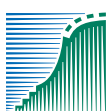




# Optimalisering van beworteling van uitgangsmateriaal voor de biologische landbouw

Luc H. Stevens, Ria (M.P.M.) Derkx, Barbara A. Eveleens-Clark & Hanneke (J.A.A.) van Zuilichem







# Optimalisering van beworteling van uitgangsmateriaal voor de biologische landbouw

Luc H. Stevens<sup>1</sup>, Ria (M.P.M.) Derkx<sup>2</sup>, Barbara A. Eveleens-Clark<sup>2</sup> & Hanneke (J.A.A.) van Zuilichem<sup>2</sup>

1 Plant Research International

2 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

© 2005 Wageningen, Plant Research International B.V. en Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.  
Plant Research International en Praktijkonderzoek Plant & Omgeving zijn niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van deze nota zijn opvraagbaar bij Luc Stevens, luc.stevens@wur.nl of bij Ria Derkx, ria.derkx@wur.nl

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en in het kader van het programma 338 'Biologisch uitgangsmateriaal'.

**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.plant@wur.nl  
Internet : www.plant.wur.nl

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.  
Akkerbouw, Groene Ruimte en Vollegrondsgroente**

Adres : Edelhertweg 1, Lelystad  
: Postbus 430, 8200 AK Lelystad  
Tel. : 0320 – 29 11 11  
Fax : 0320 – 23 04 79  
E-mail : infoagv.ppo@wur.nl  
Internet : www.ppo.wur.nl

# Inhoudsopgave

	pagina
1. Inleiding	1
2. Ontwikkeling biologisch stekpoeder	3
2.1 Aanpak	3
2.2 Bereiding van de bewortelingsmiddelen	3
2.2.1 Suspensies	4
2.2.2 In talk geformuleerd bacterieel IAA als bewortelingsmiddel	4
2.2.3 In algiinaat geïncapsuleerde <i>Azospirillum brasilense</i> als bewortelingsmiddel	4
2.2.4 Gecombineerde preparaten van geformuleerd bacterieel IAA en geïncapsuleerde <i>Azospirillum brasilense</i>	5
3. Effect van de bewortelingsmiddelen op dahlia	7
4. Effect van de bewortelingsmiddelen op snijroos	9
4.1 Proefopzet	9
4.2 Resultaten	9
5. Effect van de bewortelingsmiddelen op boomkwekerijgewassen	15
5.1 Proefopzet	15
5.2 Resultaten	17
6. Effecten van het manipuleren van de moerplanten op de beworteling	25
6.1 Proefopzet	25
6.2 Resultaten	26
7. Discussie en conclusies	29
7.1 Biologisch stekpoeder	29
7.2 Moerplantbehandeling	29
8. Gebruikte afkortingen	31



# 1. Inleiding

Een groot deel van de productie van plantaardig uitgangsmateriaal gebeurt door vegetatieve vermeerdering via stekken. Voor het verkrijgen van een hoog percentage gezonde planten met een gelijkmatig en compact wortelstelsel worden de stekken voorbehandeld met bewortelingsmiddelen die auxine bevatten. Auxinen vormen een klasse van groeiregulatoren die de wortelvorming bevorderen en de uitloop van scheuten remmen.

De richtlijnen voor de productie van uitgangsmateriaal voor de biologische plantenteelt sluiten het gebruik van synthetische bewortelingsmiddelen uit. Omdat slechts synthetische bewortelingsmiddelen op de markt zijn, is stekvermeerdering van vooral houtige gewassen voor de biologische teelt geen reële mogelijkheid. Wanneer dit praktische probleem niet opgelost wordt, is het materieel onmogelijk om de gewenste groei van het biologisch marktaandeel van deze gewassen te verwezenlijken.

Dit probleem kan in beginsel verholpen worden door bewortelingsmiddelen op de markt te brengen die gebaseerd zijn op natuurlijke bronnen van auxine. Micro-organismen die van nature plantengroeiregulatoren produceren kunnen een dergelijke bron zijn. Hier wordt verslag gedaan van de ontwikkeling van een biologisch bewortelingsmiddel dat gebaseerd is op de bodembacterie *Azospirillum brasilense*. Deze vrij levende stikstoffixerder produceert verschillende groeiregulatoren, waaronder ruime hoeveelheden van het natuurlijke auxine indolazijnzuur (IAA).

Een mogelijk tweede alternatief voor synthetische bewortelingsmiddelen is het manipuleren van de moederplanten voordat er stek van genomen wordt. Uit buitenlands onderzoek is gebleken dat ook zonder gebruik te maken van auxine enige verbetering in de beworteling van diverse boomkwekerijgewassen bereikt kan worden; behandelingen als etioleren (= tijd in het donker kweken) en verkorting van de fotoperiode gaven verbetering van de beworteling in enkele houtige gewassen. Ook het stektijdspunt en de leeftijd en kwaliteit van de moederplanten kunnen effect hebben op het bewortelingsresultaat.

Het doel van het onderzoek was de ontwikkeling van een bewortelingsmiddel dat voldoet aan de richtlijnen van de biologische landbouw en dat net zo goed werkt als synthetische middelen. Daarnaast werd onderzocht voor enkele moeilijk wortelende boomkwekerijgewassen onderzocht of etioleren een goed alternatief is. Het onderzoek is het gezamenlijke werk van PPO-instellingen (PPO Bollen & Bomen en PPO Glas) en Plant Research International en werd uitgevoerd in de periode 1 januari 2001 – 31 december 2003.





## 2. Ontwikkeling biologisch stekpoeder

### 2.1 Aanpak

Als biologische bron voor het benodigde auxine werd gekozen voor de bodembacterie *Azospirillum brasilense*. De bacterie werd opgekweekt in standaard, vloeibaar Luria Bertani medium (LB-medium), dat is samengesteld uit gist-extract, trypton, zouten en water. Om verhoogde IAA-productie te verkrijgen werd 10 mg/l van het aminozuur tryptofaan toegevoegd, dat een precursor is van IAA. De grondstoffen zijn allemaal te verkrijgen uit natuurlijke bronnen.

Uitgaande van een bacterie als biologische bron van auxine zijn er in principe mogelijkheden voor drie typen van bewortelingsmiddel, namelijk:

1. Bewortelingsmiddel dat het auxine bevat dat door de bacterie geproduceerd is. Het auxine stimuleert net als gangbare middelen direct en kortstondig de beworteling.
2. Bewortelingsmiddel dat niet het hormoon maar wel kolonievormende eenheden van de bacterie bevat. Toediening van het middel komt neer op inoculatie van de stek met de bacterie. Wanneer de bacterie zich weet te vestigen bevat de stek een zich vermeerderende bron van auxine, met naar verwachting een langdurige stimulering van de beworteling en op termijn een robuustere plant.
3. Bewortelingsmiddel dat zowel het auxine als kolonievormende eenheden van de bacterie bevat. Dit middel combineert het korte- en lange-termijn effect van 1 en 2, en vormt daarmee een bewortelingsmiddel met toegevoegde waarde ten opzichte van de synthetische bewortelingsmiddelen.

Bij aanvang van het project werd gekozen voor de derde optie: er werd geprobeerd kolonievormende eenheden van de bacterie te formuleren tezamen met het auxine dat in de opkweekfase door de bacterie geproduceerd was. Op aanwijzingen vanuit de gebruikersgroep werd met het oog op een praktische toediening van het middel gekozen voor een droge stekpoeder formulering. Hiertoe werd op basis van literatuurgegevens geformuleerd met veenmosveen, hetgeen een gangbare carrier is voor micro-organismen. De diverse preparaten werden uitgetest op moeilijk te bewortelen gewassen, namelijk snijroos, dahlia, *Magnolia stellata* en *Acer palmatum* 'Atropurpureum'.

Het gebruik van veenmosveen als dragermateriaal van *Azospirillum* cultures bleek in onze proeven echter een ongelukkige keuze te zijn omdat (a) de bacterie het drogen van het geformuleerde eindproduct niet overleefde, en (b) de hoeveelheid IAA aan de stek mede daardoor uiteindelijk te gering was. Daarom werd vervolgens gekozen voor de aanpak om de bacteriën en het bacterieel geproduceerde IAA apart en met andere formuleringmethoden op te werken tot twee afzonderlijke producten (hetgeen in principe neerkomt op de hierboven getypeerde bewortelingsmiddelen 1 en 2). De bacteriën werden geïncapsuleerd in alginaatbolletjes en gedroogd; het bacterieel geproduceerde IAA werd gevriesdroogd en geformuleerd met talk. Deze middelen werden afzonderlijk en gecombineerd getest op hun effectiviteit als bewortelingsmiddel op dahlia (PPO Bollen & Bomen), snijroos (PPO Glas), *Magnolia stellata* en *Acer palmatum* 'Atropurpureum' (PPO Bollen & Bomen).

### 2.2 Bereiding van de bewortelingsmiddelen

De bacterie werd in batches van 1 liter opgekweekt op vloeibaar LB-medium. Wanneer de bacterie-culture de stationaire fase bereikt had, werd deze middels centrifugatie gescheiden in twee fracties, namelijk in (1) het medium, waarin het biologische IAA zich bevond, en (2) de bacteriën. Het medium en de bacterie werden in verschillende concentraties tot afzonderlijke suspensies of geformuleerde preparaten verwerkt zoals hieronder beschreven.

## 2.2.1 Suspensies

In de diverse stekproeven werden het medium en suspensies van verschillende concentraties bacteriën al dan niet gecombineerd in ongeformuleerde toestand aan de stekken toegediend middels dippen: de stek werd hierbij voor kortere of langere tijd (variërend van minuten tot enkele uren) in de vloeistof gedoopt. Op deze wijze konden het effect van het IAA dat door de bacterie in het medium uitgescheiden was, het effect van de bacterie, en het effect van de combinatie van beiden getest worden.

## 2.2.2 In talk geformuleerd bacterieel IAA als bewortelingsmiddel

Het medium waarin zich het bacterieel geproduceerde IAA bevond, werd verwerkt tot een droge poederformulering met talk als dragermateriaal, zoals bij conventionele stekpoeders. Om in het uiteindelijke product een voldoende hoog hormoongehalte te verkrijgen werd het medium door vriesdrogen sterk geconcentreerd. Een dergelijke stap brengt met zich mee dat storende restcomponenten en nevenproducten uit de opweek net zo geconcentreerd in het eindproduct terecht komen. Met het doel deze hoeveelheden 'ballast' uit het opweekmedium te minimaliseren, met maximale IAA-productie, zijn in factoriële experimenten uiteenlopende combinaties van opweekparameters uitgetest. Dit heeft geresulteerd in aangepaste opweekprotocollen, en een LB-opweekmedium met sterk gereduceerde hoeveelheden zouten en andere mediumcomponenten.

De IAA-gehalten werden bepaald met een spectrofotometrische assay en met behulp van HPLC met UV-detectie. Met de aangepaste protocollen werd een IAA-concentratie van ca. 0.8 à 1 mmol per liter kweekmedium bereikt. HPLC-analyse wees uit dat tijdens de opweek van de bacteriën ca. 20% van de tryptofaan was omgezet. Afgezien van de verwijderde bacteriën werd per liter volgegroeid kweekmedium ca. 3 gram droge stof gewonnen. Dit geelbruine materiaal was eenvoudig tot poeder te verpulveren.

