentie cultivars Apeldoorn en Gander 3 andere cultivars in (zie Materiaal en Methode). De resultaten staan in Tabel 3.2 waarbij wederom de NAA (M1 – M3) en de 2,4-D (M4-M7) media gepoold zijn. De resultaten zijn samengevat:

Bevredigend (meer dan 2 per schijfje) zowel op NAA + ZEA + JA als op 2,4-D + BA:
Gander, Apeldoorn, Top Parrot, Hollandia, Mondial, Strong Gold

Bevredigend (meer dan 2 per schijfje) alleen op NAA + ZEA + JA:
Yellow Flight, Carmen, Sevilla, Blue Diamond

Bevredigend (meer dan 2 per schijfje) alleen op 2,4-D + BA:
Geen

Matig (minder dan 2 per schijfje) op beide media:
Ad Rem, Passionale, Purple Flag, Purple Prince

Tabel 3.2. Initiatie bij een reeks cultivars. De experimenten zijn uitgevoerd door 4 verschillende laboratoria. De explantaten werden ingezet op media met NAA + ZEA + JA (kolom NAA) of op media met 2,4-D + BA (kolom 2,4-D) in verschillende concentraties (zie Materiaal en methode) De resultaten zijn gepoold.

		NAA	2,4-D
PPO	Apeldoorn	0.7	6.6
	Gander	5.6	5.8
	Ad Rem	0.5	1.5
	Top Parrot	13.7	3.1
	Yellow Flight	2.8	1.4
VLZ	Apeldoorn	2.2	3.4
	Gander	3.1	2.5
	Carmen	3.1	0.9
	Hollandia	7.6	4
	Sevilla	5.9	1.6
VCI	Apeldoorn	1.8	0.7
	Gander	1.9	1.4
	Blue Diamond	3.1	1
	Mondial	2.3	2.2
	Strong Gold	3.4	4.1
SBW	Apeldoorn	0.7	1.4
	Gander	1.4	1
	Passionale	0.4	0.4
	Purple Flag	0.1	0.4
	Purple Prince	0.9	0.4

Hierbij moet opgemerkt worden dat bij de referentie cultivars Gander en Apeldoorn de behandeling op de verschillende labs suboptimaal was (zie 3.3.1) en dat hetzelfde waarschijnlijk gold voor de andere cultivars. Door fijnstelling zullen waarschijnlijk alle cultivars boven de arbitraire grens van 2 scheutjes per schijfje kunnen komen. Dat betekent per bol ca. 20 scheutjes. De eerder ontwikkelde procedure is dus waarschijnlijk i.h.a. bevredigend.

3.3.3 Effect van verschillende media

De stengelschijfjes zijn ingezet volgens verschillende procedures:

- Op medium met NAA, ZEA en JA. Hierbij werd de concentratie van JA gevarieerd.
- Op medium met 2,4-D in 2 concentraties met ofwel BA ofwel ZEA als cytokinine. Hierbij werd eveneens de periode van toediening van 2,4-D gevarieerd (de eerste 2 of de eerste 3 weken).

De resultaten staan in tabellen 3.3-3.5. De resultaten laten zien dat ieder van de behandelingen in een respons resulteerde maar dat de mate van respons sterk varieerde. Het is

opvallend dat bij de 2,4-D puls, de 2-weken-puls met 50 µM 2,4-D aanzienlijk beter was dan de 3-weken-puls met 5 µM 2,4-D. Het is uit deze experimenten niet af te leiden of dit het gevolg was van de hoge 2,4-D concentratie of van de korte periode. In het algemeen geeft de behandeling van 2 weken 50 µM 2,4-D de beste resultaten.

Tabel 3.3. Regeneratie percentage van stengelscheutjes bij verschillende procedures. Het percentage is van niet besmette schijfjes. Het besmettingspercentage was 20-40%.

	regeneratie %					
	Apeld	Gander	Ad Rem	Yellow Fl.	Top Par.	Gem.
5NAA + 15ZEA + 3JA	23.7	80.6	37.4	36.1	87.9	53.1
5NAA + 15ZEA + 10JA	9.1	78.6	36.9	31.6	88.0	48.9
5NAA + 15ZEA + 30JA	22.2	78.2	0.0	41.7	95.7	47.5
3w 5 2,4-D + 0.5BAP	61.2	33.3	7.1	0.0	4.9	21.3
2w 50 2,4-D + 0.5BAP	74.2	89.9	28.5	13.4	81.4	57.5
3w 5 2,4-D + 15ZEA	57.3	69.8	9.0	6.3	43.5	37.2
2w 50 2,4-D + 15ZEA	81.2	95.8	64.3	56.3	85.7	76.6

Tabel 3.4. Aantal scheutjes per niet-besmet schijfje. Het besmettingspercentage was 20-40%.

	# scheuten per niet besmet plakje					
	Apeld	Gander	Ad Rem	Yell. Fl.	Top Par.	Gem.
5NAA + 15ZEA + 3JA	0.7	5.5	0.8	1.2	11.2	3.9
5NAA + 15ZEA + 10JA	0.4	5.5	0.8	1.9	12.8	4.3
5NAA + 15ZEA + 30JA	0.9	5.8	0.0	0.8	17.0	4.9
3w 5 2,4-D + 0.5BAP	5.6	1.2	0.9	0.0	0.0	1.5
2w 50 2,4-D + 0.5BAP	8.8	10.5	2.2	0.1	5.2	5.4
3w 5 2,4-D + 15ZEA	6.1	4.0	0.1	0.4	1.7	2.5
2w 50 2,4-D + 15ZEA	6.0	7.6	2.7	2.2	5.5	4.8

Tabel 3.5. In tabel 3.4. staat het aantal scheutjes dat in 4 oogsten verkregen werd. In deze tabel staat het percentage scheutjes dat in de eerste oogst werd verkregen.

	percentage scheutjes in de eerste oogst					
	Apeld	Gander	Ad Rem	Yell. Fl.	Top Par.	Gem.
5NAA + 15ZEA + 3JA	77.0	43.0	58.0	83.0	35.0	59.2
5NAA + 15ZEA + 10JA	31.0	47.0	15.0	50.0	46.0	37.8
5NAA + 15ZEA + 30JA	38.0	37.0	-	20.0	40.0	33.8
3w 5 2,4-D + 0.5BAP	77.0	100.0	92.0	-	100.0	92.3
2w 50 2,4-D + 0.5BAP	30.0	67.0	89.0	50.0	87.0	64.6
3w 5 2,4-D + 15ZEA	70.0	98.0	100.0	33.0	92.0	78.6
2w 50 2,4-D + 15ZEA	23.0	67.0	61.0	57.0	79.0	57.4

3.3.4 Positie in de bloemstengel

Van een jonge bloemstengel kunnen maximaal slechts 10 schijfjes gesneden worden. Daarom werd onderzocht of oudere, langere bloemstengels gebruikt konden worden (Tabel 3.6). Dit bleek niet het geval. Het regeneratievermogen loopt blijkbaar snel achteruit als de stengels in de lengte groeien. Bij jonge bloemstengels is bovendien onderzocht of er een effect was van de positie in de bloemstengel. Hier kwamen geen duidelijke resultaten uit.

Tabel 3.6. Regeneratie van scheuten uit schijfjes gesneden van lange bloemstengels van Gander.

	Lengte Stengel (cm)	# plakjes	# reactieve plakjes
Experiment 1			
Stengel 1 (geforceerd)	7.4	46	0
Stengel 2 (geforceerd)	4.5	1	0
Stengel 3 (geforceerd)	5.9	40	0
Stengel 4 (geforceerd)	5.4	48	16
Stengel 5 (geforceerd)	5.5	?	0
Stengel 6 (geforceerd)	5.6	40	0
Experiment 1			
Stengel 7 (geforceerd)	22.8	170	0
Stengel 8 (geforceerd)	22.1	?	0
Stengel 9 (geforceerd)	22.0	?	0
Stengel 10 (geforceerd)	22.0	160	1
Stengel 11 (geforceerd)	20.5	180	1
Stengel 12 (geforceerd)	17.5	190	0
Controle			
Stengel 13	0.5 – 1.0	7	6
Stengel 14	0.5 – 1.0	7	0
Stengel 15	0.5 – 1.0	10	4
Stengel 16	0.5 – 1.0	7	3
Stengel 17	0.5 – 1.0	5	0
Stengel 18	0.5 – 1.0	10	2
Stengel 19	0.5 – 1.0	8	6
Stengel 20	0.5 – 1.0	10	0
Stengel 21	0.5 – 1.0	10	1



Foto 3.1. Intiatie: Scheutjes geregenereerd op bloemstengelschijfjes van Gander.

4 Doorvermeerdering

4.1 Inleiding

Bij weefselkweekvermeerdering wordt wat betreft de vermeerderingssnelheid de meeste winst behaald bij de vermeerderingsfase. In weefselkweek kan vermeerdering immers jaarrond gedaan worden waardoor verschillende vermeerderingscycli per jaar kunnen worden verkregen. Bij buitenteelten is per jaar maar één vermeerderingscyclus mogelijk. Door het toevoegen van groeiregulators kan de vermeerdering nog eens versneld worden. De kleine afmetingen van het in-vitro materiaal zijn op verschillende manieren een nadeel, o.a. doordat ze als ze voor verdere ex-vitro teelt geogst worden nog steeds klein zijn en daardoor geruime tijd nodig hebben om weer de 'juiste' afmetingen te verkrijgen. De kleine afmeting maakt bovendien het manueel bewerken tijdrovend en de weefsels meer kwetsbaar.

