



Weefselweek in het donker

Onderzoek naar nieuwe methodes van weefselweekvermeerdering

Geert-Jan de Klerk

Plant Research International B.V., Wageningen

Februari 2008

pp 1-35: © 2008 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit het PRI-deel van deze uitgave (pp 1-35) mag worden veelevoudigd, 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 Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

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



PT-projectnummer 11.453.02

Startdatum: 01-04-2003

Einddatum: 31-12-2007

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl, geertjan.deklerk@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Medewerkers bij PRI: Greetje Kuiper, Frans Krens en Geert-Jan de Klerk

Inhoudsopgave

	pagina
<u>PRI-deel</u>	
Voorwoord	5
Samenvatting en aanbevelingen	7
Tabel samenvatting van alle resultaten	9
1. Inleiding	11
1.1. Kosten van weefselkweekmateriaal	11
1.2. Scheutcultuur in het donker	12
1.3. Wortelcultuur	12
1.4. Het PRI-onderzoek	14
2. Materiaal en Methode	15
2.1. Zantedeschia scheutcultures	15
2.2. Pelargonium wortelcultures	15
3. Resultaten	16
3.1. Geëtioteerde scheutcultures van Zantedeschia	16
3.2. Wortelcultures van Pelargonium	20
3.3. Regeneratie van scheuten uit wortels	30
4. Bespreking van PRI-resultaten	33
4.1. Zantedeschia: scheutcultures in het donker	33
4.2. Pelargonium wortelcultures	33
Wetenschappelijke Literatuur	35
<u>Onderzoek bij deelnemende bedrijven</u>	
Könst Alstroemeria: Alstroemeria	37
KP Holland: Spathiphyllum en Curcuma	51
P&S Plantlab: Cymbidium	57
SBW International: Curcuma, Phalaenopsis, Zantedeschia, Limonium, Eryngium en Gerbera	59
Syngenta: Scaevola en Primula	75
Van Zanten Plants: Alstroemeria en Limonium	85
GP Plants: Roos en Heuchera	99
Vitrocom Holland: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia en Syngonium	105

Voorwoord

Weefselkweek heeft in de tuinbouw brede toepassing gevonden. Waarschijnlijk staan we pas aan het begin van een ontwikkeling en zal weefselkweek op nog veel grotere schaal gebruikt gaan worden. De huidige toepassingen liggen bij veredeling, ziektevrij maken en vermeerdering. Een van de belangrijkste knelpunten bij vermeerdering zijn de hoge kosten. Andere speerpunten voor weefselkweekonderzoek zijn recalcitrantie (veel gewassen doen het niet of onvoldoende), kwaliteit (die is meestal goed maar kan veel beter) en een aantal veelbelovende potentiële toepassingen (ziektevrijmaken via weefselkweek, bijv., kan veel beter). Het project *Weefselkweek in het Donker* richtte zich op het terugdringen van de kosten. Dit is voor de hele sierteeltsector van belang omdat de voordelen van weefselkweekmateriaal dan voor veel meer gewassen beschikbaar komen.

Het project werd gestart toen het weefselkweekonderzoek nog ondergebracht was bij PPO in Lisse. Het is vervolgens “verhuist” naar PRI in Wageningen. Het onderzoek is verricht door PRI/PPO en door tien en na 2 jaar acht bedrijven. PRI/PPO hield zich meer bezig met de achtergronden en de bedrijven met het toegepaste onderzoek waarbij methodieken die bij PRI/PPO boven tafel waren gekomen door eigen onderzoek of bij desktop studies toegepast werden. In dit verslag worden de belangrijkste resultaten van het PRI/PPO onderzoek gerapporteerd. De verslagen van de deelnemende bedrijven zijn bijgevoegd.

Recalcitrantie bij adventieve regeneratie van scheuten uit wortels bleek een van de belangrijkste bottlenecks bij de deelnemende bedrijven en bij PPO/PRI. Er is hierover een uitgebreide desktopstudie gemaakt (gedeeltelijk in het kader van het *weefselkweek-in-het-donker* project). Deze studie is in druk (De Klerk 2008) en een kopie kan worden opgevraagd bij de projectleider (geertjan.deklerk@wur.nl). Andere in dit rapport genoemde (wetenschappelijke) publicaties in de literatuurlijst kunnen eveneens opgevraagd worden.

Dr. Geert-Jan de Klerk
Wageningen Tissue Culture Centre

Samenvatting en Aanbevelingen

Om een kostenreductie bij weefselkweekvermeerdering te verkrijgen zijn twee benaderingen onderzocht.

Scheutcultures van *Zantedeschia* (voorbeeldgewas) werden in het donker gekweekt. Excessieve strekking kon worden tegengegaan met paclobutrazol (commercieel verkrijgbaar als Bonzi) waarbij er na uitplanten geen problemen waren, in tegendeel, de knolvorming (gewenst bij *Zantedeschia*) was verbeterd. Andere manieren om strekking tegen te gaan, toediening van imazalil en unicastol, gaven slechtere resultaten tijdens de kweek in vitro en/of bij uitplanten. Deze methode kan toegepast worden bij *Zantedeschia*. Er is weinig aandacht gegeven aan problemen na uitplanten.

Vermeerdering via *wortelcultures* bij *Pelargonium* (voorbeeldgewas) verliep matig tot redelijk. De bottlenecks waren (1) wortelgroei in vitro en (2) regeneratie van scheuten uit wortels. De problemen bij de eerste bottleneck konden aanzienlijk verminderd worden door een korte behandeling met auxine (indolazijnzuur, niet naftylazijnzuur) aan het begin van de kweek. Regeneratie werd verbeterd door gebruik van triiodobenzoëzuur (TIBA) en thidiazuron in het regeneratiemedium. Grote verbetering bij regeneratie werd ook verkregen als wortelcultures werden gebruikt die de korte, initiële behandeling met auxine hadden gekregen. Omdat de nieuw gevormde scheuten ontstaan uit meristematische cellen in het pericykel, zijn problemen die vaak bij adventieve scheutvorming gevonden worden, met name afwijkingen, waarschijnlijk van minder belang. Deze methode kan bij *Pelargonium* nog niet toegepast worden. De vinger moet aan de pols gehouden worden vanwege de grote voordelen van deze methode. Doorbraken bij de eerste bottleneck, wortelgroei, worden niet snel verwacht vanwege de afwezigheid van fundamenteel onderzoek. Doorbraken bij het regeneratieprobleem worden wel binnen afzienbare tijd verwacht.

Tabelsamenvatting van alle resultaten

inclusief die van de deelnemende bedrijven

Aan het onderzoek werd deelgenomen door een aantal bedrijven. Hierdoor was een optimale doorstroming van wetenschappelijke kennis (zowel kennis uit de algemene wetenschappelijke literatuur als kennis verkregen bij PRI) naar het bedrijfsleven gewaarborgd. Er was enthousiaste uitwisseling van ideeën tussen bedrijfsonderzoekers en instituutsonderzoekers, maar ook in grote mate tussen bedrijfsonderzoekers onderling. De deelnemende bedrijven waren:

- GP Plants
- Könst Alstroemeria
- KPHolland (voorheen VLZ)
- P+S Plantlab
- StBW
- Syngenta
- Van Zanten Plants
- Vitrocom

De resultaten samengevat wat betreft uitzicht op toepasbaarheid zijn:

Via etiolering		Via wortelcultures	
Heuchera	+	Heuchera	-
Roos	-	Roos	-
Asltroemeria 1	+	Spathiphyllum	±
Cymbidium	±	Curcuma	-
Curcuma	+	Alstroemeria	-
Phalaenopsis	-	Cymbidium	-
Zantedeschia 1	+	Eryngium	+
Scaevola	±	Gerbera	-
Primula	-	Limonium 1	±
Alstroemeria 2	±	Limonium 2	+
Spathiphyllum	+	Pelargonium	±
Zantedeschia 2	+		
Syngonium	+		
Musa	-		
Delphinium	+		
Zantedeschia 3	+		

Als het gewas door verschillende bedrijven is onderzocht is dit aangegeven met een nummering.

+ goed: wordt in enkele gevallen reeds commercieel toegepast

± redelijk/matig: met extra onderzoek wordt de procedure wellicht toepasbaar

- hier zit niet veel of nog zeer weinig schot in.

1. Inleiding

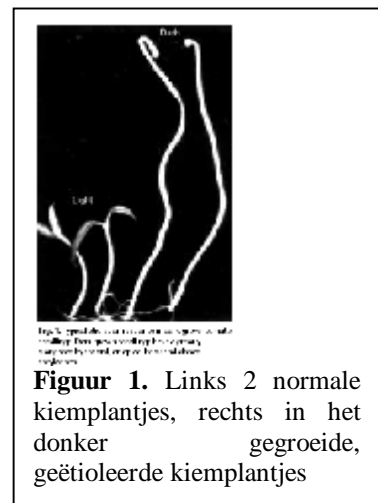
1.1. Kosten van weefselkweekmateriaal

Uitgangsmateriaal dat in weefselkweek is geproduceerd, is duur: de prijs van weefselkweekplantjes is meestal (veel) hoger dan de prijs van conventioneel vermeerderd materiaal. Vanzelfsprekend moeten ook de kosten en baten na weefselkweek worden meegenomen. Er zijn extra kosten: voorzichtiger uitplanten en afharden, soms meer uitval en het voorkomen van afwijkingen. Er zijn ook extra baten: snellere groei, meer uniformiteit en grotere kwaliteit van het eindproduct. Daarnaast zijn er de voordelen dat weefselkweekvermeerdering veel sneller is en –als de juiste maatregelen zijn genomen– ziektevrij materiaal levert. Wanneer wordt afgezien van de prijs, zijn bij veel gewassen de baten van weefselkweekvermeerdering veel groter dan de kosten. De hoge prijs is dus een sta-in-de-weg bij het benutten van de voordelen van weefselkweek bij veel gewassen.

Om de kosten van afgeleverde plantjes terug te dringen hebben weefselkweekbedrijven eerst hun productielaboratoria gestroomlijnd en ‘eenvoudige’ automatisering doorgevoerd, vooral bij de mediumbereiding. Sinds ongeveer 1990 is de bulkproductie naar lage-lonen landen overgebracht en er zijn nu nog maar enkele bedrijven die hun bulkproductie in Nederland doen. Nederlandse weefselkweeklaboratoria leggen zich in hun Nederlandse vestiging toe op inzetten (overgang van plantmateriaal van de kas naar de buis) en op de eerste productie cycli. Bovendien begeleiden ze de productie in buitenlandse bedrijven en de aflevering van materiaal. Er zijn vervolgens veel pogingen geweest om weefselkweek geheel of gedeeltelijk te automatiseren/robotiseren. Één bedrijf is zo ver gegaan dat behalve het opsnijden alle stappen door robots gedaan werden (bijv. ook het uit de container halen en in de containers zetten). Bij het opsnijden wordt een plantje na een cyclus van groei in stukjes gesneden (meestal scheutjes) die ieder weer kunnen uitgroeien in de volgende cyclus. Dit is inderdaad het moeilijkst te robotiseren deel. Ieder ras groeit anders en beeldherkenning m.b.v. de computer is nog niet voldoende gevorderd om de posities te herkennen waar het materiaal gesneden moet worden.

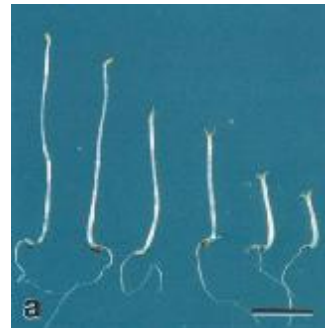
Om makkelijker te kunnen robotiseren heeft men geprobeerd het biologisch proces zo te wijzigen dat het automatiseerbaar wordt. In de jaren 90 dacht men algemeen dat somatische embryogenese in vloeibare cultures de nieuwe vermeerderingsmethode zou worden. Bij een enkel commercieel belangrijk gewas (cyclaaam) is het ook gelukt om de productie voor elkaar te krijgen maar uiteindelijk bleek de uniformiteit in de kas onvoldoende, zodat het niet breed commercieel toegepast kon worden. Andere pogingen hielden in dat in plaats van vermeerdering via clusters van scheuten vermeerdering via gestrekte scheuten werd gedaan waarbij uit de scheuten segmenten met okselknoppen werden gesneden en ingezet op vers medium. Hier zijn geen algemene procedures uit voortgekomen.

Een aantal jaren geleden is door PRI een door weefselkweekbedrijven gefinancierde desktop studie gemaakt naar nieuwe manieren van kostenreductie. Een mogelijkheid die naar voren kwam was kweek in het donker. Hiermee kan het elektriciteitsgebruik flink gereduceerd worden. Weefselkweekmateriaal wordt vanwege de steriliteit in speciale kweekcellen gekweekt. Deze zijn fel verlicht. Het grootste deel van de energie die door de verlichting in een cel gebracht wordt, wordt omgezet in warmte en het afvoeren van warmte kost veel elektriciteit. De kostenreductie per plantje zou desalniettemin beperkt zijn. Het bleek echter ook bij de



desktop studie dat kweek in het donker een aanzienlijke besparing in de arbeidskosten kan inhouden.

Om weefselkweek in het donker te doen zijn er twee manieren (1) De nu toegepaste scheutvermeerdering wordt in het donker gedaan. (2) De tweede manier is om onderdelen van planten die normaal in het donker groeien in weefselkweek in het donker te kweken. Hiervoor komen bijv. bollen en knollen in aanmerking. Kweek van wortels in het donker is evenwel een betere optie. Alle planten hebben wortels en uit wortels kunnen plantjes gevormd worden. Wortelcultuur is dus een algemeen toepasbare methode. Hieronder wordt uitgebreid op beide manieren ingegaan.



Figuur 2. Effect van een toenemende concentratie van een remmer van de brassinosteroïde synthese. De geëtioloerde plantjes lijken weer op normale kiemplantjes. Dit suggereert dat etioleren veroorzaakt wordt door een te hoge synthese van brassinosteroïden. (Foto uit (Nagata et al. 2000).

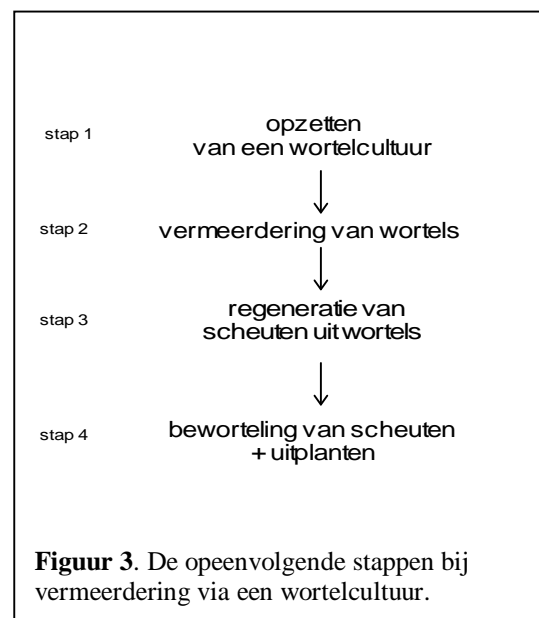
1.2. Scheutcultuur in het donker

Planten die in het donker groeien 'etioleren'. Dit verschijnsel is het meest bekend bij kiemplantjes. Ze worden lang en blijven wit (Fig.1). In weefselkweek is dat meestal ongewenst. In het donker groeien de geëtioloerde scheutjes al snel tegen de deksel. Verder ontstaan er problemen met de aanvoer van nutriënten. In weefselkweek gebeurt dit voor een groot deel door diffusie: in planten die ex vitro groeien is er een beduidende sapstroom, gedreven door de verdamping door de bladeren; in weefselkweek is die verdamping beperkt door de zeer hoge luchtvochtigheid. Etioleren van kiemplantjes is uitgebreid onderzocht in de wetenschappelijke literatuur. Men denkt dat een nieuwe klasse plantenhormonen, brassinosteroïden, hierbij belangrijk is (Fig. 2). Licht zou de aanmaak van deze plantenhormonen remmen; in het donker worden ze in grote hoeveelheden aangemaakt waardoor de zaailingen erg strekken (Nagata et al. 2000). In meer recente literatuur wordt hier echter weer aan getwijfeld (Alabadi et al. 2004).

Het onderzoek richtte zich er op de strekking in het donker tegen te gaan. Het compacte materiaal is makkelijker te snijden waardoor een aanzienlijk arbeidsbesparing gerealiseerd kan worden. Tegelijk hielden we in het achterhoofd dat strekking eventueel juist gewenst kon zijn omdat uit gestrekte scheuten makkelijk okselknoppen (*single nodes*) gesneden kunnen worden, en dat dit mogelijk geautomatiseerd kan worden.

1.3. Wortelcultuur

In weefselkweek worden doorgaans niet complete planten maar onderdelen van planten gekweekt. Om te vermeerderen worden meestal scheutcultures gebruikt. Dit zijn scheuten die zonder wortel groeien. Onderdelen van normale planten die in het donker groeien, zijn waarschijnlijk prima materiaal voor weefselkweek in het donker. De onderdelen waar het om gaat zijn bollen, knollen, rhizomen en wortels. Alleen wortels komen bij alle planten voor en het onderzoek heeft zich daar op gericht. In Figuur 3



Figuur 3. De opeenvolgende stappen bij vermeerdering via een wortelcultuur.

wordt het basisschema weergegeven. Na de initiatie (stap 1) worden eerst op grote schaal in het donker wortels geproduceerd (stap 2). Het is bekend dat uit wortels scheuten kunnen regenereren, bijv. bij wortelstek. Wortelstek wordt in de praktijk alleen gedaan bij gewassen met stevige verhouten wortels maar in weefselkweek is de vorming van scheuten uit wortels bij veel meer gewassen beschreven. De in grote hoeveelheden geproduceerde wortels worden gebruikt als startmateriaal voor scheutvorming (stap 3). Deze scheuten worden uitgeplant, eventueel na een bewortelingsfase (stap 4). Het bewerken van een wortelcultuur bij overzetten is eenvoudig, snel en automatiseerbaar. Ook hier zou een flinke besparing in de arbeidskosten gerealiseerd kunnen worden.

Iedere stap heeft zijn eigen problemen.

Stap 1

Bij het in weefselkweek brengen van wortels van ex-vitro groeiende planten worden problemen verwacht wat betreft besmetting. Ondergronds groeiende plantendelen zijn hierom bij weefselkwekers berucht. Dit probleem werd opgelost door uit te gaan van wortels van wortels van reeds in vitro groeiend materiaal.

Stap 2

Vermeerdering van wortels gebeurt op standaardmedium waaraan soms plantenhormonen of speciale voedingsstoffen zijn toegevoegd. Interessant is dat in 1938 door de Amerikaan White de eerste echte weefselkweek gedaan is met wortels (van tomaat) die zonder veel problemen in weefselkweek continu bleven doorgroeien (White 1938). Waarschijnlijk mede als gevolg van dit succes is er sinds midden jaren 50 van de vorige eeuw een tijd lang geen onderzoek gedaan in dit gebied. Het vroege onderzoek is samengevat door (Street 1957) Pas rond 1985 is weer onderzoek aan wortelcultures gestart maar dat betrof vrijwel uitsluitend wortels die ontstaan waren na infectie met *Agrobacterium rhizogenes* en met DNA van deze bacterie waren getransformeerd (*hairy roots*). Dit onderzoek ging meestal over de productie van bepaalde fijnchemicaliën (secundaire metabolieten).

Stap 3

In de gewone vermeerdering wordt bij sommige gewassen gebruik gemaakt van wortelstek (Zie tabel 1). Het gaat hier altijd om planten met verhouten wortels: zachte wortels zijn meestal te kwetsbaar en rotten na afsnijden weg. In weefselkweek blijken niet-verhouten wortels van veel gewassen in staat tot regeneratie van scheut. Er is in dit kader een uitgebreide literatuurstudie gemaakt (De Klerk 2008).

Stap 4

Tenslotte worden voldoende uitgegroeide scheuten –eventueel na een bewortelingsstap– uitgeplant. Omdat er sprake is van adventieve regeneratie, is er de kans dat de plantjes niet soortecht zijn. Hiervoor is helaas geen vroege toets beschikbaar (zie Bouman en De Klerk 2001) . Omdat de nieuw gevormde scheuten ontstaan uit meristematische cellen in het pericykel, komen afwijkingen waarschijnlijk minder voor dan bij andere vormen van adventieve regeneratie.

Het onderzoek richtte zich op stappen 2 en 3.

1.4. Het PRI -onderzoek

Er is voor twee onderzoeksrichtingen gekozen, scheutcultures in het donker en vermeerdering via wortelcultures. Het verslag is op basis hiervan ingedeeld. In overleg met de deelnemende bedrijven is het onderzoek aan wortelcultures gedaan met Pelargonium. Voor dit gewas is reeds gerapporteerd dat scheuten uit wortels gevormd kunnen worden zij het met zeer beperkte efficiëntie. Voor scheutcultures is gekozen voor Zantedeschia. De voornaamste reden was de grote interesse voor Zantedeschia.

Het onderzoek is gedaan samen met een aantal bedrijven. Hun verslagen zijn bijgevoegd. Een samenvatting van de verschillende onderzoeken in tabelvorm, waarbij de bruikbaarheid op bedrijfsniveau wordt geëvalueerd, staat aan het begin van dit rapport.

Tabel 1. Gewassen die via wortelstek vermeerderd kunnen worden (uit Hartmann et al. 1990)).

<i>Acanthopanax pentaphyllum</i>	<i>Dicentra</i> spp.	<i>Pyrus calleryana</i>
<i>Actinidia deliciosa</i>	<i>Eschscholzia californica</i>	<i>Rhus copallina</i>
<i>Aesculus parviflora</i>	<i>Ficus carica</i>	<i>Rhus glabra</i>
<i>Ailanthus altissima</i>	<i>Forsythia intermedia</i>	<i>Rhus typhina</i>
<i>Albizia julibrissin</i>	<i>Hypericum calycinum</i>	<i>Robinia hispida</i>
<i>Anemone japonica</i>	<i>Koeleruteria paniculata</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>Aralia spinosa</i>	<i>Liriope</i> spp.	<i>Rosa blanda</i>
<i>Artocarpus altilis</i>	<i>Malus</i> spp.	<i>Rosa nitida</i>
<i>Broussonetia papyrifera</i>	<i>Myrica pennsylvanica</i>	<i>Rosa virginiana</i>
<i>Campsis radicans</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Rubus</i> spp.
<i>Celastrus scandens</i>	<i>Phlox</i> spp.	<i>Sassafras albidum</i>
<i>Chaenomeles japonica</i>	<i>Plumbago</i> spp.	<i>Sophora japonica</i>
<i>Chaenomeles speciosa</i>	<i>Populus alba</i>	<i>Stokesia laevis</i>
<i>Clerodendrum trichotomum</i>	<i>Populus tremula</i>	<i>Symphoricarpos hancockii</i>
<i>Comptonia peregrina</i>	<i>Populus tremuloides</i>	<i>Syringa vulgaris</i>
<i>Daphne genkwa</i>	<i>Prunus glandulosa</i>	<i>Ulmus carpinifolia</i>

2. Materiaal en methode

2.1. Zantedeschia scheutcultures

Zantedeschia cultures werden verkregen van Vitrocom, een van de deelnemende bedrijven. Zantedeschia werd standaard vermeerderd op medium zoals aangegeven in Tabel 2a bij 24 °C en 16 uur licht per dag ($30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, Philips TL 33). Er werd standaard gebruik gemaakt van glazen containers (doorsnee 8.5 cm, hoog 9 cm) met 60 ml medium en afgesloten met een plastic deksel zonder nok. Er waren 3-8 scheuten per container. Om vast medium verkrijgen werd niet agar maar gelrite gebruikt. Gelrite induceert bij veel gewassen waterigheid (*hyperhydricity* of *vitrification*), maar dit werd bij Zantedeschia nooit waargenomen. De vermeerderingsfactor was 2 à 3 per 4 weken. De condities werden veranderd zoals aangegeven voor de verschillende experimenten. Beworteling werd gedaan op medium aangegeven in Tabel 2b.

tabel 2a. Vermeerderingsmedium Zantedeschia. De chemicaliën zijn van de firma Duchefa.

Murashige Skoog zouten (macro en micro) + vitamines	Volle sterkte
Sucrose	30 g.l ⁻¹
Benzylaminopurine (BA)	1 mg.l ⁻¹
pH	5.7 (voor autoclaveren)
Phytigel (=gelrite)	3g.l ⁻¹

tabel 2b. Bewortelingsmedium Zantedeschia. De chemicaliën zijn van de firma Duchefa.

Murashige Skoog zouten (macro en micro) + vitamines	Volle sterkte
Sucrose	30 g.l ⁻¹
Indolazijnzuur (IAA)	0.2 mg.l ⁻¹ (toegevoegd voor autoclaveren)
pH	5.7 (voor autoclaveren)
Phytigel (=gelrite)	3g.l ⁻¹

2.2. Pelargonium wortelcultures

Zaadjes van Pelargonium uit de Pulsar (Lavender, Scarlet en Rose Star) en de Ringo (Red, Pink, Scarlet) serie werden verkregen van Syngenta. De zaadjes werden 30 min gesteriliseerd in 1% NaOCl met een druppel Tween 20 en daarna 3 maal grondig gespeld met steriel demi water. Ze werden gekiemd bij 21 °C in 9 cm Petri schalen met MS medium (volle sterkte), 1% sucrose en 3 g.l⁻¹ phytigel (gelrite). Na ongeveer een week werden de primaire wortels afgesneden. De zaailingen zonder wortel werden beworteld op MS, 3% sucrose en 2.5% phytigel. Na ong. 2 weken waren de adventieve wortels 1.5 cm en werden ze afgesneden voor proeven.

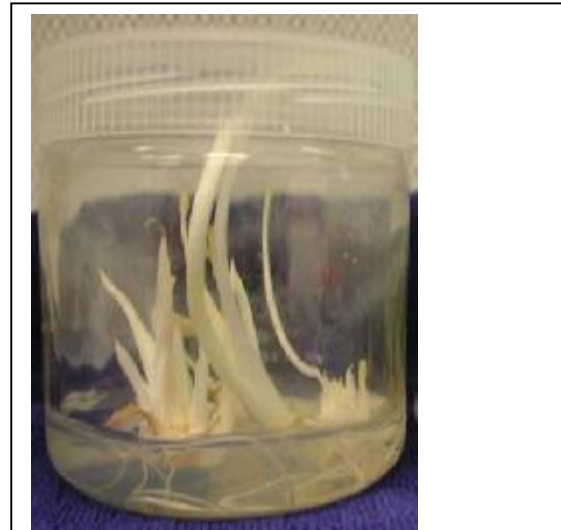
Standaard werden de wortels (3 per pot tenzij anders aangegeven) gekweekt in glazen potten met 30 ml vloeibaar medium (volle sterkte MS en 3% sucrose). Scheutregeneratie uit wortelstukjes was op vast regeneratiemedium in Petrischalen. Het basis regeneratie medium bestond uit volle sterkte MS, 3% sucrose, 3 μM zeatine en 2.5% phytigel.

Bepaling van elementen werd uitgevoerd door het Chemisch Biologisch Laboratorium Bodem, WUR. Suiker werd bepaald met een Brix-meter (Pocket PAL-1, Atago) en de hoeveelheid ionen (als maat van de MS-concentratie) met een EC-meter (Cond 315i, WTW).

3. Resultaten

3.1. Geëtiolerde scheutcultures van Zantedeschia

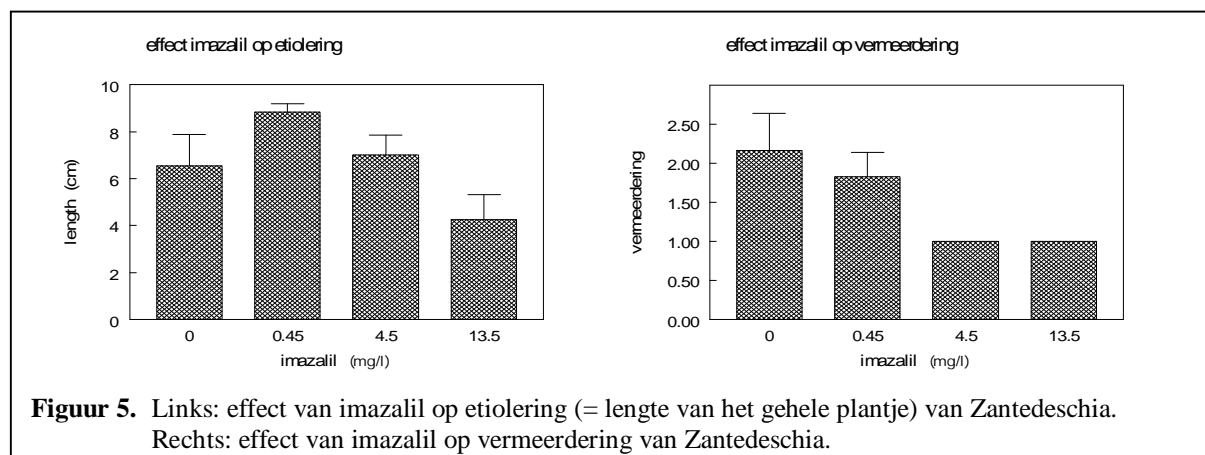
Bij de in bedrijven gangbare vermeerderingsprocedure van Zantedeschia, wordt bij overzetten vaak gewisseld van hoge naar lage BA concentratie waarbij kleine scheutjes overgezet worden naar een pot met lage BA en grote scheutjes naar een pot met hoge BA. Voor de uniformiteit van de opeenvolgende experimenten hebben wij met één vaste concentratie BA gewerkt, aanvankelijk met 0.5 mg.l^{-1} maar omdat de vermeerdering te laag was na een paar cycli mrt 1 mg.l^{-1} . Toen een voldoende grote stock was opgebouwd kon gestart worden met de experimenten. Hierbij werd steeds zo uniform mogelijk materiaal ingezet.



Figuur 4. Geëtiolerde Z.-plantjes na 1 cyclus.

3.1.1. Effect van remmers van de brassinosteroïde synthese

Na 1 cyclus in het donker zagen de Zantedeschia-plantjes er heel anders uit dan in het licht. Uiteraard waren ze wit doordat de chlorofyl synthese was geremd. Verder waren ze gestrekt en was de bladschijf vrijwel afwezig (Zie Fig. 4). Om de excessieve strekking tegen te gaan zijn er een aantal mogelijkheden. De groep van P. Debergh in Gent heeft gevonden dat het fungicide imazalil de aanmaak van brassinosteroïden remt (Werbrouck et al. 2003): Een van de effecten van dit fungicide is dat het de strekking in het donker van kiemplantjes van Arabidopsis remt. Dit is een duidelijke aanwijzing van het werkingsmechanisme van imazalil. Wij hebben daarom imazalil toegevoegd. Dit remde de strekking, maar pas bij een concentratie van 13.5 mg.l^{-1} . Verder werd de vermeerdering door imazalil geremd. Wanneer de BA-concentratie niet verhoogd werd, was de vermeerdering sterk geremd en trad er ook bij 4.5 mg.l^{-1} strekking op (Fig. 5). Wanneer de BA concentratie verhoogd werd, was de strekking bij 4.5 mg.l^{-1} geremd en was de vermeerdering niet of nauwelijks geremd (Fig. 6). Er zijn verder geen experimenten meer gedaan met imazalil vanwege teleurstellende resultaten bij uitplantproeven (zie 3.1.4). Naast imazalil is er nog een andere brassinosteroïde-remmer bekend, brassinazole. Deze stof is niet commercieel beschikbaar. Hij is aangevraagd bij de ontdekkers van deze stof, een groep Japanse onderzoekers, maar helaas is brassinazole niet verkregen.



Figuur 5. Links: effect van imazalil op etiolering (= lengte van het gehele plantje) van Zantedeschia. Rechts: effect van imazalil op vermeerdering van Zantedeschia.



Figuur 6. Effect van de fungicide imazalil op de strekking van Zantedeschia in het donker. In de rechter container (4.5 mg.l^{-1}) is de strekking goed geremd. NB : In de rechterpot is de BA concentratie verhoogd van 1 naar 3 mg.l^{-1} .

3.1.2. Effect van remmers van de gibberelline synthese

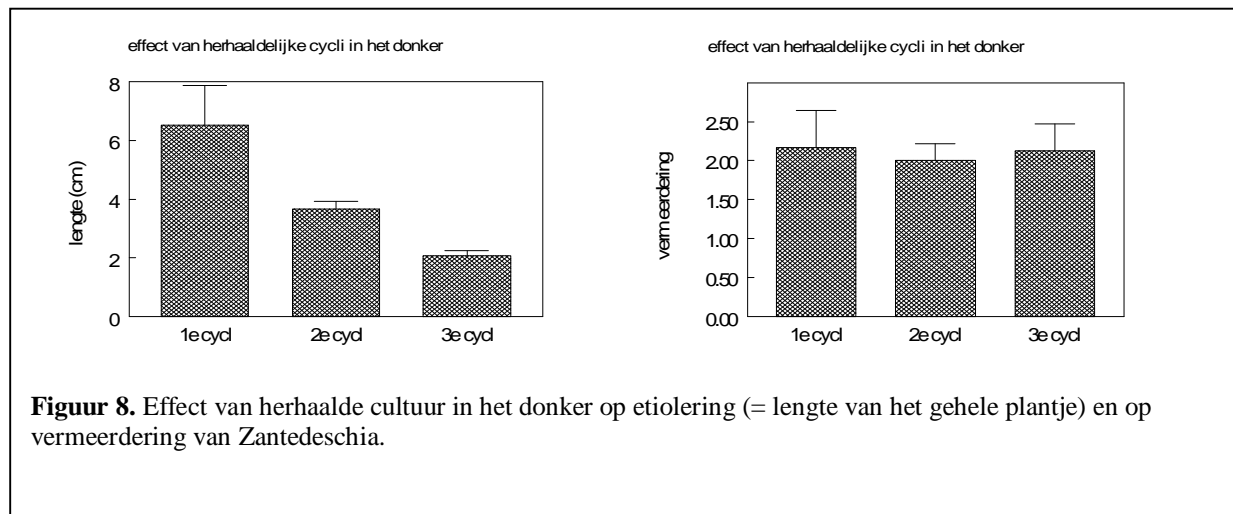
Naast imazalil als remmer van de brassinosteroïde synthese werden ook 3 remmers van de gibberelline synthese onderzocht. De beste resultaten werden verkregen met paclobutrazol (Fig. 7). De optimale concentratie was 0.87 mg.l^{-1} . Daarnaast zijn de remmers unicazol en flurprimidol getest. Deze gaven minder goede resultaten. We concludeerden dat om de etiolering te remmen de beste resultaten verkregen worden met paclobutrazol.



Figuur 7. Effect van de GA-synthese remmer paclobutrazol op de strekking van Zantedeschia in het donker.

3.1.3. Effect van herhaalde cultuur in het donker.

Bij het testen van het effect van remmers bij herhaalde cultuur in het donker viel op dat er een gewenning optrad bij de controle. Er was geen verandering waar te nemen bij bijv.



Figuur 8. Effect van herhaalde cultuur in het donker op etiolering (= lengte van het gehele plantje) en op vermeerdering van Zantedeschia.



Figuur 9. Plantjes gevormd bij verschillende concentraties paclobutrazol (linker foto), uniconazol (middelste foto) en imazalil (rechter foto). Bij paclobutrazol is de knolvorming duidelijk verbeterd, bij imazalil is er sprake van grote bossigheid.

paclobutrazol. Het effect van gewenning is te zien in Figuur 8. Er was geen effect op de vermeerdering. De achtergronden van dit effect zijn geheel onduidelijk.

