
Regulatie van de Fytomorfogenese

Achtergronden en Toepassingen

H. Breteler (red.)



N-168

552301

cabo-dlo Wageningen 1991

92-07

Abstract

Breteler, H. (ed.), 1991. Regulatie van de fytomorfogenese. Achtergronden en toepassingen (Regulation of Phytomorphogenesis. Backgrounds and Applications). Agrobiologische Thema's 5 (Agrobiological Themes 5). DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen, 96 pp.

The publication consists of seven chapters: Coordination of cell division during plant regeneration; hormonal regulation of differentiation in tissue cultures; root regeneration in apple tissue cultures; metabolism and activity of cytokinins in bulbous iris; physiology of rose flower bud opening; effects of light colour in horticulture; research on growth substances in a bird's-eye view, 1960-1990.

Free descriptors: plant physiology, ontogenesis, horticulture, phytohormones

ISBN 90 73384 10 9

© DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

Niets uit deze uitgave, met uitzondering van de titelbeschrijving en korte citaten ten behoeve van een boekbespreking, mag worden gereproduceerd, opnieuw vastgelegd, vermenigvuldigd of uitgegeven door middel van druk, fotokopie, microfilm, langs elektronische of elektromagnetische weg of op welke andere wijze dan ook zonder schriftelijke toestemming van de uitgever, CABO-DLO, Postbus 14, 6700 AA Wageningen. Voor alle kwesties inzake het kopiëren uit deze uitgave: Stichting Reprorecht, Amsterdam.

Gedrukt in Nederland

Inhoudsopgave

Woord vooraf	1
1 Celdeling en regeneratie bij planten	3
J.A. Traas DLO-Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek (CPRO-DLO), Wageningen; Huidige adres: INRA, Station de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Versailles, Frankrijk	
Samenvatting	3
1.1 Inleiding	3
1.1.1 Regulering van de morfogenese	4
1.1.2 Morfogenese in vitro	4
1.2 Coördinatie van celdeling	5
1.2.1 Coördinatie van celdeling in eukaryotische cellen	5
1.2.2 De rol van het cytoskelet bij de deling van plantecellen	6
1.2.3 Inductie van celdeling bij hogere planten: de rol van fosfoproteïnen	10
1.2.4 Fosforyleringen en PPB-vorming	11
1.2.5 Andere factoren die het delingsvlak bepalen.....	12
1.3 Conclusies en perspectieven	12
1.4 Literatuur	13
2 Hormonale regulatie van differentiatie in weefselweek	15
A.F. Croes & G.J. Wullems Experimentele Plantkunde, Afdeling Moleculaire Plantenfysiologie, Universiteit van Nijmegen	
Samenvatting	15
2.1 Inleiding	15
2.1.1 Gevoeligheid voor hormonen	15
2.1.2 Interactie	16
2.2 Onderzoeksresultaten.....	17
2.2.1 Gevoeligheid.....	19
2.2.2 Interactie	21
2.2.3 Samenhang tussen gevoeligheid en interactie	21
2.3 Conclusies.....	22
2.4 Literatuur	23

3 Wortelregeneratie aan weefselkweekmateriaal van de appel 25

W.M. van der Krieken, H. Breteler & M.H.M. Visser
DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

	Samenvatting	25
3.1	Inleiding	25
3.1.1	Achtergrond	25
3.1.2	Omzetting van auxinen.....	27
3.1.3	Werkingswijze van IBA	27
3.2	Resultaten.....	28
3.2.1	Een toetsysteem voor beworteling.....	28
3.2.2	Omzetting van IBA en IAA.....	30
3.2.3	Effect van IAA (afkomstig van IBA) op de wortelvorming.....	30
3.2.4	Relatie tussen auxine-concentratie en wortelvorming.....	30
3.3	Discussie.....	33
3.4	Conclusies.....	34
3.5	Literatuur.....	35

4 Metabolisme en activiteit van cytokininen in de boliris 37

C.R. Vonk
DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

	Samenvatting	37
4.1	Inleiding	37
4.2	Verdeling van recente fotosyntheseprodukten en bloemverdroging.....	38
4.3	De werking van cytokininen en de verdeling van assimilaten.....	39
4.4	Endogene cytokininen in irisknoppen.....	41
4.5	Endogeen zeatine, gebonden of vrij?	42
4.6	Biosynthese van zeatine allylisch fosfaat (ZAP)	43
4.7	Hoe werkt zeatine allylisch fosfaat?	44
4.8	Conclusies	44
4.9	Literatuur.....	45

5 Fysiologie van de groei en bloemknopopening van de roos 47

D. Kuiper, N. Marissen*, H.S. van Reenen & S.A. Ribôt
DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen
*Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland (PBN), Aalsmeer

	Samenvatting	47
5.1	Inleiding	47
5.2	De bloemknopopening en wat daarvoor nodig is.....	50
5.3	De petalen als sink	51
5.4	Hormonale regulatie.....	57
5.5	Evaluatie.....	59

5.6	Literatuur	60
6	Stuurlichteffecten in de tuinbouw	63
	F.M. Maas DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen	
	Samenvatting	63
6.1	Algemene inleiding	64
6.2	Het licht toegelicht.....	65
6.2.1	Definities en eenheden.....	65
6.2.2	Het natuurlijk lichtklimaat: de evolutionaire achtergrond van de fotomorfogenese	66
6.3	Reacties van planten op veranderingen in het lichtklimaat	67
6.4	Fotomorfogenese-onderzoek: richtingen en ontwikkelingen	71
6.4.1	Fundamenteel onderzoek	71
6.4.2	Praktijkgericht onderzoek	72
6.4.3	Lichtkwaliteitseffecten op de groei en bloei van rozen	73
6.5	Literatuur	79
7	Het groeistofonderzoek in vogelvlucht, 1960-1990	81
	H.M. Dekhuijzen DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen	
	Samenvatting	81
7.1	Inleiding	81
7.2	Het werkingsmechanisme van hormonen.....	81
7.3	Hormonale regulatie van de genexpressie.....	83
7.4	Carboxymethyldimethyldithiocarbamaat.....	84
7.5	Hormonen en de vorming van groene eilanden	86
7.6	De rol van hormonen bij de knolvoetziekte	87
7.7	Hormonen en de bij de afrijping van <i>Vicia faba</i> peulen: het gehalte aan hormonen en de gevoeligheid voor hormonen	88
7.8	Literatuur	91
	De auteurs	93

Woord vooraf

Aanleg en groei van organen zijn bij planten belangrijk voor opbrengst en kwaliteit. Het begrip fytomorfogenese omvat de aanleg, groei, rijping en/of veroudering van plantorganen (bladeren, bloemen, zaden, vruchten, etc.). De kennis van de morfogenese is minder ontwikkeld dan die van fysisch meetbare fysiologische processen, zoals fotosynthese, ademhaling en verdamping. Tot voor kort was onderzoek over de morfogenese van plantorganen vooral beschrijvend van aard. Nieuwe inzichten in morfogenetische processen op cel- en orgaanniveau bieden perspectief voor meer toepassingsgericht onderzoek. Celfysiologisch onderzoek naar perceptie en transductie van interne en externe signalen zal het inzicht in de hormonale regulatie van morfogenetische processen in de plant vergroten. Dit legt de basis voor een meer gerichte beïnvloeding van een aantal kwaliteitsbepalende processen bij planten. In de bijdragen aan dit themaboekje wordt de kennis van de fytomorfogenese op verschillende integratieniveaus (cel-, orgaan- en plantniveau) behandeld. Er zijn twee bijdragen van "gast sprekers" en vijf bijdragen vanuit CABO-DLO. De bijdrage van dr. Dekhuijzen heeft een speciaal karakter; er wordt teruggeblikt op de ontwikkelingen in het groeistofonderzoek tijdens zijn betrokkenheid bij het fytofarmaceutisch en plantenfysiologisch onderzoek.

Gaarne wil ik de organisatoren, dr. H. Breteler en dr. L.A.M. van der Heijden, en degenen die een inhoudelijke bijdrage hebben geleverd aan de themadag op 27 november 1991 en aan het themaboekje, bedanken. Ik hoop, dat de geboden informatie voor velen inspirerend en van nut is.

Dr.ir. J.H.J. Spiertz
Directeur CABO-DLO

1 Celdeling en regeneratie bij planten

J.A. Traas

DLO-Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek
(CPRO-DLO), Wageningen; Huidige adres: INRA, Station de Biologie
Cellulaire et Moléculaire, Versailles, Frankrijk

Samenvatting

De plantecel is omgeven door een rigide celwand die snelle vormveranderingen en celmigraties onmogelijk maakt. Daarom moet de morfogenese op cellulair niveau op zeer strikte wijze worden gecoördineerd, hetgeen gebeurt door een precieze controle van celdeling en groei in ruimte en tijd. Dit geldt niet alleen voor de normale ontwikkeling van de plant, maar ook voor de morfogenese in vitro. Problemen bij het ontwikkelen van regeneratietechnieken zijn vaak terug te brengen op een verstoring van de regulering van celdeling en gerichte expansie. In dit hoofdstuk worden twee groepen eiwitten besproken die direct betrokken zijn bij de regulering van de morfogenese. In de eerste plaats wordt het cytoskelet besproken, dat als effectorsysteem de celdeling uitvoert, delingsvlakken vastlegt en de richting van celexpansie bepaalt. Dit onderzoek laat zien dat de mechanismen betrokken bij de geordende ontwikkeling zijn verstoord in protoplasten en calluscellen. Specifieke veranderingen in het cytoskelet (de vorming van preprofasebanden) blijken geassocieerd te zijn met de inductie van meristemen. Een tweede groep eiwitten die wordt besproken is betrokken bij een fosforyleringscascade die het verloop van de celcyclus controleert. Deze eiwitten zijn o.a. verantwoordelijk voor het handhaven van delingsactiviteit, maar reguleren eveneens de veranderingen die in het cytoskelet optreden gedurende de preprofasebandvorming.