In het voorgaand onderzoek is gevonden dat de beste vermeerdering wordt verkregen door scheutjes die bij de initiatie zijn gevormd in dunne 1-mm plakjes te snijden en die op een voedingsbodem te enten. Hierop ontstaan nieuwe scheutjes die na 12 - 16 weken geogst kunnen worden. Er zijn enkele experimenten gedaan om de vermeerdering te verbeteren.

4.2 Materiaal en methoden

- Alleen scheutjes langer dan 0.5 cm werden gebruikt voor doorvermeerdering, ongeacht de 'kwaliteit' (lang, dik, vergroeid).
- De scheutjes werden van de explantaten losgesneden en doorvermeerderd door ze in plakjes van ± 1 mm dik te snijden. Alleen de 5 onderste plakjes werden gebruikt tenzij anders aangegeven. De plakjes werden 'basaal' geënt (d.w.z. met de fysiologische onderkant op het medium). De doorvermeerdering gebeurde in hoge petrischalen; plakjes van meerdere scheutjes werden in één petrischaal gekweekt in het donker bij 20 °C.
- De scheuten werden doorvermeerderd op basismedium met 5 μ M NAA en 15 μ M 2-iP of basismedium met 5 μ M 2,4-D en 15 μ M 2-iP. Bij de 2,4-D behandeling werden de scheutjes na 3 weken overgezet naar medium met alleen 2-iP (Tabel 4.1 – 4.7 en 4.9-4.11) of niet overgezet (Tabellen 4.8 en 4.12 en Figuur 4.1).
- De scheutjes waren afkomstig van verschillende initiatie media. In sommige gevallen werden de scheutjes van de verschillende initiatiemedië gepoold: ze werden afgesneden, 'op één hoop gelegd' en vervolgens over de verschillende behandelingen verdeeld (minimaal 25 scheutjes per behandeling).
- Doorvermeerdering na een 'tussenkweek': Scheutjes van 0.5-2 cm lengte werden van het explantaat gesneden en gedurende 4 weken in vloeibaar medium gekweekt (de hele scheuten). Vanwege het besmettingsrisico waren er maximaal 5 scheutjes per erlenmeyer (30 ml medium in kolfje van 100 ml). Na 4 weken werden de scheutjes in plakjes gesneden als hierboven omschreven. Het vloeibaar tussenkweekmedium was standaard basismedium met 0.5 x MS (i.p.v. 1 x MS) met 5 μ M NAA en 15 μ M 2i-P.
- Er werden ongeveer 5 scheutjes per petrischaal gekweekt. Scheutjes groeiden sterk tijdens de tussenkweek; de 5 scheuten uit één kolfje werden dan over 2 petrischalen verdeeld. Petrischalen werden dicht getaped.
- Na 12 of 16 weken werd het aantal scheutjes > 0.5 cm per plakje geteld.

4.3 Resultaten

4.3.1 Effect van uitgangsmateriaal

Van verschillende factoren is onderzocht wat het effect was op de doorvermeerdering. Wat betreft de herkomst van de scheuten waarvan de plakjes gesneden werden was er weinig effect te zien. Noch de 'oogst' (Tabel 4.1), noch het initiatiemedium (Tabel 4.2) hadden een duidelijk effect. Er lijkt wel een effect van de lengte van het geregenereerde scheutje te zijn. Uiteraard kunnen van een lang scheutje meer plakjes gesneden worden maar het aantal scheutjes dat per plakje gevormd werd was ook hoger (Tabel 4.3).

Tabel 4.1. Doorvermeerderen van scheuten van de vier verschillende oogsten Alleen de gegevens voor de doorvermeerderingsmedium met 5 μM NAA en 15 μM 2-iP zijn weergegeven.

	Apeld	Gander	Ad Rem	Yellow Fl.	Top Par.
1 ^e oogst	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.6	0.4 \pm 0.1	4.5 \pm 0.5
2 ^e oogst	2.7 \pm 0.6	0.6 \pm 0.5	2.9 \pm 1.4	0.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.5
3 ^e oogst	1.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3	1.6 \pm 0.5	1.0 \pm 0.3	2.8 \pm 0.3
4 ^e oogst	0.8 \pm 0.1	2.3 \pm 0.4	5.2 \pm 1.8	0.3 \pm 0.1	3.0 \pm 0.8

Tabel 4.2. Doorvermeerderen afhankelijk van het initiatiemedium waarop de uitgangsscheuten waren geproduceerd. Alleen de gegevens van de eerste oogst en doorvermeerderingsmedium met 5 μM NAA en 15 μM 2-iP zijn weergegeven.

	Apeld	Gander	Ad Rem	Yellow Fl.	Top Par.
NAA + ZEA + 3 JA	-	0.6 \pm 0.3	-	-	6.6 \pm 1.1
NAA + ZEA + 10 JA	-	0.6 \pm 0.4	-	-	3.6 \pm 0.7
NAA + ZEA + 30 JA	-	1.6 \pm 0.4	-	-	4.9 \pm 0.9
NAA + ZEA + 3/10/30 JA	0.9 \pm 0.2	-	-	-	-
2,4 D (alles gepoold)	0.9 \pm 0.2	3.1 \pm 1.0			2.8 \pm 0.8

Tabel 4.3. Resultaten met scheutjes die op 15 μM 2-iP, 15 μM ZEA of 30 μM 2-iP geregenereerd waren. De resultaten zijn onderscheiden naar korte scheutjes (opgesneden in 7 plakjes of minder) en lange scheutjes (opgesneden in meer dan 7 plakjes). (cultivar Gander)

	15 μM 2-iP		15 μM ZEA		30 μM 2-iP	
	lang	kort	lang	kort	lang	kort
# opgesn scheutjes	18	7	11	5	4	16
# plakjes	177	44	118	30	33	89
# gereg scheutjes	425	38	140	10	35	112
gemiddeld per plakje	2.4	0.9	1.2	0.3	1.1	1.3
gemiddeld per scheutje	23.6	5.4	12.7	2.0	8.8	7,0

Tabel 4.4. Doorvermeerderen bij verschillende doorvermeerderingsprocedures.. Alleen de gegevens van de eerste oogst worden weergegeven. De voorbehandeling tijdens de initiatie zijn geward.

	Apeld	Gander	Ad Rem	Yellow Fl.	Top Par.
5NAA + 15 2-iP	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.3	2.2 ± 0.6	0.4 ± 0.1	4.5 ± 0.5
5NAA + 15 2-iP (eerste 4 weken vloeibaar)	2.2 ± 0.5	3.0 ± 1.0	5.8 ± 0.9	0.1 ± 0.1	10.4 ± 1.2
5 2,4-D + 15 2-iP (na 3 weken 15 2-iP)	4.2 ± 0.8	4.4 ± 1.3	4.9 ± 0.5	0.4 ± 0.2	1.8 ± 0.6

Tabel 4.5. Doorvermeerdering afhankelijk van een tussenkweek (tkwk) in vloeibaar medium. Scheuten werden geïnitieerd op medium met of zonder 30 µM 2-iP. In het geval van Gander werden scheuten geïnitieerd met of zonder 3 µM JA. De scheutjes werden ofwel direct doorvermeerderd of na 4 weken tussenkweek op de aangegeven media.

	Gander + JA	Gander - JA	Hollandia	Ad Rem	Sevilla
Geen tussenkweek	4.4 ± 1.0	1.2 ± 1.0	4.3 ± 1.1	2.3 ± 1.1	7.6 ± 1.5
Tkwk in 1 MS	9.9 ± 1.2	0.9 ± 0.4	10.3 ± 2.7	5.9 ± 1.9	12.3 ± 2.1
Tkwk in 1 MS + Paclo	5.4 ± 1.9	0.4 ± 0.2	7.0 ± 2.2		13.4 ± 2.1
Tkwk in 0.5 MS + Paclo	6.0 ± 1.7		7.2 ± 2.0		

4.3.2 Effect van doorvermeerderingsprocedure

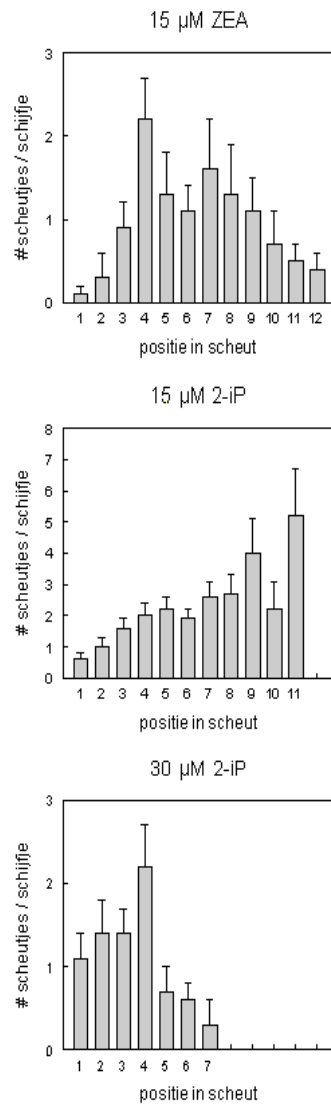
Er was een duidelijke effect van de doorvermeerderingsprocedure. Als direct werd doorvermeerderd gaf medium met 2,4-D meestal betere resultaten (Tabel 4.4). Interessant was dat een tussenkweek in vloeibaar medium eveneens meestal een positief effect had (Tabel 4.4). De tussenkweek werd daarom in meer detail onderzocht. Hierbij bleek opnieuw dat de tussenkweek een positief effect had (Tabel 4.5) maar dat effect hing waarschijnlijk samen met het langer worden van de scheutjes (zie Tabel 4.3). Tijdens de kweek in vloeibaar medium werden de scheuten namelijk meestal langer zoals te zien aan het aantal schijfjes dat van ieder plakje kon worden gesneden (Tabel 4.6). De toename van het aantal geregenereerde scheutjes per oorspronkelijk scheutje nam in dit experiment ongeveer in de zelfde mate toe als het aantal schijfjes dat gesneden kon worden.

