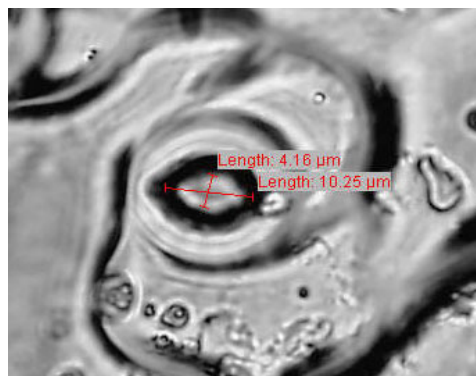
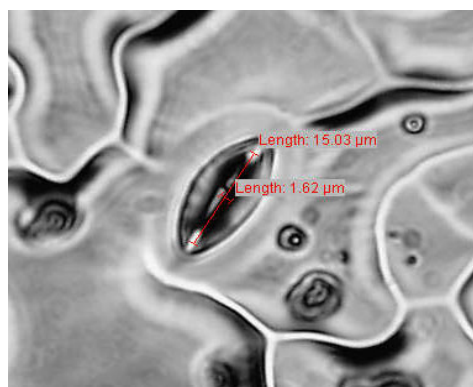




Tegengaan van kwaliteitsverlies door stress bij weefselkweek

Auteurs: Dr. F.A. Krens & Dr. G.-J. de Klerk



Productschap  Tuinbouw

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Wageningen UR Plant Breeding
Maart 2013

Eindrapport

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: Wageningen UR Plant Breeding

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van dit rapport kunnen door heffingbetalers van het internet gedownload worden via www.tuinbouw.nl van het Productschap Tuinbouw



Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR, Wageningen UR Plant Breeding

Adres : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 09 62
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.wageningenUR/nl/pri

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	2
2. Inleiding	3
2.1 Achtergrond	3
2.2 Organisatie	4
3. Resultaten	5
3.1 Waterigheid, fysiologisch onderzoek	5
3.1.1 Apoplastisch water	5
3.1.2 Apoplastische lucht	7
3.1.3 Hypoxie en oxidatieve stress	7
3.1.4 Water Retentie Capaciteit	8
3.1.5 Huidmondjes	9
3.2 Acclimatisering, fysiologisch onderzoek	10
3.2.1 Groei na uitplanten, algemeen	10
3.2.2 Groei, fysiologische parameters	11
3.2.3 Salicylzuur	13
3.3 Waterigheid, moleculair biologisch onderzoek	17
3.3.1 Microarray	17
3.3.2 qRT-PCR	19
3.4 Acclimatisering, moleculair biologisch onderzoek	20
3.4.1 Microarray	20
3.4.2 qRT-PCR	22
3.4.3 QTL analyse	22
3.5 Controle gewas	23
3.5.1 De keuze	23
3.5.2 Statice	23
3.6 Bijdrage van bedrijven	24
3.6.1 Testen protectants	25
3.6.2 Testen signaalstoffen	25
3.6.3 Testen milde stress	25
3.6.4 Andere behandelingen	26
4. Conclusies	27
5. Producten en dissimiatie	29

1. Samenvatting

Het onderzoek in dit project betrof stress bij planten gerelateerd aan aspecten van weefselkweek. Door de invloed van deze stress op kwaliteit en kwantiteit van de geproduceerde planten leiden *in vitro* vermeerderingsbedrijven grote verliezen. Wij deden het onderzoek bij de zandraket, *Arabidopsis thaliana*, hét modelgewas bij uitstek in het moleculair genetische onderzoek bij planten. Daarnaast werden enkele commerciële gewassen bestudeerd.

Allereerst is onderzocht of het mogelijk was om twee stress-gerelateerde verschijnselen, waterigheid en verwelking na uitplanten in aarde, reproduceerbaar op te wekken bij *in vitro* gekweekte *Arabidopsis* zaailingen. Het voordeel van *Arabidopsis* is dat er zeer veel bekend is van de moleculaire biologie en de fysiologie en dat er talloze mutanten zijn, zelfs een mutant die heel snel waterig wordt, *cri1*. In zaailingen van *Arabidopsis* op medium met Gelrite als geleermiddel trad na ongeveer 14 dagen waterigheid op in bijna 100% van de zaailingen, terwijl ze op medium met agar normaal bleven. Zaailingen die *in vitro* opgekweekt werden en dan overgebracht naar aarde, vertoonden verwelking en een duidelijk negatief effect op groei en herstel. Kortom, *Arabidopsis* is geschikt om beide stress-fenomenen in detail te bestuderen.

Waterigheid (*hyperhydricity*) is een fysiologische ziekte die gekenmerkt wordt door een aantal symptomen o.a. brosse, gekrulde en glazige blaadjes. De groei kan geheel stil komen te liggen. Waterigheid bleek gekoppeld aan een toename van de hoeveelheid water in de apoplast en een afname van de hoeveelheid apoplastische lucht. 'Symplast' is de naam voor alle cel onderdelen binnen de plasmalemma, dus cytoplasma, kern, vacuole etc.; 'apoplast' is alles wat daar buiten ligt, nl. celwanden en intercellulaire ruimtes. Dit werd niet alleen vastgesteld bij *Arabidopsis* maar ook bij meerdere andere gewassen. Toename van apoplastisch water en afname van apoplastische lucht zijn goede indicatoren om de mate van waterigheid te bepalen. Meer water in de apoplast kan komen door verminderde afvoer, door verhoogde aanvoer of door beiden. Verdamping is onder *in vitro* condities sterk beperkt door de hoge luchtvochtigheid. Onderzoek aan huidmondjes toonde aan dat die van waterige plantjes meer gesloten waren dan die van niet-waterige plantjes. Ook werd gevonden dat de water retentie capaciteit van waterige plantjes groter was. Het teveel aan water in de apoplast leidt tot een verminderde gasuitwisseling tussen cellen en intercellulaire ruimtes. Hierdoor ontstaat zuurstof gebrek in de cellen en een ophoping van gassen die in cellen geproduceerd worden (CO_2 , methyljasmonaat en anderen). Zuurstofgebrek leidt in andere systemen tot oxidatieve stress en had hetzelfde effect in waterige *Arabidopsis*, zoals bleek uit de bepaling van de hoeveelheid zuurstofradicalen en uit de expressie van genen die gerelateerd zijn aan hypoxische condities.

Het vermogen tot acclimatisering is bepaald aan de hand van verschillende groeiparameters, waaronder chlorofylfluorescentie. Deze parameters bleken goede indicatoren om tolerantie en herstellend vermogen vast te stellen. Er bleek genotypische variatie aanwezig bij de geteste ecotypen (variëteiten) in acclimatisatie. De parameters zijn gebruikt om een QTL analyse te doen aan de nakomelingen van een tweetal kruisingen. Er kunnen gebieden op chromosomen aangewezen worden die geassocieerd zijn met het vermogen tot acclimatisering. Bestudering van het functioneren van de huidmondjes gaf aan dat de huidmondjes van *in vitro* opgekweekte zaailingen na uitplanten in aarde niet op de drogere omstandigheden reageerden. Normaal sluiten de huidmondjes bij droogte, bij *in vitro* opgekweekte plantjes bleek dit vermogen verloren. Opvallend was dat een behandeling met salicylzuur (SA) dit vermogen kon herstellen. Dit resultaat met SA kan voor de praktijk van groot belang zijn en moet verder uitgewerkt worden.

Met behulp van DNA microarrays, waarop alle 24.000 genen van *Arabidopsis* zijn aangebracht, is bestudeerd welke genen zijn aan- of uitgeschakeld in waterige en niet-waterige zaailingen op verschillende momenten van ontstaan van waterigheid en in uitgeplante zaailingen op het moment van uitplanten en na 1 of 5 dagen. Dit leverde een grote hoeveelheid data op. De expressie van vele honderden genen verschilde. Er is vervolgens eerst gekeken welke groepen van genen dit betrof en bij wat voor soort processen die betrokken zijn. Hieruit bleken grote overeenkomsten tussen de beide stresscondities. Een aantal van die groepen genen zijn 1) genen betrokken bij de SA signaaltransductie, 2) genen betrokken bij de jasmonzuur signaalverwerking, 3) genen betrokken bij de verdediging tegen zuurstofradicalen, 4) genen betrokken bij het mobiliseren van voedselreserves en 5) genen betrokken bij celwandsynthese of – afbraak. Deze vijf groepen leveren al een aantal interessante aanknopingspunten op voor verder onderzoek gericht op het identificeren van directe applicaties van stoffen of behandelingen om de stress van *in vitro* vermeerdering tegen te gaan en de kwaliteit van de geproduceerde planten te verhogen.

2. Inleiding

2.1 Achtergrond

Het onderzoek in dit project betrof stress bij planten gerelateerd aan aspecten van weefselkweek. Door de invloed van deze stress op kwaliteit en kwantiteit van de geproduceerde planten leiden in vitro vermeerderingsbedrijven grote verliezen. Wij deden het onderzoek bij de zandraket, *Arabidopsis thaliana*, hét modelgewas bij uitstek in het moleculair genetische onderzoek bij planten. Daarnaast werden enkele commerciële gewassen bestudeerd.

Allereerst is onderzocht of het mogelijk was om twee stress-gerelateerde verschijnselen, waterigheid en verwelking na uitplanten in aarde, reproduceerbaar op te wekken bij in vitro gekweekte *Arabidopsis* zaailingen. Het voordeel van *Arabidopsis* is dat er zeer veel bekend is van de moleculaire biologie en de fysiologie en dat er talloze mutanten zijn, zelfs een mutant die heel snel waterig wordt, *cri1*. In zaailingen van *Arabidopsis* op medium met Gelrite als geleermiddel trad na ongeveer 14 dagen waterigheid op in bijna 100% van de zaailingen, terwijl ze op medium met agar normaal bleven. Zaailingen die in vitro opgekweekt werden en dan overgebracht naar aarde, vertoonden verwelking en een duidelijk negatief effect op groei en herstel. Kortom, *Arabidopsis* is geschikt om beide stress-fenomenen in detail te bestuderen.

Waterigheid (*hyperhydricity*) is een fysiologische ziekte die gekenmerkt wordt door een aantal symptomen o.a. brosse, gekrulde en glazige blaadjes. De groei kan geheel stil komen te liggen. Waterigheid bleek gekoppeld aan een toename van de hoeveelheid water in de apoplast en een afname van de hoeveelheid apoplastische lucht. 'Symplast' is de naam voor alle cel onderdelen binnen de plasmalemma, dus cytoplasma, kern, vacuole etc.; 'apoplast' is alles wat daar buiten ligt, nl. celwanden en intercellulaire ruimtes. Dit werd niet alleen vastgesteld bij *Arabidopsis* maar ook bij meerdere andere gewassen. Toename van apoplastisch water en afname van apoplastische lucht zijn goede indicatoren om de mate van waterigheid te bepalen. Meer water in de apoplast kan komen door verminderde afvoer, door verhoogde aanvoer of door beiden. Verdamping is onder in vitro condities sterk beperkt door de hoge luchtvochtigheid. Onderzoek aan huidmondjes toonde aan dat die van waterige plantjes meer gesloten waren dan die van niet-waterige plantjes. Ook werd gevonden dat de water retentie capaciteit van waterige plantjes groter was. Het teveel aan water in de apoplast leidt tot een verminderde gasuitwisseling tussen cellen en intercellulaire ruimtes. Hierdoor ontstaat zuurstof gebrek in de cellen en een ophoping van gassen die in cellen geproduceerd worden (CO₂, methyljasmonaat en anderen). Zuurstofgebrek leidt in andere systemen tot oxidatieve stress en had hetzelfde effect in waterige *Arabidopsis*, zoals bleek uit de bepaling van de hoeveelheid zuurstofradicalen en uit de expressie van genen die gerelateerd zijn aan hypoxische condities.

Het vermogen tot acclimatisering is bepaald aan de hand van verschillende groeiparameters, waaronder chlorofylfluorescentie. Deze parameters bleken goede indicatoren om tolerantie en herstellend vermogen vast te stellen. Er bleek genotypische variatie aanwezig bij de geteste ecotypen (variëteiten) in acclimatisatie. De parameters zijn gebruikt om een QTL analyse te doen aan de nakomelingen van een tweetal kruisingen. Er kunnen gebieden op chromosomen aangewezen worden die geassocieerd zijn met het vermogen tot acclimatisering. Bestudering van het functioneren van de huidmondjes gaf aan dat de huidmondjes van in vitro opgekweekte zaailingen na uitplanten in aarde niet op de drogere omstandigheden reageerden. Normaal sluiten de huidmondjes bij droogte, bij in vitro opgekweekte plantjes bleek dit vermogen verloren. Opvallend was dat een behandeling met salicylzuur (SA) dit vermogen kon herstellen. Dit resultaat met SA kan voor de praktijk van groot belang zijn en moet verder uitgewerkt worden.

Met behulp van DNA microarrays, waarop alle 24.000 genen van *Arabidopsis* zijn aangebracht, is bestudeerd welke genen zijn aan- of uitgeschakeld in waterige en niet-waterige zaailingen op verschillende momenten van ontstaan van waterigheid en in uitgeplante zaailingen op het moment van uitplanten en na 1 of 5 dagen. Dit leverde een grote hoeveelheid data op. De expressie van vele honderden genen verschilde. Er is vervolgens eerst gekeken welke groepen van genen dit betrof en bij wat voor soort processen die betrokken zijn. Hieruit bleken grote overeenkomsten tussen de beide stresscondities. Een aantal van die groepen genen zijn 1) genen betrokken bij de SA signaaltransductie, 2) genen betrokken bij de jasmonzuur signaalverwerking, 3) genen betrokken bij de verdediging tegen zuurstofradicalen, 4) genen betrokken bij het mobiliseren van voedselreserves en 5) genen betrokken bij celwandsynthese of -afbraak. Deze vijf groepen leveren al een aantal interessante aanknopingspunten op voor verder onderzoek gericht op het identificeren van directe applicaties van stoffen of behandelingen om de stress van in vitro vermeerdering tegen te gaan en de kwaliteit van de geproduceerde planten te verhogen.