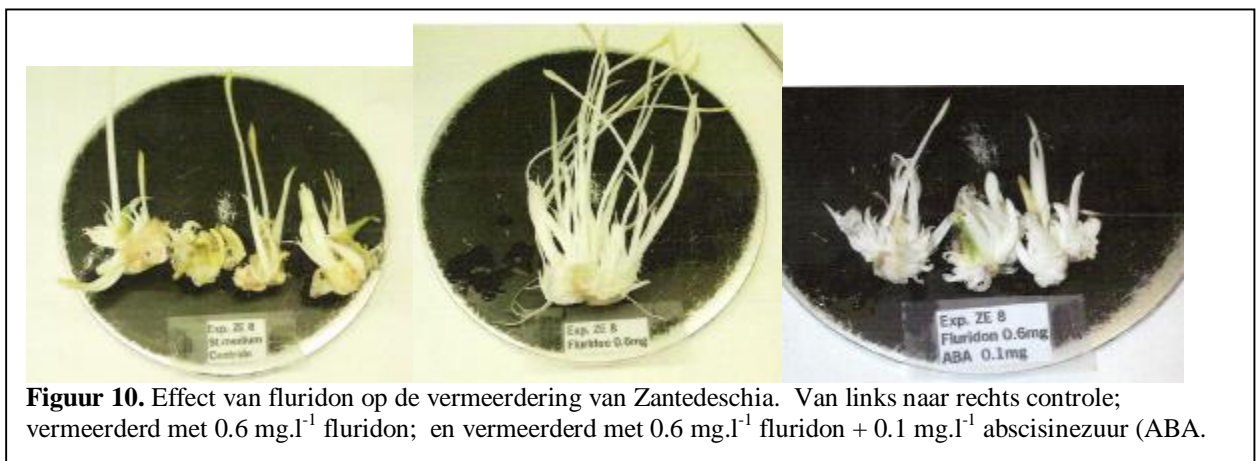
3.1.4. Uitplantingen

De experimenten met *Zantedeschia* in vitro in het donker verliepen voortvarend. Om een eventueel na-effect van de verschillende behandelingen te zien, werden de *Zantedeschia* scheutjes beworteld en uitgeplant. Bij de paclobutrazol plantjes overleefde 100% het uitplanten, bij de imazalil plantjes 93% en bij de controle 93%. Er waren grote verschillen tussen de verschillende behandelingen wat betreft de knolvorming. De paclobutrazol plantjes hadden veel grotere knolletjes gevormd na 2 maanden in de kas. De uniconazol plantjes groeiden beter dan de controle maar knolvorming was nauwelijks verbeterd t.o.v. de controle. De imazalil plantjes hadden vaak in het geheel geen knolletje. Het grootse probleem met de imazalil plantjes is dat de afwijking bossigheid vaak werd gevonden (Fig. 9). Het effect van imazalil op bossigheid is hoogst opmerkelijk. Het is al eerder gerapporteerd dat imazalil, toegediend tijdens de weefselkweek, een effect had op bossigheid na uitplanten, nl. bij *gerbera*, maar in dit geval ging imazalil bossigheid juist tegen (Topoonyanont and Debergh 2001). Dit geeft aan hoe onbegrepen de effecten van toegevoegde regulatoren kunnen zijn.

De *Zantedeschia* experimenten konden slechts in beperkte mate herhaald worden. Na 2 jaar gingen de cultures snel achteruit. Dit is een bekend verschijnsel bij *Zantedeschia* (C. Randag, Sande, persoonlijke mededeling) en wordt ook bij veel andere gewassen gevonden. Er is bij veel gewassen een grens aan het aantal cycli. Een nieuw verkregen cultuur was inwendig besmet. Er is getracht om deze cultuur schoon te krijgen, o.a. met geavanceerde warmwater behandelingen maar dit gaf geen verbetering. Er is vervolgens afgesproken ons te concentreren op de wortelcultures. Bij twee deelnemende bedrijven zijn dezelfde resultaten verkregen als bij PRI. Bij uitplanten en verdere groei in de kas, gedroegen de donkerplanten zich normaal (nog niet in bloei gekomen).

3.1.5. Extra resultaat: effect van fluridon op uitloop van okselknoppen

Fluridon is een remmer van de carotenoïde synthese. Het remt daardoor de aanmaak van chlorofyl, die van abscisinezuur en die van een nog onbekende carotenoïde die betrokken is bij de remming van de uitloop van zijknoppen. Deze carotenoïde-achtige remmer is pas kort geleden ontdekt (Booker et al. 2004), hoewel er al 15 jaar geleden aanwijzingen zijn gevonden (De Klerk 1992). Bij *Zantedeschia* heeft fluridon een duidelijk effect op de vermeerdering (Fig. 10). De explantaten vormen veel zijscheuten. Als er naast fluridon ABA wordt toegediend, is de vermeerdering nog steeds beter dan in de controle maar is de strekking van de blaadjes geheel geremd. Dat laat zien dat het effect niet is via ABA maar op een andere manier, waarschijnlijk via de carotenoïde-achtige remmer. Dit resultaat kan mogelijk van groot belang zijn voor de vermeerdering van gewassen waarbij de uitloop van zijknoppen sterk geremd is.



Figuur 10. Effect van fluridon op de vermeerdering van *Zantedeschia*. Van links naar rechts controle; vermeerderd met 0.6 mg.l^{-1} fluridon; en vermeerderd met 0.6 mg.l^{-1} fluridon + 0.1 mg.l^{-1} abscisinezuur (ABA).

3.2. Wortelcultures van Pelargonium

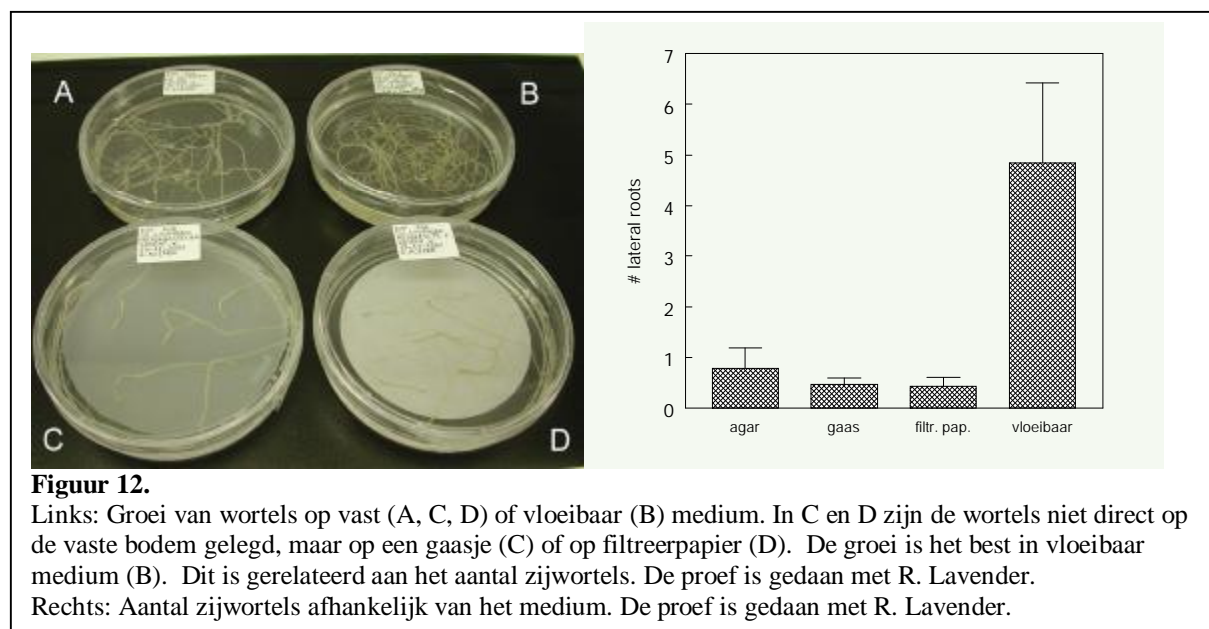
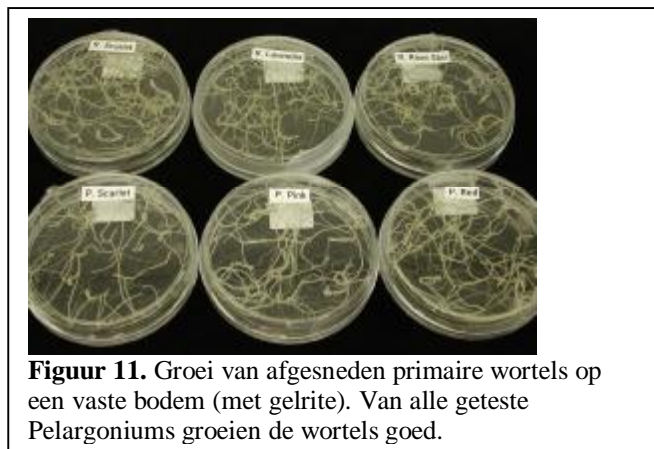
Zoals aangegeven in de Inleiding beslaat vermeerdering via wortels een viertal stappen. Bij het onderzoek aan Pelargonium wortels, maar ook bij andere gewassen bleken de grootste bottlenecks (1) de groei van wortels en (2) de regeneratie van scheuten uit wortels. De tweede bottleneck was verwacht, de eerste niet.

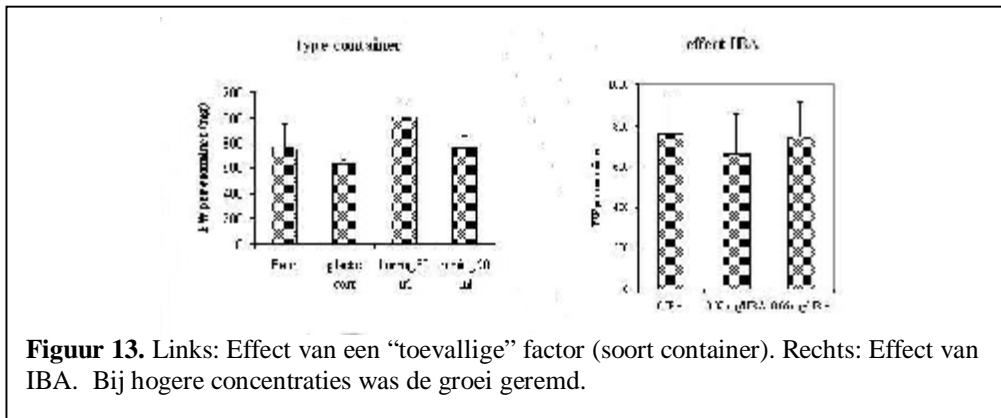
3.2.0. Kieming van Pelargonium zaadjes

Sterilisatie en kieming van de zaadjes gaven geen probleem. Na verwijderen van de primaire wortel werden de kiemplantjes beworteld. Hiervoor werd standaard bewortelingsmedium gebruikt met lage concentratie van IAA. Ook de beworteling gaf geen problemen en per plantjes ontstonden 1-5 bruikbare (adventieve) wortels. Op enkele experimenten na is geen aandacht besteed aan de herkomst van de adventieve wortels.

3.2.1. Wortelgroei; initiële experimenten

Afgesneden wortels groeiden goed op vast medium (Fig. 11), maar meestal groeiden ze niet op maar in het medium. Dat is ongewenst omdat hierdoor het verwerken bij overzetten moeilijker gaat. Daarom werden de wortels in een dunne laag vloeibaar medium gekweekt. De cultures werden niet geschud. Dit ging eveneens uitstekend en in feite beter dan op vast medium. Een belangrijk verschil was dat in vloeibaar medium er veel meer zijwortels (laterale wortels) werden gevormd (Fig. 12). Mogelijk wordt dit veroorzaakt door ethyleen ophoping in weefsel dat ondergedompeld is (Voeselek et al. 1993). Ethyleen stimuleert de vorming van zijwortels (bijv. Rupp and Mudge 1985).

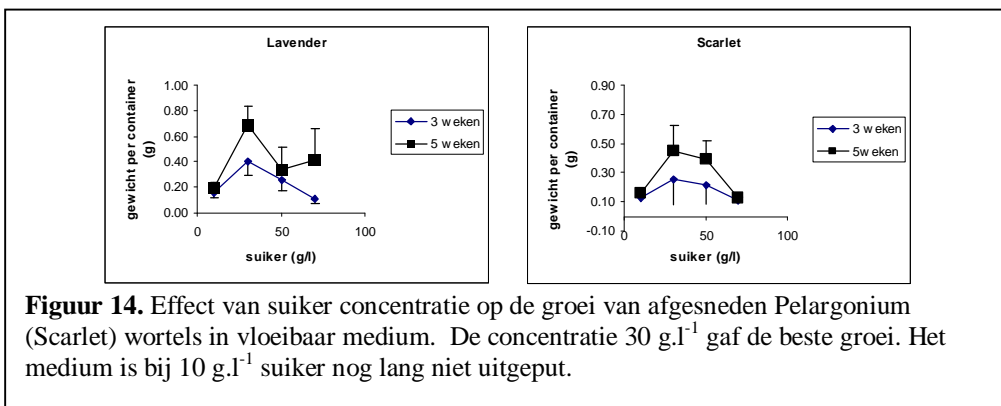


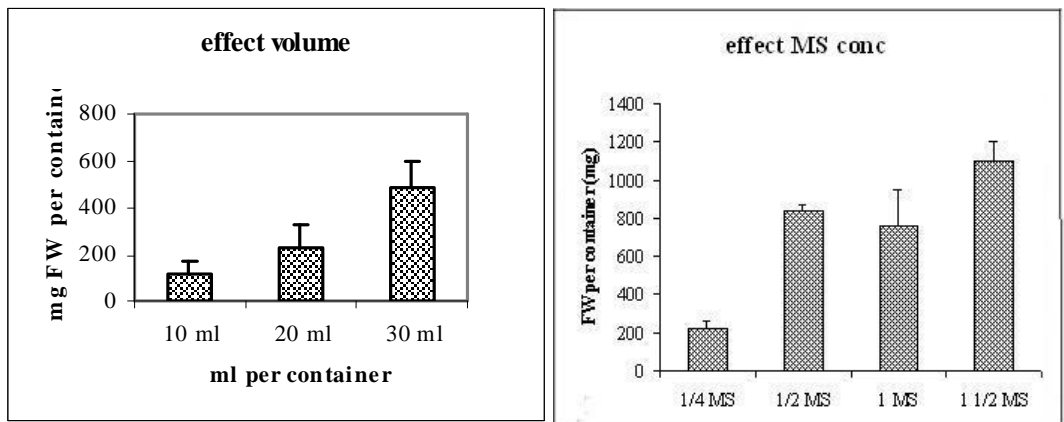


Omdat auxine de vorming van zijwortels bevordert (Fukaki et al. 2007), zijn auxine concentratie en type auxine uitgebreid getest. Er werd bij continue toediening van auxine echter geen stimulatie gevonden; de groei was bij hoge auxine concentraties geremd. De resultaten voor lage concentraties indolboterzuur (IBA) staan in Figuur 13. Het zou mogelijk zijn dat een korte behandeling met auxine wel of betere groei leidt. Dit is ook getest en hierop wordt later ingegaan in de sectie over stimulerende behandelingen (3.2.5.). Er zijn een reeks andere groeiregulatoren getest in een reeks concentraties, onder andere cytokinines, abscisinezuur/fluridon, gibberellines/paclobutrazol, AgNO_3 (ethyleen-remmer), imazalil, maar geen had een positief effect. In de literatuur is er over de hormonale regulatie van wortelgroei niets bekend, met de uitzondering van de stimulatie van zijwortelvorming door auxines (Fukaki et al. 2007).

Er zijn ook een aantal ‘toevallige’ factoren getest. Er was geen effect van het type container (Fig. 13). Ook schudden gaf geen verbetering. Sucrose wordt bij scheutcultures gebruikt in een concentratie van 3% (3 g per 100 ml). Sucrose wordt in weefselkweek gebruikt, omdat het in planten van nature de transportvorm van suikers is. Bij vergelijkingen van de effectiviteit van verschillende suikers geeft sucrose doorgaans de beste resultaten. In wortelcultures was 3% eveneens de beste concentratie (Fig. 14). Bij nader inzien en verdere metingen zijn de resultaten echter merkwaardig en onbegrijpelijk. Bijv. bij 10 g.l^{-1} suiker vormde Lavender ong. 200 mg wortel en bij 30 g.l^{-1} suiker 700 mg wortel. Dit suggereert dat er bij 10 g.l^{-1} suiker te weinig suiker in het medium is. Metingen van het suikergehalte in het medium aan het eind van de cultuur (5w) lieten echter zien dat minder dan 10% van het aanwezige suiker opgebruikt was en er in het medium dus nog ruimschoots suiker voor handen was.

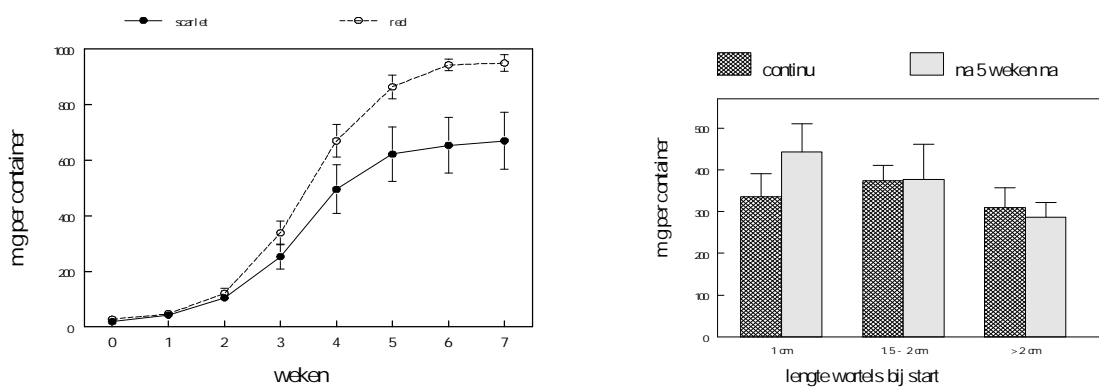
In Figuur 15 (links) staat het effect van het volume. De groei was minder bij een laag volume. De groei was eveneens minder als er een lagere concentratie MS zouten in het medium was (Fig. 15 rechts). Beide waarnemingen wijzen weer op een te kort aan voedingsstoffen. Hier zijn soortgelijke metingen als bij suiker gedaan en het bleek wederom





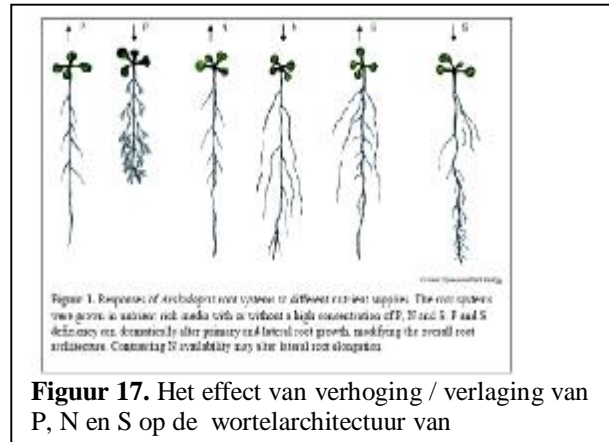
Figuur 15. Effect van het volume in een container (links) en van de concentratie MS-zouten (rechts) op de groei van wortels van Pelargonium (Scarlet). Bij de situaties met de mindere groei is het medium echter nog lang niet uitgeput.

dat het medium nog lang niet was uitgeput (meer dan 90% was nog aanwezig). Voor deze tegenspraken is in de loop van het onderzoek geen oplossing/verklaring gevonden. Dat er geen (duidelijke) relatie is tussen groei en het opraken van nutriënten bleek ook uit een groeicurve. De groei verminderde na 4- 5 weken (Fig. 16, links). Metingen van de EC (geleidbaarheid) en suikergehalte lieten zien dat er nog lang geen mediumuitputting was (meer dan 90% over), waarbij moet worden aangetekend dat de EC het geheel aan ionen meet en dat er dus wel specifieke elementen uitgeput kunnen zijn. Op basis van de EC-waarde ligt het voor de hand dat dat micro-elementen zijn. Om dit te checken is de eenvoudigste proef om het medium te verversen na 5 weken. Dat gaf geen verbetering (Fig. 16, rechts). Het experiment in Figuur 16, rechts, laat eveneens zien dat de start lengte van de wortels geen of geen grote invloed had.



Figuur 16. Links: groei van wortels tijdens een 7 weken durende kweek. Rechts: wortels werden 8 weken gekweekt. Een groep bleef de gehele tijd op hetzelfde medium staan (continu), bij de andere groep werd het medium na 5 weken verversen (na 5 weken). In dit experiment werd gestart met wortels van verschillende lengte.

Wortels hebben als functie dat ze planten verankeren, water opnemen en voedingszouten opnemen. Er is veel onderzoek gedaan naar het effect van de aanwezigheid van voedingszouten op de architectuur en groei van het wortelstelsel. Het effect op de groei van wortels bij de modelplant *Arabidopsis* staat in Figuur 17. Het effect van nutriënten ligt voor de hand: de wortel ‘zoekt’ in de bodem naar de juiste nutriënten en hij kan alleen zoeken door meer/minder/anders te groeien.



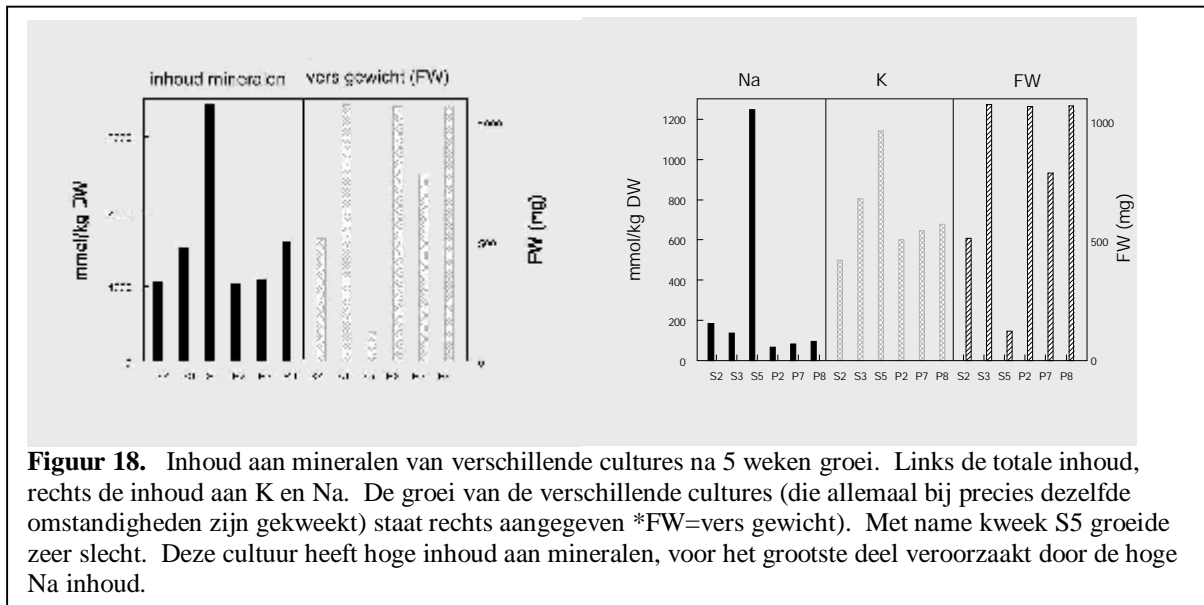
Figuur 17. Het effect van verhoging / verlaging van P, N en S op de wortelarchitectuur van

We onderzochten of de verminderde groei bij lage concentratie MS goed gemaakt kan worden door extra specifieke nutriënten toe te voegen tot vol MS. De resultaten staan in Tabel 3. Geen van de toevoegingen gaf de groei van die van vol MS. De beste resultaten werden verkregen met extra N toevoeging. De groei werd echter in feite vaak juist geremd. Dat zou kunnen komen door de verhoudingen van de voedingsstoffen ver uit balans raakten waardoor, als bijv. Ca werd verhoogd, dit extra Ca andere 2-waardige ionen op belangrijke plaatsen, bijv. op enzymen of transport-carriers, verdrong.

3.2.2. Het effect van anorganische nutriënten: natrium

De inhoud aan mineralen werd gevolgd tijdens een groei cyclus (Figuur 18). Na 15 dagen -op dat moment is de groei het snelst- was van alle elementen de inhoud het laagst. Na 30 dagen was de groei vrijwel tot stilstand gekomen en was de mineraalinhoud het hoogst. Vooral de inhoud aan Na was hoog geworden.

Bij de *Pelargonium* wortelcultures kwamen vaak slecht-groeiende potten voor. Waarom sommige potten slecht groeiden was onduidelijk. Hieraan zijn een aantal experimenten gedaan die vooral een mogelijke genetische component betreffen en die later behandeld zullen worden. Bij de experimenten aan het effect van nutriënten is van de grote verschillen in groei tussen potten gebruik gemaakt door cultures in afzonderlijke potten te analyseren op hun inhoud aan specifieke elementen en die te vergelijken met de gerealiseerde groei. In Figuur 18 zijn alleen macronutriënten aangegeven. De slecht groeiende cultuur S5 had een hoge mineraalinhoud die voor een groot deel het gevolg was van een hoge Na-inhoud.



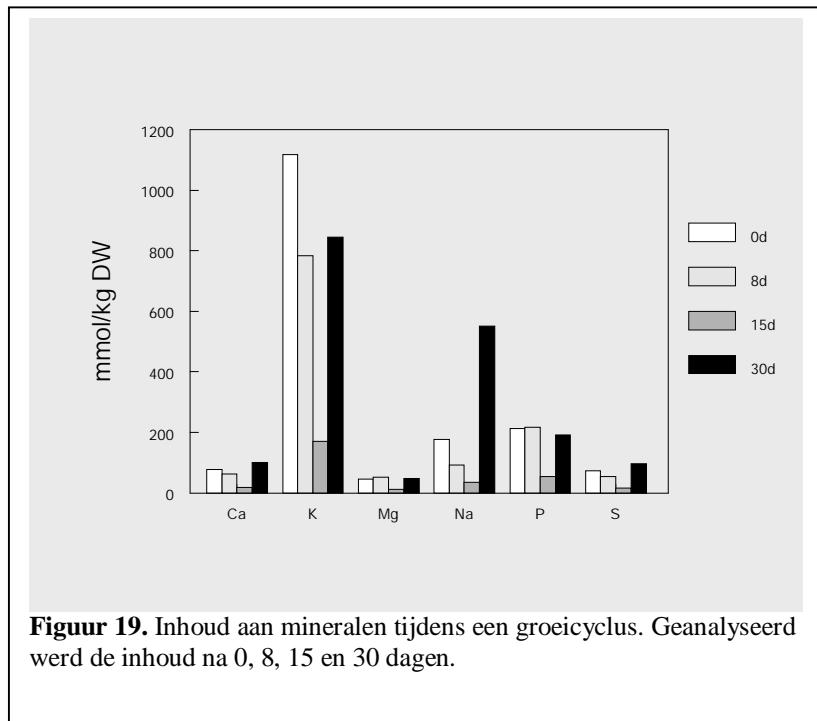
Een mogelijke verklaring van de slechte groei zou dus Natrium kunnen zijn. In MS medium zit, evenals in de meeste andere mediumformuleringen, zeer weinig Na. Het wordt alleen toegevoegd via NaFeEDTA dat in een concentratie van 0.1 mM wordt gegeven. In vaste media zit evenwel veel meer Na dan in vloeibare media omdat agar, een zeewier extract, veel Na bevat. Gelrite bevat eveneens veel Na. De hoeveelheid Na wordt, afhankelijk van merk agar en batch tot 6 maal hoger door de agar. Gelrite zorgt ook voor een verhoging, ongeveer een verzevenvoudiging. De conclusie uit Figures 18 en 19 en uit verdere analyses was dus dat Na mogelijk toxisch was. De gegevens wat betreft inhoud van Fe in slecht en goedgroeïende cultures gaven op dezelfde manier aan dat dit mineraal mogelijk toxisch was.

De directe manier om de toxiciteit van Na te testen is door het toe te voegen. Om dit te doen was het ook nodig om Fe niet meer via NaFeEDTA toe te dienen. Er werd gekozen voor FeEDDHA en de zgn. Van der Salm-modificatie van MS werd gebruikt. De eventuele toxiciteit van Na werd ook getest met kiemplantjes. Uit de grafiek met afgesneden wortels blijkt dat Na inderdaad toxisch is en de groei geheel stop zet. De toegevoegde concentratie is wel hoog, tussen 0.2 en 0.5 mM. Wanneer dezelfde reeks NaNO_3 bij kiemplantjes wordt getest, is er geen remming bij de hoge concentraties. Waarschijnlijk treedt er geen grote accumulatie op van Na op in de wortels omdat het gemakkelijk wordt afgevoerd naar de scheut. Een hypothese die op basis van deze gegevens kan worden opgesteld is dat de wortels als ze nog niet afgesneden zijn veel Na uit het medium opnemen: er is naar schatting 0.85 mM totaal in het medium. Als de wortels zijn afgesneden kan dit Na niet meer naar de scheut

Tabel 3. Effect van specifieke nutriënten toevoegingen.

	toevoeging	mean (mg)	SE
1MS		357 (100%)	122
1/4 MS		122 (34,2%)	47
1/4 MS	Ca tot 1MS	12 (3.4%)	5
1/4 MS	Mg tot 1MS	44 (12.3%)	27
1/4 MS	P tot 1MS	91 (25.5%)	44
1/4 MS	N tot 1MS	263 (73.7%)	136
1/4 MS	Cu 0.1	53 (14.8%)	19
1/4 MS	Ca tot 1.5 MS	49 (13.7%)	11
1/4 MS	N tot 1.5 MS	191 (53.5%)	80
1/4 MS	Mg tot 1.5 MS	100 (28.0%)	22
1/4 MS	P tot 1.5 MS	90 (25.2%)	21
1/4 MS	Cu 0.25	69 (19.3%)	14

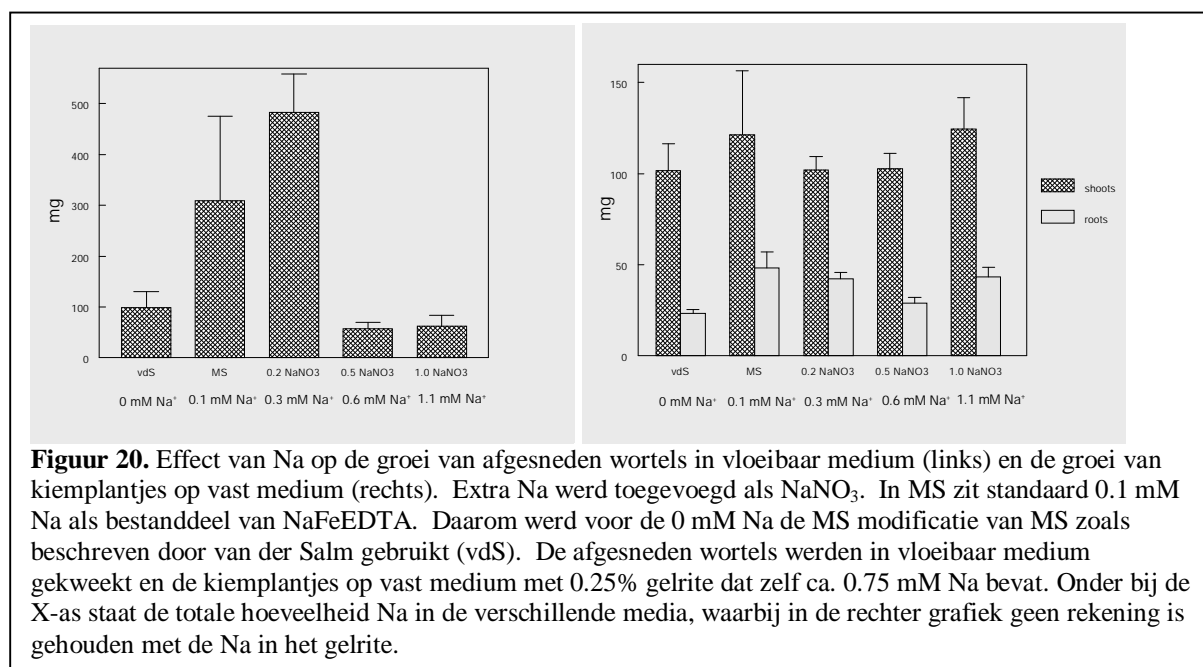
vervoerd worden en is het na wat langere tijd toxisch. Deze hypothese is niet meer onderzocht. Hij lijkt al weerlegd te worden door de goede groei van afgesneden wortels op vast medium waar ze continu op een hoge Na concentratie staan (Fig. 11). Het lijkt waarschijnlijk dat Na met de slechte groei te maken heeft maar het is waarschijnlijk een complexe zaak waarbij ook de onderdompeling in vloeibaar medium – met als gevolg bijv. ethyleen accumulatie in het weefsel – een rol kan spelen.



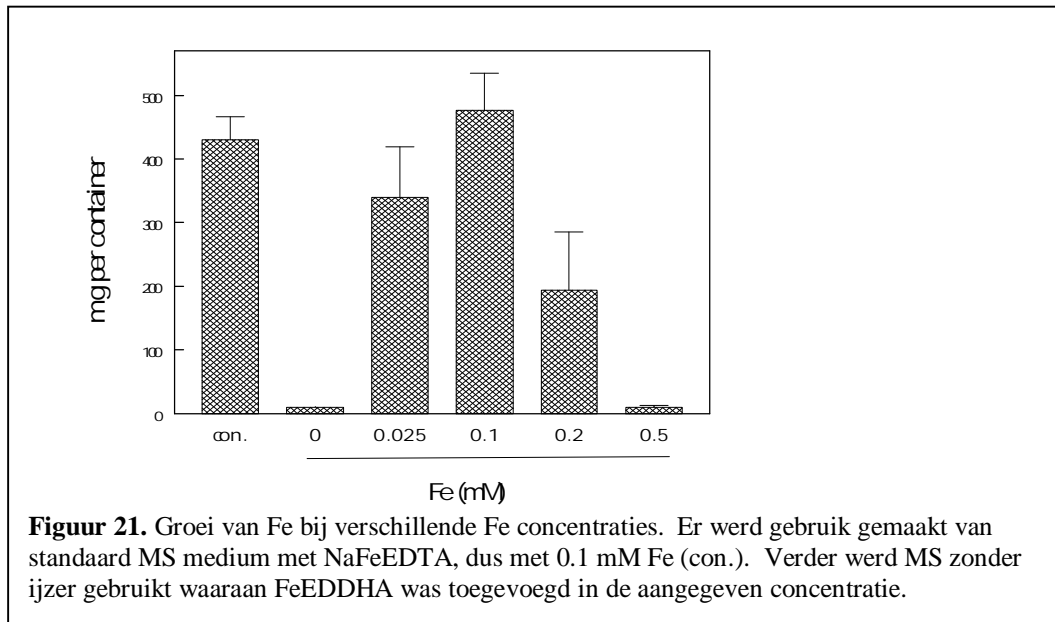
Figuur 19. Inhoud aan mineralen tijdens een groeicyclus. Geanalyseerd werd de inhoud na 0, 8, 15 en 30 dagen.

3.2.3. Het effect van anorganische nutriënten: ijzer (Fe)

Bij controle experimenten voor Na werd het medium zonder NaFeEDTA gebruikt. In de controles die hiervoor werden gedaan bleek dat Fe een toxisch effect had. Een concentratie van 0.5 mM Fe (toegevoegd als NaFeEDTA) blijkt zeer toxisch. In Figuur 21 zijn de resultaten van een afsluitend experiment. Als het Fe werd toegevoegd als FeSO₄ bleek er een nog grotere toxiciteit. Van de andere kant, als er helemaal geen Fe in het medium aanwezig was, was er zeer slechte groei. Omdat Fe wat betreft de wortelgroei zo'n scherp optimum heeft (iets minder en er is geen groei, iets meer en de groei gaat eveneens zeer slecht) zou het mogelijk een van de factoren kunnen zijn die bij wortelcultures voor slechte groei zorgen. Ten slotte moet er op gewezen worden dat er in agar en gelrite nauwelijks verontreiniging met Fe is.

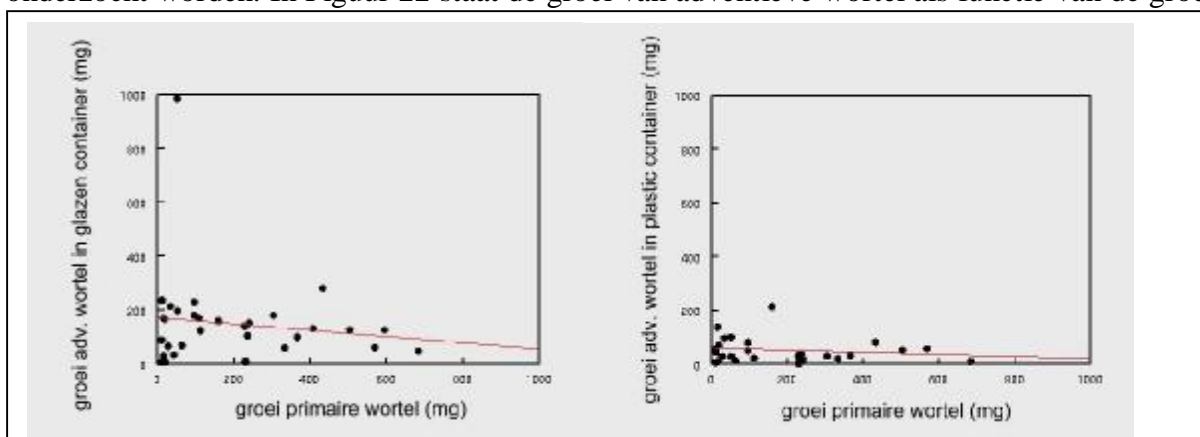


Figuur 20. Effect van Na op de groei van afgesneden wortels in vloeibaar medium (links) en de groei van kiemplantjes op vast medium (rechts). Extra Na werd toegevoegd als NaNO₃. In MS zit standaard 0.1 mM Na als bestanddeel van NaFeEDTA. Daarom werd voor de 0 mM Na de MS modificatie van MS zoals beschreven door van der Salm gebruikt (vdS). De afgesneden wortels werden in vloeibaar medium gekweekt en de kiemplantjes op vast medium met 0.25% gelrite dat zelf ca. 0.75 mM Na bevat. Onder bij de X-as staat de totale hoeveelheid Na in de verschillende media, waarbij in de rechter grafiek geen rekening is gehouden met de Na in het gelrite.

