

# **Bruikbaarheid van het eerder in Lisse ontwikkelde tulp-weefselkweekprotocol**

Verslag van project PT-13892, WUR 3360130600;

**Geert-Jan de Klerk**

Plant Breeding Wageningen UR

## Inhoudsopgave

0. <b>Samenvatting</b> .....	3
1. <b>Waarom weefselkweekvermeerdering van tulp?</b> .....	4
<i>Vermeerdering van nieuwe rassen</i> .....	4
<i>Herstel van de groeikracht</i> .....	5
2. <b>Voorgaand weefselkweekonderzoek aan tulp</b> .....	7
<i>Eerder ontwikkeld protocol voor tulp</i> .....	8
3. <b>Het huidige project.</b> .....	12
<i>Methode Initiatie</i> .....	12
<i>Methode Doorvermeerderen</i> .....	14
<i>De resultaten: Initiatie</i> .....	17
<i>De resultaten: Doorvermeerdering</i> .....	21
<i>Conclusie</i> .....	23
4. <b>Waarom groeit tulp zo traag in weefselkweek tijdens stappen 1 en 2?</b> .....	24
<i>De vorming van nieuwe scheuten</i> .....	24
<i>De toename van het gewicht van scheuten</i> .....	26
5. <b>Hoe verder met weefselkweek tulp?</b> .....	28
<i>Modificatie van de gangbare methode</i> .....	28
<i>Geheel nieuwe methode</i> .....	29
6. <b>Literatuur</b> .....	31

## **0. Samenvatting**

De vegetatieve vermeerdering van tulp in het veld gaat traag. Dit geeft problemen bij de introductie van nieuwe rassen en leidt tot 'degeneratie' van tulp in het veld. Weefselkweekvermeerdering kan voor beide problemen de oplossing bieden. Tulp bleek echter een zeer 'lastig' gewas in weefselkweek. Er is bij COWT/LBO in Lisse in de jaren 90 van de vorige eeuw een protocol ontwikkeld dat evenwel niet of nauwelijks commercieel wordt toegepast. Het huidige onderzoek heeft als doel om de bruikbaarheid van dit protocol te testen en bottlenecks te identificeren. Het protocol lijkt inderdaad voor de meeste rassen onvoldoende. De bottlenecks bleken (1) te weinig regeneratie van nieuwe scheuten en (2) een zeer langzame doorgroei van de gevormde scheuten. Deze problemen lijken oplosbaar: achtergronden en ideeën hiervoor worden aangegeven.

## **1. Waarom weefselweekvermeerdering van tulp?**

De tulp is verreweg het belangrijkste bolgewas in Nederland. De tulpenbouw beslaat ong. 50% van het bollenareaal. De omzet van tulp op de Nederlandse veilingen was in 2010 € 230 miljoen. Tulp wordt vegetatief in het veld vermeerderd via dochterbollen. Per jaar worden 4 miljoen bollen geproduceerd. Ondanks dit grote aantal, is vegetatieve vermeerdering een (de?) Achilles' hiel van het tulpen vak. De conventionele veldvermeerdering presteert slecht wat betreft de introductie van nieuwgewonnen rassen en wat betreft de fysiologische en fytopathologische gezondheid van het geproduceerde materiaal ('degeneratie').

### *Vermeerdering van nieuwe rassen*

Zoals bij veel gewassen (siergewassen, voedingsgewassen als aardappel en banaan, bomen) zijn er bij tulp geen homozygote lijnen aanwezig. Bij de veredeling van deze gewassen worden gerichte kruisingen gemaakt waarna onder de nakomelingen goed-presterende individuen worden geselecteerd. Een tweede manier waarop veel nieuwe rassen gewonnen worden is de selectie van mutanten die in het veld zijn aangetroffen, "sporten". De geselecteerde kruisingsproducten/mutanten worden vervolgens vegetatief vermeerderd. Adequate vegetatieve vermeerdering is bij gewassen die op deze manier veredeld worden, dus inclusief tulp, uiteraard een absolute voorwaarde.

In tulp gaat vegetatieve vermeerdering evenwel zeer langzaam. Wanneer een nieuw ras gewonnen is, duurt het gemiddeld nog 25 jaar voordat hij op de markt gebracht kan worden. De eerste revenuen zijn er dus ook pas na 25 jaar. Voor veredelingsbedrijven is een dergelijk periode

erg lang, vaak te lang. Door de trage vermeerdering kan tulp niet snel aan nieuwe eisen van maatschappij (verbod op het gebruik van bepaalde gewassenbeschermingsmiddelen) en klant (nieuwe kleuren en geuren, nieuwe vormen) tegemoet komen. Vermeerdering in weefselkweek (micropropagation) is de voor de hand liggende oplossing van dit probleem omdat de snelheid in weefselkweek normaliter vele malen hoger is dan bij conventionele vermeerdering. Er moet hier al op het kosten-probleem gewezen worden: weefselkweekmateriaal is duur, veel duurder dan conventioneel geproduceerd materiaal. De strategie zou daarom kunnen zijn om enkele tienduizenden bolletjes in weefselkweek te produceren waarna ze enkele jaren conventioneel vermeerderd worden. Hiermee wordt de periode die voor de commerciële introductie van een nieuw ras nodig is gehalveerd. Een dergelijke strategie wordt momenteel bij andere gewassen toegepast. Een tweede belangrijke toepassing van weefselkweekvermeerdering bij veredeling van tulp is snelle vegetatieve vermeerdering van geselecteerde kruisingsproducten vroeg in het veredelingsproces om in een korte periode voldoende bollen te verkrijgen om hun prestatie met betrekking tot ziekteresistentie, kwaliteit van bloemen enz. te evalueren.

#### *Herstel van de groeikracht*

Na vele jaren conventionele vegetatieve vermeerdering in het veld neemt de groeikracht van een gewas vaak af. Weefselkweekvermeerdering kan de groeikracht herstellen. Dit betreft ten eerste fytopathologisch herstel. Bij generatieve vermeerdering is het zaad een barrière die de verspreiding van de meeste micro-organismen naar de volgende generatie verhindert. In conventionele vegetatieve vermeerdering worden de micro-organismen gewoonlijk overgebracht van de ene generatie naar volgende. Telers pakken

dit probleem aan met chemische bescherming (bijv. tegen luizen om de verspreiding van virussen te verhinderen) en door zieke individuen te verwijderen ('ziek-zoeken'). Als weefselkweek gestart wordt met virusvrije meristemen zal dit uiteindelijk in gezonde bollenvelden resulteren op voorwaarde dat herbesmetting langzaam is. Weefselkweekvermeerdering is dus opnieuw een absolute voorwaarde.

Er is bij langdurige veldvermeerdering ook verslechtering van de groei­kracht op fysiologisch niveau. Die wordt waarschijnlijk veroorzaakt door te weinig selectie van krachtige bollen voor vermeerdering. Weefselkweekvermeerdering kan de groei­kracht herstellen mogelijk doordat het de epigenetische status 'reset' (Bouman and De Klerk 2001; Smulders and de Klerk 2010).