4.3.3 Positie in de scheut

Het is bekend dat weefsels uit verschillende posities in een scheut een verschillende

Tabel 4.6. Aantal plakjes dat gesneden kon worden per uitgangsscheut in het experiment van Tabel 4.4.

	Gander + JA	Gander - JA	Hollandia	Ad Rem	Sevilla
Geen tussenkweek	6.5	9.4	5.6	6.8	8.6
Tkwk in 1 MS	19.0	10.0	10.0	11.4	11.2
Tkwk in 1 MS + Paclo	9.9	9.2	8.7		10.9
Tkwk in 0.5 MS + Paclo	9.9		10.3		



Figuur 4.1. Regeneratie van scheutjes uit plakjes afkomstig van verschillende posities in de uitgangsscheut. Alleen posities waarvan er minstens 5 waren zijn in de berekeningen meegenomen. De scheutjes waren geregenereerd met 15 μM ZEA, 5 μM 2-iP of 30 μM 2-iP. Positie 1 is het onderste plakje.

regeneratiecapaciteit hebben. Dit geldt ook voor plakjes gesneden uit scheutjes (Fig. 4.1.) De plakjes reageerden slechter zowel als ze van onder als boven in de scheut afkomstig waren. In het grote experiment is vanwege de standaardisatie voor de onderste 5 plakjes gekozen. Vooral bij de lange scheutjes zijn op deze wijze een groot aantal scheutjes ‘mislagen’ (50% of meer; Tabel 4.7).

Tabel 4.7. Verdeling van de regeneratie in een scheutje. De uitgangsscheutjes waren geregenereerd met 15 μM 2-iP, 30 μM 2-iP of 15 μM ZEA. Aangegeven worden het aantal scheutjes gevormd in de onderste 5 plakjes en in de overige plakjes. Omdat de scheutjes bij 15 μM 2-iP het langste waren en er daar dan ook meer overige plakjes waren is het aantal scheutjes uit de overige plakjes dan ook veel groter. Aangegeven zijn ook het regeneratie percentage en het aantal scheutjes per schijfje. Het experiment is uitgevoerd met de cultivar Gander.

		15 μM 2-iP	15 μM ZEA	30 μM 2-iP
aantal uitgangsscheutjes		25	16	20
aantal geregenereerde scheutjes per scheut	onderste 5	7,5	4,8	6,7
	overige	10,6	4,6	0,7
regeneratie%	onderste 5	42	51	90
	overige	58	49	10
gemiddeld # scheutjes per schijfje	onderste 5	1,5	1	1,3
	overige	2,9	1,1	0,6

4.3.4 Effect van entdichtheid

Een puls met 2,4-D zou mogelijk beter zijn dan continue cultuur met 2,4-D. Een puls kan nagebootst worden door de entdichtheid te verhogen (Tabel 4.8). Met name auxines worden snel opgenomen door de explantaten. Door een hoge dichtheid van explantaten raakt het medium daardoor relatief snel uitgeput wat betreft 2,4-D en wordt er in feite dus een 2,4-D puls gegeven. Bij Strong Gold en Gander is een hogere entdichtheid positief en bij Apeldoorn juist negatief. Opgemerkt moet worden dat er bij Apeldoorn veel callus ontstond, met name bij 10 μM 2,4-D.

4.3.5 Effect van herhaaldelijk medium verversen

Mogelijk is de matige vermeerdering bij doorvermeerdering het gevolg van het opraken van specifieke mediumcomponenten. Daarom werd onderzocht wat het effect is van herhaaldelijk overzetten. Dit blijkt juist een negatief effect te hebben (Tabel 4.9.). Dit kan veroorzaakt zijn doordat bij extra overzetten naar vers medium bepaalde mediumcomponenten juist zo veel opgenomen kunnen worden dat ze nu remmend werken of doordat het plakje op de een of andere manier het medium conditioneert.

Tabel 4.8. Effect van de entdichtheid van plakjes (25 of 50 plakjes per petrischaal) op de vermeerderingsfactor. (gegevens SBW).

		# plakjes per petrischaal	Vermeerderingsfactor
Strong Gold	3 μM 2,4-D	50	6.6
		25	4.6
	10 μM 2,4-D	50	7.7
		25	4.2
Apeldoorn	3 μM 2,4-D	50	2.0
		25	2.6
	10 μM 2,4-D	50	0.6
		25	3.2
Gander	1 μM 2,4-D	50	3.0
		25	0.4

Tabel 4.9. Effect van herhaaldelijk overzetten tijdens doorvermeerderen bij de cultivar Strong Gold. Het medium was 5 μM NAA en 15 μM ZEA.

	Aantal scheutjes per initiële scheut
Geen overzetting naar vers medium	1.4 \pm 0.3
Na 6 weken overgezet naar vers medium	0.6 \pm 0.2
Iedere 2 weken naar vers medium	0.5 \pm 0.1

4.3.6 Groot doorvermeerderingsexperiment: JA en temperatuur(PPO)

In de tweede helft van het project is een groot doorvermeerderingsexperiment gedaan, waarin behalve naar de doorvermeerdering, ook naar het effect van enkele factoren werd gekeken. Hier worden de resultaten van PPO en die van SBW en VZR weergegeven. PPO onderzocht het effect van de aanwezigheid van jasmonzuur tijdens de doorvermeerdering en het effect van wisseltemperaturen.

Jasmonzuur werd onderzocht omdat eerder gevonden was dat de aanwezigheid van jasmonzuur een zeer positief effect had op het aantal en het percentage ‘goede’ scheuten (=scheuten met een meristeem; zie algemene inleiding). In Tabel 4.10. wordt het resultaat na drie doorvermeerderingscycli weergegeven. In de derde cyclus werden alle scheutjes (dus niet alleen de scheutjes > 0.5 cm) geoogst, op bolvormingsmedium gezet en gescoord. De bolvormingsgegevens staan in het volgende hoofdstuk (Tabel 5.2). Het aantal gevormde scheuten per initiële scheut nam af met de concentratie jasmonzuur. Tevens valt het grote verschil tussen cultivars op, waarbij Hollandia nauwelijks vermeerdering te zien gaf. Dit is opvallend omdat bij de initiatie Hollandia niet extra slecht presteerde. Ook in het experiment in 4.12 presteerde Hollandia beter.

In Tabel 4.11. staan de gegevens van het experiment waarin de doorvermeerderingstemperatuur werd gevarieerd. Er was geen consistent effect van de temperatuurbehandelingen over de cultivars heen. In het algemeen is de vermeerdering minder dan in het experiment met jasmonzuur maar dit kwam doordat er minder cycli waren. Bovendien is de hormoon behandeling (1 week met 2,4-D, daarna overzetten naar medium zonder auxine)

Tabel 4.10. Aantal scheuten gevormd per initiële scheut (=scheut op het bloemstengelschijfje na de initiatie) na 3 cycli doorvermeerderen van de eerste golf scheuten en inclusief doorvermeerderen voor 2 cycli van de latere golven. Tijdens de doorvermeerdering was jasmonzuur in oplopende concentraties aanwezig. Van de ingezette plakjes werden scheuten geoogst en vervolgens werden de plakjes weer teruggezet op vers medium. Daarna werden opnieuw scheuten geoogst. Het aantal oogsten per plakje was maximaal 4. Bij de laatste cyclus werden ook scheutjes kleiner dan 0.5 cm meegeteld. Het medium was standaard medium met 5 μM NAA, 15 μM ZEA en toenemende concentraties jasmonzuur.

