MERKERS VOOR RODITIJDSTIP IN TULP
Gegevens:
Financier: Productschap Tuinbouw
PT projectnummer: 10316
Projectleider: Simon Langeveld (GT)
Onderzoeksperiode: 2001-2006

Begeleidingscommissie:
Peter Raven (LTO Groeiservice)
Joh Schouw (Lucel)
Willy Schutte (bedrijfssleven)
Corine Anker (PT, Voorzitter)

Projectmedewerkers:
GeertJan Naus
Simon Langeveld
Douwe de Boer
## INHOUDSOPGAVE

<table>
<thead>
<tr>
<th>Hoofdstuk</th>
<th>Pagina</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Inhoudsopgave</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>Samenvatting</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td>Inleiding</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td>Methodiek</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td>Resultaten</td>
<td>5</td>
</tr>
<tr>
<td>Conclusie</td>
<td>7</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Samenvatting

Bij tulpen is het rooimoment van belang voor de kwaliteit en opbrengst van dit bolgewas. Indien te vroeg wordt gerooid is de opbrengst lager en vindt er ook in de braei uitval plaats ten gevolge van ziektes en slechte beworteling. Indien te laat wordt gerooid is de opbrengst weliswaar goed maar kan bij ongunstige weersomstandigheden veel uitval optreden door ziektes. Het is dus van belang om op het optimale tijdstip te rooien. In dit project is door Genetwister Technologies BV in samenwerking met PPO te Lisse onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van een toets gebaseerd op bio-merkers om dit tijdstip te kunnen bepalen. De resultaten uit een set van referentie-cultivars die over vele seizoenen verzameld werden, bevestigden de betrouwbaarheid van de bio-merkers. Uitvoerbaarheid en reproduceerbaarheid van de ontwikkelde toets zijn in een applicatielaboratorium aangetoond. De toets gebaseerd op deze bio-merkers blijkt voor een uitgebreide selectie van tulpencultivars geschikt.

Inleiding

Bij tulpen is het rooimoment van belang voor de kwaliteit en opbrengst van dit bolgewas. Indien te vroeg wordt gerooid is de opbrengst lager en vindt er ook in de braei uitval plaats ten gevolge van ziektes en slechte beworteling. Indien te laat wordt gerooid is de opbrengst weliswaar goed maar kan bij ongunstige weersomstandigheden veel uitval optreden door ziektes. Het is dus van belang om op het optimale tijdstip te rooien. In dit project is door Genetwister Technologies BV in samenwerking met PPO te Lisse onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van een toets om dit tijdstip te kunnen bepalen. Door Genetwister Technologies BV (GT) zijn biomarkers ontwikkeld waarmee het rooitijdstip van tulpenbollen bepaald kan worden dat tot optimale resultaten in de broeierij leidt. Het biomarker onderzoek is uitgevoerd aan drie economisch belangrijke tulpencultivars. De biomerkertoets is voor applicatielaboratoria geschikt gemaakt en de algemene bruikbaarheid in een breder assortiment van tulpencultivars is onderzocht. In dit onderzoek heeft PPO-Lisse onder auspiciën van GT als applicatielaboratorium voor de toets gefungeerd. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de biomarkers op een enkele uitzondering na, op een brede selectie van cultivars toepasbaar zijn.

Methodiek

Algemeen

GT is gespecialiseerd in de ontwikkeling van toetsen op basis van bio-merkers die een relatie hebben met de kwaliteit van land- en tuinbouwproducten. Door GT toegepaste technologie is gebaseerd op de relatie die bestaat tussen het gedrag van de genen en de gemeten kwaliteit van het product. In bollen die op verschillende momenten en op verschillende plaatsen en grondsoorten gerooid werden, is op grond van genexpressionanalyse studies een collectie markers geselecteerd die een relatie hebben met de rijpheid van de bol. Voor de objectieve beoordeling van de rijpheid werden door het PPO-Lisse bleeproeven uitgevoerd met de veldmonsters die ook in de geneexpressie-analyses gebruikt werden. De beoordeling van de uitbloeikwaliteit werd bepaald aan de hand van een getal dat berekend werd uit de lengte en het gewicht van de bloem op een gedifferentieerd moment van de uitbloei. Dit getal, dat vooral een maat is voor de stivigheid van de bloem, werd als parameter voor de broekwaliteit gehanteerd.

