

Vermeerdering tulp in weefselkweek: een werkbaar protocol

• TEKST : GEERT-JAN DE KLERK, WIM ROOK, ARJEN VAN VARK EN PIET VAN DER LINDE
 • FOTO'S : PPO

De veredeling van tulp gaat traag door de lange generatietijd en door langzame vermeerdering op het veld. Een veredelingsprogramma van tulp duurt al snel 25 jaar. Dit kan aanzienlijk verkort worden door vermeerdering in weefselkweek. Er is nu een werkbaar protocol.

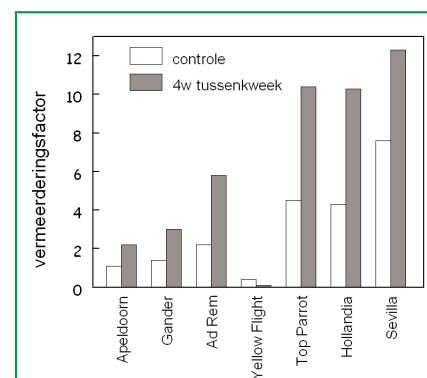
Er is continu vraag naar nieuwe rassen met andere vormen en kleuren en met minder negatieve impact op het milieu. Dit geldt ook voor tulp maar doordat het veredelingsproces traag is, kunnen verschuivingen in het assortiment maar langzaam plaats vinden. Tal van onderzoekers in binnen- en buitenland hebben geprobeerd om met behulp van weefselkweek de vermeerdering te verbeteren en daarmee het veredelingsprogramma te verkorten. Dit bleek moeizaam en de verwachtingen moesten keer op keer naar beneden worden bijgesteld. Enkele jaren geleden is door LBO/COWT in Lisse een protocol gepubliceerd dat voldoende mogelijkheden leek te bieden. Dit artikel gaat over het vervolgonderzoek. De nadruk lag op rasafhankelijkheid, doorvermeerderen en implementatie bij bedrijven. Voor een samenvatting van het resulterende protocol zie kader.

VLOEIBAAR MEDIUM

Foto 1 laat scheutjes zien die bij de initiatie-stap werden gevormd. Dunne 1-mm plakjes gesneden van deze scheutjes werden op vers medium geënt. Het merendeel van de plakjes reageerde matig: de scheutjes bleven klein en waren daardoor niet bruikbaar (zie foto 2). De doorvermeerdering werd een stuk verbeterd door voor opsnijden een tussenkweek in vloeibaar medium in te lassen. Deze procedure bleek bij veel cultivars goed te werken (zie grafiek 1). De verbetering had twee oorzaken. Tijdens de tussenkweek groeiden de scheutjes aanzienlijk en konden er daardoor meer plakjes gesneden worden. Het aantal scheutjes per plakje nam ook toe, mogelijk omdat de plakjes meer robuust waren (onder meer met een grotere diameter). Bij weefselkweek van lelie is dit fenomeen goed gedocumenteerd: uit

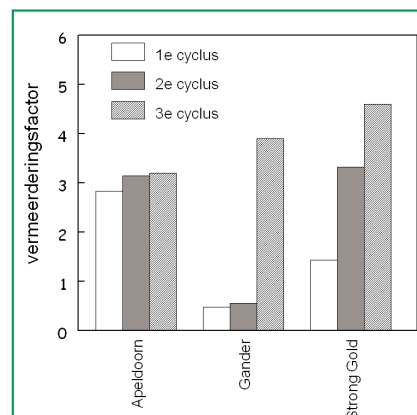


Foto 2 Doorvermeerderen van tulp. Scheutjes (bijv gevormd bij de initiatie, zie foto 1, of tijdens de doorvermeerdering) werden in plakjes van 1-mm gesneden die vervolgens op vers medium werden gekweekt. Er ontstaan veel kleine scheutjes.



Vermeerdering van een aantal tulpcultivars na een tussenkweek van 4 weken in vloeibaar medium. De scheutjes werden ofwel direct in plakjes gesneden of na 4 weken tussenkweek in vloeibaar medium. Het medium bevatte NAA en 2-iP als groeiregulators. De vermeerderingsfactor is het aantal scheutjes dat gevormd wordt per opgesneden scheutje.

Grafiek 1



Vermeerdering van tulp in 3 opeenvolgende cycli. In het medium was 5 µM 2,4-D en 15 µM 2-iP. Bij Apeldoorn en Gander kregen de scheutjes ook een uitgroefase op medium zonder het auxine. Hierna werden de scheutjes op bolvormingsmedium gezet. Dit gaf geen problemen.

Grafiek 2



Foto 1 Initiatie: Regeneratie van scheutjes op schijfjes gesneden van jonge bloemstengels. Het is overigens mogelijk dat de structuren die er uit zien als scheutjes eigenlijk (somatische) embryo's zijn.

kleine explantaten ontstaan kleine bolletjes en uit grote explantaten grote.