	Strong Gold	Gander	Hollandia
0 μM JA	39.5	24.5	1.4
0.01 μM JA	58.6	24.0	1.9
0.1 μM JA	46.2	12.0	1.3
1 μM JA	20.5	10.2	0.3
3 μM JA	13.3	12.8	0.1
10 μM JA	1.8	10.0	0.1

Tabel 4.11. Het aantal scheuten gevormd per initiële scheut (=scheut op het bloemstengels explantaat na de initiatie) na 2 cycli doorvermeederen. Het temperatuur regime werd gewijzigd. Van de ingezette plakjes werden scheuten geoogst en vervolgens werden de plakjes weer teruggezet op vers medium. Daarna werden opnieuw scheuten geoogst. Het aantal oogsten per plakje was maximaal 2 en alleen scheutjes groter dan 0.5 cm werden meegeteld. Het medium was standaard medium met 5 μM 2,4-D met of 15 μM ZEA (Apeldoorn) of 0.5 μM BAP (Gander) waarna de plakjes overgezet werden naar medium met alleen 0.5 μM BAP. Voor Hollandia was het medium 5 μM NAA met 15 μM ZEA en werd niet overgezet.

	Apeld	Gander	Hollandia
4w 20 °C, 8 w 17 °C	5.0	3.6	1.9
8w 20 °C, 4 w 17 °C	6.5	2.5	4.2
4w 20 °C, 8 w 14 °C	1.3	0.2	0.1
8w 20 °C, 4 w 14 °C	3.0	0.6	5.7
12 w 20 °C	3.8	0.1	1.5
12 w 17 °C	5.3	0.1	0.6

waarschijnlijk ver suboptimaal (vergelijk het effect van de behandeling met 5 μM 2,4-D bij initiatie, Tabel 3.3 en 3.4). Relatief korte periodes met een wat lagere temperatuur leken in het algemeen positief. Ter illustratie is een foto van doorvermeerdering weergegeven in foto 4.1.

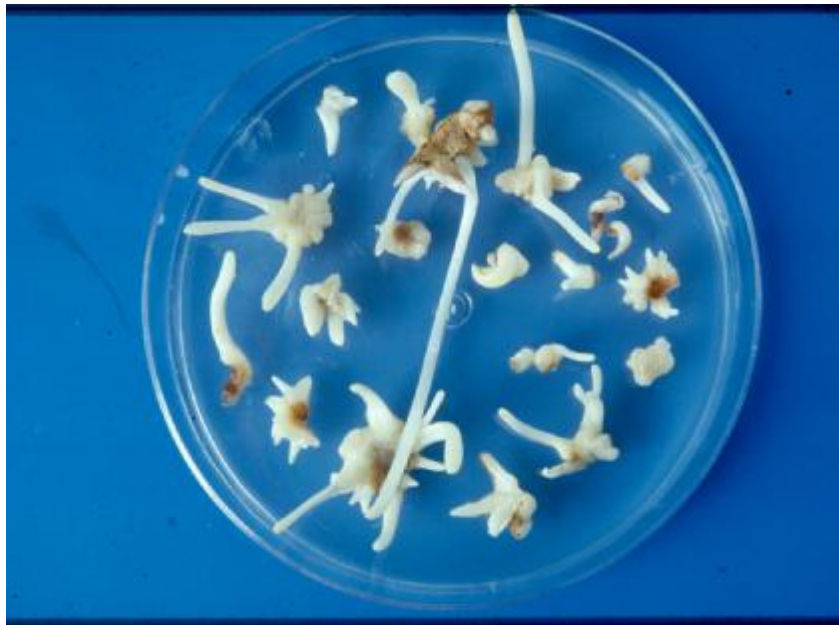


Foto 4.1. Doorvermeerdering van Gander via plakjes gesneden van scheutjes.

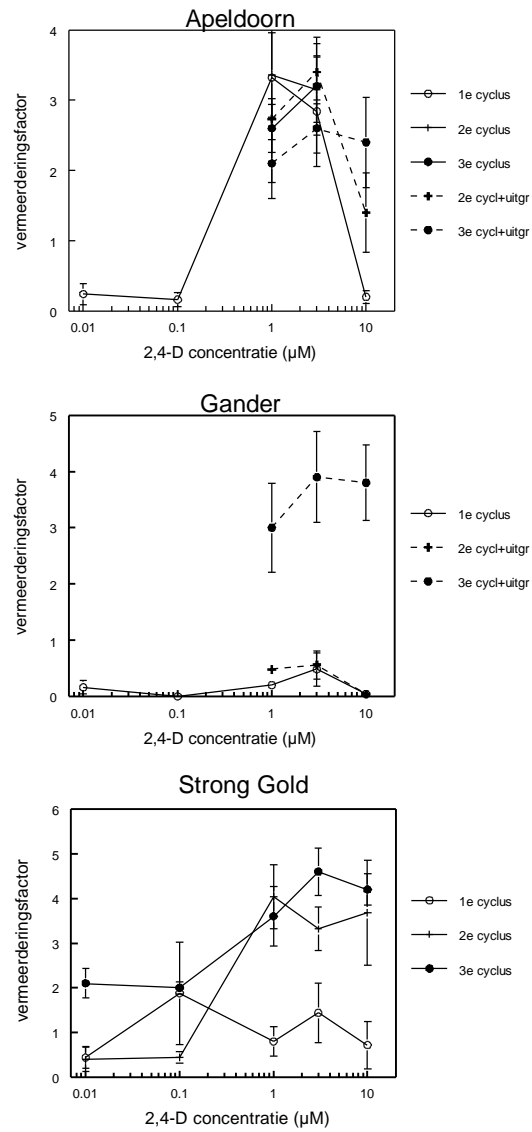
4.3.7 Groot doorvermeerderingsexperiment: 2,4-D zonder overzetten (SBW en VZR)

In Figuur 4.2 staan de resultaten van een experiment waarbij de scheuten drie cycli werden doorvermeerderd met 2,4-D. Het is duidelijk dat de vermeerdering met relatief hoge concentraties 2,4-D ($> 0.1 \mu\text{M}$) beter is dan met lage en dat de vermeerderingsfactor bij Apeldoorn constant hoog blijft en bij de andere twee cultivars, Strong Gold en Gander juist toeneemt.

In een ander experiment waarin tijdens de doorvermeerdering naar het effect van JA werd gekeken werd eveneens gevonden dat de vermeerderingsfactor bij doorvermeerderen constant bleef of toenam (Tabel 4.12). De lage JA-concentratie had een relatief positief effect (maar de controle van 2,4-D zonder JA ontbreekt). De behandeling met 2,4-D komt er weer als beste uit.

Table 4.12 Doorvermeerderen van tulp op verschillende media. Aangegeven zijn de resultaten van de eerste golf scheutjes (die drie maal is doorvermeerderd) en de tweede golf (die twee maal is doorvermeerderd). Aangegeven wordt de vermeerderingsfactor over de verschillende cycli. De lengtes van de cycli was enkele weken langer. (resultaten VZR)

	0.1 μM JA 0.1 μM 2,4-D 15 μM ZEA	0.1 μM JA 1.0 μM 2,4-D 15 μM ZEA	1.0 μM JA 0.1 μM 2,4-D 15 μM ZEA	1.0 μM JA 1.0 μM 2,4-D 15 μM ZEA	15 μM ZEA 5 μM NAA
Apeldoorn					
Vermeerdering van de eerste golf in 3 cycli	0	27.9	0	0	0.6
Vermeerdering an de tweede golf in 2 cycli	0	3,4	0	0	0.8
totaal	0	31.3	0	0	1.4
Hollandia					
Vermeerdering van de eerste golf in 3 cycli	0	4.1	0	0	2.2
Vermeerdering an de tweede golf in 2 cycli	0	4.4	0	0	7.5
totaal	0	8.8	0	0	9.7
Apeldoorn					
Vermeerdering van de eerste golf in 3 cycli	0	78.4	2.8	0	48.7
Vermeerdering an de tweede golf in 2 cycli	4,9	56.9	2.8	3.0	38.2
totaal	4,9	135	5.6	3.0	86.9



Figuur 4.2. Doorvermeerderen van Apeldoorn, Gander en Strong Gold op medium met de aangegeven concentratie 2,4-D. Er werd niet overgezet naar medium zonder 2,4-D m.u.v. Apeldoorn en Gander waarbij in de 2^e en 3^e cyclus de scheuten na 12 weken (ook) werden overgezet naar uitgroei medium zonder 2,4-D voor 12 weken. (resulaten SBW)

5 Bolvorming

5.1 Inleiding

Uitgangsmateriaal van bolgewassen geproduceerd in weefselkweek wordt bij voorkeur uitgeplant als bolletje en niet als scheut. Bolvorming kan ‘spontaan’ gebeuren, zoals bij lelie. Bij tulp wordt bolvorming geïnduceerd door een koude behandeling. Daarna worden de scheutjes verder geteeld bij een hoge temperatuur voor de bolgroei. Er zijn enkele experimenten gedaan.

5.2 Materiaal en methoden

Na de doorvermeerderingscyclus gaan de scheutjes naar bolvormingsmedium (standaard medium maar met 7% suiker i.p.v. 3% suiker). Ze werden 10 - 12 weken weggezet bij 5°C in het donker en vervolgens 12 weken bij 20°C in het donker zonder overzetten naar vers medium.