Gebruikte cultivars, localities en rooiseizoenen


Sampling

De monsternaam van de bollen voor de ontwikkeling van de toets is uitgevoerd in samenwerking met PPO-Lisse. In de ontwikkelfase van de toets zijn de monsters telkens op drie posities binnen een bed genomen. De omvang van de monsters bedroeg telkens minimaal 25 en maximaal 50 bollen voor toetsontwikkeling en eenzelfde hoeveelheid voor uitbriei per positie in het bed op verschillende tijdstippen voor, tijdens en na het door de teler gekozen rooimoment. Voor elke cultivar en bemonsteringstijdstip is de toestand van het gewas op foto vastgelegd.
### Tabel 1

<table>
<thead>
<tr>
<th>cultivar</th>
<th>lokatie</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Viking</td>
<td>Zeeland</td>
</tr>
<tr>
<td>Kees Nelis</td>
<td>Zeewolde</td>
</tr>
<tr>
<td>Oranje Monarch</td>
<td>Zeewolde</td>
</tr>
<tr>
<td>Rococo</td>
<td>Nagele</td>
</tr>
<tr>
<td>Brilliant Star</td>
<td>Zwaagdijk</td>
</tr>
<tr>
<td>World's Favorite</td>
<td>Hillegom</td>
</tr>
<tr>
<td>Leen vd Mark</td>
<td>Nagele</td>
</tr>
<tr>
<td>Prominence</td>
<td>Lisse</td>
</tr>
<tr>
<td>Apeldoorn</td>
<td>Zeeland</td>
</tr>
<tr>
<td>Elegant Lady</td>
<td>St Maarten</td>
</tr>
<tr>
<td>Silver Dollar</td>
<td>Almere</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Bedrijven die in de uitontwikkelafase voor toelevering van betreffende ballen werden geselecteerd, lagen verspreid over verschillende teeltgebieden in Nederland. Dit om het eventuele effect van klimaat en bodemgesteldheid te kunnen meten. Voor de bepaling van het verloop van de bolripping zijn deze cultivars gedurende een periode van 3 weken rond het verwachte rooitijdstip vier maal bemonsterd. De ballen zijn na bemonstering op het veld, daags daarna in het lab van PPD-Lisse verwerkt en verdeeld in een monster voor merkeranalyse en een voor de bepaling van de broekkwaliteit. Voor de merkeranalyse zijn ballen van ongeveer gelijke grootte geselecteerd en werden uit de buitenste balrok poking genomen. De apparatuur die nodig is voor de uitvoering van de merkeranalyse is door het PPD aangeschaft en de toets werd uitgevoerd volgens het protocol dat door G1 werd opgesteld. De toets is in '96-wells' formaat uitgevoerd. Platen met merkerspecifie componenten zijn door Genetwister samengesteld en aan PPD-Lisse geleverd voor uitvoering van de toetsen. De ruwe data afkomstig uit de toetsen zijn door PPD-Lisse opgestuurd naar Genetwister die de dataverwerking en analyses heeft uitgevoerd.

**Breeiproeven**

De uitbloeiproeven zijn uitgevoerd door het PPD-Lisse volgens het daar geldende protocol. De uitbloeiproeven zijn uitgevoerd met ballen uit de monsters die in de merkeranalyses gebruikt werden. De oplant van de ballen is per maat uitgevoerd.

