



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING



BIBLIOTHEEK
PPO sector Bloembollen
Postbus 85
2160 AB Lisse
0252 462121

Toepassing van weefselkweek en embryogenese bij vermeerdering en veredeling van tulp.

M.M. Langens-Gerrits (Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Bloembollen)
H. Bouman (Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Bloembollen)
J.B.M. Custers (Plant Research International)

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Augustus 2001

PPO 405

P-12-R

ISBN 1672753

513-N-1-A.
502-F-2

M

405

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS



0000 0940 3615

WAGENINGEN UR

© 2001 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit project is mede gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bloembollen

Adres : Vennestraat 22, Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 462121
Fax : 0252 - 417762
E-mail : infobollen@ppo.dlo.nl
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

Voorwoord	7
Samenvatting	9
1 Inleiding	13
1.1 Doelstelling van het gepresenteerde onderzoek.....	13
1.2 Opzet van het verslag.....	14
2 Vermeerdering van tulp in weefselkweek op vast of in vloeibaar medium.....	15
2.1 Korte beschrijving van de methoden	15
2.2 Problemen bij de weefselkweekvermeerdering van tulp	15
2.3 Aanpak van het onderzoek	16
3 Protocol initiatie en vermeerdering van scheutjes op vast medium.....	17
3.1 Behandeling uitgangsmateriaal	18
3.2 Initiatie	18
3.2.1 Sterilisatie.....	18
3.2.2 Opkweek van scheutjes	18
3.3 Doorvermeerdering	19
3.3.1 Conditionering van de scheutjes vóór doorvermeerdering	19
3.3.2 Overige factoren.....	19
3.4 Bolvorming.....	19
3.4.1 'Feeder'-weefsel.....	19
3.5 Groei en bloei	20
4 Opmerkingen bij het protocol voor initiatie en vermeerdering op vast medium.....	21
4.1 Behandeling uitgangsmateriaal	21
4.1.1 Invloed bolbewaring op scheutvorming	21
4.2 Initiatie	21
4.2.1 Polair of apolair enten.....	21
4.2.2 Temperatuur	21
4.2.3 Licht.....	21
4.2.4 Verloop van de scheutvorming.....	21
4.2.4.1 Regeneratiegradiënt.....	21
4.2.4.2 Verloop van de scheutvorming	22
4.2.5 Infecties	22
4.2.5.1 Vroegtijdig ontdekken van infecties	22
4.2.5.2 Verwijderen/onderdrukken van infecties.....	22
Cultivar.....	23
Behandeling.....	24
Regeneratie	24
4.2.6 Groeiregulatoren.....	24
4.2.6.1 Pulsen met het auxine 2,4-D.....	24
4.2.6.2 Methyljasmonaat (Me-JA) en jasmonzuur (JA)	25
4.2.6.3 Cytokinines.....	26
4.2.6.4 Paclobutrazol	26
4.2.6.5 STS.....	27
4.2.7 Mineralen	27
4.2.8 Suikers	27
4.2.9 Overige factoren.....	27
4.3 Doorvermeerdering.....	28
4.3.1 Scheutjes in plakjes of overlans doorsnijden.....	28
4.3.2 Licht.....	28

Voorwoord

In dit verslag worden de resultaten beschreven van twee projecten waarin weefselkweekmethoden ten behoeve van vermeerdering en veredeling van tulp zijn onderzocht.

Het project 'Toepassing van embryogenese bij de vermeerdering en veredeling van tulp' is vanaf begin 1996 tot eind 1999 uitgevoerd bij het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (voorheen Laboratorium voor Bloembollenonderzoek/Centraal Onderzoekslaboratorium voor de Weefselkweek van Tuinbouwgewassen) en Plant Research International, Wageningen (voorheen CPRO-DLO). Projectleider waren P.M. Boonekamp (PPO, tot november 1998) en M. van Lookeren Campagne (PRI).

Doel van het projectonderdeel bij het PPO was om uit te zoeken of somatische embryogenese (vorming van embryo's uit niet-geslachtscellen) toepasbaar is voor een sneller vermeerderingssysteem van tulp. Aan dit onderdeel hebben de volgende mensen meegewerkt: A. de Jong (deelprojectleider tot augustus 1997), H. Bouman (deelprojectleider vanaf augustus 1997), M. Dijkema (tot januari 1999), H. Gude (tot augustus 1997), W. Schoo, en als stagiaires I. Strik, C. Randag, R. Otten en F. Vidal.

Doel van het projectonderdeel bij Plant Research International was een methode te ontwikkelen voor microsporenembryogenese (vorming van embryo's uit onrijp stuifmeel) om de genetische variatie die aanwezig is in tulp sneller beschikbaar te maken voor veredelingsdoeleinden. Aan dit onderdeel hebben meegewerkt J. Custers (deelprojectleider), L. Ennik, W. Eikelboom en J. Mathijsen.

Het project werd additioneel gefinancierd door het Productschap Tuinbouw en begeleid door een begeleidingscommissie waarin de volgende personen zitting hadden: J. de Vries (PT), IJ. de Jong, E. Jongedijk (tot juni 1997), D. van Kleinwee (vanaf december 1997) (Stiverbol) en P. van der Linde (VGB).

Het project 'Weefselkweekvermeerdering tulp: regeneratie op bloemstengelexplantaten en doorvermeerdering' werd uitgevoerd bij het PPO van 1993 tot eind 1999. Doel van dit project was het verbeteren van de vermeerdering van tulp in vitro uitgaande van scheutvorming op bloemstengelplakjes. Aan dit project hebben meegewerkt: M.M. Langens-Gerrits (projectleider), A.M. Kuijpers (tot april 1998), I. Brouwer (vanaf mei 1998), en als stagiaires B. de Wit, M. Malik en C. Patton. Dit project is vanaf 1997 mede onderwerp geweest van de besprekingen met bovengenoemde begeleidingscommissie en bij deze bijeenkomsten is ook over dit deel gerapporteerd.

Samenvatting

Vermeerdering van tulp met behulp van weefselkweek

Onderzoek

Vermeerdering van tulp op het veld gaat erg langzaam waardoor het lang duurt voordat nieuwe cultivars op de markt kunnen worden gebracht. Vermeerdering met behulp van weefselkweek kan de introductie van nieuwe cultivars aanmerkelijk versnellen. Met het protocol dat bij aanvang van de projecten beschikbaar was, is commerciële toepassing van vermeerdering van tulp in vitro nog niet haalbaar.

Deze methode verloopt als volgt: op bloemstengelplakjes worden scheutjes geregenereerd. Deze scheutjes worden gebruikt voor verdere doorvermeerdering, en als voldoende scheutjes verkregen zijn, worden ze aangezet tot bolvorming. Bolletjes worden uitgeplant en komen na een koudebehandeling snel en uniform op. Er doen zich verschillende problemen voor in dit protocol. Veel van de scheutjes (90-95%) die op de stengelplakjes ontstaan hebben geen groeipunt en kunnen dus geen bolletje vormen. Daarnaast is de vermeerderingsfactor te laag (ongeveer 1_ per 10 weken) en net als in de eerste fase vormt maar een klein percentage van de scheutjes uit de doorvermeerdering een bolletje. Over groei en bloei van weefselkweekbolletjes en de kans op het ontstaan van afwijkingen was weinig of niets bekend.

In de projecten is op verschillende manieren geprobeerd om de vermeerdering van tulp te verbeteren. De eerste lijn ging uit van het bestaande protocol op vast medium. De tweede lijn was het ontwikkelen van een nieuwe, potentieel veel snellere methode waarbij geen scheutjes maar clusters van groeipunten (meristematische clusters) worden vermeerderd in vloeibaar medium. Op bloemstengelplakjes worden dan geen scheutjes maar meristematische clusters geïnduceerd. Deze clusters worden vermeerderd in vloeibaar medium en daarna, tot scheutvorming, op vast medium gebracht. Tot slot worden de scheutjes aangezet tot bolvorming. Een dergelijke methode is voor andere bolgewassen (lelie, narcis, nerine) wel beschreven, maar voor tulp was daarover niets bekend. Voor vermeerdering op vast medium is vooral gewerkt met de cultivars Gander en Apeldoorn. Op kleinere schaal zijn andere cultivars onderzocht. In vloeibaar medium is alleen gewerkt met de cultivar Apeldoorn.

Het protocol dat beschikbaar was bij aanvang van de projecten is aanzienlijk verbeterd. Er zijn verschillende combinaties van groeiregulatoren gevonden waarmee scheutjes kunnen worden geïnduceerd en kunnen worden doorvermeerderd. In het verslag wordt de bandbreedte van de concentratie van groeiregulatoren gegeven die gebruikt zijn om te komen tot een werkzaam protocol. Regeneratie- en vermeerderingscapaciteit verschilt van cultivar tot cultivar.

Initiatie van scheutjes

Toepassing van de groeiregulator jasmonzuur of methyl-jasmonaat verhoogde het percentage scheuten met een groeipunt sterk. Stengelplakjes die gekweekt waren op medium met jasmonzuur, bleken na afsnijden van de scheutjes nogmaals te gebruiken voor scheutvorming. Scheutvorming verliep beter in het donker dan in het licht. Wijziging van de mineralen- of suikersamenstelling had geen stimulerend effect op de scheutvorming. Antibiotica en PPM (een antibacterieel middel) verminderden uitval van explantaten door endogene (in het weefsel aanwezig) bacteriële besmettingen.

Doorvermeerdering

Voor doorvermeerdering zijn scheutjes overlans doormidden of in plakjes gesneden. Scheutjes uit het donker vermeerderden beter dan scheutjes uit het licht. De vermeerderingsfactor kon worden verhoogd door de scheutjes voor opsnijden in plakjes eerst een aantal weken in vast of vloeibaar medium te kweken (tussenkweek). Een koudebehandeling gegeven aan scheutjes op een stengelplakje verhoogde de vermeerderingsfactor bij de cultivar Gander.

De cultivar Apeldoorn is met succes vermeerderd in vloeibaar medium door middel van meristematische clusters. Het is niet gelukt om een echte suspensiecultuur (kweek van losse cellen en hele kleine celklompjes) op te zetten. Een groot probleem bij gebruik van vloeibaar medium was uitval door inwendige besmettingen. Op vast medium konden de clusters aangezet worden tot vorming van scheutjes.

Bolvorming

Losgesneden scheutjes vormden veel minder vaak een bolletje dan scheutjes waaraan een stukje explantaat vast zat. Verhogen van de suikerconcentratie bevorderde het percentage bolvorming niet. Scheutjes verkregen uit meristematische clusters van 'Apeldoorn' gaven meer bolvorming dan scheutjes vermeerderd op vast medium.

Groei na de weefselkweek

Uitplanten in het veld of de gaaskas gaf over het algemeen betere groei dan in een klimaatcel. Weefselkweekbollen van de cultivar Gander gaven forsere en zwaardere bloemen en hadden dikkere stelen dan conventioneel vermeerderde bollen. Er waren niet meer afwijkingen dan in de conventioneel vermeerderde bollen. Weefselkweekbollen verkletterden minder en gaven de zwaarste A-bollen.

Conclusies

Vermeerdering op vast medium

- Het protocol dat beschikbaar was bij aanvang van de projecten is aanzienlijk verbeterd.
- Bolvorming na doorvermeerdering blijft een knelpunt.
- De regeneratiecapaciteit en vermeerderbaarheid verschilt van cultivar tot cultivar.
- Groei en bloei van de bolletjes na uitplanten gaf geen problemen. Weefselkweekbolletjes presteerden beter dan conventioneel vermeerderde bollen. Er zijn nog geen gegevens verkregen over de bloei van bolletjes die verkregen zijn na kweek op het auxine 2,4-D (vast- en vloeibaar medium).
- In de loop van het project werd duidelijk dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen scheuten en embryo's.

Vermeerdering in vloeibaar medium

- De cultivar Apeldoorn werd succesvol vermeerderd in vloeibaar medium via meristematische clusters. Regeneratie van scheutjes en daarna bolletjes uit de clusters verliep zonder problemen.
- Een nadeel was de vrij grote kans op het optreden van infecties bij kweek in vloeibaar medium.
- Het is nog niet duidelijk of deze methode voor meer cultivars werkt.
- Een echte suspensiecultuur bleek niet haalbaar.

Vervolgonderzoek

In vervolgonderzoek worden de volgende zaken onderzocht:

- Groei en bloei van bolletjes uit het vorige project.
- Commerciële toepasbaarheid van het tot nu toe ontwikkelde protocol wordt getest voor een brede reeks van cultivars, in samenwerking met drie weefselkweekbedrijven.
- Verdere verbetering van de bolvorming.
- Er wordt getest of het mogelijk is om met gebruik van jasmonzuur, zónder doorvermeerdering, in een jaar 100-200 bolletjes uit één bloemstengel te verkrijgen.

MICROSPORENEMBRYOGENESE

Onderzoek

Tulp is een vegetatief vermeerderd, sterk heterozygoot gewas met een lange juveniele fase van vier tot zes jaar. Als gevolg van deze eigenschappen is veredeling van het gewas moeilijk en gaat genetische verbetering langzaam. Efficiëntere en meer gerichte veredeling is mogelijk indien de veredelaars kunnen beschikken over homozygote planten, maar om deze te maken kost bij tulp wel veertig jaar wanneer herhaalde zelfbestuiving wordt toegepast. Microsporencultuur biedt de mogelijkheid om in één generatie, homozygote planten van tulp te maken.

Deze nieuwe manier van produceren van homozygote planten kan ook de moleculaire merkerveredeling bij tulp een stuk versnellen, omdat het koppingsonderzoek dan eenvoudiger gaat. Ook kunnen de homozygote planten dienen als ouders voor het maken van F1-hybridecultivars.

De doelstelling van dit project was om voortbouwend op het Urgentieprogramma Bollenziekte- en -veredelingsonderzoek het protocol van microsporencultuur van tulp te verbeteren en om van een vijftiental cultivars een groot aantal verdubbelde haploïde planten te produceren en deze op hun waarde voor de veredeling te beoordelen.

Initiatie van sporofytische deling vanuit microsporen bleek bij alle cultivars van tulp mogelijk. Bij de meeste cultivars werden grote aantallen multicellulaire microsporen gevormd, regelmatig tot meer dan 500 per bol. Voorbehandeling van de bol bij 32°C verbeterde de vorming van embryo's vanuit de microsporen, maar deze behandeling is nog niet bij alle cultivars geoptimaliseerd. Een tegenvallend resultaat was dat gedurende opeenvolgende ontwikkelingsstappen tijdens de cultuur steeds grote aantallen individuen afvielen, hetgeen waarschijnlijk het gevolg is van sterke inteeltdepressie. Met name de kieming was een groot struikelblok. Het resultaat daarvan kon enigszins worden verbeterd door cytokinine toe te voegen tijdens de embryorijping en tijdens de kou. Na de kieming was plantvorming mogelijk via vorming van somatische embryo's. Hieruit werden kloontjes gemaakt, die na een aantal cycli weefselkweekplanten opleverden die groot genoeg waren om bolletjes te vormen voor uitplanten. Een eerste serie van 20

bolletjes werd overgebracht naar de grond. Op het veld stonden tot nu toe alleen microsporenplantjes afkomstig van het Urgentieprogramma. Na 4 jaar groei zijn deze plantjes nog steeds erg klein en miezerig. Bij ploïdie-onderzoek aan de embryo's werden zowel haploïde als diploïde individuen aangetroffen. Dit geeft aan dat in elk geval embryo's zijn ontstaan uit haploïde microsporen. Na uitgroei tot plant bleken alleen nog maar diploïde en een klein percentage tetraploïde planten aanwezig te zijn. AFLP-analyse van deze planten liet een sterk vereenvoudigd bandenpatroon zien ten opzichte van de ouders, hetgeen erop wijst dat de plantjes inderdaad uit microsporen zijn ontstaan. Maar ook was te zien dat de segregatie van polymorfismen wat scheef was, wat kan duiden op koppeling met genen die gunstig zijn voor de regeneratie.

Conclusie

Ondanks de nieuwe inzichten, het verbeterde protocol en de grootschalige cultures kon het hoofddoel van het project niet worden gerealiseerd. Het project leverde niet de grote aantallen verdubbelde haploïde planten op het veld die werden verwacht. Het algemene idee is dat dit het gevolg is van sterke inteeltdepressie.

1 Inleiding

Tulp is het belangrijkste bloembolgewas in Nederland; de exportwaarde per jaar bedraagt meer dan 500 miljoen gulden. Veredeling van tulp is belangrijk om in te kunnen spelen op veranderende eisen van de maatschappij (er is vraag naar rassen die geteeld kunnen worden met minder milieubelasting) en de markt (nieuwe kleuren en vormen). Veredeling gaat echter erg langzaam, omdat aan de ene kant het gewas sterk heterozygoot is en een bijzonder lange generatiecyclus heeft, en aan de andere kant omdat de vermeerdering op het veld zeer langzaam gaat, waardoor het lang duurt voordat nieuwe cultivars, verkregen uit conventionele of biotechnologische veredeling, op de markt gebracht kunnen worden. Een veredelingsprogramma van tulp duurt al gauw 20-25 jaar. Verschuivingen in het sortiment vinden dus maar langzaam plaats, en snel inspringen op veranderende wensen uit de markt en de maatschappij is niet mogelijk.

Vermeerdering met behulp van weefselweek 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). In weefselweek kunnen op de plakjes gesneden van de bloemstengel van één bol, grote aantallen scheutjes ontstaan (zo'n 50 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. Deze vermeerderingsmethode was bij aanvang van het project echter nog niet zover uitgewerkt dat commerciële toepassing haalbaar was. Er is de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan in binnen- en buitenland aan weefselweekvermeerdering van tulp en ook bij het PPO is vermeerdering van tulp met behulp van weefselweek uitgebreid onderzocht.

Veredeling van tulp kan versneld worden door methoden waarmee de genetische variatie binnen het gewas sneller zichtbaar wordt. Embryogenese vanuit jonge stuifmeelkorrels (microsporen) biedt in principe die mogelijkheid. Bij microsporenembryogenese ontstaan planten uit jonge stuifmeelkorrels. De stuifmeelkorrels bevatten de erfelijke informatie in enkelvoud en bovendien is de erfelijke informatie telkens in verschillende combinaties aanwezig. Daardoor wordt in planten die uit stuifmeelkorrels ontstaan, in één generatie de erfelijke variatie van een cultivar of geniteur zichtbaar gemaakt. Daarmee wordt een aanzienlijke tijdswinst geboekt ten opzichte van herhaald zelfbestuiven om homozygote planten te maken, wat bij tulp anders wel 40 jaar kost. De verkregen haploïde planten uit stuifmeelkorrels kunnen na verdubbeling van het aantal chromosomen gebruikt worden in veredelingsprogramma's. Er is binnen het Urgentieprogramma Bollen ziekte- en veredelingsonderzoek onderzoek gedaan naar microsporenembryogenese bij tulp, maar een breed toepasbaar protocol voor deze cultuur was bij aanvang van het project nog niet beschikbaar.

1.1 Doelstelling van het gepresenteerde onderzoek

Doel van het onderzoek was het ontwikkelen van methoden voor snelle vermeerdering en efficiënte veredeling van tulp, waardoor de introductie van nieuwe rassen kan worden versneld, en de genetische variatie beter kan worden benut.

Binnen de projecten werden verschillende methoden onderzocht:

- 1) Vermeerdering van scheuten/somatische embryo's die direct op bloemstengelplakjes ontstaan (PPO).
- 2) Vermeerdering van meristematische clusters of celsuspensies in vloeibaar medium en daarna vorming van bolletjes via somatische embryogenese (PPO)
- 3) Microsporenembryogenese (PRI).

1.2 Opzet van het verslag

Naar de wens van de begeleidingscommissie is het verslag in eerste instantie geschreven voor de directe gebruikers van de onderzoeksresultaten, de weefselkweekbedrijven. Daarnaast is het verslag bedoeld voor veredelaars. De onderdelen uit bovengenoemde projecten die betrekking hebben op vermeerdering (met behulp van scheuten of embryo's) zijn in de loop van 1997 bij elkaar gevoegd en worden in dit verslag gezamenlijk besproken.

Het verslag begint met een samenvatting. Hoofdstuk 2, 3 en 5 beschrijven de protocollen voor vermeerdering van tulp op vast of in vloeibaar medium. Toelichtingen bij de verschillende stappen van de protocollen zijn in hoofdstuk 4 en 6 opgenomen. In hoofdstuk 7 worden de belangrijkste conclusies getrokken uit hoofdstuk 2 tot en met 6 getrokken.

In hoofdstuk 9 vindt u het protocol voor microsporenembryogenese inclusief de mediumsamenstellingen, eveneens gevolgd door een toelichting, met in hoofdstuk 10 de conclusies rond dit project.