## 2. Voorgaand weefselweekonderzoek aan tulp

De dringende behoefte aan een weefselweekvermeerderingsprotocol heeft onderzoek aan tulp gestimuleerd, maar dit heeft niet in een protocol geresulteerd dat routinematig in commercieel laboratoria kan worden gebruikt. Een van de tekortkomingen in veel onderzoek is dat er zeer veel aandacht is besteed aan de initiatie (het in weefselweek brengen). Aan de laatste stappen, bolvorming, rustdoorbreking en uitplanten is zelfs zo goed als geen onderzoek gedaan. De doorvermeerderingsstap werd stiefmoederlijk behandeld. Het is daarom nodig aan een oude wijsheid uit de weefselweekvermeerdering te herinneren: het succes van weefselweekvermeerdering hangt grotendeels af van het succes in stap 2, de doorvermeerdering. Als de productie in de initiatie stap verdubbeld wordt en er twee maal zo veel scheutjes gevormd worden, is het aantal uiteindelijk geproduceerde plantjes twee maal zo groot. Wordt bij de doorvermeerdering

	vermeerderingsfactor 1.5				vermeerderingsfactor 2				vermeerderingsfactor 4			
	5	10	20	40	5	10	20	40	5	10	20	40
<b>initiatie</b>	5	10	20	40	5	10	20	40	5	10	20	40
<b>1e cyclus</b>	8	15	30	60	10	20	40	80	20	40	80	160
<b>2e cyclus</b>	11	23	45	90	20	40	80	160	80	160	320	640
<b>3e cyclus</b>	17	34	68	135	40	80	160	320	320	640	1280	2560
<b>4e cyclus</b>	25	51	101	203	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
<b>5e cyclus</b>	38	76	152	304	160	320	640	1280	5120	10240	20480	40960
<b>6e cyclus</b>	57	114	228	456	320	640	1280	2560	20480	40960	81920	163840
<b>7e cyclus</b>	85	171	342	683	640	1280	2560	5120	81920	163840	327680	655360
<b>8e cyclus</b>	128	256	513	1025	1280	2560	5120	10240	327680	655360	1310720	2621440
<b>9e cyclus</b>	192	384	769	1538	2560	5120	10240	20480	1310720	2621440	5242880	10485760

Tabel 2.1. De effecten van verbetering van de initiatie (van 5 naar 40 dus met een factor 8) en de vermeerdering (van 1.5 naar 4 dus met een factor 2,7). Aangegeven is in welke cyclus het aantal van 1000 scheutjes (geel) en 10.000 scheutjes (blauw) wordt bereikt.

de factor verdubbeld, dan is bijv. na de 9<sup>e</sup> cyclus het aantal geproduceerde plantjes  $2^9 = 512$  (!! ) groter. Dit wordt aangegeven in tabel 2.1.

In de volgende secties, wordt het protocol dat in het weefselkweek laboratorium in Lisse is ontwikkeld benadrukt omdat dat het dichtst in de buurt van een werkbaar protocol komt. Ook in het Lissese onderzoek is de meeste aandacht naar de initiatie gegaan. Het belangrijkste probleem in de doorvermeerderingsstap is dat de geproduceerde spruiten met elke subcultuurcyclus kleiner en teerder worden. Dit probleem (dat ook in andere bolvormige gewassen) voorkomt is nooit onderzocht.

### *Eerder ontwikkeld protocol voor tulp*

Zoals bij andere bolgewassen, beslaat de procedure 4 stappen.

#### a. Stap 1: Initiatie

In het algemeen zijn er twee mogelijkheden: (1) Bij de meeste gewassen worden bestaande knoppen (eind- of okselknop) uit de moederplant gesneden, gesteriliseerd en overgebracht naar

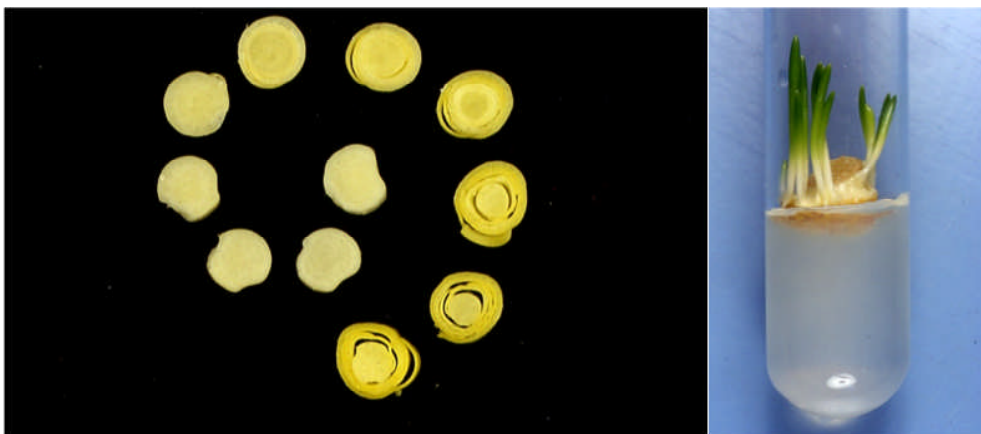


Fig. 2.1. Links: plakjes die van bloemstelen zijn gesneden; Rechts: regeneratie van spruiten na ca. 8 weken.



weefselkweekvoedingsmedium. Daar kunnen de knoppen groeien en vertakken. (2) Bij sommige gewassen wordt weefsel zonder bestaande knoppen genomen, gesteriliseerd en overgebracht naar het voedingsmedium om via de adventieve weg nieuwe knoppen te regenereren. Bij tulp hebben de meeste onderzoekers voor de tweede weg gekozen. Als startmateriaal worden 1-mm schijfjes van jonge bloemstelen genomen (Fig. 2.1) (Le Nard et al. 1987) of segmenten van bolrokken (Nishiuchi 1979). De bloemsteelschijfjes zijn geschikter aangezien bolrok explantaten vaak aan zware oxidatieve stress lijden (Van Rossum et al. 1997). De basale plaat die okselknoppen bevat, en oksel of apicale knoppen kunnen ook worden gebruikt (Ghaffoor et al. 2004).

b. Stap 2: Doorvermeerdering

In het protocol dat in Lisse is ontwikkeld (De Klerk 2005; De Klerk et al. 2005), worden de adventieve scheuten die in stap 1 zijn geproduceerd in 1-mm schijfjes gesneden en op deze schijfjes worden nieuwe adventieve scheuten geregenereerd (Fig. 2.2). Deze worden opnieuw in 1-mm schijfjes gesneden enz. Een vermeerderingsfactor van 2 per 12-16 weken kon worden bereikt (afhankelijk van het ras). Wanneer een tussenkweek van 4 weken in vloeibaar medium werd ingelast, kon de vermeerdering verdubbeld worden.