2.2 Organisatie

Dit project was een tweeling-project, waarbij een deel door het Productschap Tuinbouw is gefinancierd en een ander deel door het Technologisch TopInstituut Groene Genetica, TTI-GG. Ook de deelnemende bedrijven, in alfabetische volgorde Floricultura, Goldsmith (tot overname door Syngenta), Könst, SBW (tot faillissement), Syngenta (2x), VCI, VitroWestland en VZP, hebben aan de financiering bijgedragen en eveneens *in kind*. De betrokken kennisinstellingen waren Wageningen UR Plant Breeding en de vakgroep Plant Ecophysiology van Utrecht University. De projectleiding is erkentelijk voor de bijdragen van de volgende personen:

WUR: N. van den Dries, G.-J. de Klerk, F.A. Krens, L.I. Rojas-Martínez, R. Ariaans, G. Groenwold, & I. Tinnenbroek

UU: A. Czerednik, A.J.M. Peeters, J.M.H. Ammerlaan, R.L.M. van Marlen, J. Versluis & A. McCarthy

Floricultura: I. de Bruin, N. van der Harst

Goldsmith: M. Ursem

Könst: L. Kuipers, R. Veenhof

SBW: K. Gerding, M. van Bennekom

Syngenta: C. Houthuijs, W. van der Meer

VCI: D. Hardeman, G. Kolster

VitroWestland: G. Eijk-Bos

VZP: W. Rook

3. Resultaten

3.1 Waterigheid, fysiologisch onderzoek

Waterigheid (hier afgekort als HH; de Engelse term is *hyperhydricity*) is een fysiologische afwijking van plantjes die in weefselweek groeien. De bladeren van aangetaste planten zijn bros, gekruld en glazig. Microscopisch onderzoek liet zien dat er grotere intercellulaire ruimten in het blad zijn en dat de palissadel laag minder prominent is. De hoeveelheid chlorofyl is minder. HH plantjes hebben een verlaagde ligninesynthese en minder lignine. Recent onderzoek op biochemisch en moleculair niveau liet zien dat er sprake is van oxidatieve stress. Hoewel er veel onderzoek aan de symptomen is gedaan is er weinig tot geen onderzoek gedaan aan de achterliggende oorzaak van deze afwijking. Uit de wetenschappelijke literatuur en uit eigen ervaringen van deelnemers is bekend dat waterigheid (hyperhydricity) bij in vitro vermeerdering geïnduceerd kan worden door te kweken op media met Gelrite als 'gelling agent'. Tegenover dit nadeel staan voordelen van het gebruik van Gelrite zoals de grotere transparantie die het mogelijk maakt om eventuele contaminatie door schimmels of bacteriën sneller op te merken. Om de fysiologische en moleculaire achtergronden van waterigheid te achterhalen en te bestuderen is er een standaardisering nodig met een modelgewas en een modelbehandeling die waterigheid veroorzaakt. Het modelgewas bij uitstek in de meeste plantenstudies is *Arabidopsis thaliana* en het bleek mogelijk om in zaailingen van *Arabidopsis* waterigheid te induceren door ze 7 dagen na kieming over te brengen naar medium met Gelrite (Figuur 1). De controlebehandeling, waarbij de zaailingen op medium met agar werden doorgekweekt gaf geen waterigheid. Hiermee is dus de standaard proefopzet verkregen die het mogelijk maakt om het fenomeen verder in detail te bestuderen.

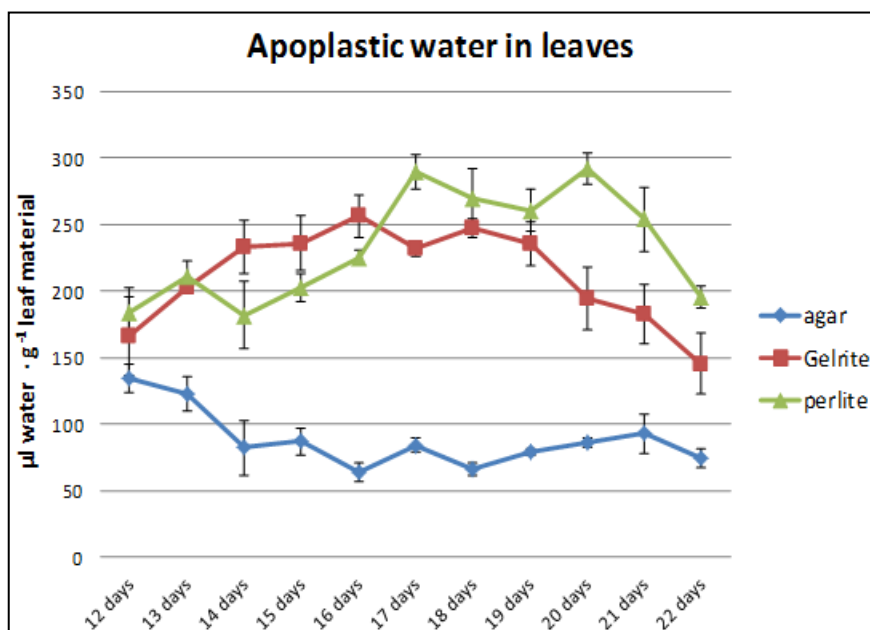


Figuur 1. *Arabidopsis thaliana* zaailingen gegroeid op medium met 0.7% agar (A), 0.2% Gelrite (B) en vloeibaar perliet medium (C). B en C zijn waterig.

3.1.1 Apoplastisch water

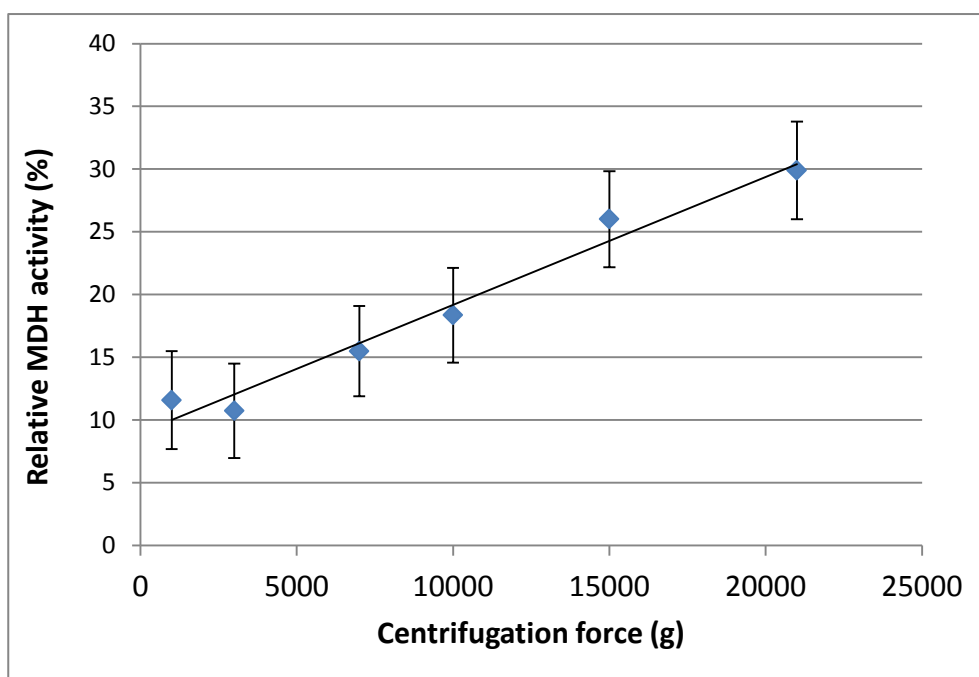
'Waterigheid' duidt net als '*hyperhydricity*' op een overmaat van water in het weefsel. Eerder onderzoek aan gipskruid heeft laten zien dat er een ophoping van water in de apoplast optreedt in geval van waterigheid (de apoplast bestaat uit de celwanden en de intercellulaire ruimtes). Verder is er geen onderzoek aan gedaan en de hoeveelheid water in de apoplast van HH plantjes is nooit gekwantificeerd. Om een schatting van de hoeveelheid te maken is met milde centrifugering het apoplastisch water uit de weefsels gecentrifugeerd en vervolgens gewogen. Het bleek dat bladeren van HH plantjes (zaailingen gegroeid op Gelrite medium of vloeibaar perliet medium) aanzienlijk meer apoplastisch water bevatten dan de zaailingen gegroeid op agar medium (Figuur 2). Deze resultaten laten zien, dat HH plantjes een overschot aan water in de apoplast accumuleren. Verder is in Figuur 2 te zien, dat na 20 dagen de hoeveelheid water in de apoplast van HH plantjes afnam (Gelrite en perliet). Deze afname werd veroorzaakt doordat het weefsel van HH plantjes rond dit tijdstip af begon te sterven, wat zeer waarschijnlijk een gevolg is van de stress die waterigheid teweegbrengt.

De resultaten van dit experiment laten zien dat apoplastisch water een geschikte parameter is om HH in *A. thaliana* te kwantificeren. Het meest geschikte moment om apoplastisch water te meten ligt tussen de 14 en 19 dagen omdat daarna het weefsel van HH plantjes afsterft.



Figuur 2. Apoplastisch water in bladeren van *A. thaliana* zaailingen gegroeid op medium met 0.7% agar, 0.2% Gelrite en vloeibaar perliet medium.

Deze ophoping van water in de apoplast is ook door ons gevonden bij HH plantjes van andere plantensoorten zoals bij het uiteindelijke controlegewas, *Stactis* (zie 3.5.2) en bij appel en crambe. Om de hoeveelheden apoplastisch water te bepalen wordt gebruik gemaakt van centrifugering bij een lage omwentelingssnelheid (3000 g). Om uit te kunnen sluiten dat door deze behandeling de cellen kapot gaan en naast het apoplastisch water ook de



Figuur 3. Malaat dehydrogenase activiteit in de verzamelde waterfractie na centrifugering bij toenemende snelheden van waterige *Arabidopsis* zaailingen.

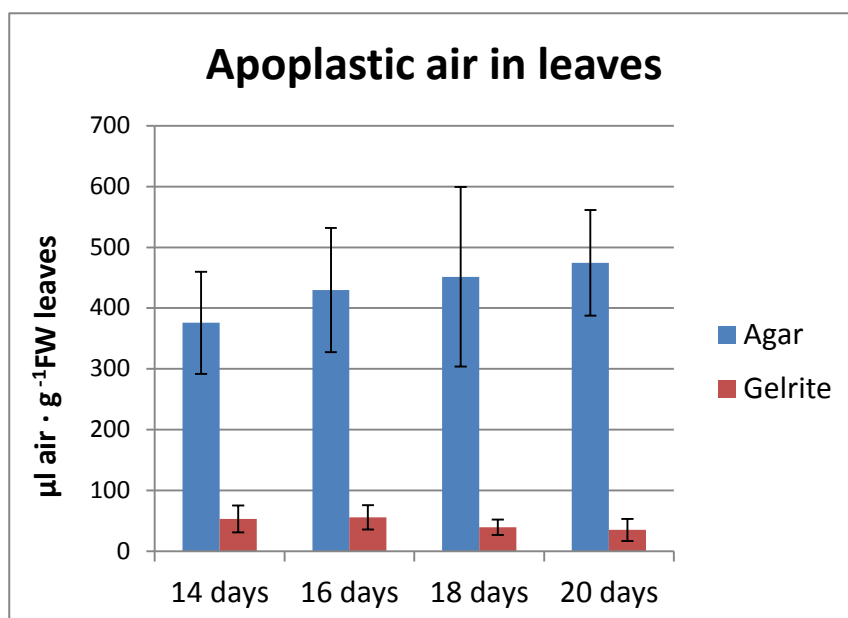
inhoud van deze cellen meekomt is in het eruit gecentrifugeerde water de activiteit bepaald van het enzym malaat dehydrogenase (MDH). De aanwezigheid van dit celsapenzym is een indicator voor eventuele schade aan cellen. Figuur 3 laat zien dat er bij de gebruikte centrifugeringssnelheid minimale celschade is en de gevonden hoeveelheden water afkomstig moeten zijn uit de apoplast. Validatie van het omgekeerde (wordt al het apoplastisch water er uit

gecentrifugeerd?) is niet onderzocht. Het is dus mogelijk dat de waarden te laag zijn. Dit is bij HH plantjes niet denkbeeldig, omdat de huidmondjes deels gesloten zijn.

3.1.2 Apoplastische lucht

Vervolgens werd er gekeken of de verhoogde hoeveelheid apoplastisch water in HH plantjes van invloed was op het volume lucht in de apoplast. Het volume apoplastische lucht in bladeren van HH Arabidopsis zaailingen (Gelrite) en niet-HH zaailingen (agar) werd bepaald op verschillende tijdstippen door middel van vacuüminfiltratie (Figuur 4). Met behulp van een pycnometer wordt door het aanbrengen van een vacuüm de lucht in de apoplast in blaadjes vervangen door water. De hoeveelheid vrijgekomen lucht in de pycnometer afkomstig uit de apoplast kan vervolgens bepaald worden aan de hand van de gewichtstoename van de pycnometer na aanvullen met water. Figuur 4 laat zien dat HH plantjes (Gelrite medium) veel minder lucht bevatten dan de controle planten (agar).

Om de getallen in figuren 3 en 4 meer inzichtelijk te maken zijn er schattingen gemaakt van de volumes van apoplast en die van apoplastisch water en apoplastische lucht. Het volume van de apoplast is ongeveer de helft van het totale blad volume. Inderdaad laat microscopisch onderzoek zeer grote intercellulaire ruimtes zien. De apoplast van niet-HH plantjes bestaat voor 85% lucht. In HH plantjes is dit slechts 11% en bestaat 89% uit water. De grote hoeveelheid apoplastisch water in HH plantjes heeft dus vrijwel alle lucht uit de apoplast verdreven. Verder laat deze proef zien dat het volume apoplastische lucht ook gebruikt kan worden als een parameter om HH in *A. thaliana* te kwantificeren.

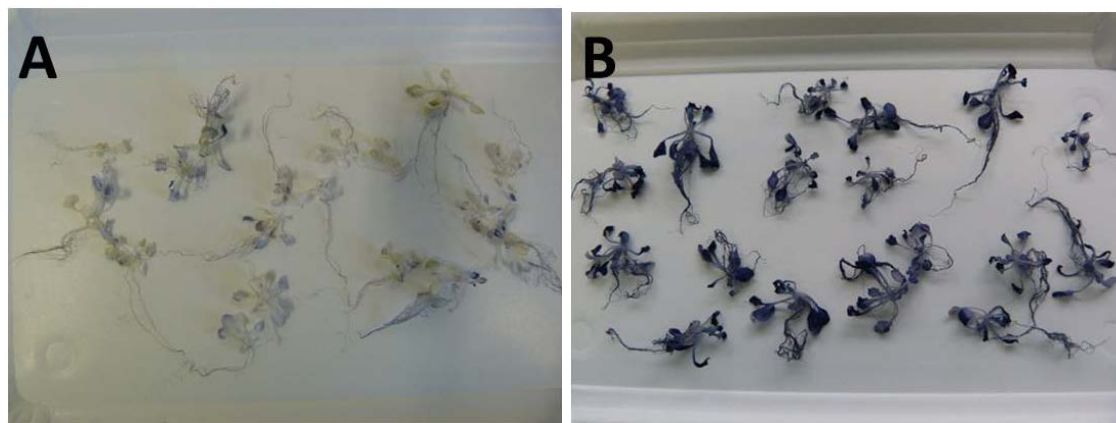


Figuur 4. Het volume apoplastische lucht per gram vers gewicht berekend op verschillende tijdstippen van groei aan HH blaadjes (Gelrite) versus niet-HH blaadjes (agar).