Het verpoederde, gevriesdroogde kweekmedium werd met talk vermengd in verhoudingen die leidden tot de gewenste IAA-gehalten (variërend van 0.2 tot 2 gew.-%). Menging gebeurde achtereenvolgens met behulp van een mortier en rollerbank zodat een homogeen eindproduct ontstond.

Voor het bereiden van een stekpoeder met een IAA-gehalte van ca. 2% zijn ca. 1 deel talk en 2 delen van het gevriesdroogde medium nodig. De relatief hoge kosten die verbonden zijn aan de productie van het bacterieel product maken het interessant om te zoeken naar mogelijkheden om de gevoeligheid van de stek voor auxine te verhogen. Experimenten uit het verleden uitgevoerd bij PRI hebben laten zien dat nonanaat en calciumlignosulfonaat een dergelijke werking bezitten. Daarom werden ook prototypen van stekpoeder bereid waarin behalve de uiteenlopende hoeveelheden van het gevriesdroogde medium ook natriumnonanaat (0.5 gew.-%) of calciumlignosulfonaat (1 gew.-%) werden toegevoegd.

De talkformuleringen van het gevriesdroogde, door *Azospirillum* begroeide medium bevatten naast IAA uiteraard ook andere producten van de bacterie en (omgezette) resten van het kweekmedium. Deze componenten kunnen een negatief effect op de beworteling hebben, maar mogelijk ook de beworteling verbeteren. Daarom zijn ook talkformuleringen bereid met daarin uiteenlopende concentraties zuiver natrium-IAA die in de experimenten als controles fungeerden.

## 2.2.3 In alginaat geïncapsuleerde *Azospirillum brasilense* als bewortelingsmiddel

Op basis van literatuurgegevens werd een protocol opgesteld voor de incapsulatie van de bacterie. Een geconcentreerde suspensie van *Azospirillum brasilense* (stationaire fase) in begroeid medium werd 1:1 gemengd met een 2% (w/v) alginaatoplossing waaraan al dan niet melkpoeder was toegevoegd. Dit mengsel werd via een pomp en druppelverdeler in een 100 mM CaCl<sub>2</sub>-oplossing gedruppeld. De ontstane bolletjes werden na afharding gewassen en in vers

kweekmedium gebracht, waarna de geïncapsuleerde bacteriën zich gedurende de nacht verder konden vermeerderen. Na wassen en vriesdrogen werden de alginaatbolletjes verpoederd in een mortier.

Plaattellingen van de eindproducten lieten zien dat een substantieel, maar enigszins tegenvallend aantal vitale bacteriën in het droge eindproduct aanwezig was (ca.  $10^7$  cfu/g droog poeder, wat neerkomt op een overlevingspercentage van ongeveer 0.1%).

#### 2.2.4 Gecombineerde preparaten van geformuleerd bacterieel IAA en geïncapsuleerde *Azospirillum brasilense*

Van bovengenoemde formuleringen van het bacteriële IAA-preparaat en de geïncapsuleerde bacterie zijn homogene mengsels bereid gebruik makend van een mortier en rollerbank. Ook de effecten van deze mengsels zijn getest op stekken van de verschillende gewassen.



### 3. Effect van de bewortelingsmiddelen op dahlia

In de bloembollen- (en knollen)teelt wordt alleen bij de stekproductie van dahlia gebruik gemaakt van stekpoeder. Het dahlia-assortiment vertoont een vrij grote spreiding van bewortelbaarheid van stekken. Er zijn cultivars die ook zonder stekpoeder goed bewortelen, maar er zijn ook cultivars die moeilijk bewortelen, ondanks het gebruik van stekpoeder. Vooral de moeilijker te bewortelen cultivars leveren later meer geld op en zijn daarom interessant om te telen voor een rendabele biologische teelt. In de gangbare praktijk wordt overwegend gebruik gemaakt van Rhizopon B (0.2% 1-naftylazijnzuur). In dit project werden stekmiddelen beproefd op dahliastekken van de moeilijk bewortelbare cv. 'Eveline' en van de gemiddeld bewortelende cv. 'Autumn Fairy'.

In het eerste seizoen (2002) zijn de effecten onderzocht van (1) *Azospirillum brasilense* in begroeid medium vermengd met veenmosveen als carrier, (2) het door *Azospirillum* begroeide medium afzonderlijk vermengd met veenmosveen als carrier, en (3) *Azospirillum* gewassen en geresuspendeerd in fosfaatbuffer. Verder zijn als controles meegenomen (4) Rhizopon B, (5) veenmosveen, en (6) een onbehandelde controlegroep. De gangbare behandeling met Rhizopon B gaf het beste bewortelingsresultaat, terwijl de onbehandelde stekken het minst goed bewortelden. De andere behandelingen vertoonden geen sterk positief resultaat. Bij de moeilijk bewortelende cultivar 'Eveline' werd een licht positief effect gevonden bij de veenmosveenformulering met *Azospirillum* in begroeid medium en met de veenmosveenformulering met alleen het begroeide medium. Dit wijst op een stimulerend effect van de door de bacterie in het medium uitgescheiden auxine.

In het seizoen 2003 werden diverse formuleringen op basis van combinaties van *Azospirillum*, door *Azospirillum* begroeid medium (met daarin bacterieel auxine), synthetisch auxine en een elicitor getest, al dan niet geformuleerd met de carriers talk en/of alginaat. De gangbare behandeling met het bewortelingsmiddel Rhizopon B gaf ook nu weer het beste resultaat, en de onbehandelde stekken het slechtste. Het effect van de behandelingen met bacteriële producten was uiterst gering. Geconcludeerd werd dat voor een goed resultaat de hoeveelheid bacterieel auxine verhoogd diende te worden. Hiertoe werden nieuwe preparaten bereid. Omdat de dahlia-proeven zo sterk seizoensgebonden zijn, konden de middelen echter niet meer op dahlia uitgetest worden. Voor effecten op de beworteling van snijroos, *Magnolia stellata* en *Acer palmatum* zie hoofdstuk 4 en 5.



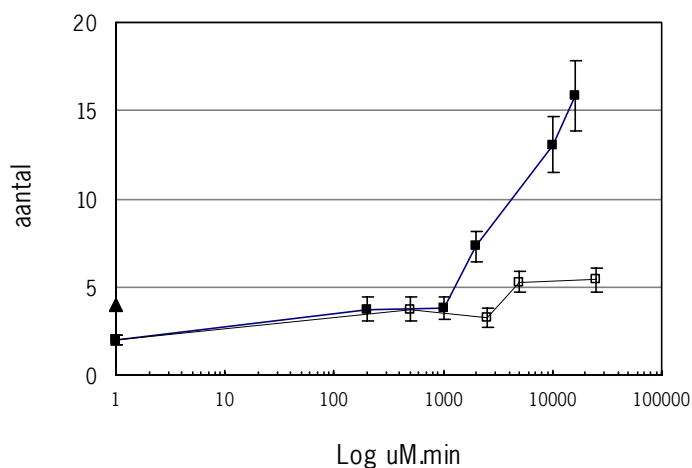
## 4. Effect van de bewortelingsmiddelen op snijroos

### 4.1 Proefopzet

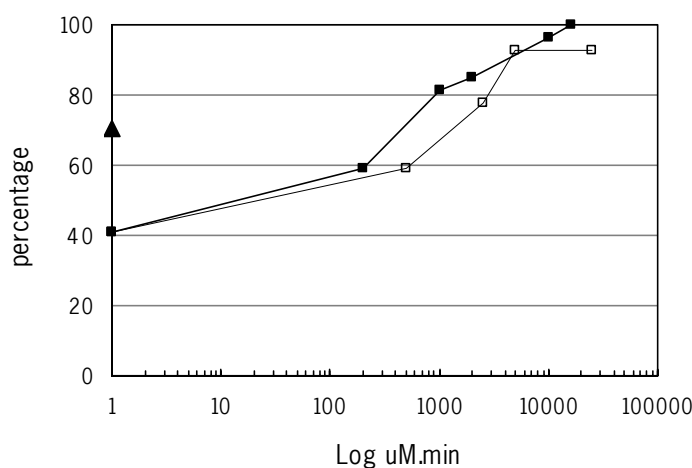
Na het dopen van de onderkant van de stek in verschillende preparaten zijn de stekken in kokospluggen beworteld bij 23 °C substraat temperatuur, 100% R.V., 650 ppm CO<sub>2</sub>, 18 uur licht (minimaal 10 Wm<sup>-2</sup> op stek niveau) en is het aantal wortels en het percentage beworteling in alle experimenten na 21 dagen bepaald. Per behandeling zijn 2 x 27 stekken beoordeeld en geanalyseerd met variatieanalyse. In één serie proeven (experiment 2) zijn IAA/indolboterzuur (IBA) dosis-responscurven gemaakt voor het aantal wortels en het percentage beworteling van de cultivar 'First Red' in kokospluggen. Naar aanleiding van eerdere resultaten van proeven met rozenstek bij PPO Aalsmeer is gebruik gemaakt van het begrip 'concentratie x dipduur'. De concentratie van de oplossing vermenigvuldigd met de tijd dat het stekje in de oplossing staat, is een maat voor de effectiviteit van de behandeling op de beworteling. De stekken werden gedurende 1, 5, 10 en 50 minuten in een oplossing van 500 µM IAA of gedurende 1, 5, 10, 50 en 80 minuten in een oplossing van 200 µM IBA gedoopt. Deze stekken werden vergeleken met stekken die gedurende 5 minuten gedoopt waren in een verse bacteriesuspensie in buffer. Als controle dienden stekken die alleen in buffer werden gedoopt. In experiment 6 is naast cv. First Red een tweede cultivar (Vendela) en tweede substraat (steenwol blokken) opgenomen.

### 4.2 Resultaten

De stekpoederformuleringen in experiment 1 gaven teleurstellende resultaten (Tabel 1). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de wijze van toediening in dit experiment (aanhangend stekpoeder) leidt tot een ontoereikende hoeveelheid inoculum/IAA per stek. Aan de iets vochtige stekken hechtte de talk gemakkelijk, maar de humus slecht. Dit was ook aan de resultaten te zien omdat er significant meer wortels gevormd werden bij de behandelingen met talk vergeleken met die met humus. Dit gold ook voor de handelstoepassing 0.5% w/w synthetisch IBA in talk of humus. Het toevoegen van tryptofaan aan het opweekmedium van de bacterie als precursor van IAA gaf geen verbetering van het aantal wortels of het percentage beworteling. In experiment 2 (zie Tabel 1) is een vloeibare formulering van de verse bacteriesuspensie in buffer getest. Na drie weken bleek het aantal wortels en het percentage bewortelde stekken bij stekken gedoopt in bacteriesuspensie hoger dan bij onbehandelde stekken (Figuur 1 en 2). Gebaseerd op de dosisrespons curven van IAA en IBA lijkt de concentratie auxine in de bacteriesuspensie overeen te komen met het gebied van 200 tot maximaal 1000 µM IAA.