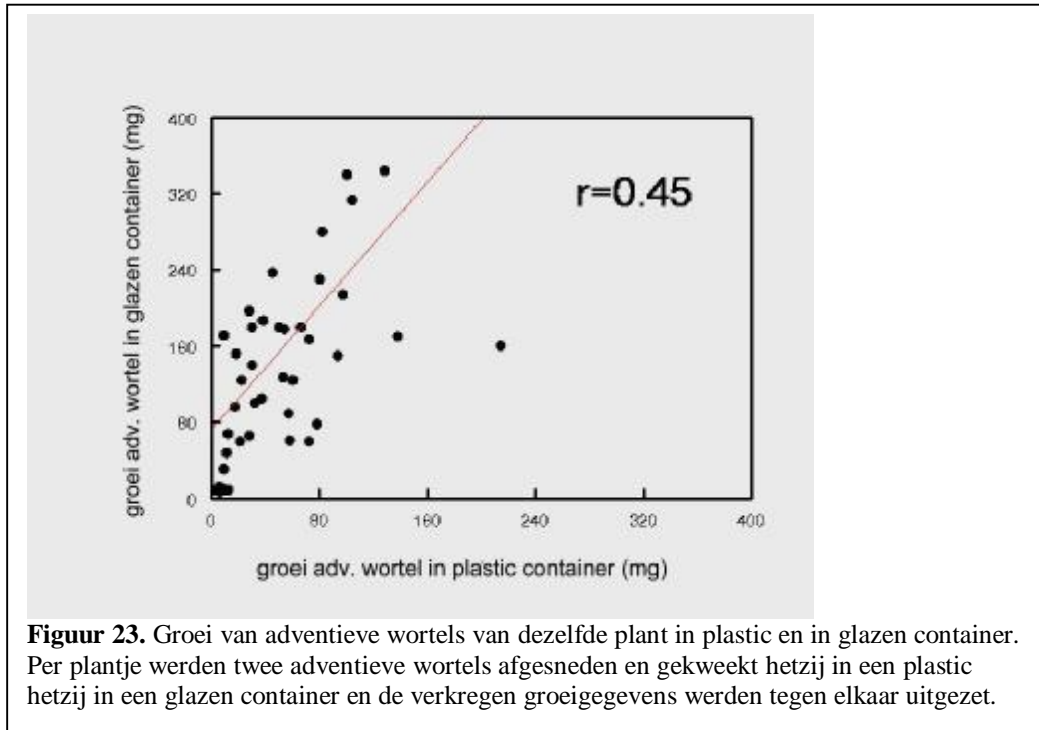


Is er een genetische component?

In het onderzoek worden wortels van kiemplantjes gebruikt van *Pelargonium* selecties. De plantjes binnen een selectie zijn genetisch niet identiek maar lijken wel heel sterk op elkaar. Er zijn op het oog tussen de kiemplantjes geen verschillen te zien. Dat neemt niet weg dat er tussen individuele plantjes wel verschillen kunnen zijn die pas naar voren komen in eigenschappen “als groei van afgesneden wortels”. Dit is geanalyseerd. Er is in de eerste plaats onderzocht of primaire wortels (= wortels afgesneden van kiemplantjes) en adventieve wortels (= wortels die ontstaan zijn uit de stengel van een kiemplantje) afkomstig van hetzelfde kiemplantje overeenkomen wat betreft groeicapaciteit. Het experiment is eenvoudig: van een groep van ong. 30 kiemplantjes is van ieder plantje de groei bepaald van de primaire wortel en de adventieve wortel. Die zijn tegen elkaar uitgezet. Als de groeicapaciteiten overeenkomen (van een kiemplantje groeien zowel de primaire wortel als de adventieve wortels slecht; van een ander kiemplantje groeien zowel de primaire wortel als de adventieve wortels goed) ontstaat er een rechte lijn. Anders ontstaat er een puntenwolk. Statistisch kan de correlatiecoëfficiënt berekend worden. Omdat er per kiemplantje meestal meer adventieve wortels ontstonden zijn de adventieve wortels zowel in een glazen container als in een plastic container gekweekt. Zo kon nogmaals het effect van de container onderzocht worden. In Figuur 22 staat de groei van adventieve wortel als functie van de groei



Figuur 22. Groei van adventieve wortel uitgezet tegen de groei van de primaire wortel van dezelfde plant. Er is in geen correlatie. Verdere uitleg in de tekst. De adventieve wortels links zijn gekweekt in een glazen containers en rechts in een plastic container. De primaire wortels zijn gekweekt in een glazen container. In iedere container werd één wortel gekweekt.



Figuur 23. Groei van adventieve wortels van dezelfde plant in plastic en in glazen container. Per plantje werden twee adventieve wortels afgesneden en gekweekt hetzij in een plastic hetzij in een glazen container en de verkregen groeigegevens werden tegen elkaar uitgezet.

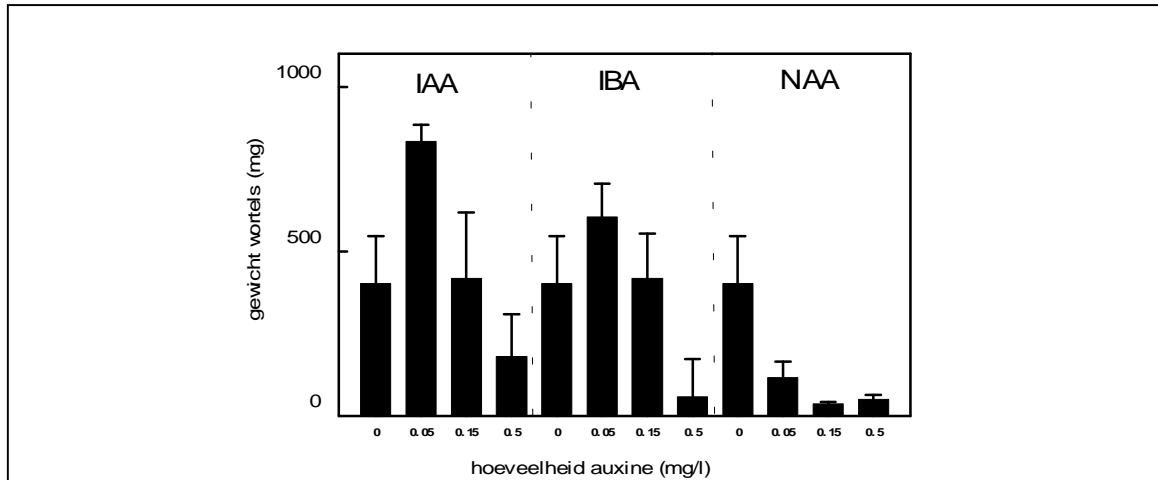
van de primaire wortel. Er is in het geheel geen correlatie. Uit de getallen is het duidelijk dat er zowel bij de primaire als bij de adventieve wortels goede en slechte groeiers zijn maar die zijn niet afkomstig van dezelfde plant. Verder is het duidelijk dat primaire wortels beter groeien dan adventieve wortels.(ongeveer twee maal zo goed!).

Omdat er per kiemplantje twee of meer wortels werden gesneden kon de overeenkomst in groei van adventieve wortels afkomstig van een kiemplantje gemeten worden. De gegevens hiervan staan in Figuur 23. Hier is er wel een correlatie ($P < 0.001$): als een adventieve wortel van een kiemplantje goed groeit, groeit een andere wortel van datzelfde kiemplantje beter; en omgekeerd als een adventieve wortel van een kiemplantje slecht groeit, groeit een andere wortel van datzelfde kiemplantje ook slechter.

Er zijn uit deze experimenten twee conclusies mogelijk: (1) er is een genetische component die pas bij de groei van adventieve wortels te zien is of (2) er is een epigenetische component: door omgevingsfactoren tijdens de groei van adventieve wortels ontstaan er verschillen tussen wortels waardoor ze na afsnijden beter dan wel slechter gaan groeien. Dat er een epigenetische component is lijkt ook te volgen uit de verschillen in groei tussen primaire en adventieve wortels. Hoe dan ook, een significant deel van de slechte groei wordt bepaald voordat de wortels worden afgesneden en in cultuur gebracht.

3.2.4. Procedures die de groei van cultures sterk verbeteren

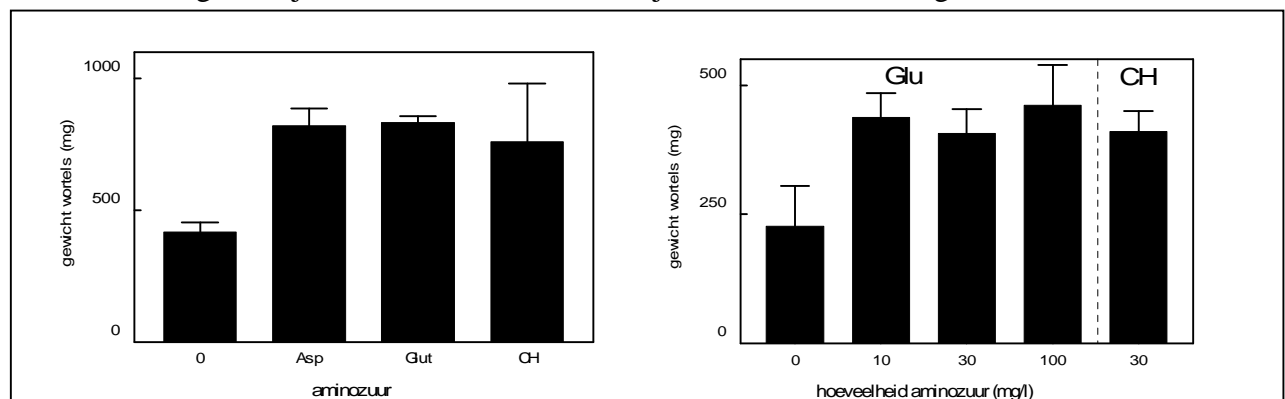
Bovenstaande onderzoeken in 3.2.1. – 3.2.4. leveren een scala van onderzoeksmogelijkheden op om tot een beter groei te komen. De aanwijzingen welke factor sterke groei kan geven, zijn echter niet concreet. Als er een epigenetische component is, zoals in 3.2.4. wordt aangegeven, kunnen adventieve wortels bijv. in allerlei verschillende media geïnduceerd worden waarna de groeicapaciteit van afgesneden wortels onderzocht wordt. Deze weg is niet ingeslagen, omdat er twee procedures gevonden zijn die de groei van wortelcultures sterk beïnvloeden. Mogelijk wordt dit later onderzocht in het kader van een studentenonderzoek.



Figuur 24. Effect van een 3 dagen voorbehandeling met auxine op de groei van wortelcultures. Wortels werden afgesneden en 3 dagen in vloeibaar medium behandeld met auxine (indolazijnzuur, IAA; indolboterzuur, IBA; of naftylazijnzuur, NAA) en daarna overgezet naar medium zonder auxine.

De eerste factor die onderzocht is, is een tijdelijke behandeling met auxines. Zoals al in 3.2.1. aangegeven heeft een langdurige behandeling met auxines geen of een negatief effect, ondanks het feit dat auxines de vorming van laterale wortels bevorderen. Dan zou je dus verwachten dat er meer zijwortels gevormd worden en dat de groei bevordert wordt. De reden dat deze verwachting niet uitkomt is dat auxine belangrijk is bij de aanleg van zijwortels en ook van adventieve wortels, maar daarna de uitgroei van de wortelbeginselen en ook de groei van de wortel sterk remt (De Klerk et al. 1999). Er is inderdaad een artikel waarbij de auteurs een korte behandeling geven met auxine waarna er een sterk verbeterde groei werd verkregen (Czako et al. 1993). De gegevens van het afsluitend experiment van een reeks experimenten hieraan staat in Figuur 24. Het auxine IAA geeft de beste groei, daarna IBA, terwijl NAA alleen remt. De effectiviteit van de verschillende auxines komt precies overeen met hun stabiliteit: IAA is het minst stabiel, NAA het meest. Waarschijnlijk gaat er bij overzetten veel auxine mee. Dit auxine remt. Als er IAA mee gaat is het remmend effect niet zo groot want IAA wordt vanwege de instabiliteit snel afgebroken. NAA blijft evenwel lange tijd aanwezig.

De tweede factor die onderzocht is zijn organische supplementen. Het idee is dat de wortels vanwege afwezigheid of laag niveau van bepaalde enzymsystemen sommige essentiële stoffen niet of te weinig maken. In complete planten komen die stoffen uit de scheut via het floëem. Er is een desktop studie gedaan naar de inhoud van het floëem maar daar kwamen geen bijzondere zaken uit. Toch zijn een aantal stoffen getest, o.a. oxaalzuur,



Figuur 25. Effect van aminozuren op de groei van wortels. Links werden verschillende aminozuren getest, asparagine (asp), glutamine (glu) en een aminozuur mengsel (CH) dat alle 20 aminozuren bevat. Rechts het effect van de concentratie glutamine vergeleken met de optimale concentratie aminozuurmengsel. (CH is de afkorting van caseine hydrolysaat.)

appelzuur en aminozuren (de eerste twee gesuggereerd door een deelnemend bedrijf). Aminozuren bleken een groot effect te hebben (Fig. 25). Er is gekozen voor asparagine en glutamine, omdat dit in planten de transportvormen zijn, die de plant dus normaal gebruikt als startpunt voor de aanmaak van andere stoffen. Asparagine en glutamine kunnen beiden niet geautoclaveerd worden wat mediumbereiding arbeidsintensiever maakt. Glutamine wordt bij autoclaveren omgezet naar een ander aminozuur, glutaminezuur en asparagine naar asparaginezuur. Beide omzettingsproducten hadden een even bevorderend effect als de oorspronkelijke aminozuren.

3.3. Regeneratie van scheuten uit wortels

3.3.1. Wetenschappelijk onderzoek aan regeneratie

Cellen in planten, bijv. in bladeren, kunnen nieuwe wortels, scheuten of embryo's (zgn. somatische embryo's) vormen. In de wetenschap worden deze nieuw gevormde organen adventieve organen genoemd. Adventief betekent (volgens Van Dale) "bij toeval hier groeiend". In dit verband wordt bedoeld dat de organen zich bevinden op een plaats waar ze zich normaal niet zouden bevinden. Adventieve regeneratie is al eeuwen bekend. De oude Grieken stekten fruitbomen, waarbij er adventieve wortels op de takken gevormd werden. Bladstek wordt veel in de praktijk gebruikt. Wortelstek, waarbij scheuten uit wortels ontstaan wordt eveneens veel in de praktijk gebruikt (zie Tabel 1). In de dierlijke wereld is dit type regeneratie beperkt tot de 'lagere' soorten. Schoolboekvoorbeelden zijn bijv. de regeneratie bij wormen en hydra's (zoetwaterpoliepen) Bij mensen is regeneratie beperkt tot bijv. de vorming van wondweefsel.

In het onderzoek was de grote stap voorwaarts in 1957. Skoog en Miller rapporteerden toen dat de verhouding van toegediende groeiregulatoren van het cytokinine en het auxine type doorslaggevend is: bij veel cytokinine ontstaan er scheuten, bij veel auxine wortels en wanneer ze allebei in voldoende mate worden toegevoegd callusweefsel. Dit principe is sindsdien vele malen bevestigd.

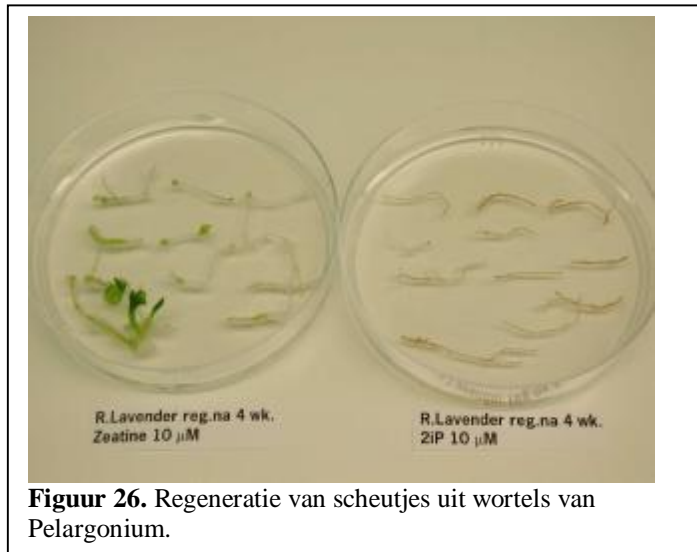
Sinds 1957 betroffen de praktische ontwikkelingen het de opstellen van regeneratieprotocollen voor een grote reeks gewassen, en de toepassing van andere groeiregulatoren. Dat laatste betrof enerzijds nieuwe types auxine en cytokinine (bijv. thidiazuron) en anderzijds andere types hormonen. Voor alle groeiregulatoren is gevonden dat ze bij de regeneratie van een of andere plant een effect hebben maar de effecten lijken nooit zo universeel als die van cytokinines en auxine. Voor het hormoon ethyleen, bijv. is gevonden dat het soms stimuleert, soms remt en soms geen effect heeft. Daarom is meer fundamenteel onderzoek nodig.

Sinds 1957 was de belangrijkste ontwikkeling in het fundamentele onderzoek dat regeneratie geanalyseerd is als een ontwikkelingsproces dat uit verschillende stappen bestaat met ieder specifieke hormooneisen. In de eerste fase, de "dedifferentiatie" verliezen cellen (een deel van) hun differentiatie en worden competent om op orgaaninducerende hormonen te reageren (ze "gaan terug in de tijd" en worden weer embryo-achtig). De orgaaninducerende

Tabel 4. Effect van twee cytokinine-types (Zeatin, Z; en isopentanyladenine, 2-iP) op de regeneratie uit Pelargonium wortels. Categorie 1= scheutjes met blaadjes; categorie 2= groen calluspropje ; categorie 3= groene wortels + callusvorming.

	Z (2 mg.l ⁻¹)				2 iP (2 mg.l ⁻¹)			
	# expl.	cat.1 (%)	cat.2 (%)	cat.3 (%)	# expl.	cat.1 (%)	cat.2 (%)	cat.3 (%)
P.Scarlet	33	3.0	72.7	63.6	36	0.0	0.0	0.0
P.Pink	37	0.0	48.6	91.9	37	0.0	0.0	0.0
P.Red	23	0.0	39.1	82.6	25	0.0	0.0	0.0
R.Lavend.	31	6.5	54.8	74.2	35	0.0	0.0	0.0
R.Scarlet	25	0.0	56.0	20.0	24	0.0	0.0	0.0
R.Rose St	35	0.0	42.9	51.4	35	0.0	0.0	0.0

Opm.: 2 iP geeft geen regeneratie te zien - wortels vertonen amper of geen groei.
De scheutjes die bij Zeatine te zien zijn komen uit callus.



Figuur 26. Regeneratie van scheutjes uit wortels van Pelargonium.

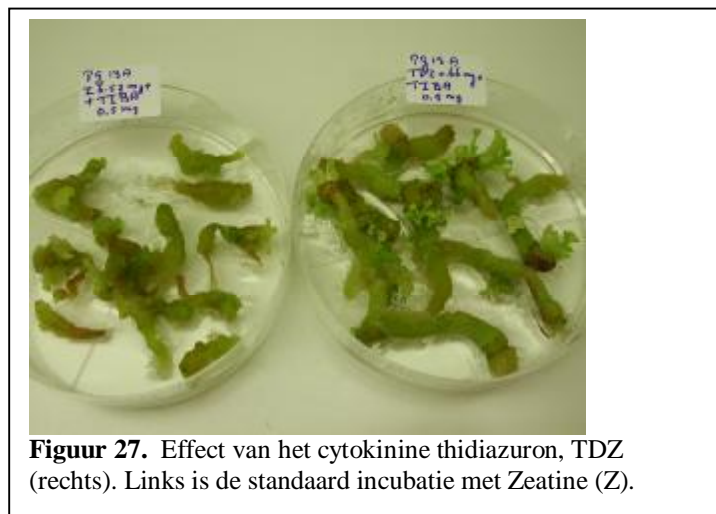
hormonen, cytokinine bij scheutvorming, en auxine bij wortelvorming, werken in de 2^e fase, de “inductiefase”. De cellen worden dan scheutmeristemen resp. wortelmeristemen. In de 3^e fase groeien ze uit tot scheuten of wortels. Hiermee konden de tegenovergestelde effecten van ethyleen verklaard worden: ethyleen bleek te bevorderen in de 1^e fase en te remmen in de 2^e. Welk van de twee effecten de overhand heeft bij continue toediening hangt o.a. af van het genotype. Van dit principe werd in ons onderzoek gebruik gemaakt om de groei van

wortelcultures te verbeteren (3.2.5). Voor de modelplant Arabidopsis, die sowieso moeilijk is in weefselkweek, was lange tijd adventieve scheutregeneratie zeer moeilijk. De manier om Arabidopsis te laten regenereren is ook door verschillende media voor de verschillende fasen te gebruiken. Het resterende grote probleem is evenwel dat het vrijwel geheel onbekend is hoe de eerste fase van het regeneratieproces, de dedifferentiatie, door hormonen gestuurd wordt.

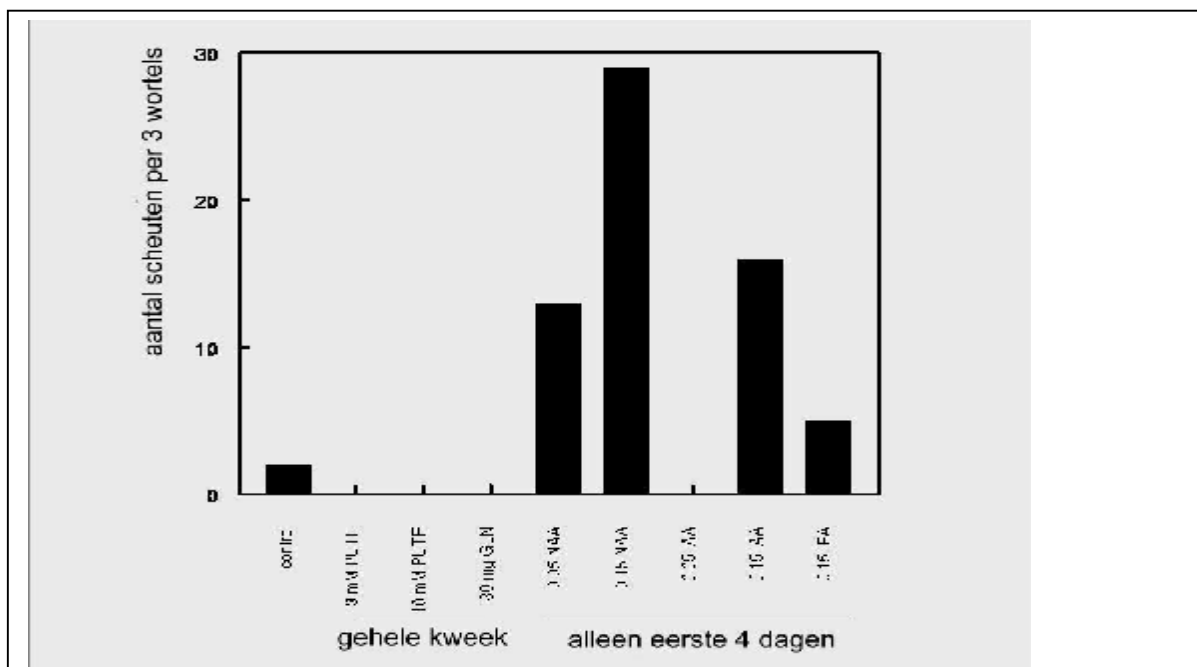
Een tweede ontwikkeling op fundamenteel niveau is het moleculair onderzoek dat de afgelopen 5 à 10 jaar steeds meer belangwekkende resultaten oplevert. Het ligt daarom in de verwachting dat op basis van het recente onderzoek binnen afzienbare tijd nieuwe regeneratie procedures kunnen worden ontwikkeld. Een overzicht van de achtergronden is in de Klerk (2008).

3.3.2. Regeneratieprocedures voor Pelargonium wortels.

Pelargonium wortels regeneerden relatief makkelijk maar het aantal geproduceerde scheutjes is laag. Zeatine geeft goede resultaten maar bij het cytokinine 2-iP gebeurt er helemaal niets (Tabel 4; Fig. 26). Toevoegen van de auxine-transport remmer trijodobenzoëzuur (TIBA) verbeterde de regeneratie eveneens. Het mechanisme daarvan is geheel onduidelijk: meestal remt TIBA juist de regeneratie. Het cytokinine TDZ (thidiazuron) was weer beter dan zeatine (Fig. 27). Er is een reeks van factoren geprobeerd (Tabel 5), maar geen daarvan had een positief effect op één uitzondering na. Wanneer wortels voorgekweekt waren met auxine ging de regeneratie ook een stuk beter (Fig. 28). Men moet



Figuur 27. Effect van het cytokinine thidiazuron, TDZ (rechts). Links is de standaard incubatie met Zeatine (Z).



Figuur 28. De capaciteit van wortels om scheuten te regenereren afhankelijk van de verschillende condities tijdens de periode van wortelgroei. Putrescine (PUTR) en glutamine (GLU) waren de gehele periode van wortelkweek (5 weken) aanwezig, de auxines naftylazijnzuur (NAA), indolazijnzuur (IAA) en indolboterzuur (IBA) alleen de eerste 4 dagen van de periode van wortelkweek.

hier wel bij bedenken dat de voorbehandeling helemaal in het begin van de wortelkweek was gedurende alleen de eerste paar dagen. Op een onbekende manier heeft het auxine zijn invloed 4 of 5 weken later tijdens de regeneratie. Verder moet opgemerkt worden dat het grootste effect verkregen werd met het auxine naftylazijnzuur (NAA) maar dat dit auxine leidde tot een slechte groei van de wortels zelf. Figuur 28 laat ook het effect zien van verschillende andere voorbehandelingen. Het is teleurstellend dat glutamine, dat een positief effect had op de wortelgroei, een negatief effect had op de capaciteit van wortels om scheuten te regenereren.

De geproduceerde scheuten zijn op kleine schaal uitgeplant en in bloei gebracht. Er waren geen afwijkingen te zien. Adventieve scheuten ontstaan rechtstreeks uit de pericykel (Seeliger 1959; Tetsumura and Yukinaga 2000). De pericykel bestaat een laag cellen die nog gedeeltelijk meristematisch zijn: laterale wortels ontstaan uit de pericykel en de pericykel is ook betrokken bij de secundaire diktegroei. In meer meristematische cellen is de kans op afwijkingen waarschijnlijk aanzienlijk minder.

Tabel 5. Effect van een reeks van geteste factoren. Als referentie is het standaard medium gebruikt dat aan het einde van het eerste jaar opgesteld was (0.22 mg/l TDZ + 0.5 mg/l TIBA).

BAP minder effectief, Z vrijwel even effectief
IAA 0.2 en 2.0 mg/l + TDZ: betere regeneratie maar met additioneel TIBA is effectiever
epibrassinolide: negatief
wortels voorbehandeld met auxine (ca 0.1 mg/l): (zeer?) positief
voorgroei met putrescine: negatief
voorgroei met glutamine: negatief (?)
voorgroei met extra CuSO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂ : geen effect
leeftijd wortels (getest tot 6 weken oud): geen effect
Eerste 3 dagen verschillende concentraties 2,4-D, daarna pas naar het standaard regeneratie medium: geen effect ('Arabidopsis methode')
Eerste 3 dagen verschillende concentraties IAA, daarna pas naar het standaard regeneratie medium: geen effect

4. Bespreking van de PRI/Resultaten

4.1. Zantedeschia: scheutcultures in het donker

Het gedeelte met Zantedeschia is voorspoedig verlopen. De cultures groeiden goed in het donker en de excessieve lengtegroei in het donker kon geremd worden door gibberellinesynthese remmers. Tevens trad er na enkele cycli in het donker spontaan remming van de lengtegroei op. Als de remmer paclobutrazol gebruikt werd, had dit een zeer gunstige effect op de knolgroei na uitplanten. Er moet op gewezen worden dat het gebruik van groeiregulatoren onverwachte problemen kan geven. Imazalil (dat de aanmaak van brassinosteroiden remt) gaf bossigheid na uitplanten. Bij imazalil werden ook na uitplanten incidenteel juveniel uitziende plantjes met ronde blaadjes verkregen. Unicazol (dat de aanmaak van gibberelline remt) gaf geen betere knolgroei maar leek ook bossigheid te induceren.

Er moet gewezen worden op het effect van fluridon op de doorbreking van apikale dominantie wat vorming van veel zijscheuten tot gevolg had. Apikale dominantie is de remming van de uitgroei van okselknoppen door de hoofdknop. Men dacht sinds ongeveer 1935 dat het werkingsmechanisme in grote lijnen ontdekt was: de hoofdknop maakt auxine, dat omlaag in de stengel wordt getransporteerd en dan de uitloop van de zijknoppen remt. Ongeveer vijf jaar geleden is een nieuwe regulator bij apikale dominantie ontdekt, een carotenoïde die de uitloop remt. Fluridon remt de aanmaak van carotenoïden en het zou goed kunnen dat dit het effect van fluridon in Zantedeschia verklaart. Bij PRI is een onderzoek gestart aan apikale dominantie in alstroemeria in weefselkweek en mogelijk wordt het fluridon onderzoek bij Zantedeschia in dit kader opgepakt.

4.2. Pelargonium wortelcultures

In het onderzoek door de deelnemende bedrijven bleek het bij veel gewassen problematisch om een goed groeiende cultuur te verkrijgen. Dit was ook het geval bij Pelargonium. De problemen bij wortelgroei waren onverwacht omdat weefselkweek voor het eerst bij wortelcultures gelukt was (en daarom ten onrechte makkelijk uitvoerbaar leek) en omdat er in de recente literatuur alleen succesverhalen over wortelkweek zijn. Wat dat laatste betreft, het betrof op enkele uitzonderingen na wortels die getransformeerd waren met *Agrobacterium rhizogenes*. Deze bacterie brengt genen met een groeiregulator-achtige werking over naar het genoom van de gastplant en mogelijk is dit er de oorzaak van dat groei van de zgn. *hairy roots* zo goed gaat. Er wordt veel fundamenteel onderzoek gedaan aan het effect van *A. rhizogenes* maar hoe de hormoonachtige werking precies tot stand komt, is nog steeds niet ontdekt. Als dit principe bekend wordt, kunnen op basis daarvan wellicht nieuwe methodes voor de groei van afgesneden wortels ontwikkeld worden.

Om de groei bij Pelargonium aan de gang te krijgen zijn veel experimenten gedaan. Een reeks groeiregulatoren is onderzocht maar geen had effect. Er was alleen een (groot) positief effect van een korte behandeling met auxines aan het begin van de cultuur. Dit was mogelijk het gevolg van de inductie van zijwortels. Bij langere aanwezigheid van auxine wordt waarschijnlijk de groei van de zijwortels geremd.

Experimenten met anorganische nutriënten leverden twee kandidaten voor remming, Na en Fe. Als deze anorganische nutriënten inderdaad een negatieve invloed hadden was dat op een complexe manier. Het zou interessant zijn dit onderzoek voort te zetten. Omdat afgesneden wortels mogelijk een tekort hebben aan bepaalde organische componenten die ze in intacte planten uit de scheut aangeleverd krijgen is hier veel aandacht aan besteed. Het bleek dat de groei sterk bevorderd werd door toediening van aminozuren.

Een verwachte bottleneck was de scheutregeneratie uit wortels. Dit gebeurt spontaan bij veel gewassen bij de normale groei. Bij wortels van *Pelargonium* kon regeneratie verkregen worden maar was het aantal geproduceerde plantjes niet groot. Dit aantal kon omhoog gebracht worden door de hormonen in het regeneratiemedium aan te passen. Het cytokinine thidiazuron (TDZ) gaf de beste resultaten. Een andere manier om het aantal scheuten omhoog te brengen was door de regeneratiecapaciteit van het wortelmateriaal te verhogen. Dit kon verbeterd worden door een behandeling die de wortelgroei stimuleerde, de korte voorbehandeling met auxine. Helaas gaf de andere voorbehandeling die wortelgroei bevorderde, kweek met extra aminozuren, juist veel slechtere scheutregeneratie.

Regeneratie van scheuten, wortels en embryo's is een algemeen probleem in de biotechnologie en ook in de tuinbouw (slecht bewortelbare soorten). Er wordt aan dit probleem wetenschappelijk onderzoek gedaan, zij het niet op grote schaal. Het is de verwachting dat op basis van dit onderzoek het proces zo goed begrepen zal worden dat er nieuwe procedures voor regeneratie worden opgesteld. Literatuuronderzoek liet zien dat op basis van wat nu bekend is, dergelijke procedures nog niet opgesteld kunnen worden maar dat een veelbelovende oplossingsrichting is om de hormoonbehoefte per stap te bestuderen.

Wetenschappelijke literatuur

- Alabadi D, Gil J, Blazquez MA, Garcia-Martinez JL (2004) Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiology* 134:1050-1057
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Current Biology* 14:1232-1238
- Bouman H, De Klerk GJ (2001) Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theoretical and Applied Genetics* 102:111-117
- Czako M, Wilson J, Yu XD, Marton L (1993) Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 12:603-606
- De Klerk GJ (1992) Hormonal control of dormancy and apical dominance in tissue-cultured plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41:443-451
- De Klerk GJ (2008) Adventitious regeneration. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (in press):
- De Klerk GJ, Van Der Krieken W, De Jong JC (1999) The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 35:189-199
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M, Kwang WJ (2007) Auxin-Mediated Lateral Root Formation in Higher Plants. In: *International Review of Cytology*. Academic Press, pp 111-137
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Jr. (1990) Plant propagation. Principles and practices. *Plant propagation Principles and practices* 647 pp
- Nagata N, Min YK, Nakano T, Asami T, Yoshida S (2000) Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants. *Planta* 211:781-790
- Rupp LA, Mudge KW (1985) Ethephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of mugo pine. *Physiologia Plantarum* 64:316-322
- Seeliger I (1959) Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie wurzelburtiger Sprosse an isolierten Robinienwurzeln.; The development and anatomy of adventitious shoots arising on excised roots of *Robinia pseudoacacia*. *Flora, Jena* 148:119-124
- Street HE (1957) Excised root culture. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 32:117-155
- Tetsumura T, Yukinaga H (2000) Comparative rooting of shoot tips of four Japanese persimmon cultivars vs. shoots regenerated from roots cultured in vitro. *HortScience* 35:940-944
- Topoonyanont N, Debergh PC (2001) Reducing bushiness in micropropagated *Gerbera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67:133-144
- Voesenek L, Banga M, Thier RH, Mudde CM, Harren FJM, Barendse GWM, Blom C (1993) Submergence-Induced Ethylene Synthesis, Entrapment, and Growth in Two Plant Species with Contrasting Flooding Resistances. *Plant Physiol* 103:783-791
- Werbrouck SPO, Saibo NJM, Dhuyvetter H, De Schepper S, Van Der Straeten D, Debergh PC (2003) Physiological and morphological evidence of brassinosteroid-biosynthesis inhibition by the fungicide imazalil. *Physiologia Plantarum* 119:69-77
- White PR (1938) Cultivation of excised roots of dicotyledonous plants. *American Journal of Botany* 25:348-356

Könst: *Alstroemeria*

1 - Etiolering

2 - Scheutregeneratie uit wortels

1 - Etiolering

Exp. 1: Optimale [PAC]

Exp. 2: follow up - Optimaliseren [PAC]

Exp. 3: Optimale [PAC] in relatie met vermeerderings factor (VF)

Experiment 1: optimale [PAC]

- 2 Alstroemeria rassen
- Antigibberelline - PAC (Paclobutrazol in de vorm van Bonzi)
- 3 Wavin 280 containers à 16 planten per behandeling
- Resultaten na 2 cycli in het donker

Behandeling	[PAC] μM	Conditie
1.1	0,0	Donker
1.2	0,1	Donker
1.3	1	Donker
1.4	10	Donker
1.5	30	Donker
1.6	Blanco	Licht

Resultaten:

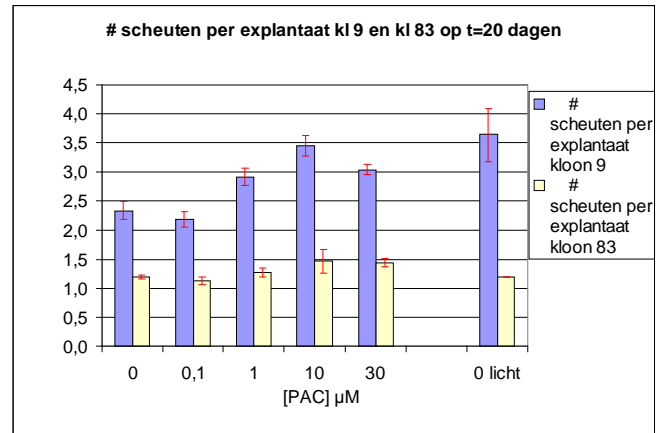
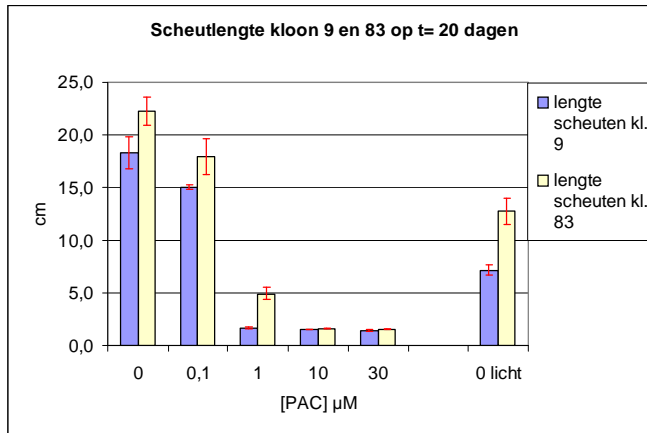
Waarnemingen:

- lengte opgaande scheuten
- # opgaande scheuten per explantaat (Vermeerderingsfactor)

figuur 1

figuur 2

Könst: *Alstroemeria*



Plant in het licht (rechts) en in het donker 10 µM PAC(links)



Uit figuur 1 blijkt dat na 2 cycli in het donker bij 10µM PAC de scheutlengte optimaal wordt geremd. Alle delen van de planten zijn goed te herkennen. Bij hogere concentraties is dit niet het geval, opgaande scheuten en wortelstok zijn dusdanig vervormt dat herkennen van de verschillende onderdelen moeilijk word. Hierdoor word vermeerderen zonder de wortelstok te beschadigen bijna onmogelijk.