Fig. 2.2. Regeneratie van scheuten op schijfjes die van spruiten zoals die in Fig. 2.1 waren gevormd.

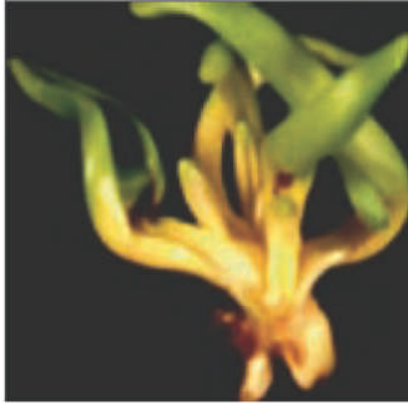


Fig. 2.3. Axillaire vermeerdering van scheuten die in Fig. 1 waren geproduceerd.

Een alternatieve benadering werd ontwikkeld door M. Podwyszyńska in Skierniewice, Polen. Zij verkreeg cyclisch uitlopen van okselknoppen van de spruiten die in stap 1 waren geproduceerd, gebruik makend van het cytokinine thidiazuron (Fig. 2.3). Zij bereikte een vermeerderingsfactor van 2 in 12 weken in 40% van de rassen die werden onderzocht.

c. Stap 3: De vorming van de bol

De spruiten kregen een koude behandeling (4 °C) van 12 weken om in het groeipunt van de scheuten een switch naar bolvorming te bewerkstelligen. Daarna ontwikkelden de bolletjes zich tot een voldoende grootte tijdens een groeiperiode van 12-16 weken bij 20 °C (Rice et al. 1983)

d. Stap 4: Doorbreken van rust en uitplanten

De bolletjes die bij stap 3 zijn verkregen, waren in rust en hadden een koude behandeling nodig om de rust te breken. Hiertoe kregen ze opnieuw een koude behandeling van 6 weken bij 4 °C. Vervolgens konden ze uitgeplant worden in de grond.

Het hele protocol staat nog eens in Figuur 2.4. De vraag was of dit protocol voldoende werkbaar was in commerciële vermeerdering en wat de zwakke schakel/schakels is/zijn. Daartoe werd een proefproductie gedaan in twee weefselkweekbedrijven.

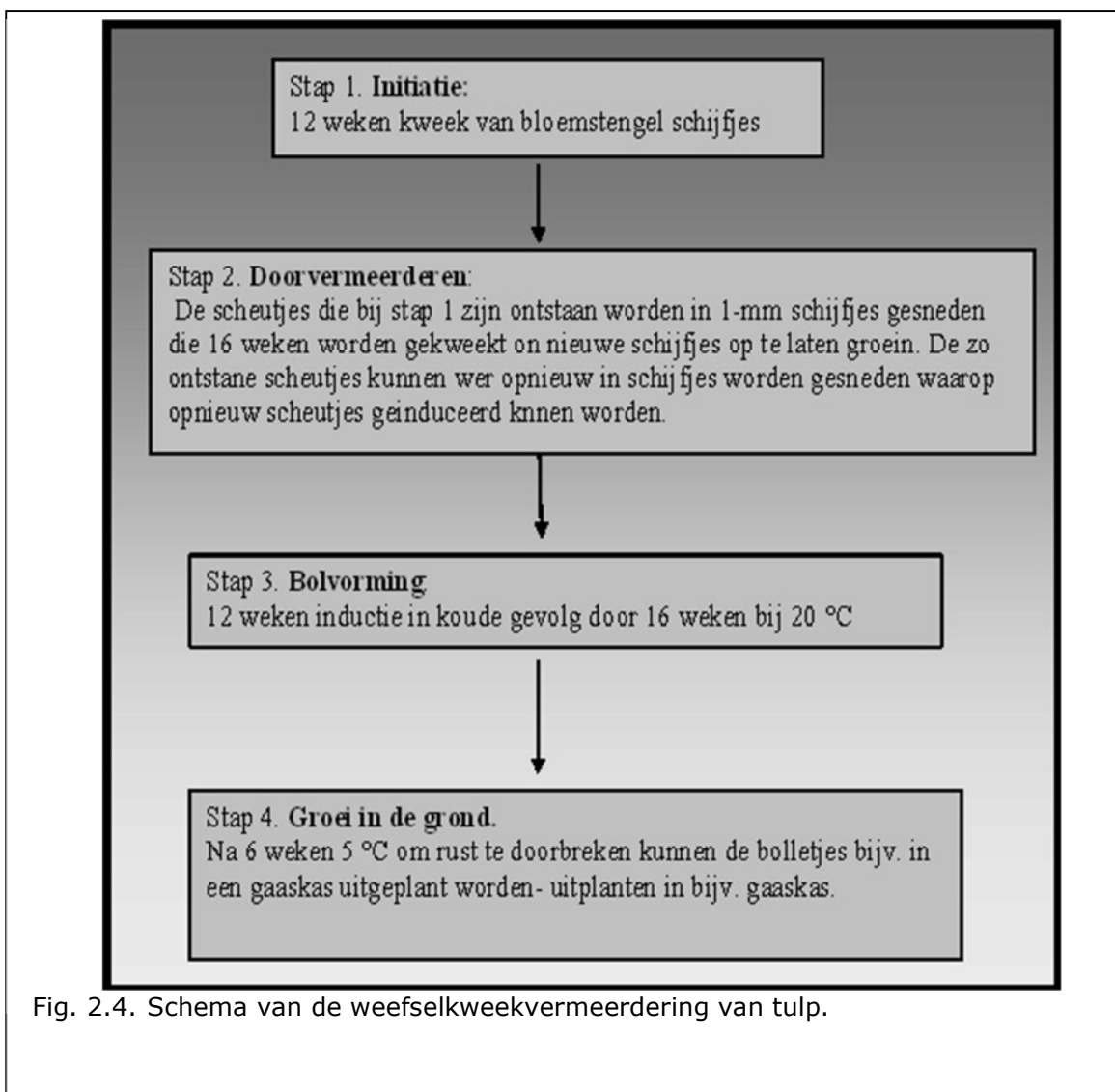


Fig. 2.4. Schema van de weefselkweekvermeerdering van tulp.

### **3. Het huidige project.**

Het laatste project aan weefselkweekvermeerdering van tulp was afgerond met de publicatie van het verslag (De Klerk 2005) en een artikel in Bloembollenvisie (De Klerk et al. 2005). Toepassing in de praktijk kwam niet van de grond ondanks enkele pogingen het schip vlot te trekken. Van de andere kant is er in de praktijk een duidelijke behoefte aan commerciële weefselkweekvermeerdering van tulp: de PRI-onderzoekers zijn talloze malen benaderd door tulpentelers en veredelaars over de stand van zake. Een bijkomend probleem bij PRI was dat de laboratorium-expertise vertrokken was en dat er nauwelijks in overdracht van laboratorium knowhow was voorzien. Om de impasse te doorbreken is een aanvraag gedaan bij PT om twee weefselkweekbedrijven (VZP in Rijsenhout en SBW in Roelofarendsveen) een opdracht voor een proefproductie toe te kennen om te zien of het bestaande protocol voldeed en welke van de opeenvolgende schakels de zwakste was. Er is voor het basis protocol gekozen zoals dat in het verslag van het laatste project is aangegeven (De Klerk 2005; De Klerk et al. 2005). De keuzes wat betreft plantenhormonen zijn in de tabellen aangegeven. Er is slechts een significant nieuwe procedure onderzocht, de *Temporary Immersion Bioreactor (TIB)* (Escalona 2006).