De sterke reductie van de hoeveelheid apoplastische lucht en de aanwezigheid van de grote hoeveelheid water in de apoplast leidt tot grote problemen bij de gasuitwisseling binnenin het weefsel tussen symplast en apoplast. De diffusiesnelheid van gassen in lucht is 10.000 maal sneller dan in water. Door de verstoorde gasuitwisseling verkeren de HH plantjes onder hypoxische condities (verminderde beschikbaarheid van zuurstof, zuurstoftekort) en dit leidt vervolgens weer tot oxidatieve stress. Daarnaast produceren cellen zelf gassen die in HH plantjes accumuleren in de cellen. Dit betreft CO₂ en gasachtige hormonen als ethyleen, methyljasmonaat en methylsalicylaat. De slechte gasuitwisseling is waarschijnlijk de oorzaak van de HH symptomen zoals die waargenomen worden met het blote oog.

3.1.3 Hypoxie en oxidatieve stress

Een slechte gasuitwisseling leidt waarschijnlijk tot zuurstoftekort (hypoxie) in de cellen en dit zou vervolgens ernstige oxidatieve stress kunnen veroorzaken. Deze hypothese wordt ondersteund door de waarneming dat HH *Arabidopsis* zaailingen vaak anthocyanen in hun bladeren accumuleren. Het is bekend dat planten vaak anthocyanen aanmaken onder oxidatieve stress. Verder vonden we dat HH *Arabidopsis* plantjes na ongeveer 3 weken afstierven; dit kan wellicht worden veroorzaakt door oxidatieve stress. De slechte gasuitwisseling in HH weefsel speelt wellicht een rol bij het ontstaan van de verschillende morfologische en fysiologische afwijkingen in de HH plantjes. Om te controleren of hypoxie daadwerkelijk optreedt in HH weefsel, is de expressie van verschillende hypoxie-geïnduceerde genen, zoals alcohol dehydrogenase en pyruvate decarboxylase, bestudeerd. Dit is gedaan met behulp van real-time PCR analyses (zie 3.3.2). Om te controleren of HH zaailingen aan oxidatieve stress leiden, is eveneens de aanwezigheid van het zuurstof radicaal superoxide (O_2^-) in de plantjes bestudeerd. Dit werd gedaan door de plantjes met nitroblauw tetrazolium (NBT) te behandelen. Nitroblauw tetrazolium kleurt blauw als het door superoxide wordt gereduceerd.



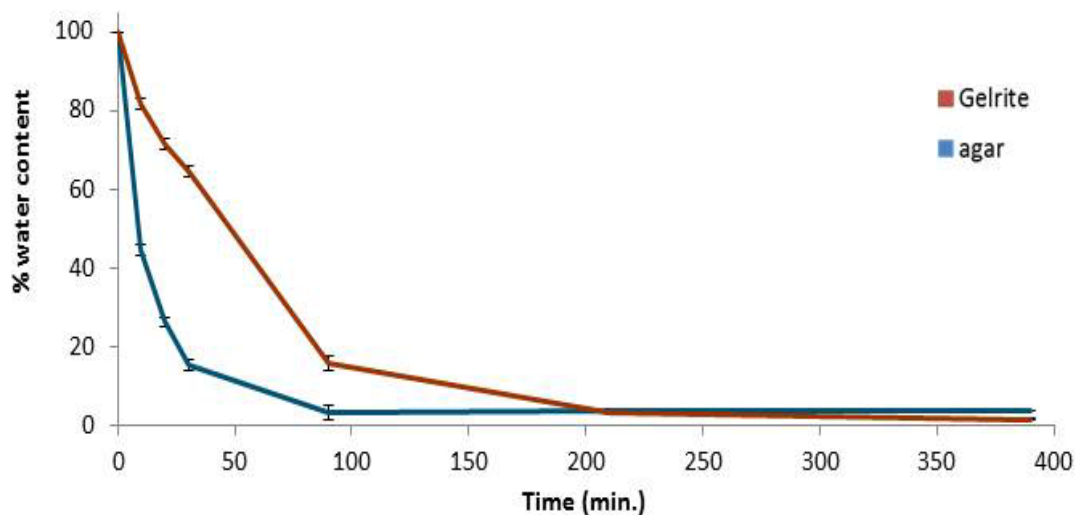
Figuur 5. Nitroblauw tetrazoliumkleuring van 17 dagen oude *Arabidopsis* zaailingen gegroeid op medium met 0.7% (w/v) agar (A) en 0.2% (w/v) Gelrite (B)

Kleuring met NBT veroorzaakt een intensieve blauwe kleur in HH plantjes (Figuur 5). In niet-HH plantjes was ook een blauwe kleur waarneembaar, maar deze was veel zwakker van intensiteit. Dit duidt erop dat HH plantjes daadwerkelijk onder oxidatieve stress staan.

3.1.4 Water Retentie Capaciteit

De ophoping in HH plantjes van water in de apoplast kan twee oorzaken hebben, te veel aanvoer van water of te weinig afvoer van water (of beiden). We onderzochten of HH plantjes in staat zijn om het teveel aan water in voldoende mate uit hun intercellulaire ruimtes af te voeren. Daarvoor hebben we de Water Retentie Capaciteit (WRC) bepaald. Er is gekeken naar de verdampingssnelheid van water uit HH en niet-HH plantjes. Hieruit bleek dat water minder snel uit HH plantjes kan verdampen (Figuur 6). Bij het overbrengen van in vitro vermeerderde plantjes, die gewend zijn aan hoge luchtvochtigheid, naar ex vitro condities met een lagere luchtvochtigheid gaan de plantjes vaak verloren doordat ze te veel water verdampen. Om dit tegen te gaan wordt er voor gezorgd door toedekken met plastic e.d. dat de luchtvochtigheid rond de bladeren nog enige tijd hoger blijft totdat de plantjes voldoende zijn geacclimatiseerd. Om te zien wat de gevonden verschillen in verdamping (water retentie capaciteit) en hoeveelheid water tussen HH en niet-HH zaailingen betekenen bij het acclimatiseren zijn de zaailingen na 10 dagen overgepot naar grond en zonder enige bescherming verder ex vitro opgekweekt. Na 30 dagen zijn de plantjes op uiterlijk beoordeeld. De HH plantjes bleken beter bestand tegen de droge condities bij uitplanten dan de niet-HH (Figuur 7). Dit kan zijn oorzaak hebben in hun betere WRC en ook in de grotere hoeveelheid water in het weefsel. De Gelrite plantjes waren groter en bezaten meer en langere bladeren. Het verlengen van de groeiperiode op media met Gelrite, dus langer dan 10 dagen, had een nadelig effect op de overleving van zaailing in de *ex vitro* omgeving. De plantjes waren niet langer in staat om te herstellen van de negatieve invloed van HH. Het aanpassingsvermogen van de zaailing was dus afhankelijk van de mate van HH. Mogelijk kan het acclimatiseringvermogen van andere plantensoorten worden verbeterd door plantjes, voorafgaande aan het uitplanten naar de *ex vitro* omgeving, voor een beperkte tijdsduur te groeien op media met Gelrite.

Slecht-functionerende huidmondjes in de bladeren van HH plantjes kunnen een mogelijke oorzaak zijn voor de trage verdamping van water uit HH plantjes. Verschillende onderzoeken hebben namelijk aangetoond dat huidmondjes van HH plantjes vaak misvormd of verstopt zijn. Daarom zijn de huidmondjes in de bladeren van HH en niet-HH zaailingen nader bekeken.



Figuur 6. Water Retentie Capaciteit van 16 dagen oude Arabidopsis zaailingen gegroeid op medium met 0.2% agar of 0.2% Gelrite.

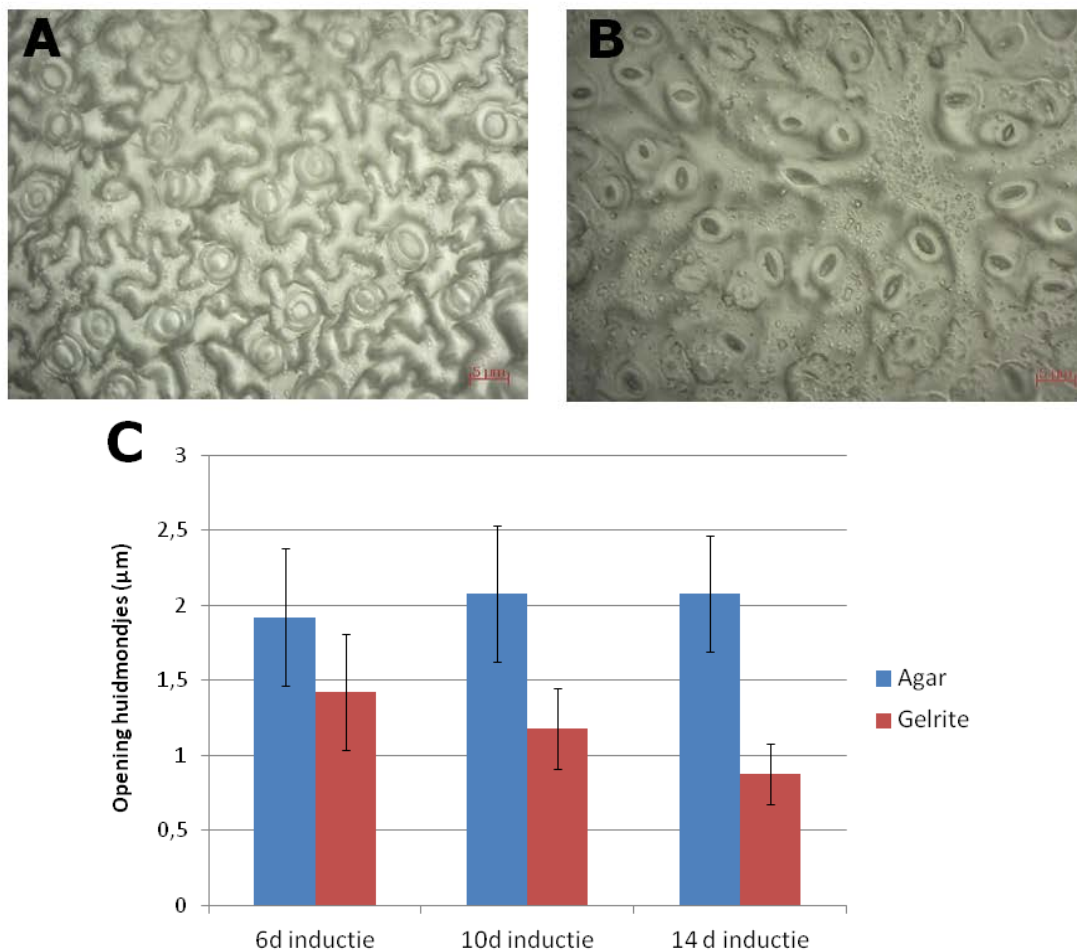


Figuur 7. Arabidopsis plantjes uit in vitro kweek overgezet naar grond. Plantjes (10 dagen) waren afkomstig van media met 0.2% Gelrite of media met 0.7% agar en het fenotype van de plantjes werd geanalyseerd na 30 dagen van groei in de grond.

3.1.5 Huidmondjes

Meerdere onderzoekers hebben aangetoond dat HH plantjes vaak misvormde of niet-functionerende huidmondjes bezitten. Daarom is het effect van HH op de huidmondjes van Arabidopsis onderzocht. Er werden afdrucken gemaakt van de adaxiale zijde van de bladepidermis afkomstig van HH en niet-HH plantjes. We vonden dat huidmondjes in HH Arabidopsis zaailingen gedeeltelijk of geheel gesloten waren (Figuur 8B). Figuur 8C laat zien dat de opening van de huidmondjes kleiner werd naarmate de zaailingen langer op media met Gelrite groeiden. Een soortgelijke respons van

de huidmondjes werd gevonden in het controlegewas statice (zie 3.5.2). Deze resultaten wijzen op een verband tussen HH en het sluiten van de huidmondjes. De sluiting van de huidmondjes wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de overmatige hoeveelheid water in de apoplast. Een studie van Sibbernsen en Mott (2010) heeft namelijk aangetoond dat het vol lopen van de apoplastische ruimtes met water leidt tot het sluiten van huidmondjes.



Figuur 8. Huidmondjes in *Arabidopsis* zaailingen gegroeid op (A) media met 0.7% agar (niet-HH) en (B) media met 0.2% Gelrite (HH). (C) Gemiddelde opening van de huidmondjes gemeten in bladeren van *Arabidopsis* zaailingen gegroeid op media met 0.7% agar en 0.2% Gelrite.

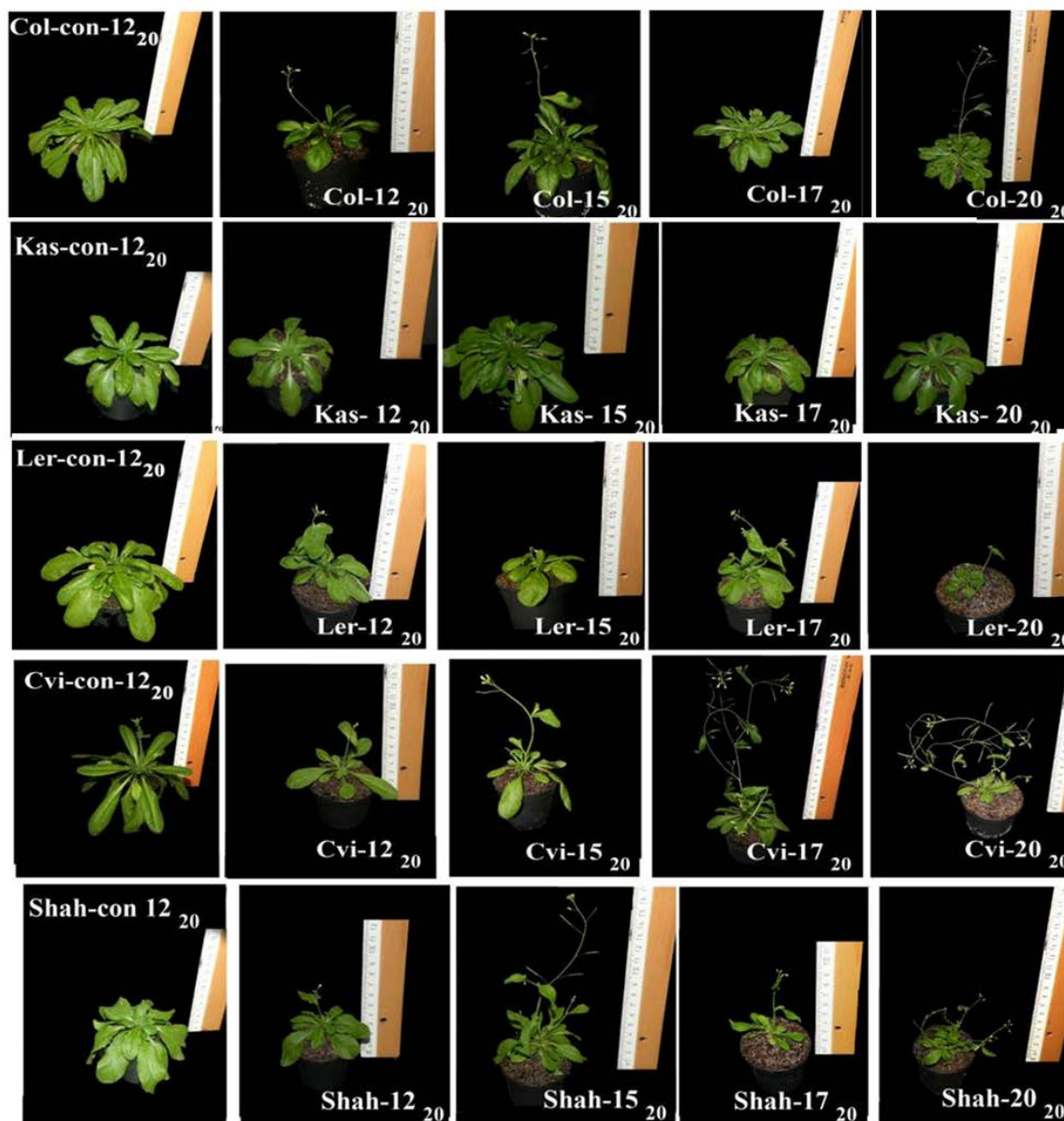
3.2 Acclimatisering, fysiologisch onderzoek

In vitro gekweekte *Arabidopsis thaliana* planten hebben ook een typisch weefselkweek gerelateerd probleem bij de overzetting naar de grond, nl. uitdroging. Voor deze afwijking is er natuurlijke genetische variatie gevonden. Na overzetten op grond zagen we verschillen in het aanpassingsvermogen van de verschillende variëteiten van *Arabidopsis*. De aanpassing van *Arabidopsis* is tevens afhankelijk van de duur van de groei in steriele *in vitro* omstandigheden. De vijf geteste variëteiten: Shahdara (Shah), Kashmir 1 (Kas-1), Landsberg *erecta* (*Ler*), Colombia-1 (Col-1) en Cape verdian islands (Cvi) vertoonden verschillende reacties op de stress die door de overgang van *in vitro* naar *ex vitro* geïnduceerd werd.