DOORVERMEERDEREN MET 2,4-D

Een groot probleem bij initiatie en doorvermeerderen is de rasafhankelijkheid: sommige rassen doen het goed en andere slecht. Dit geldt met name voor adventieve regeneratie, ofwel de vorming van scheuten uit weefsel dat zelf geen groeipunten heeft. Bij gebruik van 2,4-D in plaats van NAA (een andere groeiregulator van het auxine-type) was er minder rasafhankelijkheid terwijl bovendien de vermeerdering verbeterde. Zonder tussenkweek werd een vermeerderingsfactor van meer dan 3 gehaald (zie grafiek 2). Een groot percentage van de scheutjes vormde plantbare bolletjes maar er is geen onderzoek gedaan dit te verbeteren. Een tweede probleem was besmetting. Dit speelt echter naar verwachting bij nieuwe veredelingsproducten veel minder omdat veel besmetting waarschijnlijk veroorzaakt wordt door kleine beschadigingen tijdens het massaal (machinaal) verwerken van bollen. Daarnaast kan tijdens de kweek de ontsmettende stof 'PPM' toegediend worden. In voorgaand onderzoek bleek deze stof succesvol.

CONCLUSIE EN PERSPECTIEVEN

Met het hier beschreven protocol lukt het om per bol in 1,5 jaar 12.000

ADVENTIEVE SCHEUTVORMING

Planten kunnen uit lichaamcellen adventieve organen vormen, geheel nieuwe, goed functionerende scheuten, wortels en zelfs (somatische) embryo's. Bij het schubben van lelies ontstaan er op deze manier nieuwe bolletjes op de schubben. Bij stekken worden nieuwe wortels adventief op de stengels gevormd. In weefselkweek verloopt dit proces veel makkelijker. In 1957 publiceerden Skoog en Miller een klassiek artikel waarin ze lieten zien dat er bij een lage concentratie auxine en een hoge concentratie cytokinine uit tabaksweefsel scheutjes ontstonden. Was auxine hoog en cytokinine laag dan ontstonden er wortels. Waren ze allebei hoog, dan ontstond er callus. Adventieve orgaanvorming is een van de sleutelprocessen in de hedendaagse plantenbiotechnologie en wordt bij weefselkweek van tulp bij initiatie en bij doorvermeerdering toegepast. Over enkele nieuwe, algemene ontwikkelingen in het onderzoek wordt verwezen naar het artikel Organogenesis van G.J. de Klerk in The Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Academic Press, 2003. Een kopie is bij hem aan te vragen.

scheutjes te maken. In nog eens 24 weken kunnen hieruit 6000 bolletjes verkregen worden. Na drie jaar teelt in het veld (met enige extra vermeerdering) levert dit 10.000 bollen met de maat van normaal plantgoed. Deze schatting is voor een gemiddelde cultivar en is eerder voorzichtig dan optimistisch. Het blijft desalniettemin de vraag of het protocol commercieel haalbaar is gezien de vele stappen. Er zijn echter nog tal van mogelijkheden voor verdere verbetering. De in dit artikel beschreven verbeteringen, vloeibaar medium en 2,4-D, zijn bijvoorbeeld nog niet in combinatie geprobeerd. Tevens zijn er in recent

onderzoek nieuwe mogelijkheden ontdekt om de kleine plakjes minder kwetsbaar (en daardoor beter regenererbaar) te maken. Er zijn ook mogelijkheden om bolvorming en de groei na uitplanten aanmerkelijk te verbeteren.

Dr. Geert-Jan de Klerk is senior onderzoeker bij het Wageningen Tissue Culture Centre, Plant Research International, Wageningen; Ir. Wim Rook is onderzoeker bij Van Zanten Plants B.V., Rijsenhout; Ing. Arjen van Vark en Dr. Piet van der Linde zijn onderzoeker en directeur onderzoek bij SBW International BV, Roelofarendsveen. Het onderzoek werd deels bij PPO-Lisse uitgevoerd door Ir. Merel Langens en Ing. Annie Paffen. Dit deel is gefinancierd door het PT.

PROTOCOL VERMEERDERING TULP IN WEEFSELKWEEK

Stap 1: Initiatie

Na ontsmetting worden jonge bloemstengels in 1-mm schijfjes gesneden (ong. 10 per stengel) en op medium met 2,4-D (een auxine) en zeatine (een cytokinine) gekweekt. Er ontstaan per bol 20-50 scheutjes die na ongeveer 12 weken geogst kunnen worden (zie foto 1).

Stap 2: Doorvermeerderen

De scheutjes worden in 1-mm plakjes gesneden die op medium met 2,4-D en 2-iP worden gekweekt. Per scheutje worden ongeveer 5 scheutjes van voldoende lengte (> 5 mm) gevormd (zie foto 2). Een tussenkweek voor opsnijden van 4 weken in vloeibaar medium is voordelig. Soms is een extra periode op uitgroefmedium (= medium zonder auxine) gewenst. De scheutjes kunnen weer opnieuw opgesneden worden in plakjes voor verdere vermeerdering of ze kunnen een bolvormingsbehandeling krijgen.

Stap 3. Bolvorming

De scheutjes worden overgezet naar bolvormingsmedium. Dit bevat geen plantengroeiregulators en extra suiker (7% i.p.v. 3%). Ze worden eerst 12 weken weggezet bij 4°C om bolvorming te induceren en vervolgens 12 weken bij 20°C voor bolgroei.

Stap 4. Uitplanten

De bolletjes krijgen een koudebehandeling om rust te doorbreken en worden uitgeplant in een gaaskas.