#### *Methodie Initiatie*

##### Preparatie bloemstengels (Fig. 3.1)

Er werden als startmateriaal bollen gebruikt die schoon waren en niet / zo-min-mogelijk beschadigd waren. De wortels werden verwijderd en de bollen werden goed afgespoeld. De bloemstengel werd uitgeprepareerd door de rokken weg te snijden. Een klein stukje van de bolbodem bleef aan het stengeltje zitten. Het topje van de bloemstengel (1-2 cm) werd verwijderd

als het bruin was en de stengeltjes werden goed afgespoeld met water. De stengeltjes werden 30 sec. in 70% ethanol gespoeld en vervolgens 30 min. gesteriliseerd in bleekwater (1% actieve stof) met een paar druppels Tween 20. Tijdens de 30 min. werd af en toe geschud. Daarna werden de scheutjes drie keer gespoeld met steriel demiwater. Per ras werden 15-20 bloemstengels ingezet. De rassen waren Leen van der Mark, Furand en Dokkum.



Fig. 3.1 Preparatie van de bloemstengel. Het stukje stengel rechts wordt gesteriliseerd en in plakjes gesneden.

### Medium

Het startmedium bestond uit Murashige-Skoog macro- en micro-elementen, sucrose (30 g/l), caseïne hydrolysaat (500 mg/l), verschillende vitamines (myo-inositol, 100 mg/l; nicotinezuur, 0.5 mg/l; pyridoxine-HCl, 0.5 mg/l; thiamine-HCl, 0.1 mg/l), Daichin agar (5,5 g/l), 50  $\mu$ M 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyazijnzuur) en 15  $\mu$ M Z (zeatine) en na 2 weken hetzelfde medium zonder 2,4-D maar met 15  $\mu$ M Z. De pH werd op 5.8 gesteld voor autoklaveren. Standaard buizen (14.5 cm hoog, 2 cm diameter) met platte

bodem werden gevuld met 15 ml medium. Per buis werd 1 schijfje gekweekt en de buizen werden getapet met huishoudfolie (1-1.5x rond).

### Inzetten

Het door bleekwater aangetaste stukje bolbodem werd verwijderd. Er werden schijfjes (explantaten) van ongeveer 1 mm dikte gesneden. De ringetjes blad die rondom de schijfjes zaten die gesneden waren uit de bovenkant van het stengeltje werden verwijderd. De reden hiervan is dat dit blad groeit en strekt en er geen scheutjes op worden gevormd. Van elk bloemstengeltje werden alle schijfjes tot het begin van de bloem ingezet behalve het meest basale plakje dat werd weggesneden na de sterilisatie. De schijfjes werden met de fysiologische onderkant op het medium gelegd (basaal).

### Cultuurcondities

De stengelschijfjes werden gedurende ongeveer 12 weken bij 20°C in het donker gekweekt. Het explantaat zelf groeide aanzienlijk en scheutjes ontstonden meestal aan de rand van het explantaat uit de subepidermale lagen. Stengelschijfjes konden uitvallen door endogeen (in het weefsel) aanwezige besmettingen. Na ongeveer 6 weken werden de eerste scheutjes zichtbaar.

### *Methode Doorvermeerderen*

#### Schijfjes:

De scheutjes werden van de explantaten losgesneden en in schijfjes van ongeveer 1 mm gesneden. De hele scheut werd opgesneden tot maximaal 10 schijfjes per scheutje (gerekend vanaf onder); de onderste mm en het topje werden niet genomen. De schijfjes werden 'basaal' geënt

(d.w.z. met de fysiologische onderkant op het medium). De doorvermeerdering gebeurde in hoge 9-cm Petri schalen; schijfjes van meerdere scheutjes werden in één Petri schaal gekweekt in het donker bij 20 °C (ong. 20 schijfjes per schaal). Per conditie waren er ong. 150 schijfjes.

### Media

Het basismedium was hetzelfde als bij de initiatie. Vanwege onduidelijke resultaten in het voorgaand onderzoek werden twee hormooncondities getest. Eveneens werden de effecten van een tussenkweek in vloeibaar medium en in *Temporary Immersion Bioreactor* onderzocht. De verschillende procedures waren:

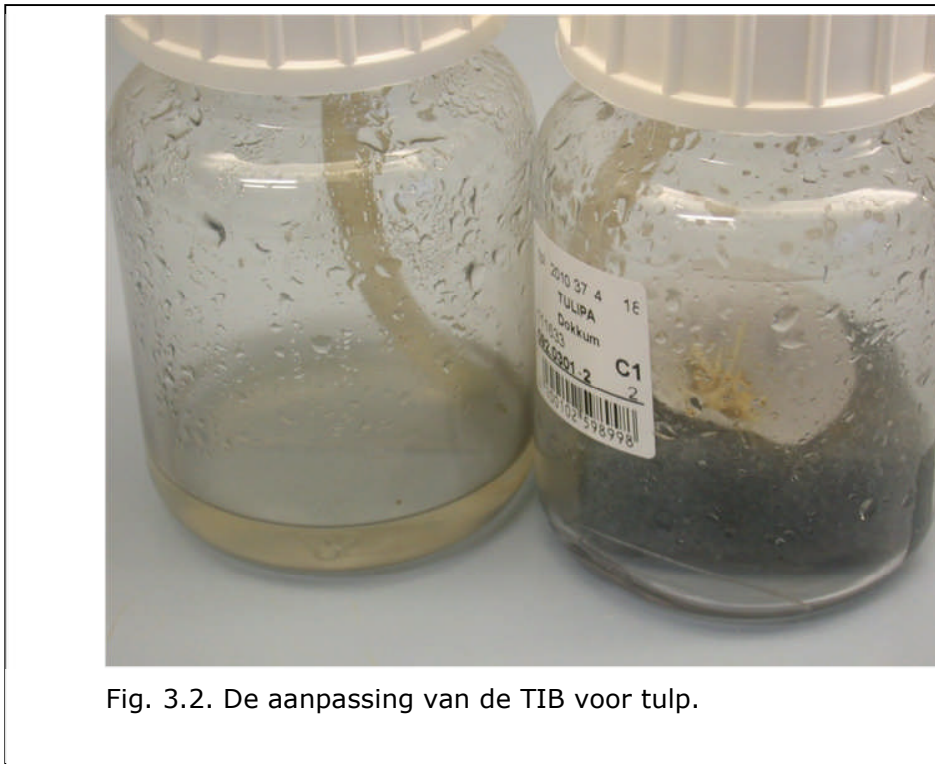
Procedure 1: Basismedium met 5  $\mu\text{M}$  2,4-D en 15  $\mu\text{M}$  2-iP. Na 3 weken werd overgezet naar medium met alleen 2-iP.