1.1 Inleiding

Fytomorfogenese is het resultaat van het tot expressie komen van genetische informatie onder invloed van talrijke factoren. Het is echter in de meeste gevallen onduidelijk hoe de signaaltransductieketen verloopt die ligt tussen het veranderen van bijvoorbeeld de hormoonconcentratie of de temperatuur en de uiteindelijke morfogenetische respons. Het is daarom essentieel om een beter inzicht te verkrijgen in de processen die op moleculair en cellulair niveau direct betrokken zijn bij de

regulering van groei en vorm. De behoefte aan betrouwbare en efficiënte regeneratietechnieken in de moderne plantenveredeling heeft ook geleid tot een hernieuwde aandacht voor de mechanismen die aan de basis liggen van de morfogenese in vitro. De resultaten van het onderzoek moeten ons niet alleen in staat stellen om het regeneratieproces beter te beheersen. Een fundamentele analyse zal tevens informatie opleveren over de regulering van fytomorfogenese in het algemeen.

1.1.1 Regulering van de morfogenese

De morfogenese in strikte zin, dus de processen die de vorm van de plant bepalen, wordt in belangrijke mate beheerst door het feit dat de individuele cellen omringd zijn door een rigide celwand. Deze wand maakt snelle vormveranderingen en celmigraties, processen die bij de dierlijke ontwikkeling van groot belang zijn, onmogelijk. Aangezien correcties dus moeilijk zijn, moet de plant de morfogenese op celniveau op een zeer strikte wijze reguleren. Dit gebeurt door een precieze controle van celdeling en groei in ruimte en tijd. Celdelingsactiviteit bijvoorbeeld wordt alleen geïnduceerd en gehandhaafd in bepaalde delen van de plant. Andere belangrijke processen zijn het vastleggen van het delingsvlak in de meristemen en het bepalen van de strekkingsrichting van de cellen.

1.1.2 Morfogenese in vitro

Dezelfde mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de ontwikkeling van de normale plant, zijn uiteraard ook van groot belang bij de morfogenese in vitro. Dit wordt duidelijk wanneer we bijvoorbeeld de regeneratie van protoplasten volgen. Protoplasten worden vaak geïsoleerd uit weefsels die geen mitotische activiteit vertonen. Deze cellen ondergaan eerst een slecht omschreven periode die wordt aangeduid met dedifferentiatie, waarna er een eerste belangrijke stap plaatsvindt: de inductie van celdeling. In vele gevallen zal deze celdeling leiden tot de vorming van ongedifferentieerd, ongeordend weefsel (callus). Wanneer dit callus vervolgens onder de juiste omstandigheden wordt gekweekt zal het overgaan tot een geordende ontwikkeling: er worden meristemen gevormd waarna verdere differentiatie plaatsvindt.

Problemen bij de regeneratie doen zich veelvuldig voor rondom de inductie van celdeling en geordende ontwikkeling: het is vaak niet mogelijk om mitose in een celpopulatie te induceren of, indien dit wel het geval is, zijn de delingen abnormaal of vindt er geen geordende ontwikkeling plaats. Zo verloopt inductie van celdeling bij protoplasten van monocotyle gewassen meestal moeizaam. Hetzelfde probleem doet zich voor bij geïsoleerde microsporen wanneer het gaat om de productie van haploïde embryo's. Cellen die onder grote stress hebben gestaan, bijvoorbeeld bij transformatie of celfusie, zijn vaak niet meer in staat tot mitose of meristeemvorming.

Dergelijke beperkingen in de toepassing kunnen vaak worden opgeheven door een

omvangrijke empirische benadering. Dit is echter lang niet altijd voldoende en men is in toenemende mate overgegaan naar een fundamenteelere analyse van de mechanismen die ten grondslag liggen aan het regeneratieproces. Deze omweg zal via een beter inzicht in de relevante processen leiden tot een betere beheersing van de morfogenese. Hiertoe zijn biologische systemen ontwikkeld gebruikmakend van modelgewassen. Dergelijke gewassen moeten aan vrij strikte voorwaarden voldoen. Een eerste voorwaarde is natuurlijk dat een plant goed moet kunnen regenereren. Verder moet de soort genetisch gezien goed zijn gekarakteriseerd, en bij voorkeur moeten mutanten beschikbaar zijn die verschillen in hun regeneratiegedrag. Een andere voorwaarde is dat de plant transformeerbaar moet zijn om een functionele analyse van bepaalde genen mogelijk te maken.

De meeste beschikbare modelgewassen beantwoorden niet volledig aan deze eisen. Tabak is bijvoorbeeld zeer goed regenererbaar en transformeerbaar, maar genetisch gezien slecht gedefinieerd. *Arabidopsis thaliana*, een ander modelgewas, is op genetisch gebied zeer goed gekarakteriseerd, maar regeneert niet altijd goed en is bovendien niet altijd geschikt voor biochemische analyses. Het is daarom vaak noodzakelijk om het werk te baseren op een combinatie van soorten.

1.2. Coördinatie van celdeling

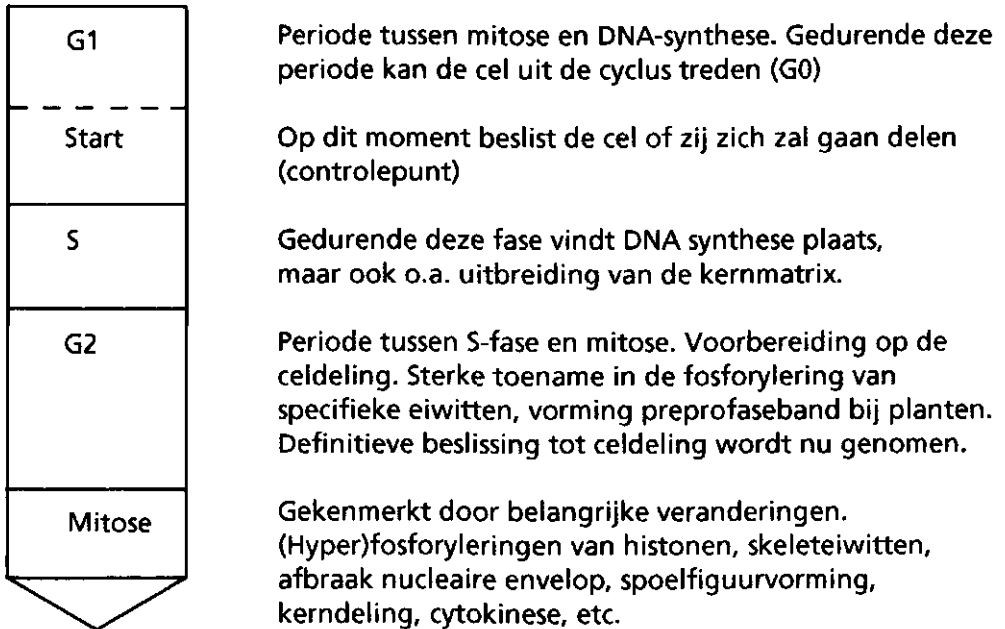
1.2.1 Coördinatie van celdeling in eukaryotische cellen

De coördinatie van de mitose bij eukaryotische cellen is een onderwerp dat momenteel zeer sterk in de belangstelling staat. Gedurende de laatste jaren is in onze kennis omtrent dit onderwerp een enorme vooruitgang geboekt.

Het huidige beeld dat wij hebben van de celcyclus is dat van een zeer complex proces, gecoördineerd door een beperkt aantal sleuteleiwitten met feed back mechanismen en controlepunten (Figuur 1.1; voor overzichtsartikel zie: Murray & Kirschner, 1989).

De bestaande modellen zijn gebaseerd op de gecombineerde resultaten van onderzoek aan gisten, schimmels en dierlijke cellen. Juist het werk aan een breed spectrum aan organismen heeft duidelijk gemaakt dat de celcyclus in alle eukaryoten volgens eenzelfde schema verloopt en wordt gereguleerd door evolutionair zeer goed geconserveerde eiwitten. Met name twee groepen van eiwitten zijn hierbij van belang. In de eerste plaats is dat een groep van proteïnen betrokken bij een fosforyleringscascade. Deze cascade, waarbij het ene eiwit het andere fosforyleert en op deze wijze activeert of inactiveert, induceert de belangrijke veranderingen die optreden gedurende de mitose en is onder andere betrokken bij de initiatie van DNA-synthese, afbraak van de nucleaire envelop, spoelfiguurvorming en DNA-condensatie via histonfosforylering. Een belangrijk doelwit van deze cascade is het cytoskelet, dat direct verantwoordelijk is voor de belangrijke structurele veranderingen in de cel gedurende de mitose, en dat de deling uiteindelijk uitvoert (zie b.v. Lloyd, 1987; Staiger & Lloyd, 1991). Zowel het cytoskelet als de fosforyleringscascade

vormen zeer interessante markersystemen voor het bestuderen van de morfogenese in het algemeen en de regeneratie in het bijzonder. De betreffende eiwitten zijn zeer goed geconserveerd waardoor resultaten verkregen aan een modelsysteem zeer gemakkelijk kunnen worden gegeneraliseerd. Een ander belangrijk voordeel is dat beide eiwitssystemen zeer goed zijn gekarakteriseerd in dierlijke cellen en schimmels.



Figuur 1.1. Overzicht van de belangrijkste etappes van de celcyclus.

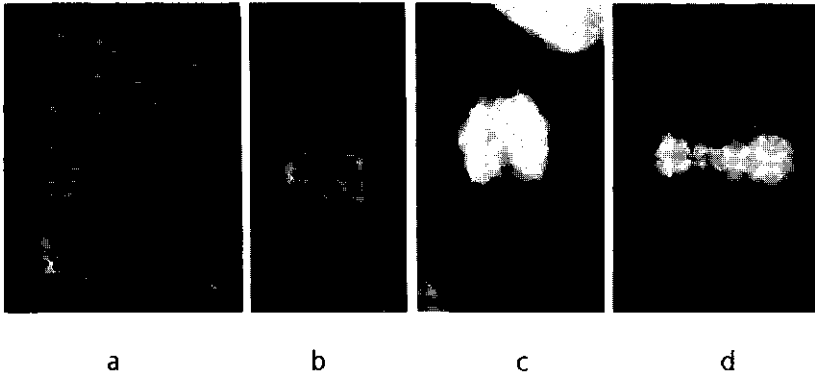
1.2.2 De rol van het cytoskelet bij de deling van plantecellen

Het cytoskelet kan worden gedefinieerd als een complex netwerk van eiwitten dat zich uitstrekt in het cytoplasma tussen de plasmamembraan en de kernvelop. De belangrijkste componenten van dit netwerk zijn de microtubuli (25 nm, opgebouwd uit heterodimeren van α - en β -tubuline), F-actine (5-7 nm, opgebouwd uit het globulaire eiwit G-actine) en intermediaire filamenten (10 nm, bestaande uit een heterogene groep van eiwitten). Hiernaast onderscheidt men nog een groot aantal geassocieerde eiwitten die betrokken zijn bij de interacties tussen de onderlinge filamenten en bij de interacties met andere componenten van de cel.