*Figuur 1. Gemiddeld aantal wortels en standard error (s.e.) per stekje na behandeling met IBA (dichte symbolen). Het driehoek geeft aan hoeveel wortels de bacteriesuspensie in experiment 2 heeft. Voor verdere uitleg zie tekst.*



*Figuur 2. Gemiddelde percentage wortels per stekje na behandeling met synthetische-IAA (open symbolen) en synthetische-IBA (dichte symbolen). Het driehoek geeft aan de percentage beworteling de bacteriesuspensie in experiment 2 veroorzaakt. Voor verdere uitleg zie tekst.*

De vloeibare formulering in experiment 2 (zie Tabel 1) verhoogde wel het percentage beworteling en aantal wortels per stek. In experiment 3 zijn bacteriesuspensies, oplossingen van synthetisch IAA (aangedikt met cellulose) en een natte veenmosveenformulering getest door 1 ml van deze mengsels in een voorgestoken gat te brengen waarop vervolgens de stekken geplaatst werden. Daarnaast zijn stekken behandeld door ze korter (1 uur) of langer (4 uur) in deze mengsels te dippen (zie experiment 3, Tabel 1). Om de veelbelovende resultaten bij lange diptijden van bacterie met begroeid medium nogmaals te testen zijn begroeid medium en bacterie gedurende een reeks diptijden (0.5, 1, 2 en 4 uur) getest (experiment 4, resultaten niet weergegeven). Een diptijd van 4 uur bevorderde de beworteling, maar veroorzaakte bladbeschadiging. Hetzelfde effect was ook zichtbaar in poeders waarin een hoge concentratie van met Azospirillum begroeid medium aanwezig was. Waarschijnlijk zijn zouten uit het opkweekmedium de oorzaak van deze beschadigingen.

Na overleg met potentiële vermarkters en na het testen van rozenstek met synthetisch IAA is gekozen voor een poederformulering. In experiment 5 is naast talk ook een alginaat-preparaat als bewortelingspoeder opgenomen in de proef. Effecten van met Azospirillum begroeid-medium, Ca-lignosulfonaat en melkpoeder werden ook getest maar de resultaten (niet weergegeven) waren niet bemoedigend.



Tabel 1. Overzicht van de resultaten van de bewortelingsproeven in experiment 1,2 en 3.

Expt	Draagstof/vorm	Soort preparaat	N wortels <sup>1</sup>	Beworteling (%) <sup>1</sup>	Opmerking
1	Talk/poeder	Gedroogde bacterie in poeder	4.7 ns <sup>2</sup>	93.6 ns	Talk hechtte beter aan het stekje; talk als drager stimuleerde het aantal (N) wortels t.o.v. humus
1	Humus/poeder	Gedroogde bacterie in poeder	3.4 ns	83.4 ns	
1	Talk	Handelstoepassing (0.5%) IBA	18.4 sg	38.3 ns	
1	Humus	Handelstoepassing (0.5%) IBA	8.2 sg	71.6 ns	
2	Vloeibaar	Bacterie suspensie	3.5 ns	70.4 sg	N wortels moet nog hoger zijn
3	Vloeibaar Dip 1 uur	Bacterie suspensie + begroeid medium	7.0 sg <sup>2</sup>	77.8 ns	In vloeibare dip behandelingen is de bacterie suspensie verantwoordelijk voor een verhoging van N wortels
3	Vloeibaar Dip 1 uur	Begroeid medium	5.6 ns	77.8 ns	
3	Vloeibaar Dip 4 uur	Bacterie suspensie + begroeid medium	10.9 sg	83.3 ns	
3	Vloeibaar Dip 4 uur	Begroeid medium	4.4 ns	74.1 ns	
3	Veen substraat/ poeder	Bacterie en begroeid medium	4.1 ns	74.1 ns	Veensubstraat is niet geschikt omdat de behandelingen geen verhoging t.o.v. de controle lieten zien
3	Veen substraat/ poeder	Begroeid medium	4.0 ns	75.9 ns	
3	Vloeistof met cellulose	Bacterie en begroeid medium	4.5 sg	61.1 sg	De bacterie in de cellulose verhoogt N wortels. De controle behandeling had een laag aantal wortels
3	Vloeistof met cellulose	Begroeid medium	2.8 ns	61.1 sg	
3	Poeder	Handelstoepassing 0.4% IBA	33.6 sg	<90 sg	

<sup>1</sup> Significantie berekend t.o.v. controle: rozenstek zonder bewortelingshormoon. De significantie is berekend voor het aantal wortels en percentage beworteling per behandeling en per controle.

<sup>2</sup> ns: niet significant; sg: significant op  $P < 0,05$  niveau.

Daarom is overgegaan op het testen van een hogere concentratie IAA. In plaats van 0.1 tot 0.4% (w/w) zoals gebruikt in experiment 5 zijn door een aangepaste voorbereidingsmethodiek (zie paragraaf 2.2.2) poeders met 0.4, 0.8 en 2% (w/w) bacterieel geproduceerd IAA gemaakt. In experiment 6 (zie Tabel 2) zijn deze getest en zowel 0.8 als 2% (w/w) IAA gaven een significant hoger aantal wortels. Ook is het percentage beworteling verhoogd. Het toevoegen van Na-Nonanaat of Ca-lignosulfonaat gaf geen verbetering van de resultaten.

Tabel 2. *Overzicht van de resultaten van de bewortelingsproeven in experiment 6 en 7.*

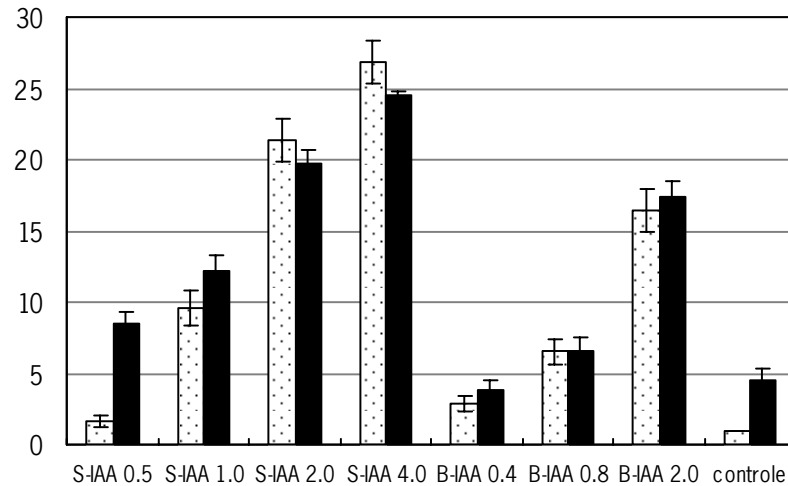
Expt	Draagstof/vorm	Soort preparaat	N wortels <sup>1</sup>	Beworteling (%) <sup>1</sup>	Opmerking
6	Poeder	Bacterieel IAA 0.8% (w/w)	4.9 <sup>2</sup> sg	76 sg	2% (w/w) bacterieel IAA geeft goede resultaten
6	Poeder	Bacterieel IAA 2% (w/w)	16.4 sg	96 sg	
6	Poeder	Handelstoepassing 2% (w/w) synthetische IAA)	21.4 sg	100 sg	
7	Poeder	Bacterieel IAA 0.8% (w/w)	6.6 ns	89 ns	Herhaling expt 6. First Red, kokos 2% (w/w) bacterieel IAA geeft goede resultaten
7	Poeder	Bacterieel IAA 2% (w/w)	17.4 sg	100 ns	
7	Poeder	Bacterieel IAA 0.8% (w/w)	8.9 sg	96 ns	First Red, kokos. 0.8% (w/w) en 2% (w/w) bacterieel IAA geven goede resultaten
7	Poeder	Bacterieel IAA 2% (w/w)	16.8 sg	93 ns	
7	Poeder	Bacterieel IAA 0.8% (w/w)	14.1 n.s	100 ns	Vendela, kokos 2% (w/w) bacterieel IAA geeft goede resultaten
7	Poeder	Bacterieel IAA 2% (w/w)	21.9 sg	100 ns	
7	Poeder	Bacterieel IAA 0.8% (w/w)	12.0 sg	89 ns	First Red, steenwol 0.8% (w/w) en 2% (w/w) bacterieel IAA geven goede resultaten
7	Poeder	Bacterieel IAA 2% (w/w)	15.0 sg	98 ns	
7	Poeder	Bacterieel IAA 0.8% (w/w)	14.0 ns	92 ns	Vendela, steenwol 2% (w/w) bacterieel IAA geeft goede resultaten
7	Poeder	Bacterieel IAA 2% (w/w)	16.0 sg	100 ns	
7	Poeder	Handelstoepassing 2% (w/w) synthetische IAA)	19.7 sg	100 ns	First Red kokos
7	Poeder	Handelstoepassing 2% (w/w) synthetische IAA)	22.2 sg	100 ns	Vendela kokos
7	Poeder	Handelstoepassing 2% (w/w) synthetische IAA)	13.0 sg	100 ns	First Red steenwol
7	Poeder	Handelstoepassing 2% (w/w) synthetische IAA)	17.0 sg	83 sg	Vendela steenwol

<sup>1</sup> *Significantie berekend t.o.v. controle: rozenstek zonder bewortelingshormoon. De significantie is berekend op het aantal wortels en percentage beworteling per behandeling en per controle.*

<sup>2</sup> *ns: niet significant; sg: significant op  $P < 0,05$  niveau.*

Aansluitend hierop zijn dezelfde formuleringen nogmaals getest (experiment 7, Tabel 2) op de cultivar 'First Red'. Daarnaast zijn in experiment 7 nieuwe formuleringen getest op de cultivars 'First Red' en 'Vendela' in twee verschillende substraten: kokospluggen en steenwol. In deze experimenten gaf de 2% (w/w) bacterieel geproduceerde IAA

significant meer wortels dan de controle behandelingen. De 0.8% (w/w) IAA gaf een significant hoger aantal wortels bij 'First Red'. Dit was niet het geval bij 'Vendela', waarschijnlijk omdat deze cultivar makkelijker bewortelt. Het aantal wortels na drie weken kwam overeen met het aantal wortels geïnduceerd door een synthetisch product met 2% (w/w) IAA. Dit was het geval in beide rozencultivars en bij beide substraten (zie Tabel 2, experiment 7). In experiment 7 was het percentage bewortelde stekken in de First Red controle 85% (kokos) en 58% (steenwol) en in Vendela in beide substraten 100%. De spreiding in de bewortelingspercentages van First Red was groot. In de Vendela stekken in steenwol waaraan 2% (w/w) handelstoepassing IAA was toegevoegd, trad uitval in de partij op ten gevolge van zwart stek en daarom is het bewortelingspercentage slechts 83%. Het gemiddelde aantal wortels per stekje in experimenten 6 en 7 is weergegeven in Figuur 3. Figuur 4 geeft een illustratie van de beworteling.



*Figuur 3. Het gemiddelde aantal wortels per stekje (First Red op kokos) met standaard afwijking (s.e.) van experiment 6 (open balken) en experiment 7 (herhaling expt. 6) (dichte balken). S-IAA is synthetisch IAA, B-IAA is IAA geproduceerd door A. brasilense. S-IAA is getest in concentraties 0.5 tot 4.0% (w/w) en B-IAA is getest tussen 0.4 en 2.0 % (w/w).*



*Figuur 4. Links controle behandeling 'First Red' zonder toediening bewortelingspoeder. Rechts met toediening bacterieel geproduceerd IAA. Gefotografeerd na 3 weken.*



## 5. Effect van de bewortelingsmiddelen op boomkwekerijgewassen

### 5.1 Proefopzet

#### Experimenten 2001

##### **Effecten van bacteriepreparaten op de beworteling van *Magnolia stellata* en *Aronia arbutifolia***

In 2001 is gewerkt met het moeilijk wortelende gewas *Magnolia stellata* en met het gemakkelijk wortelende gewas *Aronia arbutifolia*. Stekken van *Aronia arbutifolia* werden genomen van moederplanten die door PPO geteeld waren. Stekken van *Magnolia stellata* werden betrokken van een commerciële boomkwekerij. Om verdamping te beperken werd het blad van de *Magnolia* stekken half doorgesneden. Aan de onderzijde werden de stekken 1 cm ingesneden. Beide soorten werden gestekt in week 27 vanaf 3 juli.