3.2.1 Groei na uitplanten, algemeen

Arabidopsis thaliana zaailingen van vijf verschillende variëteiten werden *in vitro* gekiemd en gedurende verschillende perioden *in vitro* op agar opgekweekt, namelijk een tijdreeks van 12 tot en met 20 dagen. Vervolgens werden zij overgepot naar aarde, zonder verdere bescherming doorgeweekt in een kweekcel en na 20 dagen bekeken

op morfologische kenmerken. Als controle werden in aarde uitgezaaide en opgekomen zaailingen genomen die 32 dagen na kieming zijn gescoord. De vijf variëteiten vertoonden verschillende reacties op de stress bij uitplanten (Figuur 9); Shah, Cvi en Ler lijken minder tolerant en kunnen na 12 dagen groei in *in vitro* omstandigheden niet goed herstellen. Dit in tegenstelling tot Kas-1 en Col-1 die zich gemakkelijker kunnen aanpassen, zelfs na een nog langere periode in steriele omstandigheden. Shah, Cvi en Ler bloeiden snel in vergelijking met controle planten. Het bladoppervlak en de compactheid van de rozet in Shah, Ler en Cvi waren opmerkelijk minder ten opzichte van



Figuur 9. Planten van verschillende *Arabidopsis thaliana* variëteiten 20 dagen na het overbrengen van medium (*in vitro* gedurende 12, 15, 17 of 20 dagen) naar grond. De controle planten 20 dagen na de eerste analyse (32 dagen na de kieming).

controle en tolerante planten (Kas-1 en Col-1). Bovendien zagen we veranderingen in de bladvorm bij Shah, die in normale omstandigheden gekarteld is, maar na de ontwikkeling *in vitro* glad.

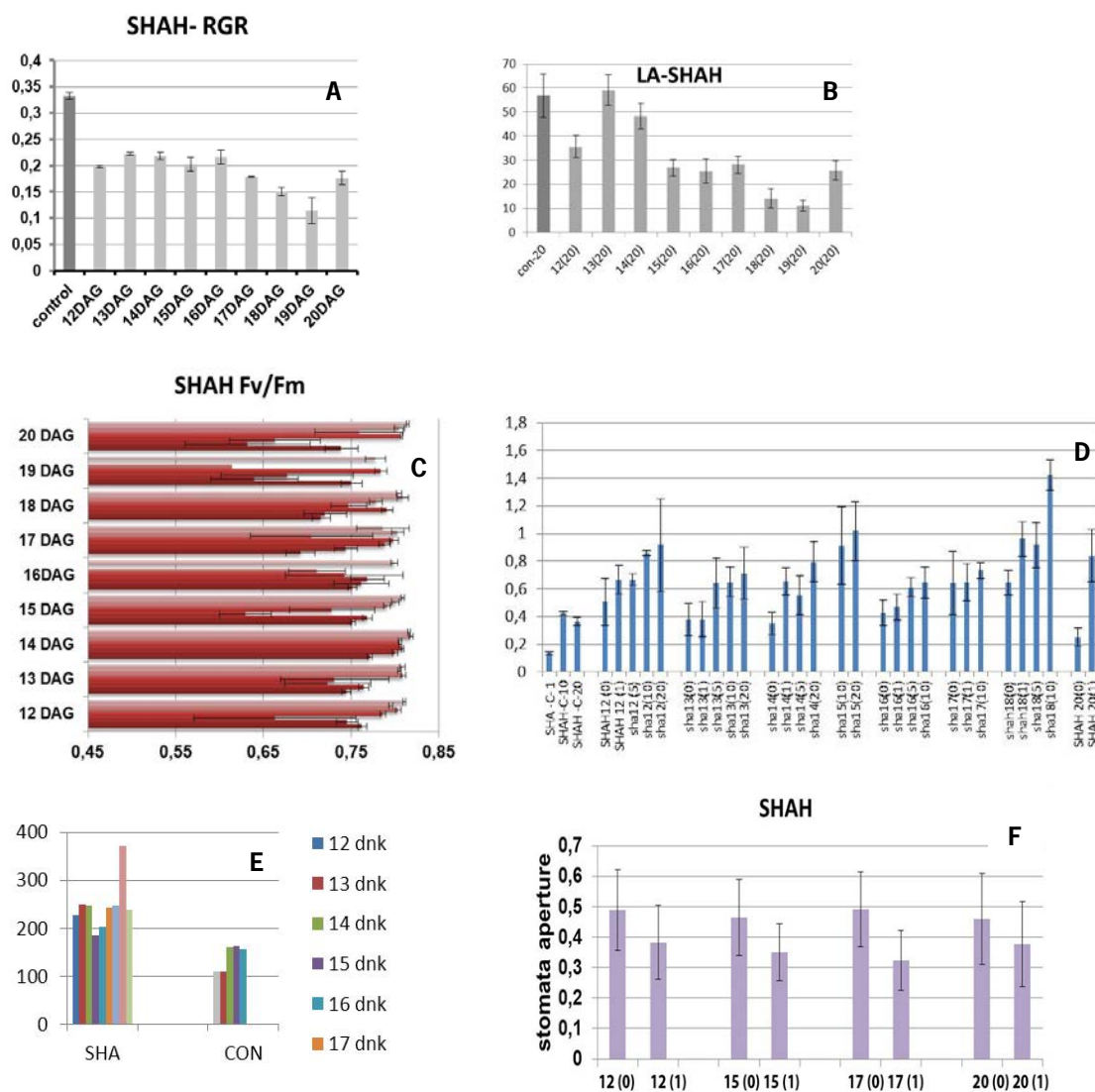
3.2.2 Groei, fysiologische parameters

De correlatie tussen stress, veroorzaakt door uitplanten, en verschillende fysiologische parameters is onderzocht. Hierbij zijn de verhoudingen tussen de relatieve groeisnelheid (Relative Growth Rate, RGR), bladoppervlakte (LA- leaf

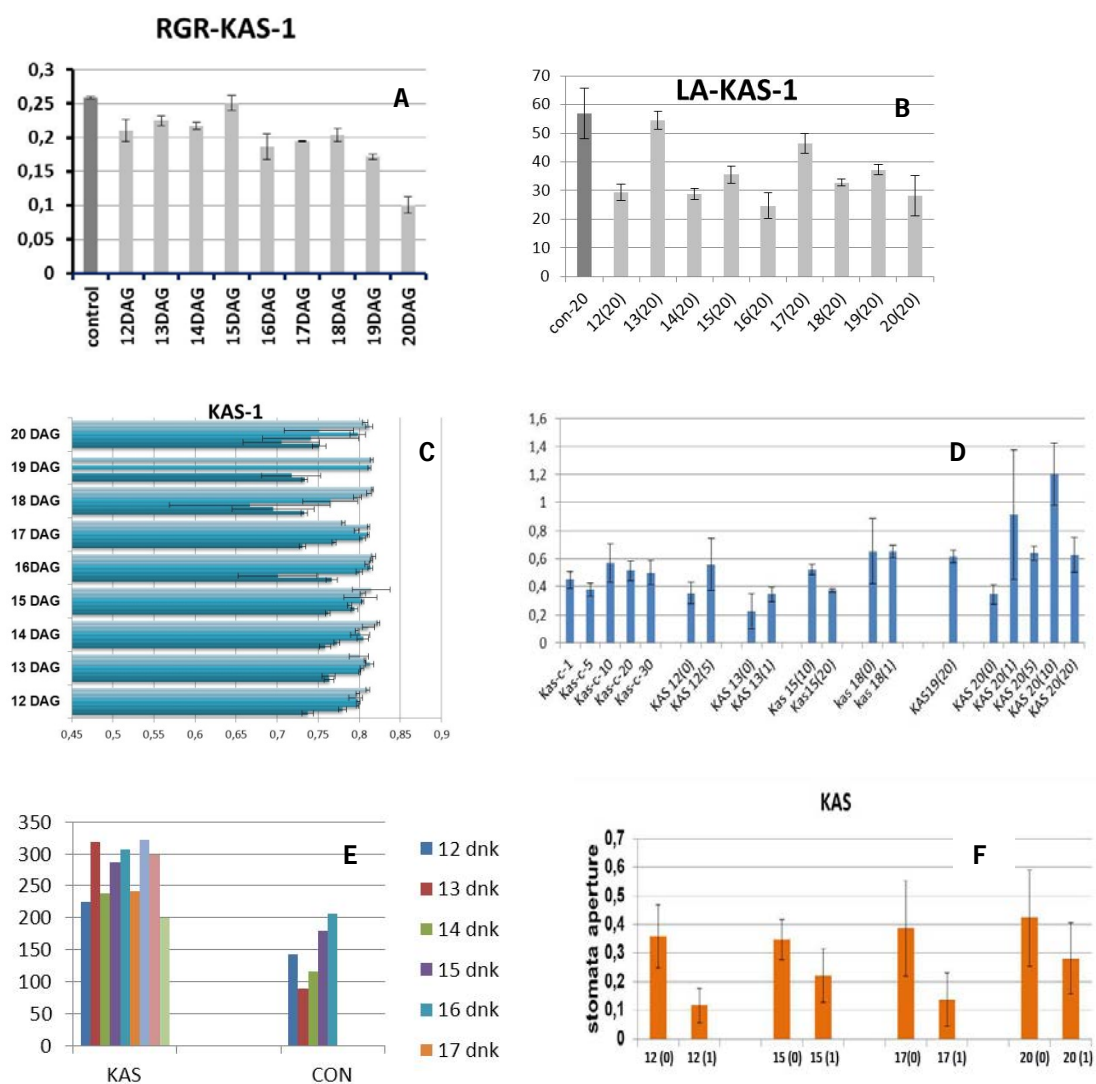
area), chlorophyl fluorescentie (Fv/Fm), chlorofyl gehalte per blad vers gewicht en het aantal huidmondjes per bladoppervlakte gemeten. Er bestaat een duidelijke correlatie tussen gereduceerde groei, reductie in bladoppervlakte en chlorofyl fluorescentie. Chlorofyl fluorescentie gemeten als Fm/Fv werd gebruikt als indicator van fysiologische stress en schade aan fotosysteem II (PS II; analyse op 5 tijdstippen).

Kas-1 en Col-1 kunnen goed herstellen tot aan 20DAG (Days After Germination). Bladeren van Shah en Cvi vertoonden daarentegen nauwelijks vermogen tot herstel na uitplanten van MS medium naar grond. *Ler* bevindt zich tussen Kas-1 en Cvi in. De nieuw gevormde bladeren in alle variëteiten vertoonden geen enkel teken van fysiologische stress gemeten als Fv/Fm en zijn vergelijkbaar met bladeren van controle planten.

Er bleek een duidelijke correlatie te bestaan tussen de tijd in *in vitro* groei en ontwikkeling *ex vitro* na oppotten in reductie van bladoppervlakte en chlorofyl fluorescentie. Een positieve correlatie werd gevonden tussen stress en chlorofyl gehalte. Naarmate de stress hoger was en de groei van de plant gereduceerd was, werd meer chlorofyl per gram bladgewicht gevormd. Het aantal stomata per bladoppervlakte was in alle geanalyseerde variëteiten hoger in planten gekiemd *in vitro* dan in controle *ex vitro* planten. Hoewel het vermogen van stomata om zich te sluiten in verlaagde luchtvochtigheid is gecorreleerd met acclimatiseringsvermogen, heeft het *aantal* stomata dus blijkbaar geen grote invloed op het vermogen tot herstel na het uitplanten. De figuren 10 en 11 laten de resultaten zien voor twee van de variëteiten, één als voorbeeld van vatbaar voor stress (Shah) en één als voorbeeld van een tolerante (Kas-1).



Figuur 10. Analyse van SHAH. A. RGR; B. Bladoppervlakte; C. Chlorofyl fluorescentie (Fv/Fm); D. Chlorofyl gehalte; E. Aantal van stomata per blad oppervlakte; F. Opening van stomata (ratio brede/lengte).