In algemene zin is het netwerk betrokken bij een groot aantal fysisch-chemische processen zoals transport, endo- en exocytose, verdeling van eiwitten en uiteraard ook de coördinatie van celdeling.

De wijze waarop het cytoskelet de celdeling bij plantecellen coördineert is gedurende de laatste jaren vooral met behulp van microscopische technieken geanalyseerd, waarbij gebruik is gemaakt van specifieke antilichamen tegen cytoskelet-eiwitten in combinatie met immunofluorescentie. Van dit onderzoek zal een kort

overzicht worden gegeven (voor overzichtsartikelen: Lloyd, 1987; Staiger & Lloyd, 1991; Traas, 1990).



Figuur 1.2. Immunofluorescentiebeelden van het microtubulaire skelet in meristematische cellen van maïs. Gedurende de interfase (a) liggen de microtubuli min of meer parallel aan elkaar, loodrecht op de strekkingsrichting van de cellen. Gedurende de preprofase en de profase wordt de zgn. preprofaseband gevormd. In (b) is een vroege preprofaseband te zien. Rondom de kern vormt zich een spoelfiguur (c). Na de kerndeling wordt de fragmoplast gevormd (d). Schaal: 1 cm= 11 μ m.

Het cytoskelet in meristematische cellen

Het meeste onderzoek is tot dusver gericht op het gedrag van het microtubulaire systeem en het F-actine gedurende de celcyclus in meristematische cellen. Dit skelet volgt een nauwkeurig vastgelegd programma van reorganisaties gedurende de mitose (Figuur 1.2). In interfasecellen zijn de microtubuli vooral geassocieerd met de plasmamembraan en liggen zij parallel aan elkaar, loodrecht op de strekkingsas. Dit patroon verandert na de S-fase. Gedurende G2 gaan de membraangebonden microtubuli zich geleidelijk concentreren in de zogenaamde preprofaseband (PPB) die de kern omgeeft en die precies het toekomstige delingsvlak aangeeft. Steeds meer gegevens wijzen erop dat het microtubulaire systeem in de preprofaseband in combinatie met het F-actine, het toekomstige delingsvlak vastlegt (Traas et al., 1987). De microtubuli in de preprofaseband worden weer afgebroken gedurende de prometafase en gedurende de metafase kunnen er alleen microtubuli worden waargenomen in de spoelfiguur. Het actinenetwerk blijft gehandhaafd en is waarschijnlijk betrokken bij de positionering van de spoelfiguur en het vastleggen van het delingsvlak. Na de kerndeling wordt de fragmoplast gevormd die vanuit het midden van de cel uitgroeit naar de plasmamembraan. Na de celdeling wordt er een nieuw interfasesysteem gevormd. Deze opeenvolging van veranderingen is typerend voor alle meristematische cellen.

Het cytoskelet en regeneratie

Met dit zeer gedetailleerde beeld van het cytoskelet in geordende weefsels als basis werd begonnen met de analyse van het microtubulaire en F-actine-skelet gedu-

rende de regeneratie vanuit protoplasten. Hiervoor werd gebruik gemaakt van *Petunia hybrida* als modelsysteem. Voor petunia werd een zeer goed gedefinieerd regeneratiesysteem ontwikkeld gebruikmakend van een vijftigtal lijnen die verschillen in hun vermogen om te regenereren vanuit mesofylprotoplasten (Dulieu et al., 1983; Traas et al., 1990). In de eerste plaats werd een studie gemaakt van de verdeling van cytoskeletelementen (zie voor samenvatting Figuur 1.3).

Vers geïsoleerde protoplasten vertonen een ongeordend microtubulair en F-actinesysteem gedurende de interfase. Zij lijken hierin op de oorspronkelijke mesofylcellen, maar ook als de microtubuli parallel aan elkaar liggen in de betreffende cel, zal deze ordening verloren gaan gedurende protoplastvorming (zie bv. Simmonds, 1986). Deze situatie blijft gehandhaafd in de calluscellen en hierin treedt slechts verandering op wanneer de regeneratie goed op weg is en opnieuw gedifferentieerde cellen aanwezig zijn (Traas et al., 1990).

	INTERFASE			MITOSE				cytokin.	
	G1/S	G2	G2/preprof.	profase	metaf.	anaf.	telof.		
a									mer.
b				 of: 	 of: 	 of: 	 of: 		1ste deling
c			 of: 	 of: 					callus

Figuur 1.3. Het microtubulaire skelet in delende meristematische cellen (a), in cellen die hun eerste deling in vitro ondergaan (b) en in calluscellen (c). Deze waarnemingen zijn gebaseerd op experimenten met o.a. petunia (Traas et al., 1990) en *Vicia* (Simmonds & Setterfield, 1986). In meristematische cellen wordt de PPB gevormd gedurende de G2 en G2/preprophase. Deze band verdwijnt gedurende de prometafase. Na de kerndeling wordt de fragmoplast gevormd, bestaande uit korte microtubuli. Deze structuur, die in het centrum van de cel ontstaat, groeit vervolgens uit naar de oude plasmamembraan. Nieuwe interfase-microtubuli worden gevormd vanuit het kernoppervlak. Gedurende de eerste deling in vitro wordt er geen normale PPB gevormd. Een band ontstaat laat gedurende de profase of in het geheel niet. Gedurende de metafase kunnen vaak veelpolige spoelfiguren ontstaan. Gedurende de anafase/cytokinese ontstaat vaak geen of een onvolledige fragmoplast waardoor veelkernige of polyploïde cellen ontstaan. In de callusfase is alleen de PPB-vorming nog abnormaal.

Een ander belangrijk verschil met de normale meristematische cellen wordt zichtbaar wanneer we het cytoskelet bekijken gedurende de eerste delingen in vitro en gedurende de callusfase (Figuur 1.3). In deze cellen is namelijk de preprofasebandvorming verstoord (Simmonds, 1986; Traas et al., 1990). De band kan alleen worden waargenomen in profasecellen en is dan ook vaak nog onvolledig. Het lijkt er dus op dat het mechanisme dat het delingsvlak bepaalt is verstoord. Dit blijft het geval, ook wanneer het callus op een inductiemedium wordt geplaatst. Het aantal PPB's neemt slechts toe op het moment dat de meristemen zich vormen, voor petunia ongeveer na 14 dagen op inductiemedium (Tabel 1.1). De correlatie tussen PPB-vorming en de geordende ontwikkeling wordt des te sterker wanneer we gaan kijken naar verschillende lijnen die niet in staat zijn om te regenereren op standaard inductiemedium en niet verder komen dan de callusfase. In deze gevallen worden nooit goede PPB's gevormd.

Tabel 1.1. Relatieve hoeveelheid preprofasebanden (PPB-index: aantal banden gedeeld door het aantal fragmoplasten) in callus van petunia op scheutinductiemedium. Een regenererende lijn (PC6) werd vergeleken met een niet-regenererende (S+T40). De index stijgt alleen in de regenererende lijn op het moment dat meristemvorming plaatsvindt.

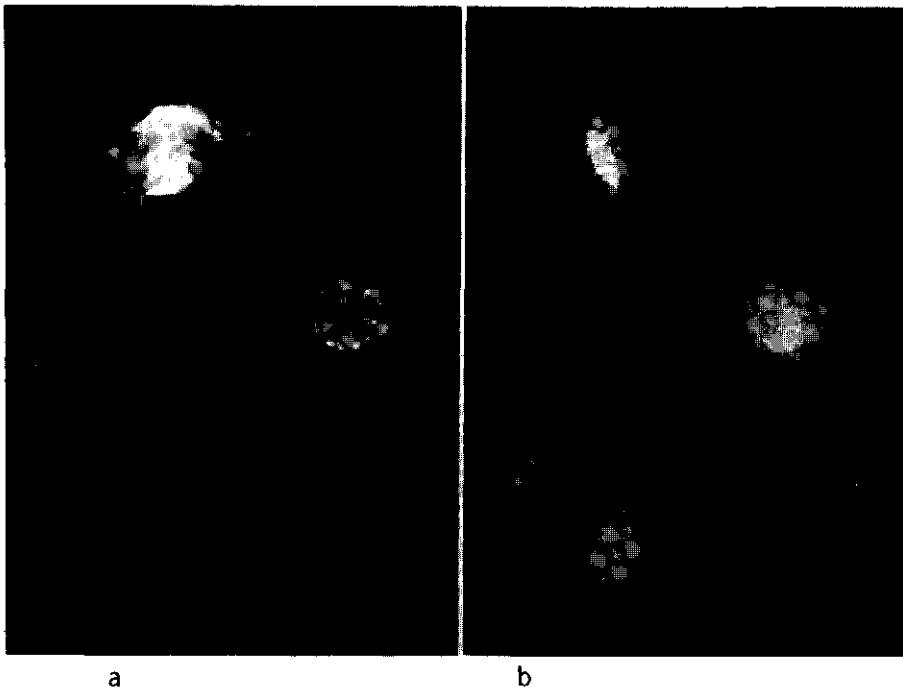
Tijd op scheutinductiemedium (d)	PPB-index in callus (SD)	
	lijn PC6	lijn S+T40
0	0,34 (0,24)	0,28 (0,11)
3	0,38 (0,08)	0,32 (0,15)
9	0,30 (0,08)	0,31 (0,21)
17	2,00 (0,65)	0,37 (0,09)

Voor wat betreft de spoelfiguur en de fragmoplast worden ook soms afwijkingen waargenomen, maar die beperken zich tot de eerste delingen in vitro. Dan worden namelijk regelmatig veelpolige spoelfiguren of onvolledige fragmoplasten waargenomen (Simmonds & Setterfield, 1986). Dit leidt dan tot veelkernige of polyploïde cellen en zelfs permanente genetische afwijkingen in de regeneranten (Figuur 1.3). Deze resultaten tonen aan dat belangrijke veranderingen in de ordening van het cytoskelet kunnen worden gecorreleerd met belangrijke stappen in het regeneratieproces. Met name de vorming van de preprofaseband lijkt een belangrijke stap te zijn bij de overgang naar de geordende groei. Een volgende belangrijke vraag is nu, hoe deze veranderingen in het cytoskelet worden gestuurd, en welke factoren betrokken zijn bij de coördinatie van celdeling bij plantecellen.