Procedure 2: Basismedium met 5  $\mu\text{M}$  NAA en 15  $\mu\text{M}$  2-iP.

Procedure 3: 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 maximaal 8 scheutjes per erlenmeyer (30 ml medium in kolfje van 100 ml). Na 4 weken werden de scheutjes in schijfjes gesneden en ingezet conform procedure 1. Het vloeibaar tussenkweekmedium was standaard basismedium met  $\frac{1}{2}$  MS (i.p.v. vol MS) met 5  $\mu\text{M}$  NAA en 15  $\mu\text{M}$  2-iP.

Procedure 4: TIB; Het vloeibaar tussenkweekmedium was standaard basismedium met  $\frac{1}{2}$  MS (i.p.v. vol MS) met 5  $\mu\text{M}$  NAA en 15  $\mu\text{M}$  2-iP. Het aantal keren per dag "op en neer" was 7. Voor TIB moesten de standaard TIB-condities aangepast worden. Normaal ligt het weefsel op de bodem maar de tulp scheutjes waren te klein en werden meegezogen bij het

verwijderen van het medium. Daarom werden ze op een soort schuimplastic gelegd (Fig. 3.2.)





### *De resultaten: Initiatie*

	<b>Besmetting (%)</b>
<b>LvdM</b>	11
<b>Furand</b>	26
<b>Dokkum</b>	32

Tab. 3.1. Besmetting 12 weken na initiatie. De meeste besmetting was van bacteriën. Alleen bij Leen van der Mark (LvdM) was 50% schimmels en de andere 50% bacteriën.

Ongeveer 6 weken na inzetten werden de eerste scheutjes zichtbaar. Na 12 weken werden besmetting (Tab. 3.1) en regeneratie (Tab 3.2) gescoord. De besmetting was niet te hoog. Als de cultures nog eens 14 weken bleven staan kwam er incidenteel besmetting bij behalve bij Dokkum waar de besmetting opliep tot boven 40%. Voor de daadwerkelijke vermeerdering is vooral het aantal grote scheutjes (hier gedefinieerd als > 3 mm) van belang. Bij Dokkum was dit aantal 25.9. Bij Leen van der Mark was het aanzienlijk minder (6.6) en bij Furand werden nauwelijks lange scheutjes gevormd (0.1). Er werd daarom besloten de initiatie te verlengen tot 26 weken (Tab. 3.3). Er waren nu aanzienlijk meer lange scheutjes per bol (42.3, 14.7 en 7.0 voor Dokkum, Leen van der Mark en Furand, resp.). Het aantal voor Furand bleef evenwel erg laag.

	% Regeneratie (per schijfje)			% Waterigheid (per schijfje)
	< 3 mm	> 3 mm	totaal	
<b>LvdM</b>	17.3	25.0	26.9	27
<b>Furand</b>	19.6	2.0	21.2	4
<b>Dokku m</b>	34.6	32.7	40.4	13

	Aantal scheutjes (per bol)		
	< 3 mm	> 3 mm	totaal
<b>LvdM</b>	4.1	6.6	10.7
<b>Furand</b>	8.1	0.1	8.3
<b>Dokku m</b>	18.0	25.9	43.9

Tab. 3.2. Regeneratie uit 12 weken oude scheutjes. In de bovenste tabel wordt de regeneratie per schijfje aangegeven als percentage van het totaal aantal schijfjes. Verder wordt de waterigheid aangegeven als percentage schijfjes met waterige scheutjes van het totaal aantal schijfjes. In de onderste tabel wordt het aantal geregenereerde scheutjes per bol aangegeven.

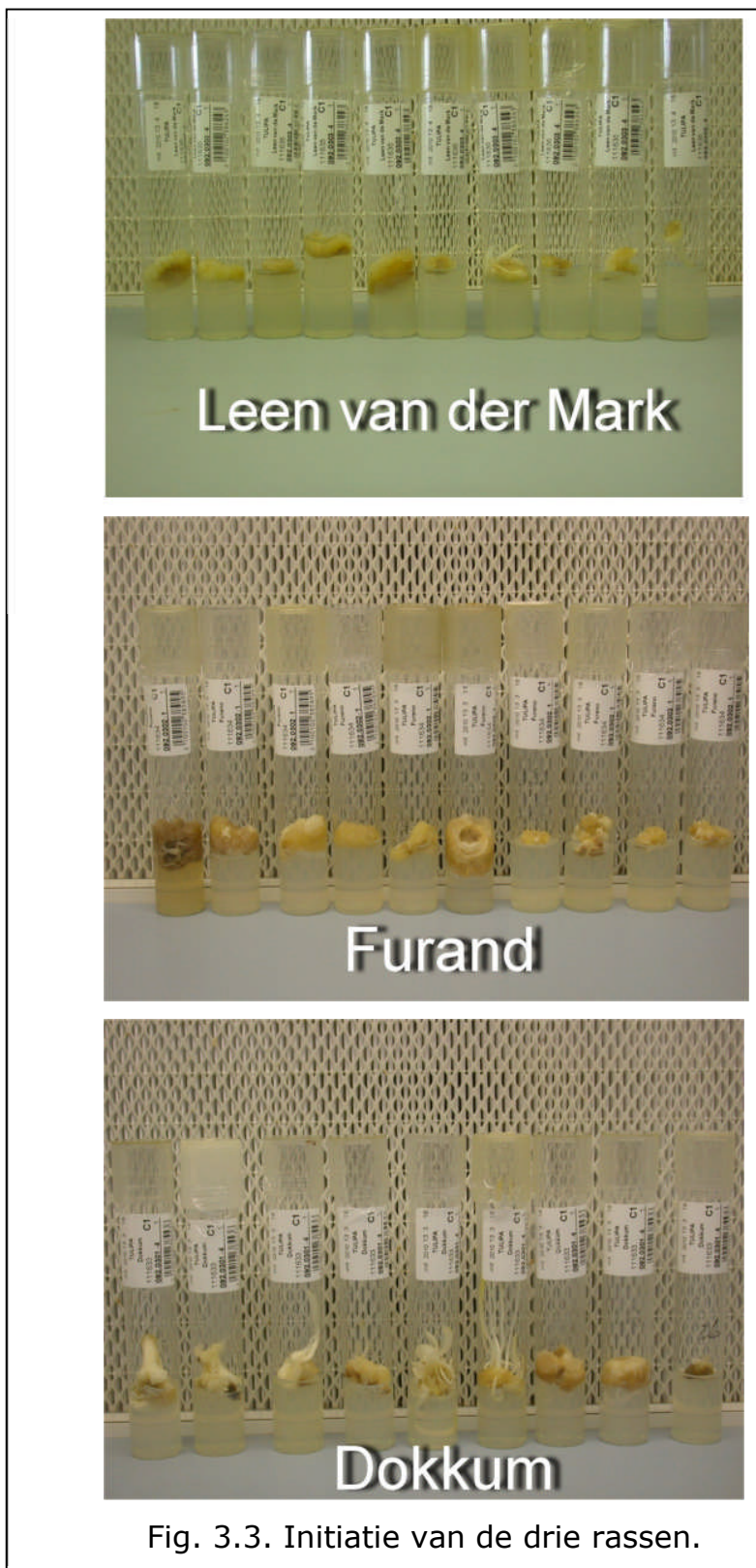


Fig. 3.3. Initiatie van de drie rassen.