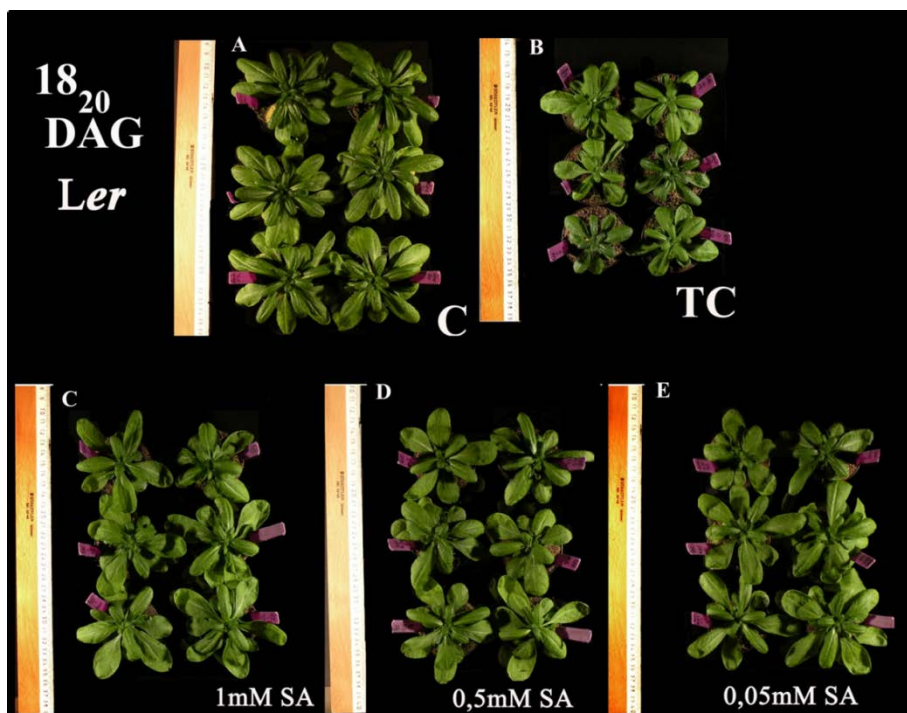
Figuur 11. Analyse van KAS-1. A. RGR; B. Bladoppervlakte; C. Chlorofyl fluorescentie (Fv/Fm); D. Chlorofyl gehalte; E. Aantal van stomata per blad oppervlakte; F Opening van stomata (ratio brede/lengte).

Resumerend, er zijn verschillen in het aanpassingsvermogen aan de stress als gevolg van het overgaan van *in vitro* omstandigheden naar de grond (afharderen) tussen de variëteiten. De afname van de groei en ontwikkeling in Shah, Cvi en Ler zijn goed gecorreleerd met parameters zoals chlorofyl fluorescentie, huidmondjes ontwikkeling en cellulaire organisatie van het blad. Aan de andere kant lijken Kas-1 en Col-1 in sommige opzichten meer stress tolerant in vergelijking met Shah, Cvi en Ler en vertoonden een veel beter vermogen om te herstellen.

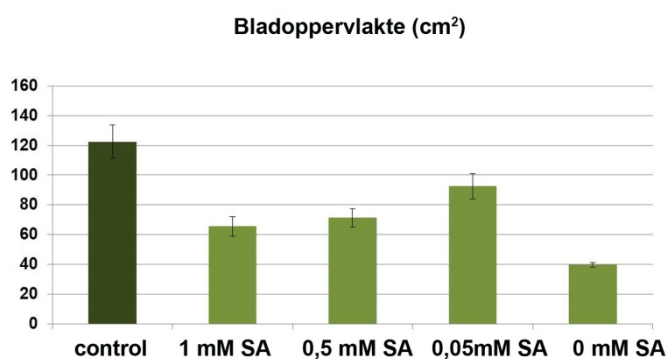
3.2.3 Salicylzuur

Salicylzuur (SA) is als signaalstof een schakel tussen het waarnemen van de stress en de reactie van de plant daarop. In dit project is de invloed van salicylzuur op de acclimatisatie van *Ler* bestudeerd. 17 Dagen na de kieming werden *in vitro* planten bespoten met een oplossing van SA in verschillende concentraties, 0,05 mM, 0,5 mM, 1 mM. Als gevolg daarvan bleken de planten beter te kunnen acclimatiseren aan de stressvolle omstandigheden. In deze studie is de beweging van huidmondjes bekeken na behandeling met SA *in vitro* en 1 dag na het uitplanten. Imprints werden in het donker en in licht van beide kanten van blad gemaakt. Op dag 0, 1, 5, 10 en 20 na uitplanten in de grond is een analyse gedaan van de chlorofyl fluorescentie (gemeten als Fv/Fm). Op dezelfde tijdstippen hebben we veranderingen in vers- en drooggewicht en bladoppervlaktegevoel geanalyseerd.

Toedienen van SA had invloed op de acclimatisatie. Planten die waren behandeld met SA herstelden sneller na het uitplanten en vertoonden een grotere bladoppervlakte dan niet behandelde planten (Figuren 12 en 13).

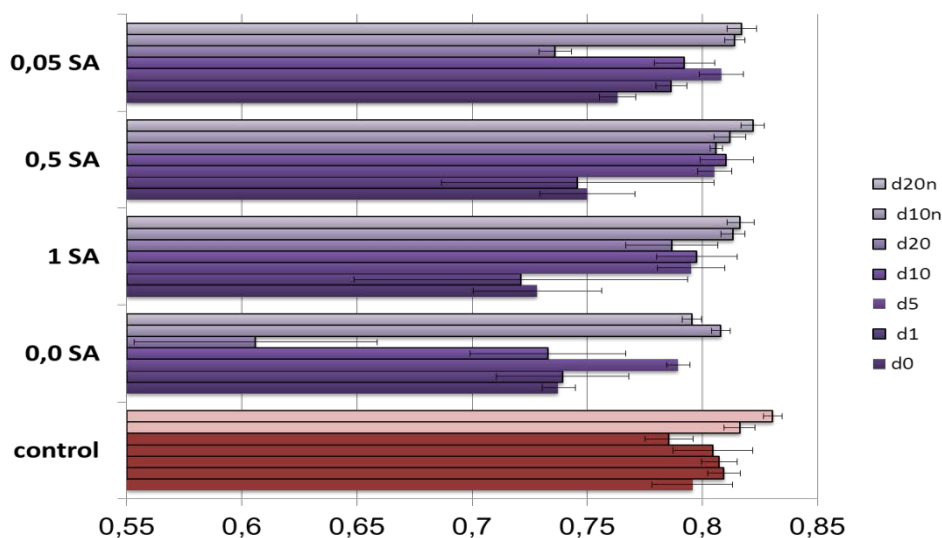


Figuur 12. Effect van Salicylzuur (SA) op de acclimatisatie. *Arabidopsis thaliana* 20 dagen na het oppotten ex vitro. Planten waren 18 dagen in vitro gekweekt. A. Control planten in grond gekweekt; B. In vitro gekweekte planten zonder behandeling met SA; C. In vitro gekweekte planten na de behandeling met 1mM SA; D. In vitro gekweekte planten na de behandeling met 0,5 mM SA; E. In vitro gekweekte planten na de behandeling met 0,05 mM SA



Figuur 13. Bladoppervlakte van controle en in vitro gekweekte planten 20 dagen na het uitplanten in grond.

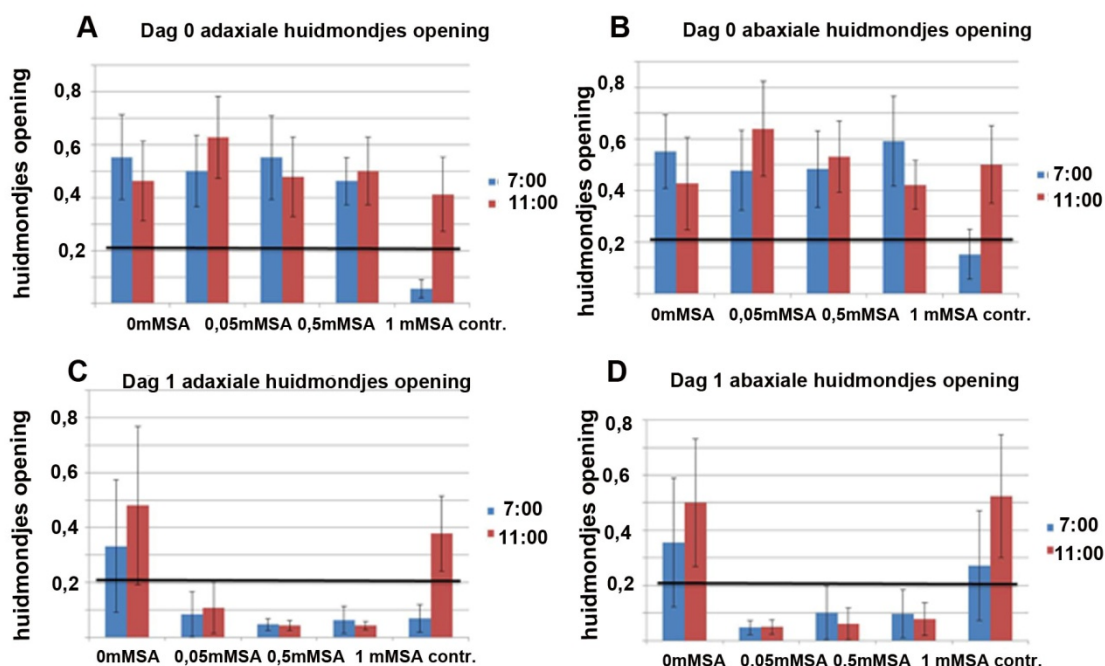
Fotosynthese-activiteit werd geanalyseerd als chlorofyl fluorescentie Fv/Fm. Chlorofyl fluorescentie is een indicator voor de mate van stress en in dit experiment toonde het stress bij planten aan (stress drempel 0,77) bij planten die geen SA-behandeling hadden gekregen. Planten na SA behandeling herstelden sneller hun fotosysteem II en toonden al 5 dagen na het uitplanten fluorescentie boven de stressdrempel (0.5 en 1 mM, Figuur 14).



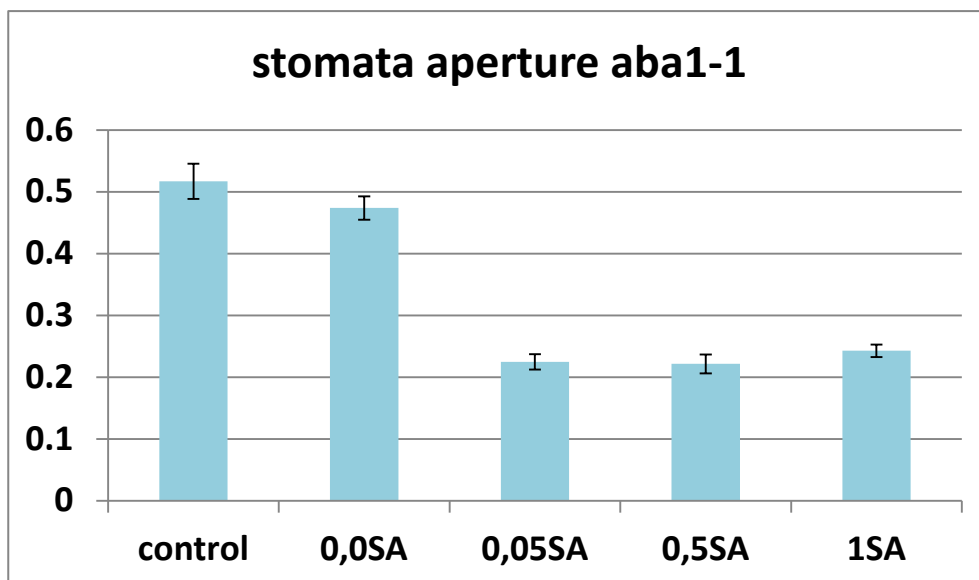
Figuur 14. Veranderingen in chlorophyllfluorescentie in de loop van 20 dagen van dag 0 (planten *in vitro* in dag van uitplanten) tot dag 20. Stressdrempel is 0,77 Fv/Fm. D10n en d20n zijn nieuw gevormde bladeren.

Figuur 15 laat de analyse aan huidmondjesbeweging zien, die werd bepaald met behulp van bladafdrukken (imprints). Uit onze analyse blijkt dat controle planten in het donker gesloten huidmondjes hadden en in het licht open huidmondjes. *In vitro* gegroeide planten hadden open huidmondjes in steriele omstandigheden bij 100% vochtigheid. In *in vitro* omstandigheden had de behandeling met SA geen effect op de huidmondjes opening. Na het uitplanten in grond en na behandeling met SA waren de planten in staat te reageren op de verandering in luchtvochtigheid en sloten de huidmondjes aan beide kanten van het blad. Arabidopsis planten zonder behandeling hielden hun huidmondjes open en droogden snel uit bij verandering in luchtvochtigheid. Om de rol van SA nader te bestuderen zijn er ook experimenten uitgevoerd met een tweetal mutanten, één deficiënt in SA productie (Nagh) en één deficiënt in ABA synthese of signaalverwerking (*aba1-1*). Bij wildtype Arabidopsis zaailingen verbetert SA de acclimatisering wat te zien is aan groeiparameters, aan chlorofyllfluorescentie als maat voor herstel en aan reactie van de huidmondjes op droogte of nacht (Figuur 15); bij mutant Nagh zien we na toediening van SA dezelfde effecten op acclimatisering, groei, Fv/Fm en huidmondjes. Bij *aba1-1* zien we geen effect van SA toediening op de groei of op Fv/Fm (herstel) maar wel op huidmondjes reactie al op dag 1 na uitplanten (Figuur 16).

Uit de literatuur is bekend dat de huidmondjes van *in vitro* opgekweekte plantjes niet meer reageren met sluiting op toediening van ABA; uit het eigen onderzoek blijkt dat SA in staat is het functioneren van de huidmondjes met sluiting weer te herstellen bij *in vitro* plantjes en dit zou rechtstreeks kunnen maar ook via het herstellen van het vermogen om op ABA te reageren. Daarnaast is SA betrokken in het afweren van stress. Het is dus in allerlei opzichten een zeer interessante kandidaat om de negatieve gevolgen van *in vitro* stress, zowel waterigheid als bij acclimatisering, tegen te gaan. Nader onderzoek is geboden.



Figuur 15. Opening van huidmondjes aan de adaxiale en abaxiale kanten van blad van planten, A en B, in vitro plantjes 18 dagen na kieming; C en D, 1 dag na uitplanten ex vitro. Planten waren behandeld met verschillende concentraties SA 17 dagen na de kieming. Huidmondjesopening is gemeten als breedte/lengte verhouding. Van alle groepen zijn 3 planten geanalyseerd om 7uur (donker) en om 11 uur (licht).



Figuur 16. Opening van huidmondjes van in aarde opgekweekte controle en in vitro opgekweekte zaailingen van een mutant die ongevoelig is voor ABA, 1 dag na uitplanten in aarde en acclimatiseren onder invloed van SA behandelingen (0, 0,05, 0,5 en 1,0 mM). Drie planten per groep om 11 uur (licht).

3.3 Waterigheid, moleculair biologisch onderzoek

3.3.1 Microarray

Om meer inzicht te krijgen welke genen en biologische processen betrokken zijn bij het ontstaan van waterigheid werd er een micro-array analyse uitgevoerd. Hiermee wordt de genexpressie bestudeerd tijdens verschillende stadia van HH. Eén week oude Arabidopsis zaailingen werden voor 2, 7 en 10 dagen gegroeid op media met 0.2% Gelrite of 0.7% agar, waarna er mRNA werd geïsoleerd en een micro-array expressieanalyse werd uitgevoerd op rond de 24.000 genen van Arabidopsis. De zogenaamde transcriptomen (dus het spectrum van actieve genen die worden overgeschreven in mRNA) van HH en niet-HH zaailingen werden vervolgens met elkaar vergeleken en verschillen in genexpressie gedetecteerd. De data van micro-array analyse werd genormaliseerd en er werd een Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) uitgevoerd. Met deze analyse werd bekeken of vooraf gedefinieerd genensets, die betrokken zijn in een bepaald biologisch proces, significant verschillen tussen de twee condities (Gelrite vs. agar).