De stekken werden behandeld met experimentele middelen op basis van de bacterie *Azospirillum brasilense*. De bacterie is getest in twee formuleringen (talk en humus), in twee concentraties ( $10^7$  en  $10^6$  bacteriën per mg medium), met of zonder toevoeging van de IAA precursor tryptofaan. Deze behandelingen zijn vergeleken met twee in de boomkwekerij gebruikelijke behandelingen: 0,5 en 1% Rhizopon AA, dat IBA bevat en met een onbehandelde controle. Ter vergelijking is 0,5% synthetisch IBA in combinatie met talk of humus aan stekken toegevoegd.

Van elke behandeling werden vier herhalingen van elk 48 stekken gestoken in 48-gaats stektrays gevuld met standaard stekmedium dat veenmosveen en perliet bevatte (Kooter b.v.). De trays werden onder plastic tunnels op eb/vloed tafels in een kas gezet. De stekken werden elke twee weken gespoten met het biologische Algeco (ECOSTyle b.v.). De beworteling van *Aronia* is na 8 weken beoordeeld (week 35, 26 augustus) en die van *Magnolia* na 11 weken (week 38, 16 september).

De resultaten werden geanalyseerd met variantie-analyse.

##### **Effecten van verschillende elicitors op de IBA-geïnduceerde beworteling van *Magnolia x soulangeana***

Stekmateriaal van *Magnolia x soulangeana* werd op 25 juli 2001 betrokken van een commerciële boomkwekerij. Tussenstekken hiervan werden gebruikt voor de proeven. De stekken werden behandeld met 0,0, 0,5, 1,0 en 1,5% IBA in combinatie met acht verschillende elicitors. Deze elicitors waren maïszetmeel, melkpoeder, behangplaksel, talkpoeder met 'nat' IBA, PVPP, Zweeds veen, lignosulfonaat en talkpoeder met 'droog' IBA. Van elke behandeling werden 3 x 24 stekken gestoken in stektrays gevuld met standaard stekmedium, zoals in de bacterieproef hierboven beschreven. De stektrays werden onder plastic tunnels op eb/vloedtafels in een kas gezet. De beworteling is na 8 weken beoordeeld (vanaf 19 september).

#### Experimenten 2002

##### **Effecten van bacteriepreparaten op de beworteling van *Magnolia stellata***

In 2002 zijn wederom effecten van experimentele middelen op basis van de bacterie *Azospirillum brasilense* op de beworteling van *Magnolia stellata* stek onderzocht. In de op 2 juli gestarte stekproef is gewerkt met andere formuleringen en toedieningsmethoden dan in 2001, daar de resultaten met de poeders die in 2001 getest waren, tegenvielen. In een deel van de behandelingen is een gat in de plug geprikt, dat gevuld werd met veensubstraat (1-3) of vloeistof met cellulose (4-6). Cellulose zorgt voor verhoogde viscositeit van de vloeistof zodat deze niet meteen door

de plug wegluopt. Hieraan is de bacterie + medium (1, 4) toegevoegd of met *Azospirillum* begroeid medium (2, 5) waaruit de bacterie verwijderd was door centrifugeren. Dit met *Azospirillum* begroeide medium bevatte auxine dat door de bacterie geproduceerd was. Controle behandelingen zonder bacterie of met *Azospirillum* begroeid medium werden eveneens getest (3, 6). Als derde toedieningswijze werden de stekken gedipt in een suspensie: 2 uur of 24 uur (7-10), met daarin bacterie + medium (7, 9) of met *Azospirillum* begroeid medium (8, 10). Deze behandelingen werden vergeleken met een controle behandeling zonder enige toevoeging (11) en met de standaardbehandeling: 1% handelstoepassing IBA (12). Daarnaast is een formulering E getest (nieuwe formuleringmethode met nieuwe carrier) (13). Stek werd gesneden van biologisch geteelde moederplanten die door PPO buiten geteeld werden. De stekken werden gestoken in 48-gaats stektrays, die met standaard stekmedium gevuld waren (zie experimenten 2001). Van elke behandeling werden vier herhalingen van 48 stekken ingezet. De stektrays werden onder plastic tunnels op roltafels in een kas gezet. Tegen trips is gespoten met het biologische middel Spruzit. De beworteling is beoordeeld op 26 september 2002.

De resultaten werden geanalyseerd met variantie-analyse.

## Experimenten 2003

### **Effecten van bacteriepreparaten op de beworteling van *Magnolia stellata* en *Acer palmatum* 'Atropurpureum'**

In 2003 zijn wederom effecten van een aantal experimentele middelen op basis van de bacterie *Azospirillum brasilense* op de beworteling onderzocht. Dit is gebeurd in twee moeilijk wortelende soorten, te weten *Magnolia stellata* en *Acer palmatum* 'Atropurpureum'. In een aantal behandelingen was IAA aanwezig dat door bacteriën geproduceerd was (m-IAA). De bacterie zelf was niet meer aanwezig. Bij een aantal behandelingen was daarnaast de elicitor Na-nonanaat (Na-n) en/of Ca-lignosulfonaat (Ca-LS) aanwezig. Elicitors kunnen de gevoeligheid voor auxinen doen toenemen. In enkele formuleringen was zowel IAA aanwezig dat door de bacterie geproduceerd was als de bacterie zelf. De bacterie was ingekapseld in Skim milk Alginaatbolletjes (SmAlg) of in alginaatbolletjes (Alg) (50% bolletjes en 50% kalk) en zou weer kunnen vrijkomen nadat er vocht bij komt. Toevoeging van Skim milk was bedoeld om overleving van de bacterie te verbeteren. In synthetisch stekpoeder zit IBA. Om te kijken of het minder actieve IAA überhaupt wel werkt, zijn ook effecten van synthetisch IAA (s-IAA) op de beworteling onderzocht. Ook is een combinatie van synthetisch IAA en door bacteriën geproduceerd IAA meegenomen. Hierdoor kan vastgesteld worden of de mediumcomponenten die aanwezig zijn bij het door bacteriën geproduceerde IAA een effect hebben op de beworteling. De effecten van alle experimentele middelen werden vergeleken met een onbehandelde controle en een in de boomkwekerij gebruikelijke standaardbehandeling (1% Rhizopon AA, waarin 1% IBA zit). In *Acer palmatum* 'Atropurpureum' is daarnaast het effect van het auxine naftylazijnzuur (0,2%)(NAA) onderzocht en van een combinatie van IBA en NAA.

Stek van *Magnolia stellata* werd gesneden van biologisch geteelde moederplanten die door PPO buiten werden geteeld. Stek van *Acer palmatum* 'Atropurpureum' werd betrokken van een commerciële boomkwekerij. Het stekken van *Acer palmatum* 'Atropurpureum' vond plaats in week 26 vanaf 24 juni en het stekken van *Magnolia stellata* in week 27 vanaf 30 juni. De stekken werden gestoken in 48-gaats stektrays, die met standaard stekmedium gevuld waren (zie experimenten 2001). Bij *Magnolia stellata* was extra perliet door het stekmedium gemengd (25 volume % perliet tegen 15% in standaard stekmedium). Van elke behandeling werden vier herhalingen van 48 stekken ingezet. De stektrays werden onder plastic tunnels op roltafels in een kas gezet. Na beworteling werden de stekken bemest met het biologische middel Bio-Trissol 3-3-6. In *Magnolia stellata* werden preventief roofmijten uitgezet tegen spint. Beoordeling van de beworteling vond in *Acer palmatum* plaats in week 41 vanaf 6 oktober en in *Magnolia stellata* in week 2, 2004.

De resultaten zijn geanalyseerd met IRREML.

## Experimenten 2004

In 2004 is geprobeerd het effect van biologisch stekpoeder verder te verbeteren door beendermeel aan de stekken toe te dienen. Beendermeel dat toegelaten is in de biologische landbouw, bevat een verhoogd fosfaatgehalte. In de gangbare landbouw wordt vaak kunstmeststof 10+52+10 (N+P+K) aan stekken toegevoegd op het moment dat ze beginnen te bewortelen, met als doel de beworteling een extra impuls te geven. Beendermeel is meteen door het stekmedium gemengd of aangegoten toen de stekken callus begonnen te vormen. Als proefgewas is voor *Acer palmatum* 'Atropurpureum' gekozen. Stek werd betrokken van een commerciële boomkwekerij. Het stekken vond plaats in week 24 (7 juni) en beoordeling van de beworteling vond plaats in week 30 (19 juli). De stekken werden gestoken in 48-gaats stektrays, die met standaard stekmedium gevuld waren (zie experimenten 2001). Van elke behandeling werden vier herhalingen van 48 stekken ingezet. De stektrays werden onder plastic tunnels op rolltafels in een kas gezet.

## 5.2 Resultaten

### Experimenten 2001

#### **Effecten van bacteriepreparaten op de beworteling van *Magnolia stellata* en *Aronia arbutifolia***

De bewortelingsresultaten van *Magnolia stellata* staan in Tabel 3. Onbehandelde stekken lieten een bewortelingspercentage van 22% zien. Het bewortelingspercentage nam enorm toe tot 73% door het gebruik van 1% Rhizopon AA. De halve dosering (0,5% Rhizopon AA) had geen effect. Van de geteste preparaten gaf de behandeling met  $10^7$  bacteriën in de humusformulering zonder toevoeging van tryptofaan een bewortelingspercentage van 64%. Dit was veel beter dan de onbehandelde controle en bovendien niet significant slechter dan dat van de standaardbehandeling 1% Rhizopon AA. Dezelfde hoeveelheid bacteriën in humusformulering met extra toevoeging van de IAA precursor tryptofaan gaf daarentegen geen betere beworteling dan de onbehandelde controle. Ook alle andere behandelingen gaven geen betere beworteling dan de onbehandelde controle.

Tabel 3. Effecten van diverse preparaten op het bewortelingspercentage, het gemiddeld aantal wortels per beworteld stek en het gemiddelde versgewicht van de wortels van *Magnolia stellata*. Waarden met verschillende letters zijn significant verschillend bij  $P < 0,05$ .