In bijlage 1 wordt een aantal begrippen die veel worden gebruikt in dit verslag toegelicht. In bijlage 2 en 3 worden rekenvoorbeelden gegeven van het aantal bolletjes dat verkregen wordt bij vermeerdering op vast of in vloeibaar medium. Bijlagen 4 tot en met 6 tot slot geven de medium-recepten.

2 Vermeerdering van tulp in weefselweek op vast of in vloeibaar medium

2.1 Korte beschrijving van de methoden

Voor de initiatie van scheuten wordt uitgegaan van dunne plakjes gesneden van jonge bloemstengeltjes. Op de plakjes ontstaan, afhankelijk van de gebruikte groeiregulatoren, scheutjes of clusters van groeipunten.

- Scheutjes worden op vast medium doorvermeerderd door ze in stukjes te snijden, waarna op de stukjes weer nieuwe scheutjes ontstaan.
- Clusters groeien in vloeibaar medium en vallen op een schudder uiteen in kleinere clusters. In de laatste stap worden de clusters op vast medium gelegd en aangezet tot scheutvorming. Vermeerdering van clusters in vloeibaar medium geeft in principe een veel hogere vermeerderingssnelheid en is goedkoper, omdat de clusters niet handmatig doorvermeerderd hoeven te worden. Nadelen zijn de grotere kans op het optreden van infecties en het feit dat de meeste weefselweekbedrijven ingericht zijn op het kweken op vaste voedingsbodems. Voor verschillende andere gewassen, waaronder ook bolgewassen, is deze methode in de praktijk toepasbaar of in ontwikkeling.
- Suspensies groeien net als clusters. Het verschil is de grootte van de te vermeerderen eenheden. Suspensies kunnen aangezet worden tot somatische embryogenese. In principe geeft deze methode de hoogste vermeerderingsfactor. Voor grote aantallen (honderdduizenden) is zeer geavanceerde apparatuur nodig (bioreactoren); voor aantallen rond de tienduizend voldoen erlenmeyers op schudders. De methode wordt nog nergens in de sierteelt toegepast. Alleen in de bosbouw, speciaal voor coniferen, is er een ontwikkeling die richting praktijktoepassing gaat.

Als voldoende scheutjes zijn verkregen worden ze aangezet tot bolvorming. De scheutjes krijgen dan eerst een koudebehandeling (10 weken bij 5°C). Hierdoor wordt het groeipunt aangezet tot vorming van een bolletje. Na de koudebehandeling is nog geen bolvorming waarneembaar; pas als het scheutje daarna bij hogere temperatuur (20-25°C) verder wordt gekweekt, gaat de basis van het scheutje zwellen en ontstaat een bolletje. Het bolletje kan worden uitgeplant en na een tweede koudebehandeling om de rust te breken, komen de bolletjes snel en uniform op.

2.2 Problemen bij de weefselweekvermeerdering van tulp

Bij aanvang van de projecten was er een protocol (Hulscher *et al.*, 1992) voor de vermeerdering van tulp met behulp van weefselweek beschikbaar. Dit protocol ging uit van vermeerdering van scheutjes die werden verkregen op bloemstengelplakjes of vanuit okselknoppen. Daarbij traden bij de volgende stappen problemen op en/of er was nog geen ervaring:

Scheutvorming op stengelplakjes.

De scheutjes die op de bloemstengelplakjes ontstonden, hadden niet allemaal een groeipunt. De scheuten zonder groeipunt, die geen bolletje konden vormen, waren op het oog niet te onderscheiden van scheuten met groeipunt die dat wel konden. Het percentage scheuten zonder groeipunt was hoog, meestal hoger dan 80%.

Doorvermeerdering.

Met de bestaande methode werd een vermeerderingsfactor van ongeveer 1,5 per 10 weken verkregen. Deze vermeerderingsfactor bleek onvoldoende voor commerciële toepassing. Er was geen methode beschikbaar voor vermeerdering van meristematische clusters en/of suspensies.

Bolvorming.

Bij de scheutjes die ontstonden na doorvermeerdering deed zich hetzelfde probleem voor als bij scheutjes die direct op stengelplakjes ontstonden: niet alle scheutjes hadden een groeipunt en niet alle scheutjes konden dus een bolletje vormen.

Groei en bloei.

Over het aspect groei en bloei was weinig bekend bij aanvang van het project. Van andere gewassen dan tulp is bekend dat door weefselkweek soms afwijkende planten ontstaan. Een enkele afwijkende plant in een partij is echter geen probleem; deze kan worden verwijderd. Een verlies aan groeikracht in de hele partij kan wel opbrengstdaling tot gevolg hebben. De afwijkingen die ontstaan in weefselkweek zijn niet altijd blijvend; sommige verdwijnen na één of meer groeiseizoenen. Lang niet alle afwijkingen worden door weefselkweek veroorzaakt. Ook daarbuiten komen ze regelmatig voor.

2.3 Aanpak van het onderzoek

Scheutvorming op stengelplakjes op vast medium

Dit onderzoek heeft zich in eerste instantie gericht op het verbeteren van de initiatiefase: het ontstaan van scheutjes op bloemstengelplakjes. Onderzocht is welk effect een groot aantal factoren (hormonale, fysische of voedingsfactoren; uitgangsmateriaal) heeft op het aantal scheutjes dat ontstaat op een stengelplakje en op het percentage daarvan dat een groeipunt heeft. Ook factoren waarvan bij andere gewassen (o.a. komkommer, cycloam, wortel) bekend is dat ze van belang zijn bij somatische embryogenese, zijn in het onderzoek opgenomen.

Dit onderdeel is voornamelijk uitgevoerd met 'Gander' en 'Apeldoorn'. Voor 'Gander' werd voor scheutinitiatie als standaard het auxine naftaleenazijnzuur (NAA) en het cytokinine zeatine gebruikt. Voor initiatie van scheutjes bij 'Apeldoorn' werden stengelplakjes eerst een korte periode (2-3 weken) op medium met het auxine 2,4-dichlorophenoxyazijnzuur (2,4-D) en het cytokinine benzyladenine (BA) gekweekt en daarna op medium met alleen BA. Een aantal andere cultivars is later meegenomen in het onderzoek.

Initiatie van meristematische clusters en/of suspensies

Uitgaande van bloemstengelplakjes zijn door variatie van de kweekcondities (voornamelijk de auxineconcentratie) geen scheutjes maar clusters of embryogeen callus geïnduceerd. Dit onderdeel was een haalbaarheidsstudie en is alleen met de cultivar Apeldoorn uitgevoerd.

Inductie van embryogeen callus om een celsuspensie op te zetten bleek al snel niet haalbaar binnen de duur van het project. Dit onderdeel wordt dan ook zeer beperkt besproken in dit verslag.

Doorvermeerdering

Hierbij zijn de volgende aspecten onderzocht:

1. doorvermeerderen van scheutjes door opsnijden in kleine stukjes en vermeerdering op vast medium. Factoren als de kwaliteit van de gebruikte scheutjes en een veelheid aan kweekcondities zijn hierbij onderzocht op hun effect.
2. vermeerdering van meristematische clusters in vloeibaar medium.
3. vermeerdering van embryogene cellen of kleine celclustertjes in vloeibaar medium.

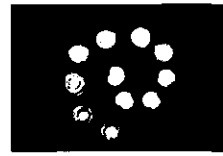
Bolgroei in vitro

De kwaliteit van de scheutjes, dat wil zeggen de capaciteit om een bolletje te vormen, is onderzocht door de scheutjes een bolvormingsbehandeling te geven. Aan de buitenkant is niet te zien of een scheutje wel of geen bolletje kan vormen. Gevormde scheutjes kregen een koudebehandeling van 10 weken en werden daarna 12 weken bij 20-25°C gekweekt voor uitgroei van de bolletjes.

Groei en bloei na uitplanten

Weefselkweekbolletjes uit de eerste fase of uit de doorvermeerdering zijn uitgeplant in grond (kweekcel, gaaskas of volle grond) om de groeikracht en de kans op afwijkende bloei te bestuderen. Groei en bloei van weefselkweekbollen en conventioneel vermeerderde bollen van de cv. Gander zijn vergeleken.

3 Protocol initiatie en vermeerdering van scheutjes op vast medium



Behandeling uitgangsmateriaal



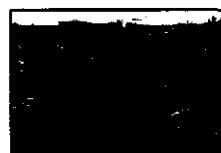
Initiatie



Doorvermeerdering



Bolvorming



Groei en bloei

3.1 Behandeling uitgangsmateriaal

Bollen kregen de temperatuurbehandeling voor ijstulpen. Na de oogst werden de bollen tot half oktober bij 20°C bewaard, vervolgens tot half november bij 17°C. Dan werden de bollen per 10 ingepakt in plastic zakken met vochtige aarde. Zo ingepakt werden ze 2-3 weken bij 9°C beworteld. Als de wortels waren gevormd werden de bollen een aantal weken bij 5°C bewaard en dan ingevroren bij -2°C. Door de bollen in te vriezen kon de periode waarin proeven konden worden gedaan, aanmerkelijk worden verlengd (§ 4.1.1). Deze bollen werden een paar dagen voor gebruik ontdooid bij 9-15°C.

Ook bollen die op een andere manier bewaard zijn, maar waarin wel een stengeltje aanwezig is, kunnen voor weefselkweek worden gebruikt.

3.2 Initiatie

3.2.1 Sterilisatie

- Gebruik gezonde, schone, niet (of zo min mogelijk) beschadigde bollen.
- Verwijder de wortels.
- Spoel de bollen goed af.
- Prepareer de bloemstengel uit de bol door de rokken weg te snijden (okselknoppen zijn ook te gebruiken als uitgangsmateriaal: uitprepareren en op zelfde manier behandelen als stengeltjes). Laat een klein stukje van de bolbodem aan het stengeltje zitten.
- Verwijder het topje van de bloemstengel (1-2 cm) als het bruin is.
- Spoel de stengeltjes goed af met water.
- Spoel de stengeltjes ± 30 seconden in 70% ethanol.
- Steriliseer de stengeltjes 30 minuten in bleekwater (1% actieve stof) met een paar druppels Tween 20. Stengeltjes drijven, dus af en toe schudden.
- Spoel drie keer met steriel demiwater (= gedemineraliseerd water).

3.2.2 Opkweek van scheutjes

- Verwijder het door bleekwater aangetaste stukje bolbodem
- Snij plakjes (explantaten) van ongeveer 1 mm dikte. Verwijder de ringetjes blad rond de plakjes die gesneden zijn uit de bovenkant van het stengeltje. Dit blad groeit en strekt en er worden geen scheutjes op gevormd.
- Plakjes kunnen worden gekweekt in hoge petrischalen (diameter 9 cm, hoogte 1,5 cm) met ongeveer 35 ml initiatiemedium A. of B.1. (bijlage 4) of in buizen met 15 ml van hetzelfde medium. Petrischalen en buizen worden niet dichtgetapet. Lage petrischalen of smalle buisjes kunnen beter niet worden gebruikt omdat het explantaat met scheutjes aanzienlijk kan groeien.
- Plaats het plakje met de fysiologische onderkant (= 'polair enten') of de fysiologische bovenkant (= 'apolair enten') op het medium (§ 4.2.1).
- Kweek de stengelplakjes gedurende ongeveer 12 weken bij 20°C (§ 4.2.2) in het donker (§ 4.2.3.) op MS-medium met groeiregulatoren. Het explantaat zelf groeit aanzienlijk en scheutjes ontstaan meestal aan de rand van het explantaat uit de subepidermale lagen (§ 4.2.4). Stengelplakjes kunnen uitvallen door endogeen (in het weefsel) aanwezige besmettingen (§ 4.2.5). Na ongeveer 6 weken worden de eerste scheutjes zichtbaar.
- Als het auxine 2,4-D wordt gebruikt, worden de plakjes eerst gedurende 1-3 weken op medium met 2,4-D (initiatiemedium B.1, bijlage 4) opgekweekt, om daarna overgezet te worden op medium zonder 2,4-D (=uitgroeimedium B.2, bijlage 4). Continue kweek op medium met de gebruikte concentratie 2,4-D remt de uitgroei van de scheutjes (§ 4.2.6.1).
- Scheutvorming in de eerste fase wordt sterk bevorderd door methyljasmonaat en jasmonzuur (§ 4.2.6.2.). Ook paclobutrazol (§ 4.2.6.4) en STS (§ 4.2.6.5) hebben positieve invloed. Verdere informatie over de mediumsamenstelling is te vinden in § 4.2.7 'Mineralen', § 4.2.8 'Suikers' en § 4.2.9 'Overige factoren'.

3.3 Doorvermeerdering

De scheuten die op de stengelplakjes ontstaan, kunnen worden doorvermeerderd door ze in plakjes of overlangs doormidden te snijden (§ 4.3.1)

- Snij scheutjes van 1 cm of langer van het explantaat af en snij ze in plakjes van ongeveer 1 mm dik.
- Plaats de plakjes polair of 'op de kop' (§ 4.2.1) op doorvermeerderingsmedium (A. of B.3. bijlage 4) bij 20°C in het donker (§4.3.2). Zet de scheutjes elke 5-6 weken op vers medium (§ 4.3.3).
- Op de plakjes ontstaan nieuwe scheutjes die opnieuw kunnen worden gebruikt voor doorvermeerdering.
- Als voldoende scheutjes verkregen zijn, worden ze aangezet tot vorming van een bolletje.

3.3.1 Conditionering van de scheutjes vóór doorvermeerdering

De vermeerderingsfactor wordt verhoogd door de scheutjes een voorbehandeling te geven vóór opsnijden in plakjes. De volgende voorbehandelingen hadden een positief effect:

- kweek van de scheutjes gedurende een aantal weken in vloeibaar medium (§ 4.3.4.1).
- een koudebehandeling (§ 4.3.4.2).

Als stengelplakjes eerst 12 weken op medium met methyljasmonaat worden gekweekt en daarna op initiatiemedium A (bijlage 4) worden gezet gedurende 12 weken, ontstaan opnieuw scheutjes (§ 4.3.4.3). Deze tweede-golf-scheutjes geven een hogere vermeerderingsfactor dan eerste-golf-scheutjes en ook de bolvormingscapaciteit is beter dan die van de eerste-fase-scheutjes.

3.3.2 Overige factoren

Voor 'Gander' zijn nog andere factoren gevonden die de doorvermeerdering positief beïnvloeden: gebruik van jonge scheuten, en verversen medium tijdens de regeneratie op stengelplakjes. Effecten zijn echter klein.

3.4 Bolvorming

- Om bolvorming te induceren moeten de scheutjes worden overgezet op bolvormingsmedium (C., met extra sucrose (§ 4.4.1) en zonder hormonen, bijlage 4) en 10 weken in het donker bij 5°C gekweekt. Na de koudebehandeling is nog geen bolgroei zichtbaar.
- Kweek de scheutjes vervolgens gedurende 10-12 weken bij hogere temperatuur (20-25°C) (§ 4.4.2). Overzetten op vers medium na de koudebehandeling is niet nodig. Tijdens deze 12 weken zwelt de basis van het scheutje op en ontstaat een bolletje. Vaak verdroogt het oorspronkelijke scheutje en vormt zich een bruin huidje om het bolletje.
- Bewaar de bolletjes vóór uitplanten ongeveer 5 weken bij 20°C (droge bolletjes in Petrischaal, niet dichtgetapet).

3.4.1 'Feeder'-weefsel

Voor goede bolvorming is aanwezigheid van 'feeder-weefsel' (een stukje van het weefsel waaruit het scheutje is ontstaan) zeer belangrijk. Geheel losgesneden scheutjes vormen veel minder vaak een bolletje dan scheutjes die nog vastzitten aan een stukje van het stengelplakje of die gekweekt worden met wat aanhangend weefsel uit de doorvermeerdering (§ 4.4.3).

Bij de scheutjes die ontstonden na doorvermeerdering, deed zich hetzelfde probleem voor als bij scheutjes die direct op stengelplakjes ontstonden, dat wil zeggen dat veel scheutjes uit de doorvermeerdering geen bolletje vormden. Het percentage bolvorming na doorvermeerdering kon onder standaardcondities sterk variëren, maar was over het algemeen wat hoger dan het percentage bolvorming in de scheutjes die direct op de stengelplakjes ontstonden.

3.5 Groei en bloei

- De weefselkweekbolletjes zijn in rust en moeten voor snelle en uniforme opkomst een koudebehandeling krijgen van 10 weken bij 5°C.
- Voldoende grote bolletjes (ca. >200 mg) worden, als ze in het goede seizoen beschikbaar zijn, direct in de gaaskas geplant. Ze krijgen dan een natuurlijke koudebehandeling tijdens de winter. Kleinere bolletjes (vanaf 50 mg) kunnen het best opgeplant worden in (ruime) potjes of bakjes. Voor een koudebehandeling werden de bakjes 10 weken in een koude cel worden geplaatst. Daarna werden de bakjes verplaatst naar een kweekcel of de gaaskas.
- In het hier gepresenteerde onderzoek werden bolletjes die werden opgekweekt in een kweekcel, geplant in houten kistjes met potgrond, aangevuld met 1,5 kg PG-Mix per 1 m³ grond. Condities in de kweekcel waren 17°C en 16 uur licht per dag.

Uitplantingen in het veld of de gaaskas gaven over het algemeen betere groei dan in een klimaatcel (§ 4.5.1).

Weefselkweekbollen van Gander groeiden beter dan een vergelijkbare partij conventioneel vermeerderde bollen (§ 4.5.2).

4 Opmerkingen bij het protocol voor initiatie en vermeerdering op vast medium

4.1 Behandeling uitgangsmateriaal

4.1.1 Invloed bolbewaring op scheutvorming

De regeneratiecapaciteit van de bloemstengelexplantaten was goed in de maanden december, januari en februari. Vóór half november is de bloemstengel te kort om te gebruiken voor inzettingen. De meeste experimenten zijn ingezet van december tot februari met bollen bewaard bij -2°C. De regeneratiecapaciteit liep in februari terug voor enkele cultivars, terwijl deze voor andere hetzelfde bleef. Bij 'Gander' en 'Lucky Strike' werd geen teruggang gevonden. IJstulpen van 'Gander' zijn tot juli gebruikt en de regeneratie van scheutjes was steeds goed. Wel gaven lang bewaarde bollen een hoger percentage besmettingen na inzet. Bij 'Apeldoorn', 'Leen van der Mark', 'Lustige Witwe' en 'Monte Carlo' had bewaring wel een negatief effect: de regeneratiecapaciteit van de bloemstengelexplantaten was het best in de maanden december en januari, maar werd minder in februari. Er ontstonden dan 10-50% minder scheuten die slecht reageerden bij doorvermeerdering of bolvorming.

Bollen van 'Gander' zijn ook bij 5°C bewaard in plaats van bij -2°C. De regeneratie op stengelplakjes van bollen die tot januari bij 5°C waren bewaard was erg slecht vergeleken met die van bollen die vanaf begin december ingevroren waren.

Er was geen groot jaareffect op de regeneratie. Wel waren er van jaar tot jaar grote verschillen in het besmettingspercentage.

4.2 Initiatie

4.2.1 Polair of apolair enten

De invloed van de oriëntatie van de plakjes was afhankelijk van de cultivar. Bij gebruik van het auxine 2,4-D leek apolair enten over het algemeen een betere reactie te geven. Bij de cultivar Gander zijn de twee manieren van enten vergeleken en waren er geen verschillen tussen polair of apolair enten. Bij polair geënte plakjes ontstonden scheutjes voornamelijk aan de randen. Bij apolair geënte plakjes ontstonden scheutjes ook uit het midden.

4.2.2 Temperatuur

Stengelplakjes van 'Gander' gaven de beste regeneratie na kweek bij 20°C. Regeneratie bij 15°C was redelijk. Bij 10 en 25°C werden wel normale aantallen scheutjes gevormd, maar die waren van slechte kwaliteit: het percentage bolvorming was zeer laag.

4.2.3 Licht

Initiatie van scheutjes ging beter in het donker dan in het licht (16 uur per dag).

Als explantaten met scheutjes, na een aantal weken in het donker, in het licht werden gezet, was het aantal gevormde scheuten meestal groter dan bij kweek continu in het donker. Alleen bij 'Lucky Strike' en 'Monte Carlo' werden in het licht resp. minder en hetzelfde aantal scheuten gevormd. Scheuten die in het licht hadden gestaan gaven echter een lagere vermeerderingsfactor (§ 4.3.2).

4.2.4 Verloop van de scheutvorming

4.2.4.1 Regeneratiegradiënt

Er is een regeneratiegradiënt in de stengel. Deze gradiënt verschilt echter per cultivar. Bij 'Gander' was de regeneratie het best op de plakjes gesneden rondom de knopen; plakjes uit de onderkant van het stengeltje regeneerden slecht. Bij 'Apeldoorn' was de knopvorming beter op plakjes uit de onderkant van de stengel. De hoeveelheid scheutjes gevormd per stengel van 'Gander' varieerde nogal: gemiddeld werden er 50 structuren (bladachtige structuren en scheutjes) per stengeltje gevormd, maar het aantal varieerde van 0

tot 125. Het was niet duidelijk waarom sommige stengels het goed deden en andere niet; op het oog waren er bij inzetten geen verschillen te zien.