Agar vs. Gelrite na 2 dagen groei.

Na een groeiperiode van 2 dagen op Gelrite, zagen we vooral genensets opgeregeleerd, die geassocieerd worden met processen van energievoorziening in de plant, zoals gluconeogenesis en zetmeelafbraak (Tabel 1.). Dit zou kunnen verklaren waarom de zaailingen op Gelrite iets sneller groeien dan de zaailingen gekweekt op agar.

Tabel 1. Genensets die significant verschillen tussen zaailingen gegroeid voor 2 dagen op Gelrite en agar.

Gelrite 2d vs. agar 2d, lager in expressie
GLUTATHIONE-MEDIATED_DETOXIFICATION_II
Gelrite 2d vs. agar 2d, hoger in expressie
GLUCONEOGENESIS_I
RUBISCO_SHUNT
STARCH_DEGRADATION_II
TRNA_CHARGING

Agar vs. Gelrite na 7 dagen groei.

In dit stadium ontwikkelden de zaailingen gegroeid op Gelrite de eerste symptomen van HH. Het aantal genensets dat was opgeregeleerd, nam in deze plantjes dan ook toe. Het is interessant om te zien dat de genen betrokken bij de biosynthese van ethyleen hoger tot expressie komen in HH plantjes. In de literatuur wordt een verhoogde productie van ethyleen namelijk meermaals geassocieerd met het ontstaan van waterigheid. Verder zien we een opregulatie van genensets betrokken bij de signaaltransductie van de signaalmoleculen salicylzuur (SA) en jasmonzuur. Dit zijn sterke aanwijzingen dat ook deze twee hormonen een rol spelen bij HH. De exacte rol van deze hormonen in de ontwikkeling van HH zal verder moeten worden onderzocht. Het is interessant om te vermelden dat salicylzuur geassocieerd wordt met sluiting van huidmondjes. Opvallend veel genen betrokken bij de productie van anthocyanen en secundaire metabolieten kwamen hoger tot expressie in HH zaailingen. Dit toont aan dat de HH plantjes inmiddels lijden aan stress.

Tabel 2. Genensets die significant verschillen tussen zaailingen gegroeid voor 7 dagen op Gelrite en agar.

Gelrite 7d vs. agar 7d, lager in expressie
GLYCINE_CLEAVAGE_COMPLEX
PHOTORESPIRATION
TRNA_CHARGING
Gelrite 7d vs. agar 7d, hoger in expressie
ETHYLENE_BIOSYNTHESIS_I

JASMONIC_ACID_HORMONE_RECEPTOR
SALICYLIC_ACID_HORMONE_SIGNAL_TRANSDUCTION
ANTHOCYANIN_BIOSYNTHESIS
SUPERPATHWAY_OF_ANTHOCYANIN_BIOSYNTHESIS
FLAVONOID_BIOSYNTHESIS
FLAVONOL_BIOSYNTHESIS
SCOPOLETIN_BIOSYNTHESIS
D-MYO-INOSITOL_(1,4,5)-TRISPHOSPHATE_BIOSYNTHESIS
PHOSPHOLIPASES
HOMOGALACTURONAN_DEGRADATION
CHOLINE_BIOSYNTHESIS_III
PHOSPHATE_ACQUISITION
THIAMINE_BIOSYNTHESIS_II

Agar vs. Gelrite na 10 dagen groei.

Het weefsel van de op Gelrite gekweekte plantjes was nu volledig waterig en vertoonde zelfs de eerste tekenen van necrose. Wederom kwamen de genen betrokken bij ethyleen biosynthese en signaaltransductie van salicylzuur en jasmonzuur hoger tot expressie in HH plantjes. Opvallend was nu de sterke toename van het aantal omlaag-gereguleerde genensets in HH plantjes. Vooral genen geassocieerd met de energievoorziening in de plant, zoals suiker metabolisme en fotosynthese waren lager in expressie. Een andere groep genen die minder tot expressie kwam in HH plantjes, waren genen betrokken bij de synthese van een cuticulare waslaag. Het is bekend dat de cuticulare waslaag nauwelijks is ontwikkeld in HH plantjes. Er waren verder tal van verschillende metabolisme processen omlaag-gereguleerd in HH plantjes. Dit komt zeer waarschijnlijk doordat het weefsel van de HH plantjes begon af te sterven als gevolg van stress.

Tabel 3. Genensets die significant verschillen tussen zaailingen gegroeid voor 10 dagen op Gelrite en agar.

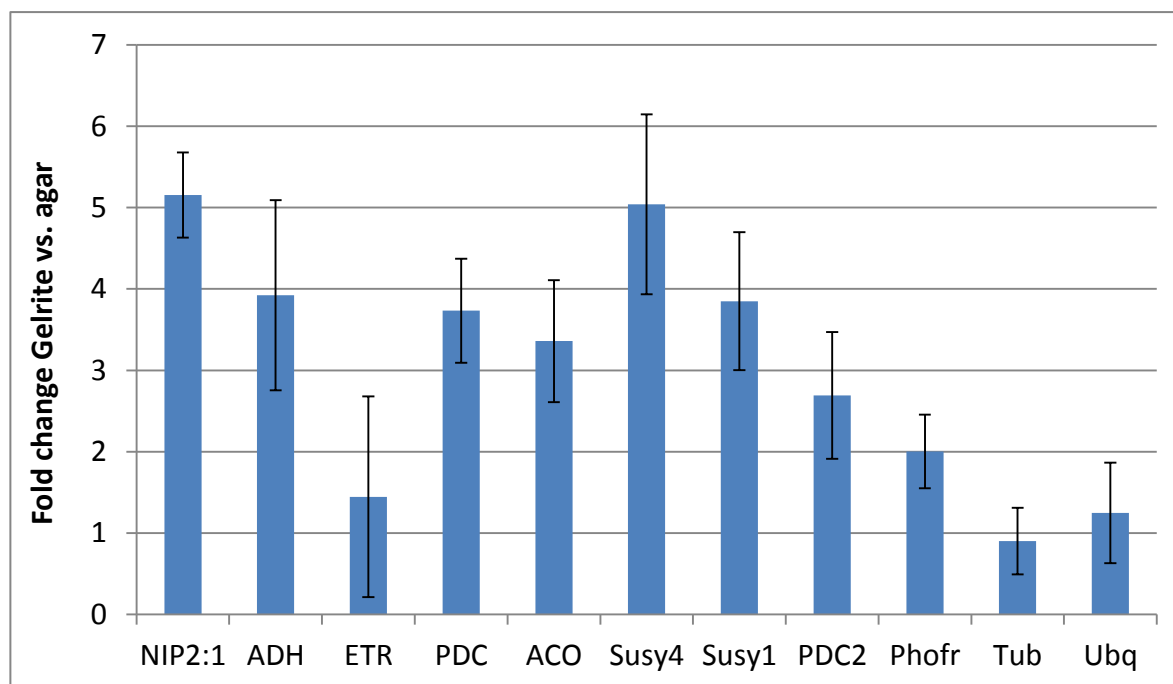
Gelrite 10d vs. agar 10d, lager in expressie
AUXIN_HORMONE_SIGNAL_TRANSDUCTION
AUXIN_HORMONE_TRANSPORTATION
BRASSINOSTEROID_HORMONE_SIGNAL_TRANSDUCTION
CALVIN-BENSON-BASSHAM_CYCLE
SUCROSE_BIOSYNTHESIS_I
GLYCOLYSIS_I
GLYCOLYSIS_IV_(PLANT_CYTOSOL)
GLUCONEOGENESIS_I
PHOTOSYNTHESIS_LIGHT_REACTIONS
PHOTORESPIRATION
GLYCINE_CLEAVAGE_COMPLEX
ASPARAGINE_BIOSYNTHESIS_III
TRNA_CHARGIN
CUTICULAR_WAX_BIOSYNTHESIS
FATTY_ACID_BIOSYNTHESIS_INITIATION_I
VERY_LONG_CHAIN_FATTY_ACID_BIOSYNTHESIS

SCIADONIC_ACID_BIOSYNTHESIS
SPHINGOLIPID_BIOSYNTHESIS
CDP-DIACYLGLYCEROL_BIOSYNTHESIS_I
DETOXIFICATION_OF_REACTIVE_CARBOXYLS_IN_CHLOROPLASTS
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_DIHOMOMETHIONINE
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_TRIHOMOMETHIONINE
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_TETRAHOMOMETHIONINE
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_PENTAHOMOMETHIONINE
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_HEXAHOMOMETHIONINE
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_HOMOMETHIONINE
GLUCOSINOLATE_BIOSYNTHESIS_FROM_PHENYLALANINE
ACETYL-COA_BIOSYNTHESIS_(FROM_PYRUVATE)
FLAVIN_BIOSYNTHESIS_I
Gelrite 10d vs. agar 10d, hoger in expressie
ETHYLENE_BIOSYNTHESIS_I
JASMONIC_ACID_HORMONE_RECEPTOR
SALICYLIC_ACID_HORMONE_SIGNAL_TRANSDUCTION
LIGNIN_BIOSYNTHETIC_PROCESS
CHOLINE_BIOSYNTHESIS_III
PHOSPHOLIPASES
FLAVONOID_BIOSYNTHESIS

Op dit moment worden de micro-array data verder geanalyseerd en ook zullen diverse genexpressie-waarden worden geverifieerd door middel van kwantitatieve real-time PCR.

3.3.2 qRT-PCR

Doordat de apoplast van HH plantjes vol met water zit, is de gasuitwisseling tussen de apoplast en de symplast verstoord. Een slechte gasuitwisseling zou tot een zuurstoftekort (hypoxie) in de cellen kunnen leiden en dit zou vervolgens ernstige oxidatieve stress kunnen veroorzaken. Deze hypothese wordt mede ondersteund door de waarneming dat HH *Arabidopsis* zaailing vaak anthocyanen in hun bladeren accumuleren. Het is bekend dat planten vaak anthocyanen aanmaken onder oxidatieve stress. Lange bladstelen van HH plantjes zijn een ander teken van 'verdrinkingsstress' en wordt ook waargenomen als *Arabidopsis* plantjes geheel onder water worden gezet. Verder vonden we dat HH *Arabidopsis* plantjes na ongeveer 3 weken afstierven; dit kan wellicht veroorzaakt zijn door oxidatieve stress. De slechte gasuitwisseling in HH weefsel speelt wellicht ook een rol bij het ontstaan van de verschillende morfologische en fysiologische afwijkingen in de HH plantjes. Om te controleren of hypoxie daadwerkelijk optreedt in HH weefsel, is de expressie van verschillende hypoxie-geïnduceerde genen, zoals alcohol dehydrogenase en pyruvate decarboxylase, bestudeerd. Dit is gedaan met behulp van real-time PCR analyses. Deze genen kunnen als markers voor hypoxie worden gebruikt, omdat hun expressie tijdens hypoxie toeneemt. De expressie van hypoxie-geïnduceerde genen, is geanalyseerd in bladeren afkomstig van HH en niet-HH *Arabidopsis* zaailingen.



Figuur 17. De expressieniveaus van hypoxie-gerelateerde genen en huishoudgenen in Gelrite gegroeide zaailingen versus agar-gegroeiende zaailingen van Arabidopsis.

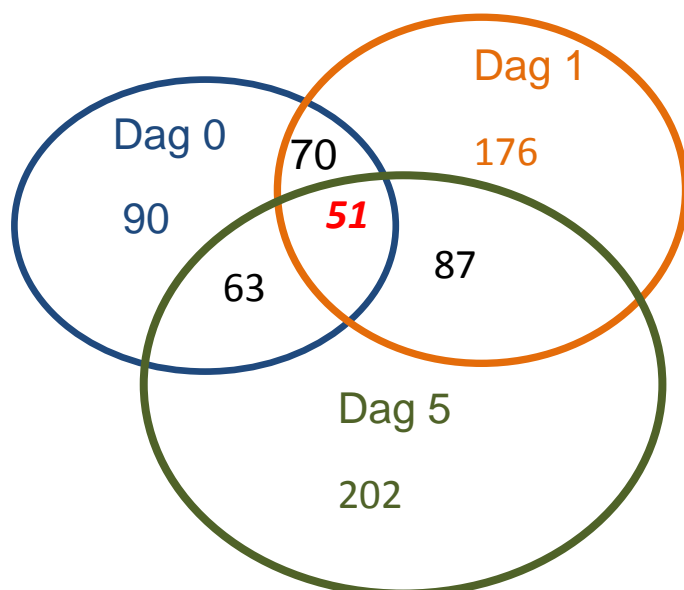
De bij hypoxie betrokken genen die m.b.v. qRT-PCR op expressie zijn bekeken zijn NIP 2:1 (een aquaporine gen betrokken bij watertransport), ADH (alcohol dehydrogenase), ETR (ethyleen receptor), PDC (pyruvaat decarboxylase), ACO (ethyleen biosynthese), Susy4 (sucrose synthase), Susy1, PDC2, Phofr (Fosfofructokinase6). Daarnaast zijn twee huishoudgenen, tubuline (Tub) en ubiquitine (Ubq) die niet door hypoxie worden beïnvloed, genomen als controle naast actine, de standaard. Figuur 17 laat zien dat 8 van de 9 hypoxie-genen hoger tot expressie komen in HH plantjes; alleen ETR verschilt niet significant. De huishoudgenen liggen volgens verwachting op hetzelfde niveau en zijn niet verhoogd of verlaagd qua expressie. Dit expressiepatroon geeft aan dat er bij HH plantjes inderdaad sprake is van stress door hypoxie (zuurstoftekort).

Vertegenwoordigers van genensets die mogelijk een rol spelen bij het ontstaan of ontwikkelen van stress door waterigheid geïdentificeerd door de microarray analyse zullen in de toekomst op eenzelfde manier verder worden geverifieerd.

3.4 Acclimatisering, moleculair biologisch onderzoek

3.4.1 Microarray

Voor de acclimatisering is een vergelijkbare analyse m.b.v. microarrays uitgevoerd. Hiertoe is RNA geïsoleerd van zaailingen van Kas-1 die 22 dagen in vitro zijn opgekweekt en duidelijk teken van stress vertoonden en toen zijn uitgeplant in aarde (t=0), 1 dag na uitplanten (t=1) en 5 dagen na uitplanten (t=5). De controles waren zaailingen die eenzelfde periode in aarde zijn opgekweekt (dus 22, 23 en 27 dagen). De verkregen data moeten nog grondig worden bestudeerd en geanalyseerd. Een eerste analyse is te zien in figuur 18, die de aantallen genen weergeeft die in expressie verschillen tussen de in vitro gekweekte plantjes en de 'aarde'-controles van gelijke leeftijd. De expressie van 51 genen is bij alle plantjes die onder in vitro condities zijn gegroeid significant verschillend t.o.v. de in aarde opgegroeide controles, onverschillig wat hun leeftijd is.