	% regeneratie (per schijfje)			% waterigheid (per schijfje)
	< 3 mm	> 3 mm	totaal	
<b>LvdM</b>	11.3	38.7	37.1	30.6
<b>Furand</b>	27.5	27.5	33.3	11.8
<b>Dokkum</b>	23.8	57.1	59.5	52.5

	Aantal scheutjes (per bol)		
	< 3 mm	> 3 mm	totaal
<b>LvdM</b>	4.0	14.7	18.7
<b>Furand</b>	12.3	7.0	19.3
<b>Dokkum</b>	12.9	42.3	55.1

Tab. 3.3. Regeneratie uit 25 weken oude scheutjes. In de bovenste tabel wordt de regeneratie per schijfje aangegeven als percentage van het totaal aantal schijfjes. Verder wordt de waterigheid aangegeven als percentage schijfjes met waterige scheutjes van het totaal aantal schijfjes. In de onderste tabel wordt het aantal scheutjes per bol aangegeven.

### *De resultaten: Doorvermeerdering*

Omdat er onvoldoende scheutjes aanwezig waren, werden de verschillende condities voor doorvermeerderen alleen bij Dokkum getest (Tabel 3.4). Hierbij kwam vermeerdering met NAA als auxine zonder tussenkweek verreweg het beste naar voren. In tegenstelling tot resultaten in het vorige project over tulp (De Klerk 2005) had een tussenkweek in vloeibaar medium geen positief effect. De *Temporary Immersion Bioreactor* had eveneens geen positief effect.

De prestatie bij doorvermeerderen van de verschillende rassen kwam overeen met die bij de initiatie (Tabel 3.5). Hierbij viel vooral het zeer kleine aantal lange scheuten bij Furand op.

Omdat er zo weinig lange scheutjes ter beschikking stonden, is alleen bij Dokkum een aantal cycli doorvermeerderd (Tabel 3.6). Het aantal lange scheutjes lijkt af te nemen.

Dokkum	% regeneratie (per schijfje)	Aantal scheuten per scheut < 3 mm	Aantal scheuten per scheut > 3 mm
<b>Procedure 1 Vast, 2,4-D</b>	30.0	4.8	5.5
<b>Procedure 2 Vast, NAA</b>	79.7	5.5	19.0
<b>Procedure 3 Vloeibaar; 2,4-D</b>	17.4	2.5	2.7
<b>Procedure 4 TIB; 2,4-D</b>	14.7	3.1	0.7

Tabel 3.4. Doorvermeerderen van Dokkum bij verschillende procedures tijdens de eerste cyclus.

	% regeneratie (per schijfje)	# scheuten per scheut < 3mm	# scheuten per scheut > 3mm
<b>LvdM</b>	14.0	2.4	2.2
<b>Furand</b>	53.1	3.1	0.2
<b>Dokkum</b>	30.0	4.8	5.5

Tabel 3.5. Vermeerdering na de eerste cyclus voor de drie rassen.

Do kkum	% regeneratie (per schijfje)	# scheuten per scheut < 3mm	# scheuten per scheut > 3mm
<b>Initiatie</b>	40.4	34.6	32.7
<b>Cyclus 1</b>	30.0	4.8	5.5
<b>Cyclus 2</b>	24	5.5	2
<b>Cyclus 3</b>	20	4.5	1.3

Tabel 3.6. Doorvermeerderen van Dokkum voor 3 cycli.

## *Conclusie*

Het doel van het project was de bruikbaarheid van het huidige protocol te testen. De prestatie van het protocol is zeer ras-afhankelijk. Wellicht zijn er rassen waarbij de vermeerdering met het huidige protocol commercieel mogelijk is. Bij de meeste rassen zal dit evenwel niet het geval zijn.

Het tweede doel van het project was de belangrijkste bottlenecks te inventariseren. Dit lijken er twee te zijn:

1. De recalcitrantie om te regenereren, per schijfje ontstaan slechts weinig scheutjes.

2. De doorgroei van deze scheutjes. Vaak blijven ze zeer klein.

(NB in de volgende stappen, bolvorming en uitplanten, kunnen ook nog belangrijke bottlenecks zijn, maar die worden niet verwacht.)

In hoofdstukken 4 en 5 worden de achtergronden besproken en wordt aangegeven hoe de bottlenecks kunnen worden opgelost.

## **4. Waarom groeit tulp zo traag in weefselkweek tijdens stappen 1 en 2?**

De snelheid van weefselkweekvermeerdering hangt af van de snelheid van twee processen:

- 1 De vorming van nieuwe scheuten; Dit kunnen adventieve scheuten zijn (zoals bij het huidige protocol en bij vermeerdering van lelie) of uitgroeïende zijknoppen (zoals bij de meeste andere gewassen, bij bolgewassen bijv. bij zantedeschia en iris).
- 2 De toename van het gewicht van scheuten.

### *De vorming van nieuwe scheuten*

Bij tulp worden nieuwe scheuten gevormd door adventieve regeneratie zowel bij de eerste als tweede stap. Hierbij kan afhankelijk van het genotype adventieve regeneratie een bottleneck zijn. De achtergronden van adventieve regeneratie zullen worden besproken in de volgende alinea's.

Bij de vorming van adventieve knoppen, kunnen twee belangrijke factoren worden onderscheiden: (i) het uitgangswefsel en zijn capaciteit om te regenereren en (ii) het regeneratieproces met inbegrip van hormonale manipulaties.