1.2.3 Inductie van celdeling bij hogere planten: de rol van fosfoproteïnen

Zoals besproken in paragraaf 1.2.1 wordt de celcyclus bij dierlijke cellen en lagere planten gereguleerd door een fosforyleringscascade (Murray & Kirschner, 1989). De fosforylering van bepaalde eiwitten neemt toe gedurende de interfase en een maximum wordt bereikt gedurende de pro- en metafase. Vervolgens worden de betreffende eiwitten gedefosforyleerd en/of afgebroken gedurende de ana- en telofase. Bij plantecellen is over deze fosforyleringscascade zeer weinig bekend. Men heeft tot nu toe slechts één eiwit van deze cyclus geïdentificeerd (Feiler & Jacobs, 1990; Colasanti et al., 1991), een homoloog van het gisteiwit p34(cdc2) dat in alle eukaryotische cellen een sleutelpositie inneemt in de coördinatie van celdeling.

Daarom werd er een project gestart dat er op is gericht om andere celcyclus-regulerende eiwitten te karakteriseren. Hierbij wordt vooral gebruik gemaakt van suspensiecultures van tabak.



Figuur 1.4. MPM2 is een monokonaal antilichaam, dat mitosespecifieke fosfo-eiwitten herkent. In plantecellen herkent het vooral kerneiwitten. Gedurende de interfase is de hoeveelheid van deze fosfo-eiwitten vrij laag ten opzichte van delende cellen. In (a) fluoresceren de metafase- en profasecellen veel sterker dan de interfasecel. In (b) is de kernkleuring (DAPI) te zien van dezelfde cellen. Schaal: 1 cm = 15 μ m.

Een eerste voorwaarde voor dit onderzoek is om een suspensie te verkrijgen die zich zo synchroon mogelijk deelt. Dit is mogelijk met behulp van specifieke remstoffen zoals aphidicoline dat de DNA-synthese remt. Wanneer cellen worden behandeld met aphidicoline zullen zij voor de overgrote meerderheid geblokkeerd raken aan het eind van G1, vlak voor de DNA-synthese. Wanneer de remstof wordt verwijderd, gaan de cellen synchroon in deling. Op deze wijze kunnen suspensies verkregen worden die voor 80% in de mitotische fase verkeren (Hasezawa et al., 1991). Dit relatief eenvoudige systeem werd gebruikt om mitose-specifieke eiwitten op te sporen. Hierbij werd eveneens gebruik gemaakt van een antilichaam dat specifiek mitotische fosfo-eiwitten herkent. Dit monokonaal, MPM2 genaamd, is oorspronkelijk gemaakt tegen eiwitten uit delende dierlijke cellen (Davis et al., 1983), maar het herkent ook gefosforyleerde eiwitten in lagere planten (bijvoorbeeld *Aspergillus*). Dit antilichaam werd eerst getest met behulp van de immunofluorescentiemethode. De resultaten laten zien dat het antilichaam een epitoom herkent dat voornamelijk is geconcentreerd in de kern (Figuur 1.4). De hoeveelheid van dit epitoom blijkt te variëren gedurende de celcyclus. Gedurende de G1- en S-fase blijft deze hoeveelheid relatief laag om gedurende G2 te verdubbelen (Tabel 1.2). Een maximum wordt bereikt gedurende de pro- en metafase, waarna de hoeveelheid weer afneemt. Op 1- en 2-dimensionale western blots van polyacrylamide gels blijkt het antilichaam een tiental gefosforyleerde eiwitten te herkennen. Een deel van het werk is er nu op gericht om deze eiwitten nader te karakteriseren.

Tabel 1.2. Relatieve hoeveelheid mitotische fosfo-eiwitten in suspensiecultures van tabak. Cellen werden gelabeld met DAPI (een kleurstof die DNA bindt) en met het monokonaal MPM2. De kleuringsintensiteit werd bepaald met behulp van beeldanalyse-apparatuur. Eerst werd de fase waarin de cellen zich bevonden bepaald. Vervolgens werd de hoeveelheid gebonden fluorescerend antilichaam bepaald. De relatieve hoeveelheid fosfo-eiwitten neemt toe gedurende G2 en daalt na een maximum dat wordt bereikt gedurende de pro/metafase.

Fase	G1/S	G2	pro/ metafase	ana/ telofase
Relatieve intensiteit fluorescentie (SD)	0,27 (0,01)	0,43 (0,14)	1,00 (0,80)	0,38 (0,18)

1.2.4 Fosforyleringen en PPB-vorming

Het is interessant dat de mitose-specifieke fosforyleringen beginnen toe te nemen gedurende G2. Dit suggereert dat een aantal G2-processen, en met name de PPB-vorming ook worden gereguleerd door de fosforyleringscascade. Tabakscellen in suspensie zijn echter in een callusfase en zij vormen geen normale preprofaseband.

Daarom hebben we ook gekeken naar delende meristeemcellen. Een analyse van meristematische cellen die zowel met antitubulines als met MPM2 waren gekleurd, geeft aan dat de vorming van de preprofase band strikt gecorreleerd is met een toename in de hoeveelheid fosfo-proteïnen. Dit betekent dat het proces dat het delingsvlak bepaalt een integraal onderdeel is van de fosforyleringscyclus. Tegelijkertijd geven de resultaten met tabakssuspensies aan dat een toename in de fosforylering alleen niet voldoende is om de PPB te induceren.

1.2.5 Andere factoren die het delingsvlak bepalen

Uit het bovengaannde blijkt dat niet alleen de fosforyleringscyclus verantwoordelijk is voor het vastleggen van het delingsvlak. Andere factoren spelen hierbij ongetwijfeld eveneens een rol. Hoewel hierover nog zeer weinig bekend is, kunnen we wel enige mogelijkheden aangeven. Normaal gesproken bepaalt de cel het delingsvlak in relatie tot haar positie in het weefsel. Er moet dus informatie vanuit dit omringende weefsel tot de cel doordringen. Het zou hierbij kunnen gaan om hormoon- of zelfs elektrische gradiënten (Rathore & Goldsworthy, 1985). Of deze factoren ook een rol spelen bij de inductie van de geordende ontwikkeling valt op dit moment moeilijk te zeggen. Een andere factor die van belang lijkt te zijn bij de georganiseerde groei is het verschil in spanning of druk ("strain") dat ontstaat in de weefsels doordat verschillende celtypes op een verschillende manier groeien. Zo staan de epidermale cellen onder een gerichte druk vanuit het inwendige. Een zeer suggestief experiment werd uitgevoerd door Lintilhac en Vesecky (1986). Zij plaatsten tabakscallus onder een gerichte druk en namen waar dat de cellen zich vervolgens loodrecht op die drukrichting gingen delen. Dergelijke spanningsverschillen, die ongetwijfeld ook ontstaan in groeiend callus, zouden heel goed kunnen leiden tot de inductie van geordende ontwikkeling en meristeemvorming. Ook hier zou het cytoskelet door te reageren op drukverschillen van buitenaf, een belangrijke rol kunnen spelen.

1.3 Conclusies en perspectieven

In dit hoofdstuk heb ik proberen duidelijk te maken hoe een fundamentele analyse een beter inzicht kan verschaffen in de processen die ten grondslag liggen aan de regeneratie.

In het onderzoek zoals dat hier is besproken kunnen verschillende lijnen worden onderscheiden. Ten eerste op het meest fundamentele niveau de analyse van het celdelingsproces in modelsystemen. Hierbij wordt niet alleen gebruik gemaakt van hogere planten, maar eveneens van dierlijke organismen en schimmels. In dit stadium wordt de nadruk vooral gelegd op dit fundamentele werk en is te verwachten dat in de komende jaren enkele belangrijke regulerende eiwitten nader zullen worden gekarakteriseerd. De resultaten van dit onderzoek vormen de basis voor het meer strategische onderzoek aan diverse regeneratiesystemen zoals bijvoorbeeld protoplastregeneratie of microsporencultuur.

In meer algemene zin zal dit onderzoek informatie opleveren over de processen die de fytomorfogenese uiteindelijk direct controleren. De resultaten zullen ons ook in staat stellen om de hele signaaltransductieketen, die informatie van buitenaf omzet in een morfogenetische respons, beter te begrijpen en, op de langere termijn, te sturen.

1.4 Literatuur

- Colasanti, J., M. Tyers & V. Sundaresan, 1991
Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 3377-3381.
- Davis, F.M., T.Y. Tsao, S.K. Fowler & P.N. Rao. 1983
Monoclonal antibodies to mitotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 80, 2926-2930.
- Dulieu, H.L., R. Bruneau & A. Pelletier, 1983
Heritable differences in in vitro regenerability in *Petunia*, at the protoplast and the seedling stage. 6th International Protoplast Symposium, 237-238.
- Feiler, H.S. & T.W. Jacobs, 1990
Cell division in higher plants: a cdc2 gene, its 34-kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 5397-5401.
- Hasezawa, S., J. Marc & B.A. Palevitz, 1991
Microtubule reorganization during the cell cycle in synchronized BY-2 Tobacco suspensions. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 18, 94-106.
- Lloyd, C.W., 1987
The plant cytoskeleton: the impact of fluorescence microscopy. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 49-66.
- Lintilhac P. & T.B. Vesecky, 1986
Stress induced alignment of division plane in plant tissue grown in vitro. *Nature* 307, 363-364.
- Murray, A.W. & M.W. Kirschner, 1989
Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 246, 614-621.
- Rathore, K.S., & A. Goldsworthy, 1985
Electrical control of shoot regeneration in plant tissue cultures. *Biotechnology* 3, 1107-1109.
- Simmonds, D.H. & G. Setterfield, 1986
Aberrant microtubule organization can result in genetic abnormalities in protoplast cultures of *Vicia hajastana* Grossh. *Planta* 167,460-468.
- Simmonds, D.H., 1986
Prophase bands of microtubules occur in protoplast cultures of *Vicia hajastana* Grossh. *Planta* 167, 469-472.
- Staiger, C.J. & C.W. Lloyd, 1991
The plant cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 3, 33-42.
- Traas, J.A., J. Doonan, D. Rawlins, P. Shaw, J. Watts & C.W. Lloyd, 1987
An actin network is present throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *Journal of Cell Biology* 105, 387-395.