4.2.4.2 Verloop van de scheutvorming

Niet alle scheutjes ontstonden gelijktijdig; tijdens de kweekperiode werden steeds nieuwe scheutjes gevormd. Snelheid en duur van scheutvorming waren per cultivar zeer verschillend.

Stengelplakjes van verschillende cultivars werden eerst drie weken gekweekt op medium met 2,4-D en vervolgens overgezet op vers medium zonder 2,4-D (proef beschreven in tabel 3). Scheutjes van 1 cm of groter werden elke 4-5 weken van de stengelplakjes afgesneden voor doorvermeerdering. De proef duurde in totaal 35 weken.

Bij de snel reagerende cultivars Gander en Leen van der Mark konden de eerste scheuten ca. 60 dagen na initiatie gebruikt worden voor de doorvermeerdering, 'Apeldoorn' en 'Lucky Strike' ca. 3 weken later en 'Lustige Witwe' en 'Monte Carlo' weer 2 weken later. Voor 'Apeldoorn' en 'Gander' werd ca. 90% van de scheuten in de opvolgende 15 weken geoogst. 'Leen van der Mark' en 'Lustige Witwe' bereikten dit percentage na ongeveer 25 weken. Daarna nam het aantal nieuw gevormde scheuten snel af en werd er gestopt met oogsten. Bij 'Lucky Strike' ontstonden nog steeds nieuwe scheuten na ca. 32 weken, maar het aantal nieuwe scheuten per overzetting nam wel af. Bij 'Monte Carlo' regenereren nog steeds nieuwe scheuten na 35 weken. Er is niet getest hoelang 'Monte Carlo' na 35 weken nog doorging met nieuwe scheuten vormen.

Een langere eerste fase lijkt een goede mogelijkheid voor langzaam reagerende cultivars.

De kwaliteit van de scheutjes was zeer verschillend per cultivar. 'Apeldoorn', 'Gander' en 'Monte Carlo' gaven scheutjes van een redelijke dikte. Bij 'Leen van der Mark' waren de scheutjes dunner en trad veelvuldig glazigheid op. 'Lucky Strike' en 'Lustige Witwe' gaven meestal zeer dunne scheuten, die soms ook nog glazig waren. Dunne en/of glazige scheuten gaven slechte(re) resultaten in de doorvermeerdering en bolvorming.

Uitgroei van de scheuten op medium met NAA en 2iP of zeatine gaf geen betere scheutkwaliteit. Een hogere agarconcentratie verminderde de glazigheid niet, maar remde scheutvorming ('Leen van der Mark'). Een lagere cytokinineconcentratie (0,2 μ M BA in plaats van 0,5 μ M) of toevoeging van 0,2 μ M 2,4-D aan het uitgroei-medium gaven ook minder regeneratie en juist meer glazigheid. Halvering van de MS-zouten gaf iets meer niet-glazige embryo's bij 'Lustige Witwe' en 'Apeldoorn' en had geen negatief effect op de scheutvorming.

4.2.5 Infecties

Endogene (in en tussen cellen aanwezige) besmettingen kunnen voor grote problemen zorgen, vooral omdat deze infecties (meestal bacterieel) soms pas na enige overzettingen uit het weefsel komen. Aan de buitenkant is niet te zien of een stengeltje inwendig besmet is; ook schone en gezond uitziende stengeltjes kunnen inwendig besmet zijn. Langer ontsmetten in bleekwater heeft geen zin, omdat bleekwater niet tot binnenin het weefsel doordringt.

4.2.5.1 Vroegtijdig ontdekken van infecties

Bacteriële infecties konden vroegtijdig worden aangetoond door van elk bloemstengeltje dat ingezet werd, het bovenste en het onderste plakje klein te snijden en dit plantmateriaal in verschillende bacteriemediën op te kweken. Er werd gebruik gemaakt van een methode die bij SBW in Roelofarendsveen goede resultaten gaf.

Het klein gesneden plantmateriaal werd op de volgende manieren opgekweekt:

1. in een 1,5 ml reactievaatje met ca. 0,75 ml 'rijk' bacteriemedium (vloeibaar, bijlage 5)
2. in een 1,5 ml reactievaatje met ca. 0,75 ml 'arm' bacteriemedium (vloeibaar, bijlage 5)
3. in een lege petrischaal overgoten met 'bacterie'-agarmedium (bijlage 5) om anaërobe bacteriën aan te tonen.

De buisjes werden gedurende 5 dagen gekweekt bij 20°C op een schudder (200 rpm). Daarna werd het mengsel uitgeplaat op agarmedium met dezelfde samenstelling als het vloeibare medium.

Vaak waren er zoveel bacteriën aanwezig in het plantmateriaal dat de buisjes na één of twee dagen opensprongen. Ook was bacteriegroei vaak al na 5 dagen zichtbaar in de buisjes, zodat uitplaten niet meer nodig was. Door uitplaten van op het oog schone mengsels konden nog een aantal extra besmettingen worden aangetoond. Er werden nooit nieuwe besmettingen gevonden bij de test op anaërobe bacteriën.

4.2.5.2 Verwijderen/onderdrukken van infecties.

- a. Een warmwaterbehandeling van de stengeltjes (1 uur bij 40°C) vóór opsnijden in plakjes was over het algemeen niet afdoende om inwendige besmettingen te verwijderen. In een enkel geval verminderde een warmwaterbehandeling het percentage besmette plakjes en werd een groter aantal scheutjes per plakje gevormd. In andere gevallen steeg het aantal besmette plakjes na een warmwaterbehandeling. Wellicht

dat een warmwaterbehandeling het stengelweefsel enigszins verzwakt, waardoor inwendige besmettingen die normaal niet naar buiten zouden komen, een kans kregen.

- b. Kweek op medium met antibiotica was wel effectief in het onderdrukken van infecties (tabel 1). Als antibiotica werd een combinatie van vancomycine en cefotaxime gebruikt; beide in een concentratie van 100 mg/l. De antibiotica moeten filtersteriel aan het medium worden toegediend en ze zijn lichtgevoelig, zodat de media niet onnodig aan licht moeten worden blootgesteld.

Van 6 cultivars werden stengelplakjes op medium met of zonder antibiotica gekweekt. De plakjes werden elke drie weken op vers medium met of zonder antibiotica gezet.

Tabel 1:

Het percentage met bacteriën besmette bloemstengelplakjes, onder invloed van antibiotica (100 mg/l cefotaxime en 100 mg/l vancomycine) drie weken na inzet.

Cultivar	Zonder antibiotica	Met antibiotica
Gander	28	19
Apeldoorn	15	2
Leen van der Mark	22	0
Lucky Strike	4	4
Lustige Witwe	30	8
Monte Carlo	15	7

Bij alle geteste cultivars daalde het percentage besmettingen bij gebruik van antibiotica.

Schimmelinfecties die ook waargenomen werden, varieerden van 3 tot 15% per inzetting, waarbij geen verschillen gevonden werden tussen de twee media.

Na 12 weken werd de helft van de plakjes op medium met antibiotica overgezet op medium zonder antibiotica. Er werden bij deze plakjes niet meer 'nieuwe' infecties waargenomen dan dan bij de plakjes die continu op medium zonder antibiotica waren gekweekt. Dit wijst erop dat de antibiotica besmettingen verwijderden en niet alleen onderdrukten. De antibiotica hadden geen negatieve invloed op de regeneratie.

- c. Kweek op medium met PPM(tm) (Plant Preservation Mixture, Plant Cell Technology Inc.; een mengsel van onbekende samenstelling) was ook effectief tegen besmettingen. De werking van PPM berust op remming van de citroenzuurcyclus. Het middel dringt niet of slecht door in plantencellen, maar wel in de bacteriecel.

In een experiment met 'Gander' werd PPM op verschillende manieren toegepast. Er werden minimaal 50 explantaten per behandeling opgezet. De bloemstengeltjes werden gesteriliseerd zoals beschreven bij § 3.2.1 en op de volgende manieren behandeld:

1. Initiatiemedium B.1 (bijlage 4) zonder PPM.
2. Initiatiemedium B.1 met 5 ml PPM/l gedurende 3 weken.
3. De bloemsteeltjes werden gedurende 12 uur gespoeld op een schudder (40 rpm; donker; 20°C) in water met 1/4 MS en 10 ml PPM/l; één steeltje per 50 ml. Hierna werden ze opgesneden in plakjes en op initiatiemedium met PPM gezet.
4. Niet intacte bloemstengeltjes, maar plakjes werden behandeld als onder 3.
5. Als controle werden plakjes overnacht geschud zoals beschreven onder 3. zonder PPM.

Tabel 2:

Het percentage met bacteriën besmette plakjes bij gebruik van verschillende behandelingen met PPM(tm); drie weken na inzet.

Behandeling	Bacteriële infectie (%)	Regeneratie
1. kweek zonder PPM	34	Normaal
2. kweek met PPM	2	Normaal
3. bloemsteeltjes spoelen in PPM, verder als 2.	4	Minder
4. plakjes spoelen in PPM, verder als 2.	0	Geen; explantaten dood
5. plakjes spoelen zonder PPM	15 (na 3 weken) 30 (na 6 weken)	Normaal

De uitvalpercentages ten gevolge van schimmel- en bacteriële infecties werden gescoord na de initiatieperiode van 3 weken. Vervolgens werden de plakjes op uitgroei-medium geplaatst met 2 ml/l PPM als ze van PPM-media kwamen. Na enkele overzettingen werd een deel van de PPM-plakjes aangesneden en op regeneratiemedium zonder PPM overgezet om te controleren of onderdrukte infecties terug zouden komen. Daarnaast werd de regeneratiecapaciteit bepaald.

Kweek op medium met PPM onderdrukte/verwijderde de bacteriële infecties beter dan antibiotica (tabel 2). Spoelen in PPM remde de scheutvorming echter en dit effect was het sterkst als gesneden plakjes werden gespoeld. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt doordat veel wondvlak in contact kwam met PPM. Er is niet geregistreerd of verminderde regeneratie bij gespoelde bloemstengeltjes veroorzaakt werd door verminderde regeneratie op de plakjes gesneden van de uiteinden van de bloemstengeltjes.

Na 12 weken werden plakjes uit behandeling 2 en 3 overgezet op medium zonder PPM. Het percentage besmettingen liep in 6 weken op tot maximaal 12%.

4.2.6 Groeiregulatoren

4.2.6.1 Pulsen met het auxine 2,4-D

2,4-D is het meest toegepaste auxine voor embryo-inductie. In veel protocollen wordt begonnen met een hoge concentratie 2,4-D om embryogenese te induceren waarna uitgroei van de embryo's plaatsvindt op medium zonder of met een lage concentratie 2,4-D. Bij tulp bleek continue kweek op medium met 5 of 50 μM 2,4-D de uitgroei van de scheutjes te remmen.

Stengelplakjes werden gedurende 1 tot 3 weken op media met verschillende 2,4-D-concentraties opgekweekt (initiatiedium B.1, bijlage 4) en daarna overgezet op medium zonder 2,4-D (uitgroei-medium B.2, bijlage 4). Er werden ook extremere 2,4-D-concentraties getest. Scheutvorming op stengelplakjes die gedurende één uur, 24 uur of 1 week op medium met 250 μM 2,4-D of gedurende een aantal weken op medium met minder 2,4-D (50 μM) werd vergeleken.

De korte pulsen (24 uur) met 2,4-D gaven minder goede resultaten bij initiatie en daaropvolgende bolvorming dan de langere pulsen.

De beste concentratie en duur van de behandeling staan per cultivar vermeld in tabel 3.

Tabel 3:

Initiatie van scheuten op medium met verschillende 2,4-D concentraties en bolvormingspercentages van de gevormde scheuten.

Cultivar	Inductiebehandeling		Visuele beoordeling	Aantal scheuten per bol *)	Percentage bolvorming 1 ^o fase **)
	weken op 2,4-D	2,4-D (μM)			
Apeldoorn	3	5	soms glazig	95 (30-125)	26
Gander	3	5	deel fasciatie	60 (30-80)	8
Lucky Strike	3	5	erg dun	28 (12-48)	22
Leen van der Mark	1 3	5 5	veel glazig	31 (20-40) 33 (10-50)	25
Lustige Witwe	2	50	iel	54 (20-75)	10
Monte Carlo	2 3	50 50	deel glazig	15 (8-37) 23 (9-40)	35

*) Gemiddeld aantal scheuten per bol, waarbij alle bollen meegenomen zijn, onafhankelijk van inzetdatum of uitgroei in licht of donker. De aantallen tussen haakjes geven de uiterste getallen die gevonden werden per bol bij die inductiebehandelingen. Per bol werden ongeveer 10 stengelplakjes gesneden.

***) Percentages zijn gebaseerd op kleine aantallen scheuten (20-45).

4.2.6.2 Methyljasmonaat (Me-JA) en jasmonzuur (JA).

Algemeen

Me-JA en JA hadden een zeer positief effect op het aantal bolletjes dat per stengelplakje gevormd werd. Met Me-JA steeg het percentage van de scheuten dat een bolletje vormde van 5-10% naar 60-95% en met JA naar ongeveer 45%. Hoewel Me-JA betere resultaten gaf, heeft gebruik van JA de voorkeur, omdat toediening van Me-JA erg bewerkelijk is (zie toediening Me-JA in deze §). De optimale concentratie verschilt per cultivar; orde van grootte is 3-10 μM JA. Voor 'Gander' was 10 μM JA optimaal. Met Me-JA en JA werden minder scheutjes per explantaat gevormd dan zonder. Het percentage van de scheutjes dat vervolgens een bolletje vormde, was echter zo veel hoger met Me-JA/JA, dat er uiteindelijk veel meer bolletjes werden verkregen (tabel 4).

Tabel 4:

Het aantal scheutjes per stengelplakje, het percentage bolvorming en het gemiddelde versgewicht per bolletje onder invloed van JA.

JA (μM)	Aantal scheutjes/ stengelplakje	Percentage scheutjes dat een bolletje vormt	Gemiddelde versgewicht per bolletje (mg)
0	9.5 \pm 0.8	5.2	353.1 \pm 67.3
0.1	9.4 \pm 0.9	5.5	369.0 \pm 65.7
1	10.2 \pm 0.7	18.1	222.1 \pm 15.5
3	6.8 \pm 0.7	22.9	389.2 \pm 27.2
10	5.9 \pm 0.7	37.2	258.9 \pm 19.1
30	5.7 \pm 1	43.6	142.6 \pm 13.7

Toediening van Me-JA

Methyljasmonaat is een vluchtige vloeistof, wat toediening omslachtig maakt. Op een filtreerpapierje dat in de bovenkant van een buis was gerold werd een druppel oplossing met een bepaalde concentratie Me-JA gebracht. De buizen werden dichtgetapet opdat het Me-JA dat vervluchtigde in de buis zou blijven. Jasmonzuur (JA) kan gewoon vóór autoclavieren toegevoegd worden aan het medium.

Uitgroei van zeer kleine scheutjes tot een bolletje

Hoewel niet makkelijk te zien is welke scheut uiteindelijk een bolletje heeft gevormd en welke niet, bleek dat met Me-JA/JA ook zeer kleine scheutjes uit konden groeien tot bolletjes. Verder was het aantal bolletjes soms groter dan het aantal grote scheutjes (>1cm) dat naar bolvormingsmedium was gegaan. Dat betekent dat zeer kleine scheutjes of nog niet uitgegroeide groeipunten ook kunnen uitgroeien tot een bolletje. Hoe de aanwezigheid en hoeveelheid van "feeder-weefsel" een rol speelt, is nog niet duidelijk.

Hergebruik van het explantaat na kweek op Me-JA

Als na 12 weken regeneratie de scheutjes van een stengelplakje werden afgesneden en het oorspronkelijke plakje weer op vers medium werd gezet, ontstonden opnieuw scheutjes op het plakje. Deze tweede scheutvorming verliep veel beter als de plakjes in de eerste fase met Me-JA waren opgekweekt (kweek in de tweede 12 weken was op standaardmedium). Zonder toevoeging van Me-JA in de eerste fase, was de scheutvorming in de tweede fase minimaal. Een hogere concentratie Me-JA in de eerste fase gaf meer scheutvorming in de tweede fase. Verder was de kwaliteit van deze scheuten hoger (het bolvormingspercentage van de tweede-fase-scheuten steeg met de concentratie Me-JA in de eerste fase). Tot slot was ook de vermeerderingsfactor van de tweede-fase-scheuten hoger dan die van de eerste-fase-scheuten. Een samenvatting geeft tabel 5.

Tabel 5:

Scheutvorming in de tweede 12 weken onder invloed van Me-JA in de eerste 12 weken. Na 12 weken op medium met Me-JA werden de scheuten van het explantaat gesneden en werden de explantaten nogmaals 12 weken op standaard medium (zonder Me-JA) opgekweekt. De scheuten die in de tweede 12 weken ontstonden werden ofwel direct op bolvormingsmedium gezet ofwel gebruikt voor doorvermeerdering met daarna bolvorming.

Me-JA (ppm) in de eerste 12 weken	Aantal scheuten/ stengelplakje in de tweede 12 weken	Directe bolvorming: % bolvorming van scheuten gevormd tijdens de tweede 12 weken	DOORVERMEERDERING	
			Vermeerderingsfactor van scheuten gevormd tijdens de tweede 12 weken	% bolvorming van doorvermeerderde scheuten
0	2,1 ± 0,4	16,0		
25	3,4 ± 0,4	34,9	5,6	33
83	4,9 ± 0,4	37,9	4,1	34
250	7,2 ± 0,8	41,7	4,2	23

Interactie tussen Me-JA en auxines

Er werden aanwijzingen gevonden dat het effect van Me-JA afhangt van het type auxine dat gebruikt wordt. Me-JA bevorderde de bolvorming sterker met toenemende concentratie 2,4-D (1, 3, 10 en 30 µM) dan met toenemende concentratie NAA (zelfde concentraties).

4.2.6.3 Cytokinines

Voor scheutvorming bleek een cytokinine essentieel. De cytokinines BA en kinetine (5 of 15 µM) gaven bij 'Gander' de minst goede resultaten: minder reactieve stengelplakjes en erg lage bolvormingspercentages van de gevormde scheutjes (0-2,5%). Zeatine en 2i-P werkten vergelijkbaar en beter. Er werden 10-15 scheutjes per plakje gevormd en het bolvormingspercentage was 10-15%. 15 µM Zeatine of 2i-P gaf betere resultaten dan 5 µM.

Voor 'Apeldoorn' kon wel BA worden gebruikt; er zijn geen andere cytokinines getest voor deze cultivar. De twee geteste concentraties van 0,5 en 5 µM bij 'Apeldoorn' bleken geen grote verschillen in respons te geven. De lage concentratie is standaard gebruikt.

4.2.6.4 Paclobutrazol

Paclobutrazol (een remmer van de gibberelline-synthese) verhoogde het percentage bolvorming bij 'Gander' van 6% in de controle tot 40% met 9 mg/l paclobutrazol. Ook bij 'Apeldoorn' en 'Lucky Strike' bevorderde

paclobutrazol de bolvorming, waarbij vooral het effect bij 'Lucky Strike' erg groot was (van 20 naar 67%; eenmalig uitgevoerde proef). Met deze groeiregulator werden geen scheutjes maar direct bolletjes gevormd op de stengelplakjes. De doorvermeerderingscapaciteit van deze bolletjes was echter minimaal.

4.2.6.5 STS

STS (zilverthiosulfaat, een remmer van de werking van ethyleen), had een klein maar herhaalbaar positief effect. Met 0,1 μM STS steeg het percentage bolvorming van 3 naar 10% (cultivar Gander).

4.2.7 Mineralen

Bij de cultivar Apeldoorn zijn diverse minerale samenstellingen van het medium getest. Stengelplakjes werden eerst drie weken op medium met 5 μM 2,4-D gekweekt en daarna overgezet op medium met 0,5 μM BA. De volgende media zijn getest:

- MS volledige sterkte.
- MS 1/2-sterkte.
- MS-M : MS-medium volgens een formulering van Maliga et al., Nature (1975)255: 401-402. MS-medium waarbij de gehalten aan KNO_3 , NH_4NO_3 en MgSO_4 tot 1/5 zijn teruggebracht en de PO_4^{3-} verhoogd is met een factor 5.
- MS-P: MS-medium waarin de PO_4^{3-} verhoogd is tot 5,25 mM.
- MS-NP: MS-medium waarin de PO_4^{3-} verhoogd is tot 5,25 mM, en de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ -verhouding verschoven is naar 3,8 in plaats van 1,9.
- MS-G: MS-medium volgens Guylai et al., 1992. Een medium met ijzer en micro-elementen volgens MS maar een andere macroformulering: 11,9 mM NH_4NO_3 , 8,5mM KH_2PO_4 , 1,5 mM MgSO_4 , CaCl_2 0,6 mM.