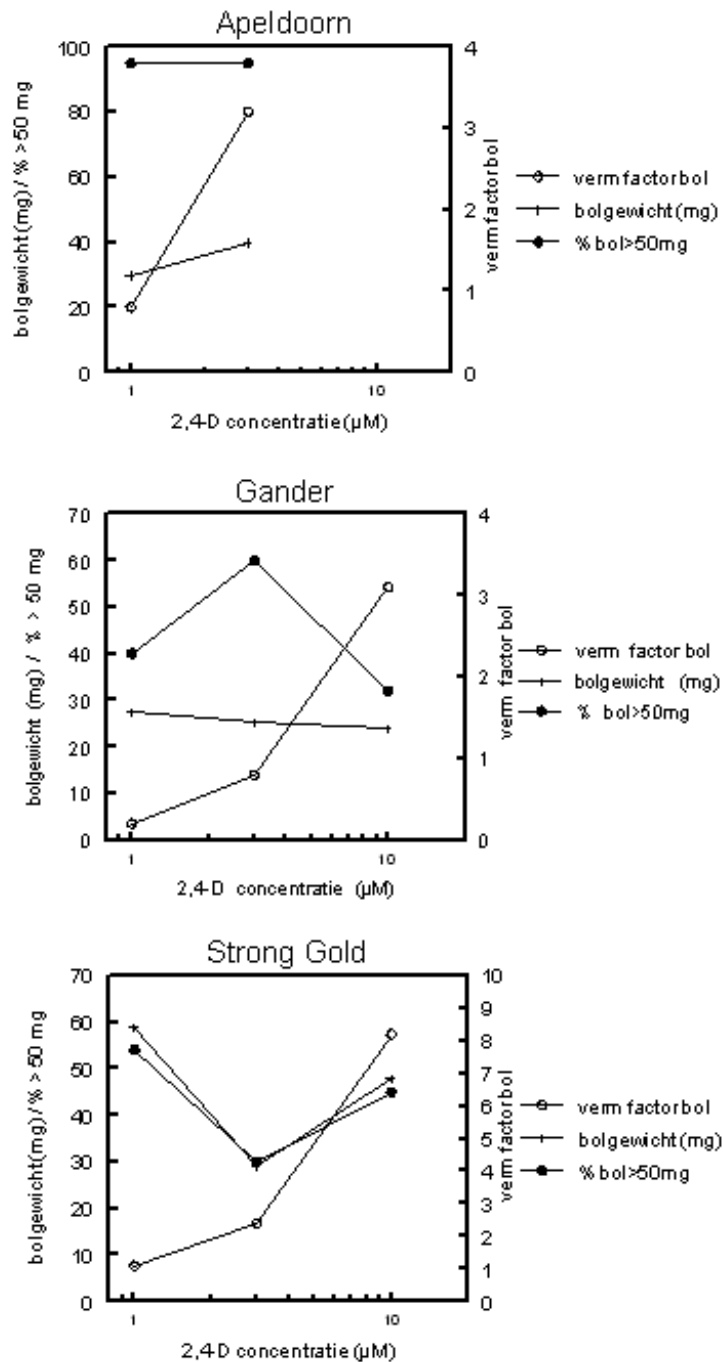
5.3 Resultaten

5.3.1 Effect van de vermeerderingscondities.

De verschillende geteste doorvermeerderingsomstandigheden hadden geen effect op het percentage dat bolletjes vormde en het gewicht van de bolletjes. Dat gold voor doorvermeerdering met NAA, 2,4-D en vloeibaar medium (Tabel 5.1.), doorvermeerderen met verschillende concentraties jasmonzuur (Tabel 5.2) en doorvermeerderen bij continu verschillende 2,4-D concentraties (Fig. 5.1).

Tabel 5.1. Doorvermeerderen (1 cyclus) en bolvorming bij verschillende doorvermeerderingsprocedures. Alleen de gegevens van de eerste oogst worden weergegeven. De voorbehandeling tijdens de initiatie zijn gewaard.

	Apeld	Gander	Ad Rem	Yellow Flight	Top Parrot
	# scheutjes / beginplakje				
5NAA + 15 2-iP	2.1	4.6	1.9	0.2	17.3
5NAA + 15 2-iP (eerste 4 weken vloeibaar)	4.2	9.7	1.5	0.1	40.5
5 2,4-D + 15 2-iP (na 3 weken 15 2-iP)	2.0	12.9	4.7	0.2	7.0
	# bolletjes / beginplakje				
5NAA + 15 2-iP	1.5	6.0	1.3	0.1	2.2
5NAA + 15 2-iP (eerste 4 weken vloeibaar)	2.7	11.6	0.7	0.1	1.0
5 2,4-D + 15 2-iP (na 3 weken 15 2-iP)	1.0	5.2	0.5	0.1	4.7



Figuur 5.1. Bolvorming bij scheutjes die bij verschillende 2,4-D concentraties waren doorvermeerderd. Weergegeven is het aantal bolletjes dat per ingezet scheutje gevormd is (verm. factor bol), het gemiddeld bolgewicht en het percentage bolletjes dat groter is dan 50 mg. De scheutjes van Gander hadden na de kweek met 2,4-D een uitgroei periode op medium zonder dit auxine (Resultaten SBW)

Tabel 5.2. Aantal bollen gevormd per scheutje dat op bolvormingsmedium was ingezet. De scheuten waren geproduceerd bij verschillende concentraties jasmonzuur. “Grote bollen” zijn bolletjes groter dan 50 mg.

	Strong Gold		Gander		Hollandia	
	Grote bollen	Kleine bollen	Grote bollen	Kleine bollen	Grote bollen	Kleine bollen
0 μM JA	0.08	0.19	0.16	0.62	0.13	0.41
0.01 μM JA	0.15	0.21	0.26	0.84	0.13	0.35
0.1 μM JA	0.10	0.16	0.19	0.69	0.18	0.43
1 μM JA	0.18	0.41	0.20	0.74	0.19	0.40
3 μM JA	0.06	0.40	0.10	0.56	0.17	0.53
10 μM JA	0.10	0.52	0.18	0.72	0.26	0.45

Er was geen duidelijk effect van het doorvermeerderingsmedium als er op dat medium enkele keren was doorvermeerderd maar de scheutjes afkomstig van de tweede golf scheuten leken beter te reageren (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Bolvorming van scheuten na 3 cycli vermeerderen Dit zijn de scheuten uit tabel 4.12. Alleen de resultaten met de beste 2,4-D en de NAA-behandeling zijn weergegeven (resultaten VZR)

		2,4-D medium	NAA-medium
Apeldoorn	1^e golf	37%	45%
	2^e golf	76%	70%
Hollandia	1^e golf	14%	31%
	2^e golf	37%	45%
Gander	1^e golf	66%	50%
	2^e golf	57%	62%

5.3.2 Effect van bolvormingsmedium

Hier werd alleen het effect van de concentratie suiker onderzocht (Tabel 5.4.) Het is opvallend dat toenemende suiker concentratie geen of nauwelijks effect heeft op het bolgewicht.

Tabel 5.4 Effect van suiker concentratie tijdens de bolinductie behandeling (12 weken bij 5 °C) en bolgroei periode (12 weken bij 20 °C) op bolvorming.

		Aantal bollen per explantaat		Totaal bolgewicht (mg)
bolinductie 12 wk 5°C	bolgroei 12 wk 20°C	groot +klein	Groot (>50 mg)	
3%	3%	7,7 ±1,4	3,5 ±0,8	688,3 ±192,4
3%	6%	10,6 ±2,3	4,0 ±1,0	776,0 ±154,6
3%	9%	9,6 ±1,5	2,5 ±0,7	742,7 ± 213,3
6%	3%	9,5 ±0,9	4,7 ±0,7	877,1 ± 145,0
6%	6%	9,5 ±1,3	4,7 ±0,8	1050,3 ± 220,7
6%	9%	7,4 ±1,0	3,8 ±1,0	771,5 ± 271,3
9%	3%	6,1 ±0,8	3,2 ±0,6	692,5 ± 149,0
9%	6%	11,0 ±2,4	4,0 ±1,0	783,6 ± 158,5
9%	9%	10,6 ±0,9	7,0 ±0,8	1404,5 ± 177,2
Controle (continu 6% zonder overzetten)		8,0 ±4,0	5,0 ±2,0	1144,5 ± 786,5

6 Uitplanten

6.1 Inleiding

Bij de periode na weefselkweek zijn verschillende zaken van belang. (1) Overleven de uitgeplante bolletjes? (2) groeien ze goed door? en (3) zijn er afwijkingen? In het huidige onderzoek is alleen gekeken naar spruiten en bolgroei.

6.2 Materiaal en Methoden

De bolletjes werden na een koude behandeling uitgeplant in houten kistjes (25 per kistje) die ingegraven werden in de volle grond in een gaaskas. Na een groeiseizoen werden ze gescoord.

6.3 Resultaten

6.3.1 Effect van gewicht bij uitplanten en cultivar

De opkomst van de bolletjes was ca 70% en gerelateerd aan de grootte van de geproduceerde bolletjes (Tabel 6.1.): bij bolletjes van 50 tot 100 mg was het percentage net boven 50% en bij bolletjes zwaarder dan 200 mg 80%. De opkomst was cultivarafhankelijk (Tabel 6.2). In Tabel 6.3. staan enkele groei gegevens met uitgeplante bolletjes verkregen. Opvallend is dat ook de groei in het veld cultivar afhankelijk is. De doorvermeerderingscondities hadden geen effect op de overleving.