Formulering	-/+ tryptofaan	Azospirillum brasilense	IBA	Percentage beworteld	Gemiddeld aantal wortels per beworteld stek	Versgewicht wortels (g)
Talk	-	10 <sup>7</sup>	-	10 a	1,5 a	0,27 ab
		10 <sup>6</sup>	-	13 a	1,5 a	0,24 a
	+	10 <sup>7</sup>	-	16 a	1,7 ab	0,43 cd
		10 <sup>6</sup>	-	16 a	1,6 ab	0,25 a
Humus	-	10 <sup>7</sup>	-	64 bc	2,4 ab	0,46 cd
		10 <sup>6</sup>	-	25 ab	1,7 ab	0,35 abc
	+	10 <sup>7</sup>	-	34 abc	2,6 ab	0,42 bcd
		10 <sup>6</sup>	-	4 a	2,1 ab	0,37 abcd
Talk	-	-	-	8 a	1,7 ab	0,21 a
Humus	-	-	-	18 a	2,2 ab	0,42 bcd
Talk	-		0,5%	26 ab	2,2 ab	0,47 cd
Humus	-		0,5%	26 ab	3,2 ab	0,34 abc
-	-	-	0,5% Rhizopon	31 ab	3,5 bc	0,43 cd
-	-	-	1% Rhizopon	73 c	5,2 c	0,51 d
-	-	-	-	22 a	1,5 a	0,31 abc

Rhizopon AA 1% had niet alleen een positief effect op het bewortelingspercentage, maar ook op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek en op het versgewicht van de wortels (Tabel 3). In alle andere behandelingen was het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek en het versgewicht van de wortels niet significant hoger dan dat van de onbehandelde controle.

In *Aronia arbutifolia* (Tabel 4) gaven onbehandelde stekken al een bewortelingspercentage van 88%. Rhizopon AA gaf geen verdere verbetering van het bewortelingspercentage. Het bewortelingspercentage van alle andere behandelingen kwam ook overeen met dat van de onbehandelde controle. Toevoeging van bacteriën had dus geen resultaat, ongeacht formulering, concentratie en toevoeging van tryptofaan.

Rhizopon AA met 0,5 of 1% IBA gaf wel een significante verhoging van het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek en van het versgewicht van de wortels. Alle overige behandelingen verschilden niet of nauwelijks van de onbehandelde controle.



Tabel 4. Effecten van diverse preparaten op het bewortelingspercentage, het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek en het gemiddelde versgewicht van de wortels van *Aronia arbutifolia*. Waarden met verschillende letters zijn significant verschillend zijn bij  $P < 0,05$ .

Formulering	-/+ tryptofaan	Azospirillum brasilense	IBA	Percentage beworteld	Gemiddeld aantal wortels per beworteld stek	Versgewicht wortels (g)
Talk	-	10 <sup>7</sup>	-	88 a	5,3 a	0,34 abc
		10 <sup>6</sup>	-	84 a	5,3 a	0,31 abc
	+	10 <sup>7</sup>	-	87 a	5,4 a	0,28 abc
		10 <sup>6</sup>	-	91 a	5,4 a	0,29 abc
Humus	-	10 <sup>7</sup>	-	89 a	5,6 a	0,37 cd
		10 <sup>6</sup>	-	75 a	5,5 a	0,36 bcd
	+	10 <sup>7</sup>	-	93 a	5,6 a	0,30 abc
		10 <sup>6</sup>	-	81 a	5,0 a	0,29 abc
Talk	-	-	-	82 a	5,3 a	0,26 a
Humus	-	-	-	92 a	5,6 a	0,30 abc
Talk	-	-	0,5%	94 a	5,6 a	0,33 abc
Humus	-	-	0,5%	88 a	5,7 a	0,30 abc
-	-	-	0,5% Rhizopon	96 a	7,7 b	0,48 e
-	-	-	1% Rhizopon	95 a	9,0 c	0,45 de
-	-	-	-	87 a	5,1 a	0,28 ab

### Effecten van verschillende elicitors op de IBA-geïnduceerde beworteling van *Magnolia x soulangeana*

Binnen behandelingen traden enorme variaties op in het aantal bewortelde stekken. Dit was te wijten aan extreem hoge temperaturen (tot 45°C) in de eerste weken na de start van de stekproeven. Afhankelijk van de plek in de kas, stierf een groter of kleiner deel van de stekken in de eerste weken. Dit zorgde ervoor dat de gemiddelde bewortelingspercentages laag waren en geen uitspraken mogelijk waren over de effectiviteit van de elicitors. De noodzaak voor auxinen kwam wel duidelijk naar voren. De gemiddelde bewortelingspercentages staan in Tabel 5.

Tabel 5. Effecten van diverse elicitors en IBA op het percentage beworteling van *Magnolia x soulangeana* stekken

Elicitor	IBA concentratie				Gemiddelden
	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%	
Maïszetmeel	0.0	5.6	54.2	56.9	29.2
Melkpoeder	0.0	22.2	0.0	13.9	9.0
Behangplaksel	2.8	4.2	2.8	19.4	7.3
Talkpoeder met 'nat'IBA	4.2	6.9	40.3	36.1	21.9
PVPP	1.4	11.1	69.4	6.9	22.2
Zweeds veen	0.0	16.7	40.3	30.6	21.9
Lignosulfonaat	33.3	23.6	54.2	18.1	32.3
Talkpoeder met 'droog'IBA	0.0	13.9	27.8	31.9	18.4
Gemiddelden	5.3	13.0	36.1	26.7	20.3

## Experimenten 2002

### Effecten van bacteriepreparaten op de beworteling van *Magnolia stellata*

De bewortelingspercentages en gemiddelde aantal wortels per beworteld stek van *Magnolia stellata* na behandeling met diverse experimentele middelen staan samengevat in Tabel 6.

Tabel 6. Gemiddelde bewortelingspercentages en gemiddelde aantal wortels per beworteld *Magnolia stellata* stek na behandeling met diverse experimentele middelen. Toelichting op de behandelingen in hoofdstuk 5.1.

Code	Veen substraat	Vloeistof met Cellulose	Bacterie + medium	Met Azospirillum begroeid medium	Dippen	Rhizoapon AA	Code E	Percentage beworteld	Gemiddeld aantal wortels per beworteld stek	
1	+	-	+	-	-	-	-	4	1,9	
2			-	+	-	-	-	7	2,1	
3			-	-	-	-	-	6	1,4	
4	-	+	+	-	-	-	-	9	2,2	
5			-	+	-	-	-	2	1,5	
6			-	-	-	-	-	39	2,1	
7		-	-	+	-	2 uur	-	-	13	2,0
8				-	+	2 uur	-	-	22	1,8
9				+	-	24 uur	-	-	0	-
10	-	-	-	+	24 uur	-	-	0	-	
11			-	-	-	-	-	18	2,2	
12			-	-	-	1%	-	70	3,5	
13	-	-	-	-	-	+	17	2,7		

De handelsoplossing IBA (1%)(12) gaf een voor *Magnolia stellata* goede beworteling van bijna 70%. Zonder enige toevoeging was minder dan 20% beworteld (11). Ook de kwaliteit van de beworteling werd sterk verbeterd door IBA. Toediening van de bacterie of met Azospirillum begroeid medium, waarin eerder door de bacterie geproduceerd auxine aanwezig was, gaf geen verbetering van de beworteling in vergelijking met de onbehandelde controle. De behandelingen waarbij de stekken 24 uur gedipt werden in vloeistof (9, 10) verdroogden in de eerste weken in de stek tunnels. Dit had waarschijnlijk voorkomen kunnen worden door de stekken tijdens de dipperiode af te dekken.

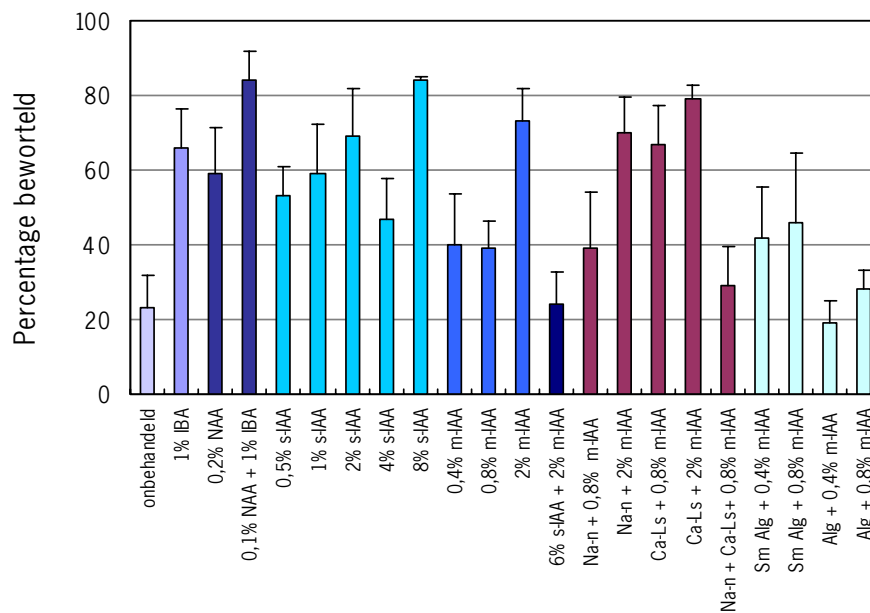
## Experimenten 2003

### Effecten van bacteriepreparaten op de beworteling van *Magnolia stellata* en *Acer almatum* 'Atropurpureum'

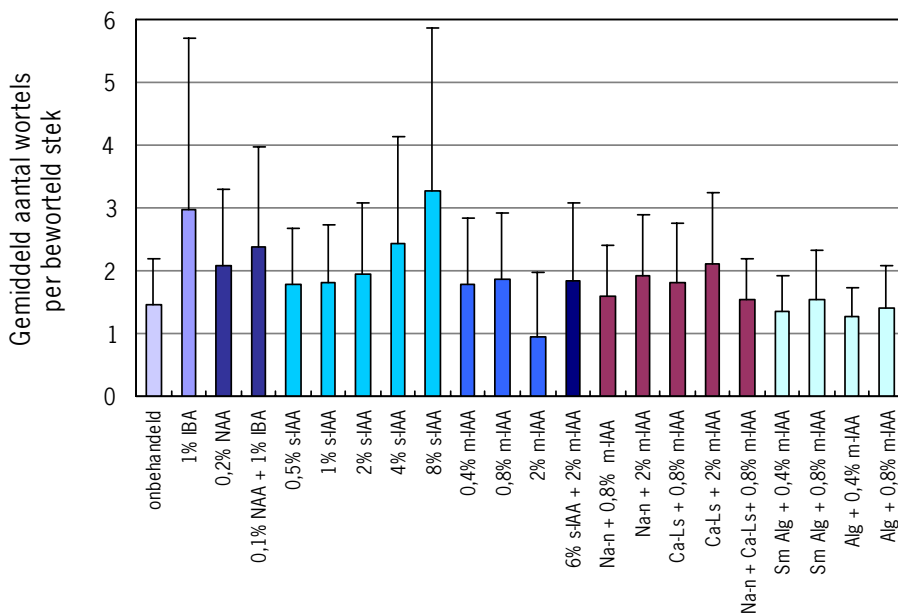
*Acer palmatum* 'Atropurpureum'

In Figuur 5 en 6 staan de bewortelingsresultaten van *Acer palmatum* 'Atropurpureum'. Onbehandelde stekken lieten een bewortelingspercentage van 23% zien en een gemiddeld aantal wortels per beworteld stek van 1,5. De beworteling werd sterk verbeterd door het gebruik van 1% Rhizoapon AA, dat 1% IBA bevat. Nu bewortelde 66% van de stekken en was het gemiddeld aantal wortels per beworteld stek bijna 3. Het gebruik van 0,2% Rhizoapon B, dat 0,2% NAA bevat, gaf een vergelijkbaar bewortelingspercentage als 1% Rhizoapon AA. Combinatie van beide auxinen resul-

teerde zelfs in 84% beworteling. Synthetisch IAA gaf een duidelijke verbetering van de beworteling in vergelijking met onbehandelde stekken. Een concentratie van 8% resulteerde zelfs in 84% beworteling en meer dan 3 wortels per beworteld stek. Diverse experimentele middelen die door Plant RI gemaakt waren, gaven een duidelijke verbetering van de beworteling in vergelijking met onbehandelde stekken. Door de bacterie geproduceerd IAA in een concentratie van 2% gaf 73% beworteling. Concentraties van 0,4 en 0,8% waren te laag. Opvallend was dat het aantal wortels per beworteld stek laag was in 2% door bacteriën geproduceerd IAA. In lagere concentraties van 0,4 en 0,8% lag het aantal wortels per beworteld stek duidelijk hoger. De elicitor Na-nonanaat gaf geen verbetering van de beworteling. De elicitor Ca-lignosulfonaat lijkt de gevoeligheid voor IAA te doen toenemen. Deze elicitor in combinatie met 0,8% IAA gaf een beworteling die vergelijkbaar was met die van 2% IAA. De aanwezigheid van de bacterie in combinatie met IAA leidde niet tot een extra verbetering van de beworteling. Wanneer de bacterie aanwezig was in alginaatbolletjes had dit in combinatie met door de bacterie geproduceerd IAA zelfs een licht negatief effect op de beworteling.