Traas, J.A., 1990

The plasma membrane associated cytoskeleton. In: C. Larsson & I.M. Möller (Eds). *The Plant Plasma Membrane*. Springer Verlag, Heidelberg, 269-292.

Traas, J.A., J.P. Renaudin & B. Teysseidier de la Serve, 1990

Changes in microtubular organization mark the transition to organized growth during organogenesis in *Petunia hybrida*. *Plant Science* 68, 249-256.

2 Hormonale regulatie van differentiatie in weefselkweek

A.F. Croes en G.J. Wullems
Experimentele Plantkunde, Afdeling Moleculaire Plantenfysiologie,
Universiteit van Nijmegen

Samenvatting

De rol van hormonen bij de differentiatie in vitro is zeer groot, omdat het weefsel in een explantaat uitzonderlijk gevoelig is voor hormonen. Het uitsnijden van het explantaat veroorzaakt dedifferentiatie van cellen, die vervolgens redifferentiëren in verschillende richtingen. Er is dus een voorbijgaande periode van vergrote plasticiteit waarin in de cel een keuze wordt gemaakt voor een specifiek differentiatieproces. In deze periode is de gevoeligheid voor hormonen verhoogd en hun effectiviteit derhalve extra groot. De omvang en aard van het effect van een hormoon worden ook gemodificeerd door de aanwezigheid van andere hormonen. Bij het ontrafelen van deze interacties zijn experimenten waarin de concentraties van de hormonen onafhankelijk van elkaar worden gevarieerd, onmisbaar. Het belang voor de differentiatie in weefselkweek van gevoeligheid, hormooninteractie en hun onderlinge samenhang wordt met een aantal voorbeelden gedemonstreerd.

2.1 Inleiding

2.1.1 Gevoeligheid voor hormonen

Plantehormonen zijn ongetwijfeld betrokken bij differentiatie in planten, maar het is niet gemakkelijk een algemene uitspraak te doen over het belang van hun rol bij dit proces. In bepaalde gevallen is de rol van een hormoon duidelijk groot. Wanneer bijvoorbeeld afrikaantjes geïnfecteerd worden met een wild-type stam van *Agrobacterium tumefaciens*, ontwikkelen zij tumoren, die gedurende lange tijd als ongedifferentieerd weefsel in vitro verder te kweken zijn. Als de infectie wordt uitgevoerd met een gemuteerde bacterie, waarbij het cytokinine-gen is geïnactiveerd, worden wortels gevormd, die onbepakt in cultuur zijn te houden (Croes & Wullems, 1989). De aan- of afwezigheid van het enkele genetische element dat leidt tot

overproduktie van cytokinine, bepaalt dus de aard van het weefsel en houdt deze in stand.

Wanneer daarentegen hetzelfde cytokinine-gen, voorzien van een 'heat-shock'-promoter, wordt geïntroduceerd in tabak en in de transgene planten tot expressie wordt gebracht, wijken deze relatief weinig af van de ongetransformeerde controles (Klee & Estelle, 1991). Door het geven van heat shocks kan het cytokinine-niveau tot 40 maal dat van de ongetransformeerde planten worden opgevoerd zonder dramatische gevolgen voor de morfologie: de planten bloeien en produceren kiemkrachtig zaad. Een dergelijke waarneming relativeert de rol van hormoonconcentraties bij de morfogenese.

De aard van het weefsel is duidelijk bepalend voor de omvang van de respons op het hormoon. Het met *Agrobacterium* geïnfecteerde weefsel is veel gevoeliger voor cytokinine dan de transgene planten. Het verschil wordt veroorzaakt door de aard van het infectieproces: bacteriën komen in contact met weefsel dat is beschadigd. De verwonding leidt tot destabilisering, waarbij cellen dedifferentiëren, dat wil zeggen delen en hun organisatie gedeeltelijk verliezen. Door het ontstaan van nieuwe differentiatiepatronen in de celmassa, ontwikkelen zich uit de gedifferentieerde cellen verschillende celtypen. Er is dus tijdelijk sprake van een plasticiteit, die ontwikkeling in meer dan één richting mogelijk maakt. In het stadium, waarin de differentiatie van de individuele cel nog niet is gefixeerd, is het weefsel sterk beïnvloedbaar door hormonen en heeft dus een grote gevoeligheid. In de transgene planten is het ontwikkelingspatroon al gevestigd en zijn de cellen relatief ongevoelig, ook voor hoge hormoonconcentraties.

Van de grote gevoeligheid van gedifferentieerde cellen wordt door de mens gebruik gemaakt om in weefselkweek differentiatie te induceren en ook scheuten te laten ontstaan, waaruit planten kunnen worden geregenereerd. De rol van hormonen bij differentiatie en morfogenese wordt daarom veelvuldig aan explantaten bestudeerd. De resultaten zijn echter niet zonder meer extrapoleerbaar naar de intacte plant.

Een ander weefsel met grote plasticiteit is de worteltop. In het vegetatiepunt van de stengel verloopt de bladvorming volgens een sterk gedetermineerd patroon, dat tot uiting komt in een voor de soort karakteristieke bladstand. In de worteltop ligt de plaats waar de zijwortels ontstaan niet zo vast: nieuwe primordia kunnen ook tussen al aanwezige wortels worden aangelegd. De worteltop is dus plastisch waardoor het ontwikkelingspatroon, zoals bij de gedifferentieerde cellen, sterk beïnvloedbaar is door hormonen.

2.1.2 Interactie

Inductie van differentiatie en orgaanvorming in een explantaat is in het algemeen afhankelijk van tenminste twee hormonen, meestal een auxine en een cytokinine. Hun effecten op wortel- en scheutvorming in tabaksexplantaten hebben geleid tot het populaire concept van de hormoonbalans, dat inhoudt dat de verhouding tussen de concentraties auxine en cytokinine bepaalt of er wortels, dan wel scheuten ontstaan. Analyse van dit concept in meer fysiologische termen leidt tot het begrip

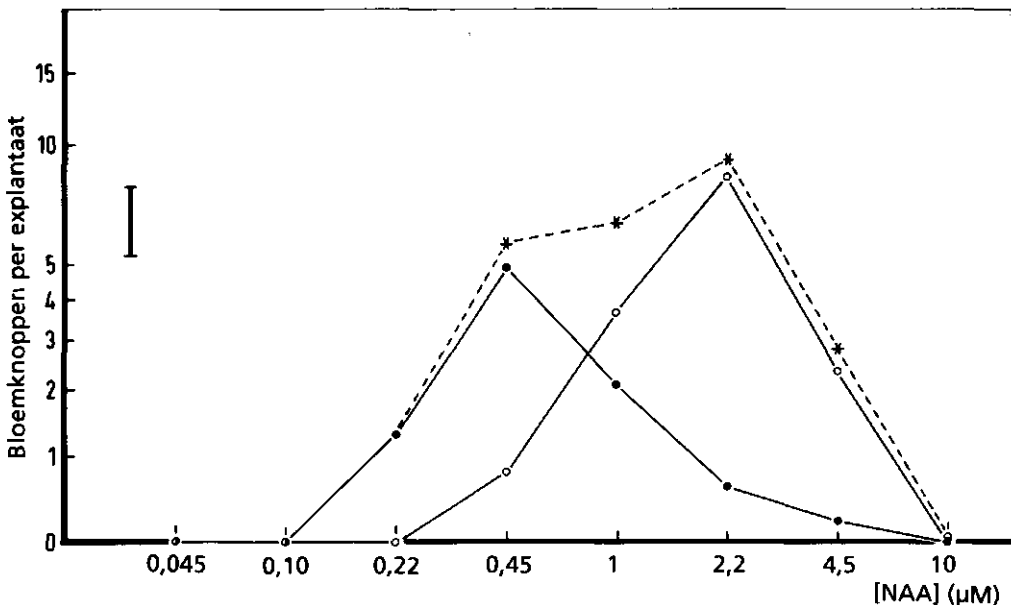
interactie. De interactie tussen auxine en cytokinine bij de organogenese neemt twee vormen aan:

- positieve interactie: de aanwezigheid van beide hormonen is vereist voor orgaanvorming;
- negatieve interactie: auxine en cytokinine remmen elkaars effect.

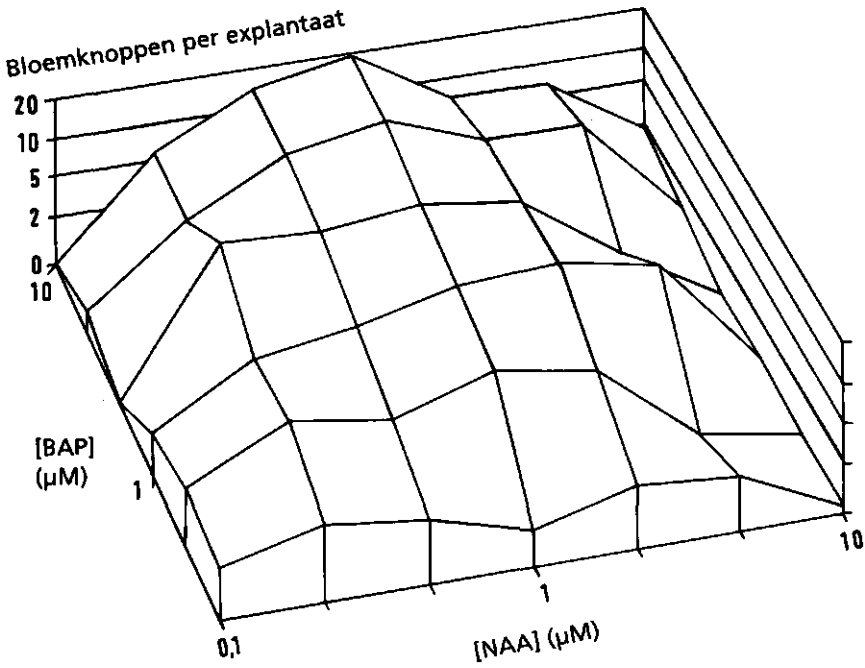
De concentraties van een hormoon waarbij de twee typen interactie optreden kunnen sterk verschillen. In explantaten van tabak is de cytokinineconcentratie die wortelvorming remt, ongeveer een factor 100 lager dan de concentratie die knoppen induceert.