Uit figuur 2 blijkt dat bij 10µM PAC de meeste opgaande scheuten per explantaat worden gemaakt. Het aantal opgaande scheuten per cyclus geeft de groeisnelheid van de wortelstok weer, en is dus ook een maat voor vermeerderingsfactor.

Experiment 2: Follow up optimaliseren [PAC]

- 2 *Alstroemeria* rassen
- Antigibberelline - PAC (Paclobutrazol in de vorm van Bonzi)
- 3 Wavin 280 container à 16 planten per behandeling
- Resultaten na 2 cycli in het donker

Könst: Alstroemeria

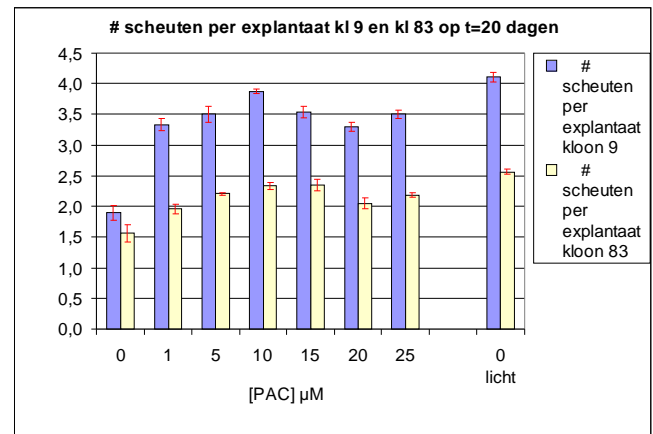
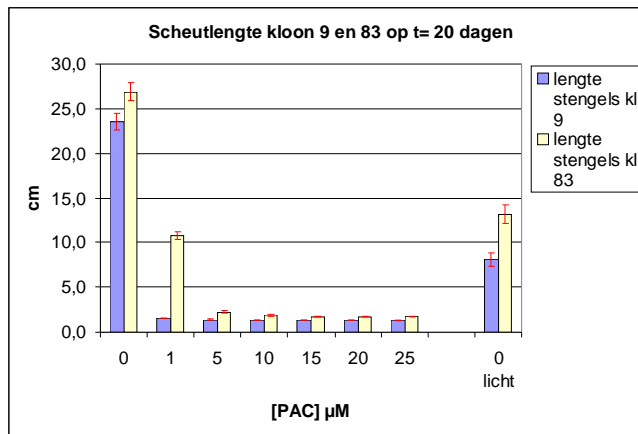
Behandeling	[PAC] μM	Conditie
3.1	0,0	Donker
3.2	1,0	Donker
3.3	5,0	Donker
3.4	10	Donker
3.5	15	Donker
3.6	20	Donker
3.7	25	Donker
Blanco	0	Licht

Resultaten:

Waarnemingen:

- lengte opgaande scheuten
- # opgaande scheuten per explantaat (maat voor VF)

Könst: *Alstroemeria*



Scheutlengte op t=20 dagen bij verschillende PAC concentraties.



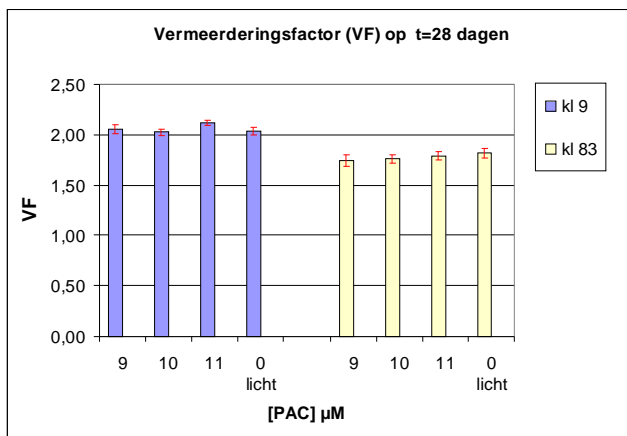
Experiment 3: optimale vermeerderingsfactor bij verschillende [PAC]

- 2 *Alstroemeria* rassen
- Antigibberelline = PAC (Paclobutrazol in de vorm van Bonzi)
- 3 Wavin 280 containers à 16 planten per behandeling
- Resultaten na 6 cycli in het donker

Könst: *Alstroemeria*

- Na afloop van het experiment worden de planten beworteld in het licht, hierna afgehard in de kas, en daarna worden 10 planten opgeplant in de volle grond voor soortechtheidscontrole en eventuele andere afwijkingen

Behandeling	[PAC] μM	Conditie
5.2	9,0	Donker
5.3	10,0	Donker
5.4	11,0	Donker
5.1 blanco		Licht



Resultaten:

Waarnemingen:

- Vermeerderings factor (VF)

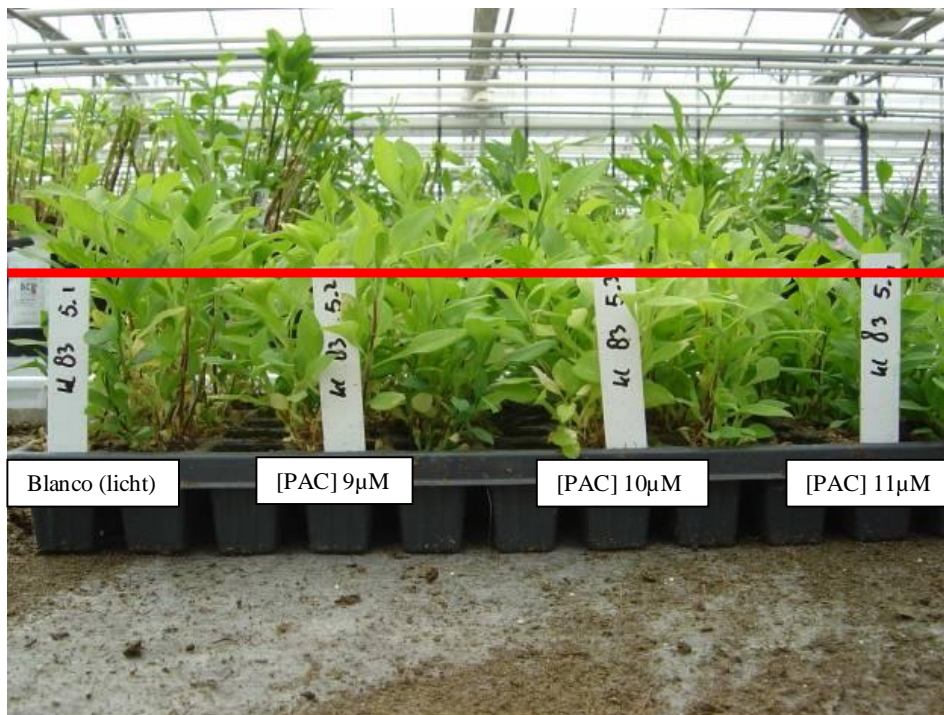
Resultaten:

Könst: *Alstroemeria*

Waarnemingen:

- Effect van de [PAC] op het uitvalspercentage na het afharderen

Kloon	Behandeling	[PAC] μM	% dood
9	5.2	9,0	75,0
	5.3	10,0	85,0
	5.3	11,0	95,0
	5.1 licht		10,0
	5.2	9,0	6,0
	5.3	10,0	6,0
	5.4	11,0	7,0
	5.1 licht		5,0



Opmerking:

Na 6 weken afharderen in de kas zijn de opgaande scheuten van planten die op een medium met PAC gestaan hebben zijn korter ten opzichte van de planten die in het licht gestaan.

Resultaten:

Könst: *Alstroemeria*

Waarnemingen:

invloed [PAC] tijdens de vermeerdering in het lab op:

- snelheid van in bloei komen
- verschil lengte/kwaliteit
- afwijkingen gewas/bloem



Opmerking:

Er zijn geen significante verschillen wat betreft groei, bloei, kwaliteit, lengte en snelheid waar te nemen tussen de behandelingen.

Conclusie etiolering:

1. Alstroemeria is in weefselkweek in het donker te vermeerderen.
Dit met behoud van vermeerderingsfactor en kwaliteit
Optimale Paclobutrazol concentratie bij de door ons gebruikte rassen is 10 μ M.
2. Enkele variëteiten die in het donker zijn vermeerderd leveren problemen op tijdens het afharderen in de kas, de meeste planten gaan dood. Dit probleem wordt waarschijnlijk veroorzaakt omdat de donker planten bijna tot geen wortels maken op bewortelingsmedium. Na 1 vermeerderingsfase in het licht zijn de planten hersteld en kunnen dan alsnog beworteld worden voor afharderen in de kas.
3. Tijdens de soortechtheid controle zijn geen significante verschillen wat betreft groei, bloei, kwaliteit, lengte en groeisnelheid waar te nemen tussen de behandelingen.

2 - Scheutregeneratie uit wortels

Exp. 1: Optimale suikerconcentratie van medium wortelcultuur

Exp. 2: Verbetering vertakkingsgraad

Könst: *Alstroemeria*

- Exp. 3: Regeneratie van 2 type wortels met behulp van Zeatine
- Exp. 4: Regeneratie met behulp van Thiadizuron (TDZ) en Zeatine in combinatie met TIBA
- Exp. 5: Regeneratie van wortels van planten uit zaad met behulp van Thiadizuron (TDZ) en 2-4 epibrassinolide

Experiment 1: optimaliseren suikerconcentratie

- Materiaal: 2 type Adventieve wortels, gevormd tijdens de in-vitro vermeerdering en in-vitro beworteling.
- 7 wortelpunten van 2cm per container (wavin 250) met 40 ml vloeibaar/vast medium. 3 containers per behandeling.
- Het medium bevat standaard: MS (Gamborg B5) en 0.1mg/l biotine.
- Incubatie bij 20 °C, 24 uur donker

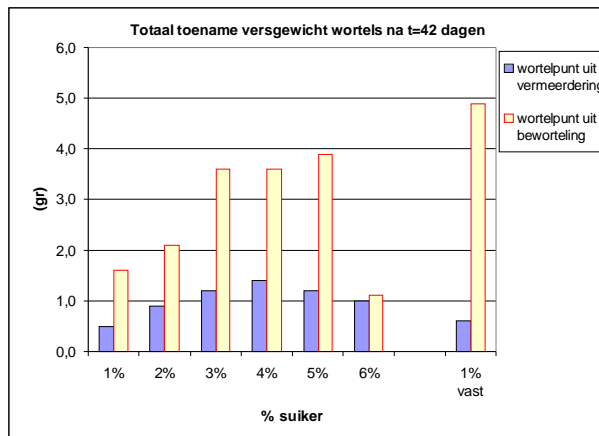
Behandeling	[suiker] gr/l	Conditie
1.1	10	vloeibaar
1.2	20	vloeibaar
1.3	30	vloeibaar
1.4	40	vloeibaar
1.5	50	vloeibaar
1.6	60	vloeibaar
1.7	0	vast

Resultaten:

Waarnemingen:

- Effect van de suikerconcentratie op de toename van het versgewicht van wortels van *Alstroemeria*.
- Na t=42 dagen wordt de toename van het versgewicht van het totale bakje bepaald.

Könst: *Alstroemeria*



Opmerking: De hoofdwortel vertoont geen vertakking.

Conclusie:

De optimale suikerconcentratie in vloeibaar medium is 5%.

Geen vertakking van de hoofdwortel.

Adventieve wortels gevormd tijdens de in-vitro beworteling groeien beter in een vloeibare wortelcultuur.

Experiment 2: optimaliseren vertakkingsgraad wortels.

- Materiaal: Adventieve wortels gevormd tijdens in-vitro beworteling.
- 7 wortelpunten van 2 cm per container (wavin 2/50) met 40 ml vloeibaar medium. 3 containers per behandeling

Könst: *Alstroemeria*

- Het medium bevat standaard: MS (Gamborg B5), 0,1mg/l biotine en 5% suiker
- Incubatie bij 20 °C, 24 uur donker

Behandeling	[IBA] mg/l	Conditie
1.1	0.4	vloeibaar
1.2	0.8	vloeibaar
1.3	1.6	vloeibaar
1.4	3.2	vloeibaar

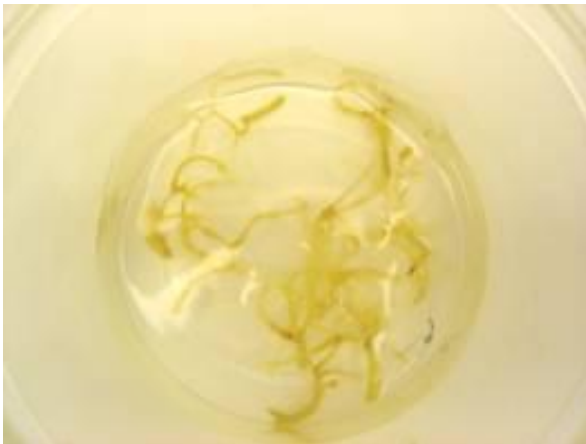
Resultaten:

Waarnemingen:

- Effect van de [IBA] op de toename van vertakkinggraad tijdens de wortelcultuur. Na t=42 dagen wordt de cultuur visueel beoordeeld op het aantal zijwortels.

Behandeling	[IBA] mg/l	Vertakkingsgraad
1.1	0.4	Geen
1.2	0.8	1 wortel per bakje
1.3	1.6	Een aantal per wortel, lengte groei blijft behouden.
1.4	3.2	Een aantal per wortel, lengte groei blijft niet behouden. Veel callus vorming.

Behandeling 1.6



Conclusie:

- De optimale [IBA] is 1.6 mg/l
- Regelmatige vertakking, waarbij de lengtegroei van de wortel behouden blijft.
- Optimale medium voor wortelcultuur:

Könst: *Alstroemeria*

1MS (Gamborg B5)
Suiker 5%
IBA 1.6 mg/l
0.1 mg/l Biotine

Experiment 3: Scheutregeneratie uit wortels voortkomend uit experiment 1

- Materiaal: Wortel van cultures op verschillen suikerconcentratie (zie exp 1). 2 type adventieve wortels, in-vitro vermeerdering en in-vitro beworteling.
- 6 wortelpunten/segmenten per petrischaal.. 3 schalen per behandeling.
- Regeneratiemedium: MS, 3% suiker, 2 mg/l Zeatine, 0.1 mg/l IAA, 2 gr/l gelrite.
- Incubatie bij 20 °C, 12 uur licht.

Resultaten:

Waarnemingen:

- Na t= 7 en 14 en 21 dagen word gekeken of er scheuten al danniet callus structuren zijn verschenen op de wortelplanten.



Opmerking: Na 21 dagen incubatie geen regeneratie. Ook geen callus, "green spots" of iets wat daar op lijkt.

Conclusie:

Op het gebuikte regeneratie medium met een concentratie van 2 mg/l Zeatine vertonen de wortel explantaten afkomstig van de verschillen suiker concentraties van experiment 1 geen regeneratie. Ook geen vorming van callus, "green spots", of andere veranderingen van de structuur van de wortel.

Könst: *Alstroemeria*

Experiment 4: Scheutregeneratie uit wortels van een goed groeiende wortelcultuur.

- Materiaal: goed groeiende wortelcultuur.
- 10 wortelpunten of segmenten per petrischaal.. 3 schalen per behandeling.
- Het medium bevat standaard: MS (Gamborgs B5), 5% suiker, 0.1 mg/l IBA, 2 gr/l gelrite
- Incubatie bij 20 °C, 12 uur licht

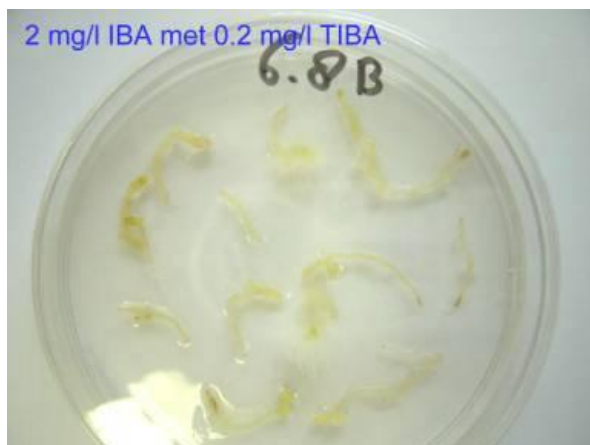
	[] mg/l			
TDZ	0.01	0.05	0.1	
Zeatine	2	4	8	16
IBA	2	4	8	16
NAA	2	4	8	16
24D	2	4	8	16
TIBA	0.06	0.2	0.6	

In totaal 57 behandelingen

Resultaten:

Waarnemingen:

- Na t= 21 dagen word gekeken of er scheuten al dan niet callus structuren zijn verschenen op de wortelxplanten.



Opmerking: Na 21 dagen incubatie geen regeneratie.
Ook geen callus, "green spots" of iets wat daar op lijkt.

Könst: *Alstroemeria*

Conclusie:

De gebruikte hormonen, TDZ, Zeatine, IBA, NAA, 24D in combinatie met TIBA, kunnen geen regeneratie te weeg brengen bij de gebruikte wortels. Niet één behandeling heeft ook maar iets van regeneratie gegeven.

Ook geen vorming van callus, "green spots", of andere veranderingen van de structuur van de wortel.

Experiment 5: Scheutregeneratie uit wortels van zaailingen van verschillende type *Alstroemeria*'s

- Materiaal: Wortel van cultures op verschillen suikerconcentratie (zie exp 1). 2 type adventieve wortels, in-vitro vermeerdering en in-vitro beworteling.
- Materiaal: 340 *Alstroemeria* zaden van verschillende types
- 10 Wortel punten/segmenten per behandeling, 3 schalen per behandeling
- Verschillen [TDZ] in combinatie met verschillen [24-Epibrassinolide]
- Incubatie bij 20 °C, 12 uur licht

	[] mg/l		
TDZ	0.1	0.5	1
24 Epibrassinolide	0.0048	0.0481	0.4808

Resultaten:

Waarnemingen:

- Na t= 21 dagen word gekeken of er scheuten al dan niet callus zijn verschenen op de wortelplantaten.

Resultaat: Na 21 dagen incubatie geen regeneratie.
Ook geen callus, "green spots" of iets wat daar op lijkt.

Conclusie:

De gebruikte hormonen, TDZ in combinatie met 24-Epibrassinolide, kunnen geen regeneratie te weeg brengen bij de gebruikte wortels.

Ook geen vorming van callus, "green spots", of andere veranderingen van de structuur van de wortel.

Algehele Conclusie etiolering:

Könst: Alstroemeria

Met alle in de verschillen proeven gebruikte hormonen en verschillende types explantaten is het ons niet gelukt om planten te regenereren uit wortels van Alstroemeria.

KPHolland, Spathiphyllum & Curcuma

Het onderzoek bestond uit twee delen:
Scheutregeneratie uit wortels van Spathiphyllum
Scheutregeneratie uit wortels van Curcuma.

1. Algemene opzet proeven

- Er werden adventieve wortels gebruikt (6 tot 7 weken oud van Spathiphyllum en 4 tot 6 weken oud van Curcuma)
- Meestal werden 5 wortels per container gebruikt
- 90 ml medium per wavin bakje of 35 ml medium per petrischaal
- 3 tot 5 containers per behandeling
- kweken in het donker

2. Resultaten proeven Spathiphyllum

2.1. Oriënterende proeven Spathiphyllum

- Worteltopjes in of op het medium gaf geen verschil
- Media die in de productie gebruikt worden (o.a. met IBA) lieten zien dat zonder hormoon de meeste lengtegroei optrad.

2.2. Resultaten IBA reeks met 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1 en 3 μM IBA

- Het aantal zijwortels nam toe met de IBA concentratie (1,9 per segment bij 3 μM IBA na 8 weken kweken. De zijwortels waren maximaal 7 mm lang)
- De meeste lengtegroei kwam voor bij de lage concentraties IBA (6 cm)
- In de tweede cyclus was de lengtegroei het grootst bij hormoonloos medium: gemiddeld 3,5 cm in 8 weken. Het aantal zijwortels nam toe met de IBA concentratie: 4,4 zijwortels per segment bij 3 μM IBA.
- Na de derde cyclus werd nog maar 1 zijwortel gevormd per segment bij 3 μM IBA en op hormoonloos was er nog maar 0,75 cm groei per topje. Door kweken bleek dus moeilijk (zie ook 2.7)

2.3. Resultaten hogere IBA concentraties met 0, 1, 3, 10 en 30 μM IBA

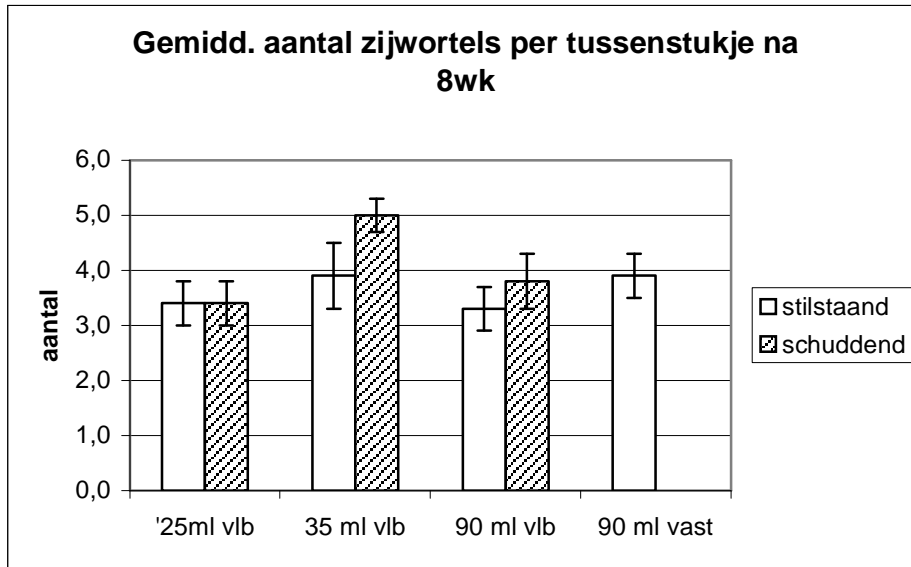
- Meeste zijwortels bij 3 en 10 μM IBA (2,5 resp. 2,2 zijwortels/segment na 9 wk)
- Bij hormoonloos medium de beste lengtegroei van de topjes (3,4 cm in 9 wk) en de langste zijwortels en de minste zijwortels
- hormoonloos medium bleef beste voor lengtegroei topjes in de 2^e cyclus van 7 weken
- Bij 10 en 30 μM IBA gingen 37% van de wortels dood
- 3 μM IBA was het beste.

2.4. Resultaten vloeibaar medium experiment

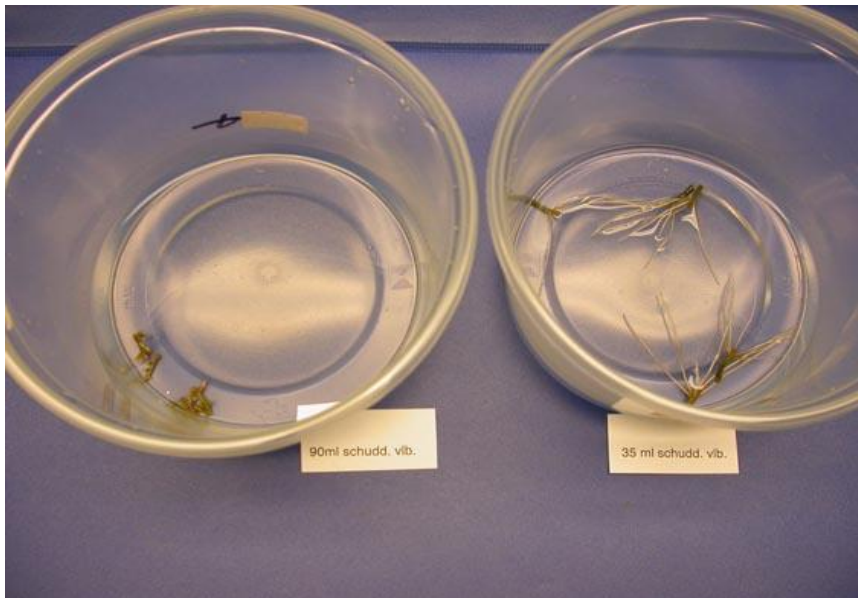
- Doel: is vloeibaar medium beter dan vast medium? Vloeibaar medium schudden of niet? Hoeveelheid vloeibaar medium.
- Bij de topjes werd geen hormoon toegevoegd aan het medium en bij tussenstukjes werd 3 μM IBA toegevoegd aan het medium.

KPHolland, *Spathiphyllum* & Curcuma

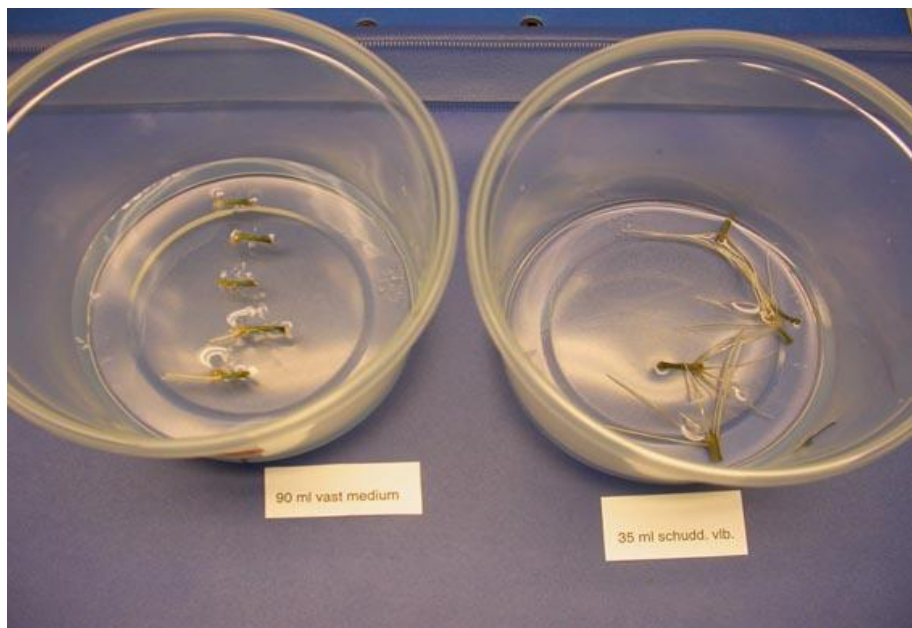
- De meeste en de langste zijwortels werden gevormd in 35 ml schuddend vloeibaar medium met 3 μ M IBA (zie figuur 1, 2 en 3)



Figuur 1 Invloed (hoeveelheid) vloeibaar medium op aantal zijwortels van wortelsegmenten van *Spathiphyllum*

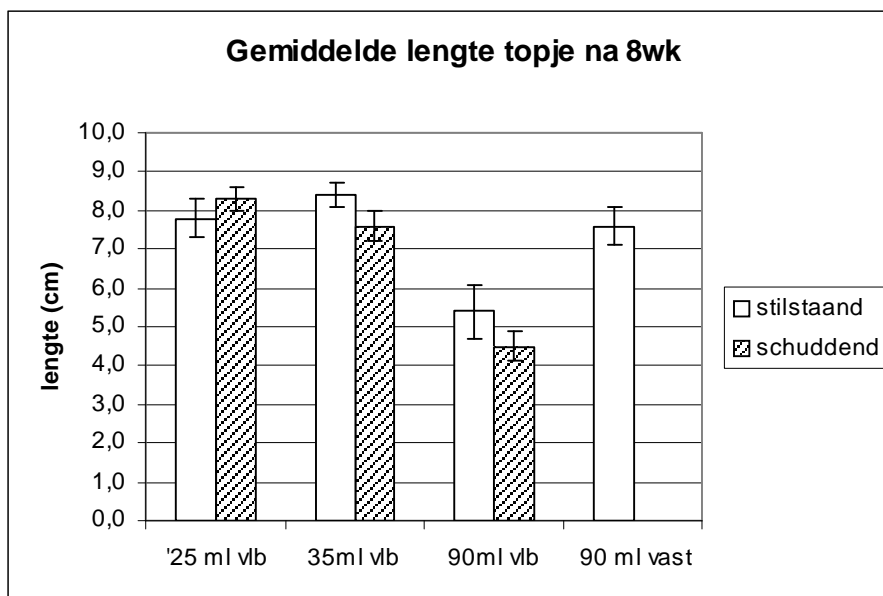


Figuur 2 kortere en minder zijwortels bij 90 ml schuddend vloeibaar medium dan bij 35 ml schuddend vloeibaar medium



Figuur 3 Het verschil tussen zijwortelvorming bij vast medium en vloeibaar medium

- De lengtegroei van worteltopjes was minder in 90 ml vloeibaar hormoonloos medium. Tussen de andere behandelingen waren geen verschillen (zie figuur 4)



Figuur 4 Invloed (hoeveelheid) vloeibaar medium op groei van topjes van wortels van Spathiphyllum

- In tweede cyclus is groei van topjes minder en zijwortelvorming veel minder. Verder kweken van zijwortels is moeilijk.

2.5. Resultaten zoutensamenstelling

- Geen verschil tussen MS, gemodificeerd MS en Gamborg
- MS met extra KNO_3 en WPM gaven minder zijwortelvorming en minder lengtegroei.

2.6. Resultaten overige experimenten om de wortelgroei te verbeteren

De volgende experimenten gaven geen verbetering van de wortelgroei:

- Kweken in licht i.p.v. donker

KPHolland, Spathiphyllum & Curcuma

- Wavin bakje vergeleken met petrischaal
- Caseïnehydrolysaat (0, 3, 10, 30 en 100 mg/l)
- Glutamine en asparagine (0, 1, 3, 10, 30 en 100 mg/l)
- Voorbehandeling van 3 dagen met NAA of IAA (0.05, 0.15, 0.5 mg/l)
- Stukje stengel aan de wortel laten
- 5 of 10 topjes per bakje

In een experiment waarbij 40 topjes per bakje gekweekt werden bleek de groei slechter te zijn dan 10 topjes per bakje (30 ml medium)

Uit een oriënterende proef bleek dat verwondingen maken zijwortels gaf, terwijl niet-verwonden geen zijwortels gaf. Daarom werden er in een uitgebreider experiment verwondingen gemaakt aan een lange worteltop in medium met IBA door pletten met verschillende voorwerpen, segmenten te snijden of de epidermis te verwijderen. De epidermis verwijderen om de 0,5 cm gaf de meeste zijwortel massa. Deze methode is echter te bewerkelijk.

2.7. Doorkweken van de wortels

- Topjes van de twee beste petrischalen van het IBA experiment (0 tot 30 μ M IBA) zijn naar hormoonloos medium overgezet.
- 4 cycli van 5 tot 7 weken doorgekweekt.
- Na elke cyclus viel 25 tot 78% uit (niet gegroeid of dood) en lengtegroei werd steeds minder.
- Tussenstukjes die los gesneden konden worden van de gegroeide topjes vormden niet of nauwelijks zijwortels op medium met 3 of 10 μ M IBA.
- Ook in vloeibaar medium lukte het niet om dit te verbeteren.
- Ook in andere experimenten lukte het niet om door te kweken.

2.8. Regeneratie van scheutjes op de wortels

- Na afloop van proeven werden wortelsegmenten van ± 1 cm overgezet naar regeneratie medium met 10 μ M Zeatine, 10 en 30 μ M 2iP
- Bij 4 proeven ontstonden na 7 tot 10 weken op enkele wortelsegmenten scheutjes op callus
- Scheutjes zijn in kas verder gekweekt. Het slagingspercentage was 90 tot 100%. Er zijn geen afwijkers gevonden.
- Later bleek regeneratie op medium met 0,2 of 1 mg/l TDZ met 0,5 mg/l TIBA meer scheutjes te geven dan op 10 μ M zeatine: 1,2 dotjes per ingezette wortel bij 0,2 TDZ met 0,5 TIBA. Dit is echter nog onvoldoende.



Figuur 5 Links van het pad planten ontstaan uit wortels en rechts is normale productie



Figuur 6 Bloem van *Spathiphyllum* ontstaan uit wortels

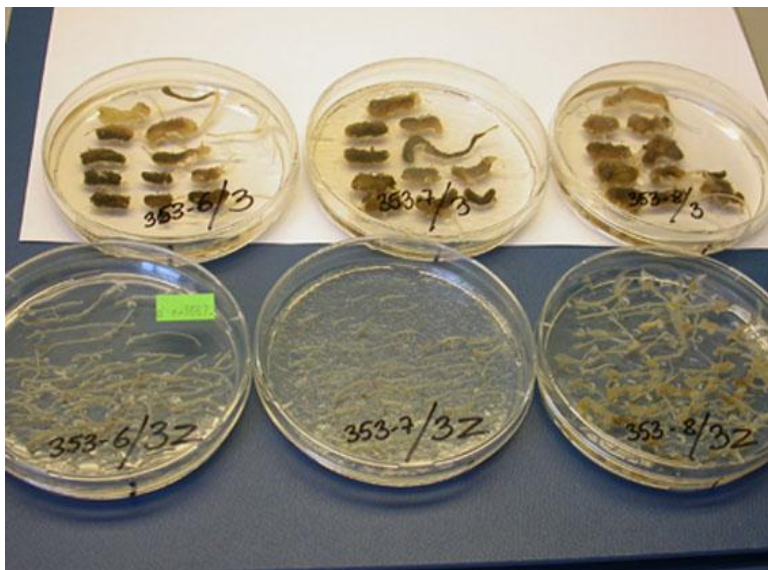
3. Conclusie *Spathiphyllum*

- Beste lengtegroei bij hormoonloos medium (35 ml vloeibaar of 90 ml vast)
- lengte groei traag en verschillend per wortel
- Meeste zijwortelvorming in 35 ml schuddend vloeibaar medium met 3 μ M IBA
- Doorkweken van topjes en tussenstukjes lukte onvoldoende
- Scheutjes sporadisch gevormd op 10 μ M Zeatine en 10 μ M 2iP. Geen afwijkers in kas
- Meer scheutvorming op medium met 0.2 mg/l TDZ en 0,5 mg/l TIBA, maar nog onvoldoende

4. Resultaten proeven wortels kweken van *Curcuma*

4.1. Resultaten IBA reeks: 0, 0,3, 1, 3, 10 en 30 μ M IBA

- Bij de laagste 3 concentraties IBA \pm 7 zijwortels per segment na 8 weken. Bij hoogste 3 concentraties IBA \pm 9 zijwortels per segment. Dunne zijwortels.
- Meer bruine segmenten en callus rond wortel bij de hoogste 3 concentraties
- Langste zijwortels \pm 2cm
- Nauwelijks lengtegroei hoofdwortel (gemiddeld 0,3 cm groei, zelfs bij hormoonloos)
- Na de tweede cyclus was heel veel materiaal bruin. Meer bruine segmenten bij oplopende IBA concentratie.
- Meeste topjes zijn niet gegroeid bij alle media. Sommigen zijn 5 cm gegroeid.
- Lengtegroei losgesneden zijwortels 0 tot 1 cm groei.
- Nauwelijks nieuwe zijwortels
- bij hormoonloos had 50% v d segmenten callus. Hoe meer IBA, hoe meer callus.