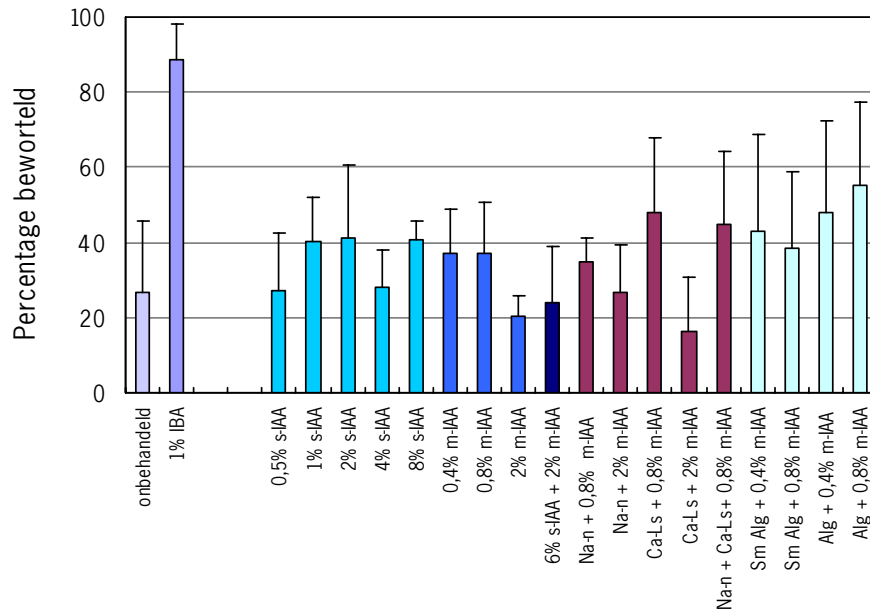
*Figuur 5. Effecten van diverse preparaten op het bewortelingspercentage van Acer palmatum 'Atropurpureum'. Toelichting op behandelingen staat in hoofdstuk 5.1.*



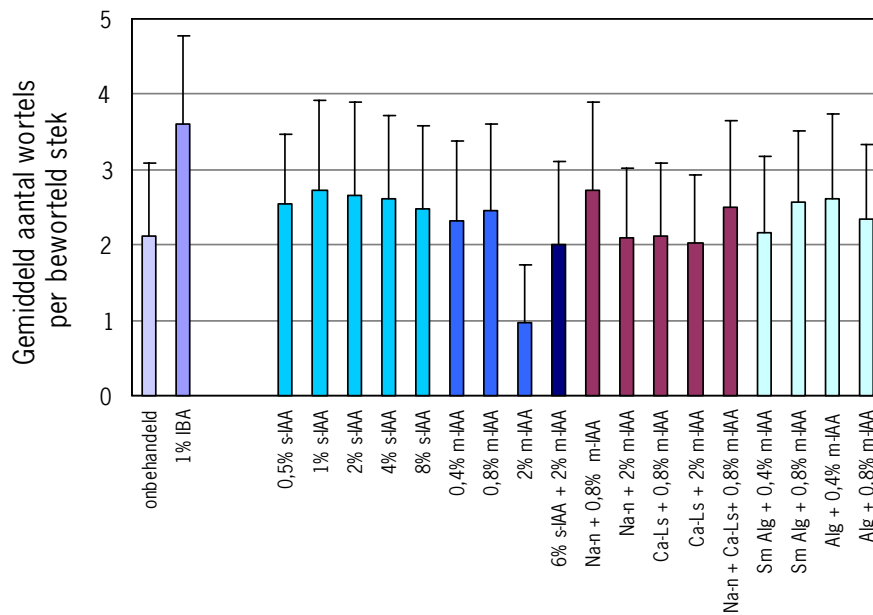
Figuur 6. Effecten van diverse preparaten op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek van *Acer almatum* 'Atropurpureum'. Toelichting op behandelingen staat in hoofdstuk 5.1.

#### *Magnolia stellata*

De bewortelingsresultaten van *Magnolia stellata* staan in Figuur 7 en 8. Binnen behandelingen was er vaak een enorme variatie in beworteling. Stekken van *Magnolia stellata* reageerden sterk op de aanwezigheid van 1% IBA (1% Rhizopon AA). Bijna 90% van de stekken bewortelde in het in de boomkwekerij gebruikelijke synthetische IBA en het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek bedroeg ruim 3,5. In onbehandelde stekken was maar een kwart van de stekken beworteld en bedroeg het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek ruim 2. Synthetisch IAA in concentraties tussen 0,5 en 8% gaf geen significante verbetering van de beworteling in vergelijking met onbehandelde stekken. Ook IAA dat door de bacterie *Azospirillum brasilense* geproduceerd was, gaf geen verbetering van de beworteling in vergelijking met onbehandelde stekken. De elicitors Na-nonanaat en Ca-lignosulfonaat deden de gevoeligheid voor IAA niet dusdanig toenemen dat dit resulteerde in een verbetering van de beworteling. Er was een tendens dat combinatie van door de bacterie geproduceerd IAA en aanwezigheid van de bacterie zelf wel een betere beworteling gaf. Dit was alleen significant wanneer 0,8% IAA gecombineerd werd met de bacterie aanwezig in algi-naat-bolletjes. Bewortelingsresultaten zoals in 1% Rhizopon AA werden echter bij lange na niet benaderd.



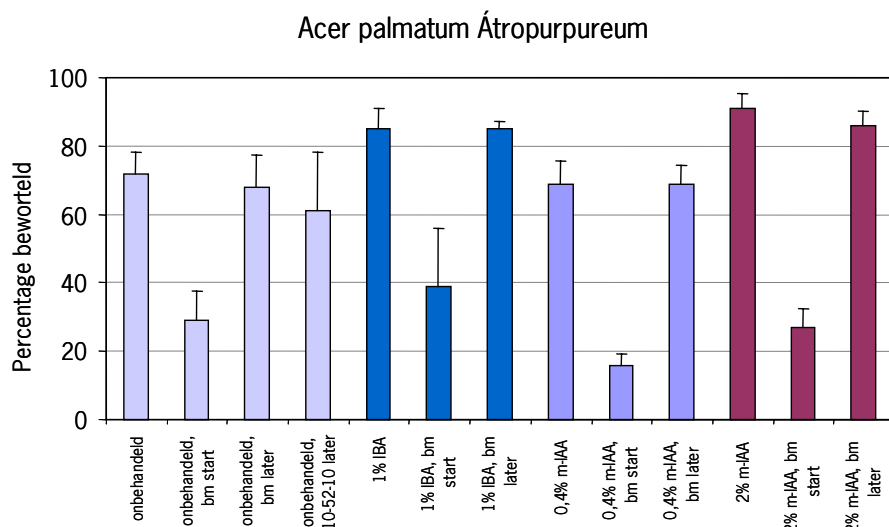
*Figuur 7. Effecten van diverse preparaten op het bewortelingspercentage van Magnolia stellata. Toelichting op behandelingen staat in hoofdstuk 5.1.*



*Figuur 8. Effecten van diverse preparaten op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek van Magnolia stellata. Toelichting op behandelingen staat in hoofdstuk 5.1.*

## Experimenten 2004

## Effecten van beendermeel



*Figuur 9. Het effect van beendermeel en auxinen op het bewortelingspercentage van Acer palmatum 'Atropurpureum'. Bm = beendermeel.*

Ook in 2004 gaf zowel gangbaar als biologisch stekpoeder een duidelijke verbetering van de beworteling (Figuur 9). In vergelijking met eerdere jaren was ook de beworteling van onbehandeld stek al heel acceptabel (70%). Toch zorgde gangbaar stekpoeder, met daarin 1% IBA alsook biologisch stekpoeder met daarin 2% IAA voor 15-20% extra beworteling. Het mengen van beendermeel door het stekmedium had een negatief effect op de beworteling. Het aangieten met beendermeel op het moment dat callusvorming startte, had geen negatief effect, maar gaf ook geen verbetering van de beworteling. In een controle behandeling, waarin kunstmeststof met een verhoogd fosfaatgehalte aangevuld was, trad ook geen verbetering van de beworteling op. Blijkbaar had een verhoogd fosfaatgehalte geen effect in dit gewas.

## 6. Effecten van het manipuleren van de moederplanten op de beworteling

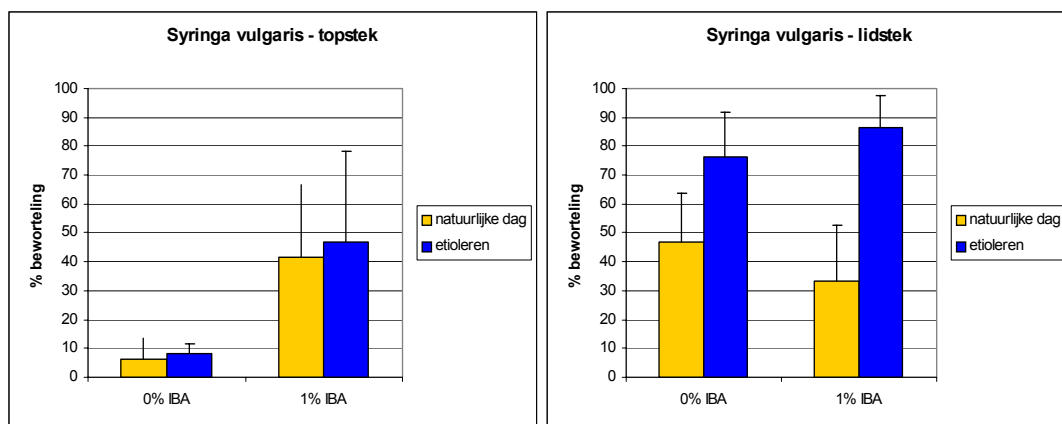
### 6.1 Proefopzet

In 2002 is het effect van etioleren onderzocht in twee selecties van *Acer platanoides* (nr 7 en nr 13) en in *Syringa vulgaris* 'Mme Florent Stepman'. *Syringa vulgaris* werd in 15 l containers geteeld, *Acer platanoides* in 3 l containers. De containers stonden in een kas. De planten werden biologisch bemest met DCM eco mix. Een deel van de moederplanten is vanaf 21 maart 2002 tot 6 mei 2002 in het donker geteeld door in die periode een daglengtescherm steeds dicht te houden. Deze planten hebben vervolgens tot 4 juni 2002 onder korte dag omstandigheden gestaan, wat inhield dat de planten per dag 8 uur werden blootgesteld aan daglicht. De andere moederplanten hebben steeds onder natuurlijke daglengte gestaan. Op 4 juni 2002 werd gestekt. Aan de stekken is 2% Rhizopon AA (*Acer*) of 1% Rhizopon AA (*Syringa*) toegevoegd of geen auxine. Rhizopon AA bevat het auxine IBA. In *Syringa* is de beworteling van top- en lidstekken onderzocht. Van *Acer* zijn alleen topstekken genomen. In *Acer* zijn per behandeling 4 herhalingen van elk 20 stekken gestoken in een stektray met stekmedium EGO E, bestaande uit veenmosveen, zand en 15% perliet. In *Syringa* is gewerkt met 4 herhalingen van 24 stekken. De trays zijn onder plastic tunnels op eb/vloedtafels in een kas gezet. De beworteling is op 26 juli 2002 beoordeeld.