2.2 Onderzoekresultaten

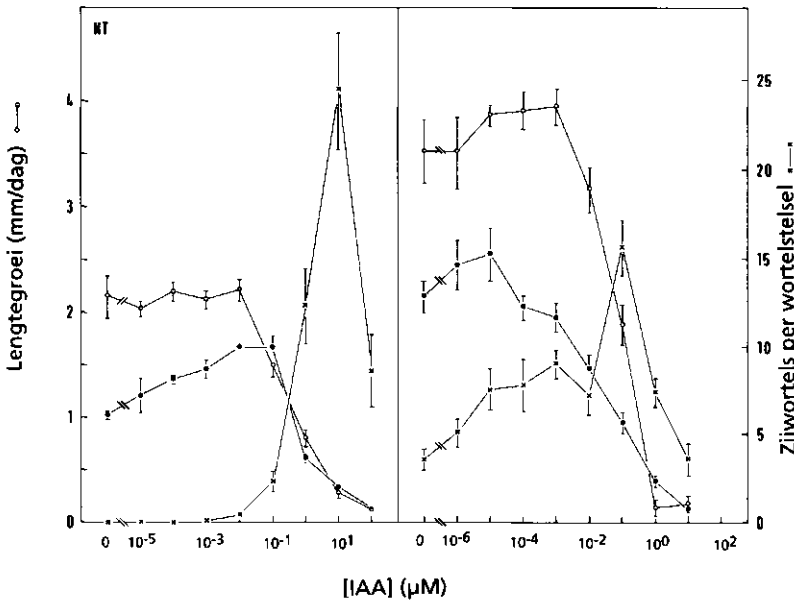
In ons laboratorium zijn de effecten van hormonen op differentiatie in vitro bestudeerd aan twee modelsystemen, die een kwantificeerbare respons geven op hormoon-applicatie. Explantaten van bloemstelen van tabak vormen bloemknoppen (Smulders, 1989; Van der Krieken, 1990), waarvan het aantal afhankelijk is van de concentraties auxine en cytokinine (Figuren 2.1 en 2.2). De auxineconcentratie bepaalt bovendien de positie van de knoppen: deze worden aan één kant of over het hele explantaat gevormd (Figuur 2.1; Smulders et al., 1988). Het tweede modelstelsel wordt gevormd door geïsoleerde wortels van het afrikaantje. De lengtegroei en de vertakingsgraad van deze wortels wordt sterk beïnvloed door auxine (Figuur 2.3; Croes et al., 1989).



Figuur 2.1. Effect van 1-naftaleenazijnzuur (NAA) op de enkelzijdige (●) en verspreide (○) bloemknopvorming op tabaksexplantaten. (*), totaal aantal knoppen. De verticale staaf in deze figuur en de volgende figuren van dit hoofdstuk is het kleinste significante verschil bij $P=0,05$.



Figuur 2.2. Effect van benzyladenine (BAP) op de bloemknopvorming op tabaksexplantaten bij verschillende concentraties NAA.

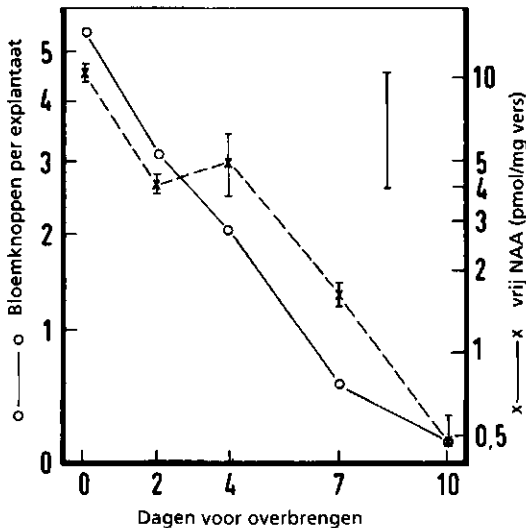


Figuur 2.3. Effect van indol-3-azijnzuur (IAA) op de lengtegroei (O) en vertakkingsgraad (X) van geïsoleerde wortels van het afrikaantje. Links, niet getransformeerd weefsel; rechts, weefsel getransformeerd met *Agrobacterium rhizogenes*, LBA 9365.

2.2.1 Gevoeligheid

In de bovengenoemde modelsystemen is de reactie van het weefsel op toediening van een hormoon telbaar of meetbaar. Dit maakt het mogelijk het verschil in gevoeligheid van twee weefsels voor een hormoon af te leiden uit kwantitatieve verschillen in bijvoorbeeld het aantal knoppen of zijwortels dat bij dezelfde hormoonconcentratie wordt gevormd. Voor de oorzaak van de verschillen in gevoeligheid zijn er diverse mogelijkheden. Ook al is de hormoonconcentratie in het medium gelijk, toch kan de inwendige concentratie in twee weefsels verschillen. Dit kan het gevolg zijn van ongelijke opnamesnelheid, afbraak, inactivering door conjugatie, of transport. Een andere mogelijkheid is, dat er verschillen zijn in het aantal hormoonreceptoren of in de signaaltransductieketen. Tenslotte kunnen genen, die het ontwikkelingsproces op gang brengen niet in dezelfde mate tot expressie te brengen zijn in de twee weefsels.

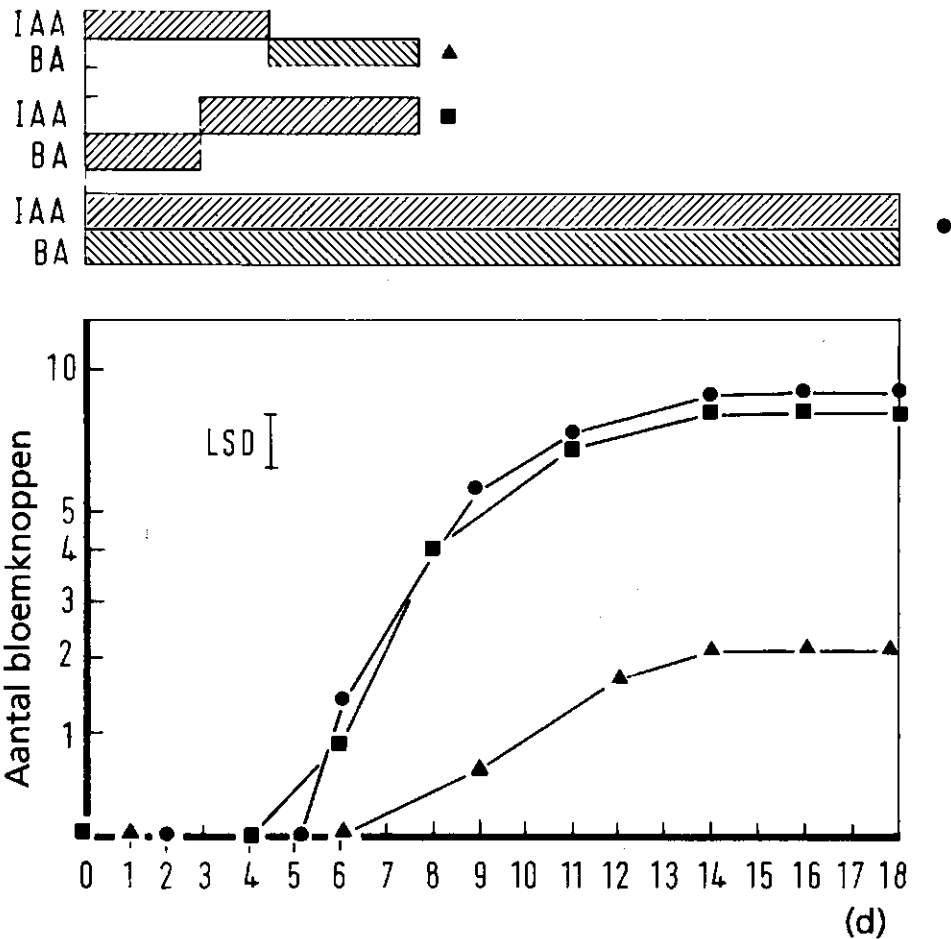
De bloemsteelexplantaten zijn direct na het uitsnijden het meest gevoelig voor auxine (Figuur 2.4). Als zij eerst enkele dagen gekweekt worden zonder auxine en dan pas aan het hormoon worden blootgesteld, worden er minder knoppen gevormd (Smulders et al., 1990a). De daling van het knopaantal gaat gepaard met een daling in de auxineconcentratie die de weefsels opbouwen (Figuur 2.4). Deze concentratievermindering blijkt de oorzaak te zijn van de vermindering van het aantal knoppen: verhoging van de auxineconcentratie in het medium doet het knopaantal stijgen.



Figuur 2.4. Bloemknopvorming (O) en accumulatie van NAA (X) in tabaksexplantaten. De explantaten werden gedurende verschillende perioden gekweekt op een medium zonder auxine, en dan overgebracht naar een medium met $[^3\text{H}]$ NAA. Zes uur later werd de interne concentratie van het NAA bepaald. Tien dagen later werden de knoppen geteld.

Ook de éénzijdige knopvorming, die optreedt bij lage auxineconcentratie (Figuur 2.1) zou gezien kunnen worden als een verschil in gevoeligheid van de weefsels aan beide uiteinden van het explantaat. Ook hier is een verschil in inwendige auxineconcentratie de oorzaak van het verschil in respons. In dit geval wordt het concentratieverschil veroorzaakt door longitudinaal transport door het explantaat (Smulders et al., 1988).

Transformatie met *Agrobacterium rhizogenes* veroorzaakt een verhoogde gevoeligheid voor auxine in de transgene weefsels. In wortels verschuiven de auxineconcentraties die lengtegroei en vertakking van wortels stimuleren en remmen, naar lagere waarden (Figuur 2.3; Croes et al., 1989). Het effect van transformatie op bloemknopregeneratie in tabaksexplantaten komt hierna nog aan de orde.