Figuur 7 veel callusvorming en veel bruin materiaal bij wortels van *Curcuma*

4.2. Resultaten proef waarin N en P gevarieerd werd

- Geen verbetering. Bij laag N minder lengtegroei
- Groei traag (max 1,5 cm in 8 wk) en dunne zijwortels.

4.3. Resultaten overige experimenten om wortelgroei te verbeteren

De volgende experimenten gaven geen verbetering van de wortelgroei:

- Kweken in licht i.p.v. donker
- Wavin bakje vergeleken met petrischaal
- Lange wortel kweken t.o.v. topje van ± 1 cm
- BAP toevoegen aan medium
- Op of in het medium
- Met KMnO₄ korrels

- Bij alle proeven groeiden slechts enkele topjes.
- Van goed gegroeide topjes werd vaak het ingezette deel bruin.
- Groei top bleef max. 1,5 cm in 8 weken (gemiddeld)
- Op hormoonloos medium al zijwortels, maar erg dun

4.4. Resultaten van scheutjes op wortels op regeneratie medium

- Heel veel bruine segmenten
- Veel callus rond oppervlak wortel, niet op uiteinde van wortel
- Geen scheutjes na 18 weken op 10 en 30 μ M 2iP, 10 en 30 μ M zeatine.

5. Conclusie Curcuma:

- Curcuma vormde op hormoonloos medium al veel dunne zijwortels
- Met 3 μ M of meer IBA meer zijwortels, maar ook ongewenst callus
- na 2 cycli op hormoonloos ook callus
- lengte groei zeer slecht, ook op hormoonloos
- na 2 cycli veel bruine wortels vooral bij hoog IBA
- Geen scheutvorming op regeneratie medium

P+S Plantlab: cymbidium

Project: Weefselkweek in donker.

PT-nummer 11.453.02

Begindatum: 01-04-2003

Einddatum: 23-11-2007

Bedrijf: P+S Plantlab

Projectleider: Ir B. van der Harst

Gewas: Cymbidium

Doel van het project.

Onderzoeken of weefselkweek in donker mogelijk is, met als voordelen energie- en ruimte besparing in de klimaatcellen.

Opzet van het project.

Met subsidie van het Productschap Tuinbouw hebben tien bedrijven en PRI-Wageningen gedurende vier jaar onderzoek gedaan naar weefselkweek in donker met voor de bedrijven belangrijke gewassen.

In gezamenlijke bijeenkomsten, ongeveer zestien in totaal, werd verslag gedaan van de resultaten en werden discussies gevoerd over mogelijke verbeteringen.

P+S Plantlab is gestart om Cymbidium in donker te vermeerderen d.m.v. etiolering.

In een tweede traject is getracht om vermeerdering uit de wortels te verwezenlijken.

Bespreking van de proeven.

1. Etiolering.

Omdat de meeste planten bij groei in donker etioleren is een test gedaan met verschillende concentraties van de groeiremmer Paclobutrazol in het standaardmedium.

Bij toevoegingen van 1 tot 30 micromol PAC had alleen de hoogste concentratie enig effect (minder gewicht na 17 weken).

De vermeerdering was met Paclobutrazol wisselvallig: voor twee cultivars slechter, voor een derde iets beter. Conclusie was dat groeiremmers voor Cymbidium niet zinvol zijn.

Vervolgens is een proef gedaan met 1 mg/l BAP in het standaardmedium.

Het is mogelijk om Cymbidiumplanten in het donker te vermeerderen. De toevoeging van BAP heeft daarbij een positief effect, maar geeft bij één van de vier cultivars afwijkende planten.

De langzame groei van Cymbidium heeft tot gevolg dat pas na drie jaar de bloeiende planten beoordeeld kunnen worden.



2. Wortelcultures.

In de eerste plaats is getracht om de wortels in donker goed te laten groeien om ze vervolgens te vermeerderen en te regenereren.

In het standaard MS-medium zijn de volgende variaties beproefd:

- Verschillende suikerconcentraties van 1 tot 6%, 2 of 3% lijkt optimaal.
- Verschillende zoutconcentraties van 1/3 tot 4/3 MS, 2/3 MS is de beste concentratie.
- Verschillende concentraties auxine zoals IAA, IBA en NAA. IBA-gehalten van 2,0-3,0 en 5,0 mg/l geven de beste resultaten.
- Verlaagd fosfaatgehalte (0,1 mMol) heeft positief effect op de wortelgroei.
- Biotine 1,0 mg/l geeft iets betere groei.
- Vloeibaar ½ MS-medium stationair en op schudder geeft minder groei dan op vaste bodem, ook een proef met eb- en vloedsysteem in RITA's is geen succes.
- Toevoeging van 2 g/l actieve kool geeft in donker slechtere groei.
- Wortelstukjes van de plant groeien vooral aan de uiteinden, de middenstukjes doen in de meeste gevallen niets.

Tenslotte is het met een MS-medium met laag fosfaatgehalte en 5,0 mg/l IBA gelukt om voor drie van de vier cultivars wortelgroei met zijwortels te verkrijgen.



Om de verkregen wortels te regenereren is een serie media bereid met de cytokinines BAP, 2-IP, TDZ in verschillende concentraties samen met de auxines IAA en IBA.

Naast de gekweekte wortelstukjes zijn ook verse wortelstukjes direct van de plant gesneden en op deze media ingezet.

Met geen van beide soorten wortelstukjes is het gelukt om regeneratie te verkrijgen.

Conclusies.

1. Cymbidium is in donker te vermeerderen, waarbij de toevoeging van 1.0 mg/l BAP de opbrengst verhoogt.

Bij het gebruik van BAP is er kans op mutaties, die zich pas na drie jaar openbaren.

Daar de energiekosten slechts een klein deel vormen van de prijs van Cymbidiumplantjes is de noodzaak van weefselkweek in donker niet duidelijk aanwezig.

2. Ondanks de vele proeven en adviezen uit de bijeenkomsten is het niet gelukt om uit Cymbidiumwortelstukjes nieuwe planten te verkrijgen.

Projecttitel: Weefselkweek in het donker
Projectnummer PT: 11.453.03
Intern projectnummer: 39.154
Projectleider: Michiel van Bennekom (M.van.Bennekom@stbw.nl)
Bedrijfsgegevens: SBW International BV
Sotaweg 29, 2371 GA, Roelofarendsveen
071 3314900

1. Inleiding

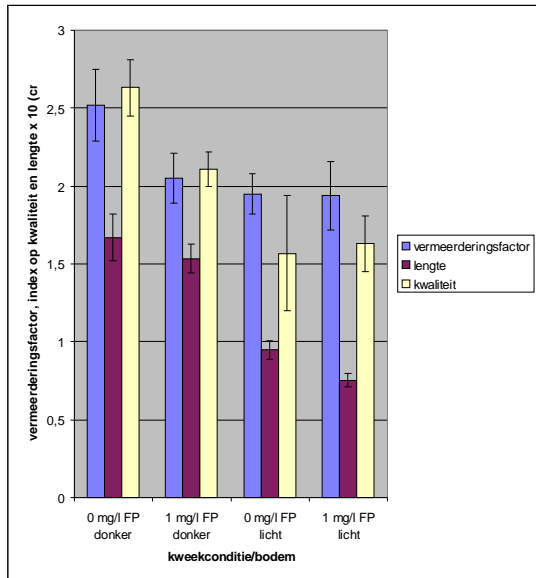
Als deelnemer aan het project "Weefselkweek in het donker" heeft SBW gewerkt aan zowel het etiolerings- als het wortelgroeigedeelte van dit project. Met betrekking tot de wortelcultures is gewerkt aan de gewassen *Eryngium* en *Gerbera*. Voor het etioleringsgedeelte is gewerkt aan de gewassen *Curcuma*, *Phalaenopsis* en *Zantedeschia*. In dit verslag worden per gedeelte en gewas de resultaten gerapporteerd.

2. Etiolering

Het doel van het etioleringsgedeelte was het effect na te gaan van permanente donkeromstandigheden op gewas en bestaande weefselkweekprocedures. Hiertoe zijn een aantal model gewassen in het donker geplaatst en gevolgd op hun ontwikkeling. Aan de hand van de reactie op de donkeromstandigheden zijn diverse aanpassingen aan de media gedaan ten einde een normale groeiwijze te verkrijgen. Per gewas zal dit nader toegelicht worden.

2.1 *Curcuma*

De eerste test met *Curcuma* omvatte het nagaan van de gevolgen van donkeromstandigheden ten opzichte van die in het licht. Hiertoe is het materiaal op het standaard vermeerderingsmedium gezet, bestaande uit MS zouten, 13,3 µM BAP en 30 g/l sucrose, aangevuld met de groeiremmers flurprimidol om de van nature aanwezige uitgroei te remmen. Het materiaal is bij 24°C geplaatst, en gedurende drie cycli gevolgd op ontwikkeling. Figuur 1 geeft de gemiddelde resultaten over drie cycli grafisch weer.



Figuur 1: Gemiddelde van drie cycli *Curcuma*, in het licht en in het donker; kwaliteitscijfer 1 – 5, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.

Vermeerdering van *Curcuma* in het donker blijkt mogelijk. Wel zijn planten gekweekt in het donker beduidend langer (significant) dan die in het licht. Door toevoeging van Flurprimidol wordt de lengtegroei gereduceerd echter nog onvoldoende voor een goede handelbaarheid.

Vervolgonderzoek is gericht op het verhogen van de concentratie flurprimidol en het toetsen van een tweede groeiremmer paclobutrazol. Uit experimenten is gebleken dat paclobutrazol minder effectief is als groeiremmer voor het gewas *Curcuma*. Het verhogen van de flurprimidol concentratie heeft tot een verdere scheutreductie geleid. Foto's 1 en 2 geven een indruk van de scheutreductie.



Foto 1. Scheutreductie *Curcuma* bij gebruik van 3.2 µM flurprimidol.



Foto 2. Scheutreductie *Curcuma* bij gebruik van 9.6 µM flurprimidol.

Ter controle op doorgroei zijn van de diverse behandelingen planten beworteld onder lichtomstandigheden. Foto's 3 en 4 geven een indruk van de uitgroei en beworteling.



Foto 3. Uitgroeit Curcuma in het licht, afkomstig van 3.2 µM flurprimidol.



Foto 4. Uitgroeit Curcuma in het licht, afkomstig van 9.6 µM flurprimidol.

Het bewortelingspercentage behaald de 100 procent en de kwaliteit is goed. De planten die gekweekt zijn in het donker blijven korter na bewortelen dan degene die in het licht gekweekt zijn. Het materiaal is ter bepaling van de soortechtheid afgehard. In de doorgroeit van het materiaal in de kas zijn geen groei- of bloeiafwijkingen geconstateerd.

2.2 *Phalaenopsis*

De eerste test met *Phalaenopsis* omvatte het nagaan van de gevolgen van donkeromstandigheden ten opzichte van die in het licht. Hiertoe is het materiaal op het standaard vermeerderingsmedium gezet, bestaande uit Gamborg B5 macro, MS micro, 46.5 µM kinetine en 30 g sucrose. Het materiaal is bij 24°C geplaatst, en gedurende 3 cycli gevolgd op ontwikkeling. Foto's 5 en 6 geven een indruk van de ontwikkeling van het plantmateriaal.



Foto 5. Uitgroeit plantmateriaal na de eerste cyclus donker.



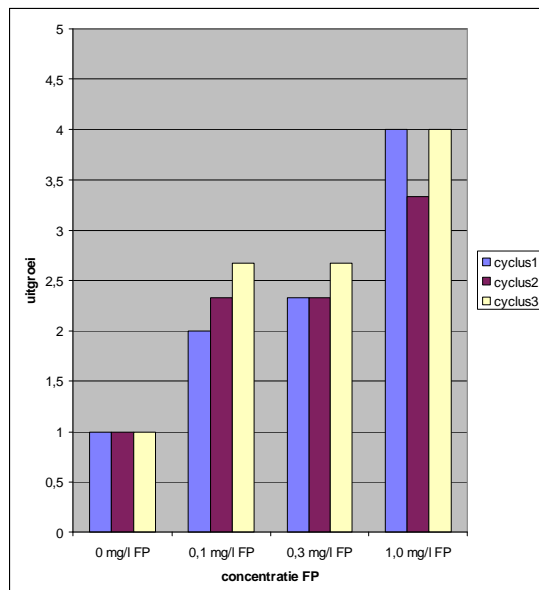
Foto 6. Uitgroeit plantmateriaal na de derde cyclus donker.

Vermeerdering van *Phalaenopsis* in het donker heeft geleid tot onderontwikkelde scheuten die glazigheid vertonen. Tevens loopt de vermeerdering terug. Vervolgonderzoek is gericht op het verkrijgen van normaal ontwikkelende planten.

Hiertoe zijn verschillende zouten en hormoonconcentraties getest, echter wederom heeft dit tot gereduceerde bladgroei geleid. Tevens neemt de kwaliteit sterk af naar mate het materiaal langer in het donker staat en treedt er spontane sterfte van het materiaal op. De opzet om tot normale planten in het donker te komen is dus niet geslaagd. Om deze reden is het onderzoek gestaakt.

2.3 *Zantedeschia*

De eerste test met *Zantedeschia* omvatte het nagaan van de gevolgen van donkeromstandigheden ten opzichte van die in het licht. Hiertoe is het materiaal op het standaard vermeerderingsmedium gezet, bestaande uit MS zouten, 2,2 µM BAP en 30 g/l sucrose. Om de verwachte strekking als gevolg van de donkercultuur tegen te gaan zijn verschillende concentraties flurprimidol toegevoegd. Het materiaal is bij 19°C geplaatst, en gedurende 3 cycli gevolgd op ontwikkeling. Figuur 2 geeft de gemiddelde resultaten van de donkercultuur grafisch weer.



Figuur 2: Uitgroei *Zantedeschia* onder invloed van verschillende concentraties flurprimidol gedurende 3 cycli in het donker; kwaliteitscijfer waarbij 1 = veel en 5 is geen uitgroei.

Het toevoegen van flurprimidol aan de vermeerdering blijkt voor een reductie van de scheutlengte te zorgen. Er zijn geen verschillen in vermeerderingsfactor en de kwaliteit gevonden tussen de verschillende behandelingen. Het materiaal afkomstig van flurprimidol is steviger ten opzichte van de controle. Foto's 7, 8, 9 en 10 geven een indruk van het plantmateriaal na drie cycli donker.



Foto 7. Scheutgroei *Zantedeschia* bij geen gebruik flurprimidol.

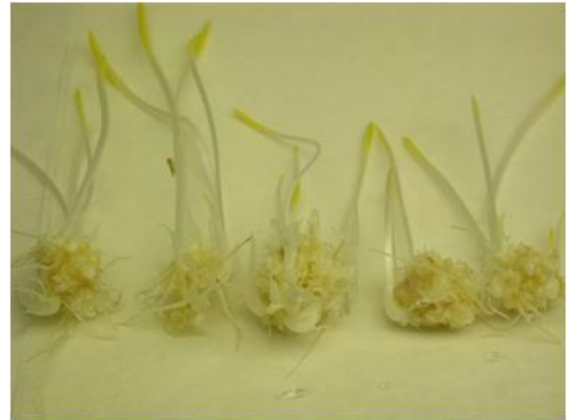


Foto 8. Scheutreductie *Zantedeschia* bij gebruik van 0.32 μ M flurprimidol.

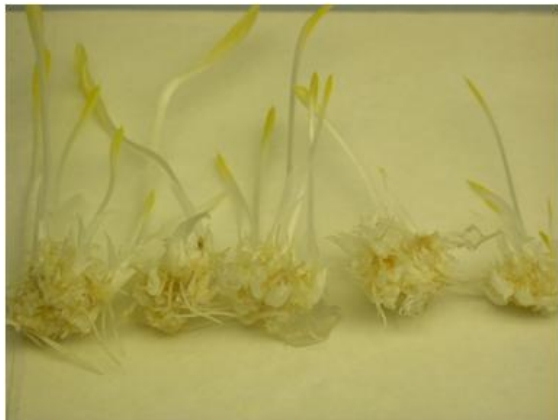


Foto 9. Scheutreductie *Zantedeschia* bij gebruik van 1.0 μ M flurprimidol.



Foto 10. Scheutreductie *Zantedeschia* bij gebruik van 3.2 μ M flurprimidol.

Om na te gaan of het proefmateriaal bewortelt en of de behandeling met Flurprimidol effect heeft op de doorgroei van het materiaal is een vervolproef naar de beworteling ingezet. Hierbij zijn twee benaderingen gevolgd, te weten directe beworteling vanuit de donkervermeerdering en een laatste fase vermeerdering zonder flurprimidol waarna het materiaal op beworteling gezet is.

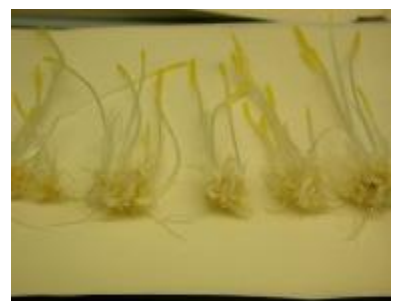
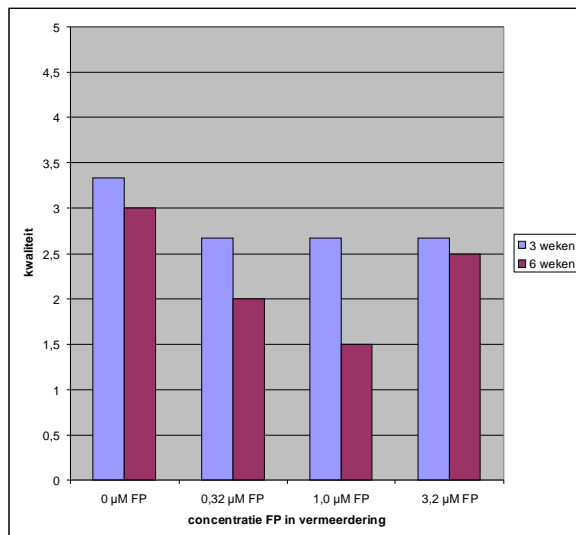


Foto 11. Controle, uitgroei in donker zonder flurprimidol

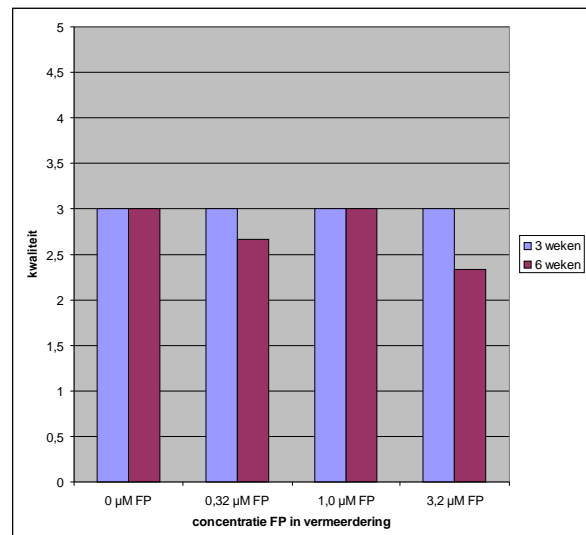
Foto 12. Vermeerdering met 3.2 μM flurprimidol

Foto 13. Uitgroei van vermeerderingsmateriaal afkomstig van 3.2 μM flurprimidol

Het is gebleken dat het toepassen van een laatste fase vermeerderingsmedium zonder groeiremmer voor normale uitgroei zorgt. Wanneer materiaal beworteld wordt is er geen verschil in bewortelingspercentage tussen materiaal afkomstig van medium met of zonder groeiremmer in de laatste fase. Wel blijkt het materiaal afkomstig van flurprimidol beter door te groeien en beter van kwaliteit te zijn dat het materiaal afkomstig van een laatste fase zonder groeiremmer. De plantkwaliteit wordt in onderstaande figuren weergegeven.



Figuur 3. Plantkwaliteit directe beworteling *Zantedeschia* onder invloed van verschillende concentraties flurprimidol, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.



Figuur 4. Plantkwaliteit beworteling *Zantedeschia* na laatste fase zonder flurprimidol, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.

Ter beoordeling op de doorgroei in de kas is het materiaal afgehard. Hier is gebleken dat materiaal dat een laatste fase uitgroei gehad heeft gelijkmatiger weggroeit in de kas. Uit het opplanten in de kas zijn, na doorgroei, geen significante verschillen geconstateerd tussen materiaal afkomstig van flurprimidol of van het controlemiddel.

Ter verbetering van de plantkwaliteit is er gekeken naar de elementinhoud van kasgekweekt materiaal ten opzichte van dat in weefselweek. Onderstaande tabel (tabel 1.) geeft een overzicht van de elementinhoud van *Zantedeschia* van verschillende herkomsten.

Tabel 1. Elementinhoud *Zantedeschia* materiaal afkomstig van controlemedium in het licht, van 1.0 µM flurprimidol uit het donker en kasgekweekte T1 bolletjes.

monster nr.	N mmol/kg	Cl mmo/kg	B mg/kg	Ca mmol/kg	Cu mg/kg	Fe mg/kg	K mmol/kg	Mg mmol/kg	Mn mg/kg	Na mmol/kg	P mmol/kg	S mmol/kg	Zn mg/kg
irheidsgrens	80			12	7,5	33	30	0,9	6	2,1	9	1,5	18
Controle	4005	189	30	138	3	145	1031	55	229	40	148	71	64
Donker	5445	----	39	120	1	135	1321	56	169	52	170	77	68
Kas	1835	190	11	156	7	107	695	120	45	95	105	68	58

Op basis van de elementanalyse zijn diverse variaties in elementgift aangebracht waarbij het medium voor het weefselkweekmateriaal aangepast is naar de resultaten van het kasmateriaal . Hieruit zijn geen significante verschillen in plantkwaliteit uitgekomen. De noodzaak om het standaardmedium hierop aan te passen is dus niet nodig gebleken.

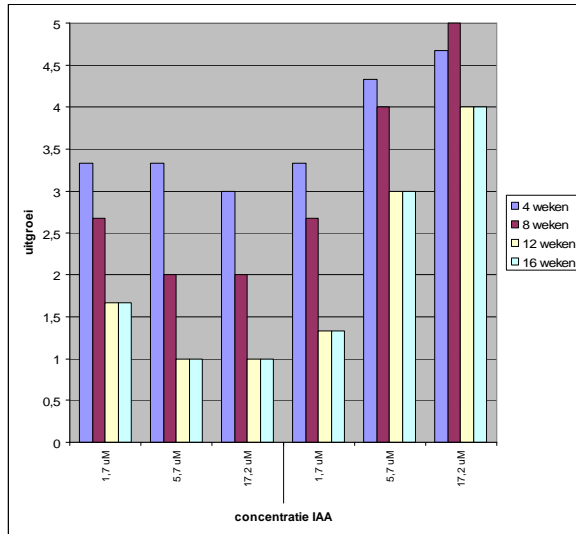
3. Wortelcultures

Het doel van het wortelgroeigedeelte was tweeledig. Wortels moeten na isolatie van de scheut kunnen doorgroeien en aan geïsoleerde wortels moet opnieuw scheutjes via regeneratie verkregen kunnen worden. Hiertoe zijn gewassen beworteld en wortelstukjes losgesneden om ze vervolgens op medium in het donker te plaatsen ter doorvermeerdering. Aan de hand van de reactie op de donkeromstandigheden zijn diverse aanpassingen gedaan ten einde een normale groei te verkrijgen. Voor het regeneratiegedeelte zijn wortelstukjes op diverse media geplaatst en zijn er aanpassingen gedaan om regeneratie te laten plaatsvinden en met een voldoende hoog percentage ontwikkelde scheutjes. Per gewas zullen beide benaderingen nader toegelicht worden.

3.1 *Eryngium*

3.1.1 Wortelcultures

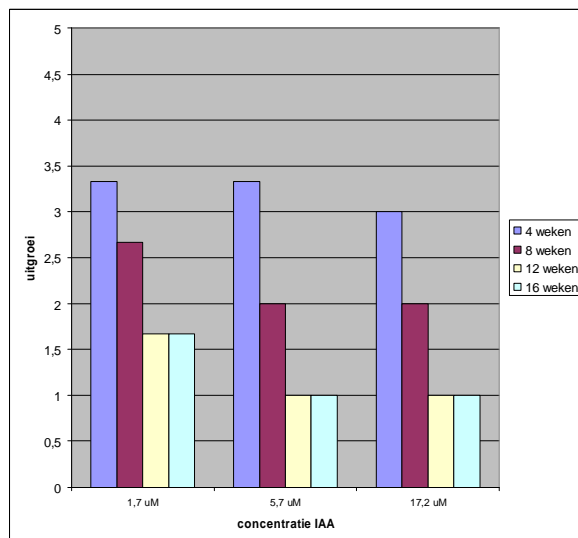
De eerste test met *Eryngium* omvatte het nagaan van de gevolgen van het lossnijden van wortels afkomstig van bewortelde planten en de controle op doorgroei. Hiertoe is het materiaal op het standaard vermeerderingsmedium gezet, bestaande uit MS zouten, 2,2 µM BAP en 30 g/l sucrose. Dit heeft tot een zeer beperkte uitgroei geleid, uiteindelijk resulterend in sterfte van het wortelmateriaal. Op basis van literatuur over wortelcultures van *Cyclaam* en resultaten uit de projectcommissie met wortelcultures van het gewas *Limonium* zijn nieuwe aanwijzingen verkregen. Voor beide gewassen is beschreven en voor *Limonium* binnen SBW ook getest dat geïsoleerde wortels goed doorgroeien op vloeibaar medium. Op basis hiervan zijn vervolgprouven met *Eryngium* ingezet. Het basismedium voor *Eryngium* is aangepast naar vloeibaar MS medium met een concentratiereeks IAA. In deze proeven is naast het effect van de concentratie IAA ook naar de cyclusduur (4 of 6 weken) en het stilstaan of het schudden van de cultuur gekeken. Het is gebleken dat het materiaal zich op een schudder beter ontwikkeld dan wanneer het stilstaat. Dit wordt in figuur 5 grafisch weergegeven en foto 14 geeft een indruk van het zich ontwikkelende materiaal.



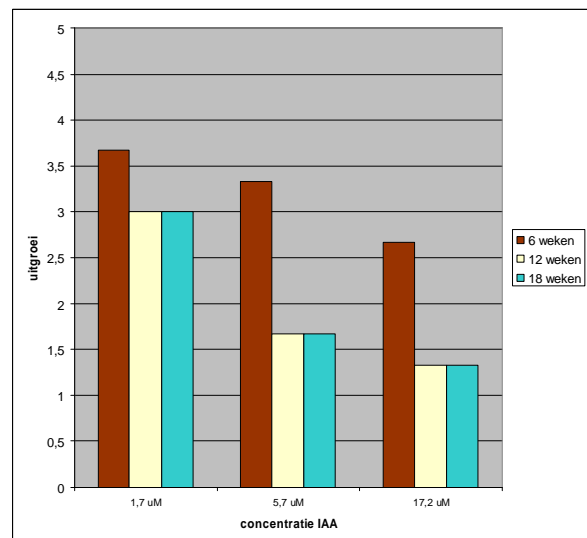
Figuur 5. Uitgroeï van Eryngiumwortels op drie concentraties IAA, schuddend (links) en stilstaand (rechts) medium, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.

Foto 14. Uitgroeï Eryngiumwortels op vloeibaar MS medium met 5.7 µM IAA.

Verder is gebleken dat het aanhouden van een 4 weekse cyclus voor een betere doorgroeï zorgt dan wanneer een cyclusduur van 6 weken aangehouden wordt (figuren 6 en 7).

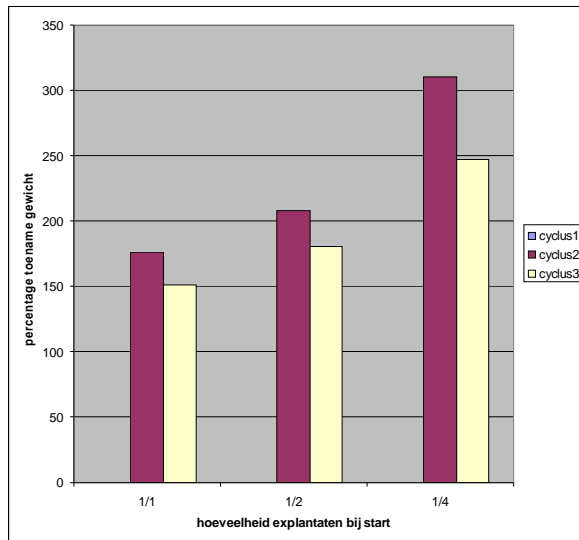


Figuur 6. Uitgroeï van Eryngiumwortels op drie concentraties IAA gedurende een 4 weekse cyclus, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.



Figuur 7. Uitgroeï van Eryngiumwortels op drie concentraties IAA gedurende een 6 weekse cyclus, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.

Omdat er aanwijzingen waren dat het wortelvolumen toeneemt naar mate er meer biomassa bij de aanvang van de kweek gebruikt wordt is een vervolgonderzoek gestart waarin gekeken is naar het gewichtstoename ten opzichte van verschillende startgewichten. Hieruit is gebleken dat het startgewicht van 2 gram voor het hoogste percentage toename in gewicht. In Figuur 8 wordt dit grafisch weergegeven.



Figuur 8. Percentage gewichtstoename ten opzichte van startgewicht van *Eryngium*wortels, waarbij 1/4 overeenkomt met 2 g startgewicht.

3.1.2 Regeneratie

Naast de proeven naar de vermeerdering via wortelcultures zijn er experimenten gedaan waarin de mogelijkheid van regeneratie aan wortels nagegaan wordt. Dit is nodig om vanuit wortelstukjes opnieuw planten te verkrijgen welke ook soortecht blijken. Hiervoor zijn twee benaderingen gevolgd, te weten vast en vloeibaar medium met combinaties van auxine en cytokinine. De hiervoor gebruikte wortelstukjes zijn afkomstig van bewortelde planten.

Voor *Eryngium* geldt dat vast medium een beter resultaat geeft ten opzichte van vloeibaar. Verder blijken korte wortelstukjes een kwalitatief beter plantje te geven. Vaak is dit ook een enkel plantje ten opzichte van een bosje bij grotere wortelstukjes. Voordeel hierbij kan het direct uitplanten zijn zonder dat het materiaal eerst verspeend dient te worden.

Op basis van de eerste regeneratie experimenten is een vervolgonderzoek ingezet waarin de twee beste regeneratiemediën zijn meegenomen. In dit experiment is er gekeken naar het aantal explantaten per kweekeenheid. Uit dit experiment is gebleken dat de meeste regeneratie optreedt op MS medium met 8.9 µM BAP en 1.3 µM NAA. Verder blijkt een teveel aan wortelstukjes tot een verminderde regeneratie te leiden. Foto's 15, 16, 17 en 18 illustreren dit.



Foto 15. Regeneratie Eryngium, 25 explantaten.



Foto 16. Regeneratie Eryngium, 50 explantaten.



Foto 17. Regeneratie Eryngium, 75 explantaten.



Foto 18. Regeneratie Eryngium, 100 explantaten.

Regeneratie ligt rond de 15% van het aantal ingezette wortelstukjes. Dit percentage is wellicht te verhogen echter in dit project niet meer uitgevoerd wegens het aflopen van de projectduur.

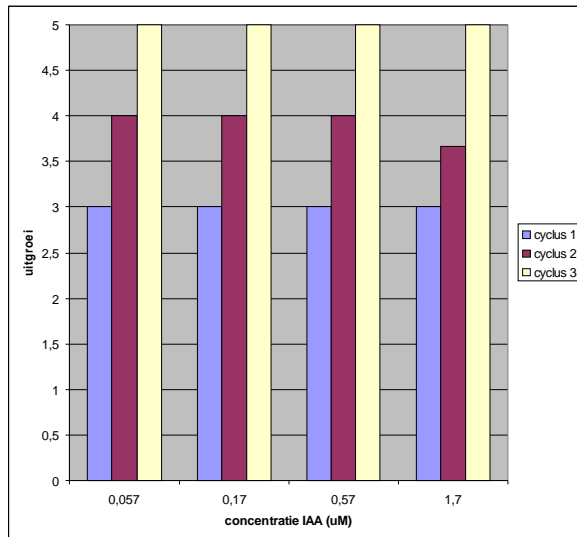
3.2 Gerbera

3.2.1 Wortelcultures

De eerste test het Gerbera omvatte het nagaan van de gevolgen van het lossnijden van wortels afkomstig van bewortelde planten en de controle op doorgroei. Hiertoe is het materiaal op het standaard vermeerderingsmedium gezet, bestaande uit $\frac{1}{2}$ MS zouten, 2,2 μM BAP en 30 g/l sucrose. Dit heeft niet tot uitgroei maar tot sterfte van het materiaal geleid.

Op basis van de resultaten met Eryngium is deze benadering ook voor Gerbera gevolgd. Het basismedium is vloeibaar MS medium met een concentratiereeks IAA getest. In deze proeven is naast het effect van de concentratie IAA ook naar de cycluseduur (4 of 6 weken) en het stilstaan of het schudden van de cultuur gekeken. De met Gerbera ingezette proeven laten veel minder uitgroei zien ten opzichte van Eryngium. De meeste uitgroei vindt plaats op medium met 1,7 μM IAA, echter is

deze uitgroei minimaal. Figuur 9 geeft de uitgroei grafisch weer en foto 19 geeft een indruk van het materiaal. Verder lijkt ook hier schuddend medium een betere uitgroei te geven dan wanneer de cultuur stilstaat. Doordat er nauwelijks uitgroei optreedt is er over de beste cyclusduur niets te zeggen.



Figuur 9. Uitgroei Gerberawortels gedurende drie cycli, waarbij 1 = goed en 5 = slecht.



Foto 19. Uitgroei Gerberawortels op vloeibaar MS medium met 1.7 µM IAA.

Naar aanleiding van deze resultaten zijn nieuwe proeven ingezet, waarbij er opnieuw naar de concentratiereeks IAA gekeken is, nu naar lagere concentraties ten opzichte van het vorige beschreven experiment aangezien hier een afname in uitgroei bij toenemende auxineconcentratie gevonden is. Daarnaast is een experiment uitgevoerd naar het aanpassen het medium, met variatie in suikerconcentratie en de toevoeging van kinetine, met als doel tot een betere doorgroei en kwaliteit te komen. Gedurende de eerste cyclus leek een lagere concentraties IAA voor een goede uitgroei te zorgen, echter was dit niet beter dan het controlemedium. Het experiment waarin variaties in het basismedium zijn aangebracht heeft geen onderlinge verschillen laten zien. De uitgroei is wel minder gebleken ten opzichte van de proef met de auxinereeks. Beide proeven hebben uiteindelijk niet geleid tot een betere doorgroei van Gerberawortels.

3.2.2 Regeneratie

Naast de vermeerderingsproeven zijn er experimenten gedaan waarin de mogelijkheid van regeneratie aan wortels nagegaan is. Een eerste proef op basis van standaard regeneratiemedia heeft alleen tot callusvorming geleid. Hierop is de benadering van *Eryngium* toegepast. De proef naar vast en vloeibaar medium heeft wederom tot callusvorming geleid; regeneratie is niet waargenomen. Wel bleek materiaal op vast medium van een betere kwaliteit.

SBW: Curcuma, Phalaenopsis, Zantedeschia, Limonium, Eryngium, Gerbera

Als vervolg op het regeneratieonderzoek is een proef op vast medium ingezet waarin naar de combinatie van BAP en NAA in matrixverband gekeken is. Ook dit heeft niet tot de gewenste regeneratie geleid. Bij geen of weinig hormoon treedt geen reactie op terwijl de hoge doses alleen tot callusvorming leidt. Daarbij wordt ook zijwortelvorming waargenomen.

4. Conclusies

4.1 Etiolering

Het protocol voor de donkervermeerdering van *Zantedeschia* is opgesteld. Dit gewas is reeds meerdere jaren in volledig donkeromstandigheden doorvermeerderd. Wat betreft soortechtheid, hier is nog geen feedback over ontvangen.

Het protocol voor de donkervermeerdering van *Curcuma* is opgesteld. Wel blijft de scheutlengte aanzienlijk en zou verder gereduceerd moeten worden. Dit gewas is een jaar in het donker geproduceerd voordat een proefpartij uitgeleverd is. Het uitgeleverde materiaal heeft geen afwijkingen vertoond in opkweek in de kas en is dus soortecht bevonden.

Met het gewas *Phalaenopsis* is het niet geslaagd een donkerprotocol te ontwikkelen. De kwaliteitsproblemen als gevolg van de donkerteelt zijn te groot om tot goed plantmateriaal te komen.