### Resultaten

#### Ontwikkeling van de merkers


![Calibration curve optimal lifting time](image)

Figuur 1. De merker waarden (horizontale as) uitgezet in de tijd (verticale as). Naarmate het optimale rooimoment (waarde G op verticale as) nadert, neemt de spreiding in de merkerwaarden af (rode lijnen).

Eigendom van Genetwister Technologies B.V. Niets uit dit verslag mag worden gebruikt, vermeerderd of gedistribueerd zonder schriftelijke toestemming van Genetwister Technologies B.V.
Nadat bij de referentie-cultivars in de jaren 2001-2004 werd bepaald hoe het rijpingsproces van de bol met een set van samengestelde merkers in kaart kon worden gebracht, is onderzocht hoe breed deze merkers toepasbaar zijn op het gehele assortiment.

Ontwikkeling van de toets
Om het gedrag van de merkers in relatie tot het rijpingsproces en de broeikwaliteit in kaart te brengen werden op vier tijdstippen rond het oogstmoment metingen uitgevoerd. De teler schatte het optimale rooimoment en vervolgens werd 1 en 2 weken voor dit moment, op dit moment zelf en een week daarna bemonsterd. De referentie-cultivars werden ter controle meegenomen. Twee van deze cultivars, cvs ‘Apeldoorn’ en ‘Prominence’ werden op drie verschillende locaties binnen een teeltperceel bemonsterd.

De merkertoets is uitgevoerd met een samengestelde set merkers en uiteenlopende controless. Bij GT werden de aan het PPQ-Lisse uitgeleverde platen vooraf gecontroleerd op kwaliteit. De toetsresultaten van de referentie-cultivars zijn eerst bepaald. Hieruit bleek dat deze volledig overeenkwamen met die in voorafgaande jaren, de intensiteit en het verloop van de waarden (lijkmen) waren volledig vergelijkbaar. De resultaten van cv ‘Leen van de Mark’ lieten wel een grotere variatie zien dan in voorafgaande jaren en ten opzichte van de waarden gemeten bij de twee andere cultivars ook een grotere variatie. De resultaten van de nieuwe cultivars bleken op twee uitzonderingen na van zeer goede kwaliteit. In een geval was het geschatte rooimoment niet juist, dit heeft tot gevolg dat voor cv ‘Viking’ een te beperkt aantal meetpunten in de merkeranalyse beschikbaar is voor een nauwkeurige voorspelling van het juiste rooimoment. Echter op grond van de meetwaarde die overeenkomt met het optimale rooimoment kan ook voor deze cultivar een voorspelling gedaan worden niet het rooimoment in relatie tot broeikwaliteit. Het criterium dat voor de bepaling van de broeikwaliteit gehanteerd werd, is het gewicht/cm, aangeduid met stevigheid. Uit de broeiresultaten blijkt dat volgens dit criterium het optimum bij de referentie cultivars cvs ‘Prominence’ en ‘Leen vd Mark’ varieert met de bolmaat zie figuur 2.

Figuur 2. Weergave van de broeikwaliteit per zifmaat op verschillende tijdstippen rond het door de teler geschatte rooimoment (waarde 6 op horizontale as) bij de cultivars Prominence (links) en Leen vd Mark (rechts). (Resultaten PPQ-Lisse)