Hoewel MS-M en MS-P tijdens de initiatiefase betere resultaten leken te geven, bleef van dat effect in de uitgroei en bolvorming niets over. MS-G en 1/2 MS gaven slechtere resultaten dan de standaardbehandeling. De resultaten van deze proeven gaven geen aanleiding om de mineralensamenstelling (normale sterkte MS-zouten) van het medium te wijzigen.

4.2.8 Suikers

Omdat tulpenbollen naast zetmeel ook fructanen (fructose-polymeren) bevatten als reservesuiker, is het effect van fructose op de scheutvorming bekeken. Omdat bij lelie mannose de regeneratie positief beïnvloedde, is ook het effect van mannose bekeken.

Eenzelfde molariteit van de verschillende suikers werd vergeleken (vergelijkbaar met 3% sucrose).

Scheutvorming verschilde niet met fructose of sucrose. De vermeerderingsfactor van op fructose geïnduceerde scheuten was dezelfde als die van sucrosescheuten. Mannose had een negatief effect op de scheutvorming: veel minder plakjes regenereerden scheuten en het aantal scheutjes per plakje was erg laag. De scheutjes waren te klein om te gebruiken voor doorvermeerdering.

4.2.9 Overige factoren

Floriglucinol (remt de afbraak van auxines) had geen stimulerend effect op de scheutvorming. Initiatie in vloeibaar medium in plaats van op agarmedium gaf nauwelijks scheutvorming en wel veel problemen met infecties.

4.3 Doorvermeerdering

4.3.1 Scheutjes in plakjes of overlans doorsnijden

De scheuten die op de stengelplakjes ontstaan kunnen worden doorvermeerderd door ze in plakjes of overlans doormidden te snijden. Hoewel er geen duidelijke verschillen in vermeerderingsfactoren werden gevonden tussen beide snijwijzen, hebben we gekozen voor opsnijden in plakjes vanwege de praktisch betere uitvoerbaarheid. Overlangs doorsnijden van scheuten is lastiger en alleen dikkere scheuten kunnen gebruikt worden. Een voordeel van overlans doorsnijden zou een grotere kans op axillaire nieuwvorming van scheuten zijn en dus kans op minder afwijkingen. Bij opsnijden in plakjes ontstaan de nieuwe scheutjes (vrijwel allemaal) adventief.

Bij 'Gander' werden geen eenduidige verschillen gevonden tussen polair of apolair ('op de kop') enten van de plakjes. Bij 'Apeldoorn' werden de plakjes standaard apolair geënt (§ 4.2.1).

De vermeerderingsfactor is steeds berekend als het aantal nieuwe scheuten dat gevormd was per opgesneden scheutje. De kwaliteit van de scheutjes uit de doorvermeerdering is bepaald door ze een bolvormingsbehandeling te geven.

4.3.2 Licht

Scheutjes die in het licht waren gekweekt vóór opsnijden, gaven een lagere vermeerderingsfactor dan scheutjes uit het donker, bij vrijwel alle onderzochte cultivars. Alleen de onderste plakjes reageerden bij deze groenkleurende scheuten. Het groene, verder gedifferentieerde weefsel was duidelijk minder reactief. Bij de 'donker-scheuten' trad regeneratie op over een groot deel van de scheut, hoewel er ook hier, net als bij de initiatiefase, cultivarverschillen waren. 'Gander' reageerde over bijna de hele scheut, terwijl de andere cultivars gemiddeld meer reactie gaven in de onderste plakjes. Waarschijnlijk is het topweefsel verder gedifferentieerd en minder regeneratief, zodat het niet meer te induceren is met de gebruikte concentratie groeiregulatoren.

Voor veel gewassen gaat initiatie in het donker beter dan in het licht. Opvallend was dat voor 'Lustige Witwe' in verschillende proeven hogere vermeerderingsfactoren werden verkregen als de scheutjes na opsnijden in het licht werden gekweekt (in het licht een vermeerderingsfactor van 3-4 en in het donker van 0,5-1,5). Bolvorming van 'Lustige Witwe'-scheutjes was echter zeer slecht, onafhankelijk van het ontstaan in het donker of in het licht.

4.3.3 Groeiregulatoren

In principe was de samenstelling van de vermeerderingsmedia dezelfde als die van de initiatiemedia. Alleen de 2,4-D-concentraties varieerden (bijlage 4).

Na opsnijden in plakjes werden de cultures elke 5-6 weken op vers medium gezet.

4.3.3.1 2,4-D

Als het auxine 2,4-D werd gebruikt, werden de plakjes standaard eerst 1-3 weken op medium met 2,4-D gekweekt en daarna elke 5 weken op vers medium zonder 2,4-D overgezet. Na elke doorvermeerderingscyclus volgde eerst een kweek van 1-3 weken op medium met 2,4-D om scheutvorming te stimuleren.

Tabel 6:

Doorvermeerdering van scheuten gevormd op medium met 2,4-D en bolvormingspercentages van scheuten ontstaan in de doorvermeerdering.

cultivar	Inductiebehandeling		Aantal scheuten/ reagerende scheut	Aantal scheuten per bol ^{*)}	Percentage bolvorming >50 mg
	tijd (weken)	[2,4-D] (μM)			
Apeldoorn	1	5	6 \pm 0,6	370	12
Gander	1	5	9 \pm 1,1	480	12
Lucky Strike	1	5	5 \pm 1,0	100 ^{**)}	6
Leen van der Mark	1	5	5 \pm 0,6	90	10
Lustige Witwe	3	5	6 \pm 0,7	100 ^{**)}	5
Monte Carlo	3	5	12 \pm 1,5	240 ^{**)}	27

^{*)} dat deze getallen lager zijn dan op grond van de vermeerderingsfactor per scheut verwacht kan worden, moet toegeschreven worden aan niet-reagerende 1^e-fase scheuten en 2^e-fase-scheuten die te klein bleven en daarom niet tot bolvorming zijn overgegaan. In de tabel zijn alleen grotere scheuten opgenomen.

^{**)} deze aantallen kunnen hoger worden als langer doorgegaan wordt met oogsten van 2^e-fase-scheuten van de 1^e fase-scheuten-explantaten

Er werden proeven uitgevoerd om de optimale concentratie en kweekduur op medium met 2,4-D te bepalen. Omdat bij de doorvermeerdering uitgegaan wordt van 'jonger' weefsel dat over het algemeen makkelijker regenereert, werden lagere concentraties gekozen dan voor de kweek van stengelplakjes in de eerste fase.

Alle zes cultivars werden getoetst. De beste behandelingen staan vermeld in tabel 6.

4.3.3.2 NAA en zeatine

De hier beschreven proeven zijn uitgevoerd met 'Gander'. Scheutjes werden doorvermeerderd op medium met 0,5 of 1 of 5 μM NAA gecombineerd met 5, 15 of 20 μM zeatine (3x3 matrix). De hoogste vermeerderingsfactor werd verkregen op medium met 5 μM NAA, onafhankelijk van de zeatineconcentratie (op medium met 5 μM NAA was de vermeerderingsfactor 3 en op medium met 0,5 μM NAA 1,5). Voor de daaropvolgende bolvorming leek de zeatineconcentratie echter belangrijker dan de auxineconcentratie: de meeste bolletjes werden verkregen op medium met 20 μM zeatine (12-24% bolvorming; 5-10% met 5 of 15 μM zeatine).

Een hogere concentratie NAA, 10 μM in plaats van 5, gaf geen hogere vermeerderingsfactor. Het percentage bolvorming daarna was hetzelfde of wat hoger dan dat met 5 μM NAA. Wel waren de bolletjes die ontstonden na doorvermeerdering op 10 μM NAA kleiner. 30 μM NAA was een te hoge concentratie en remde de regeneratie in de doorvermeerdering.

4.3.3.3 Methyl-jasmonaat (Me-JA)

Omdat Me-JA zo positief werkt in de eerste fase, zijn diverse proeven gedaan om het effect van Me-JA tijdens de doorvermeerdering te bekijken. Resultaten waren niet altijd eenduidig en de volgende conclusies konden worden getrokken: scheuten die geïnitieerd waren in aanwezigheid van Me-JA vermeerderden iets beter dan scheuten geïnitieerd zonder Me-JA. Aanwezigheid van Me-JA tijdens de doorvermeerdering had geen of een licht negatief effect.

4.3.4 Conditionering van de scheutjes vóór doorvermeerdering

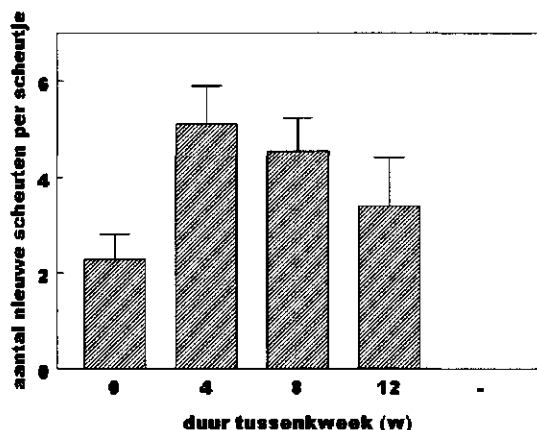
4.3.4.1 Tussenkweek

Kweek van de scheutjes vóór opsnijden in vloeibaar medium gedurende een aantal weken (een 'tussenkweek') bevorderde de doorvermeerdering.

Een tussenweek in standaardmedium verhoogde de vermeerderingsfactor van 'Gander' van 1,5 - 3 naar 2,5 - 5. Een tussenweek van 4 weken gaf betere resultaten dan één van 8 weken (Figuur 1).

Figuur 1:

Invloed van een tussenweek in standaard medium op de vermeerderingsfactor van 'Gander'-scheutjes



Het percentage bolvorming van de doorvermeerderde scheuten uit een tussenweek varieerde nogal: soms aanmerkelijk hoger dan in de controle en soms lager. Per saldo werden na een tussenweek meer bolletjes verkregen dan zonder tussenweek.

Bij vier andere cultivars dan 'Gander' was het effect van een tussenweek variabel (eenmalig uitgevoerd experiment). Voor de cultivars Apeldoorn, Lustige Witwe, Monte Carlo en Leen van der Mark werden vermeerdering en bolvorming onderzocht na doorvermeerdering zonder tussenweek of na een tussenweek van 8 weken op vast of in vloeibaar medium. De vermeerderingsfactor van 'Leen van der Mark' en 'Monte Carlo' was 2-3 x zo hoog na een vloeibare tussenweek. Bij 'Apeldoorn' verdubbelde de vermeerderingsfactor na een vaste tussenweek en bij 'Lustige Witwe' was de vermeerderingsfactor zonder tussenweek of met een vloeibare tussenweek gelijk.

Het bolvormingspercentage in de verschillende behandelingen liep uiteen. Uiteindelijk werden van 'Monte Carlo' de meeste bolletjes verkregen na een vloeibare tussenweek, van 'Apeldoorn' zonder tussenweek, van 'Leen van der Mark' zonder tussenweek of met een vloeibare tussenweek en van 'Lustige Witwe' werden alleen bolletjes verkregen na een vaste tussenweek (dit was ook in een eerder experiment gevonden).

Het effect van een tussenweek werd in belangrijke mate bepaald door de hormonen in het tussenweekmedium. Een tussenweek in medium zonder hormonen gaf namelijk zeer slechte vermeerdering en bolvorming. Ook tussenweek in alleen demiwater gaf over het algemeen zeer slechte resultaten.

Nadelen van een tussenweek zijn de bewerkelijkheid en de grotere kans op infecties door gebruik van vloeibaar medium.

4.3.4.2 Koudebehandeling

Een koudebehandeling van 6 weken bij 5°C (gegeven aan stengelplakjes met daarop scheutjes) stimuleerde de doorvermeerdering. Zonder kou was de vermeerderingsfactor 1,8 en met kou 3,4. De kwaliteit van de scheutjes uit de koudebehandeling was beter dan die zonder koude. Met koudebehandeling vormde 20% een bolletje en zonder kou slechts 4%.

4.3.4.3 De 'tweede golf'-scheutjes

Zoals te zien is in tabel 2 (§ 4.2.6.2.) was de vermeerderingsfactor van 'tweede golf' scheutjes hoger als de explantaten in de eerste 12 weken op medium met Me-JA waren gekweekt. Ongeveer 30% van deze scheutjes vormde een bolletje.

4.4 Bolvorming

4.4.1 Sucrose

Verhogen van de hoeveelheid sucrose in het bolvormingsmedium bij 'Gander', 'Lucky Strike', 'Lustige Witwe' en 'Monte Carlo' van 7% naar 9% had geen duidelijke invloed op de bolvorming. Het percentage scheutjes dat een bolletje vormde of het gewicht van de bolletjes werd niet verhoogd door de extra sucrose.

4.4.2 Temperatuur

Bij de cultivar Monte Carlo werden na de 10 weken bij 5°C, de volgende temperatuurregimes gegeven om bolgroei te bevorderen:

- 12 weken 25°C
- 12 weken 20°C
- 4 weken 15°C gevolgd door 8 weken 25°C.

Van deze temperatuurproef zijn de gegevens in tabel 7 beschikbaar.

Tabel 7:

Percentage bolvorming afhankelijk van de temperatuurbehandeling tijdens de bolgroei-fase, cultivar Monte Carlo.

Temperatuurbehandeling	Aantal bolletjes	Bolvorming (%)
12 weken 25°C	124	33
12 weken 20°C	130	47
4 weken 15°C + 8 weken 25°C	98	61

Bolgroei bij lagere temperatuur bevorderde het percentage bolvorming.

4.4.3 Aanwezigheid van het explantaat aan het scheutje

Voor goede bolvorming is het zeer belangrijk dat (een deel van) het explantaat aan het scheutje blijft zitten. Aanwezigheid van het explantaat was vooral belangrijk als de explantaten op medium met Me-JA waren gekweekt. Na kweek op medium met Me-JA vormde bijvoorbeeld 60% van de scheutjes een bolletje als de scheuten met een stukje explantaat naar bolvormingsmedium werden gezet en slechts 7% als de scheuten losgesneden op bolvormingsmedium werden gekweekt.

Tabel 8:

Bolvorming onder invloed van de aanwezigheid van een stuk explantaat tijdens de bolvorming. Scheutjes van Gander werden opgekweekt op stengelplakjes op medium met verschillende concentraties methyljasmonaat. Na 12 weken werden de scheutjes met of zonder een stuk explantaat op bolvormingsmedium gezet.

Me-JA (ppm)	Bolvorming van scheuten op een stuk explantaat		Bolvorming van losgesneden scheuten	
	Bolvorming (%)	Gewicht per bolletje (mg)	Bolvorming (%)	Gewicht per bolletje (mg)
0	7,7	207 ± 32	0,7	31
25	13,3	281 ± 15	3,8	132 ± 60
83	24,4	240 ± 25	9,9	85 ± 19
250	57,8	138 ± 17	7,3	59 ± 16

Dit zou kunnen betekenen dat het groeipunt van een scheut wellicht dieper in het explantaat zit (en dus niet wordt meegenomen als de scheut wordt losgesneden). Aan de andere kant vormt deze waarneming ook weer een aanwijzing dat hele kleine of nog niet uitgegroeide scheutjes ontstaan op medium met Me-JA ook kunnen uitgroeien tot een bolletje (§ 4.2.6.2). Alleen grotere scheuten werden losgesneden in dit experiment.

In een andere proef zijn de scheuten nauwkeurig beschreven, voordat ze op bolvormingsmedium werden gezet, om zo beter inzicht te krijgen in het type scheut dat een bolletje vormt. Er werden vier groepen onderscheiden (tabel 9):

- losse scheuten groter dan 1,5 cm (= 'groot'),
- grote embryo's met 'aanhangend' materiaal (grotere embryo's en callus = 'groot+C'),
- losse scheuten, kleiner dan 1,5 cm ('klein'),
- kleine scheuten met aanhangend materiaal (kleine embryo's en callus = 'klein+C').

Tabel 9:

Bolvorming van grote en kleine scheuten van 'Gander' en 'Monte Carlo' die met of zonder aanhangend materiaal (kleinere embryo's en callus) op bolvormingsmedium zijn gezet.

Type scheut	Aantal scheuten	Aantal bolletjes en percentage bolvorming
Gander		
Groot	34	17 (50%)
Groot + C	34	27 (79%)
Klein	11	6 (55%)
Klein + C	12	10 (83%)
Monte Carlo		
Groot	67	22 (33%)
Groot + C	93	66 (71%)
Klein	23	7 (30%)
Klein + C	103	67 (65%)

Bij 'Gander' en 'Monte Carlo' was de bolvorming van scheutjes met aanhangend materiaal beduidend beter dan die van losse scheutjes. Hoewel de aantallen voor 'Lucky Strike' en 'Lustige Witwe' niet erg groot waren, bleek dat ook hier de bolvorming in deze groep beter was.

Het gewicht van de ontstane bolletjes werd nauwelijks beïnvloed door de embryogrootte: 'Lucky Strike' en 'Lustige Witwe' vormden kleine bolletjes; bij 'Monte Carlo' waren bijna alle bolletjes zwaarder dan 50 mg en bij 'Gander' de helft, ongeacht het ingezette type scheut.

Als scheutjes met aanhangend materiaal werden ingezet, werden vaak meer bolletjes per scheut gevormd. Bolvorming was dus ook hier sterk afhankelijk van 'feeder'-weefsel.

4.5 Groei en bloei

4.5.1 Uitplanten op het veld, in de gaaskas of in een kweekcel

Uitplanten in het veld of de gaaskas gaf over het algemeen betere groei dan in een klimaatcel. Ook klimaatcellen met een hoge lichtintensiteit gaven in vergelijking met het veld minder bolgroei. Het is daarom aan te raden om zoveel mogelijk gebruik te maken van het natuurlijke groeiseizoen. Bolletjes die bijvoorbeeld in januari geplant kunnen worden, kunnen het best worden opgeplant in bakjes, een koudebehandeling krijgen in een klimaatcel en vervolgens naar de gaaskas worden overgezet. In de hier beschreven proeven zijn bolletjes nog half april/begin mei in de gaaskas geplaatst en zonder problemen verder gegroeid. Het succes van groei in de gaaskas hangt dan natuurlijk sterk af van de voorjaarsstemperaturen.

4.5.2 Groei- en bloeivergelijking van bolletjes uit weefselkweek met conventioneel vermeerderde bollen.

Omdat tulpenbolletjes uit weefselkweek vaak klein zijn, duurt het een aantal jaar voor ze gaan bloeien. Er zijn tot nu toe voornamelijk bloeigegevens beschikbaar van 'Gander', omdat dat project al langer loopt. In het voorjaar van 1997 hebben ongeveer 200 bollen van 'Gander' gebloeid. Tijdstip van opkomst en groeisnelheid waren gelijk aan die van 'gewone' Ganders. De bloemen zagen er vrijwel allemaal goed uit. Slechts twee planten hadden afwijkende bloemen en bladeren. Dergelijke afwijkingen komen ook in conventioneel vermeerderde partijen voor.

Van de cultivar Apeldoorn en Lucky Strike hebben een paar bollen gebloeid. De bloemen zagen er normaal uit.

In het najaar van 1997 zijn twee vergelijkbare partijen van 'Gander', een conventioneel vermeerderde en een uit weefselkweek, opgeplant in de gaaskas. Na de bloei in 1998 zijn beide partijen onder precies dezelfde condities bewaard en in het najaar van 1998 zijn hieruit opnieuw twee vergelijkbare partijen geselecteerd en uitgeplant.

In beide seizoenen waren de weefselkweekbloemen forser en zwaarder en hadden ze dikkere stelen dan de conventioneel vermeerderde bloemen. In het eerste jaar trad er wat aantasting door Botrytis op en de weefselkweekplanten waren duidelijk minder aangetast dan de conventioneel vermeerderde bollen. In beide jaren verklisterden de weefselkweekbollen minder dan de conventioneel vermeerderden. In beide seizoenen werden de zwaarste A-bollen verkregen uit de weefselkweekbollen.

Tabel 10:

Groei van conventioneel vermeerderde en weefselkweektulpen van 'Gander' in twee opeenvolgende seizoenen (s.e.= standard error).