Tabel 6.1. Opkomst na een groeiseizoen in het veld van bolletjes uit tabel 4.7.

	50 - 100 mg	100 - 150 mg	150 - 200 mg	200 - 250 mg	> 250 mg
# geplante bollen	454	139	57	32	38
Opkomst (%)	52	63	67	80	80

Tabel 6.2. Percentage doorgroeide bolletjes, over alle media

	gewichts-klasse (mg)	# geplante bollen	# overlevende bollen	Doorgroei (%)
Apeldoorn	<50	3	2	67
	50<x<100	94	44	47
	100<x<200	114	84	74
	>200	79	62	78
	totaal	290	192	66
Gander	<50	27	18	67
	50<x<100	292	184	63
	100<x<200	179	134	75
	>200	39	33	85
	totaal	537	369	69
Ad Rem	<50	4	2	50
	50<x<100	24	22	92
	100<x<200	34	26	76
	>200	35	34	97
	totaal	97	84	87
Top Parrot	<50	11	5	45
	50<x<100	35	19	54
	100<x<200	6	3	50
	>200	2	2	100
200<x<250	totaal	54	29	54

Tabel 6.3. Gewichtstoename na een seizoen in het veld.

	# geplante bollen	Overleving (%)	Vermeerderingsfactor	Bij uitplanten FW / bol (mg)	Bij oogst FW / bol (mg)	absolute groei (mg)	Relatieve groei (mg/mg)
Gander	172	68.6	1.2	113.5	339.1	225.6	2.1
Ad Rem	45	93.3	1.2	205.0	766.8	561.8	2.6
Apeldoorn	47	91.5	1.1	218.7	397.2	178.5	0.74
Top Parrot	17	52.9	1.0	59.0	69.0	10.0	0.2

Tabel 6.4. Opkomstpercentage van bolletjes in één groeiseizoen afhankelijk van het medium waarop ze doorvermeerderd zijn. NAA is vast medium met 5 µM NAA en 15 µM 2-iP; VM is vloeibaar medium met 5 µM NAA en 15 µM 2-iP; 2,4-D is vast medium met 5 µM 2,4-D en 15 µM 2-iP voor 1 week waarna de plakjes overgezet worden naar medium met 15 µM 2-iP.

	Gander			Apeldoorn			Ad Rem	
	NAA	VM	2,4-D	NAA	VM	2,4-D	NAA	VM
<50	61	0	88	88			50	80
50<x<100	61	61	73	73	27	20	95	100
100<x<150	72	75	91	91	68	17	65	100
150<x<200	68	83	100	100	82	83	100	100
200<x<250	86	40	100	100	67	100	100	100
>250	92	100	100	100	71	100	94	100
totaal	67	67	67	80	55	52	84	95

6.3.2 Effect van het vermeerderingsmedium

Wanneer bolletjes afkomstig van scheutjes geproduceerd via de verschillende onderzochte methodes werden uitgeplant, was er geen verband te zien tussen groei en overleven van de bolletjes met de vermeerderingscondities van de scheutjes (Tabel 6.4).

7 Vermeerdering via meristematische clusters

7.1 Inleiding

In het voorgaande onderzoek was een methode gevonden voor vermeerdering in vloeibaar medium via meristematische clusters. Voor dit deel van het onderzoek was de cultivar Apeldoorn gebruikt. In dit project is onderzocht of andere cultivars ook positief reageerden.

7.2 Materiaal en methoden

- Inzet: per bloemstengel bol werden 6 plakjes gesneden. Plakje 1 en 6 werden gebruikt voor bacterietoetsen (rijk en arm medium), de andere 4 plakjes werden met de niet-basale kant (dus “omgekeerd” op het medium ingezet op buizen met 50 μM 2,4-D en 5 μM 2iP, in donker bij 20° C. Na 4 weken werden de schone explantaten (blijkt uit bacterietoets) overgezet in petrischalen met hetzelfde medium en gedurende een half jaar werd het medium om de 4 weken verversd.
- Vloeibaar medium: gezonde stukken explantaat met callus werden overgebracht in kolfjes met vloeibaar medium (standaard medium + 10 μM 2,4-D + 5 μM BA) en gekweekt in donker bij 20°C op een schudder (80 rpm). Grote stukken weefsel werden in kleinere stukken gesneden. Per kolfje met 50 ml vloeibaar medium werd 1-3 gram weefsel gebracht. Hiervoor werd een van bijvoorbeeld 200-ml erlenmeijer genomen, omdat de verhouding tussen volume vloeistof en lucht en ook de hoeveelheid weefsel later van belang bleek te zijn (bruinwording). Medium wordt na 2 weken verversd door 35 ml oud medium uit het kolfje te halen en 35 ml vers medium toe te voegen (het is van belang dat er nog een bepaalde hoeveelheid oud medium aanwezig blijft).

Na 4 tot 6 weken werd de 2,4-D concentratie verlaagd (standaard medium + 2 μM 2,4-D + 5 μM BA) en om de 4 weken wordt het medium verversd. Bruine stukken werden geregeld verwijderd. Na verloop van tijd ontstonden er een soort gele knobbeltjes tussen het oorspronkelijke weefsel. Dit zijn de meristematische clusters. Deze werden doorvermeerderd of overgezet op uitgroeimedum.

- Uitgroeimedum: na 24 weken in vloeibaar medium werd materiaal overgezet op uitgroeimedum bij 20°C in donker. Hier groeiden de scheuten uit. De scheuten gingen vóór de bolvorming nog een aantal weken naar 15°C met licht om ze meer body te geven.
- Bolvorming: op bolvormingsmedium, 12 weken bij 5°C en 12 weken bij 20°C, donker.

7.3 Resultaten

7.3.1 Bacterietoetsen

Uit de toetsen bleek dat vrijwel alle bollen besmet waren (Tabel 7.1). Dat maakt deze methode moeizaam. Toch werden er niet-besmette cultures verkregen.

Tabel 7.1. Besmetting van bollen zoals getoetst op rijk en arm medium.

Besmet (volgens toets op arm medium)	Besmet (volgens toets op rijk medium)	Gander (# bollen)	Ad Rem (# bollen)	Apeldoorn (# bollen)	Strong Gold (#bollen)
-	-	2	3	1	4
+	-	1	0	5	1
-	+	2	4	2	2
+	+	23	23	19	24

7.3.2 Resultaten met verschillende cultivars

Uiteindelijk de meeste bolletjes gekregen bij Gander. Ook Yellow Flight, Hollandia en Strong Gold gaven wat bolletjes, maar veel minder dan Gander. Ter illustratie is een foto van meristematische clusters op uitgroei medium weergegeven in foto 7.1.

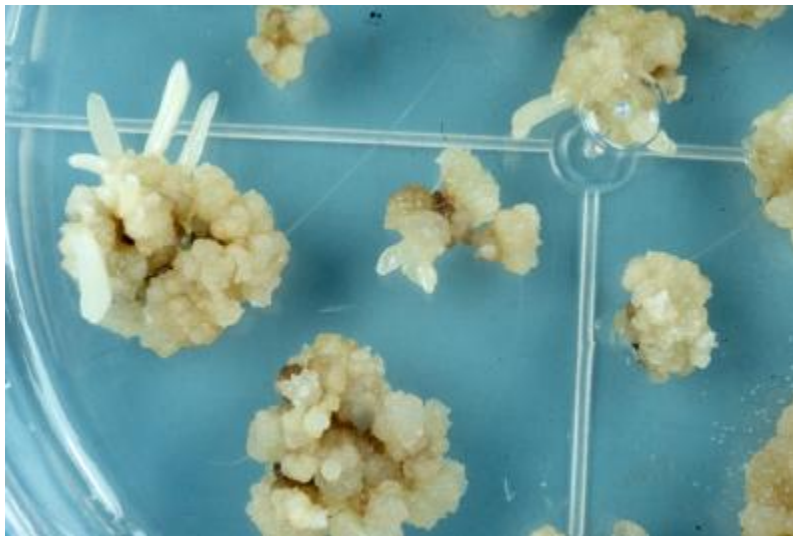


Foto 7.1. Vorming van scheutjes uit meristematische clusters op uitgroei medium.

8 Discussie, conclusie en perspectieven

8.1 De verschillende stappen in het protocol

8.1.1 *Initiatie*

Er werden schijfjes van jonge bloemstengels gebruikt. Een belangrijk probleem is dat de regeneratie uit deze schijfjes bij veel cultivars onvoldoende is. Het lijkt er op dat de meeste cultivars redelijk reageren op medium met 50 μM 2,4-D voor 2 weken waarna de scheutjes over gezet worden naar medium zonder 2,4-D. Dit geeft in het algemeen betere resultaten dan medium met NAA. De experimenten hieraan zijn echter beperkt geweest. De resultaten van de doorvermeerdering (waarbij ook scheutjes uit plakjes worden geregenereerd, maar dan plakjes gesneden van de adventieve scheutjes) doen vermoeden dat een behandeling met een hoge concentratie 2,4-D langer dan 2 weken beter is.