Met betrekking tot (i), het uitgangswefsel, is bij tulp de leeftijd van belang. Bij stap 1, de initiatie, moeten de explantaten uit bloemstelen van een bepaalde leeftijd gesneden worden, nl. wanneer de bloem net uit de bol komt. Hieraan is verder niet veel onderzoek gedaan. Schijfjes van veruitgelopen bloemstelen regenereren nauwelijks scheutjes. Het lijkt goed mogelijk dat nog jongere bloemstelen in het geval van de recalcitrante rassen wel overvloedig scheutjes regenereren. Hieraan is in het onderzoek geen aandacht besteed net zoals bijv. aan zaken als de dikte van het schijfje en de mate van verwonding (de scherpte van het mesje waarmee de



schijfjes gesneden worden). Bij doorvermeerdering zijn er bij tulp aanwijzingen gevonden dat de leeftijd van het weefsel waaruit de schijfjes gesneden worden van doorslaggevend belang is (Geert-Jan de Klerk en Naser Askari, ongepubl. resultaten). Met betrekking tot (i) is verder de vitaliteit van de schijfjes van belang. Na tussenkweek in vloeibaar medium zijn de scheutjes veel robuuster en hebben een sterk verbeterde regeneratie capaciteit. Schijfjes van niet-robuste scheutjes sterven vaak af (zie Fig. 2.2). De robuustheid kan verder verhoogd worden door meer radiale groei. Die kan verkregen worden door hormonale behandelingen. Zowel auxine als cytokinin (Loomis and Torrey 1964; Matsumoto-Kitano et al. 2008), maar ook GA<sub>3</sub> (Nilsson et al. 2008) en ethyleen (Junghans et al. 2004) spelen hierbij rol.

Wat betreft (ii), het proces van regeneratie, is bij tulp veel aandacht besteed aan de hormonale condities met inbegrip van het type van auxine, de duur van toediening en het type cytokinine. De derde hormonale factor die vaak adventieve regeneratie beïnvloedt, ethyleen, is vrijwel niet onderzocht. Het onderzoek werd meestal op het niveau van "*spray and pray*" gedaan. Helaas wordt in de wetenschap van het proces van adventieve regeneratie nog weinig begrepen zodat veel praktisch onderzoek op het "*spray and pray*" niveau moet worden uitgevoerd. Momenteel, wordt meer en meer basisonderzoek uitgevoerd dat uiteindelijk zal leiden tot geavanceerdere regeneratieprotocollen. Het wordt duidelijk dat er verschillende stappen in het regeneratie proces zijn (De Klerk 2009; Sena and Birnbaum 2010). In *Arabidopsis* worden explantaten eerst enkele dagen gekweekt in CIM, callus inducerend medium, alvorens ze wordt overgebracht naar SIM, scheut inducerend medium met een andere hormonale

samenstelling. Op deze wijze wordt optimale adventieve scheutvorming verkregen (Che et al. 2007).

### *De toename van het gewicht van scheuten.*

Het belangrijkste probleem is dat de geregenereerde scheuten (zoals de scheuten in Fig. 2.2) vaak kort en dun zijn. Hieronder zal op de mogelijke oorzaak hiervan worden ingegaan. Het lijkt dat er in de groeiende weefsels zelf onvoldoende voedingsstoffen aanwezig zijn voor optimale groei. Er zijn wel voldoende voedingsstoffen in het medium maar het transport van medium naar het groeiende weefsel schiet te kort. Omdat deze bottleneck van groot belang lijkt bij tulp maar ook bij andere gewassen wordt er relatief uitgebreid op ingegaan.

De voedingsstoffen zijn opgelost in water en moeten van het medium naar de groeiende weefsels gaan. Hoe gaan opgeloste stoffen van de ene naar de andere plaats? Hiervoor zijn twee mogelijkheden: (1) door diffusie en (2) door "meeliften" met de waterstroom. Diffusie wordt veroorzaakt door willekeurige beweging van deeltjes door thermische agitatie. Diffusie leidt tot een netto verplaatsing van plaatsen met een hoge concentratie naar plaatsen met een lage concentratie en is snel over korte afstand (< 1 mm), maar zeer langzaam over grote afstand. Volgens Flick's diffusie wet vergt verplaatsing over 50  $\mu\text{m}$  2.5 seconden, over 2 cm één week, en over 100 cm 32 jaar (!). Daarom gebruiken planten de waterstromen in de vaatbundels voor transport over lange afstand (Taiz and Zeiger 2006). In weefselkweek hebben de vaatbundels waarschijnlijk eveneens de sleutelrol bij het inwendig transport van mediumcomponenten.

Over het functioneren van vaatbundels in weefselkweek is echter zo goed als niets bekend. Omdat de natuurlijke *driving forces* er niet zijn

(verdamping voor de stroom in het xyleem en laden van suiker in de vaatbundel in het blad voor het floëem), zullen ze slecht functioneren (De Klerk and Askari 2012). De omstandigheden in weefselkweek lijken optimaal voor de groei: water is overvloedig beschikbaar, er worden hoge doses organische en anorganische voeding toegevoegd en de temperatuur is gunstig. Niettemin, is de groei van plantjes in weefselkweek veel minder dan verwacht (De Klerk 2010) en het ligt voor de hand dat dit het gevolg is van de transportproblemen in het plantje. De geldigheid van de argumentatie in het voorafgaande blijkt uit de scherp verhoogde groei in vloeibaar medium, inclusief *Temporary Immersion Bioreactors* (Escalona 2006; Etienne and Berthouly 2002) en stilstaand vloeibaar medium (De Klerk and Ter Brugge 2011). In vloeibaar medium is er ook opname via de blaadjes, waar de voedingstoffen in het floëem kunnen worden geladen en vervolgens getransporteerd naar de groeiende weefsels. Zoals gezegd gaf vloeibaar medium bij tulp in het huidige onderzoek geen verbetering. Aan een van de voorwaarden voor verbetering, opname door de epidermis, werd niet voldaan waarschijnlijk misschien omdat de waslaag op de epidermis te dik is.

## **5. Hoe verder met weefselkweek tulp?**

De eerste vraag is of er inderdaad, zoals eerder geopperd, een dringende behoefte is aan weefselkweek van tulp is. Beantwoorden van deze vraag ligt niet in de competentie van de schrijver van dit verslag maar gezien het belang bij de veredeling en bij fytopathologische en fysiologische problematiek, lijkt verbetering van de vermeerdering op middellange termijn (binnen enkele decennia) cruciaal voor het overleven van tulp als belangrijk siergewas. Er is al veel onderzoek gedaan zonder dat dit tot commerciële toepassing heeft geleid. Maar moet dit tot de conclusie leiden dat verder gaan met het onderzoek trekken aan een dood paard is? Bij nadere analyse blijkt dat veel voorgaand onderzoek niet altijd even adequaat was. Verder lijkt het er op dat tulp een van de gewassen is waarbij we tegen de blinde vlekken van het weefselkweekonderzoek oplopen en dat nodig is zich van deze blinde vlekken rekenschap te geven. Hieronder worden twee opties gegeven voor verder onderzoek, de eerste betreft aanpassingen van de gangbare methode, de tweede is een geheel nieuwe methode. Een eerste inschatting van de kansen vanuit weefselkweekstandpunt is dat de eerste optie een redelijke kans op slagen heeft. De tweede optie heeft een grotere kans op slagen maar het is de vraag of hij goed in de huidige bedrijfsstructuren kan worden ingepast.

### *Modificatie van de gangbare methode*

In de gangbare methode zijn er drie punten die verbeterd moeten worden.