1997-'98							
Uitplanten			Oogst				
	Versgewicht/ bol (g)	Gemidd. zifmaat	Versgewicht/ bol (totaal) (g)	Versgewicht/A- bol (g)	Versgewicht/B +H bol (g)	Steellengte (cm)*	Gewicht per bloem (g)
Weefselkweek							
gemiddeld	9.7	8.8	15.3	14.8	1.9		
s.e.	0.5	0.2	0.6	0.6	0.3		
aantal bloemen	94	94	94	94	24		
Conventioneel vermeerderd							
gemiddeld	9.5	8.9	17.7	13.8	2.8		
s.e.	0.5	0.1	0.9	0.6	0.2		
aantal bloemen	101	101	101	101	142		
1998-'99							
Uitplanten			Oogst				
	Versgewicht/ bol (g)	Gemidd. zifmaat	Versgewicht/ bol (totaal) (g)	Versgewicht/A- bol (g)	Versgewicht/B +H bol (g)	Steellengte (cm)*	Gewicht per bloem (g)
Weefselkweek							
gemiddeld	14.7	10.3	43.1	35.3	4.4	48.0	7.6
s.e.	0.6	0.1	1.7	1.3	0.4	0.6	0.2
aantal bloemen	76	76	76	76	136	71	71
Conventioneel vermeerderd							
gemiddeld	14.6	10.3	37.5	27.3	3.8	44.5	6.5
s.e.	0.5	0.1	1.4	1.1	0.3	0.6	0.3
aantal bloemen	79	79	79	79	213	70	71

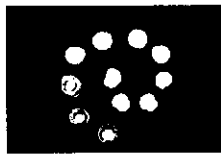
* Steellengte: gemeten is de lengte vanaf de inplanting van het onderste blad tot de onderkant van de bloem.

In het eerste seizoen groeiden de conventioneel vermeerderde bollen meer dan de weefselkweektulpen (gewicht van A-bol en overige klisters (B-H) bij elkaar). Dit werd veroorzaakt door sterkere verklistering en groei van de klisters in de conventioneel vermeerderde bollen. Tabel 10 vat de resultaten van beide seizoenen samen.

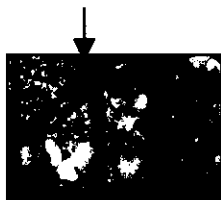
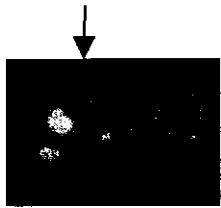
De twee partijen waren voor opplanten in 1997 niet op precies dezelfde manier bewaard. Omdat dit groeiverschillen kan veroorzaken, zijn beide partijen na de oogst in 1998 wel op precies dezelfde manier bewaard en opnieuw opgeplant in het najaar van 1998.

Beide partijen zullen in 1999 opnieuw worden opgeplant.

5 Protocol voor initiatie en vermeerdering van meristematische clusters in vloeibaar medium



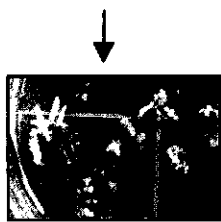
Behandeling uitgangsmateriaal



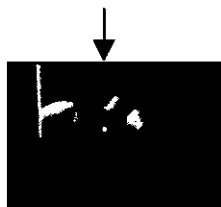
Initiatie



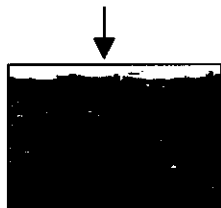
Doorvermeerdering



Regeneratie clusters



Bolvorming



Groei en bloei

5.1 Behandeling uitgangsmateriaal

Voor vermeerdering in vloeibaar medium wordt uitgegaan van bollen die op dezelfde manier bewaard zijn als beschreven voor vermeerdering op vaste media (§ 6.1). De cultivar Apeldoorn is gebruikt om de methode te ontwikkelen.

5.2 Initiatie

5.2.1 Sterilisatie

De sterilisatieprocedure is gelijk aan de procedure voor de vermeerdering op vaste media (§ 3.2.1).

5.2.2 Inductie meristematisch callus op vast medium

Snij na sterilisatie de bloemstengel in plakjes zoals beschreven bij § 3.2.2. Als medium wordt medium D1 gebruikt (bijlage 4). Zet gedurende 4 tot 6 maanden de explantaten elke 4 tot 5 weken over. Op het plakje ontstaat callus en 'knoppig'-weefsel (eerste fase-knoppen). Het callus is zeer variabel van structuur. Dit is nog niet het goede weefsel dat uiteindelijk voor vermeerdering in vloeibaar medium gebruikt kan worden (§ 6.2.1).

5.2.3 Start clustercultuur in vloeibaar medium

Breng bloemstengelplakjes met callus en eerste fase knoppen over in 50 ml erlenmeyers met vloeibaar medium (1 tot 3 g per 10 ml medium D.2.I. Bijlage 4). Kweek de erlenmeyers op een schudder (100 rpm) bij 20°C in het donker en ververs elke 2 weken, waarbij steeds ca 1/4 van het oude medium mee overgezet wordt (§ 6.2.2.).

5.3 Doorvermeerdering

5.3.1 Meristematische clustercultuur in vloeibaar medium

Na 4-6 weken ontstaan tweede fase knoppen (meristematische clusters) uit het oorspronkelijke stengelplakje. Het callus en de eerste fase knoppen groeien slecht en gaan gaandeweg dood. Deze cultures kunnen nu het beste één keer per 4 weken worden ververs (§ 6.3.1). Verwijder bij elke verversing (medium D.2.II, bijlage 4) dood materiaal. Plaats de erlenmeyers op een schudder (100 rpm) bij 20°C in het donker.

5.4 Regeneratie scheuten

Plaats de meristematische clusters in stukjes van ca 5 mm doorsnede op regeneratiemedium (D.3, bijlage 4, § 6.3.2). Na enige weken groeien de meristemen uit tot scheuten. Deze scheutvorming gaat enige maanden door. Zet de clusters met scheutvorming om de 4 weken op vers medium over. Scheuten van voldoende grootte kunnen op bolvormingsmedium worden gezet.

5.5 Bolvorming

Zet scheuten van voldoende grootte (1cm of langer) met een stukje clusterweefsel op bolvormingsmedium en gebruik dezelfde behandeling als beschreven bij § 3.4 om bolvorming te induceren (§ 6.4).

5.6 Groei en bloei

Plant bolletjes uit op dezelfde manier als beschreven bij 'Vermeerdering op vast medium' (§ 4.5).

6 Opmerkingen bij het protocol voor vermeerdering in vloeibaar medium

6.1 Uitgangsmateriaal

6.1.1 Bewaring

In een vroeg stadium van het onderzoek is, naast stengelplakjes, ook gebruik gemaakt van stukjes bolrokweefsel als uitgangsmateriaal. Dit uitgangsmateriaal loopt echter zeer snel terug in reactiviteit: alleen vers geoogste bollen gaven meristematische callusvorming. Na langere bewaring (1 maand) trad met dezelfde hormoonconcentraties nauwelijks nog callusvorming op. Een tweede, nog groter nadeel is de veel hogere infectiedruk die waargenomen werd in deze explantaten. Er is daarom al snel besloten om in verder onderzoek alleen bloemstengelplakjes te gebruiken.

6.1.2 Toepassing PPM en antibiotica

Infecties kunnen vooral in vloeibare cultures grote problemen veroorzaken. Voorzorgsmaatregelen om besmetting te voorkomen en vroegtijdige ontdekking van infecties zijn hier dan ook zeer belangrijk. Omdat de stengelplakjes eerst gedurende een aantal maanden op vast medium worden gekweekt, is het van groot belang nauwkeurig op infecties te beoordelen tijdens deze fase. De maatregelen zoals besproken in § 4.2.5. om infecties kwijt te raken of te onderdrukken zijn niet in vloeibare media geprobeerd. Bij gebruik van antibiotica in vloeibare media deed zich het probleem voor dat de pH van deze media te laag was voor effectieve werking van vancomycine en cefotaxime. In vloeibare cultures werden vaak pH-waarden rond pH=4 gevonden (in tegenstelling tot pH=6 in vaste media).

6.2 Initiatie

6.2.1 Initiatie van meristematisch callus op vast medium

Om een goed meristematisch callus te verkrijgen zijn veel experimenten uitgevoerd. Aanvankelijk is geprobeerd om callus te verkrijgen waarmee een suspensiecultuur (bijlage 1) zou kunnen worden opgezet. Gedurende het project werd echter nooit het geschikte callus gevonden, zodat geen verdere experimenten zijn gedaan in deze richting.

De meeste explantaten vormden meristematische clusters op vast medium (bijlage 1). Het was echter niet van te voren te zeggen of deze clusters zich ook in vloeibaar medium zouden gaan vermeerderen.

6.2.2 Initiatie van meristematische clusters in vloeibaar medium

Er zijn verschillende media uitgetest om callus te induceren en clusters te vermeerderen. In onderstaande tabel zijn de verschillende variaties weergegeven.

Tabel 11:

Combinaties van inductiemedia (vast) en vermeerderingsmedia (vloeibaar) die gebruikt zijn om een clustercultuur te verkrijgen.

Inductie Basismedium met:	2 ^o fase Vloeibaar basismedium met:	Resultaat
50 μM 2,4-D; 5 μM BA	10 μM 2,4-D; 5 μM BA	Goed qua kleur en vermeerdering
50 μM 2,4-D; 5 μM BA	10 μM 2,4-D; 5 μM BA + 3 dagen paclobutrazol 1mg/l	Redelijk
50 μM 2,4-D; 5 μM BA	30 μM 2,4-D; 5 μM BA	Slecht
1dag 250 μM 2,4-D, dan 5 μM ; 5 μM BA	10 μM 2,4-D; 5 μM BA	Slecht qua kleur en vermeerdering
50 μM 2,4-D; 0,5 μM BA	10 μM 2,4-D; 5 μM BA	Redelijk
50 μM 2,4-D; 5 μM BA + snijden van explantaten	10 μM 2,4-D; 5 μM BA	Kleur donker, goede vermeerdering

De in tabel 11 als eerste genoemde combinatie is verder als standaardmethode gebruikt.

Daarnaast werd een inductie onder standaardomstandigheden op vast medium met gelrite in plaats van agar gedaan. Het resultaat was verrassend: het callus was zeer licht van kleur, was zacht en los en bleef zacht en los in vloeibaar medium. Scheutvorming uit de clusters was echter slechter zodat Gelrite niet verder gebruikt is.

6.3 Doorvermeerdering

6.3.1 Doorvermeerdering clustercultuur

De meristematische clusters groeiden vrij langzaam in de vloeibare cultuur (tabel 12) en ook de kwaliteit ervan liep terug. De groeipunten van de clusters veranderden in callus, dat niet meer tot scheutvorming kon worden aangezet. Daarom werden de verversfrequentie en de 2,4-D-concentratie gewijzigd. De hypothese was dat gedurende de vloeibare cultuur de behoefte aan de hoge concentratie 2,4-D af zou nemen. Dit bleek het geval. Bij kweek van clusters met lagere concentratie 2,4-D (2 μM) trad minder verbruining op, terwijl de groeisnelheid verbeterde. De structuur van de clusters bleef goed.

Tabel 12:

De groei van de clustercultuur onder invloed van 2,4-D-concentratie en verversfrequentie.

Vloeibaar medium	Overzetfrequenties	Gewichtstoenamefactor in 8 weken
10 μM 2,4-D; 5 μM BA	per 2 weken	3,4
	per 4 weken	5,0
2 μM 2,4-D; 5 μM BA	per 2 weken	8,4
	per 4 weken	8,2

6.3.2 Regeneratie van scheuten uit meristematische clusters

Aanvankelijk werd voor regeneratie hetzelfde medium gebruikt als voor de directe scheutvorming (B2, bijlage 3). Het meristematische weefsel groeide echter slecht, stierf af en regenereerde zeer weinig goede scheuten. Scheutvorming werd aanzienlijk beter als een lage concentratie 2,4-D aan het medium (0,5 μM) werd toegevoegd. Lagere concentraties (0,2 μM) of hogere (1,0 μM) gaven minder regeneratie. Regeneratie op medium met NAA en zeatine was slechter. Regeneratiemedium met 2iP in plaats van BA gaf wat minder glazigheid. Dit laatste is echter een minder groot probleem voor de bolvorming dan aanvankelijk gedacht werd (§ 6.4).

Ook verlaging van de zoutenconcentratie tot de helft van de MS-macrozouten gaf een duidelijke verbetering. Omdat slechts één experiment gedaan werd, zal dit nog bevestigd moeten worden.

6.4 Bolvorming

Van scheutjes verkregen uit drie verschillende clustercultures zijn de bolvormingspercentages bepaald. Een positieve verrassing was het hoge percentage scheuten dat bolletjes vormde die meestal ook nog voldoende groot waren.

Tabel 13:

Bolvorming van scheutjes verkregen uit drie clustercultures van 'Apeldoorn'.

Suspensiecultuur	Percentage bolvorming *1		Gemiddeld bolgewicht van bolletjes > 50 mg	Percentage 'normale' bolletjes > 50 mg
	Totaal aantal bolletjes	Aantal bolletjes > 50 mg		
1997 – proef III	81	56	228	84
1997 – proef IV	66	42	136	88
1998	78	49	144	86

* = aantal gevormde bolletjes / aantal ingezette scheuten x 100

Van een groot aantal scheuten werd genoteerd of zij glazig waren bij start van de bolvorming. Soms bevonden zich op één explantaat zowel glazige als niet-glazige scheuten. Daardoor kon niet altijd met zekerheid de herkomst van een bolletje vastgesteld worden ("niet duidelijk" in tabel). Ook glazige scheutjes bleken bolletjes te kunnen vormen (tabel 14)

Tabel 14:

Het bolvormingspercentage afhankelijk van de toestand van de scheut.

Toestand scheut	Bolvorming (%)		
	Wel	Geen	Niet duidelijk
normaal	66	17	17
glazig	59	30	13

6.5 Groei en bloei

De groei van de verkregen bolletjes was normaal en vergelijkbaar met die van de bolletjes verkregen via de directe scheutvorming.

Opgemerkt dient te worden dat er nog geen bollen gebloeid hebben die via deze weg gekweekt zijn. In de eerste stappen van deze methode en speciaal bij de eerste inductie van het meristematisch callus wordt een vrij hoge concentratie 2,4-D gebruikt. Deze groeistof wordt wel eens als mogelijke veroorzaker van (somaklonale) variatie gezien. In de hier beschreven methode lijken clusters direct te ontstaan uit het oorspronkelijke explantaat en niet via een callus-tussenfase. De kans op afwijkingen is waarschijnlijk klein. Bolletjes zullen de komende jaren worden opgeplant om de bloei te controleren.

7 Conclusies en vervolgonderzoek vermeerdering van tulp met behulp van weefselkweek

Doel van het project 'Weefselkweekvermeerdering tulp: regeneratie op bloemstengelplakjes en doorvermeerdering was:

"verbetering van het bestaande protocol om introductie van nieuwe cultivars te versnellen".

De outputverwachting voor het onderdeel somatische embryogenese in het project 'Toepassing van embryogenese bij de vermeerdering en veredeling van tulp' was de volgende:

- een volledig protocol voor "directe" somatische embryogenese dat overgedragen kan worden aan het weefselkweekbedrijfsleven; informatie over vermeerderingssnelheid en de kwaliteit van de geproduceerde plantjes;
- een volledig protocol voor somatische embryogenese uit celsuspensies werd niet verwacht; wel dat duidelijk zou worden wat het perspectief hiervoor is, of grootschalige vermeerdering op deze manier realiseerbaar is, en hoe het vervolgonderzoek en overdracht naar het weefselkweekbedrijfsleven zou moeten worden aangepakt;
- informatie over mogelijke afwijkingen in planten afkomstig van somatische embryogenese.

Het protocol dat beschikbaar was bij aanvang van de projecten is aanzienlijk verbeterd. Er zijn verschillende combinaties van groeiregulatoren gevonden waarmee scheutjes kunnen worden geïnduceerd op stengelplakjes en kunnen worden doorvermeerderd. Het percentage scheutjes dat een bolletje vormde werd zeer sterk verhoogd door jasmonzuur/methyl-jasmonaat. Het lijkt haalbaar om met gebruik van jasmonzuur, zónder doorvermeerdering, in een jaar 100-200 bolletjes uit één bloemstengel te verkrijgen. Ook de doorvermeerdering werd verbeterd door toepassing van een tussenkweek of een koudebehandeling. Hoewel de aantallen scheutjes die verkregen worden na doorvermeerdering door opsnijden in plakjes vaak ruim voldoende zijn, blijft bolvorming na doorvermeerdering een knelpunt. Verder verschilden de regeneratiecapaciteit en vermeerderbaarheid van cultivar tot cultivar.

Groei en bloei van de bolletjes na uitplanten gaf geen problemen. Weefselkweekbolletjes presteerden beter dan conventioneel vermeerderde bollen. Omdat het 4 tot 5 jaar duurt voor een weefselkweekbolletje bloeit, zijn in het project geen gegevens verkregen over de bloei van bolletjes die verkregen zijn na kweek op het auxine 2,4-D. Deze gegevens komen vanaf 2000 beschikbaar.

Uitgangspunt bij het onderdeel 'somatische embryogenese' was dat vermeerdering door middel van embryogenese ook op vast medium aanmerkelijk sneller zou zijn dan vermeerdering met behulp van scheutvorming. In de loop van het project werd echter duidelijk dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen scheuten en (defecte) embryo's. Het protocol voor vermeerdering met behulp van scheutjes is dus in principe hetzelfde als voor vermeerdering met behulp van directe somatische embryogenese.

Door de gezamenlijke inspanning bij het onderdeel vermeerdering op agarmedia zijn nu verschillende initiatie- en vermeerderingsmedia beschikbaar. In het verslag wordt de bandbreedte van de concentraties van de groeiregulatoren gegeven die gebruikt zijn om te komen tot een werkzaam protocol.

Op het punt van vermeerdering in vloeibaar medium is meer bereikt dan verwacht werd. De cultivar Apeldoorn werd succesvol vermeerderd in vloeibaar medium via meristematische clusters. Regeneratie van scheutjes uit de clusters verliep zonder problemen. Een groot voordeel was dat embryo's geregenereerd vanuit deze clusters zeer hoge bolvormingspercentages gaven. Een nadeel was de vrij grote kans op het optreden van infecties bij kweek in vloeibaar medium. Het is nog niet duidelijk of deze methode voor meer cultivars werkt. Een echte suspensiecultuur bleek niet haalbaar.

In vervolgonderzoek zal de toepasbaarheid van het ontwikkelde protocol voor een brede reeks van cultivars, in het weefselkweekbedrijfsleven worden onderzocht. Ook de commerciële haalbaarheid zal worden bekeken.

Daarnaast zal met name aan het verbeteren van doorvermeerdering en bolvorming worden gewerkt.

8 Output vermeerdering van tulp met behulp van weefselweek

8.1 Publicaties

- Gerrits M.M. & H.J. van Telgen (1991).
Tulp van de toekomst wellicht uit het laboratorium.
Vakblad Bloemisterij 46 (42), 54-56. Bloembollencultuur (102) (19): 28-29; Vakwerk (65) 38: 10-11.
- Gerrits M.M. & A.M. Kuijpers (1995).
Weefselweek tulp. Eerste fase vermeerdering sterk verbeterd.
Bloembollencultuur (106) 20: 43
- Gude H., M. Dijkema, J. Custers en A. Wilmink (1995).
Snelle vermeerdering van tulp, hoopgevende vorderingen door PPO en PRI.
Bloembollencultuur (106):21-23, Vakwerk (69):10-11.
- Gude H., M. Dijkema (1996)
Werken aan een nieuwe vermeerderingsmethode tulp: embryogenese sneller dan weefselweek.
Bloembollencultuur (107), 36-37. Vakwerk (70), 32-33
- Kuijpers A.M. and Langens-Gerrits M. (1996).
Propagation of tulip in vitro.
Acta Bot. Neerl. 45(4):578
- De Jong A., H. Gude, M. Dijkema and P. Boonekamp (1997)
Somatic embryogenesis: applicable to a propagation system for tulip?
Acta Bot. Neerl. 46, 424
- Gude H. and M. Dijkema (1997)
Somatic embryogenesis in tulip.
Acta Hort. 430, 275-280
- Kuijpers A.M. and M. Langens-Gerrits (1997).
Propagation of tulip in vitro.
Acta Hort. 430:321-324
- Langens-Gerrits, M. and Kuijpers, A.M. (1997).
Regeneration of shoots from stem explants of tulip.
Acta Bot. Neerl. (46) 4:427-428
- Langens-Gerrits M.M. & Kuijpers, A.M. (1997).
Weefselweekvermeerdering tulp: goed resultaat eerste bloeiende tulpen uit buis.
Bloembollencultuur (108) 14: 36-37. Vakwerk (71) 26: 48-49
- Langens-Gerrits, M. and Kuijpers, A.M. (1998).
Improved propagation of tulip in vitro (abstr.).
In: COST 822, Physiology and control of plant propagation in vitro; Proceedings of the workshop held at Humboldt University, Berlin 1996 (Ed. G. Reuther). P90.
- H. Bouman (1999)
Somatic embryogenesis of horticultural crops exemplified with cyclamen and tulip.
In: Proceedings of the conference 'Development of Bulbous Flower Industry' (eds. T.-F. Sheen, J.-J. Chen, T.-C. Yang, M.-C. Liu) Taiwan Seed improvement and Propagation Station, Tai-chung, Taiwan. pp. 149-169
- H. Bouman, M. Langens, W. Schoo, M. Dijkema (1999)
Somatic embryogenesis of tulip.
Acta Biologica Cracoviensia 41 suppl. 1, 34
- Langens-Gerrits, M., Bouman, H., Dijkema, M. en Brouwer, I. (1999)
Weefselweek tulp: in twee jaar duizenden bolletjes uit vijf bollen.
Bloembollencultuur (110) 20: 36-37. Vakwerk (73) 39: 34-35. Vakblad voor de Bloemisterij (54) 42: 130

8.2 Posterpresentaties

Open dagen PPO (15-16 feb., 1995).