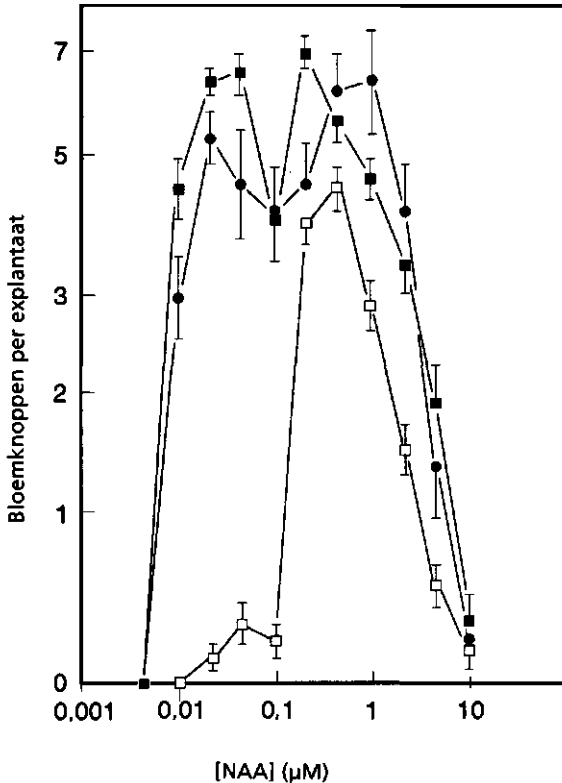
Figuur 2.5. Kinetiek van de bloemknopvorming op tabaksexplantaten, die eerst werden blootgesteld aan IAA en daarna aan BAP (▲), en omgekeerd (■). Weefsels die gedurende de gehele cultuurperiode op beide hormonen werden gekweekt, dienden als controle (●).

2.2.2 Interactie

Interactie tussen twee hormonen is het best te onderzoeken in matrix-experimenten, waarin beide hormoonconcentraties onafhankelijk van elkaar worden gevarieerd. De uitkomsten van een dergelijk experiment met bloemknopvormende tabaksexplantaten laten zien, dat auxine en cytokinine een beperkt effect op elkaars werking hebben. De beide hormonen bepalen samen het algemene niveau van de knopregeneratie, maar de concentratie versus respons-curve van ieder van beide hormonen wordt door het andere niet wezenlijk verstoord (Figuur 2.2; Smulders & Van der Krieken, ongepubliceerde resultaten). Dit leidt tot de hypothese dat auxine en cytokinine niet dezelfde deelprocessen van de bloemknopvorming reguleren (Mohr & Schopfer, 1978). Mogelijk spelen deze deelprocessen zich ook niet op hetzelfde tijdstip af. In het geval van de tabaksexplantaten blijkt, dat niet alleen het aantal knoppen, maar ook de kinetiek van hun ontstaan dezelfde blijft, wanneer de weefsels pas na drie dagen aan een voldoende hoge concentratie auxine worden blootgesteld (Figuur 2.5; Peeters et al., 1991). Dit zou er op wijzen, dat alleen cytokinine betrokken is bij de eerste stappen van de bloemknopregeneratie. Dit moet voorzichtig gesteld worden, omdat het weglaten van een hormoon uit het medium kan leiden tot een verhoogde endogene synthese in het explantaat (Van der Krieken et al., 1991). Het endogeen gevormde hormoon zou de rol van het exogeen toegediende kunnen overnemen.

2.2.3 Samenhang tussen gevoeligheid en interactie

Het in Figuur 2.2 getoonde experiment laat zien dat interactie tussen auxine en cytokinine in tabaksexplantaten leidt tot een veranderde hormoongevoeligheid van het weefsel: cytokinine modificeert de respons op auxine en omgekeerd. Ook andere hormonen hebben een dergelijk effect. In hetzelfde systeem reduceert ethyleen, dat zelf geen inducerende rol speelt bij de bloemknopvorming, de gevoeligheid van het weefsel voor auxine in sterke mate (Smulders et al., 1990b). Ook dit resultaat komt uit een matrix-experiment, waarin de concentraties van ethyleen en auxine onafhankelijk van elkaar werden gevarieerd. De gevoeligheid voor auxine wordt daarentegen vergroot door transformatie van het weefsel met *Agrobacterium rhizogenes* (Figuur 2.6). Er blijkt een duidelijk verband te bestaan tussen de effecten van ethyleen en transformatie (Smulders et al., 1991). Getransformeerde explantaten reageren niet op ethyleen en ook niet op AgNO_3 , een remmer van de ethyleenwerking. Deze weefsels zijn dus ongevoelig voor ethyleen. In ongetransformeerde explantaten heeft AgNO_3 een zeer sterk effect: de weefsels reageren op toediening van de ethyleenremmer door hetzelfde aantal knoppen te maken als de transgene explantaten (Figuur 2.6). Hieruit volgt, dat het effect van transformatie volledig berust op het opheffen van de gevoeligheid van het weefsel voor ethyleen. Dit is een tot nu toe onbekende verandering, die het T-DNA van *Agrobacterium rhizogenes* in de plantecel teweeg brengt.



Figuur 2.6. Bloemknopvorming, in afhankelijkheid van de NAA-concentratie, op normale explantaten (□, ■) en op weefsels getransformeerd met *Agrobacterium rhizogenes*, pRi 1855 (●). De ongetransformeerde weefsels werden gekweekt op media met (■) en zonder (□) AgNO₃.

2.3. Conclusies

Het samenspel van weefseleigenschappen en hormonen is een essentieel facet van differentiatie en morfogenese in vitro. Om dit samenspel te begrijpen is een analyse van kwantificeerbare effecten noodzakelijk, die primair uitgaat van de werking van individuele hormonen, en die relaties legt tussen de endogene concentratie van het hormoon en de omvang van het proces, dat door het hormoon wordt gestuurd. De volgende stap in de analyse betreft de wijze waarop hormonen elkaars werking modificeren. Wat daarna te onderzoeken overblijft, is de black box, die van hormoon leidt naar effect, een box die als belangrijke elementen signaaltransductie en genexpressie bevat, maar daarmee zeker niet tot de rand is gevuld. De lange weg, die het hormoononderzoek heeft te gaan, zal zeker tot vele fascinerende ontdekkingen en weer nieuwe problemen en toepassingen leiden.

2.4. Literatuur

Croes, A.F., A.J.R. van den Berg, M. Bosveld, H. Breteler & G.J. Wullems, 1989

Thiophene accumulation in relation to morphology in roots of *Tagetes patula*. Effects of auxin and transformation by *Agrobacterium*. *Planta* 179, 43-50.

Croes, A.F. & G.J. Wullems, 1989.

Morphogenesis and secondary metabolism in *Tagetes* tissues transformed by oncogenes of *Agrobacterium*. *Journal of Cellular Biochemistry, Supplement* 13D, 256.

Klee, H. & M. Estelle, 1991.

Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 529-551.

Mohr, H. & P. Schopfer, 1987.

Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. 3d Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 608 pp.

Peeters, A.J.M., W. Gerards, G.W.M. Barendse & G.J. Wullems, 1991.

In vitro flower bud formation in tobacco: interction of hormones. *Plant Physiology* 97, 402-408.

Smulders, M.J.M., 1989.

Auxin regulation of flower bud formation in tobacco explants. Role of concentration and sensitivity. Doctoral Thesis, Nijmegen University, 112 pp.

Smulders, M.J.M., A.F. Croes & G.J. Wullems, 1988.

Polar transport of 1-naphthaleneacetic acid determines the distribution of flower buds on explants of tobacco. *Plant Physiology* 88, 752-756.

Smulders, M.J.M., E.J.W. Visser, W.M. van der Krieken, A.F. Croes & G.J. Wullems, 1990a.

Effects of the developmental state of the tissue on the competence for flower bud regeneration in pedicel explants of tobacco. *Plant Physiology* 92, 582-586

Smulders, M.J.M., A. Kemp, G.W.M. Barendse, A.F. Croes & G.J. Wullems, 1990b.

Role of ethylene in auxin-induced flower bud formation in tobacco explants. *Physiologia Plantarum* 78, 167-172.

Smulders, M.J.M., A.F. Croes, A. Kemp, K.M. Hese, F. Harren & G.J. Wullems, 1991.

Inhibition by ethylene of auxin-promotion of flower bud formation in tobacco explants is absent in plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiology* 96, 1131-1135.

Van der Krieken, W.M., 1990.

Cytokinin regulated flower bud formation in vitro in tobacco. Doctoral Thesis, Nijmegen University, 108 pp.

Van der Krieken, W.M., G. van Eldik, L. Nijtmans, A.F. Croes & G.J. Wullems, 1991.

Endogenous cytokinins in flower bud forming explants of tobacco. *Journal of Experimental Botany* 42, 77-80.

3 Wortelregeneratie aan weefselkweekmateriaal van de appel

W.M. van der Krieken, H. Breteler en M.H.M. Visser
DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

Samenvatting

Slechte wortelvorming is een hinderpaal bij het toepassen van vermeerdering via weefselkweek van diverse plantensoorten. Met name houtige gewassen zijn moeilijk in vitro te bewortelen. Ons onderzoek richt zich op het mechanisme dat de wortelregeneratie in appelscheutjes veroorzaakt of verhindert. Daartoe werd een eenvoudig toetsysteem, bestaande uit dunne stengelschijfjes, ontworpen en op respons op het bewortelingsinducerend hormoon auxine getest. Tevens werd de opname en het metabolisme van enkele auxinen bepaald om een indruk te krijgen van de relatie tussen het gehalte aan vrij (fysiologisch actief) inwendig auxine en het wortelregeneratieproces.

3.1 Inleiding

3.1.1 Achtergrond

De vermeerdering van planten via de weefselkweektechniek heeft de laatste decennia een enorme vlucht genomen (Pierik, 1991). De potentiële omvang van deze branche is vele malen groter dan de actuele omvang. Te verwachten is dat o.a. door robotisering en kweek in bioreactoren het verschil in kostprijs tussen weefselkweekplantjes en buiten de buis vermeerderde plantjes nog aanzienlijk zal dalen, waardoor nog meer soorten in de toekomst via weefselkweek vermeerderd zullen worden (Kozai, 1991). Naast kwantitatieve beperkingen zijn er ook kwalitatieve beperkingen in de weefselkweek. Voor veel soorten lukt het niet ze in weefselkweek te brengen. Bij deze zogenaamde recalcitrante soorten is men er niet in geslaagd om scheutmeristemen via zijscheuten tot vermeerdering te brengen of om de nieuwe scheuten te bewortelen.