4.2 Wortelcultures

De vermeerdering van *Eryngium* via wortelcultures is mogelijk. Ook regeneratie geeft plantjes aan de gekweekte wortels. Deze zijn af te harden, echter is er geen feedback ontvangen over de doorgroei en soortechtheid. Om het protocol productiewaardig te krijgen zal het regeneratiepercentage verhoogd moeten worden.

De vermeerdering van *Gerbera* via wortelcultures is niet geslaagd. Er treedt nauwelijks uitgroei op. Ook de regeneratie aan de wortelstukjes is in dit onderzoek niet mogelijk gebleken. Hier treedt alleen callusvorming op.

4.3 Grafische weergave resultaten

Tabel 2 geeft een grafische weergave van de vorderingen van de donkerprotocollen bij de verschillende gewassen. In de tabel is ook het gewas *Limonium* opgenomen. Dit betreft geen officieel onderzoeksgewas binnen het SBW gedeelte van het project, echter is het wel zijdelings meegenomen om ervaring mee op te doen. Om deze reden is het in de tabel opgenomen.

Tabel 2. Grafische weergave van het ontwikkelingsstadium van het donkerprotocol van de diverse geteste gewassen.

	Vermeerdering		Beworteling		Soortechtheid	
Curcuma	██████████		██████████		██████████	
Phalaenopsis	████					
Zantedeschia	██████████		██████████			
Limonium	██████████		██████████			
Eryngium	██████████		██████████			
Gerbera	████					

5. Urenoverzicht Donkerproject

In tabel 3 is de urenbesteding gedurende de projectduur weergegeven. Deze uren zijn per jaar en voor het gehele project getotaliseerd.

Tabel 3. Urenoverzicht donkerproject SBW International BV per jaar en eindtotaal.

2003	2004	2005	2006	2007	totaal
148,10	253,00	284,67	164,50	96,25	946,52

Michiel van Bennekom, januari 2008.

SBW: *Curcuma*, *Phalaenopsis*, *Zantedeschia*, *Limonium*, *Eryngium*, *Gerbera*

Projecttitel:

Weefselweekvermeerdering van Scaevola en Primula acaulis in het donker.

Wiert van der Meer, 27 december 2007

Gewaskeuze



Scaevola is een vegetatief vermeerderd gewas (stekproductie) wat via vitro vermeerdering wordt instandgehouden en opgeschaald door middel van oogstekcultures. De vermeerderingsfactor van dit gewas is nogal eens aan de lage kant waardoor een verhoging gewenst is bij een aantal genotypen. Primula acaulis is een zaadvermeerderd gewas (F1 produkt), waarbij de ouderlijnen middels weefselweekkloning worden vermeerderd en instandgehouden. Hierbij wordt axillaire vermeerdering toegepast wat soms leidt tot lage vermeerderingsfactoren. Het kan echter ook leiden tot ongewenste vorming van adventieve scheuten of bossigheid door te snelle ontwikkeling van axillaire scheuten.

Doel

Het doel is om beide gewassen middels een oogstekvermeerdering in het donker te vermeerderen om een hogere vermeerderingsfactor en betrouwbare scheutproductie te verkrijgen. Oogstekvermeerdering is eenvoudiger (veelal efficiënter) dan axillaire scheutvorming en leidt over het algemeen niet tot afwijkende scheutvormen of bossigheid. De vereenvoudigde snijmethode zal ook kunnen leiden tot lagere kosten voor instandhouding en vermeerdering.

Opzet

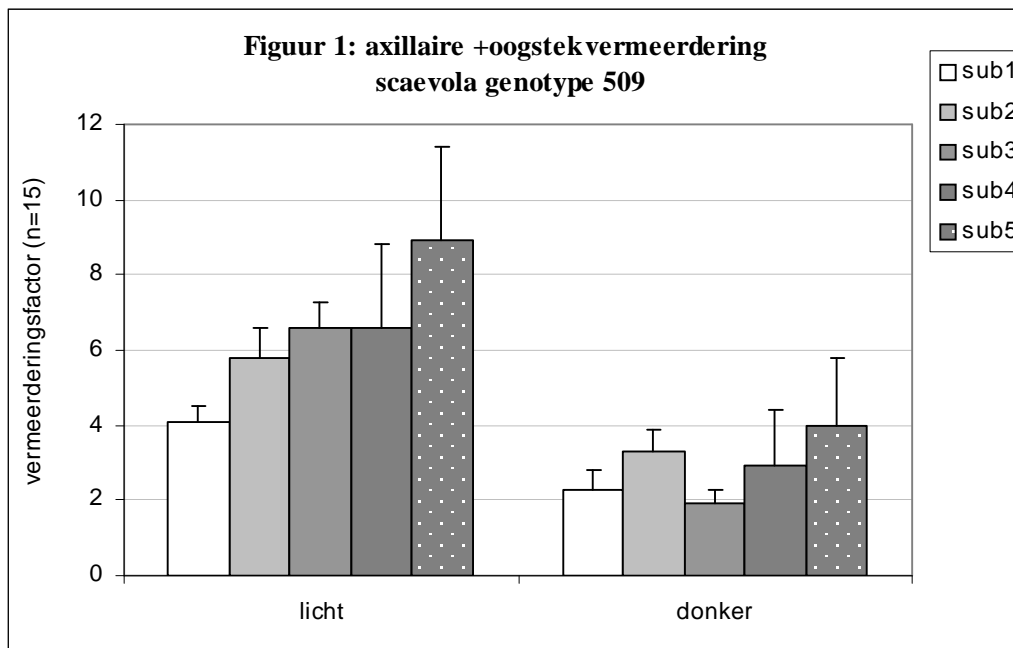
Na enige verkennende experimenten betreffende concentraties van strekkingsremmers zijn deze in vermeerderingsmedia getest. De subcultuurtijd is op 7 weken gehouden voor beide gewassen. De donker varianten zijn geplaatst in een kleine klimaatcel unit (zgn Van den Berg kast) waarbij de temperatuur gelijk is ingesteld als bij de controle grotere klimaatcel. Kleine milieu verschillen zijn echter aanwezig tgv de schaal en ventilatie van beide ruimten.

Resultaten

Scaevola media

Van een 2-tal genotypen zijn gedurende een 5-tal subcultures de vermeerderingsfactoren bepaald bij cultures in het licht en in het donker. Het gebruikte medium bestaat uit MS zouten met 30g/l sucrose en als groeiregulators Kinetine (2mg/l) en IAA (0.5mg/l). Als strekkingsremmer is paclobutrazol gebruikt in een concentratie van 0.3mg/l. In het vervolg wordt dit protocol aangeduid als het standaardprotocol. Zie voor vermeerderingsfactoren figuur 1.

De conclusie hieruit is dat weliswaar de vermeerdering in het donker gedurende een periode van 9 maanden plaatsvindt, maar significant lager is dan de controlebehandeling die in het licht wordt uitgevoerd. Er lijkt echter een “gewenningsproces” op te treden waardoor in de tijd er enige progressie in de vermeerdering lijkt op te treden. De eerste resultaten met sterk gewijzigde mediumsamenstelling met name in hoeveelheid en samenstelling van de stikstof laat nog geen verbetering van de groei zien. Wijzigen van de suikerbron van sucrose naar trehalose biedt geen perspectief.



Deze cultures zijn vervolgens een 10 tal subcultures volgens het standaardprotocol vermeerderd omdat een opgaande lijn in de vermeerdering aanwezig leek.

De conclusie hieruit is dat de vermeerdering niet toeneemt naarmate er langer in het donker wordt vermeerderd, terwijl er in eerste instantie wel een gewenningsreactie leek te bestaan. De vermeerderingsfactor blijft echter steken op gemiddeld 50% van de factoren gehaald in het licht. (zie figuur 2, donkere balken geven gemiddelde vijf keer).

Dit treedt op voor beide gebruikte genotypen.

Wanneer de hoeveelheid gebruikte hormonen wordt verhoogd dmv een concentratiereeks cytokinine (BA) treedt een sterke toename van de vermeerdering op. (Fig.3) Hierbij treedt echter ook callusgroei op alsmede de vorming van adventieve scheuten. Of dit toch een bruikbare begaanbare weg is zal moeten worden aangetoond door beoordeling van de habitus van de op deze wijze vermeerderde planten op vivo-nivo. Wijzigen van de zoutensamenstelling van het medium door

Syngenta: Scaevola en Primula

verlaging van de hoeveelheid zouten tot 1/2MS. Echter waarbij de stikstof is verlaagd tot 20% en de Calcium concentratie is verdubbeld. Dit leidt echter niet tot een betere groei en vermindering van de optredende verbruining na een 3-tal subcultures (Fig.4)

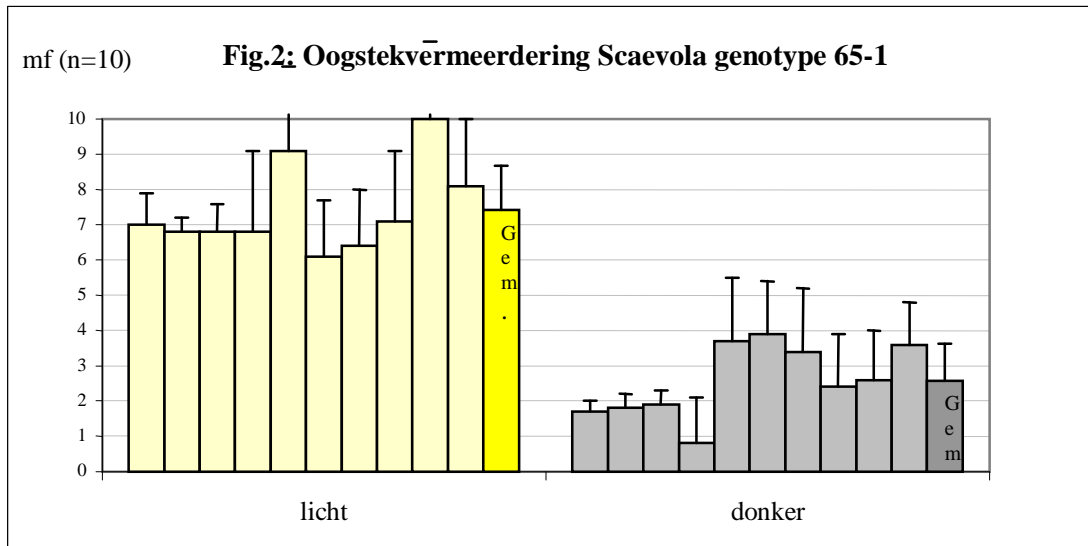


Fig.3 Verhoogd hormoonniveau

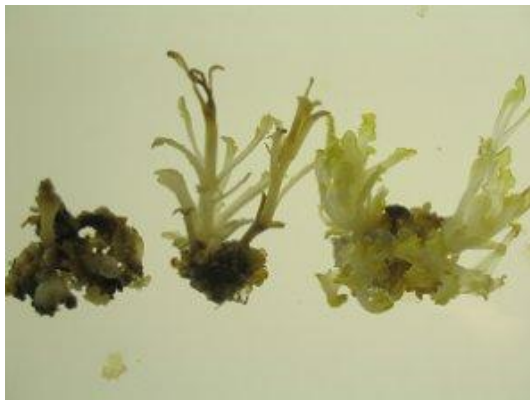


Fig. 4: Aangepaste zoutconcentratie sub 3



Toevoegen van zilvernitraat aan het gebruikte standaardmedium tot nu toe leverde geen significante vermindering van de topnecrose van scheuten op.

Bij het tot nu toe gebruikte standaardmedium voor vermeerdering zijn KMnO_4 korrels in een petrischaaltje geplaatst in een pot met vermeerderingsscheuten van Scaevola. De KMnO_4 adsorbeert de vrijkomende ethyleen uit de cultures alsmede ook waterdamp. Bij een andere variant is gebruik gemaakt van een container die door middel van een filter in het deksel ventileert, waardoor gasuitwisseling plaatsvindt met de omgeving. De scheutcultures zijn 1 subcultuur gevolgd en er lijkt al een significante verbetering op te treden (zie fig.5 en 6) van de kwaliteit van de scheuten. Dit ondanks de beperkte hoeveelheden toegevoegde adsorptiemiddelen.

Fig.5: gebruikte containers

A: Controle jampot

B: KMnO_4 korrels

C: Eco-container met XXL deksel

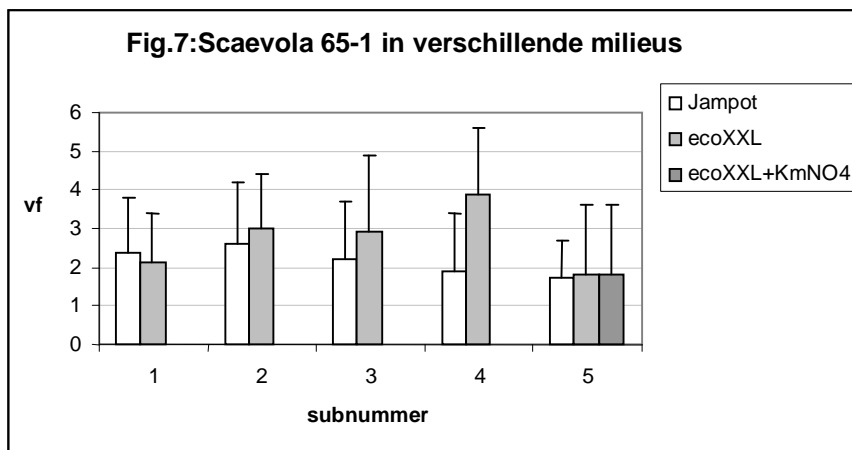
Syngenta: Scaevola en Primula



Fig 6: gevormde donkerscheuten.



Gedurende een aantal subcultures zijn scheutcultures vermeerderd in het donker op SCA6 medium (MS basis, 2mg/1Kinetine,0.5IAA,0.3paclobutrazol) De vermeerdering lijkt eerst te verbeteren wanneer beluchte containers (ecoXXL) worden toegepast, maar na een aantal subcultures daalt deze toch weer tot het oorspronkelijke niveau (zie fig.7)

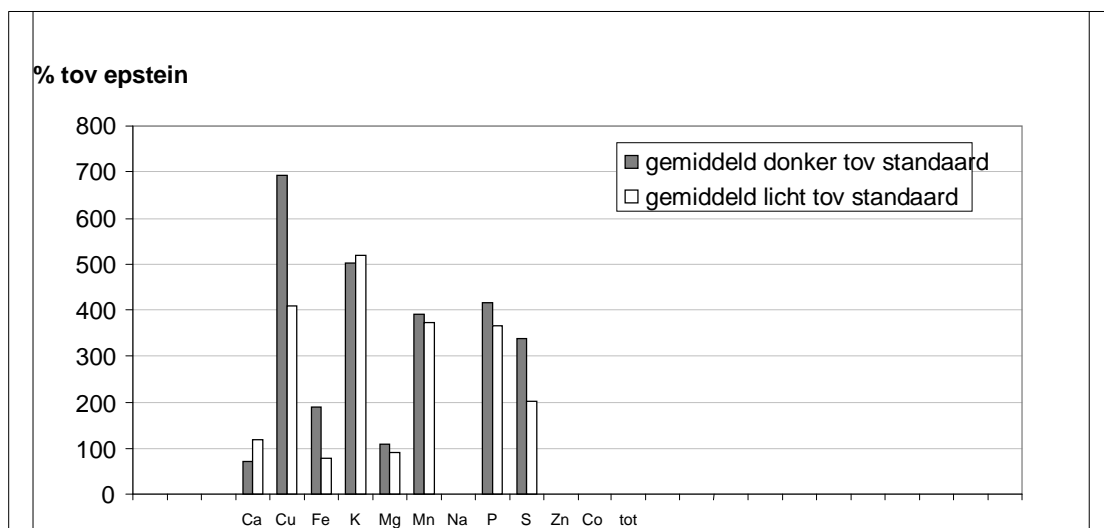


Syngenta: Scaevola en Primula

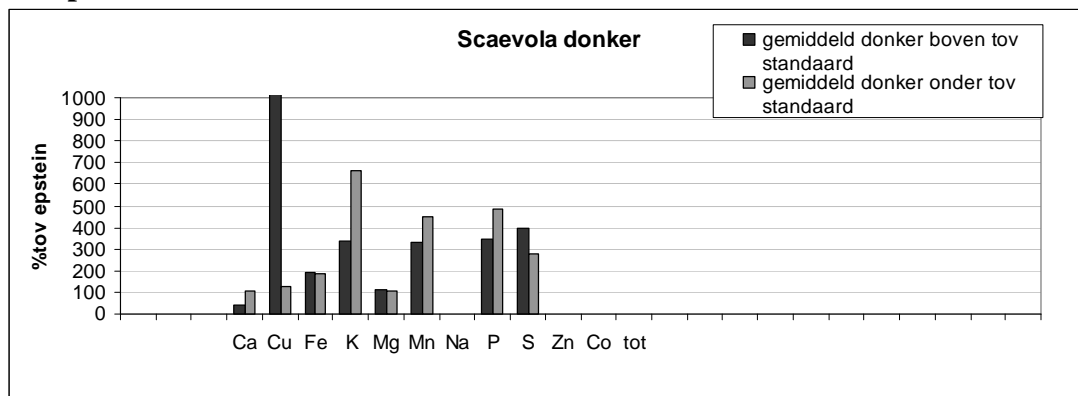
Scaevola elementbepalingen

Scheutcultures geproduceerd in het donker en het licht zijn geanalyseerd op elementsamenstelling van de biomassa op basis van het totale droge stof gehalte. (fig. 8 en 9). Hieruit kan geconcludeerd worden dat bij donkercultures de hoeveelheid Calcium laag is, met name in de bovenste (topscheut) delen van de scheuten. Dit is een goede verklaring voor het optreden van scheuttopnecrose, maar moeilijk te corrigeren. De ijzerwaarde lijkt tamelijk hoog, maar negatieve gevolgen hiervan lijken niet aannemelijk. De kaliumgehalten in de bovenste scheutdelen zijn ook tamelijk laag, wat veroorzaakt zou kunnen worden door de opname van Natrium uit de agar. Besloten is om op basis hiervan geen experimentele mediasamenstellingen te ontwikkelen.

Figuur 8: elementbepalingen Scaevola licht en donkercultures



Figuur 9: Relatieve elementbepalingen van de bovenste gedeelten van scheuten tov epstein

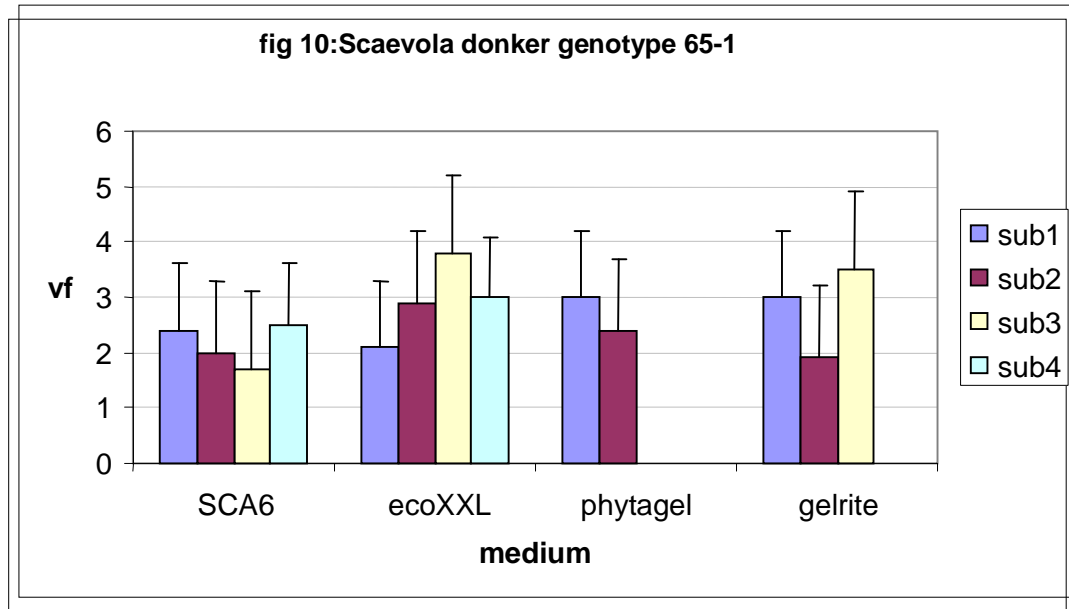


Syngenta: Scaevola en Primula

Saevola Geleermiddelen

Er zijn een 2-tal concentraties van de geleermiddelen phytigel en gelrite (3 en 4 g/l) getest.

Na 1 sub is gekozen om alleen de 4 g/l verder te volgen omdat deze het meest overeenkomt met de gewenste gelsterkte. Na 3 subs op gelrite lijkt de vermeerdering niet slechter en de topnecrose lijkt zeker niet toe te nemen (fig.10) Dit leidt echter nog niet tot een substantieel hogere vermeerderingsfactor.



SCA-6 Jampot

SCA6 ecoXXL container



4 g/l gelrite in Jampot

4g/l phytigel in Jampot

Syngenta: Scaevola en Primula

Agars

Media met phytigel of gelrite als geleermiddel blijken geen substantieel hogere vermeerdering te geven. Deze experimenten zijn niet verder vervolgd. Uit metingen aan agars door PRI op basis van resultaten uit andere donker experimenten bleek echter een groot verschil tussen de in onze experimenten standaard gebruikte “plantagar” van Duchefa en een nieuw type agar genaamd agar-T van dezelfde firma. Deze agar-T bevat een duidelijk afwijkende concentratie van de elementen Fe, Mn, Na en S, zoals weergegeven in onderstaande tabel 11. Om vast te stellen of er een effect van de agarsamenstelling op de donkercultures van Scaevola is zijn media met deze agars gebruikt. Als standaardmedium is gebruikt SCA6, wat in eerdere experimenten is beschreven. In eerste instantie zijn van beide agars, 8 gram per liter toegevoegd wat standaard in alle experimenten is gebruikt.

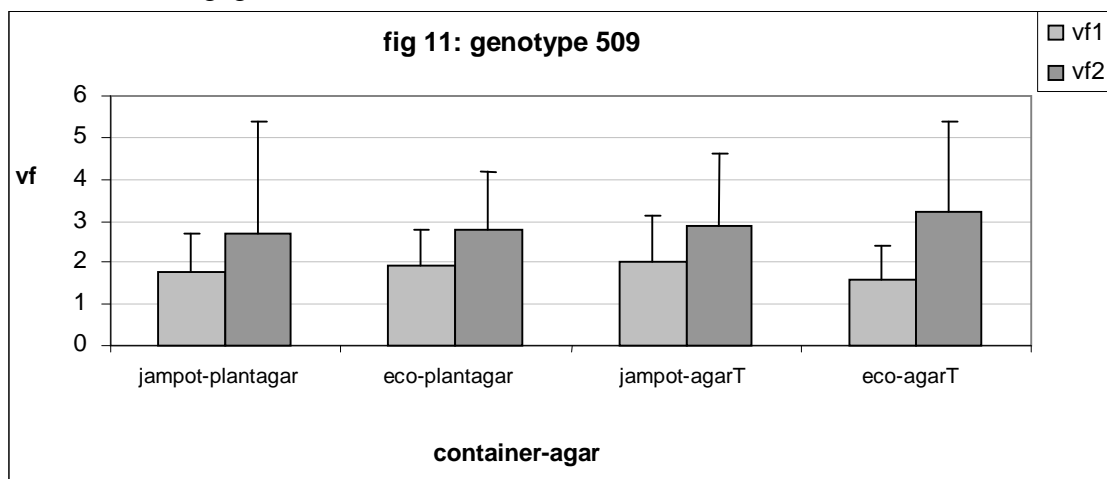
Tabel 11: Samenstelling agars op basis metingen.

mmol/kg	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Zn
plantagar	15	0.02	0.86	5	34	0.03	205	1	71	0.02
agarT	26	0.02	4.47	6	43	0.81	45	5	27	0.16

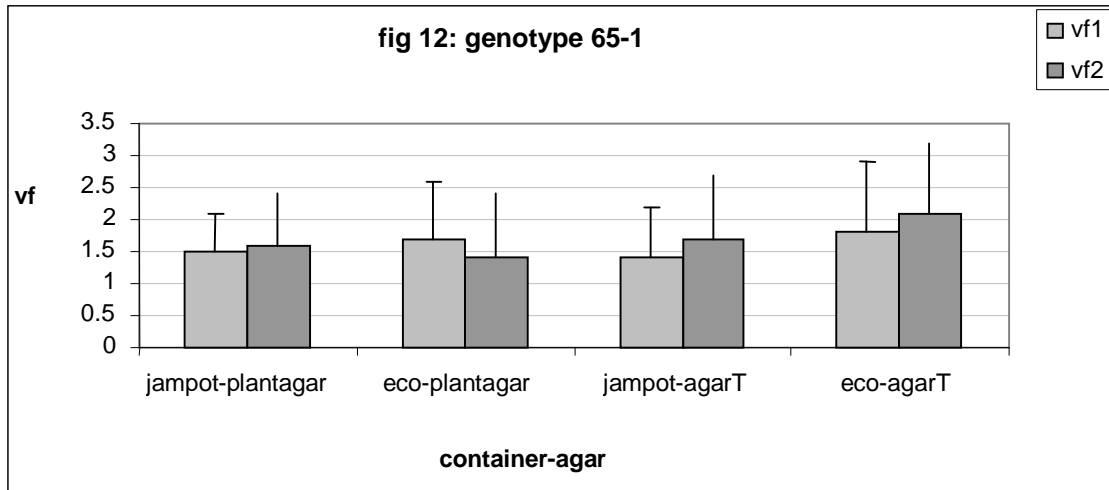
Uit eerdere metingen aan in het donker gevormde scheuten (zie fig 9) is vastgesteld dat een hoog gehalte aan Natrium schadelijk zou kunnen zijn, met name ook voor donkercultures.

Om deze reden is een agar met een laag natrium gehalte getest.

In figuur 11 en 12 staan voor 2 genotypen de vermeerderingsfactoren bij een 7 weekse subcultuur weergegeven.



Syngenta: Scaevola en Primula



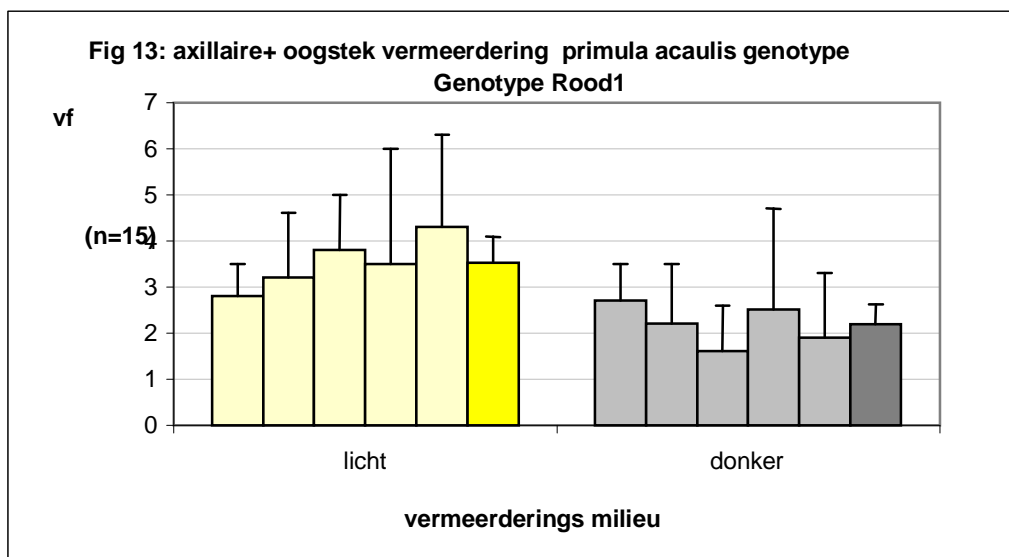
Opvallend is de lage vermeerderingsfactor voor beide genotypen. Het betreft hier cultures die inmiddels bijna 2 jaar in het donker worden vermeerderd. De laatste subs vinden plaats in zowel jampotten als eco-containers die een lagere topnecrose lieten zien dan jampotten. Het lijkt echter toch dat bij langer doorzetten van de cultures in het donker er een langzame vertraging van de groei en dus vermeerderingsfactor optreedt. De topnecrose treedt nog steeds op in beide containers, wat bij een verlaging van de groei leidt tot het wegvallen van de verschillen tussen de beide containers. Op dit moment zijn er geen significante verschillen tussen de beide agars aangetoond, maar de cultures zullen nog een aantal subs worden doorgezet. Agar-T lijkt zeker niet slechter dan de huidige standaard.

Primula acaulis.

Ook voor dit gewas zijn een 5-tal vermeerderingscycli afgerond.

Na de eerste 2 subcultures die redelijke vermeerdering lieten zien in vergelijking met de lichtvariant blijkt ook hier de vermeerdering te dalen tot ca. 50% van de controle, terwijl het doel een hogere vermeerdering is (Fig13).

De verwachte toename van vermeerdering door het mogelijk optreden van oogstekken bij dit rozetgewas naast de axillaire scheutvorming treedt in onvoldoende mate op. Besloten is om met dit gewas geen verdere experimenten uit te voeren.



Syngenta: Scaevola en Primula

Conclusies

De ontwikkelde protocollen voor Scaevola donkervermeerdering zijn toepasbaar als routinematig instandhoudingsprotocol. Ten behoeve van een snelle vermeerdering is dit minder het geval omdat de vermeerderingsfactoren beperkt blijven.

De kwaliteit van de planten na het vitro proces na afharding en doorgroei in de kas geven geen aanleiding tot zorg.

Er zijn grote verschillen in kwaliteit van agars zoals geleverd door leveranciers. Zoutconcentraties zoals recentelijk gemeten kunnen (ongewenste) effecten op de groei van cultures hebben.

Een intern proces van kwaliteitscontrole is hiervoor zeer gewenst is gebleken uit recent onderzoek van een aantal gebruikte agars.

Voor Primula acaulis is geen donkerprotocol beschikbaar wat een continue hoge vermeerderingsfactor heeft.

Als gevolg van de aankoop van een methode voor donkervermeerdering tijdens de loop van dit project door Syngenta zijn op een bepaald moment de inspanningen verlaagd. Hierdoor zijn onder meer de experimenten met het gewas Primula acaulis beperkt gebleven. Dit is met de projectleiding besproken. Na overleg van de projectleiding met de andere projectleden is besloten om Syngenta toch deel te laten blijven uitmaken van de projectgroep. Dit geeft aan dat vermeerdering in het donker grote perspectieven biedt, ook al zijn de resultaten bij beide gewassen die in dit onderzoek zijn gebruikt beperkt.

Syngenta is echter van mening dat de werkwijze in de projectgroep “ donkervermeerdering” een positieve impuls aan het ontwikkelen van efficiënte (donker) protocollen heeft gegeven. Na een aanvankelijk moeizame start van de werkgroep is na wijzigen van de organisatie vruchtbaar samengewerkt. Het verdient aanbeveling om bij komende projectgroepen de projectleiding duidelijk te scheiden van de technisch betrokken onderzoekers. Het gezamenlijk uitvoeren van dergelijk onderzoek tussen weefselkweeklaboratoria in samenwerking met PRI, Wageningen biedt duidelijk schaalvoordelen. Snel testen op praktijkniveau van een technische innovatie bij meerdere gewassen geeft snel aan hoe universeel toepasbaar de innovatie is. Het uitwisselen van (praktische) kennis bij algemeen geldende problematiek komt het weefselkweekbedrijfsleven ten goede daar veelal de onderzoeksmogelijkheden beperkt zijn.

Syngenta: Scaevola en Primula

PPO projectnummer: 330807

Bedrijf: Van Zanten Plants B.V.
 Carla van Eijk
 Wim Rook

1. Gebruik van regulatoren die etioleren tegen gaan bij vermeerdering van Alstroemeria in het donker.

Experiment 1.1. Invloed van paclobutrazol (PAC) op strekking van Alstroemeria scheutjes in het donker.

Doel:

Onderzoeken in hoeverre paclobutrazol (PAC) het nadelige effect van doorschieten bij vermeerdering in het donker van Alstroemeria tegen kan gaan.

Materiaal en methoden:

Twee typen Alstroemeria (snijtype A en pottype B) zijn ingezet op verschillende concentraties PAC (zie tabel 1).

Tabel 1: Behandelingen bij experiment 1.

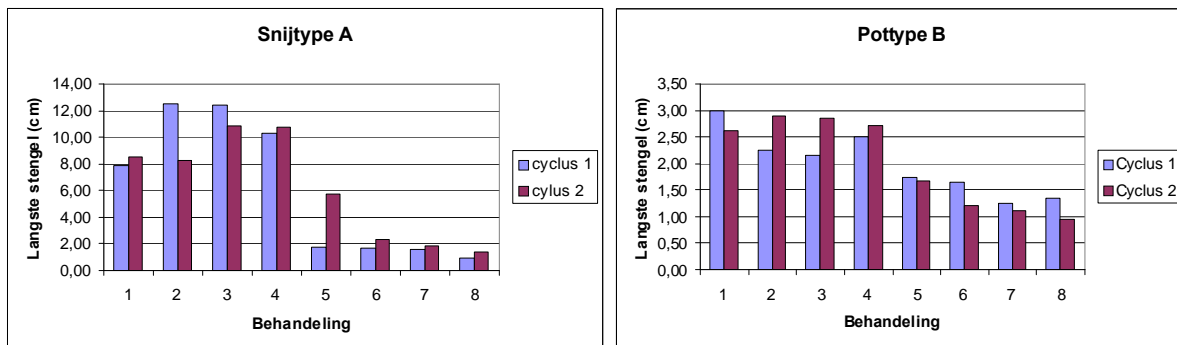
Behandeling	1	2	3	4	5	6	7	8
L(icht)/D(onker)	L	D	D	D	D	D	D	D
µM PAC	0	0	0,1	0,3	1	3	10	30

Per behandeling zijn tien buizen ingezet met per buis 1 explantaat. Inzet op MS medium met 2 mg/l BAP en gelrite. De behandelingen zijn na twee cycli beoordeeld, waarbij naar verschillende parameters is gekeken.

Resultaten:

De invloed van PAC op de lengte van de langste stengel bij snijtype A en pottype B staat weergegeven in grafiek 1.

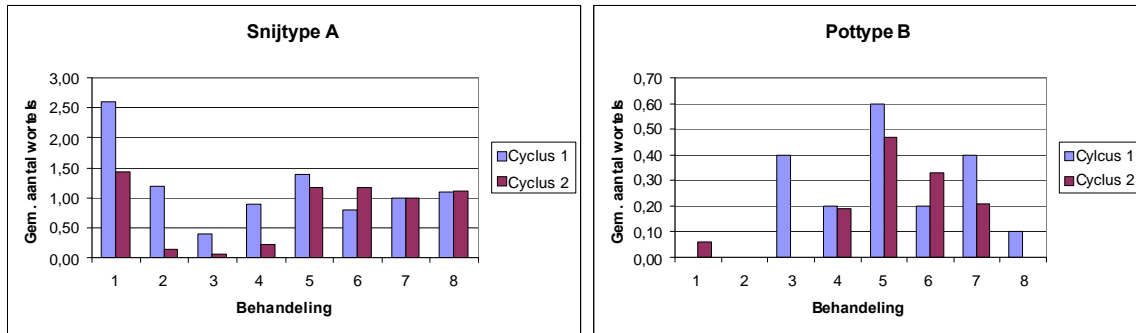
Grafiek 1: Gemiddeld lengte langste stengel per explantaat na twee cycli vermeerdering.



Uit grafiek 1 blijkt dat bij snijtype A 1 µM PAC nodig is om de scheutgroei te remmen bij vermeerdering in het donker. Ook bij pottype B is dit het geval. Het effect van de remming van de strekking is bij type B uiteraard minder, omdat het hier een pottype betreft.

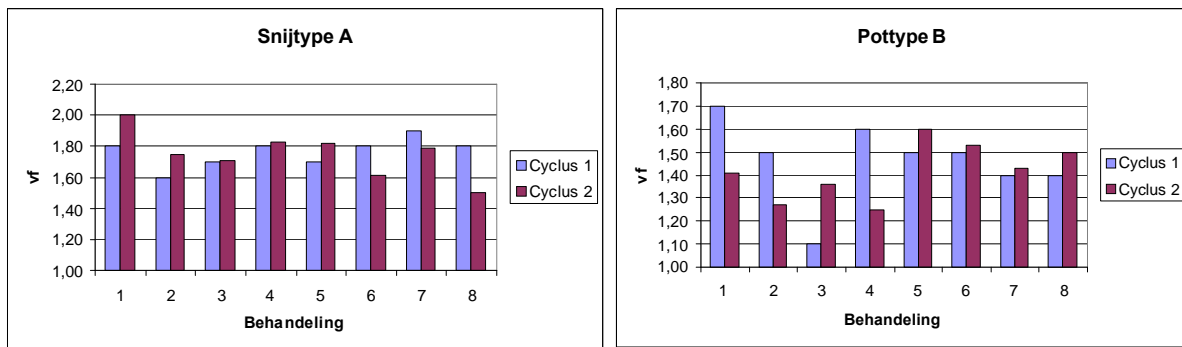
De invloed van PAC op het ontstaan van wortels tijdens de vermeerdering staat weergegeven in grafiek 2. Uit deze grafiek blijkt dat snijtype A in het licht op normale vermeerderingsbodem (behandeling 1) wortels vormt. In het donker neemt dit duidelijk af. Dit effect wordt weer enigszins opgeheven na toediening van PAC in het medium. Bij pottype B vindt in het licht op normale vermeerderingsbodem nauwelijks wortelvorming plaats. Deze wortelvorming neemt toe bij toevoeging van PAC aan het medium.