'Tulp: snelle vermeerdering via weefselkweek'. M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

'Snelle vermeerdering van bolgewassen via somatische embryogenese: tulp'. H. Gude en M. Dijkema

Open dagen PPO (14-15 feb., 1996)

'Weefselkweek via somatische embryogenese'. H. Bouman en T. Hol.

'Snelle vermeerdering van tulp via somatische embryogenese'. H. Gude en M. Dijkema.

'Vermeerdering van tulp met behulp van weefselkweek'. M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

Symposium NVPW, Wageningen (15 mrt. 1996)

'Propagation of tulip in vitro'. M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

7th International Symposium on Flower Bulbs, Israël. (10-16 mrt. 1996)

'Propagation of tulip in vitro'. M.M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

Open dagen PPO (5-6 feb. 1997)

'Weefselkweek via somatische embryogenese'. H. Bouman en T. Hol '

'Snelle vermeerdering van tulp via somatische embryogenese'. A. de Jong, M. Dijkema, R. Otten, H. Gude.

'Vermeerdering van tulp in vitro'. M.M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

Symposium NVPW, Wageningen (14 mrt. 1997) '

Regeneration of shoots from stem explants of tulip'. M.M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

Open dag PPO (4 feb. 1998)

'Vermeerdering tulp via somatische embryogenese'. H. Bouman en M. Dijkema.

Bloeiende tulpen uit weefselkweek'. M.M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers.

Symposium SBW, Rijpwetering (27 mrt. 1998)

'Vermeerdering tulp in weefselkweek' M. Langens-Gerrits, A.M. Kuijpers, H. Bouman, M. Dijkema.

Symposium IAPTC, Jeruzalem (14-19 juni, 1998)

'Methyl-jasmonate and jasmonic acid increase shoot formation in tulip regenerated in vitro'. M.M. Langens-Gerrits en A.M. Kuijpers

Onderzoekdagen PPO (3-4 feb. 1999).

Overzicht vermeerdering tulp in weefselkweek' M. Langens-Gerrits, I. Brouwer, H. Bouman, M. Dijkema, W. Schoo.

8.3 Lezingen en andere mondelinge presentaties

M. Gerrits (15 april, 1993).

'Stand van zaken weefselkweek tulp'. Bijeenkomst Stiverbol, St. Maarten.

M. Gerrits (11 mei, 1993).

Gewasdag tulp voor bedrijfsvoorlichters, IKC, Lisse.

M. Gerrits (15 dec. 1994).

Bijeenkomst Stiverbol, sectie Tulp, Akersloot

P. Boonekamp, M. Gerrits, H. Gude, A. de Jong (21 nov. 1995)

Bezoek aan Dr. M. LeNard, INRA Ploudaniël, Frankrijk.

P. Boonekamp (18 dec. 1995)

Bijeenkomst Stiverbol, sectie Tulp, Akersloot.

H. Gude (10-16 mrt. 1996).

'Somatic embryogenesis in tulip'. VIIIth Int. Symposium on Flower Bulbs, Israel.

M.M. Langens-Gerrits (9-13 okt. 1996).

'Improved regeneration of tulip in vitro'. Lezing COST-bijeenkomst Working group I, Berlijn

A. de Jong (23 maart 1997).

'Somatische embryogenese: toepasbaar als vermeerderingssysteem voor tulp?' Lezing NVPW symposium, Wageningen.

M. Langens-Gerrits (22 mei 1997)

'Vermeerdering van tulp in vitro'. Lezing Vergadering VGB-Productgroep Weefselkweek, Lisse.

M. Langens-Gerrits (20 nov. 1997)

'Afwijkingen in tulpen uit weefselkweek'. Presentatie tijdens een colloquium van het PPO.

H. Bouman (23 apr. 1998).

Enhancement of embryogenic callus formation in cucumber, cyclamen and tulip by transient increase of the 2,4-D concentration. Plant embryogenesis conference COST 822 en 824, Dublin, Ierland

- H. Bouman (6 aug. 1998).
Tissue culture research at the COWT: somatic embryogenesis of cyclamen and tulip. Lezing PBG Aalsmeer.
- H. Bouman (15 jan. 1999).
Somatic embryogenesis of horticultural crops exemplified with cyclamen and tulip. International Symposium on Development of Bulbous Flower Industry. Tai-chung, Taiwan
- M. Langens-Gerrits (4 mei 1999).
'Perspectieven voor vermeerdering van tulp in weefselkweek'. Lezing bij vergadering van de Productgroep Weefselkweek van de VGB.
- H. Bouman (21 sept.1999).
Somatic embryogenesis of tulip. IX International Conference of Plant Embryologists, Krakow, Polen
- M. Langens-Gerrits (25 nov.1999). 'Weefselkweekvermeerdering van tulp' Programmadag Innovatie Siergewassenketens, Wageningen

Verder is de stand van zaken in de projecten door verschillende onderzoekers steeds gepresenteerd tijdens bijeenkomsten van de groep 'Transformatie en regeneratie van bolgewassen' en de 'Weefselkweek studiegroep'

9 Microsporenembryogenese bij tulp

9.1 Doelstelling bij aanvang van het onderzoek

Verdubbelde haploïde, homozygote planten verkregen uit microsporen kunnen de efficiëntie van de tulpenveredeling verbeteren. Zulke planten tonen het hele palet van genetische eigenschappen van een tulpenplant op eenvoudige wijze. Dit maakt het mogelijk de genetische basis te ontrafelen van complex overervende eigenschappen. Homozygoten zullen ook het gebruik van moleculaire merkerveredeling bij tulp flink kunnen versnellen. De homozygote planten met bekende eigenschappen kunnen vervolgens gericht onderling worden gekruist wat nakomelingen op levert die genetisch alle hetzelfde zijn. Op deze manier wordt tevens een oplossing aangedragen voor het probleem van snelle vermeerdering van een nieuwe cultivar tot een eerste productiepartij.

Het doel van het onderhavige project was het verder ontwikkelen van de microsporen-embryogenese bij tulp voortbouwend op de eerdere resultaten van het Urgentieprogramma Bollenziekte- en -veredelingsonderzoek (Bulk, 1994; Bulk et al., 1994). De expliciete doelstellingen van het project zoals genoemd in de projectbeschrijving van 1995, waren:

- * verbeteren van het protocol, met name voor wat betreft embryo-inductie en -kieming, en voor plantvorming en uitplantbaarheid.
- * produceren van homozygote planten, 50 van elk van 15 interessante cultivars en 100-200 van enkele cultivars die gemakkelijk embryo's zouden maken; uitplanten van deze planten op het veld, opdat het veredelingsbedrijfsleven vervolgens de waarde van dit materiaal zou kunnen beoordelen.
- * analyseren van de verkregen planten voor wat betreft ploïdieniveau, homozygotie en mogelijke inteeltdepressie.

9.2 Werkwijze en protocol

Het belangrijkste doel van het project was het leveren van een groot aantal homozygote planten, ontstaan uit microsporen van verschillende cultivars, op het veld. Het werd in het begin van het project al snel duidelijk dat met het produceren van deze planten meteen begonnen moest worden en dat niet eerst uitgebreid aan protocolverbetering moest worden gewerkt. Enkele belangrijke stappen in het proces van microspore tot plant kosten bij tulp namelijk veel tijd, zoals de koudebehandeling voor het induceren van de kieming en de weefselkweek om bolletjes te maken voor uitplanten. Ook bleek uit het onderzoek van het Urgentieprogramma dat rekening moest worden gehouden met een lage slagingsfrequentie; een gemiddelde van 1-5 goede microsporen-embryo's uit één bol, en een kans van 2,5% dat deze embryo's een vitaal plantje in de grond opleveren, althans bij 'Rosario' (Bulk et al., 1994). Deze kennis was de reden dat we al vroeg in het project zijn begonnen grootschalige cultures in te zetten om op die manier het als doel gestelde aantal planten op het veld te bereiken. Elk jaar werden vanaf begin november tot begin januari de isolaties gedaan voor de grootschalige cultures, omdat in die periode het beste en gemakkelijkste uitgangsmateriaal voor handen is. De maanden daarna werden grotendeels in beslag genomen door overenten van embryo's op achtereenvolgens maturatie- en kiemingsmedia, en vervolgens het overzetten op groei- en bolvormingsmedia. De meeste proeven aan protocolverbetering werden uitgevoerd geïntegreerd in de grootschalige proeven; ongeveer 15% daarvan werd gebruikt voor experimenten. Een aantal andere protocolexperimenten werd gedaan buiten het grote inzetseizoen.

Voor de grootschalige cultures werd steeds het protocol gebruikt dat op dat moment het meest optimaal was, dus bijgesteld op basis van recente resultaten uit de protocolproeven. In paragraaf 9.3 wordt het protocol beschreven zoals dat er nu aan het eind van het project uitziet.

9.3 Protocol voor microsporencultuur bij tulp

1. Ga uit van droge tulpenbollen uit de 17°C-bewaring in de periode van begin november tot begin januari of van ijsstulpen die 1-2 dagen bij 18°C zijn ontdooid. De ijsstulpen zijn van januari tot april geschikt. Vroeg gerooide bollen, die meteen na rooien 2_ week bij 32°C zijn geïncubeerd, kunnen al vanaf midden oktober worden gebruikt.

2. Prepareer de bolspruit uit de bol en ontsmet deze: dompelen in 70% ethanol, afspoelen met water, 8 minuten ontsmetten in 2% NaOCl +Tween 20 (4 druppels per liter), en vervolgens de spruiten afzonderlijk 4x in ruim steriel kraanwater spoelen, respectievelijk 10 seconden, 1, 5 en 15 minuten.
3. Prepareer de bloemknop uit de spruit, isoleer vervolgens de antheren en breng deze over in een petrischaal met ca. 1,5 ml isolatiemedium (zie samenstelling bijlage 6). Maak met een scalpelmessje 4 tot 5 insnijdingen in elke anthere en druk met de vlakke kant van het mesje de inhoud naar buiten. De microsporen verdelen zich in het medium en er ontstaat een suspensie. Het isolatiemedium wordt altijd opgeslagen in de koelkast. Gebruik het wanneer de temperatuur ca. 12°C is.
4. Giet de microsporensuspensie over een steriele nylongaaszeef (150 µm) en vang het filtraat op in een 10 ml centrifugebuis. Spoel de petrischaal en het filter na met medium en vul uiteindelijk de buis aan tot 10 ml. Centrifugeer vervolgens 2 minuten bij 75 g. Een gekoelde centrifuge is niet nodig, als de temperatuur van het medium maar niet hoger wordt dan ca. 16°C.
5. Giet het supernatant af en resuspendeer het pellet in 10 ml isolatiemedium. Neem vervolgens een monster (20 µl) voor het bepalen van het totale aantal geïsoleerde microsporen m.b.v. een haemocytometer, en een tweede monster (100 µl) voor DAPI-analyse, voor het bepalen van het ontwikkelingsstadium en de vitaliteit/kwaliteit van de microsporen.
6. Centrifugeer opnieuw 2 min bij 75g en verwijder het supernatant.
7. Neem het pellet op in microsporenkweekmedium (zie bijlage 6) in de gewenste dichtheid voor cultuur, 4 x 10⁴ microsporen per ml, en plaat de suspensie uit in 6 cm TC-petrischalen (2,5-2,75 ml per schaal), die worden afgetaped met Parafilm.
8. Plaats de cultures bij 25°C in donker, en doe regelmatig waarnemingen door middel van microscopische (DAPI-analyse en omkeermicroscopie) en macroscopische (binoculair) observaties.
9. Open de schalen na 5-6 weken cultuur. De eerste 1-2 mm embryo's zijn dan vaak al gevormd en deze kunnen worden verzameld (opzuigen met pipet of oppakken met pincet). Vul het medium in de oorspronkelijke schaal aan tot het aanvankelijke volume. Deze procedure wordt elke 5-6 weken herhaald. Na een half jaar kunnen nog nieuwe embryo's ontstaan. Meest gebruikelijk is om embryo's van 2-3 mm groot over te enten.
10. Incubeer de verzamelde embryo's op embryomedium (zie bijlage 6) in standaard 6 cm petrischalen. De embryo's komen te liggen op een filtreerpapier (Whatman 1) met daaronder een ca 1,2 mm dik nylon gaas, 9-12 embryo's per filter. In de schaal wordt 1,5 ml medium gegoten, zodat het filter matig vochtig wordt. De cultures worden daarna 4-6 weken voortgezet bij 17°C in donker, gedurende welke periode de embryo's uitgroeien tot een lengte van 3-5 mm.
11. Plaats de schalen over naar 5°C in het donker voor koudebehandeling gedurende 12-16 weken. Eerst wordt de hoeveelheid medium gecontroleerd, en bij grote embryo's wordt het aantal teruggebracht tot 6-8 per schaal. Indien na 12 weken kieming te zien is, wordt de koudebehandeling gestopt; bij geen duidelijk waarneembare kieming wordt de koude nog 4 weken voortgezet.
12. Plaats de schalen na de koude eerst 3 dagen bij 10°C voor het acclimatiseren. Ent vervolgens de gekiemde en niet gekiemde embryo's over op een dik filter goed vochtig gemaakt met embryo-kiemingsmedium in 9 cm petrischalen, 6-9 embryo's per schaal, en plaats de cultures bij 17°C in donker. De kieming verloopt meestal langzaam en is vaak onvolwaardig. Om te kunnen beoordelen of bij de kieming gezond weefsel ontstaat worden de cultures na 4 weken in donker vervolgens 8 weken onder zwak licht geplaatst. Gezond weefsel kleurt dan groen.
13. Kiemende structuren met gezond weefsel overenten op tulpengroeiemedium (zie bijlage 6) met groeiregulators in honingpotten en kweken bij 17°C in donker om somatische embryogenese te stimuleren. Als de somatische embryo's beginnen uit te groeien (na ca. 8 weken) gaan de cultures 2 weken naar zwak licht. Vervolgens worden ze overgeënt op vers medium en 12 weken bij 5°C kou in het donker geplaatst.
14. Grote scheuten (≥5 cm lang en ≥2,5 mm dik) gevormd tijdens de koude overenten op tulpenbolvormingsmedium (zie bijlage 6) met 6% sucrose, en 16 weken kweken bij 17°C in donker.
15. Bolletjes met diameter ≥6 mm overbrengen naar grond, 4 weken 9°C geven voor beworteling, daarna 12 weken 5°C voor koudebehandelingen, dan laten uitgroeien bij 10°C (3 weken) en vervolgens 18°C in het fyton. Kritisch is of het *in vitro* verkregen bolletje gaat spruiten en na een seizoen in de grond inderdaad een nieuwe bol heeft gevormd.
16. Kleine scheuten gevormd tijdens stap 13 overenten op vers tulpengroeiemedium met 3% sucrose en 16 weken bij 17°C in donker kweken. Daarna overenten op vers medium en 12 weken koude geven. Deze procedure herhalen totdat grote scheuten zijn gevormd die op bolvormingsmedium kunnen worden overgeënt. Ook wanneer stap 14 geen goede bolvorming oplevert (boldiameter (<6 mm)), wordt de procedure van opeenvolgende perioden groei en kou herhaald totdat voldoende forse scheuten en bolletjes zijn gevormd.

9.4 Onderzoeksresultaten

De onderzochte onderwerpen en belangrijkste resultaten van het onderzoek worden hieronder beknopt weergegeven. Ze hebben geleid tot verbetering van het eerdere protocol dat werd gepubliceerd na het Urgentieprogramma (Bulk, 1994; Bulk et al., 1994).

9.4.1 Opeenvolgende ontwikkelingsstadia tijdens microsporenembryogenese

Microsporen van tulp in de overgang van het vroeg-ééncellig naar het midden-ééncellig stadium (zie voor schema Bulk, 1994) bleken het beste uitgangsmateriaal voor een succesvolle kweek. Vanuit een bol in het goede stadium kunnen 800.000-1.000.000 van deze microsporen worden geïsoleerd. Na incubatie van de microsporen is vrij snel te zien of de cultuur succesvol is of niet. Na ongeveer 1 week beginnen de eerste sporofytische delingen en na 2_o week zijn al een groot aantal microsporen met 4, 6 en zelfs 10 kernen te zien. Opvallend is dat op dat moment ook kluwens gekiemd pollen in de schalen zijn waar te nemen. Zulke kluwens bleken goede indicatoren te zijn voor kweken met sporofytische deling; bij afwezigheid van pollenkieming is er geen of nauwelijks sporofytische deling te vinden.

De kerndeling in de microsporen gaat vervolgens door en na 3-4 weken zijn in de kweek honderden zogenaamde multicellulaire microsporen gevormd. Deze ontwikkelen zich verder tot embryo's en embryo-achtige structuren. De overgang tot embryo kan vrij snel optreden, al in de vijfde week van de cultuur, maar vaak duurt dit langer, tot week 10-12 of nog later, terwijl een groot aantal multicellulaire microsporen nooit een embryo vormt. De embryo's zijn gemakkelijk te herkennen aan hun gladde huid: vaak zijn ze langgerekt en ze lijken dan op zygotische embryo's van tulp. Het beeld van de verdere embryonale ontwikkeling en het verloop van kieming en plantvorming is op te maken uit het eerder beschreven protocol.

9.4.2 Uitgangsmateriaal; jaarrond inzetten en verschillende cultivars

De microsporen van tulp zijn in het juiste stadium voor cultuur wanneer de bloem net volledig is aangelegd. Dit is eind oktober/begin november. Het goede microsporenstadium blijft aanwezig, totdat de bol na koudebehandeling gaat spruiten. In principe kan microsporencultuur dus jaarrond worden gestart door de bollen bloeivertragende behandelingen te geven. Ook kunnen zuidelijk-halfrondbollen worden gebruikt. We verkregen met speciaal behandelde bollen de volgende resultaten:

- -2°C bollen (ijstulpen): goede microsporencultuur was mogelijk van februari tot begin april, maar daarna liep de respons terug en vanaf juli werden geen embryo's meer gevormd. De vitaliteit van de geïsoleerde microsporen op dat moment was laag (15-40%);
- zuidelijk-halfrondbollen: eind mei/begin juni was de embryogenese matig tot redelijk. De vitaliteit van de microsporen was op dat moment goed (80-90%), maar liep vervolgens snel achteruit (eind juni 50-60%) en toen werden geen embryo's meer gevormd;
- ULO-bollen: in augustus en september werd microsporencultuur uitgetoet, maar er werd geen embryogenese verkregen.

Vergeleken met bovengenoemde bollen bleken verse bollen uit de 17°C-bewaring in de periode november/december veel beter en betrouwbaarder uitgangsmateriaal te zijn. Maar ook dat materiaal vertoonde fluctuaties in respons. Er werd bijvoorbeeld een heel sterk jaareffect gevonden (Tabel 15) en ook bleek de kans op succesvolle microsporencultuur bij de meeste cultivars van begin november tot begin januari af te nemen, van 75% naar 25% bij bijv. 'Rosario' en 'Lucky Strike' in seizoen 1996/97. Mede op basis hiervan ontstond de hypothese dat verse bollen waarin de bloem net is aangelegd, het beste uitgangsmateriaal vormen. Om dit idee te toetsen werd bij vroeg gerooide bollen op verschillende tijdstippen in het jaar de bloemaanleg geïnduceerd met de bedoeling om op die manier gedurende een lange periode te kunnen beschikken over fysiologisch jonge bloemen (Le Nard-methode, zie Krinkels, 1987). Van de vroeg gerooide, meteen geïnduceerde bollen konden vanaf medio oktober microsporen worden geïsoleerd die goed vitaal waren (≥90%) en die goede embryogenese gaven. De uitgestelde bloemaanleg-inducties, vanaf oktober of later, mislukten echter voor een groot deel als gevolg van sterke Fusariumaantasting van de bollen. Het continu produceren van fysiologisch jonge bloemknoppen werd twee seizoenen uitgetoet. Daarna werden geen nieuwe pogingen meer ondernomen, vooral omdat problemen verderop in de kweek meer aandacht opeisten.