Adventieve scheutvorming. De belangrijkste oplossingen zijn jong uitgangsmateriaal en (bij de doorvermeerdering) het verkrijgen van

robuuste vitale scheutjes waarvan de schijfjes gesneden worden. Voor het laatste is verbetering van de groei nodig.

Verbetering van de groei. Hier is vloeibaar medium de eerste oplossing (hoewel er waarschijnlijk ook andere zijn). Tulp reageert echter niet goed op vloeibaar medium (ras-afhankelijk: eerder onderzoek bij Gander gaf een duidelijk positief effect). Mogelijk is de waslaag op de epidermis te dik waardoor er nauwelijks opname is. Daarbij is het opname-oppervlak relatief klein als het vergeleken wordt met gewassen die wel succesvol in vloeibaar medium/TIB zijn (die hebben namelijk blaadjes). Een mogelijke oplossing is trichlooracetaat toe te dienen waardoor de hoeveelheid was in de epidermis flink afneemt (met 50%) terwijl de groei (van normale planten ex vitro) niet geremd wordt (Macey 1974).

Bolvorming en groei. Hier is nog geen onderzoek ter optimalisatie aan gedaan en mogelijk wordt met standaardonderzoek het probleem reeds grotendeels opgelost. Een extra mogelijkheid is een goed getimede mildestressbehandeling: de groei van andere opslagorganen nam dan toe met 50-100% (getest zijn alstroemeria rhizomen, Pumisitapon et al. 2012, en leliebolletjes, Askari en de Klerk, ongepubl. resultaten).

### *Geheel nieuwe methode*

Na kruisingen worden een groot aantal rijpe of onrijpe embryo's in weefselkweek gebracht en wordt embryogeen callus geïnduceerd. (Bij eerder onderzoek kon bij bloemstengelmateriaal geen embryogeen callus geïnduceerd worden, maar het is bekend dat superjong materiaal vele malen responsiever is.) Al het callus wordt vervolgens m.b.v. cryopreservering bewaard. Er wordt direct een beetje callus uit de cryopreservering gehaald waarop embryo's worden geïnduceerd. Die worden nadat ze voldoende groot

zijn uitgeplant en vervolgens wordt in de jaren daarna geselecteerd. Als er een ras bij is dat de moeite waard is wordt van dat ras callus uit de cryopreservering gehaald en worden daaruit grote aantallen embryo's geproduceerd die na uitgroei kunnen worden uitgeplant. Deze methode lijkt wellicht op luchtfietsen maar wordt in de praktijk bij coniferen toegepast (Burdon et al. 2008; Stasolla et al. 2002; [www.forest-genetics.com](http://www.forest-genetics.com)). Als de methode loopt kan 10-15 jaar na de start van de veredeling (dus na de eerste kruisingen) commerciële introductie gebeuren.

## 6. Literatuur

- BOUMAN H., DE KLERK G. J. (2001). Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 111-117.
- BURDON R. D., CARSON M. J., SHELBOURNE C. J. A. (2008). Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 0: *Pinus radiata* in New Zealand. *Australian Forestry*, 71: 263-279.
- CHE P., LALL S., HOWELL S. H. (2007). Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta*, 226: 1183-1194.
- DE KLERK G.-J. (2009). Adventitious regeneration. In M.C. Flickinger (ed.) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Volume 1, John Wiley & Sons, Inc. pp. 72-87.
- DE KLERK G. J. (2005). Verslag van project PT-36197. Onderzoek verricht door M. Langens aan vermeerdering van tulp met behulp van weefselkweek.
- DE KLERK G. J. (2010). Why plants grow in tissue culture? *Prophyta Annual 2010*: 42-44.
- DE KLERK G. J., ASKARI N. (2012). A Century of Plant Tissue Culture; Basal features ignored for too long. *Prophyta Annual 2012*: 46-49.
- DE KLERK G. J., ROOK W., VAN VARK A., VAN DER LINDE P. (2005). Vermeerdering tulp in weefselkweek: een werkbaar protocol. *Bloembollensvisie*, 59: 20-21.
- DE KLERK G. J., TER BRUGGE J. (2011). Micropropagation of *Dahlia* in static liquid medium using slow-release tools of medium ingredients. *Scientia Horticulturae*, 127: 542-547.
- ESCALONA M. (2006). A novel bioreactor for plant tissue culture: temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta Annual 2006*: 48-49.
- ETIENNE H., BERTHOULY M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 215-231.
- GHAFFOOR A., IMRAN MAQBOOL I., WASEEM K., QURAISHI A. (2004). In vitro response of tulips (*Tulipa gesnerina* L.) to various growth regulators. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6: 1168-1169.
- JUNGHANS U., LANGENFELD-HEYSER R., POLLE A., TEICHMANN T. (2004). Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. *Plant Biology*, 6: 22-29.
- LE NARD M., DUCOMMUN C., WEBER G., DORION N., BIGOT C. (1987). Observations sur la multiplication in vitro de la tulipe (*Tulipa gesneriana* L.) à partir de hampes florales prélevées chez des bulbes en cours de conservation. *Agronomie*, 7: 321-329.
- LOOMIS R. S., TORREY J. G. (1964). Chemical control of vascular cambium initiation in isolated radish roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52: 3-11.

- MACEY M. J. K. (1974). Wax synthesis in *Brassica oleracea* as modified by trichloroacetic acid and glossy mutations. *Phytochemistry*, 13: 1353-1358.
- MATSUMOTO-KITANO M., KUSUMOTO T., TARKOWSKI P., KINOSHITA-TSUJIMURA K., VÁCLAVÍKOVÁ K., MIYAWAKI K., KAKIMOTO T. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 20027-20031.
- NILSSON J., KARLBERG A., ANTTI H., LOPEZ-VERNAZ M., MELLEROWICZ E., PERROT-RECHENMANN C., SANDBERG G., BHALERAO R. P. (2008). Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell*, 20: 843-855.
- NISHIUCHI Y. (1979). Studies on vegetative propagation of tulip. 2. Formation and development of adventitious buds in the excised bulb scale cultivated in vitro. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 48: 99-105.
- PUMISUTAPON P., VISSER R. G. F., DE KLERK G. J. (2012). Moderate abiotic stresses increase rhizome growth and outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 1-6.
- RICE R. D., ALDERSON P. G., WRIGHT N. A. (1983). Induction of bulbing of tulip shoots in vitro. *Scientia Horticulturae*, 20: 377-390.
- SENA G., BIRNBAUM K. D. (2010). Built to rebuild: In search of organizing principles in plant regeneration. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20: 460-465.
- SMULDERS M. J. M., DE KLERK G. J. (2010). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*: 1-10.
- STASOLLA C., KONG L., YEUNG E., THORPE T. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38: 93-105.
- TAIZ L., ZEIGER E. (2006). Topic 3.2: Calculating half-times of diffusion. *Plant Physiology*, Fourth Edition Online.  
<<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=26>> ,
- VAN ROSSUM M. W. P. C., ALBERDA M., VAN DER PLAS L. H. W. (1997). Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science*, 130: 207-216.