Op de stekdatum zijn stengelstukjes net onder de gemaakte stek bewaard. Van deze stukjes is het drogestofgehalte bepaald.

In 2003 zijn nogmaals effecten van etioleren onderzocht in twee verschillende selecties van *Acer platanoides*, t.w. selectie 2 en 9. Planten zijn in containers in de kas geteeld. Een deel van de moederplanten heeft van 3 april 2003 tot 16 mei 2003 in het donker gestaan. Daarna hebben ze tot 11 juni 2003 onder kortedagomstandigheden gestaan (8 uur daglicht). De rest van de planten heeft steeds onder natuurlijke daglengte gestaan. Op 11 juni 2003 werd gestekt. Er is gewerkt met lidstek. Aan een deel van de stekken werd 2% Rhizopon AA toegevoegd. Aan de andere stekken werd geen Rhizopon toegevoegd. Van elke behandeling werden vier herhalingen van elk 48 stekken gestoken in stektrays met standaard stekmedium EGO E (zie boven). De trays zijn onder plastic tunnels op eb/vloedtafels in een kas gezet. Tijdens de bewortelingsfase is drie keer gespoten met het biologische middel Spruzit tegen spint. Dit gaf weinig resultaat. Uiteindelijk zijn roofmijten ingezet tegen spint. Ook hiervan viel het resultaat tegen, waarschijnlijk omdat de aantasting al te ver gevorderd was. Na beworteling zijn de trays bemest met Bio Trissol. De beworteling is in week 33 (11 augustus 2003) beoordeeld.

Alle resultaten zijn met variantie-analyse geanalyseerd.

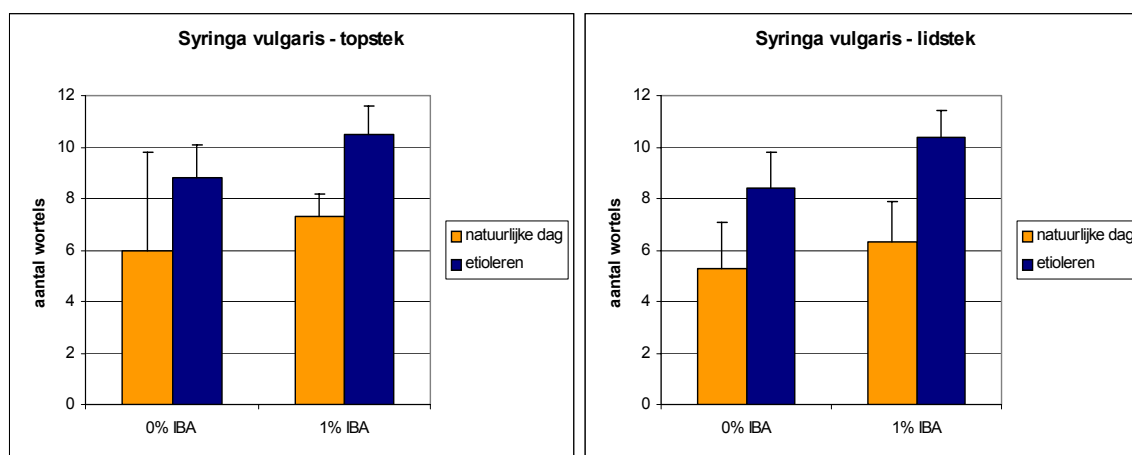


Figuur 10. Effecten van etioleren en IBA op het percentage beworteling van topstek (A) en lidstek (B) van *Syringa vulgaris*.

## 6.2 Resultaten

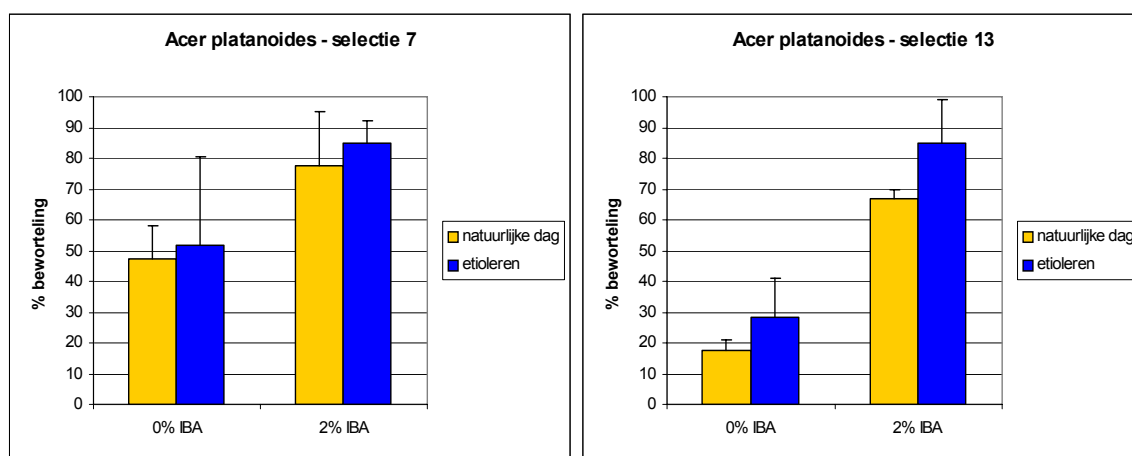
Etioleren bleek zowel in *Acer platanoides* als in *Syringa vulgaris* een groot effect te hebben op de stekbasis. Bij *Syringa* halveerde het drogestofgehalte van 33% naar 16%. Bij *Acer platanoides* was het drogestofgehalte van geëtioloerde stekken  $36 \pm 4,8\%$  en dat van stekken van moederplanten die onder natuurlijke daglengte hadden gestaan  $44,4 \pm 2,4\%$ . Stek van geëtioloerde moederplanten is dus duidelijk zachter.

Effecten van de verschillende behandelingen op de beworteling zijn te vinden in Figuur 10 en 11 voor *Syringa vulgaris* en in Figuur 12 en 13 voor *Acer platanoides*.



Figuur 11. Effecten van etioleren en IBA op het aantal wortels per beworteld stek van *Syringa vulgaris*. Er is onderscheid gemaakt tussen topstek (A) en lidstek (B).

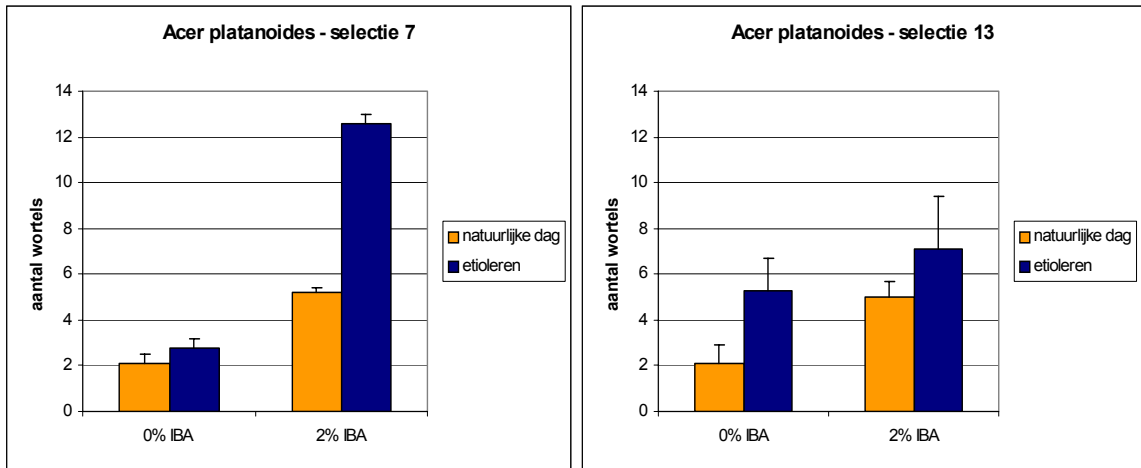
In *Syringa vulgaris* had etioleren een positief effect op het percentage beworteld stek (Figuur 10) en op het aantal wortels per beworteld stek (Figuur 11). In lidstek was het effect van etioleren op het percentage beworteld veel groter dan in topstek. Zelfs zonder IBA was dan 76% van de stekken beworteld. In 1% IBA was slechts 33% van de stekken beworteld. Op het aantal wortels per beworteld stek had etioleren zowel in topstek als in lidstek een sterk positief effect. Opmerkelijk was dat toepassing van IBA in lidstek geen significant hoger percentage beworteld stek gaf dan stek dat niet met IBA behandeld was. In topstek echter gaf toepassing van IBA wel een significant hoger percentage beworteld stek dan stek dat niet met IBA behandeld was. IBA had over het algemeen ook een positief effect op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek.



Figuur 12. Effecten van etioleren en IBA op het percentage beworteling van twee verschillende selecties van *Acer platanoides*.

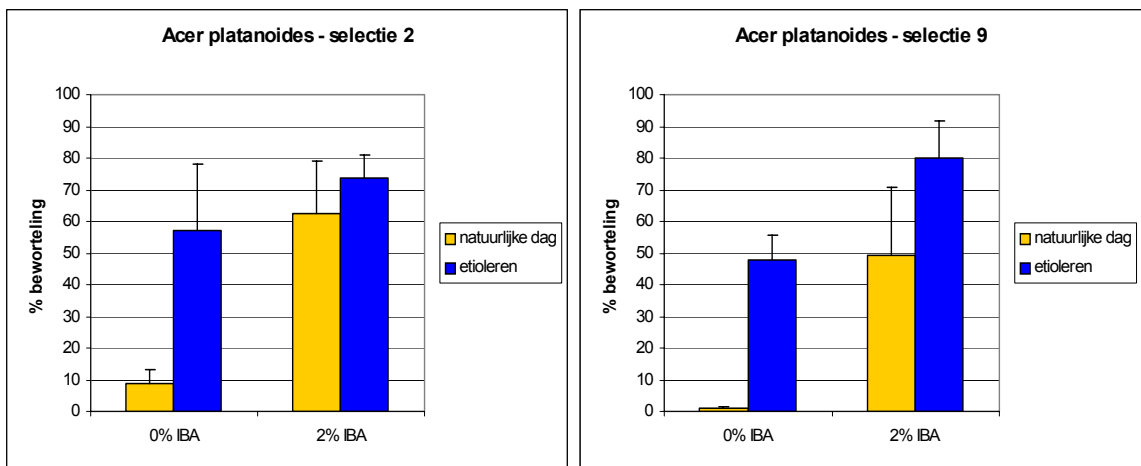


Selectie 7 van *Acer platanoides* bewortelde significant beter dan selectie 13 (Figuur 12). In beide selecties had IBA een positief effect op het percentage beworteld (Figuur 12) en op het aantal wortels per beworteld stek (Figuur 13). Etioleren had in selectie 13 een positief effect op het percentage beworteld, in selectie 7 waren de verschillen niet significant. Etioleren had ook een positief effect op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek. Met uitzondering van selectie 7 zonder IBA was het effect steeds significant.