Er kunnen onder optimale omstandigheden bij de meeste cultivars per bloemstengel 20 – 60 scheutjes gevormd worden.

8.1.2 *Doorvermeerdering*

Er zijn verschillende procedures voor doorvermeerdering getest, waarbij de scheutjes steeds in plakjes gesneden werden. Continue kweek van plakjes op relatief hoog 2,4-D (3 μM) leek optimaal. Wederom leek deze procedure beter dan die met NAA. Een interessant fenomeen bij twee cultivars, Gander en Strong Gold was dat de scheutjes bij de hoge concentratie in de 2^e en 3^e cyclus een veel betere vermeerdering gaven dan in de 1^e cyclus. Er werd een vermeerderingsfactor van bijna 3 gehaald. Voor een optimale doorvermeerdering is het ook van belang dat de scheutjes lang zijn zodat er meer plakjes gesneden kunnen worden. Er moet opgemerkt worden dat in de “grote doorvermeerderingsexperimenten” alleen de onderste 5 plakjes zijn genomen en dat wanneer alle scheutjes waren genomen de vermeerderingsfactor ongeveer 6 zou zijn geweest.

Onder relatief optimale omstandigheden is bij de meeste cultivars per cyclus een vermeerderingsfactor van 3-10 mogelijk.

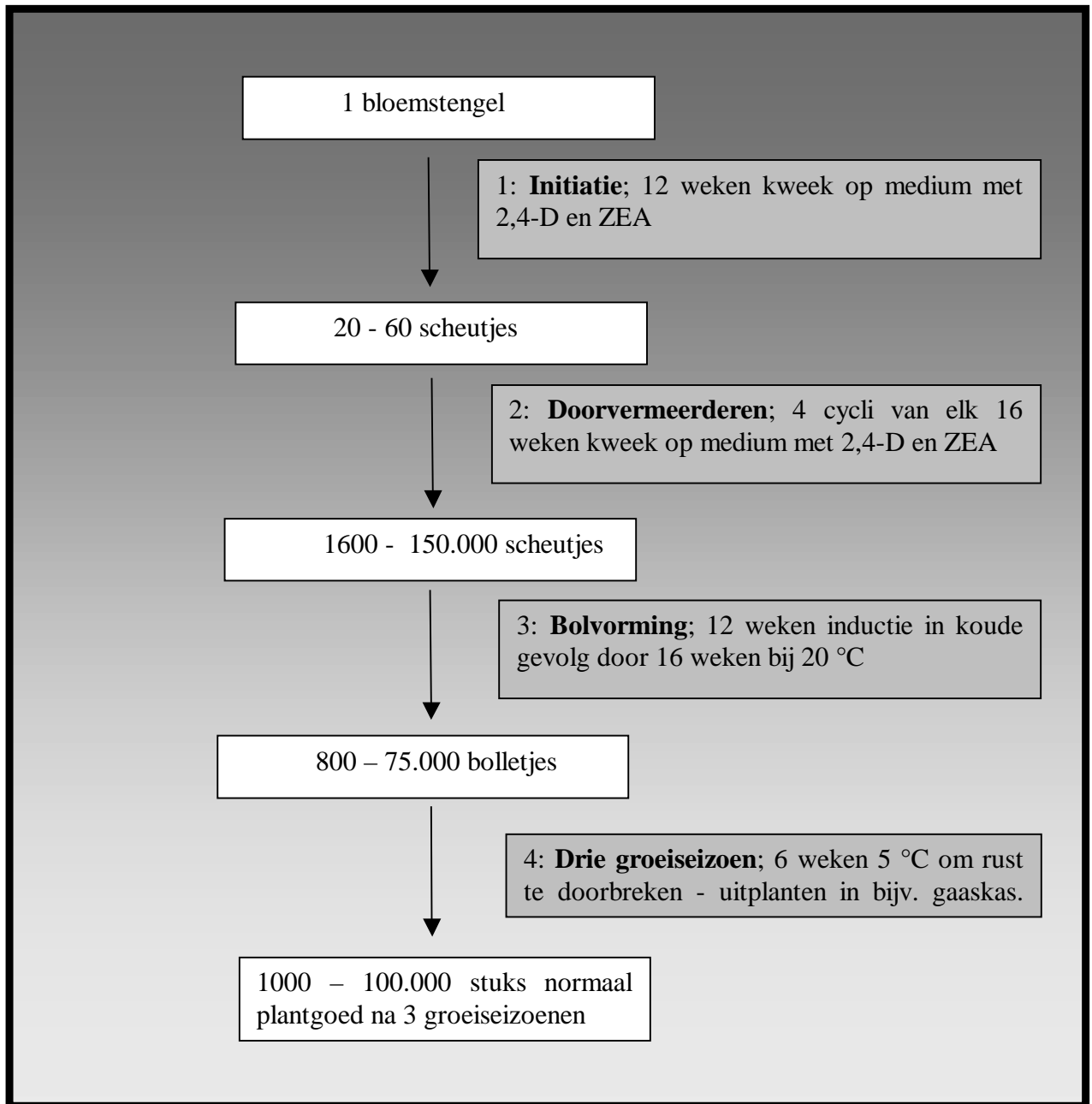
8.1.3 *Bolvorming*

Bolvorming vindt plaats maar heeft veel tijd nodig: de bolvorming moet eerst geïnduceerd worden tijdens een koude behandeling van 12 weken en daarna duurt de bolgroei nog eens 12 weken. Er is niet onderzocht of de bolvormingsinductie kan worden vervangen. De bolgroei werd niet bevorderd door toediening van extra suiker. Dit experiment was echter niet afdoende kritisch onderzocht: bij lelie is gevonden dat om de bolgroei te verbeteren niet alleen de suiker concentratie maar ook de MS concentratie verhoogd dient te worden.

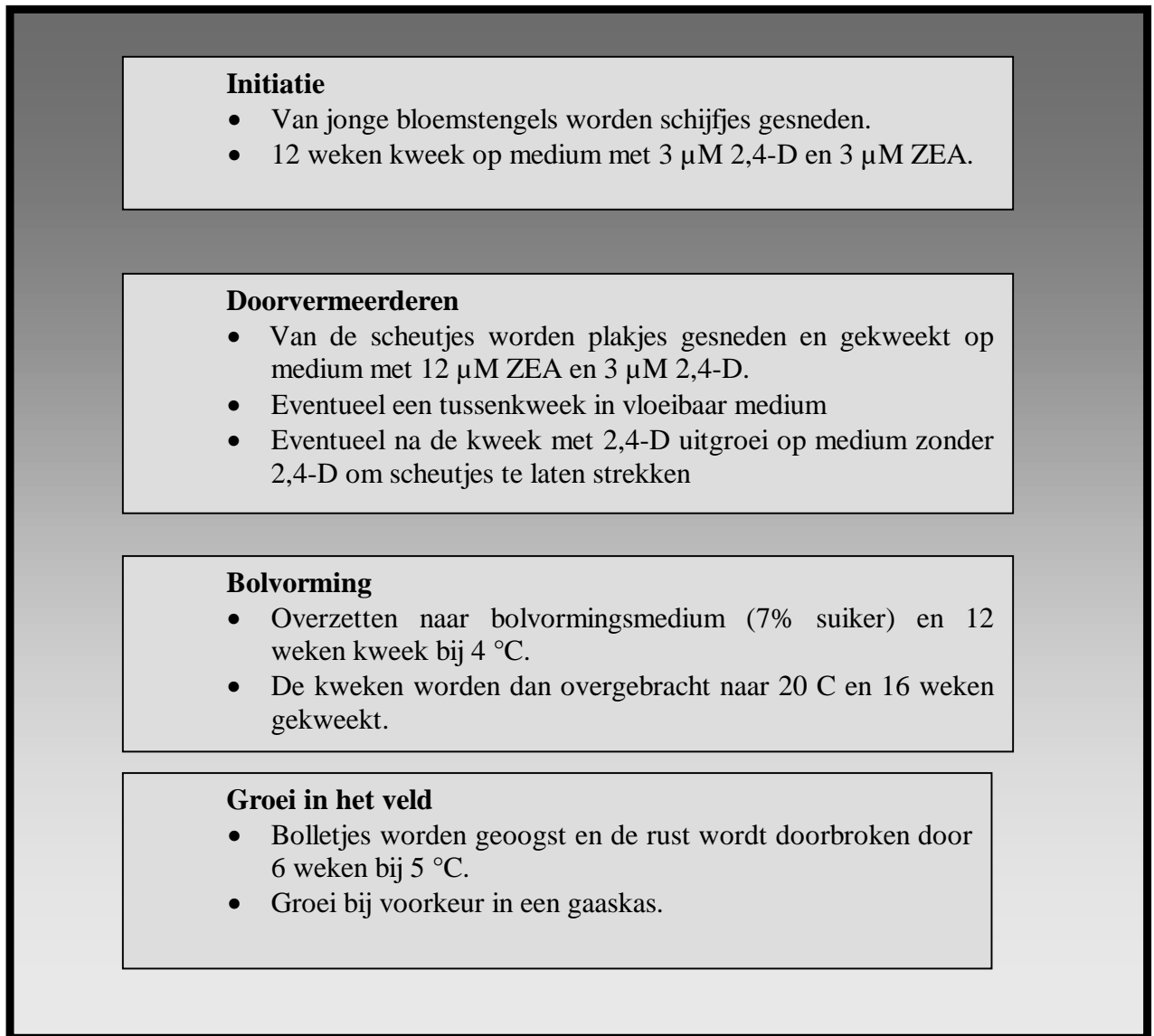
8.1.4 *Conclusie*

Een samenvattend protocol staat in Figuur 8.1a en b. Via dit protocol kunnen nu per bol in 2 jaar duizenden bolletjes geproduceerd worden bij vermeerderingsfactor van resp. 3 en 4. Vervolgens hebben deze bolletjes 3 jaar nodig hebben om tot normaal plantgoed uit te groeien en leveren dan tussen de 1000 en 100.000 bollen. De kostprijs per bol ligt echter nog boven 1 € (berekeningen dr. P. van der Linde, SBW). De berekende prijs per bolletje is nog te hoog om vermeerdering *in vitro* op grote schaal te gebruiken voor commerciële productie van bolmateriaal