Het succes van de microsporenembryogenese bij tulp bleek niet alleen afhankelijk te zijn van jaareffecten en bolouderdom, ook het genotype speelde een belangrijke rol. Alle onderzochte cultivars bleken in staat om vanuit microsporen embryo's te vormen, maar hun efficiëntie verschilde sterk (Tabel 15, 16 en 17), zowel wat betreft het aantal gevormde embryo's als de kans dat uiteindelijk goed levensvatbare plantjes werden gevormd. In de grote microsporencultuur-proeven van 1996/97 en 1997/98 bleek namelijk dat bij elke

volgende ontwikkelingsstap in de kweek een groot aantal individuen afviel (Tabel 16 en 17). Uiteindelijk bleven maar enkele cultivars over waarbij vitale plantjes ontstonden uit de microsporen (Tabel 16). Met name bij de cultivars Aladdin, All Bright, Christmas Marvel, Leen van der Mark en Rosario was dit het geval. Bij deze vitale plantjes trad geen uitval meer op bij herhaalde weefselkweek. Een aantal ontwikkelde zich fors en leverde bolletjes die werden uitgeplant.

Tabel 15.

Percentages bollen waaruit embryogene microsporencultures werden verkregen in seizoenen 1996/'97 en '97/'98. Betreffende bollen waren niet voorbehandeld met 32°C; alleen cultivars waarvan ≥ 8 bollen werden gebruikt in betreffende seizoen, zijn opgenomen.

Cultivar	Percentage responsieve bollen	
	Seizoen 1996/'97	Seizoen 1997/'98
Aladdin	100	61
Cantata	13	0
Cassini	37	8
Christmas Marvel	50	8
Fancy Frills	37	17
Gander	25	0
Leen van der Mark	88	33
Lucky Strike	57	19
Monte Carlo	85	58
Peach Blossom	88	38
Princeps	50	0
Prominence	66	63
Rosario	70	14

Tabel 16.

Resultaten van grote microsporencultuur-proef van seizoen 1996/'97

Cultivar*	Aantal gebruikte bollen	Aantal embryo's + embryo-achtige structuren	Aantal kiemende structuren (4-8 weken na koude)	Aantal met doorgaande kieming (nov. 1997)**	Aantal met kloon van ≥5 spruitachtige structuren (aug. 1998)	Aantal goede klonen (aug. 1999)
Aladdin	12	447	37	17	2	2
All Bright	12	146	40	21	5	5
Cantata	12	8	0	-	-	-
Cassini	16	268	11	4	0	-
Christmas Marvel	16	25	10	6	4	4
Fancy Frills	24	37	1	1	1	0
Gander	12	75	5	4	1	1
Leen van der Mark	20	275	57	31	3	3
Lucky Strike	28	122	0	-	-	-
Lustige Witwe	12	161	0	-	-	-
Madame Lefeber	12	8	0	-	-	-
Monte Carlo	24	141	0	-	-	-
Peach Blossom	12	147	8	6	1	1
Princeps	12	91	11	2	0	-
Prominence	16	191	3	1	0	-
Rosario	28	1117	398	248	45	43
Dyanito	8	15	0	-	-	-
Judith Leyster	8	48	0	-	-	-
Kees Nelis	4	2	0	-	-	-
Scheepers	4	5	0	-	-	-
White Dream	8	38	0	-	-	-
Yokohama	4	4	0	-	-	-

* De grote groep van 16 cultivars was afkomstig van het PPO, de kleine groep van 6 van het PRI. De laatste groep werd pas gebruikt in de tweede helft van december.

** De kieming is erg gevarieerd, meestal niet direct resulterend in een normale zaailing, maar met sterke fasciatie van het cotyl en ontstaan van meer groeipunten in plaats van zinkers op de cotylbasis.

Tabel 17.

Resultaten van grote microsporencultuurproef van seizoen 1997/'98

Cultivar	Aantal gebruikte bollen	Aantal embryo's + embryo-achtige structuren	Aantal kiemende structuren (4-8 weken na koude)	Aantal met doorgaande kieming en in kou geplaatst (mei 1999)*
Aladdin	32	264	39	3
Cantata	11	0	-	-
Cassini	20	3	-	-
Christmas Marvel	12	1	11	1
Fancy Frills	16	33	0	-
Gander	14	0	-	-
Leen van der Mark	32	7522	112	19
Lucky Strike	12	4	0	-
Madame Lefeber	8	6	2	1
Monte Carlo	36	273	70	0
Peach Blossom	8	9	0	-
Princeps	12	0	-	-
Prominence	8	32	2	1
Rosario	40	83	45	7

Doorgaande kieming houdt in vorming van somatische embryo's, waardoor de kans op vorming van een kloon groter is dan bij de vergelijkbare kolom in Tabel 16. De kieming heeft langer geduurd dan de periode die aangegeven staat in het protocol.

9.4.3 Inductie van sporofytische ontwikkeling en embryogenese

Algemeen wordt aangenomen dat een stressbehandeling belangrijk is voor de inductie van embryogenese vanuit microsporen (Custers et al., 1994; Touraev et al., 1997). In het Urgentieprogramma-onderzoek aan microsporencultuur van tulp kon geen effect van speciale stressbehandelingen worden vastgesteld (Bulk, 1994); daarom werd verondersteld dat combinatie van het in weefselkweek brengen van de microsporen tezamen met de relatief hoge kweektemperatuur van 25°C de benodigde stress opleverde. In ons onderzoek vonden wij echter een duidelijk inducerend effect van een warmtebehandeling van de bollen (Tabel 18). De bollen werden bij 32°C geplaatst meteen voorafgaand aan het isoleren van de microsporen, 5 dagen was de optimale duur. Deze stressbehandeling bevorderde met name de overgang van de multicellulaire microspore naar embryo. Dit is ook het grootste probleem bij tulp; bij de meeste cultivars is te zien dat er veel multicellulaire microsporen ontstaan, maar daarna gebeurt er niets meer. Het effect van de voorbehandeling van de bollen bij 32°C werd voor het eerst gevonden bij 'Leen van der Mark' in seizoen 1995/'96. Het jaar daarop werd de behandeling bij alle cultivars uitgetoetst en ook bij de zuidelijk-halfrondbollen, maar het effect was gering. 4 Cultivars reageerden positief, maar 3 andere negatief. In 1997/'98 werd alleen 'Leen van der Mark' voorbehandeld en toen was een geweldig effect te zien (Tabel 18). In 1998/'99 werd een duidelijk positief effect gevonden bij 'Rosario' en 'Leen van der Mark', de enige cultivars waarmee in dat seizoen werd gewerkt. Op grond van deze resultaten lijkt warmtevoorbehandeling van de bollen een goede stressbehandeling om de microsporenenembryogenese bij tulp te induceren. De behandeling dient nog geoptimaliseerd te worden voor de verschillende cultivars. Verder verwachten we ook jaarverschillen in het effect van de behandeling.

Tabel 18.

Embryovorming vanuit microsporen na 5 dagen voorbehandeling van de bol bij 32°C bij 'Leen van der Mark' in seizoen 1997/'98.

Voorbehandeling	Aantal behandelde bollen	Responsieve bollen (%)	Gemiddeld aantal embryo's per bol
-	16	44	3
+	12	100	620

Drie andere behandelingen werden uitgetoetst om de beginfase van de microsporencultuur, met name de overgang van microspore naar embryo, te verbeteren:

- verschillende temperaturen (22, 25 en 28°C): de onderzochte temperaturen beïnvloedden het percentage microsporen met sporofytische ontwikkeling niet; alleen bij 22°C trad meer gametofytische ontwikkeling en pollenkieming op en bij 28°C was de kwaliteit van de gevormde multicellulaire microsporen minder goed;
- maltose als koolstofbron in het medium: bij een aantal gewassen is gevonden dat sucrose in het medium nadelig is voor de microsporen, omdat ze deze suiker veel te snel metaboliseren. Maltose is een suiker die veel langzamer wordt gemetaboliseerd (Scott and Lyne, 1994; Scott et al., 1995). In onze proeven vonden we echter geen positief effect van maltose;
- feeder-cultures: bij microsporencultuur van tarwe bevorderen ovariumplakjes in de cultuur doorgaande ontwikkeling van de multicellulaire microsporen tot embryo (Meija et al., 1995; Touraev et al., 1997). Wij onderzochten ovariumplakjes en bloemstengelplakjes als feeders, maar deze explantaten hadden geen effect.

9.4.4 Embryomaturatie en -kieming

In het microsporenenembryogenese-onderzoek van het Urgentieprogramma werd gevonden dat de uitgroei van de embryo's en embryo-achtige structuren werd bevorderd door ze van vloeibaar MS-medium met 13% sucrose over te zetten op vast MS-medium met 8% sucrose en daarna op vast MS-medium met 3% sucrose (Bulk, 1994). Daarna werd de koudebehandeling gegeven. Deze stapsgewijze verlaging van de sucrose zou belangrijk zijn voor de maturatie van de embryo's. Wij deden daarom experimenten waarin de sucrose in nog kleinere stappen werd verlaagd en de totale periode tot aanvang van de koude werd verlengd. Deze behandelingen bleken echter nadelig te zijn; de nieuwe manier van "maturatie" leidde tot vorming van secundaire embryo's. Deze zijn veel kleiner dan de oorspronkelijke embryo's ontstaan uit de microsporen en kiemen niet. Daarom werd teruggedaan naar het oude systeem en tevens werden de cultures na de overenting op medium met 8% sucrose voortaan geplaatst bij 17°C. Eerder was altijd 25°C aangehouden tot het begin van de koudebehandeling, maar de algemene mening was dat deze hoge temperatuur de secundaire embryogenese ook zou bevorderen. Na deze aanpassingen trad geen secundaire embryogenese meer op voor de koudebehandeling.

De kieming bleef echter een probleem. Een groot aantal embryo's kiemde niet, en die wel kiemden deden dat erg onvolwaardig en vielen later af (Zie Tabel 16). In een aantal proeven werd daarom de mogelijkheid onderzocht om de kwaliteit van de embryo's, voordat ze de koude in gaan, te verbeteren. De volgende factoren, met name bedoeld om de vorming van het meristeem in het embryo te bevorderen, werden bestudeerd:

- hoge concentratie sucrose van 13% handhaven tot na de koude: de overweging was dat zygotische embryo's tot na de kou in het zaad zitten in een omgeving die een hoge osmolariteit heeft. In vergelijking met verlaging van de sucroseconcentratie tot 3% gaf het continu op 13% houden van de embryo's een hoger kiemingspercentage, maar de kwaliteit van de kieming werd niet echt verbeterd;
- jasmonzuur-behandeling voorafgaand aan en/of tijdens de kou: dit had geen effect;
- ABA behandeling al of niet gevolgd door licht uitdrogen van de embryo's voorafgaand aan de kou: dit had een nadelig effect;
- behandeling met cytokinine, BA al of niet in combinatie met IBA, op verschillende tijdstippen voorafgaande aan de kou: 0,5-1 mg/l BA leek gunstig voor de kieming.

Een nadeel van deze proeven was dat ze voor het grootste deel werden uitgevoerd met embryo's van 'Leen van der Mark' wat in het algemeen een slechte kiemer is. Alleen van 'Leen van der Mark' was in het betreffende seizoen 1997/'98 een zeer groot aantal embryo's beschikbaar. In het seizoen 1998/'99 is het effect van cytokininebehandeling opnieuw onderzocht bij embryo's van 'Rosario' en 'Leen van der Mark'. Deze embryo's zijn kort voor het moment van schrijven dit rapport uit de kou gekomen. Hun kiemingsresultaat was iets beter dan in eerdere jaren, maar verbetering van de plantvorming werd niet gevonden.

In de opeenvolgende seizoenen werd ook onderzocht of maturatie en kieming beter op vloeibaar of op vast medium kon gebeuren. Bij vast medium werden tevens Phytigel- en Daichin-agar vergeleken. Duidelijke effecten werden in deze proeven niet gevonden, en we hebben uiteindelijk gekozen voor vloeibaar medium.

9.4.5 Plant- en bolvorming

Kieming was erg onvolwaardig en meestal trad geen directe overgang van embryo tot plant op. Op de beste kiemende structuren werden wel regelmatig somatische embryo's gevormd waar vervolgens plantjes uit konden worden gekweekt. Een belangrijk verschil tussen de microsporenembryo's en somatische embryo's is dat de laatste geen koudebehandeling nodig hebben voor verdere ontwikkeling. Ze vormen vanzelf een scheutje.

We hebben onderzocht of de somatische embryogenese kon worden bevorderd door groeiregulatoren aan het medium toe te voegen. Aanwijzingen werden gevonden voor een positief effect van exogeen cytokinine. Door herhaalde cycli van groei en kou was het vervolgens mogelijk kloontjes van plantjes te vormen uit de embryo's. Gedurende deze periode vielen er echter ook nog steeds individuen af; er trad dus selectie op. Kloontjes afkomstig van de microsporencultures van seizoen 1996/'97 zijn inmiddels zover doorontwikkeld dat een aantal ervan bolletjes maakte die groot genoeg waren om uit te planten; 20 bolletjes zijn uitgeplant in grond.

Tot nu toe zijn alleen bolletjes afkomstig van microsporencultures uit het Urgentieprogramma voor langere tijd in grond geteeld. De slagingskans van het uitplanten was 13%, dat wil zeggen dat het in vitro bolletje met succes een nieuwe bol vormde. Plantjes uit deze bolletjes hebben nu 4 jaar op het veld gestaan, maar ze zijn in die periode nog nauwelijks groter geworden. Het laatste jaar waren de bladeren van deze plantjes nog steeds erg klein, 9-13 cm lang en 8-11 mm breed.

9.4.6 Ploïdieniveau en AFLP-analyse

Het ploïdieniveau werd bepaald aan embryo's en aan planten. Van embryo's van 'Rosario' was 85% diploïd en 15% haploïd, terwijl bij de embryo's van 'Leen van der Mark' een omgekeerde verhouding werd gevonden; 17% diploïd en 83% haploïd. Oryzaline-behandeling in het begin van de cultuur veranderde de verhouding bij 'Leen van der Mark' niet. Opvallend was dat bij ploïdiebepaling op plantniveau nooit haploïden werden gevonden; 73% van de plantjes was diploïd en 17% tetraploïd. Dit duidt op chromosoomverdubbeling tijdens de kweek en/of selectief nadeel van haploïde planten.

AFLP-analyse toonde een vereenvoudigd bandenpatroon aan van de plantjes uit de microsporencultuur vergeleken met het patroon van de ouder, hetgeen erop wijst dat de plantjes inderdaad uit microsporen zijn ontstaan. De segregatie van enkele polymorfismen was wat scheef. Dit kan duiden op koppeling met genen die gunstig zijn voor de regeneratie.

9.5 Plantmateriaal

Op het moment van schrijven staat het meeste materiaal dat is gemaakt tijdens het project nog in weefselweek. Voor aantallen en ontwikkelingsstadium van het materiaal uit 1996/'97 en 1997/'98 wordt verwezen naar Tabel 16 en Tabel 17. Twintig bolletjes van seizoen 1996/'97 zijn uitgeplant. Van 1998/'99 zijn de aantallen goed uitziende embryo's die op dit moment na de kou over zijn 335 van 'Leen van der Mark' en 120 van 'Rosario'. Van het Urgentieprogramma staan 3 plantjes afkomstig van 'Rosario' op het veld. Ze groeien zeer armtierig, ze zijn diploïd en tonen bij AFLP-analyse een vereenvoudigd bandenpatroon en zijn dus ontstaan uit microsporen.

10 Conclusies en aanbevelingen microsporenembryogenese project

10.1 Conclusies

In het project is de doelstelling om grote aantallen verdubbelde haploïde planten te produceren en uit te planten op het veld niet gehaald. De initiatie van sporofytische deling vanuit microsporen bleek bij tulp goed mogelijk en doorgaande ontwikkeling van multicellulaire microsporen naar embryo's kon zelfs worden verbeterd, maar daarna begonnen de problemen. Grote aantallen individuen vielen af gedurende de opeenvolgende stappen in de cultuur. Met name de kieming was een bottleneck. Individuen die overbleven, ontwikkelden zich verder zeer traag en slecht. Hier werden geen echte oplossingen voor gevonden. Het algemene idee is dat deze problemen het gevolg zijn van sterke inteeltdepressie.

In de populatie embryo's werden zowel haploïde als diploïde individuen aangetroffen. Dit geeft aan dat in elk geval embryo's zijn ontstaan uit haploïde microsporen. Na uitgroei tot plant bleken alleen nog maar diploïde en een klein percentage tetraploïde planten aanwezig te zijn. Dit is een aanwijzing dat het haploïde niveau nadelig is voor de plantontwikkeling. AFLP-analyse van deze planten liet een sterk vereenvoudigd bandenpatroon zien ten opzichte van de ouders, hetgeen erop wijst dat de plantjes inderdaad uit microsporen zijn ontstaan. De segregatie van enkele polymorfismen was scheef, wat kan duiden op koppeling met genen die gunstig zijn voor de regeneratie.

In het onderzoek kon een bijzondere verbetering van het protocol worden bewerkstelligd. Voorbehandeling van de bollen bij een temperatuur van 32°C had een duidelijk inducerende werking op de embryogenese vanuit de microsporen. Deze vondst past goed in het algemeen geaccepteerde concept dat voor inductie van embryogenese uit microsporen stress nodig is. Deze stressbehandeling moet voor de verschillende cultivars van tulp nog wel worden geoptimaliseerd. Overige verbeteringen in het protocol waren minder opzienbarend. Meestal kon alleen maar een tendens worden waargenomen. De variabele samenstelling van de (uitsplitsende) populaties en de (door inteeltdepressie veroorzaakte) lage vitaliteit van veel individuen bemoeilijkte het onderzoek aan protocolverbetering in sterke mate.

10.2 Vervolgonderzoek en aanbevelingen

Op basis van de verkregen resultaten is het niet zinvol om verder onderzoek te verrichten aan verbetering van het protocol. Eerst zal op zijn minst duidelijk moeten zijn of planten die ontstaan uit de microsporen van betekenis kunnen zijn voor de veredeling van tulp. Aanbevolen wordt om in elk geval het nog aanwezige materiaal verder af te werken en uit te planten in grond. Een cruciale vraag is namelijk hoe de fertiliteit van de verdubbelde haploïde planten zal zijn. Deze aanbeveling is conform het oordeel van de begeleidingscommissie gedaan op 8 juni 1999.

11 Output microsporenembryogenese-project

11.1 Publicaties

- J.B.M. Custers, E. Ennik, W. Eikelboom, J.J. Dons en M.M. van Lookeren Campagne, 1997.
Embryogenesis from isolated microspores of tulip: towards developing F1 hybrid varieties. *Acta Horticulturae* 430: 259-266.
- J.B.M. Custers, E. Ennik, en M.M. van Lookeren Campagne, 1998.
Microsporencultuur tulp; verdubbelde haploïden verbeteren veredeling. *Prophyta* (52) 4: 21-23.

11.2 Posterpresentatie

- Custers, E. Ennik, W. Eikelboom en M.M. van Lookeren Campagne,
IXth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, June 14-19, 1998, Jerusalem. J.B.M.
Potential of microspore embryogenesis for future tulip (*Tulipa gesneriana* L.) breeding,

11.3 Lezingen

- J.B.M. Custers,
Embryogenese uit microsporen van tulp. Tulpenmiddag voor de praktijk op PRI, 25 april 1996.
- J.B.M. Custers, 11 november 1996.
Perspectieven van verdubbelde haploïden voor de siergewassenveredeling; eerste stappen bij microsporencultuur van tulp. Lustrum Symposium NVPW, Aalsmeer.
- J.B.M. Custers, 10-16 maart 1996.
Microspore embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). VIth International Symposium on Flower Bulbs, Israël.
- J.B.M. Custers, 6-7 december 1996.
Microspore embryogenesis in tulip. 2nd Meeting of WG1 (Monocots) of EU-COST-Action 824 'Gametic Embryogenesis', Wenen, Oostenrijk.
- J.B.M. Custers, 11-14 september 1997.
High frequency initiation of embryogenesis in microspore culture of tulip. EU-COST-824 'Gametic Embryogenesis' Meeting, Sjusjoen, Noorwegen
- J.B.M. Custers,
De microsporencultuur van tulp. Programmadag 'Innovatieketens Siergewassen', 25 november 1999, Wageningen.