Grafiek 2. Gemiddeld aantal wortels per explantaat na twee cycli vermeerdering.



Ook is gekeken naar het effect van PAC op de vermeerderingsfactor. De resultaten hiervan staan weergegeven in grafiek 3. Uit deze grafiek blijkt dat PAC bij snijtype A geen grote invloed heeft op de vermeerderingsfactor. Wel lijkt de vermeerdering op medium zonder PAC in het donker iets lager lijkt dan in het licht. Dit is ook bij pottype B het geval. Ook hier lijkt PAC geen grote invloed te hebben op de vermeerderingsfactor.

Grafiek 3. Gemiddelde vermeerderingsfactor (VF) per explantaat na twee cycli vermeerdering.



Conclusies:

- Gebruik van 1 µM PAC geeft een duidelijke remming van de strekking van scheutjes van alstroemeria in het donker gedurende twee cycli vermeerdering
- 1 µM PAC heeft geen nadelige invloed op de vermeerderingsfactor van Alstroemeria in het donker gedurende twee cycli

Vervolg:

De resultaten zijn vergelijkbaar met die van de firma Konst die ook onderzoek doet aan dit onderwerp bij gewas alstroemeria. Konst heeft dit onderzoek voortgezet. Van Zanten Plants heeft besloten n.a.v. een reorganisatie binnen het bedrijf en wegens positieve resultaten bij het onderzoek naar vermeerdering via wortelcultures zich te concentreren op dat deel van het onderzoek.

2. Vermeerdering van Limonium via wortelcultures.

Experiment 2.1: Wortelcultures van Limonium

Doel:

Onderzoek naar de mogelijkheden van wortelcultures van Limonium in vitro in het donker.

Materiaal en methoden:

In dit onderzoek is limonium type A gebruikt. Als uitgangsmateriaal voor de wortelcultures zijn wortels gebruikt van vitro planten na 4 weken op bewortelingsmedium (vast medium met 1 mg/l IBA)

Er zijn verschillende behandelingen ingezet:

- Behandeling A: MMS 30 medium met 0,5 mg/l IBA
- Behandeling B: MMS 30 medium met 1,0 mg/l IBA
- Behandeling C: MMS 30 medium met 1,0 mg/l IBA en 0,055 mg/l BAP
- Behandeling D: MMS 30 medium, hormoonloos

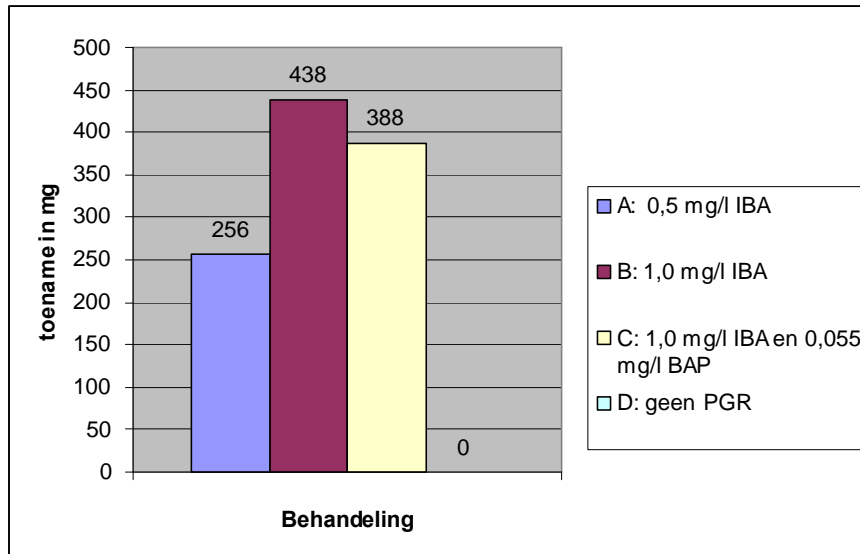
Behandelingen A t/m D zijn uitgevoerd in vloeibaar medium (15 ml) op een schudder (100 rpm), in vloeibaar stilstaand medium en op vast medium (80 ml). Opkweek bij een temperatuur van 20 °C in Wavin kuipen.

Per behandeling zijn 3 containers ingezet met 10 wortelstukjes van ca. 1 cm lengte. Het begingewicht van de wortels per container is bepaald.

Resultaten:

Van de verschillende behandelingen is na 4 weken de gemiddelde gewichtstoename per container bepaald. Resultaten staan weergegeven in grafiek 4 t/m 6. Tevens zijn van een aantal behandelingen foto's gemaakt (zie foto 1 t/m 6).

Grafiek 4: Gemiddelde gewichtstoename van wortels in vloeibaar medium op een schudder.



Waarnemingen:

Behandeling A: de ingezette wortelstukjes worden lichtbruin. Veel zijworteltjes gevormd, wit, onvertakt en ca. 0,5 cm lang. Er ontstaat geen callus en geen scheutjes.

Behandeling B: de ingezette wortelstukjes worden lichtbruin. Er worden zeer veel korte (tot ca. 0,5 cm) zijwortels gevormd, wit, onvertakt. Er ontstaat geen callus en geen scheutjes.

Behandeling C: de ingezette wortelstukjes worden lichtbruin. Er worden korte (tot ca. 0,5 cm) zijwortels gevormd. Er ontstaan echter meer scheutjes dan wortels. De meeste scheutjes ontstaan op de oude wortel. Ook enkele op nieuw gevormde wortels. Er ontstaat geen callus. De gewichtstoename bij behandeling C is niet alleen toe te schrijven aan groei van wortels, maar van wortels en scheutjes samen.

Behandeling D: de ingezette wortelstukjes worden bruin, de wortelpuntjes zwart. Er is slechts sporadisch groei van witte lange wortels.

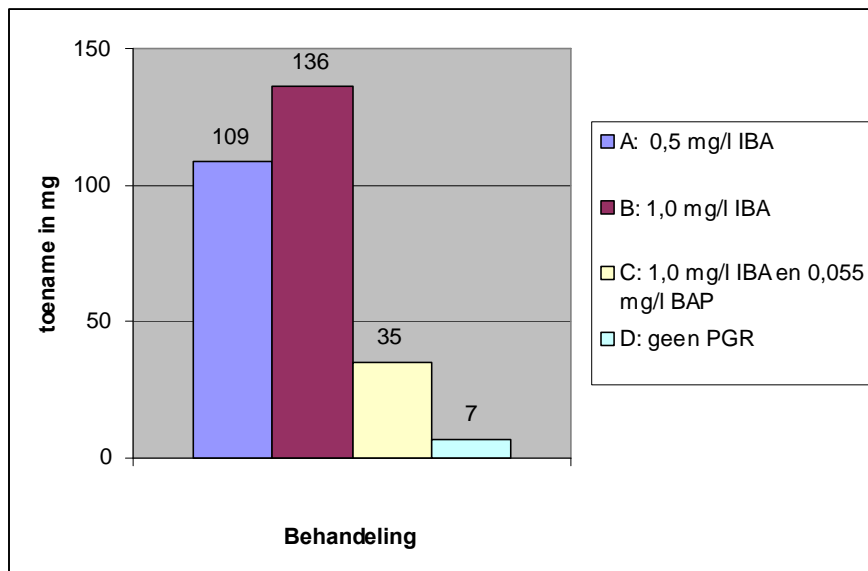


Foto 1.
Behandeling B na 4 weken vloeibaar geschud medium



Foto 2.
Behandeling C na 4 weken vloeibaar geschud medium

Grafiek 5: gemiddelde gewichtstoename van wortels op stilstaand vloeibaar medium.



Waarnemingen:

Behandeling A: de ingezette wortelstukjes worden lichtbruin. Er worden wel zijwortels gevormd, ca 0,5 cm lang. Geen callus. Geen scheutjes.

Behandeling B: de ingezette wortelstukjes worden bruin/ zwart. Er worden korte witte wortels (kleiner dan 0,5 cm) gevormd. Soms alleen heel korte dikke wortelpunten. Geen callus. Geen scheutjes.

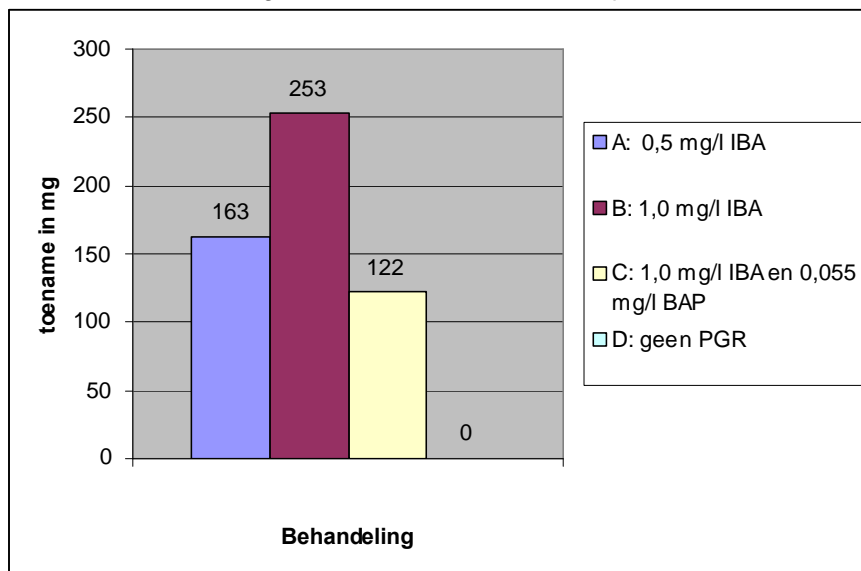
Behandeling C: de ingezette wortelstukjes worden bruin/ zwart. Er is weinig groei. Er ontstaan enkele nieuwe wortels en scheutjes. Geen callus. De gewichtstoename komt van wortels en scheutjes samen.

Behandeling D: de ingezette wortelstukjes worden bruin/ zwart. Er is nauwelijks groei. Er ontstaat een enkele wortel of scheutje. Geen callus. De gewichtstoename komt ook hier van wortels en scheutjes samen.



Foto 3. Behandeling B op stilstaand vloeibaar medium

Grafiek 6: Gemiddelde gewichtstoename van wortels op vast medium.



Waarnemingen:

Behandeling A: de ingezette wortelstukjes worden lichtbruin. Er ontstaan veel witte zijwortels tot ca. 0,5 cm in lengte. De wortels groeien op en in het medium. Sommige zijwortels vertakken. Er ontstaat geen callus en geen scheutjes.

Behandeling B: de ingezette wortelstukjes worden lichtbruin. Er ontstaan zeer veel zijwortels van ca. 1 cm lang. Wortels groeien op en in het medium. Geen callus en geen scheutjes.

Behandeling C: de ingezette wortelstukjes zijn bruin geworden. Er worden zowel scheutjes als wortels gevormd. Er zijn meer en ook langere wortels (tot 1 cm lengte) dan in vloeibaar medium. Geen callus. De gewichtstoename komt van wortels en scheutjes samen.

Behandeling D: de ingezette wortelstukjes worden erg bruin. Er is nauwelijks groei. Alleen wat lengtegroei van sommige wortelstukjes (geen zijwortels gevormd) en één scheutje.



Foto 4.
Behandeling B na 4 weken op vast medium

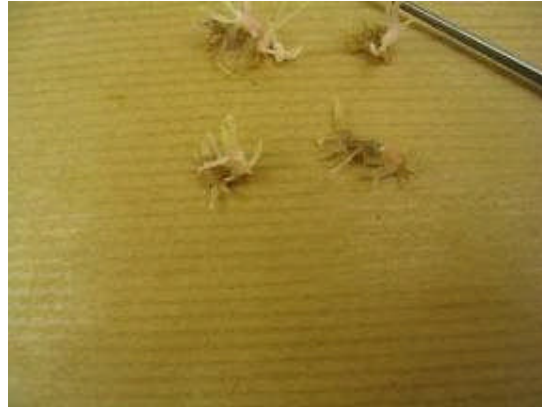


Foto 5.
Behandeling C na 4 weken op vast medium

Conclusies:

- Zowel op vloeibaar geschud, op stilstaand of op vast medium geeft behandeling B met 1 mg/l IBA de meeste toename in versgewicht van wortels van Limonium
- Behandeling B geeft op vloeibaar geschud medium de meeste toename in versgewicht van wortels van Limonium
- Scheutregeneratie uit wortels is mogelijk bij Limonium.

Experiment 2.2.: Regeneratie van scheuten uit wortelsegmenten van Limonium.

Doel:

Regeneratie van scheutjes uit wortelcultures van Limonium type A.

Materiaal en methoden:

Van alle behandelingen uit experiment 2.1 zijn wortelstukjes op regeneratiemedium gezet (vast MMS 30 met 0,01 mg/l BAP en 0,002 mg/l IBA). Opkweek bij 22 °C en 16 uur licht.

De wortelstukjes van de behandeling uit experiment 2.1 zijn steeds verdeeld over drie containers. Wortelstukjes afkomstig van vast medium konden vrij gemakkelijk in zijn geheel overgezet worden. Wortelstukjes van vloeibaar medium waren als kluwen in elkaar gegroeid en daar zijn stukjes wortel (vertakt) uit elkaar getrokken en ingezet.

Resultaat:

Na 10 weken zijn behandelingen beoordeeld. De resultaten staan in tabel 2 weergegeven.

Tabel 2. Regeneratie van scheutjes uit wortelstukjes van Limonium.

Behandeling	Aantal wortelstukjes op regeneratiemedium	Aantal wortelstukjes met scheuten	% wortelstukjes met scheuten
<i>Vloeibaar geschud medium</i>			
Behandeling A	37	36	97 %
Behandeling B	50	46	92 %
Behandeling C	39	39	100 %
Behandeling D	23	14	61 %
<i>Vloeibaar stilstaand medium.</i>			
Behandeling A	33	30	91%
Behandeling B	42	15	36%
Behandeling C	27	27	100%
Behandeling D	28	16	57%
<i>Vast stilstaand medium.</i>			
Behandeling A	38	36	95%
Behandeling B	52	48	92%
Behandeling C	24	23	96%
Behandeling D	29	9	31%

Foto's van de beste behandelingen qua scheutregeneratie.



Foto 6 en 7: Behandeling A, vloeibaar op schudder



Foto 8 en 9: Behandeling B, vloeibaar op schudder



Foto 10 en 11: Behandeling C, vloeibaar op schudder

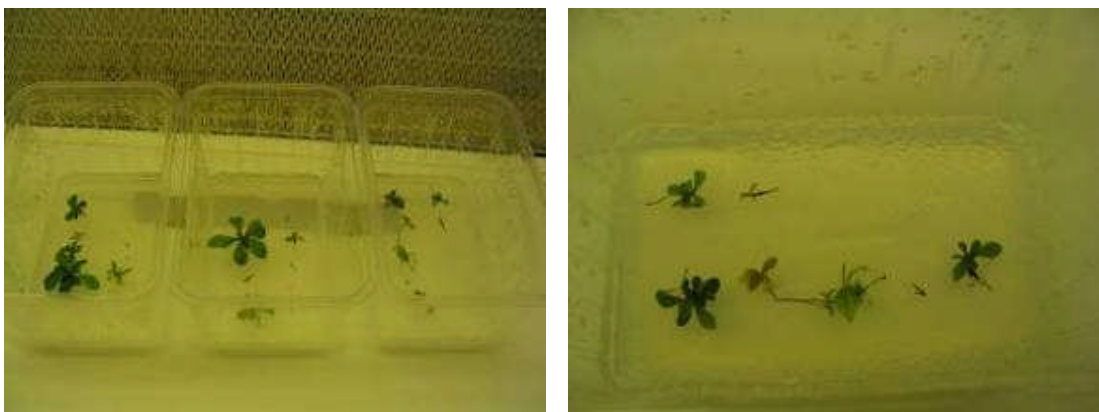


Foto 12 en 13: Behandeling D, vloeibaar op schudder

In het algemeen ontstaan er meerdere planten per wortelsegment. De meeste planten zien er normaal uit. Bij behandeling C groeien de planten het snelst. Op dit medium waren de scheuten al gevormd tijdens de wortelcultuur. Bij behandeling B lijken de meeste scheuten pas gevormd te worden op het regeneratiemedium en daardoor is de groei trager. Optimaal: meeste wortelgroei op medium B. Voorafgaand aan regeneratie wortels 2 – 3 weken op medium C zetten.

Om de planten te controleren op soortechtheid zijn van behandeling B en C van vloeibaar medium op de schudder en van vast medium planten beworteld en naar de kas gebracht voor bloeioproeven.

Totaal naar de kas gebracht:

- 30 planten afkomstig van behandeling B, vloeibaar medium schudder (B1) en vast medium (B2)
- 30 planten afkomstig van behandeling C, vloeibaar medium schudder (C1) en vast medium (C2)
- Controle planten uit standaard vermeerdering.

Uit de bloeioproef bleek dat bloei, bloeisnelheid, bloemkleur en blad geen afwijkingen laten zien t.o.v. de controle partij. Van deze bloeioproef zijn wat foto's gemaakt (zie foto 14, 15 en 16).



Foto 14, 15 en 16: Bloeioproef in de kas

Conclusies:

- Uit wortelstukjes van Limonium type A kunnen scheutjes ontstaan
- Plantjes ontstaan uit wortelstukjes van Limonium type A vertonen geen afwijkingen in de kas.

Experiment 2.3: Invloed van IBA op groei van wortels van Limonium type A in vitro.

Doel:

Optimalisatie van IBA concentratie in het medium voor wortelcultuur van Limonium type A.

Materiaal en methoden:

Als uitgangsmateriaal zijn wortels gebruikt van vitro planten die 4 weken op bewortelingsmedium hebben gestaan. Opkweek in Wavin kuipen op vloeibaar medium (15 ml per kuip) op de schudder (100 rpm). Basismedium: MMS 30.

De volgende behandelingen zijn ingezet:

Behandeling	Medium
0	1,0 mg/l IBA en 0,055 mg/l BAP
1	1,0 mg/l IBA
2	2,0 mg/l IBA
3	3,0 mg/l IBA
4	5,0 mg/l IBA

Per behandeling zijn 4 kuipen ingezet met 10 dunne witte wortels van ca. 1 – 1,5 cm lengte. Daarvan zijn 3 kuipen gebruikt om wortelcultuur aan te houden en 1 kuip voor regeneratie.

Regeneratiemedium: MMS 30 met 0,01 mg/l BAP en 0,002 mg/l IBA. Vast medium in Ecoline boxen met 140 ml medium, opkweek bij 22 °C en 16 uur licht.

Resultaten:

Na 1 cyclus van 4 weken was de groei als volgt:

Behandeling 0:

Voornamelijk lengtegroei van de wortels, nauwelijks zijwortels. Er worden enkele kleine scheutjes gevormd. Uit 1 kuip zijn 18 wortelsegmentjes op regeneratiemedium gezet.

Behandeling 1:

Het bekende beeld, kluwens van wortels. Er worden witte dunne zijwortels gevormd van ca. 0,5 – 1 cm lengte. Uit 1 kuip zijn 28 wortelsegmentjes op regeneratiemedium gezet.

Behandeling 2:

Meer en kortere zijwortels dan op 1,0 mg/l IBA. Er zijn 45 wortelsegmentjes op regeneratiemedium gezet.

Behandeling 3:

Ingezette wortels lijken iets verdikt. Heel compacte wortelkluwens met veel witte zijwortels van 3 – 5 mm lengte. Uit 1 kuip zijn 96 wortelsegmentjes op regeneratiemedium gezet.

Behandeling 4:

Korte zijwortels, ca. 3 mm lengte, iets verdikte wortels, nog compacter dan 3,0 mg/l IBA. Wortels zijn iets bros en 'lastiger uit elkaar te trekken' om op regeneratie te zetten. Uit 1 kuip zijn 73 wortelsegmentjes op regeneratiemedium gezet.

Na drie cycli is de groei bepaald aan de hand van de toename van het versgewicht. Resultaten staan weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. Gemiddelde gewichtstoename van wortels van limonium na 3 cycli op vloeibaar geschud medium.

Behandeling	IBA in mg/l	Toename gewicht in g	SE
1	1,0	1,41	0,008
2	2,0	2,77	0,33
3	3,0	4,21	0,19
4	5,0	4,43	0,23

Uit tabel 3 blijkt dat na drie cycli de grootste toename van het versgewicht optreed op medium 3 en 4. Dit is ook te zien op foto 4. Bij behandeling 0 zijn duidelijk scheutjes te zien.

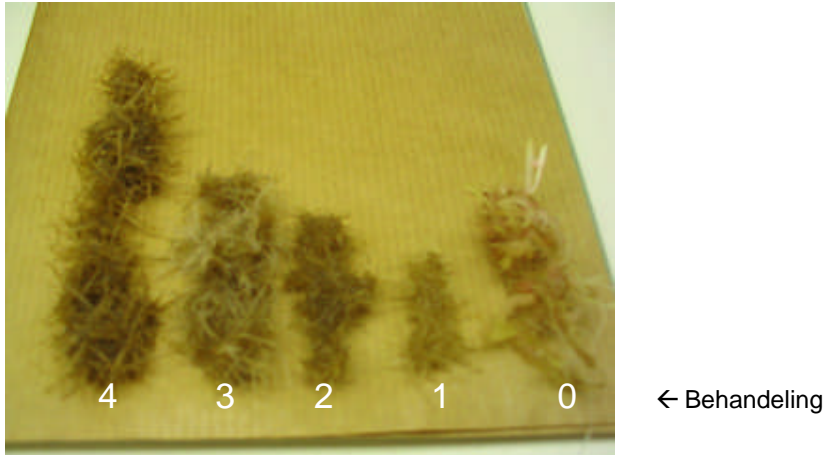


Foto 17: Wortels na drie cycli op vloeibaar geschud medium. Weergegeven de hoeveelheid wortels per kuip

De wortels zijn na drie cycli op regeneratiebodem gezet. Uit de wortelsegmenten ontstaan scheutjes. De resultaten staan weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. Regeneratie van scheutjes uit wortelstukjes van Limonium type A, die drie cycli zijn vermeerderd op vloeibaar medium.

Behandeling	Regulatoren (mg/l)	Aantal wortelstukjes per kuip	Aantal planten	Gem. aantal plantjes per wortelstukje
0	1,0 IBA en 0,055 BAP	18	32	1,8
1	1,0 IBA	28	23	0,82
2	2,0 IBA	45	41	0,91
3	3,0 IBA	96	42	0,44
4	5,0 IBA	63	7	0,11

Uit tabel 4 blijkt dat de meeste plantjes ontstaan bij behandeling 2 en 3. Bij behandeling 3 is echter het aantal gevormde plantjes per wortelsegment lager dan bij behandeling 2. Behandeling 0 geeft wel de meeste plantjes per wortelsegment op regeneratiemedium, maar de plantjes zijn glazig. Dit komt doordat ze al voor een groot deel op vloeibaar medium ontstaan (zie foto 17). Behandeling 3 geeft echter wel de grootste toename van versgewicht van de wortels te zien (zie tabel 2). Wellicht dat bij deze behandeling het aantal scheutjes per segment toeneemt na een tussenfase op vloeibaar met minder IBA of wat BA erin.



Foto 18 en 19 : Plantjes op regeneratiebodem bij behandeling 2 (2 mg/l IBA).

Conclusies:

- Bij verhoging van de IBA concentratie in vloeibaar geschud medium neemt ook de toename van het versgewicht van wortels toe.
- Behandeling 2 (2mg/l IBA) geeft de beste resultaten

Experiment 2.4. Invloed van cyclusduur op wortelcultures van Limonium type A.

Doel:

Optimaliseren van de cyclusduur voor wortelcultuur van Limonium type A.

Materiaal en methoden:

Als uitgangsmateriaal zijn dunne witte wortels van vitroplanten gebruikt van ca. 1 – 1,5 cm

Medium: gemodificeerd MS 30 medium met 1,0 mg/l IBA, vloeibaar medium op de schudder. Per behandeling zijn 3 kuipen ingezet met 10 dunne witte wortels van ca. 1 – 1,5 cm lengte. Een behandeling bestaat uit een cyclusduur van resp. 2, 3, 4 of 6 weken. Wortelcultures worden totaal 12 weken aangehouden. Daarna is de gewichtstoename bepaald en zijn wortelstukjes op regeneratiemedium gelegd.

Resultaten:

De gewichtstoename van de wortels na twaalf weken op vloeibaar medium staat weergegeven in tabel 5.

Tabel 5. Gewichtstoename van wortelcultures na verschillende cyclusduur.

Behandeling	Cyclusduur (wk)	Toename gewicht in g	SE
1	2	2,04	0,17
2	3	0,86	0,06
3	4	1,33	0,06
4	6	0,87	0,05

In de 2 en 4 weekse cyclus worden enige scheutjes gevormd. In 3 en 6 weekse cyclus zijn er nauwelijks scheutjes gevormd. In de 6 weekse cyclus worden er minder maar langere zijwortels gevormd. In de 2 weekse cyclus duidelijk de meeste wortelgroei. In alle behandelingen worden de oude oorspronkelijk ingezette wortels bruin en enigszins verdikt.

Conclusie:

- Voor wortelcultuur van Limonium type A geeft behandeling 1 (cyclusduur van 2 weken) de grootste toename in versgewicht van wortels .

Experiment 2.5. Wortelcultuur en scheutinductie bij meerdere limonium soorten.

Doel:

Onderzoeken in hoeverre andere Limonium soorten dan soort A reageren op vermeerdering van wortels op vloeibaar geschud medium in het donker en op regeneratie van scheuten uit wortels op vast medium.

Materiaal en methoden:

Van twee soorten (soort B en soort C) zijn wortels van scheutjes ontstaan op standaard bewortelingsmedium gebruikt als start materiaal. Wortels zijn vermeerderd op MMS30 medium met 1 mg/l IBA. Daarna zijn de wortels uitgelegd op standaard regeneratiemedium MMS 30 met 0,01 mg/l BAP en 0,002 mg/l IBA voor regeneratie van scheutjes.

Resultaten:

Limonium type B:

Groei van de wortelcultuur op het standaardmedium is goed, er ontstaat een kluwen van wortels, vergelijkbaar met type A. Stukjes wortel op regeneratiemedium geven veel scheutjes.

Limonium type C:

Groei van de wortelcultuur op het standaardmedium is matig. De oorspronkelijk ingezette wortels worden donkerbruin en er ontstaat een beetje callus. Er worden enkele vrij lange zijwortels gevormd. Weinig vertakking van de wortels zichtbaar. Vervolgproeven doen met meer IBA in het medium. Stukjes wortel zijn uitgelegd op standaard regeneratie medium. Er ontstaan maar een paar plantjes. Dit is te verklaren door de slechte kwaliteit van de wortelcultuur.

Eindconclusies

- Wortelcultuur van Limonium in het donker op vloeibaar geschud medium is mogelijk
- Wortelstukjes van Limonium vermeerderd via wortelcultuur zijn aan te zetten tot de vorming van scheutjes. Deze geven geen afwijkingen te zijn na groei in de kas.
- Het ontwikkelde protocol werkt voor verschillende Limonium cultivars. Protocol moet wel per cultivar geoptimaliseerd worden.

WR-19-02-2008

GP Plants: Roos & Heuchera

Inleiding

Het doel van het project is om in het donker weefselkweekplantjes met goede kwaliteit te produceren. Het onderzoek is gedaan met roos en Heuchera. Bij beiden zijn scheutcultures en wortelcultures onderzocht.

Algemene Materiaal en Methode

Roos

Het onderzoek werd gedaan met *Rosa* cv. "Matangi".

Heuchera

Het onderzoek werd gedaan met *Heuchera* cv. "Velvet Night" en aan het eind ook met "Regina", "Can Can" en "Green Spice".

Roos: scheutcultuur in het donker

Per conditie werden 3 plastic containers (diameter 70,3 mm, hoogte 49 mm, doorzichtige PS) met 30 ml medium en 4 scheuten gebruikt. De cultures werden gekweekt bij 23 ± 2 °C en één maal per week geobserveerd. Na 28 dagen werden de cultures gewogen en overgezet naar standaardcondities.

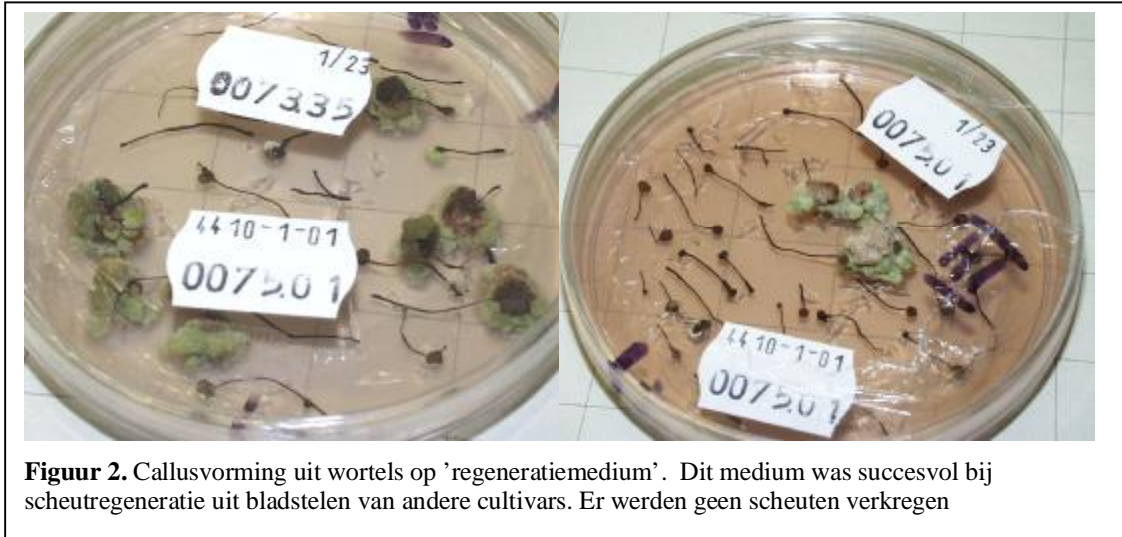
In het eerste experiment gingen de scheutcultures van roos tijdens de 4e week in het donker snel achteruit: Plantjes die er aan het eind van week 3 nog robuust uitzagen stierven tijdens de daarop volgende week af. Bij lage concentratie paclobutrazol was er enige etiolering die bij hogere concentratie geremd was. In het donker was er geen vermeerdering. In het licht was de vermeerderingsfactor ongeveer 2. Er was alleen in het licht sprake van gewichtstoename. Na overzetten van de donkercultures naar vers medium en licht was het aantal cultures duidelijk minder doordat er geen vermeerdering maar juist afsterven had plaats gevonden.

In de herhaling waren resultaten grotendeels hetzelfde: de cultures vermeerderden niet of nauwelijks. In de herhaling stierven plantjes echter niet af.



Figuur 1. Kweek van wortels van roos in vloeibaar medium. Links geheel afgesneden wortels, rechts: wortels met een stuk scheut er aan. De wortels rechts zijn gaan groeien.

GP Plants: Roos & Heuchera



Roos: wortelcultures in het donker

Omdat de scheutcultures van roos in het donker geen succes hadden, richtten we ons vooral op wortelcultures van roos. Adventieve wortels werden geïnduceerd op standaard bewortelingsmedium ($\frac{1}{2}$ MS met 0,2 mg/l IBA). Wortelinitiatie was langzaam vergeleken met meerjarigen als Heuchera. Na 4 weken op het bewortelingsmedium konden we gemiddeld per scheut 4 geschikte wortels (0,5 tot 2 cm) oogsten. Deze wortels hadden (nog) geen zijwortels. De groei werd eerst getest op vast medium met een reeks concentraties suiker en een reeks concentraties auxine. Hierop kregen we groei.

Vervolgens werd vloeibaar medium zonder hormonen getest. Er werden zowel geheel afgesneden wortels ingezet als wortels met nog een stukje stengel er aan. De wortels werden gekweekt op MS in het licht of in het donker. Geheel afgesneden wortels groeiden in het geheel niet, noch in het donker noch in het licht. Als er nog een stuk stengel aanzat, ging de wortel in het licht goed groeien, in het donker niet. Uit de stengel ontstonden overigens scheuten (Figuur 1).

Roos: scheutregeneratie uit wortels donker

Voor regeneratie uit wortels werden twee media getest; een die wij routinematig gebruiken bij regeneratie uit bladstelen in een andere roos cultivar, de andere uit de literatuur. Bij beide media verkregen we uit de wortels goed-groeiend callus, maar geen scheutregeneratie (Figuur 2).

Roos: conclusie

Roos, in ieder geval de cultivar die wij gebruikten, bleek zeer recalcitrant. Scheuten groeiden niet in het donker maar stierven juist af. Wortels zonder een stukje stengel groeiden niet, noch in het licht, noch in het donker. Als er een stukje stengel aanzat, groeiden de wortels in het licht uitstekend, terwijl in het donker groei nog steeds geremd was.

GP Plants: Roos & Heuchera

Heuchera: scheutcultuur in het donker

Heuchera scheuten etioleerden op lage paclobutrazol concentraties (0,1 μM) en vormden lange witte scheuten met zeer kleine, rudimentaire blaadjes. Bij hogere concentratie paclobutrazol (0,3-3,0 μM) kregen de blaadjes een meer normale vorm terwijl de stengel nog geëtioleerd was. Dit is voordelig voor overzetten: in het licht is Heuchera erg compact en zeer moeilijk te snijden; de gedeeltelijk geëtioleerde Heuchera's zijn goed te verwerken bij overzetten. De strekking van de stengel werd geremd bij nog hogere concentraties (10-30 μM). Bij lage paclobutrazol concentraties ontstond er veel callus uit het snijvlak van de stengel en uit oude blaadjes die het medium raakten. De vermeerdering was hoog bij lage paclobutrazol maar werd minder bij hoge concentraties. Als de scheutjes na de donkerbehandeling werden overgezet naar het licht, was de "regeneratie" beter als de paclobutrazol concentratie verhoogd was, bij zeer hoge concentratie werd de "regeneratie" juist weer minder.

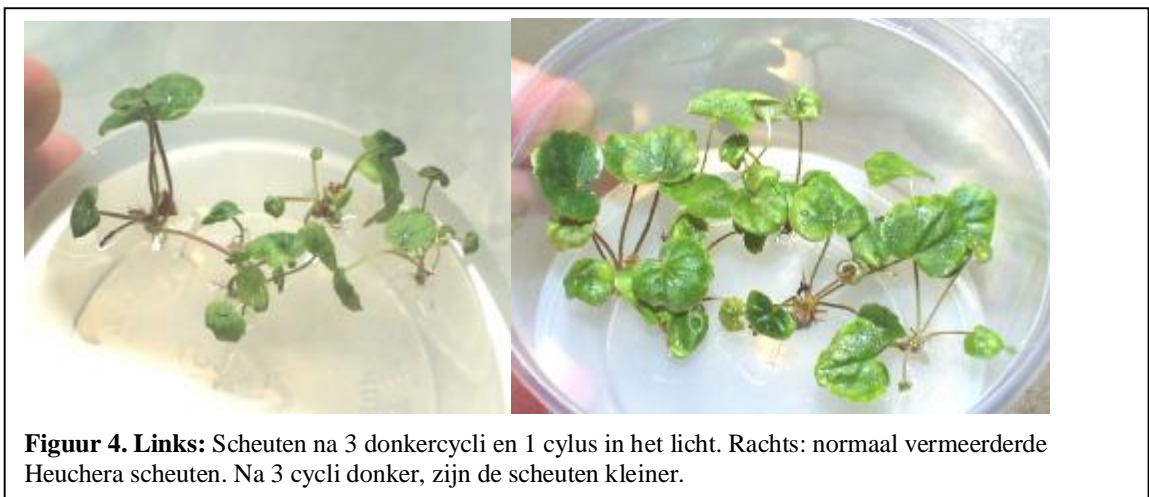
Om meer uniform startmateriaal te krijgen, werden scheutjes eerst gekweekt op medium zonder hormonen. Deze scheutjes waren duidelijk robuuster. Bij overbrengen naar het testmedium werden bovendien de oude blaadjes zorgvuldig weggesneden. Zowel callusvorming als variabiliteit waren een stuk minder. Er was in de controle (geen paclobutrazol) zeer sterke strekking. Als paclobutrazol werd bijgevoegd, werd de strekking geremd. Het effect van paclobutrazol was als in het voorgaande experiment: bij lagere concentraties had paclobutrazol een effect op de bladvorm en bij hogere ook op de stengelstrekking. We hebben Heuchera gedurende twee cycli in het donker met paclobutrazol vermeerderd. Dit ging goed. Na overbrengen naar het licht was er altijd 100% groei. We hebben niet getest op bewortelingscapaciteit maar verwachten geen problemen omdat een donkerbehandeling in het algemeen beworteling juist verbeterd. Het is wel nodig om de groei na overbrengen naar ex-vitro condities te checken.