Figuur 18. De aantallen genen die verschillen in expressie tussen de in vitro plantjes en de 'aarde'-controles op de verschillende tijdstippen en de aantallen die de verschillende tijdstippen delen.

De genen die de waarnemingen op dag 1 en dag 5 delen qua verschil in expressieniveau t.o.v de controles, hebben mogelijk te doen met de stress die veroorzaakt wordt door de acclimatisering. Tabel 4 toont de genensets.

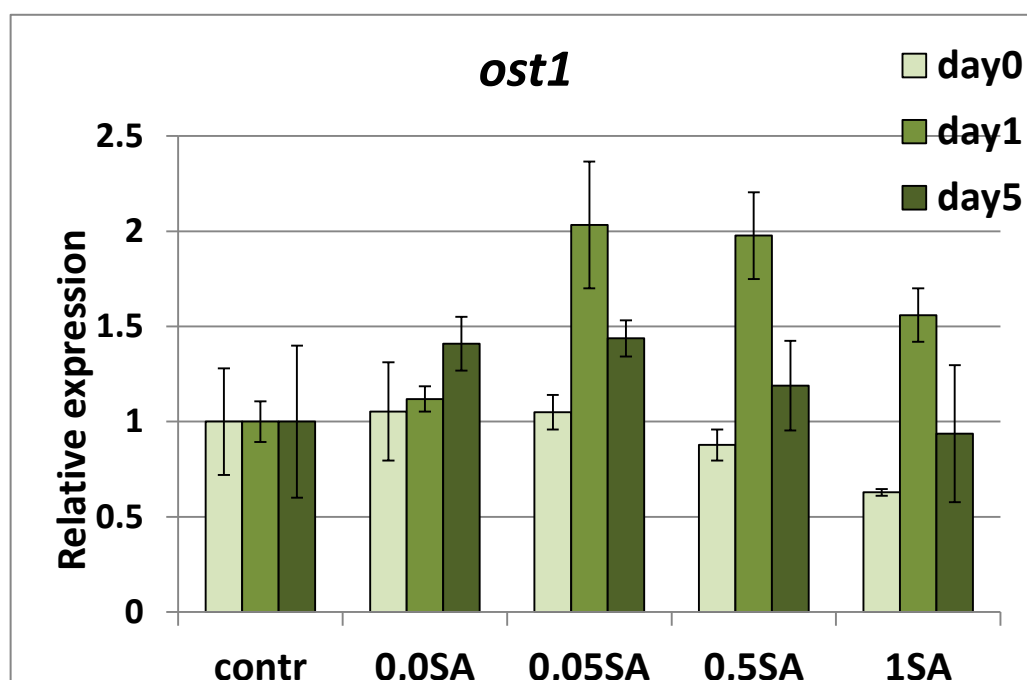
Tabel 4. Genensets die significant verschillen tussen zaailingen 1 dag en 5 dagen na uitplanten vanuit in vitro groeicondities en zaailingen die in aarde zijn opgekweekt als controle.

SALICYLIC_ACID_HORMONE_SIGNAL_TRANSDUCTION
ABSCISIC ACID GLUCOSE ESTER BIOSYNTHESIS
JASMONIC ACID BIOSYNTHESIS
LEUCINE BIOSYNTHESIS
COUMARIN BIOSYNTHESIS
FREE PHENYLPROPANOIC ACID BIOSYNTHESIS
FERULATE AND SINAPATE BIOSYNTHESIS
LEUCODELPHINIDIN BIOSYNTHESIS
LEUCOPELARGONIDIN AND LEUCOCYANIDIN BIOSYNTHESIS
SCIADONIC ACID BIOSYNTHESIS
VERY LONG CHAIN FATTY ACID BIOSYNTHESIS
AUXIN HORMONE BIOSYNTHESIS
CHLOROPHYLL A DEGRADATION II
GLUCOSINOLATE BREAKDOWN
FATTY ACID BETA-OXIDATION II
ETHANOL DEGRADATION IV (PEROXISOMAL)
ETHANOL DEGRADATION II (CYTOSOL)
STARCH DEGRADATION I
METHYLGLYOXAL DEGRADATION I

Wat opvalt, is dat ook hier genensets betrokken bij salicylzuur en jasmonzuur signaaltransductie significant meer tot expressie komen bij acclimatisering, net als eerder bij waterigheid. De betekenis van de waargenomen verschillen in expressie van genen en genensets moet nog nader bestudeerd worden.

3.4.2 qRT-PCR

De rol die salicylzuur (SA) als signaalmolecuul speelt in de reactie op de diverse stresscondities, ook bij het acclimatiseren, was al eerder vastgesteld in het fysiologische onderzoek, maar wordt hier via de moleculaire analyse bevestigd. Om deze rol verder te bestuderen zijn er een aantal genen in de literatuur geïdentificeerd die betrokken zijn bij de regulatie van of door SA. Dit zijn genen die de expressie van andere genen reguleren (transcriptie factoren zoals WRKY-8, MYC2 of MYB36), die betrokken zijn bij de reactie op het plantenhormoon ABA (ABA insensitive: ABI1, ABI2 en ABI5) of die betrokken zijn bij het openen of sluiten van de huidmondjes als reactie op ABA (OST1). Het expressieniveau van deze genen is bekeken na de diverse behandelingen met SA (0, 0,05, 0,5 en 1,0 mM) en op de verschillende tijdstippen na overbrengen in de aarde (acclimatiseren). De transcriptiefactoren vertonen een verschillend patroon, maar lijken wel allemaal te reageren op de SA behandeling. Dit zelfde geldt ook voor de andere genen, al is de relatie met het acclimatiseren niet voor alle genen even eenduidig. In figuur 19 is het expressiepatroon voor OST1 gegeven. Te zien valt dat de expressie o.i.v. SA 0,5 en 0,5 mM 1 dag na uitplanten piekt en na 5 dagen weer terugloopt. Dit is in overeenstemming met de eerder gevonden reactie van huidmondjes met sluiting op de behandeling met SA 1 dag na uitplanten (zie figuur 15), herstel van de functionaliteit van de huidmondjes o.i.v. SA.



Figuur 19. Genexpressiepatroon van *OST1* na diverse behandelingen met salicylzuur (SA; 0, 0,05, 0,5 en 1,0 mM) op de dag van overgang van *in vitro* naar *ex vitro*, 1 dag na uitplanten en 5 dagen na uitplanten. Contr. betekent de in aarde opgekweekte zaailingen op dag 22, 23 en 27.

3.4.3 QTL analyse

In vitro gekweekte *Arabidopsis thaliana* planten hebben typische weefselkweek gerelateerde problemen bij de overzetting naar de grond en voor deze afwijkingen hebben wij intraspecifieke natuurlijke genetische variatie gevonden. Na overzetten op grond zagen we verschillen in het aanpassingsvermogen van de verschillende variëteiten van

Arabidopsis. Om inzicht te krijgen in de genetische achtergrond van die verschillen zijn de nakomelingen van een kruising tussen Ler en Shah (allebei gevoelig voor uitplanten, 60 lijnen) en van een kruising tussen Ler (gevoelig) en Kas (tolerant, 70 lijnen) bekeken en is er een QTL (quantitative trait loci) analyse uitgevoerd. Hiermee kunnen mogelijk zelfs genen worden gelocaliseerd die betrokken zijn bij acclimatisering. Als meetbaar kenmerk is chlorofylfluorescentie gebruikt. Deze is gemeten op 19 dagen na kieming en 1 en 5 dagen na overbrengen in de aarde. De resultaten van deze analyse moeten nog worden uitgewerkt en details waren niet beschikbaar op het moment van opstellen van deze eindrapportage. Wel zijn er QTLs geïdentificeerd, dus gebieden op de chromosomen van Arabidopsis waar genen gelegen zijn die significant bijdragen aan de waargenomen variatie in de gemeten eigenschap (Fv/Fm).

3.5 Controle gewas

3.5.1 De keuze

De bedoeling van een controle gewas was om de bedrijven in staat te stellen een voor iedereen gelijk standaardgewas onder standaardcondities (standaardprotocol) te vermeerderen en de effecten van de stress behandelingen en uit te testen stoffen te bestuderen. Dit om eventuele 'bedrijfseffecten' te kunnen uitsluiten. Bij aanvang van het project was de keuze op roos gevallen omdat dat goed waterig te krijgen zou zijn en beschikbaar was bij een van de kennisinstellingen. Het induceren van HH bij in vitro op Gelrite vermeerderde roos bleek echter niet reproduceerbaar. Daarna zijn op suggestie van deelnemende bedrijven verschillende gewassen geprobeerd, zoals Salvia, aardappel en uiteindelijk Statice. De laatste bleek te voldoen, maar toen was het project al aardig in de tijd gevorderd en was de input van de bedrijven teruggelopen. Wel zijn er fysiologische studies gedaan naar HH bij statice om te zien of de bij Arabidopsis waargenomen fenomenen ook opgingen in een ander gewas.

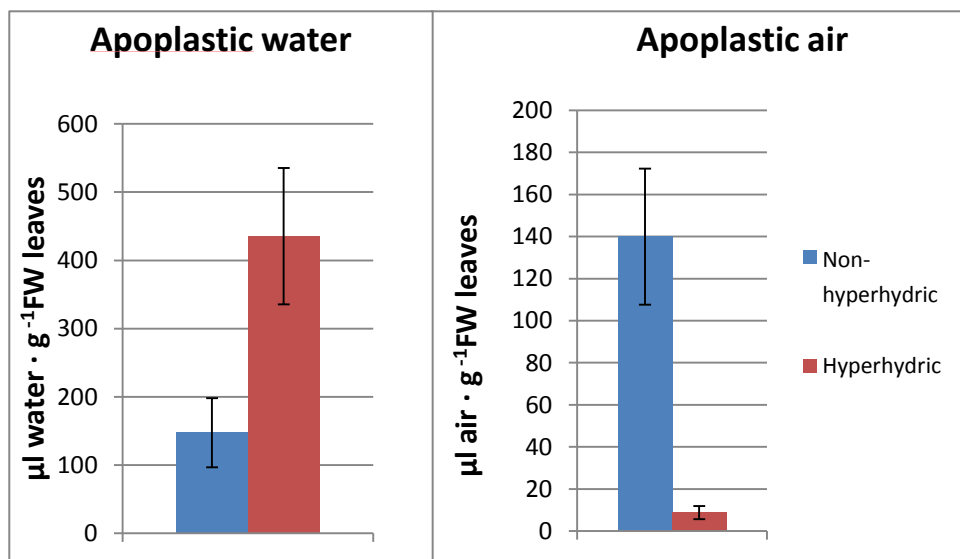
3.5.2 Statice

Nadat vastgesteld was dat kweek op met Gelrite gegeleerd medium ook bij statice HH plantjes gaf (Figuur 20) terwijl dat bij kweek op agar-medium niet het geval was, zijn ook de statice plantjes van beide media getest op apoplastisch water, apoplastisch lucht en op open of dicht staan van de huidmondjes.



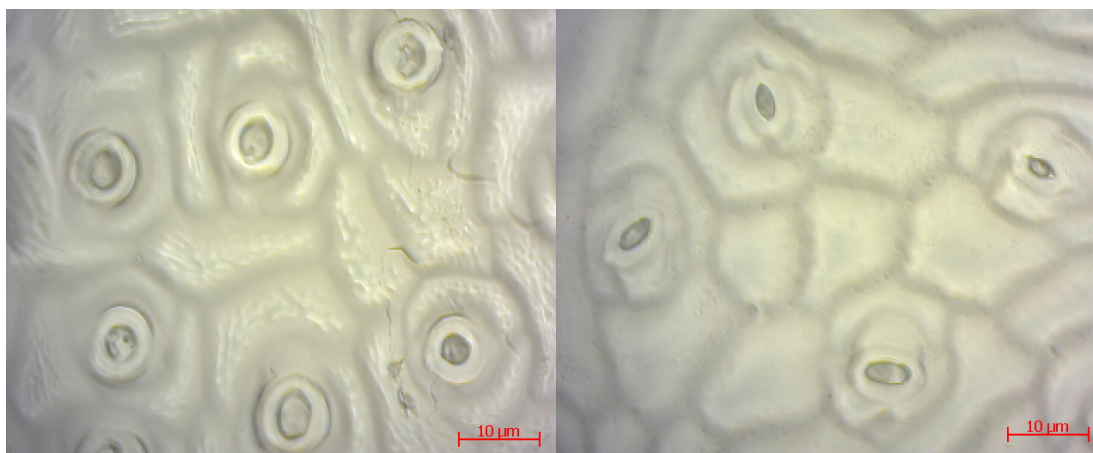
Figuur 20. HH statice plantjes gegroeid op Gelrite medium. Let wel, niet alle plantjes ontwikkelen waterigheid.

Figuur 21 laat zien dat ook bij statice de HH plantjes gekenmerkt worden door significant meer water in de apoplast dan niet-HH plantjes, terwijl de hoeveelheid apoplastisch lucht beduidend minder is. Aangezien hetzelfde fenomeen werd waargenomen bij Crambe en appel plantjes (niet getoond) kan geconcludeerd worden dat het een algemeen effect is in HH plantjes en een goede indicator, zoals al eerder opgemerkt.



Figuur 21. Apoplastisch water en lucht gemeten in HH (Gelrite) en niet-HH (agar) statice plantjes

De huidmondjes bij niet-HH statice plantjes staan wijder open dan die bij HH plantjes (Figuur 22). Ook dit beeld bevestigt eerdere bevindingen bij Arabidopsis zaailingen. HH lijkt dus tot sluiting van de huidmondjes te leiden en daarmee wordt de mogelijkheid tot verdamping van teveel water nog verder bemoeilijkt. Verdamping in in vitro condities is al beperkt vanwege de hoge luchtvochtigheid in de containers.



Figuur 22. De huidmondjes van niet-HH plantjes (links) zijn wijd geopend; die van HH plantjes (rechts) zijn meer gesloten.

Statice plantjes blijken dus de goede standaardplantjes te zijn die gezocht werden. Daarnaast blijken Arabidopsis zaailingen goed te kunnen fungeren als model voor in vitro problematiek voor de reguliere in vitro vermeerderde gewassen.

3.6 Bijdrage van bedrijven

Hieronder volgt een samenvatting van de inspanningen van de deelnemende bedrijven. Het betrof bij aanvang van het project 8 bedrijven, die experimenten hebben uitgevoerd aan meer dan 15 gewassen en gemiddeld zo'n 3 stoffen of condities hebben getoetst op effect op waterigheid of afharderen of vermeerderen of allemaal. Zij hebben hier uitgebreid over gerapporteerd in de Tussenrapportages. Hun inspanning en bijdrage aan dit project zijn beduidend geweest en de lengte van de samenvatting hieronder doet geen recht aan die bijdrage.