12 Referenties

- Bulk, R.W. van den, 1994.
Op weg naar homozygote planten uit microsporen van bolgewassen. Eindverslag van het 'Urgentieprogramma Bollenziekte- en veredelingsonderzoek', PRI, Wageningen, 19pp.
- Bulk, R.W. van den, H.P.J. de Vries-van Hulten, J.B.M. Custers and J.J.M. Dons, 1994.
Induction of embryogenesis in isolated microspores of tulip. *Plant Science* 104: 101-111.
- Custers, J.B.M., J.H.G. Cordewener, Y. Nöllen, H.J.M. Dons and M.M. van Lookeren Campagne, 1994.
Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 13: 267-271.
- Huischer M., H.T. Krijgsheld and P. v.d. Linde, 1992.
Propagation of shoots and bulb growth of tulip in vitro. *Acta Hortic.* 325:441-446.
- Guylai et al.,
Plant Cell Rep. (1992)11:266-269
- Krinkels, M., 1987. Frank de Greef onderzoekt vertraging tulpen; methode Le Nard biedt nog geen perspectief. *Bloembollencultuur* no. 25: 8-9.
- Scott, P. and R.L. Lyne, 1994.
Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 61-65.
- Scott, P., R.L. Lyne and T. ap Rees, 1995.
Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 197: 435-441.
- Touraev. A., O. Vicente, and E. Heberle-Bors, 1997.
Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* 2: 297-302.

Nawoord

De samenwerking werd door de verschillende onderzoekers als erg nuttig ervaren. Tijdens de gezamenlijke bijeenkomsten werd informatie uitgewisseld, bijvoorbeeld over media, en werden suggesties voor verder onderzoek besproken. De brede kennis van weefselweek, anatomie en fysiologie van de tulp, aanwezig bij het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving was zeer bruikbaar voor het vermeerderings- en veredelingsonderdeel.

Uit vergelijking van de morfologie en ontwikkeling van somatische embryo's met die van microsporenembryo's en zygotische embryo's bleek dat somatische embryo's niet strikt de embryonale ontwikkelingsroute van zygotische embryo's volgen. Ze gaan snel over tot voortijdige kieming en scheutvorming. Kieming inducerende behandelingen, zoals bij zygotische embryo's en microsporenembryo's, zijn niet nodig. Hierdoor was de weefselweek van somatische embryo's eenvoudiger dan die van zygotische embryo's en microsporenembryo's.

Bij de aanvang van het project werd verwacht dat inzicht in met name de rijping en kieming van microsporenembryo's zou kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van methoden voor kieming van somatische embryo's. Dit is maar beperkt gebeurd, omdat vorderingen in het microsporenembryogenese onderzoek wat langzamer werden gemaakt dan verwacht.

Bijlage 1:

WAT IS WAT?

1. Wat is somatische embryogenese ?

Somatische embryogenese betekent dat een embryo (in dit geval doorgroeiend tot een nieuw plantje) ontstaat uit een lichaamscel (= 'somatische' cel). Gewoonlijk ontstaat een embryo na bevruchting van een eicel door een zaadcel (stuijmeel) en er vindt hierbij vermenging plaats van de erfelijke eigenschappen van beide ouders. Bij somatische embryogenese ontstaat het embryo niet uit geslachtscellen maar uit 'gewone' cellen en er vindt er dus geen vermenging van erfelijke eigenschappen plaats. Een somatisch embryo heeft daarom in principe dezelfde genetische samenstelling als de plant waaruit het is ontstaan. Dit is niet het geval als de moederplant niet genetisch homogeen is (chimaer). Een somatisch embryo van tulp ziet er in het ideale geval als volgt uit:

2. Wat is een chimaer?

Een chimaere plant is genetisch niet-homogeen. Met andere woorden, verschillende delen van de plant hebben een verschillende genetische samenstelling. Het afwijkende deel kan groot of klein zijn: bijvoorbeeld een witte rand aan een rode bloem of een bontbladige plant. Niet altijd is dit chimaerisme van de buitenkant te zien. Er zijn bijv. witbloeiende chimaere planten die toch nog onderliggende plantenweefsels hebben die roodbloeiend zijn. Bij weefselkweekomstandigheden kunnen deze eigenschappen weer tevoorschijn komen.

3. Wat is het verschil tussen directe en indirecte somatische embryogenese?

De cellen van een bloemstengelplakje (het explantaat) van tulp kunnen bij de juiste kweekcondities worden aangezet tot vorming van een (somatisch) embryo. In dat geval spreken we van directe somatische embryogenese.

Een explantaat kan met andere kweekcondities aangezet worden tot vorming van ongedifferentieerde cellen (callus) of clusters van groeipunten (meristematische clusters; zie verderop). Op het callus kunnen weer embryo's ontstaan. Dan wordt gesproken van indirecte somatische embryogenese. Hiermee kunnen in principe zeer hoge vermeerderingssnelheden worden bereikt, omdat het callus of de clusters eerst vermeerderd kunnen worden in vloeibaar medium.

4. Wat is het verschil tussen een scheut en een somatisch embryo?

In de loop van de projecten bleek dat het onderscheid tussen scheuten en embryo's niet duidelijk gemaakt kan worden bij tulp. In principe is het maken van een dergelijk onderscheid ook niet wezenlijk voor dit onderzoek. Het gaat immers om vorming van structuren (scheutjes of somatische embryo's) die gebruikt kunnen worden voor doorvermeerdering en die in de laatste fase van de weefselkweek een bolletje kunnen vormen. De gevormde structuren konden gebruikt worden voor doorvermeerdering en konden ook een bolletje vormen. Voor de duidelijkheid wordt in de rest van het verslag meestal de term 'scheut' gebruikt.

5. Wat zijn meristematische clusters?

Meristematische clusters zijn klompjes van groeipunten (meristemen of voorstadia van embryo's/scheuten, over het algemeen groter dan enkele mm's doorsnede) die in die vorm doorvermeerderd kunnen worden. De clusters worden geïnduceerd op bloemstengelplakjes en daarna vermeerderd in vloeibaar medium op een schudder. Als voldoende clusters zijn verkregen kunnen ze aangezet worden tot vorming van nieuwe plantjes (scheutvorming) op vast medium.

6. Wat is een suspensiecultuur?

Een suspensiecultuur is een weefselkweek van losse cellen of kleine celklompjes in vloeibaar medium. In een suspensie zijn de cellen/celklompjes minder gedifferentieerd dan wanneer meristematische clusters worden gekweekt; er zijn geen georganiseerde groeipunten. Het verkrijgen en vermeerderen van losse cellen en kleine celklompjes in een suspensiecultuur is bij bolgewassen over het algemeen moeilijker dan de inductie en vermeerdering van meristematische clusters.

7. Wat is microsporenembryogenese?

Als een embryo ontstaat uit een stuijmeelkorrel (=microspore) spreken we van microsporenembryogenese. Een microsporenembryo ontstaat dus niet via bevruchting.

Het belangrijkste verschil met een somatisch embryo is de genetische samenstelling. Een microsporenembryo ontstaat uit een haploïde geslachtscel en bevat dus de helft van de erfelijke informatie van de ouderplant. Uitgaande van een heterozygote plant als tulp ontstaat als gevolg van segregatie en

overkruising een populatie haploïde embryo's waarin het hele palet van genetische eigenschappen van die ouder is terug te vinden.

8. Wat is een haploïde plant?

Een haploïde plant heeft van elk chromosoom één exemplaar in z'n kern (in een diploïde plant zijn dat er twee). Planten, ontstaan uit microsporenembryo's (geslachtscellen), zijn haploïd. Interessant in deze planten is dat alle recessieve genen zichtbaar zijn, omdat ze niet gemaskeerd worden door dominante genen. Na verdubbeling van de chromosomen ontstaat uit een haploïd in één stap een volledig homozygote plant met allerlei interessante toepassingen voor de veredeling. Theoretisch, uitgaande van een generatiecyclus van 5-6 jaar van tulp, zou het maken van homozygote planten via herhaalde zelfbestuiving tenminste 40 jaar kosten.

Bijlage 2:

BEREKENING VAN HET AANTAL BOLLETJES DAT VERKREGEN WORDT UIT 5 BOLLEN IN CA. TWEE JAAR BIJ VERMEERDERING DOOR MIDDEL VAN DIRECTE SCHEUTVORMING

Voor deze berekening is uitgegaan van de resultaten behaald bij twee cultivars, de snel reagerende 'Apeldoorn' en de langzaam reagerende 'Monte Carlo'.

TIJDSHEMA'S:

'Apeldoorn'

1. Uitgaande van 5 bollen kunnen 50 stengelplakjes gesneden worden
2. Per stengelplakje ontstaan gemiddeld 10 eerste-fasescheuten
3. Per scheut ontstaan gemiddeld 5 tweede fase scheuten
Eventueel kunnen er extra vermeerderingsstappen worden gedaan.
4. Scheuten naar bolvormingsmedium
5. Inductie bolvorming en bolgroei
6. Opplanten in volle grond op kistjes
7. Oogst

TIJDPAD:

Januari 1^e jaar
Maart - juni
Juni - oktober

Oktober - februari 2^e jaar
Februari - augustus 2^e jaar
Oktober 2^e jaar
Zomer 3^e jaar

'Monte Carlo'

1. Uitgaande van 5 bollen kunnen 50 stengelplakjes gesneden worden
2. Per stengelplakje ontstaan gemiddeld 2 eerste-fasescheuten
3. Per scheut ontstaan gemiddeld 10 tweede-fasescheuten

Januari 1^e jaar
April - augustus
Augustus - december

Bij deze langzaam reagerende cultivar is nog een vermeerderingscyclus niet haalbaar, als aan het eind van het tweede jaar de bolletjes moeten worden uitgeplant.

4. Scheuten naar bolvormingsmedium
5. Inductie bolvorming en bolgroei
6. Opplanten in volle grond op kistjes
7. Oogst

December - mei 2^e jaar
Mei - oktober 2^e jaar
Oktober 2^e jaar
Zomer 3^e jaar

OPBRENGST PER 5 BOLLEN:

'Apeldoorn'

Stap 1 en 2 leveren $50 * 10 = 500$ scheuten;

Stap 3: 2^e-fase-scheutvermeerdering (1 scheut levert 5,5 nieuwe scheutjes) $500 * 5,5 = 2.750$ scheuten;
50% (1375) van deze scheuten waren voldoende groot om te gebruiken voor bolvorming

Stap 4: bolvormingspercentage 12% (tabel 6), dus slechts 170 bolletjes van voldoende grootte.

'Monte Carlo'

Stap 1 en 2 leveren $50 * 2 = 100$ scheuten;

Stap 3: 2^e-fase-scheutvermeerdering (1 scheut levert 10,2 nieuwe scheutjes) $100 * 10,2 = 1000$ scheuten;
60% (600) van deze scheuten waren voldoende groot om te gebruiken voor bolvorming

Stap 4: bolvormingspercentage 27% (tabel 6), dus 160 bolletjes van voldoende grootte.

CONCLUSIE

Bij 'Apeldoorn' is het percentage bolvorming veel te laag. Bij 'Monte Carlo' is zowel het percentage scheutvorming tijdens de initiatie als het percentage bolvorming te laag.

Als het bolvormingspercentage (60%) van het laatste bolvormingsexperiment meegenomen wordt, stijgen de getallen voor 'Apeldoorn' van 170 naar 850, en voor 'Monte Carlo' slechts van 160 naar 360.

Bijlage 3:

BEREKENING VAN HET AANTAL BOLLETJES DAT IN CA. TWEE JAAR VERKREGEN WORDT BIJ VERMEERDERING IN VLOEIBAAR MEDIUM (CLUSTERS)

cv. Apeldoorn

TIJDSHEMA:

1. Inductie van eerste callusweefsel op stengelexplantaten	Januari 1 ^e jaar
2. Overbrengen naar vloeibaar medium	Juli
3. Kweek in vloeibaar medium	Vanaf juli
4. Regeneratie van scheutjes	Vanaf januari 2 ^e jaar
5. Bolvorming	Vanaf april
6. Uitplanten	Najaar 2 ^e jaar

HOEVEELHEDEN EN AANTALLEN:

Stap 1 en stap 2. leveren ongeveer 50 gram clusterweefsel per bol, waarvan 5 g losse clustertjes;
Stap 3. twee vermeederingscycli van 8 weken totaal leveren **8** (zie tabel 12) * 5 g = 40 gram los clusterweefsel;

Stap 4. regeneratie: 5 gram losse clustertjes leveren ca. **400** scheuten;

Stap 5. bolvorming: **60%** van de scheuten geeft een bolletje zwaarder dan 50 mg (levensvatbaar).

In minder dan 2 jaar geeft dit een opbrengst aan levensvatbare bolletjes van **8 * 400 * 60%** + aantal uit rest clustermateriaal (= ?) = **1.900** + ? bolletjes per bol.

Eén vermeederingscyclus extra verhoogt dit aantal al naar ca. **10.000** + ?.

Bijlage 4:

SAMENSTELLING MEDIA VOOR VERMEERDERING VAN TULP MET BEHULP VAN WEEFSELKWEK

BASISMEDIUM

Murashige and Skoog macro- en micro-elementen (Duchefa)	1/1
Sucrose	3%
Caseïne hydrolysaat (Sigma)	500 mg/l
Myo-inositol (Duchefa)	100 mg/l
Nicotinezuur (Sigma)	0,5 mg/l
Pyridoxine-HCl (Sigma)	0,5 mg/l
Thiamine-HCl (Sigma)	0,1 mg/l

Autoclaveren gedurende 15 minuten bij 120°C.

A. INITIATIE VAN SCHEUTEN MET NAA EN ZEA

Bij initiatie op medium met NAA en Zeatine, worden de stengelplakjes gedurende 12 weken zonder verversen op initiatiemedium gekweekt.

Basismedium met:

NAA (naphthaleen-azijnzuur) (Sigma)	5 μ M
Zeatine (Duchefa)	15 μ M
Agar (BBL, granulated) (Becton & Dickinson)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

B. INITIATIE VAN SCHEUTEN MET 2,4-D EN BA

Bij initiatie op medium met 2,4-D en BA, worden de stengelplakjes eerst 1-3 weken op medium met 2,4-D (B.1) gekweekt en daarna elke vijf weken overgezet op vers uitgroeiemedium zonder 2,4-D (B.2).

B.1. Initiatiemedium met 2,4-D en BA

Basismedium met:

BA (Duchefa)	0,5 μ M
2,4-D (Sigma)	5 μ M
Agar (BBL, granulated)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

Aangeraden wordt 3 weken op 5 μ M 2,4-D. Voor de meeste cultivars zal dit goed werken. Voor 'Monte Carlo' bleek verhoging tot 50 μ M een veel betere respons te geven.

B.2. Uitgroeimedium na initiatie op 2,4-D en BA (op bloemstengelplakjes of plakjes van weefselkweekscheutjes)

Basismedium met:

BA	0,5 μ M
Agar (BBL, granulated)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

Dit medium wordt om de 5 weken verversd, waarbij aanwezige embryo's geogost kunnen worden voor doorvermeerdering of bolvorming.

B.3. Initiatiemedium voor doorvermeerdering

Basismedium met:

BA	0,5 μ M
2,4-D	5 μ M
Agar (BBL, granulated)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

Aangeraden wordt één of 2 weken op deze concentratie 2,4-D; 3 weken 1 μ M 2,4-D werkte ook, maar soms minder. Voor ongevoeliger cultivars als 'Monte Carlo' kan 3 weken gebruikt worden. Na initiatie op medium met 2,4-D (B.3) worden de scheutjes op uitgroei-medium (B.2) verder gekweekt.

C. BOLVORMING

Basismedium met:

Sucrose i.p.v. 3 %	7%
Agar (BBL, granulated)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

D. VERMEERDERING MET BEHULP VAN MERISTEMATISCHE CLUSTERS

Hierbij wordt uitgegaan van stengelplakjes zoals bij de methode op vast medium.

D.1. Initiatie van meristematische clusters

Vaste fase

Basismedium met:

BA	5 μ M
2,4-D	50 μ M
Agar (BBL, granulated)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

D.2. Doorvermeerdering van meristematische clusters

Vloeibare fase I

Basismedium met:

BA	5 μ M
2,4-D	10 μ M

Vloeibare fase II

Basismedium met:

BA	5 μ M
2,4-D	2-5 μ M

D.3. Scheutvorming uit meristematische clusters

Basismedium met:

MS	1/1
Verlaging van de macro-MS tot een _ sterkte misschien beter (§ 6.3.1)	
BA	0,5 μ M
2,4-D	0,5 μ M
Agar (BBL, granulated)	0,6%
pH 6,0 voor autoclaveren	

Bijlage 5:

BACTERIEMEDIUM

Werkwijze en samenstelling van dit medium werd ter beschikking gesteld door SBW, Roelofarendsveen. Onze dank hiervoor.

'rijk' vloeibaar medium:

Sucrose	2%
Trypton (Oxoid)	5 g/l
Gist-extract (Oxoid)	5 g/l
Beef-extract (Oxoid)	5 g/l
NaCl	5 g/l
MS-vitamines, als in MS-medium	
pH 7,2	

'arm' vloeibaar medium:

Sucrose	2%
Trypton	0,5 g/l
Gist-extract	0,5 g/l
Beef-extract	0,5 g/l
NaCl	0,5 g/l
MS-vitamines, als in MS-medium	
pH 7,2	

Voor vast medium: agar (BBL) 0,6%

N.B. Het agarmedium moet niet te warm zijn bij uitgieten voor een test op (facultatief) anaërobe bacteriën ($\pm 40^{\circ}\text{C}$).

Bijlage 6:

SAMENSTELLING MEDIA VOOR MICROSPORENEMBRYOGENESE

DAPI-bepaling: draai de monsters 4 minuten af in de Eppendorfcentrifuge op stand 5000, pipetteer het medium af tot ca. 10 µl over is en resuspendeer het pellet door 10 µl DAPI-buffer toe te voegen. Maak van de suspensie een microscooppreparaat, incubeer dit 1-2 uur (of overnacht) en bepaal het aantal goed uitzijende microsporen en hun ontwikkelingsstadium m.b.v. een UV-microscoop (Zeiss filterset 02).

DAPI-buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7, 10 mM spermidine-tetrahydrochloride, 2,5 µg/ml DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), 10 mM NaCl, 200 mM hexyleneglycol en 1% Triton-X100. Deze oplossing wordt vervolgens 1:1 gemengd met glycerol om snel uitdrogen van de preparaten te voorkomen.

Isolatiemedium: _sterkte MS-macro's, MS-micro's, Nitsch-vitamin mixture van Duchefa (inclusief 100 mg/l meso-inisitol), 3 mM MES + 7% mannitol, pH 5,8. Dit medium wordt filter-steriel gemaakt.

Kweekmedium voor microsporen: hetzelfde als het isolatiemedium maar met 13% sucrose i.p.v. 7% mannitol.

Kweekmedium voor embryo's: _MS-macro's, MS-micro's, Nitsch-vitamin mixture van Duchefa (incl. 100 mg/l meso-inisitol), 500 mg/l caseïnehydrolysaat, 3 mM MES + 13% sucrose. Aan dit medium wordt verder 1 mg/l BA of 1,5 mg/l IPA + 1 mg/l NAA toegevoegd, en het wordt filter-steriel gemaakt.

Kiemingsmedium: _MS-macro's, MS-micro's, Nitsch-vitamin mixture van Duchefa (incl. 100 mg/l meso-inisitol), 3 mM MES + 2% sucrose, pH 5,8. Dit vloeibare medium wordt geautoclaveerd.

Tulpengroeimedum: _MS-macro's, MS-micro's, 80 mg/l adeninesulfaat, 10 mg/l thiamine HCl, 1 mg/l BA, 0,5 mg/l IBA + 3% sucrose en 0,2% Phytigel of 0,8% Daichin agar, pH 6. Het medium wordt geautoclaveerd. Hier bleek ook goed te voldoen het PPO-medium: MS macro's en micro's, 500 mg/l caseïnehydrolysaat, 100 mg/l myo-inositol, 0,5 mg/l nicotinezuur, 0,5 mg/l pyridoxine-HCl, 0,1 mg/l thiamine-HCl, 3% sucrose, 3,3 mg/l zeatine, 1 mg/l NAA + 0,6% BBL agar, pH 6.

Tulpenbolvormingsmedium: _MS-macro's, MS-micro's, 10 mg/l thiamine HCl, 0,5 mg/l IBA + 6% sucrose en 0,2% Phytigel of 0,8% Daichin agar, pH 6. Hier bleek ook goed te voldoen het PPO-medium: MS macro's en micro's, 500 mg/l caseïnehydrolysaat, 100 mg/l myo-inositol, 0,5 mg/l nicotinezuur, 0,5 mg/l pyridoxine-HCl, 0,1 mg/l thiamine-HCl, 7% sucrose + 0,6% BBL agar, pH 6.