GP Plants: Roos & Heuchera

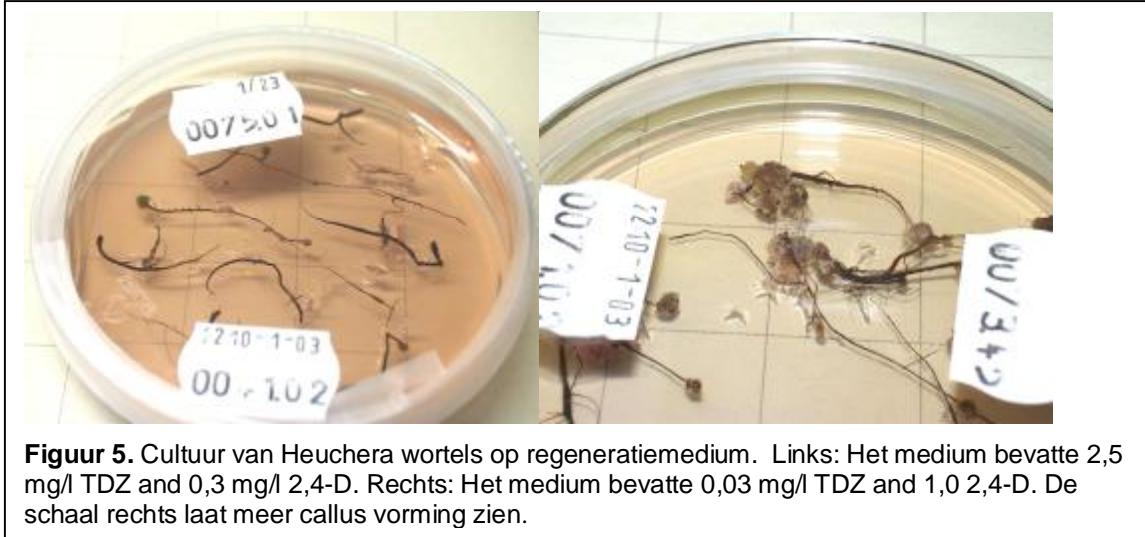


Wanneer er te veel cycli in het donker waren, warden de planten duidelijk minder robuust (Figuur 4). Daarom is een volgend schema wellicht gewenst:

- 3 cycli van 3 weken in het donker met 0,3 μ M paclobutrazol
- 1 cyclus van 4 weken in het licht op medium zonder groeiregulatoren,
- 3 cycli van 3 weken in het donker met 0,3 μ M paclobutrazol
- 1 cyclus van 4 weken in het licht op medium zonder groeiregulatoren
- 3 cycli van 3 weken in het donker met 0,3 μ M paclobutrazol
- Etc.



GP Plants: Roos & Heuchera



Figuur 5. Cultuur van Heuchera wortels op regeneratiemedium. Links: Het medium bevatte 2,5 mg/l TDZ and 0,3 mg/l 2,4-D. Rechts: Het medium bevatte 0,03 mg/l TDZ and 1,0 2,4-D. De schaal rechts laat meer callus vorming zien.

Nadat bij Heuchera cv. "Velvet Night" in een groot aantal experimenten goede en veelbelovende resultaten verkregen waren bij 0,3 μ M paclobutrazol, is ook begonnen met andere Heuchera rassen, "Regina", "Can Can" and "Green Spice".

Heuchera: wortelcultuur in het donker

Geïsoleerde wortels van Heuchera groeiden bleken zeer slecht in vloeibaar medium te groeien. Desalniettemin werd onderzocht hoe regeneratie van wortels was. Daartoe werden adventieve wortels genomen. Het regeneratiemedium bevatte verschillende concentraties TDZ en 2,4-D. Er werd callus gevormd en uit het callus ontstonden afhankelijk van de hormoonconcentratie, soms wortels. Achteraf moet gezegd worden dat de keuze van 2,4-D als auxine minder gelukkig was omdat dit auxine meestal callusgroei induceert.

Conclusie Heuchera

De resultaten bij het wortelcultuur gedeelte zijn zeer matig. De wortels vertonen enige morfogenetische respons. Mogelijk worden er bij testen met andere hormonen (IBA i.p.v. 2,4-D) wel positieve resultaten verkregen.

De resultaten bij scheutcultures zijn positief. Als met een relatief lage concentratie paclobutrazol gewerkt wordt, treedt er nog een beetje strekking op, dat het opsnijden bij overzetten aanzienlijk makkelijker maakt. Het is wel zo dat er na een aantal cycli in het donker een afname van de robuustheid is. De optimale procedure is daarom waarschijnlijk om cycli in het donker te onderbreken met een cyclus in het licht.

Gert Pezij
GP Plants, Februari 2008.

GP Plants: Roos & Heuchera

Vitrocom: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia & Syngonium

Contactpersonen: Robin van Marwijk, Kees Veldhuijzen

Doelstelling project: Het opzetten van een productiesysteem voor weefselkweek-vermeerdering het donker.

Omschrijving

Vermeerdering in het donker kan aanzienlijke voordelen ten opzichte van vermeerdering in het licht bieden:

- Reductie energiekosten. De verlichting van kweekcellen kost veel energie (m.n. afvoeren van de gegenereerde warmte). In het donker kunnen cellen veel efficiënter gebruikt worden (er zijn geen hoge schappen nodig, dus er kunnen meer cultures in een cel). De aanschafkosten en het onderhoud van verlichtingsapparatuur en chiller vervallen.
- Minder arbeidskosten. Bij vermeerderen in het donker wordt het weefselkweekmateriaal waarschijnlijk makkelijker versnijdbaar en wellicht is (gedeeltelijk) automatiseren mogelijk.

Bij Vitrocom wordt gewerkt met twee gewassen: Delphinium en Spathiphyllum. Voor de wijze van vermeerdering in het donker is gekozen voor het gebruik van groeiregulatoren om ethiolering tegen te gaan.

Spathiphyllum:

Proefopzet:

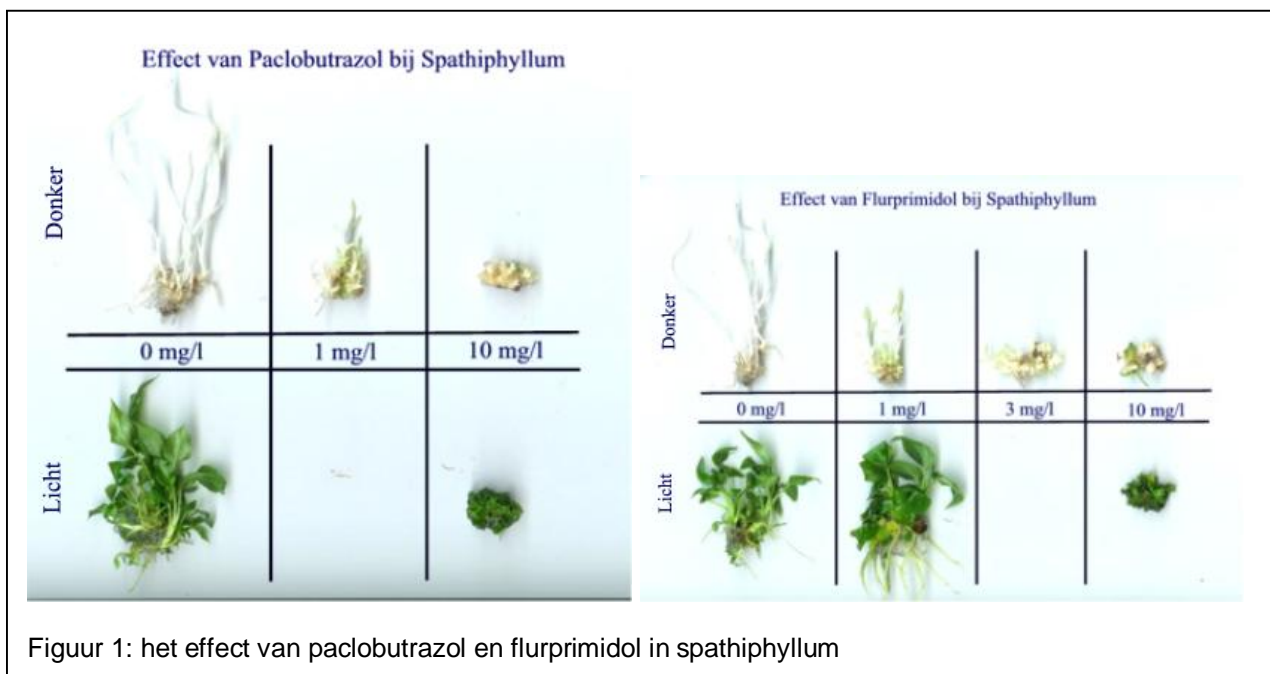
Uitgangsmateriaal: vermeerderingsmateriaal, 6 weken oud, clumps, cultivar Chico

Gebruikte media: Standaard clump vermeerderingsmedium (genaamd V86-B0) met daar aan toegevoegd de gewenste stoffen.

Snijwijze: standaard snijwijze voor Spathiphyllum: clumps delen, grote enkele planten afsnijden en apart opzetten (horen niet meer bij de proef)

Klimaat: 25 graden cel :

Aantallen: Per behandeling 4 bakjes met elk 10 clumps Cyclus: 5 weken. Clumps worden gedurende minimaal een aantal op dezelfde behandeling ingezet



Vitrocom: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia & Syngonium

Voor *Spathiphyllum* is besloten om een initiële proef op te zetten met een concentratie reeks van paclobutrazol en een reeks van flurprimidol (beide in de concentraties van 0, 0,3, 1, 3, en 10mg/l) toegevoegd aan het standaard vermeerderingsmedium van clumps. Alle behandelingen werden weggezet in licht (L) en donker (D) volgens om het effect en verschil van groei in het donker en licht duidelijk weer te kunnen geven (zie figuur 1).

De eerste keer zijn de clumps overgezet zonder te delen. De clumps werden in de 2^e overzetting wel gedeeld en weer op dezelfde media teruggezet. Na een aantal cycli bleek dat Paclobutrazol een betere werking had op het materiaal dan Flurprimidol (partiele necrose van de clumps in het donker) en dat de concentratie van 10 mg/l voor beide stoffen het beste resultaat gaf: een mooie compacte clump met veel ogen en dus veel potentie.

Hierna werd besloten om een verfijnde concentratie reeks op te zetten van paclobutrazol en flurprimidol om het effect op de planten van de tussenliggende concentraties (0, 4, 6, 8 en 10 mg/l voor paclobutrazol en 0, 3, 5, 7 en 9 mg/ Flurprimidol) te meten. De conclusie van deze proeven was hetzelfde aan die van de vorige reeks. Tevens is het effect van het vermeerderen in het donker dat de planten wat meer strekken en langzamer groeien dan wanneer in het licht. Hieruit bleek dat de alleen in de hogere concentraties de ongewenste (lengte) groei genoeg geremd werd. Alle vervolproeven zijn uitgevoerd met de meest veelbelovende concentraties van paclobutrazol en flurprimidol (te zijn 10 mg/l).

Tijdens iedere overzetting zijn de clumps in 4 à 5 stukken gesneden (dit betekent een vermeerderingsfactor van gemiddeld 4,5). Bij de vervolgcycli werd iedere keer een gedeelte van de clumps in stukken gesneden van ongeveer 3 mm en op uitgroei medium geplaatst om zo een duidelijker beeld te krijgen van wat de potentie is van de clumps met betrekking tot de hoeveelheid scheuten welke uit de clumps groeien (zie figuur 2). Na 15 weken uitgroei bleek dat het mogelijk was om gemiddeld uit een clump 60 afleverbare planten te snijden. Deze planten zijn allen naar de kas afgeleverd om er een groei- en bloeioproef op los te laten. Van de proeven uit de eerdere periode zijn plantjes opgeplant in de kas. Uit deze groeiproef blijken nog geen afwijkingen.

Naast de cultivar Chico zijn er nog 3 andere cultivars ook op medium met paclobutrazol gezet (10 mg/l). Elke cyclus werd de paclobutrazol concentratie aangepast aan de groei van de clump totdat er geen dominante planten meer op de clump groeiden. Deze proeven zijn nog 4 cycli overgezet en tijdens elke overzetting zijn de clumps in 4 stukken gesneden van ongeveer 3 mm. Ook werd er ieder overzetting materiaal op uitgroei gezet om te zien of er geen nadelige effecten ontstonden door de groei in het donker. Per overzetting zijn de verschillende cultivars beoordeeld op groeiwijze en vergeleken met cultivar 1 Chico (het soort waar de methode mee is ontwikkeld). Aan de hand van deze resultaten wordt iedere cyclus de paclobutrazol- en (indien nodig) de hormoonconcentratie aangepast tot een goede balans is gevonden tussen lengtegroei remming en gewichtstoename. (zie tabel 1)



Figuur 2 uitgroei van *Spathiphyllum* na vermeerdering in het donker

Vitrocom: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia & Syngonium

Cultivar	Hoeveelheid paclo (mg/l)	Dominantie	# planten per clump bij uitgroei
Chico	10	laag	40 - 50
11902	15	hoog	35
12810	17	midden	35
21301	15	laag	40

Tabel 1: verschillen tussen de diverse cultivars

Uit proeven is ook gebleken dat wanneer een clump teruggeplaatst wordt na het oogsten er na 10 weken opnieuw 30 tot 40 planten losgesneden kunnen worden. Totaal komt dit op een aantal van rond de 70 planten per clump. Van de proeven uit de eerdere periode zijn plantjes opgeplant in de kas. Uit deze proef is gebleken dat de planten allen nog true to type waren. Indien er beworteld moet worden is het een kwestie van de clumps snijden op de manier van de vermeerdering maar op uitgroei medium. Hierdoor zullen er (cultivar afhankelijk) binnen 10 tot 15 weken uitgegroeide planten ontstaan op de clumps welke bruikbaar zijn om op te planten in de kwekerij.

Naast de proeven met paclobutrazol en flurprimidol is ook een proef ingezet naar aanleiding van eerdere resultaten. Hierin was te zien bij de controle bakjes (zonder toevoeging van paclobutrazol en flurprimidol) dat de planten in het donker niet als een rozetvormige plant groeiden, zoals bij `normale` vermeerdering, maar een stengel vormde met blad welke mogelijk in oksels te snijden zijn. Dit hebben we dan ook gedaan in deze nieuwe proef (zie figuur 3). De clumps zijn terug gezet op het `nul` medium en de oksels zijn terug op uitgroei medium gezet.



figuur 3: oksels op uitgroei



Figuur 4: oksels na 15 weken uitgroei

De clumps werden elke cyclus kort gesneden en de topjes en oksel stukjes uit deze proeven zijn op een bewortelingsmedium gezet voor uitgroei. Het duurde vrij lang (+/- 15 weken) voordat er een afleverbaar plantje ontstond. Deze plantjes blijken weinig groeikracht hebben (zijn erg klein en iel). De topjes daarentegen doen het wat beter (zie figuur 4). De proef met spathiphyllum zonder toevoeging van paclobutrazol waarbij een stengel werd gevormd welke volgens de oogstekmethode te snijden waren is niet verder voortgezet.

Conclusie

Spathiphyllum is een gewas dat zeer goed te vermeerderen is via weefselkweek in het donker waarbij hoge vermeerderingsfactoren haalbaar zijn gebleken. Wel is duidelijk dat dezelfde methode bij vermeerdering in het licht betere resultaten geeft. Nadelige effecten van een lange duur op hoge paclobutrazol concentraties zijn niet waargenomen.

Vitrocom: *Spathiphyllum*, *Delphinium*, *Musa*, *Zantedeschia* & *Syngonium*

Delphinium

Materialen en Methode

Uitgangsmateriaal: vermeerderingsmateriaal, 5 weken oud, clumps, labnummer 13112, op medium V85-B08.

Gebruikte media: Standaard medium (V85-B08) met een concentratiereeks van paclobutrazol en een reeks van flurprimidol.

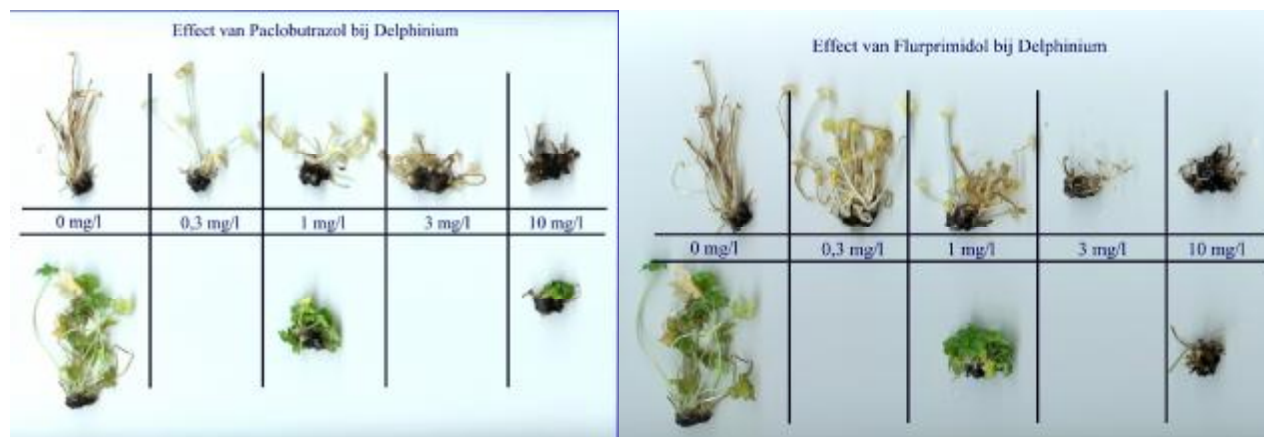
Concentraties:	0	0,3	1	3	10	mg /l
----------------	---	-----	---	---	----	-------

Snijwijze: standaard snijwijze voor Delphinium: clumps delen, blad afsnijden

Klimaat: 16 graden cel, 16 uur licht.

De behandelingen worden weggezet in licht (L) en donker (D) volgens onderstaande opgave:

Concentraties	0	0,3	1	3	10	mg/l
Wegzetten in:	L/D	D	L/D	D	L/D	



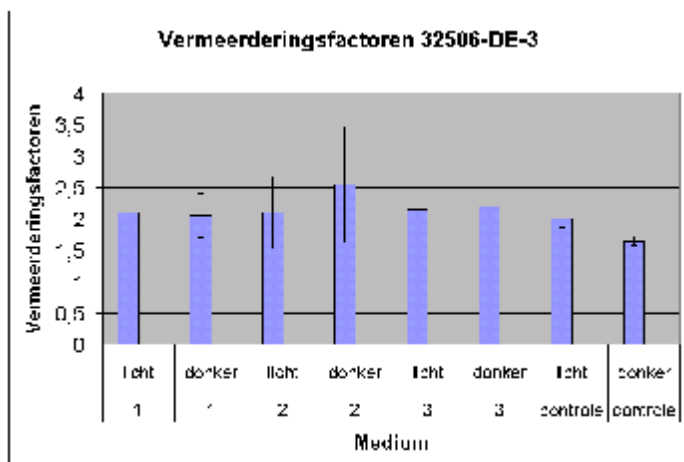
figuur 5: de effecten van Paclobutrazol en flurprimidol

Na twee cycli op de proefmedia zijn alle planten op bewortelingsmedium gezet. Geen grote verschillen waren waarneembaar tussen de behandeling met paclobutrazol en de flurprimidol. Wel was de kwaliteit van het materiaal op flurprimidol beter en de bladnecrose minder (zie figuur 5). Gevolg hiervan was dat besloten werd om door te gaan met flurprimidol in een concentratie tussen 0,3 en 1 mg/l. Na 6 weken op was er geen effect van de behandelingen meer te zien: alle planten die nog een actief groeipunt hadden, groeiden normaal uit met de normale strekking in het blad.

Om de afsterving van de bladeren tegen te gaan waren er proeven opgezet met aangepaste zoutconcentraties. Hiertoe werd standaard medium met MS Modificatie 3b (NH₄NO₃ en KNO₃ halve concentratie) met daaraan toegevoegd flurprimidol (0,5 mg/l) gebruikt. Hieraan werd toegevoegd KH₂PO₄ en MgSO₄ in twee verschillende concentraties. Als blanco's werden meegenomen medium zonder extra toevoeging van sulfaat en fosfaat en het standaard vermeerderingmedium; beide wel met toevoeging van flurprimidol (0,5 mg/l)

code	1	2	3
Concentraties MgSO ₄	90mg/l	180mg/l	0
Concentraties KH ₂ PO ₄	85mg/l	170mg/l	0

Vitrocom: *Spathiphyllum*, *Delphinium*, *Musa*, *Zantedeschia* & *Syngonium*



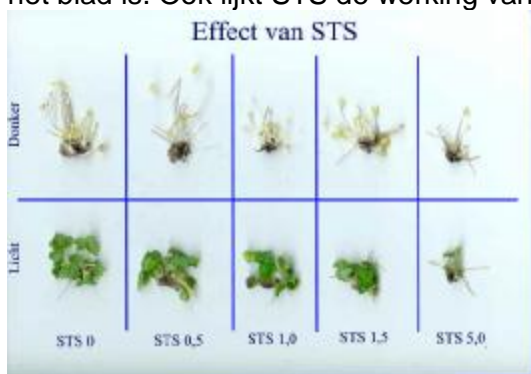
Grafiek 1: De vermeerderingsfactoren van de verschillende behandelingen

Er zijn geen noemenswaardige verschillen waargenomen in deze proef in vergelijking met de controle planten. De verschillen in de vermeerderingsfactoren waren niet significant (zie grafiek 1). Besloten is om deze proef af te sluiten zonder verder vervolg.

Vanuit de bijeenkomsten met de andere participanten in het project bleek dat er meer bedrijven met hetzelfde probleem van necrose zaten. Hiertoe werd als mogelijke oorzaak aangedragen de opeenhoping van het verouderingshormoon ethyleen. Om dit effect te verminderen en dus de bladnecrose kan er aan de voedingsboden zilvernitraat (AgNO_3) of SilverThiosulfate Solution (STS) worden toegevoegd. Aan het vanaf toen standaard vermeerderingsmedium met flurprimidol (0,5 mg/l) werd allereerst toegevoegd de Silver Thiosulfate Solution (STS) in de hoeveelheden hieronder.

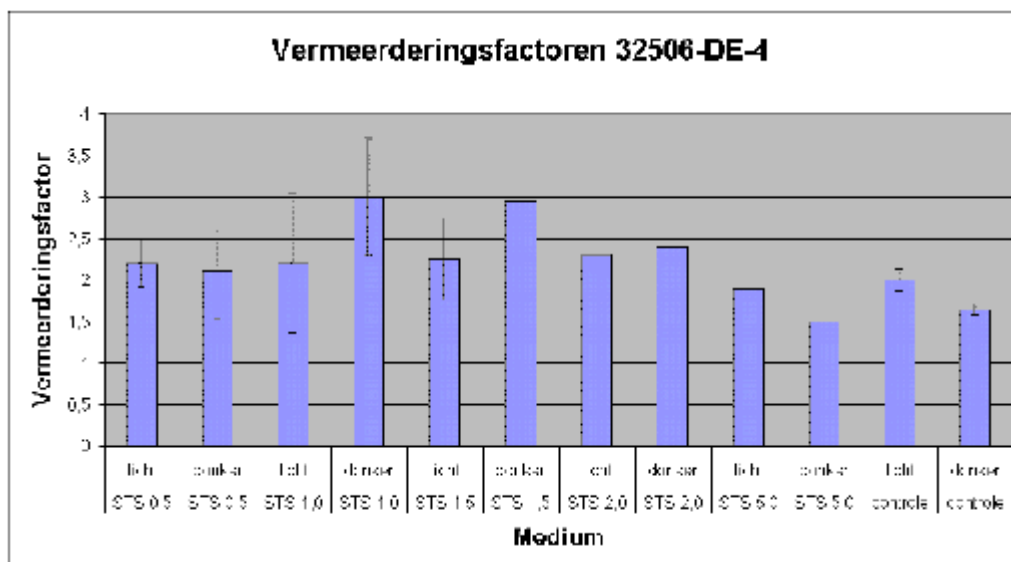
STS 0,2 M stock	0	0.5	1.0	1.5	5 ml
-----------------	---	-----	-----	-----	------

In figuur 6 is duidelijk effect van STS waar te nemen. vergeleken met de nul is goed te zien dat naarmate er meer STS in het medium zit dat er minder bruinkleuring en afsterving van het blad is. Ook lijkt STS de werking van flurprimidol nog wat te versterken.



Figuur 6: het effect van STS

Dezelfde proef werd nog minimaal 2 maal overgezet. De concentratie van 5 ml STS bleek daarin te hoog; de planten blijven bij deze concentratie achter in groei en er worden bijna geen nieuwe scheuten gevormd. In plaats daarvan is er een concentratie van 2 ml opgenomen in de reeks. De planten worden als enkele planten gesneden. In onderstaande tabel (grafiek 2) een vergelijking van vermeerderingsfactoren per STS concentratie.



Grafiek 2: Vermeerderingsfactoren STS-reeks

De proef wordt nog een keer overgezet met dezelfde STS concentraties. De planten worden enkel gesneden.

Hierna werden er nieuwe media toegevoegd aan de proef met een STS concentratie van 1 (tot nu toe de beste) en met verschillende flurprimidol concentraties (0,5; 1,0; 2,0 mg/l) en tevens met een verhoging van het hormoon. Dit er vanuit gaande dat de strekking van de planten nog wat meer geremd moet worden en er wat meer scheutvorming gewenst is.

De vermeerderingsfactoren van de planten op de media met STS 1 en flur 1,0 (vf 1,7) en flur 2,0 (vf 1,3) zijn in vergelijking met de andere media (gemiddeld vf 1,8) lager. De planten hebben ook meer bruin blad. De vermeerderingsfactoren van de planten op de media met STS 1 en flur 1,0 (vf 1,7) en flur 2,0 (vf 1,3) zijn in vergelijking met de andere media (gemiddeld vf 1,8) lager (zie tabel 2). De planten hebben ook meer bruin blad.

Medium	Vf
V-85-B08 flur 0,5 STS 0	2,5
V-85-B08 flur 0,5 STS 0,5	2,9
V-85-B08 flur 0,5 STS 1,0	2,1
V-85-B08 flur 0,5 STS 1,5	3,5
V-85-B1,5 flur 0,5 STS 0	2,1
V-85-B1,5 flur 0,5 STS 0,5	3,3
V-85-B1,5 flur 0,5 STS 1,0	3,7
V-85-B1,5 flur 0,5 STS 1,5	2,7
V-85-B08 flur 2 STS 1,0	1,9
V-85-B08 flur 1 STS 1,0	2

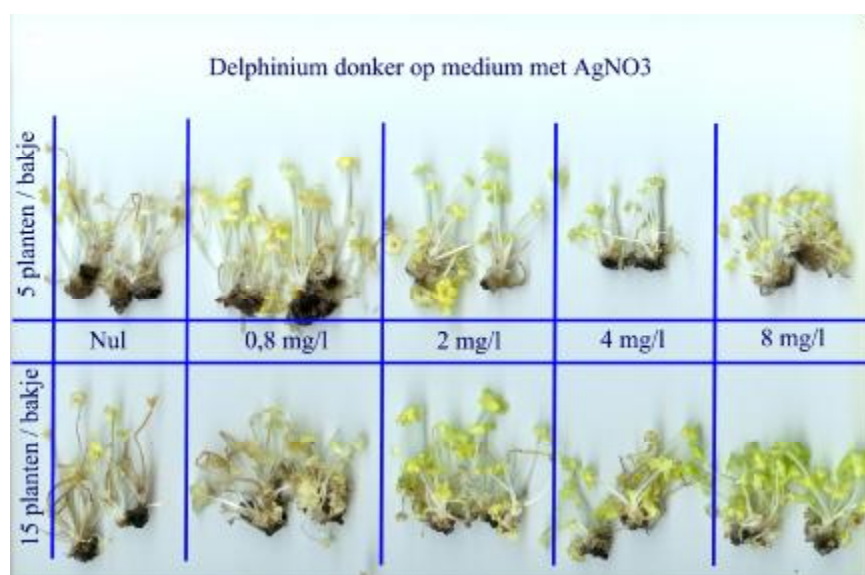
Tabel 2: De vermeerderingsfactoren bij behandeling met STS

Vitrocom: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia & Syngonium

In de media met een hogere BA concentratie zijn goede vermeerderingsfactoren gehaald. Wel wat meer callus onder de planten en de bladeren zijn hier en daar wat gekruld.

De proef met de hogere flurprimidol concentraties werd naar aanleiding van deze resultaten beëindigd. In de herhaling van de proef met hogere BA concentratie bleek dat de vermeerderingsfactoren in de media met een hogere BA concentratie een fractie lager zijn dan in de media met de standaard concentratie. Nog steeds wordt er vrij veel callus onder de planten gevormd en de bladeren zijn hier en daar wat gekruld. Besloten werd om de proef met hogere BA concentraties niet verder te herhalen

Er werd ook nog de andere ethyleenremmer getest: zilvernitraat. Afgeleid van publicaties uit de literatuur zijn er proeven gedaan met diverse concentraties van AgNO₃ (0; 0,8; 2; 4 en 8, zie figuur 7). Deze resultaten zijn vergeleken met die van STS aan de hand van de vermeerderingsfactoren en de groei van de plant is bepaald dat de planten beter reageren op AgNO₃ dan op STS. In het vervolg wordt er dan ook AgNO₃ gebruikt in plaats van STS. De beste concentratie hiervoor is 8 mg/l bij 0,5 mg/l flurprimidol



Figuur 7: effect van AgNO₃ op Delphinium

Duidelijk is geworden dat de ongewenste effecten (afsterven van blad en glazigheid) ongedaan gemaakt kunnen worden door ethyleenremmers toe te voegen aan het medium. De resultaten met Zilvernitraat zijn beter.

Uit de proeven is gebleken dat vermeerdering in het donker van delphinium mogelijk is en een werkzaam protocol is ontwikkeld. Dit protocol is zeer waarschijnlijk ook toepasbaar op andere delphinium cultivars mits er eerst een periode van 3 à 4 cycli vooraf gaat waarin de concentraties zilvernitraat en flurprimidol verfijnd worden voor de betreffende cultivar. Alle in het donker vermeerderde delphinium cultivars groeiden in de kas normaal en bleken true-to-type.

Een nadeel van het systeem van vermeerdering in het donker is dat het een erg gevoelig systeem is: de cyclusduur mag niet overschreden worden, anders treed er necrose en glazigheid op waardoor de planten niet meer bruikbaar zijn. Voordeel is dat de planten over het algemeen beter en makkelijker wortels vormen in de bewortelingsfase. Of dit werd veroorzaakt door de vermeerdering in het donker of door de toevoeging van flurprimidol is onduidelijk.

Initiële proeven andere gewassen

musa

Een initiële donkerproef is opgezet voor musa. Materiaal van musa nummer 44702 is op medium gezet dat ook voor de spathiphyllum gebruikt wordt. Namelijk MS, 30 gr/l sucrose, 6 gr/l agar en 10 mg/l paclobutrazol. Zie figuur 8.

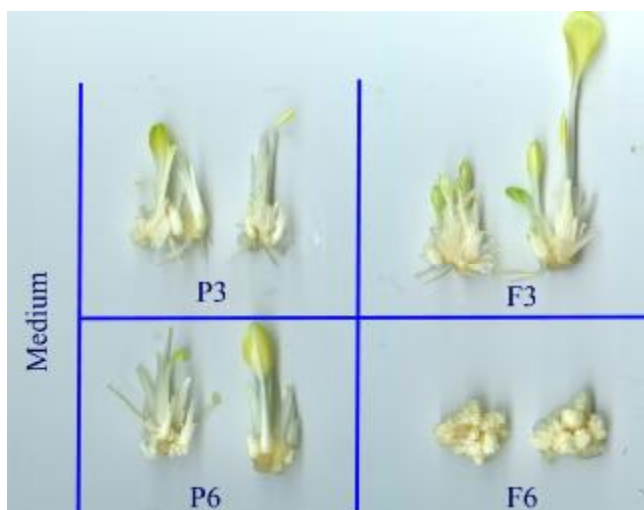


Figuur 8: musa clumps donker

De proeven met musa zijn 2 maal herhaald maar hierna beëindigd ivm matige tot slechte resultaten. Veel van de explantaten vertoonden bladnecrose als gevolg van fenolvorming in het media .

zantedeschia

Naar aanleiding van goede resultaten van andere participanten van dit project werd een eerste donkerproef opgezet voor zantedeschia nummer 40306. Het gebruikte medium bestaat uit MS, 30 gr/l sucrose, 6 gr/l agar en 1 mg/l paclobutrazol of 1 mg/l flurprimidol. Deze concentraties werden twee cycli later aangepast en verhoogd tot 3mg/l en 6 mg/l ivm te weinig remming van de lengtegroei. Wel was te zien dat door een verhoogde concentratie van paclobutrazol of flurprimidol er meer (ongewenst) callus ontstaat. De gebruikte media zijn verder hormoonloos. Dit omdat de gebruikte cultivar in de normale vermeerdering op medium met zeer laag hormoon staat (0.1 mg/l BA). Er werd dus gezocht naar een medium die de juiste balans geeft tussen lengtegroeiremming en geen of minimale callusvorming. Zie figuur 9.



Figuur 9: zantedeschia donker op diverse media

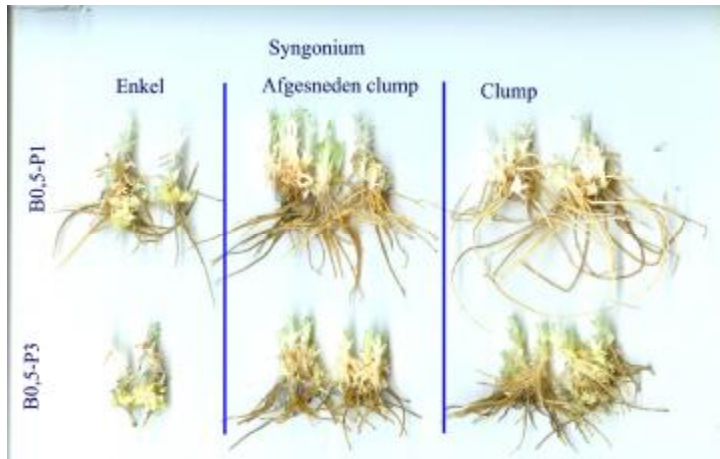
Het medium met flurprimidol welke initieel is gebruikt gaf te veel explantaten met overmatige callus vorming. Hierdoor is gestopt met het gebruik van flurprimidol in de media. Bij paclobutrazol is te zien dat door bij verhoogde concentraties van paclobutrazol er ongewenst callus kan ontstaan (figuur 9, F6).

Vitrocom: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia & Syngonium

Het lijkt dat het meest optimale medium is gevonden die de juiste balans geeft tussen lengtegroeiremming en geen of minimale callus vorming. De eerste T1 knollen zijn reeds geoogst en de planten leken tot nu toe true to type. Echter dit is nog afwachten tot de planten in bloei komen.

syngonium

Bij syngonium is gebleken dat al na een aantal cycli een zeer werkbaar systeem is te gebruiken. Er is gebruik gemaakt van MS medium met 30gr/l sucrose, 6 gr/l agar, 0.5 mg/l benzylaminopurine (BA) en paclobutrazol in de concentraties 1 en 3 mg/l. Het gewas is te snijden in clumps, topjes en oksels (tussenstukjes).



Figuur 9: syngonium donker

Syngonium is in de afgelopen periode nog een aantal malen overgezet. Hierbij werden verschillende explantaten gebruikt zoals enkele top scheutjes, stengeldelen met enkele internodiën en clumps. Allen groeiden goed uit (zie figuur 9). Het systeem blijkt goed werkbaar. Er is gebruik gemaakt van MS medium met 30gr/l sucrose, 6 gr/l agar, 0.5 mg/l benzylaminopurine (BA) en paclobutrazol in de concentratie 2 mg/l.

De vermeerderingsfactoren lagen, in plaats van rond 1.8, rond de 3.5 wat bijna 2x zo hoog is als in de normale vermeerdering.

Vitrocom: Spathiphyllum, Delphinium, Musa, Zantedeschia & Syngonium