in tulp. Echter, t.b.v. snelle vermeerdering van kruisingsmateriaal om een snellere beoordeling mogelijk te maken, is dit protocol goed en economisch verantwoord inzetbaar. Om het protocol ook beter renderend te maken voor commerciële productie zijn er nog diverse, veelbelovende aanknopingspunten om verschillende stappen in het proces te verbeteren zoals in 8.2 aangegeven.



Figuur 8.1a. Schema voor vermeerdering van tulp: rekenvoorbeeld van mogelijke cultivar. Gekozen is voor ca. 3 scheutjes per schijfje met 10 schijfjes uit een bloemstengel bij de initiatie en een vermeerdering van 2.5 per cyclus bij de doorvermeerdering, een bolvorming van ongeveer 50% en een beetje vermeerdering tijdens de drie jaar in het veld. Al deze aannames zijn voorzichtig en kunnen bij de meeste cultivars gehaald worden.



Figuur 8.1b. Detaillering van de procedure in Fig. 8.1a.

8.2 Perspectieven

8.2.1 *Initiatie*

- Het grootste probleem lijkt te zijn dat de regeneratie over verschillende genotypen een range heeft van slecht (minder dan 10 scheutjes gevormd per bloemstengel tot goed (meer dan 50 scheutjes per stengel). Geen van de geteste cultivars bleek 100% recalcitrant. Recalcitrantie van genotypen bij adventieve regeneratie (of het nu gaat om adventieve scheuten, wortels of embryo's) is een algemeen probleem. Het is nog onbekend wat hieraan te doen is. Bij adventieve scheut- en embryovorming is het bekend dat er slechts enkele genen betrokken zijn bij de recalcitrantie. De gegevens in dit verslag suggereren dat de beste behandeling continue cultuur op een relatief hoge concentratie 2,4-D is. Dit moet verder worden uitgediept.

- Besmetting is een probleem. Het effect van PPM (zie verslag vorige project) moet nader onderzocht te worden. Het is de vraag of het een groot probleem is bij nieuwe veredelingsproducten omdat veel besmetting waarschijnlijk komt doordat de bollen bij het (machinaal) oogsten licht beschadigd zijn geraakt en daardoor inwendig besmet.
- Om grotere scheutjes te krijgen zou ‘dubbele laag’ (vast agar medium met daarop een dunne laag vloeibaar medium) toegepast kunnen worden.

8.2.2 Doorvermeerderen

- In de huidige experimenten zijn de plakjes zorgvuldig gesneden en gepositioneerd. Er moet onderzocht worden of *choppen* (= in stukjes hakken) waarna de fragmenten in een container worden geschoven een optie is. Dit levert grote tijdsbesparing.
- Door de lengtegroei van scheutjes te bevorderen door een tussenkweek in vloeibaar medium worden meer plakjes verkregen terwijl de regeneratiecapaciteit per schijfje hetzelfde blijft. Mogelijk kan de lengtegroei ook bevorderd worden door het toedienen van een laag vloeibaar medium, de zgn. dubbele laag cultuur.
- Een groot deel van de plakjes reageert echter niet. Een mogelijkheid is dat de explantaten te klein zijn en daardoor te veel lijden onder stress (ze hebben o.a. een relatief groot wondoppervlak). Hiertoe zouden verschillende beschermende stoffen kunnen worden getest.
- Het effect van de hoge concentratie 2,4-D moet beter onderzocht worden. Op basis van onderzoek aan andere monocotylen moet bekeken worden of andere auxines mogelijk beter zijn.

8.2.3 Bolvorming

- De bolgroei werd niet beter door de suiker concentratie te verhogen. Bij lelie is gevonden dat de concentratie mineralen ook een belangrijke rol speelt en dat bij iedere concentratie mineralen een maximaal bolgewicht hoort.
- De bolvorming gebeurt op MS medium. Bollen hebben echter een andere element samenstelling dan scheuten en mogelijk moet de minerale samenstelling veranderd worden.
- De bolgroei heeft eerst een lange inductie nodig. Aan de hand van literatuur onderzoek moeten experimenten ontworpen worden om te bepalen of deze lange behandeling vervangen kan worden door een kortere behandeling (met plantengroei-regulators).

8.2.4 Uitplanten

- In eerder onderzoek bij lelie gevonden is gevonden dat ‘programmering’ van de bolletjes tijdens de weefselkweek mogelijk is. Dit had er mee te maken dat in lelie de overgang van het juveniele stadium naar het adult-vegetatieve stadium al in weefselkweek kon worden bewerkstelligd. Hiervoor zijn ook mogelijkheden bij tulp.
- In lelie is ook het effect van het rustniveau onderzocht. Hierbij kwam naar voren dat bolletjes ‘een beetje’ in rust kunnen zijn: ze spruiten wel maar de groei is dan matig. Bolletjes hebben een voldoende lange koude behandeling (= rustdoorbrekings-behandeling) nodig. Is deze behandeling te lang treedt er koudeschade op. Bij

kleine, minder robuuste bolletjes zou zo'n koudeschade een groot effect kunnen hebben. Een adequate koudebehandeling is mogelijk ook bij tulp van groot belang..

- Omdat de bolletjes teer zijn zou bescherming tegen de stress bij de koudebehandeling en bij uitplanten van belang kunnen zijn. Ook dit bleek in eerder onderzoek bij lelie bij enkele cultivars een belangrijke factor.
- Een belangrijke zaak is of er geen afwijkingen optreden. In voorgaand onderzoek bij Gander bleek dat weefselkweekplanten geen afwijkingen vertoonden en zelfs van een aanmerkelijk betere kwaliteit waren (betere groei) dan de controle groep van normaal vermeerderde planten. Deze tulpen waren echter niet doorvermeerderd: ze waren geïnitieerd op medium met het auxine NAA en vervolgens uitgeplant. Het is van belang om eventuele afwijkingen te checken bij tulpen die in weefselkweek zijn doorvermeerderd en waarbij het auxine 2,4-D is gebruikt.

8.2.5 *Tenslotte*

Het grootste probleem bij de start van dit project was dat doorvermeerdering niet goed liep. Door het gebruik van een hoge concentratie 2,4-D lijkt dit probleem opgelost. De kostprijs van tulp is nog hoog, meer dan 1 € Als de verschillende verbeteringen gunstig uit pakken, dan kan de prijs per bolletje tot ver beneden 1 € zakken.

9 Output

Lezingen en posters

- 13.01.2000: Studenten AH Den Bosch
16.03.2000: Jaarvergadering Stiverbol, Lisse.
29.09.2000: Vergadering Klankbordgroep 'Innovatie Siergewassenketens', Lisse.
12-15.10.2000: Bijeenkomst COST 843, Werkgroep I 'Developmental biology of regeneration'. Geisenheim, Duitsland.
08.12.2000: Symposium NVPW, Leiden.
08.01.2001: Studiekring KAVB, 't Veld.
17.01.2001: Studiekring KAVB, Egmond a.d. Hoef
15.03.2001: Jaarvergadering Stiverbol, Lisse.
11.10.2001: Programmadag Innovatie Siergewassenketens, Naaldwijk
02.11.2001: Breakfast Seminar Royal van Zanten, HortiFair, Amsterdam.
15.11.2001: Bijeenkomst oud bestuursleden plantaardige proefstations, Wageningen.
14.03.2002: Stiverbolvergadering, Lisse

Artikelen:

- Langens, M. en Paffen, A. (2001). Praktijktoeepassing weefselkweekvermeerdering dichterbij. *Bloembollencultuur* 112(26): 28-29. Tulpen uit weefselweek. *Oogst* 14(51/52): 53. *Vakwerk* 75 (52): 66
- Langens, M.M (2001). Progress in tissue culture techniques for propagation of tulips. *Flowertech* 4(8) : 22-24.

10 Afkortingen:

NAA: naphthaleneacetic acid
2,4-D: 2,-dichlorophenoxyacetic acid
BA: benzylaminopurine
ZEA: zeatine
2iP: 2-isopentanyladenine
JA: jasmonzuur
Pacl: paclobutrazol