Ook bij een meerderheid van de nieuwe cultivars blijkt dit het geval. Op grond van de merkeranalyse is een voorspelling van het optimale rooistijdstip gedaan nog voordat de resultaten van de broeierij bekend waren. Tenslotte zijn de voorspellingen gebaseerd op de merkeranalyse vergeleken met de optimale rooistijdstip op grond van de broeiresultaten. Deze vergelijking is weergegeven in tabel 2. Uit tabel 2 blijkt dat de voorspellende waarden van de merkeranalyse overeenstemmen met de optima uit de broeiresultaten op twee uitzonderingen na, cv ‘Racoco’en cv ‘Elegant Lady’. De meetwaarden uit de merkeranalyse van cv ‘Racoco’ laten een afwijking zien van de andere cultivars. Daarom kan bij deze cultivar geen goede voorspelling gedaan worden. Bij cv ‘Elegant Lady’ is een hoge achtergrond in de merkerbepaling gemeten. Dit maakt de voorspelling onbetrouwbaar. De broeiresultaten bij deze cultivar konden niet goed worden bepaald omdat bij geen enkele bolmaat bloei optrad. Het verloop van de meetwaarden in de merkeranalyse levert voor elke cultivar een lijn op. Tot nu toe is gebleken dat de helling van de lijn per cultivar over de jaren heen en op verschillende locaties niet varieert. Bovendien blijkt de waarde die gecorreleerd is aan het optimale rooistijdstip bij alle cultivars consistent te zijn. Op grond van de lijn en deze waarde blijkt een voorspelling van het optimale rooimoment een à twee weken van te voren mogelijk. De invloed van de klimaatomstandigheden is met de huidige variatie in de meetwaarden niet nauwkeurig te bepalen.

Eigendom van Genetwister Technologies B.V. Niets uit dit verslag mag worden gebruikt, vermeerdert of gedistribueerd zonder schriftelijke toestemming van Genetwister Technologies B.V.
<table>
<thead>
<tr>
<th>Cultivar</th>
<th>Locatie</th>
<th>PPO</th>
<th>GT</th>
<th>X</th>
<th>X</th>
<th>X</th>
<th>X</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Viking</td>
<td>Zeeland</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Kees Nelis Zeeuwolde</td>
<td></td>
<td>X</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Or. Morant Zeeuwolde</td>
<td></td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Rococo</td>
<td>Nagelle</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>X</td>
</tr>
<tr>
<td>Br. Star</td>
<td>Zwaagdij</td>
<td>X</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Worlds Favourite</td>
<td></td>
<td>X</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Leen vd Mark</td>
<td></td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Prominent Lisse</td>
<td></td>
<td>X 14</td>
<td>X 11,13</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Golden Apeldoorn</td>
<td>Zeeland</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Elegant Lady</td>
<td>St Maart</td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Silver Dot Almere</td>
<td></td>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Tabel 2. Het optimale roontijdstip per cultivar en lokatie is bepaald aan de hand van bruinresultaten uitgevoerd door PPO-Lisse (PPO) en met merkeranalyse (GT). Bij sommige cultivars (bijv. cv. ‘Kees Nelis’ en ‘Brilliant Star’) zijn twee optimale roonmomenten aangeduid op basis van bruinresultaten (PPO). In raad zijn de afwijkende resultaten weergegeven van de merkeranalyse (GT). Bijv. cv ‘Prominence’ zijn de drie lokaties (U13 en I4) aangegeven.

**Conclusie**

De merkerbepalingen uitgevoerd in een applicatielaboratorium tonen aan dat de roontijdstoets betrouwbaar kan worden uitgevoerd. De resultaten met de referentie-cultivars verkregen over vele jaren hebben bovendien de betrouwbaarheid van de merkset bevestigd. De toets blijkt voor een uitgebreide selectie van tulpencultivars geschikt. Uitzondering hierop is cv ‘Rococo’. Het is mogelijk dat deze cultivar genetisch verschilt van de andere cultivars. Opmerkelijk is dat het tijdstip van het optimum in de broeikwaliteit afhankelijk blijkt van de bolmaat. Mogelijk kan daarom de variatie in de meetwaarden van de merkeranalyse verklaard worden uit het feit dat bij de selectie van de bollen voor de merkeranalyse geen nauwkeurige zift-maat sortering is uitgevoerd. De variatie veroorzaakt door de bolmaat heeft tot gevolg dat in een praktijkprotocol voor bemonstering rekening gehouden moet worden met het verschil in bolmaten. Bij de uittewikkeling van de toets die nu van start is gegaan, wordt hiermee rekening mee gehouden.