Figuur 13. Effecten van etioleren en IBA op het aantal wortels per beworteld stek van twee verschillende selecties van *Acer platanoides*.

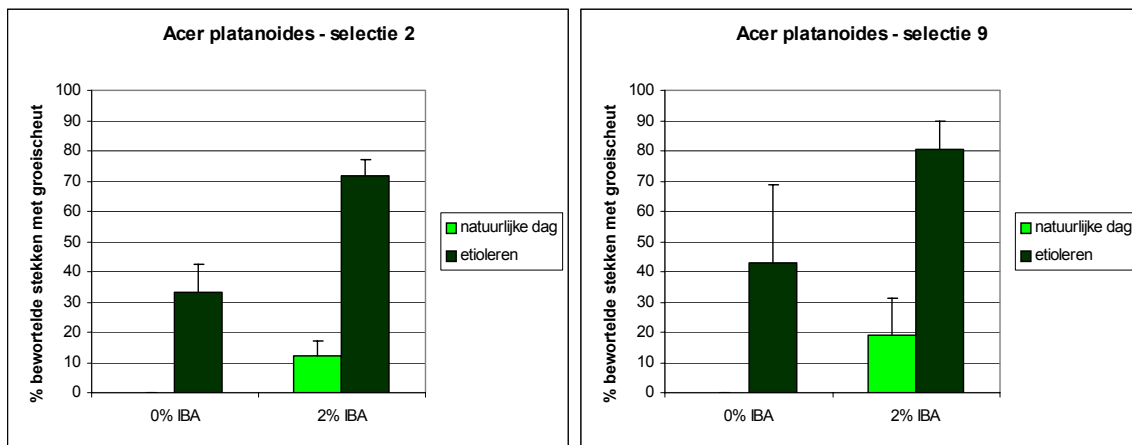
De in 2003 uitgevoerde proeven lieten geen significante verschillen in bewortelingspercentages tussen de twee geteste selecties 2 en 9 zien (Figuur 14). In beide selecties zorgden etioleren en IBA voor een significant betere beworteling. Combinatie van beiden gaf een nog beter resultaat. Het effect van etioleren was net zo groot als het effect van 2% IBA op stekken van moederplanten die onder natuurlijke daglengte hadden gestaan.



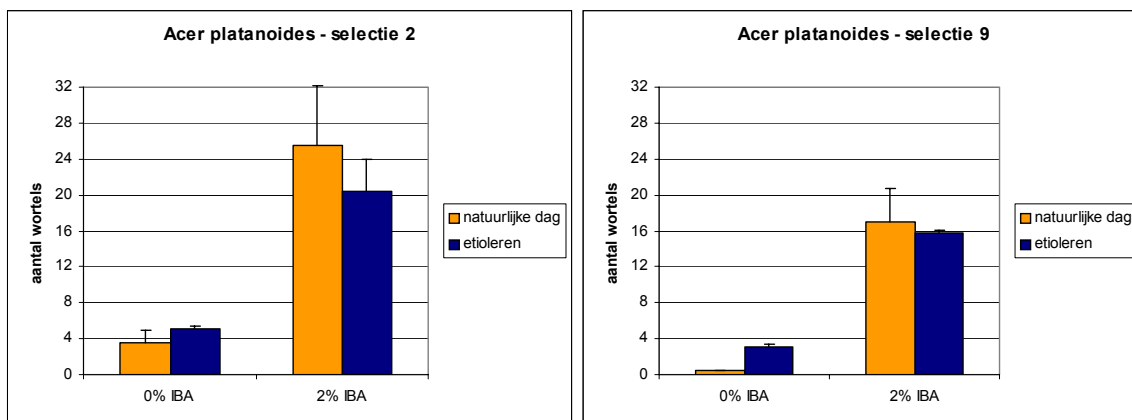
Figuur 14. Effecten van etioleren en IBA op het percentage beworteling van twee verschillende selecties van *Acer platanoides*.

Naast het percentage beworteld is ook gekeken welk deel van de bewortelde stekken een nieuwe groeischeut gevormd had. De resultaten hiervan staan in Figuur 15. Wanneer de moederplanten onder natuurlijke daglengte hadden gestaan, had IBA slechts een gering effect op het groeien van scheuten. Etioleren had duidelijk een veel groter effect. Combinatie van beiden gaf het beste resultaat.

De variatie in het aantal wortels per beworteld stek was erg groot. Interpretatie van deze getallen is lastig. Een plant met 5 wortels kan net zo goed aanslaan als een plant met 25 wortels. Hoewel het dus niet mogelijk is een directe relatie te leggen tussen deze parameter en de kwaliteit van de beworteling, is toch duidelijk dat IBA een sterk positief effect had op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek (Figuur 16). Etioleren bleek geen significant hoger aantal wortels te geven dan natuurlijke daglengte.



Figuur 15. Effecten van etioleren en IBA op het percentage bewortelde stekken met een groeischeut van twee verschillende selecties van *Acer platanoides*.



Figuur 16. Effecten van etioleren en IBA op het aantal wortels per beworteld stek van twee verschillende selecties van *Acer platanoides*.

## 7. Discussie en conclusies

Omdat in de biologische landbouw het gebruik van synthetische auxinen niet toegestaan is om de beworteling van uitgangsmateriaal te bevorderen, is gezocht naar alternatieven. Onderzocht is of het gebruik van natuurlijk voorkomende auxinen-producerende bacteriën perspectief biedt in snijrozen, dahlia en enkele boomkwekerijgewassen. Daarnaast is in enkele boomkwekerijgewassen onderzocht of manipulatie van de moederplanten de afhankelijkheid van auxinen kan doen afnemen.

### 7.1 Biologisch stekpoeder

De experimenten waarbij de stekken behandeld werden met suspensies van *Azospirillum brasilense* vertoonden wisselende resultaten; in sommige gevallen resulteerden dipbehandelingen in beter bewortelde en robuustere planten, in andere gevallen was geen effect te zien. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de stekken moeilijk te koloniseren waren door *Azospirillum*. Het was lastig om hierover eenduidige conclusies te trekken omdat de bacterie op en in de plant moeilijk te traceren is. Behalve de reproduceerbaarheid van het positieve effect van de bacterie bleek ook de formulering van de bacterie tot een droog poeder problematisch. Daarom werd besloten om in plaats van de bacterie het door de bacterie geproduceerde IAA in het biologisch stekpoeder op te nemen.

Het bleek mogelijk om de kweekcondities voor de bacterie zodanig in te stellen dat een voldoende hoeveelheid IAA door de bacterie in het opkweekmedium werd uitgescheiden. Na verwijderen van de bacterie en drogen kon het medium geformuleerd worden tot droge stekpoeders met IAA-gehalten tot 2% (w/w) die met hetzelfde gemak als gangbare bewortelingsmiddelen in de praktijk toegediend konden worden.

Het onderzoek wees uit dat de biologische stekpoeders met 2% IAA uitstekend resultaat opleverden bij stekken van moeilijk bewortelbare houtige gewassen die gevoelig zijn voor IAA. Zo was het aantal wortels geïnduceerd door het bacterieel geproduceerde IAA voldoende voor het in de praktijk vermeerderen van de snijrozen 'First Red' en 'Vendela', zowel in kokospluggen als in steenwolblokken. In *Acer palmatum* 'Atropurpureum' resulteerde een formulering met daarin 2% IAA in een beworteling die vergelijkbaar was met die in de standaardbehandeling van 1% synthetisch IBA. Het biologisch preparaat gaf echter geen verbetering in de beworteling van *Magnolia stellata*. Dit gewas reageerde ook niet op synthetisch IAA, terwijl 1% IBA wel uitstekende beworteling gaf.

Behalve IAA bevat het biologisch stekpoeder een hoog percentage andere componenten uit het begroeide opkweekmedium. In geen van de experimenten werden echter fytoxische of andere negatieve effecten van deze componenten waargenomen.

Biologische beworteling van stek van snijroos en boomkwekerijgewassen blijkt dus goed mogelijk met dit prototype van biologische bewortelaar dat gebaseerd is op IAA geproduceerd door *Azospirillum brasilense*. Voor het daadwerkelijk beschikbaar komen van het middel voor producenten van uitgangsmateriaal is productie en commercialisatie van het middel nodig. Stekpoeders worden allen geclassificeerd als gewasbeschermingsmiddel, hetgeen betekent dat ook voor handel en gebruik van het biologische bewortelingsmiddel toelating vereist is zoals vastgesteld in de Bestrijdingsmiddelenwet 1962. De vraag is of de hieraan verbonden hoge registratiekosten terugverdiend kunnen worden in de relatief kleine markt. Momenteel wordt met een commerciële partij bezien wat de mogelijkheden zijn.

### 7.2 Moerplantbehandeling

In *Syringa vulgaris* en in *Acer platanoides* had het etioleren van de moederplanten voordat er stek van genomen werd een positief effect op het percentage bewortelde stekken en op het gemiddelde aantal wortels per beworteld stek. In *Syringa* was het effect van etioleren veel duidelijker in lidstek dan in topstek. Zonder gebruik van auxinen resulteerde etioleren van de moederplanten in 76% beworteling. Dit was aanzienlijk beter dan de 33% beworteling in 1% Rhizopon

AA, dat 1% IBA bevat. Combinatie van beiden gaf 87% beworteling. In *Acer platanoides* werden positieve effecten van etioleren op de beworteling gevonden in twee opeenvolgende jaren in totaal vier verschillende selecties. Etioleren gaf in twee selecties een vergelijkbaar resultaat als een standaardbehandeling van 2% Rhizopon AA. In de andere twee selecties was het resultaat van etioleren duidelijk minder dan dat van 2% IBA. Een combinatie van etioleren en 2% IBA resulteerde in de beste beworteling. Concreet betekent dit dat etioleren een mogelijk alternatief is voor het gebruik van synthetische auxinen, maar dat toch vaak een wat lager bewortelingsresultaat verkregen wordt in vergelijking met standaardbehandelingen zoals die nu in de boomkwekerij gebruikelijk zijn. Daar komt nog bij dat geëtiolerde moederplanten erg slap en kwetsbaar zijn, wat extra aandacht vraagt na het beëindigen van de donkerperiode (planten langzaam laten wennen aan licht en tijdig schermen).

## 8. Gebruikte afkortingen

Ca-Ls	calciumlignosulfonaat
cfu	kolonievormende units
IAA	indolazijnzuur
m-IAA	medium indolazijnzuur (geproduceerd door bacterie)
s-IAA	synthetisch indolazijnzuur
IBA	inbolboterzuur
NAA	naftylazijnzuur
Na-n	natriumnonanaat
PVPP	poly vinyl poly propylene