3.6.1 Testen protectants

Waterigheid

Diverse protectants zijn door de deelnemende bedrijven getest op hun invloed op het ontstaan van waterigheid bij meerdere gewassen. De geteste beschermende stoffen waren trehalose, putrescine, proline en glycine-betaine. De gewassen die getest zijn waren ranonkel, lavendel, stative, delphinium, phlox, salvia, cycloam en verbasum. Over het algemeen is er geen duidelijk en e nduidig positief effect waargenomen van  en van de beschermende stoffen. Soms was het effect, vaak bij de hogere concentraties, zelfs negatief te noemen. Licht positieve effecten zijn gevonden bij stative voor putrescine en bij ranonkel voor glycine betaine, maar die waren in ieder geval cultivar-afhankelijk. Voor trehalose en proline werd een licht positief effect gezien bij verbasum, maar diezelfde behandelingen bleken later bij de beworteling negatief uit te werken.

Acclimatisering

In grote lijnen zijn hier dezelfde protectants bekeken voor wat betreft de afharding na overbrengen in aarde. De gewassen waren lavendel, miltonia, cambria, alstroemeria, cycloam, echinacea en verbasum; bij de protectants is ook op beperkte schaal ascorbinezuur getest. Ook hier konden geen duidelijke positieve effecten worden geconstateerd. Bij alstroemeria leek er aanvankelijk een positief effect op weggroei bij een cultivar, maar dit bleek niet reproduceerbaar. Hetzelfde werd gevonden bij het toedienen van proline bij echinacea; eerst minder uitval, maar helaas niet reproduceerbaar. Toediening van glycine betaine leek bij cambria minder gele punten te geven na uitplanten.

Vermeerdering

De bedrijven hebben van sommige stoffen ook gescoord of de vermeerderingsfactor wellicht verbeterde. Dit is bekeken voor trehalose en putrescine bij alstroemeria, zantedeschia, lisianthus, lavendel, echinacea, verbasum, delphinium en cycloam. Er kon geen positief effect worden vastgesteld.

3.6.2 Testen signaalstoffen

Acclimatisering

Signaalstoffen konden nog pas op zeer beperkte schaal uitgetest worden binnen dit project. Het betrof vooral de toepassing van 3-aminobutanoic acid (BABA), een non-proteine aminozuur betrokken bij de signaaltransductie van het plantenhormoon jasmonzuur (JA), en van salicylzuur (SA), een ander plantenhormoon betrokken bij het regelen van de afweer bij (abiotische stress. SA kwam ook uit de fysiologische en moleculaire onderzoekslijnen naar voren als effector bij zowel waterigheid als acclimatisering in Arabidopsis. BABA en SA werden getest bij miltonia en cambria. Voor BABA is nog geen eindoordeel mogelijk omdat in dat experiment de controle geen fenotype gaf te zien en dus niet bekeken kon worden of het beter zou zijn met BABA behandeling. Voor SA bleek dat de manier en het moment van toedienen van groot belang kunnen zijn. Verder onderzoek is hier zeker nodig.

3.6.3 Testen milde stress

Acclimatisering

Voorbehandelen door een lichte stress behandeling tijdens de bewortelingsfase v or het uitplanten is bestudeerd bij 3 alstroemeria cultivars. De voorbehandeling hield in het opkweken/bewortelen onder condities die de plantjes normaliter pas tegenkomen na uitplanten in de kas, d.w.z. voor 1, 2 of de volle 3 weken bij direct zonlicht, minimale temperatuur van 14  C en een RV van 85%. De volle 3 weken beworteling onder die condities gaf bij alle 3 de cultivars een lager percentage kleine planten na afharderen en groei in aarde en bij 1 ook minder uitval.

Vermeerdering

In alstroemeria zijn de effecten van het toedienen van een milde vorm van stress op de vermeerdering bekeken bij vijf cultivars. Bij twee van hen werd een licht positief effect vastgesteld dat te gering was om significant te kunnen worden genoemd.

3.6.4 Andere behandelingen

Het veranderen van het cytokinine in het medium voor de vermeerdering van statice, topoline i.p.v. BAP had geen effect op de waterigheid. Het veranderen van het agar-type had bij echinacea een duidelijk positief effect op vermeerdering en beworteling. Ook het veranderen van het container-type had een positief effect op vermeerdering en wel bij delphinium en phlox. Tot slot vertoonden diascia plantjes de beste groei onder condities die de beste gasuitwisseling mogelijk maakten.

4. Conclusies

Bij in vitro vermeerdering worden planten blootgesteld aan sterk afwijkende en stressvolle condities in vergelijking met gewone groei in het veld of in aarde in een kas. Die suboptimale opgroeicondities leiden tot kwaliteitsverlies en stress-gerelateerde verschijnselen, zoals waterigheid (HH, hyperhydricity) en verwelking na overplanten in aarde (acclimatiseringsproblemen). Gezien de grote hoeveelheid van in vitro vermeerderde soorten en cultivars en de verschillende reacties van die gewassen op de in vitro condities is het voor een fundamentele studie om inzicht te krijgen in de onderliggende mechanismen zaak om aan een representatief modelgewas te werken. Hét modelgewas bij uitstek in het planten moleculair genetische onderzoek is de zandraket, *Arabidopsis thaliana*. Allereerst is dan ook onderzocht of het mogelijk was om de genoemde twee stress-gerelateerde verschijnselen reproduceerbaar op te wekken bij in vitro *Arabidopsis* zaailingen. Zaailingen van *Arabidopsis* werden 7 dagen na kieming over gebracht naar medium gegelleerd met agar of met Gelrite en op het medium met Gelrite trad na ongeveer 7 dagen waterigheid op in bijna 100% van de zaailingen, terwijl die op agar normaal bleven. Zaailingen die gedurende 12 tot 20 dagen op agar in vitro werden opgekweekt en vervolgens werden overgebracht naar aarde en zonder bescherming (afdekking) werden doorgekweekt, vertoonden verwelking en een duidelijk effect op groei en herstel. Er bleek afhankelijk van het geteste ecotype (variëteit) een verschil in gevoeligheid of tolerantie voor de stress. Kortom, *Arabidopsis* bleek geschikt om beide stress-fenomenen in detail te bestuderen.

Waterigheid, zoals de naam al doet vermoeden, bleek gekoppeld aan een toename van de hoeveelheid water in de apoplast en een direct daaraan verbonden afname van de hoeveelheid apoplastische lucht in vergelijking met normaal uitzierende plantjes. Dit werd vastgesteld bij *Arabidopsis* maar ook bij het standaardgewas *Statice*, bij *Crambe abyssinica* en bij appel. Verhoogd apoplastisch water en verlaagd apoplastische lucht bleken dus goede, generieke merkers of indicatoren voor waterigheid. Meer water in de apoplast kan komen door verminderde afvoer of verhoogde aanvoer of beiden. In verband met de hoge luchtvochtigheid in de vermeerderingscontainers zal afvoer via verdamping sterk beperkt zijn. Onderzoek aan huidmondjes toonde aan dat die van HH plantjes meer gesloten waren dan die van niet-HH plantjes en ook dat de water retentie capaciteit van HH plantjes groter was. De waterhuishouding is dus duidelijk meer van slag in HH plantjes in vergelijking met niet-HH plantjes. Het teveel aan water in de apoplast leidt tot een verminderde gasuitwisseling tussen cellen en intercellulaire ruimtes; dit betreft gassen als O_2 , CO_2 en ethyleen. Zuurstofgebrek of hypoxia op celniveau zal het gevolg zijn en leiden tot oxidatieve stress. Dit bleek ook uit de bepaling van de hoeveelheid zuurstofradicalen en uit de expressie van genen die gerelateerd zijn aan hypoxische condities. In de HH plantjes waren meer reactieve zuurstofverbindingen aanwezig en waren hypoxia-gerelateerde genen opgereguleerd.

Het vermogen tot acclimatisering is bepaald aan de hand van verschillende groeiparameters, waaronder chlorofylfluorescentie. Deze parameters bleken goede indicatoren om tolerantie en herstellend vermogen vast te stellen bij de verschillende variëteiten van *Arabidopsis* en de diverse behandelingen. De parameters zijn gebruikt om een QTL analyse te doen aan de nakomelingen van een tweetal kruisingen, één tussen twee gevoelige typen en één tussen een gevoelig type en een meer toleranter type. Er konden gebieden op chromosomen aangewezen worden die geassocieerd zijn met het vermogen tot acclimatisering; een nadere uitwerking van deze studie is onderweg. Bestudering van het functioneren van de huidmondjes aan dit materiaal gaf aan dat de huidmondjes van in vitro opgekweekte zaailingen na uitplanten in aarde niet adequaat op de nieuwe, drogere omstandigheden reageerden. Normaal sluiten de huidmondjes bij droogte om verdamping en verwelking tegen te gaan, bij de in vitro opgekweekte plantjes bleek dit vermogen verloren. Opvallend was dat een behandeling met salicylzuur (SA) dit vermogen kon herstellen, zelfs in een mutant die ongevoelig is voor ABA. Dit hormoon regelt normaal het sluiten van huidmondjes. Een behandeling met SA zou dus, onafhankelijk van het vermogen om op ABA te reageren, bij in vitro vermeerderde plantjes het acclimatiseren kunnen verbeteren bij de overgang naar de aarde en de kas.

Het modelgewas *Arabidopsis* leent zich bij uitstek voor moleculair genetische studies bijvoorbeeld op het gebied van genexpressie. Met behulp van zogenaamde microarrays, een soort DNA chips, waarop alle 24.000 genen van *Arabidopsis* zijn aangebracht kan bestudeerd worden welke genen er in specifieke omstandigheden zijn aan- of juist zijn uitgeschakeld of hoger of lager 'aan' staan waarbij twee situaties worden vergeleken. Dit is ook gedaan in dit project waar waterig en niet-waterig zijn bekeken en dan op verschillende momenten van ontstaan van waterigheid en ook uitgeplante zaailingen op het moment van uitplanten en na 1 of 5 dagen. Dit leverde een grote hoeveelheid data op, die een zorgvuldige nadere bestudering vergen. Vele honderden genen verschillen in expressie maar een direct verband of een makkelijke verklaring is niet altijd snel voorhanden. Daarom is er eerst gekeken naar welke groepen van genen

significant verschillen en bij wat voor soort processen die betrokken zijn. Hieruit bleken grote overeenkomsten tussen de beide stresscondities. Een aantal van die groepen genen zijn 1) genen betrokken bij de SA signaaltransductie, 2) genen betrokken bij de jasmonzuur signaalverwerking, 3) genen betrokken bij de verdediging tegen zuurstofradicalen, 4) genen betrokken bij het mobiliseren van voedselreserves en 5) genen betrokken bij celwandsynthese of – afbraak. Er zijn er nog meer, maar deze vijf leveren al een aantal interessante aanknopingspunten op voor verder onderzoek gericht op het identificeren van directe applicaties van stoffen of behandelingen om de stress van in vitro vermeerdering tegen te gaan en de kwaliteit van de geproduceerde planten te verhogen.

Het uittesten van diverse protectants of andere stoffen gaf geen generiek positief effect te zien, noch op het terugdringen van waterigheid noch op het vermogen te acclimatiseren. Op individueel niveau en soms cultivar-afhankelijk bleken sommige stoffen of behandelingen een licht positief effect te geven wat het verdient om nader bekeken te worden, vooral de SA behandeling biedt perspectief.

5. Producten en dissimiatie

Artikelen:

L. Rojas-Martínez, R.G.F. Visser & G.J. de Klerk (2010) The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Prop. Orn. Plants* 10: 169-175.

L. Rojas-Martínez and G.J. de Klerk (2010): Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. Drowning from within. *Prophyta Annual* 2010: 22-25.

G.J. de Klerk (2010): Why plants grow in tissue culture. Questions, answers and exciting prospects. *Prophyta Annual* 2010: 42-44

N. van den Dries, F.A. Krens, S. Gianni & G.J. de Klerk (2012) Volumes of apoplastic water and air in hyperhydric leaves of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Acta Hort.* 961:519-524.

Artikelen in voorbereiding:

G.J. de Klerk, F. Krens & N. van den Dries. The key to hyperhydricity: the intercellular spaces are filled with water. *Prophyta Annual* 2013: xx-yy

N. van den Dries, F.A. Krens & G.J.M. de Klerk. (2013) The critical factor in the development of hyperhydricity: a disturbed balance between volumes of water and air in the apoplast.

Plus nog drie: 1) moleculaire analyse genexpressie bij waterigheid (N. van den Dries et al.)

2) Fysiologie van stress bij acclimatiseren (A. Czerednik et al)

3) Moleculaire analyse van genexpressie bij acclimatiseren (A. Czerednik et al.)

Lezingen:

Dr. G.J. de Klerk, Wageningen, NVPW, 20-11-2009 "Flux van mediumcomponenten in weefselkweek".

Dr. N. van den Dries, Wageningen, NVPW, 28 juni 2012 "Waterigheid, de hoeveelheid lucht in de apoplast is cruciaal".

Dr. A. Czerednik, Wageningen, NVPW, 28 juni 2012 "Kan de zandraket problemen bij *in vitro* weefselkweek oplossen?"

Dr. A. Czerednik, Coimbra 8th International Symposium on In Vitro Culture & Horticultural Breeding, 2-7 June 2013.

"The role of Salicylic acid in acclimatization of *in vitro* grown *Arabidopsis thaliana* after transfer to the soil."

Posters:

- "Development of hyperhydricity in *Arabidopsis thaliana* seedlings and measurement of the water content of the apoplast." door LI Rojas Martinez, FA Krens, RGF Visser & GJ de Klerk gepresenteerd op:
 - 12th World Congress of the International Association for Plant Biotechnology, 6-11 juni 2010, St. Louis, USA
 - TTI-GG Netwerkdag, 22 september 2010, Nieuwegein
- "Acclimatization, survival and growth of *in vitro* grown *Arabidopsis thaliana* seedlings after transplanting to soil". A. Czerednik, J.M.H. Ammerlaan, R.L.M. van Marlen, T.L. Pons, A.J.M. Peeters. 7th International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding. Biotechnological advances in *in vitro* horticultural breeding. Gent, België. 18-22 september 2011.
- "Hyperhydricity in *Arabidopsis* seedlings cultured *in vitro*." N. van den Dries, F.A. Krens, S. Gianni, G.-J de Klerk. . 7th International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding. Biotechnological advances in *in vitro* horticultural breeding. Gent, België. 18-22 september 2011.
 - De laatste twee posters zijn ook gepresenteerd op de TTI-GG Netwerkdag, Nieuwegein, 21 september 2011.
 - En op de Lunteren Lectures, Lunteren, 2-3 april 2012.

Andere activiteiten:

Er was 1 maal per jaar overleg met de BCO gepland, bestaande uit de deelnemende bedrijven. Dit overleg heeft 3 (drie) maal per jaar plaatsgevonden gedurende de hele looptijd van 4 jaar en werd door alle deelnemers zeer gewaardeerd.