Om recalcitrantie te overwinnen zijn twee onderzoeksstrategieën mogelijk: variatie in kweekfactoren (bijvoorbeeld licht en mediumsamenstelling) of een gedetailleerde studie van de oorzaak van de recalcitrantie. De eerste benadering is succesvol geweest voor vrijwel alle weefselkweeksystemen die thans in gebruik zijn, doch

heeft als nadeel dat de mechanismen van de recalcitrantie en het doorbreken daarvan onopgehelderd blijven. De fundamentele analyse van recalcitrantie heeft als nadeel dat een langdurig en complex onderzoek vereist is met onvoorspelbaar resultaat. Als voordeel geldt dat deze aanpak dichterbij de kern van de recalcitrantie komt en zodoende resultaten kan opleveren met een bredere toepasbaarheid. Uitgebreid empirisch onderzoek in Europees verband heeft in ieder geval het bewortelingsprobleem bij ons toetsgewas (de appel) nog niet opgelost (Rosati et al., 1988).

Vele houtige gewassen zijn moeilijk in vitro via scheutvorming te vermeerderen of de vermeerderde scheuten zijn recalcitrante bewortelaars. Eind 1989 werd op CABO-DLO gestart met een onderzoek naar de beworteling van weefselkweekscheuten van de appel. De appel is een meerjarige houtige combinatieplant (onderstam plus ent). Bij vele aantrekkelijke onderstamlijnen staat de gebrekkige beworteling de gewenste toepassing van weefselkweekvermeerdering in de weg.

Een weefselkweekstelsel begint doorgaans met het isoleren en kiemvrij maken van een meristeem, bijvoorbeeld een scheutapex. Dit meristeem wordt gekweekt in een gesloten buis met een agar waaraan talrijke voedingsstoffen zijn toegevoegd. Voor het kweken van zijscheuten gebruikt men een cytokinine. Scheutvermeerdering levert bij de appel in het algemeen geen problemen op. Beworteling vindt plaats aan een geïsoleerde weefselkweekscheut (na één of meer groeicycli op scheutvermeerderingsmedium verkregen) die geplaatst wordt op een agar waaraan o.a. een auxine, meestal indolboterzuur (IBA) is toegevoegd.

De aanpak van het onderzoek waarover wij hier berichten is:

- opzetten van een betrouwbaar en goed hanteerbaar weefselkweekstelsel om beworteling te induceren aan stengelweefsel;
- karakteriseren van het effect en het metabolisme van een auxine tijdens de fase waarin wortels geïnduceerd worden;
- gebruikmakend van de eerste twee stappen: een analyse maken van de expressie van genen die gerelateerd zijn aan het bewortelingsproces en/of de recalcitrantie om te bewortelen.

Het onderzoek naar aan beworteling gerelateerde genexpressie heeft tot doel volgorden van DNA of RNA te vinden die karakteristiek zijn voor bepaalde stadia van de beworteling, alsmede om de fysiologische betekenis van deze sequenties te achterhalen.

De analyse richt zich in de aanvang op een optimaal bewortelend toetsstelsel. Ter vergelijking beschikken onze onderzoekspartners (COWT Lisse, PBB Boskoop en de Europese COST 87 bewortelingsgroep) over niet of slecht bewortelende in vitro onderstamlijnen van de appel.

Praktisch nut van het moleculair-biologische deel van ons werk wordt verwacht door het vinden van "markers" die gecorreleerd zijn met het vermogen om te bewortelen, of door het verkrijgen van inzicht in de expressie van genen tijdens de aanleg van wortels in competent en recalcitrant weefselkweekmateriaal. Dit inzicht kan zowel van nut zijn bij het ontwerpen van doelgerichte bewortelingsprotocollen als bij de moleculaire plantenveredeling.

3.1.2 Omzetting van auxinen

Om de werking van auxinen beter te kunnen begrijpen zijn vele studies naar het auxinemetabolisme verricht. De meeste van de beschikbare data betreffen het auxine indolazijnzuur (IAA). Het metabolisme van IAA bestaat o.a. uit conjugatie-reacties met aminozuren of suikers (Cohen & Bandurski, 1982; Hangarter & Good, 1981; Bandurski et al., 1977). IAA kan met tenminste 20 verschillende natuurlijke aminozuren conjugeren. Ook zijn vele IAA-suiker-verbindingen beschreven (Feung et al., 1975; 1976). Belangrijk is dat de geconjugeerde vormen van IAA fysiologisch gezien niet actief zijn. Deze conjugaten kunnen door enzymen weer gesplitst worden. Op deze manier kunnen de conjugaten dienen als opslagvorm van IAA, waaruit het actieve IAA weer kan vrijkomen.

Het metabolisme van indolboterzuur heeft in de literatuur veel minder aandacht gekregen. In het algemeen verloopt de conjugatie van IAA en IBA volgens hetzelfde patroon (Andrae & Good, 1957; Pythoud & Buchala, 1989; Wiesman et al., 1989). Recent zijn twee interessante omzettingen van IBA en IAA beschreven. Ten eerste, de omzetting van IBA in IAA via β -oxidatie (Epstein & Lavee, 1984; Alvares et al., 1989a; 1989b). Ten tweede, de omgekeerde reactie: de vorming van IBA uit IAA in mais (Ludwig-Müller & Epstein, 1991). Betreffende de literatuurgegevens over omzetting van IBA naar IAA moet opgemerkt worden dat de auteurs naast de omzetting van IBA naar IAA geen vorming van auxineconjugaten vinden. De omzetting van IAA naar IBA is pas zeer recentelijk beschreven (juli 1991) zodat dit nog niet door andere onderzoekers en in andere soorten getoetst is. Wel bestaan er al lang al dan niet gefundeerde claims dat IBA een natuurlijk auxine is.

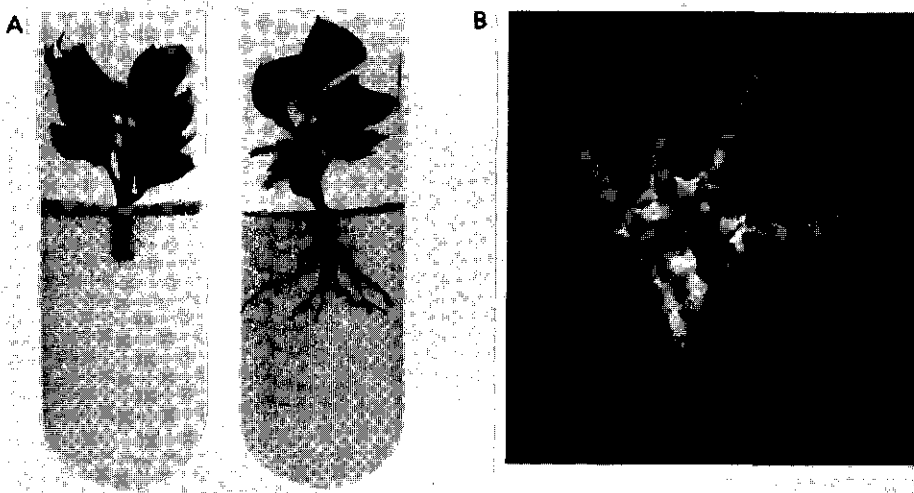
In ons onderzoek bestudeerden we de interconversie van IBA en IAA. De methoden die we hierbij gebruikten zijn 2-D-TLC en 1-D-TLC gevolgd door HPLC. Pas als we weten of IBA en IAA in elkaar omgezet worden, kunnen we de werkingwijze van een voor beworteling toegediend auxine correct beschrijven.

3.1.3 Werkingswijze van IBA

De werkingwijze van hormonen kan op verschillende niveaus beschreven worden. Men kan de respons van een bepaald weefsel kwalitatief relateren aan de hormoonconcentratie in een medium (zoals regeneratievermogen; het wel of niet optreden van groei, etc.). Beter is het om de respons kwantitatief te relateren aan de hormoonconcentratie in het medium (hoeveel organen regenereren per weefselstukje of hoeveel cm groeit het weefsel). Een nog betere beschrijving van de werkingwijze van het hormoon wordt verkregen als niet de mediumconcentratie, maar de concentratie van het fysiologisch actieve ongeconjugeerde hormoon in het weefsel gerelateerd wordt aan een kwantitatieve respons. Voor het door ons gestelde doel is inzicht in deze relatie voldoende. Uiteraard zijn er tussen de interne concentratie van vrij auxine in het weefsel en de uiteindelijke bewortelingsreactie nog vele stappen van betekenis (zie b.v. verslag IPGSA-conferentie 1991) doch deze zijn met de huidige inzichten en methodieken nog niet goed integraal te bepalen en te evalueren.

In principe kan een hormoon werken volgens twee mechanismen. Het kan zijn dat er pas een respons optreedt als er een bepaalde concentratie van het actieve hormoon in het weefsel bereikt is (concentratie-effect). Ook kan het zijn dat het regeneratieresultaat afhangt van het product van de actieve auxineconcentratie in het weefsel en de tijd die nodig is voor de inductie van het regeneratie-effect (dosis-effect).

In dit hoofdstuk wordt nader op de werkingwijze van IBA bij de wortelregeneratie ingegaan. Voor het algemene concept van de relatie tussen hormoonconcentratie en fysiologische respons verwijzen wij naar hoofdstuk 2 van deze bundel.



Figuur 3.1. Foto van een scheutje voor en na in vitro beworteling (A) en stengelschijfje (B) van de appel. De diameter van stengelbasis en schijfjes is 1 à 2 mm

3.2 Resultaten

3.2.1 Een toetssysteem voor beworteling

Bij de ontwikkeling van een toetssysteem dat geschikt is om de opname en het metabolisme van IBA tijdens de wortelvorming te bestuderen, geldt als belangrijk criterium dat relatief veel cellen in het weefsel direct (functioneel en/of structureel) bij de beworteling betrokken moeten zijn. Hierdoor is de relatie tussen de concentratie van het actieve hormoon in het weefsel en wortelvorming veel specifiek. Zo'n systeem is verkregen door gebruik te maken van dunne (< 1 mm; ± 10 cellagen) stengelschijfjes van in vitro gekweekte scheutjes (Figuur 3.1). Onder invloed van IBA en IAA worden per schijfje respectievelijk maximaal 8 en 4,5 wortels gevormd. Op scheutjes zijn deze getallen respectievelijk 13,5 en 9. Omdat wortelprimordia uit één cel ontstaan, geldt dat in deze schijfjes onder optimale condities 1 à 4 % van de cellen bij de wortelinductie betrokken is. Bij scheutjes is dit véél minder (ongeveer 0,05%). De optimale auxine-concentratie voor wortelinductie bij schijfjes is voor

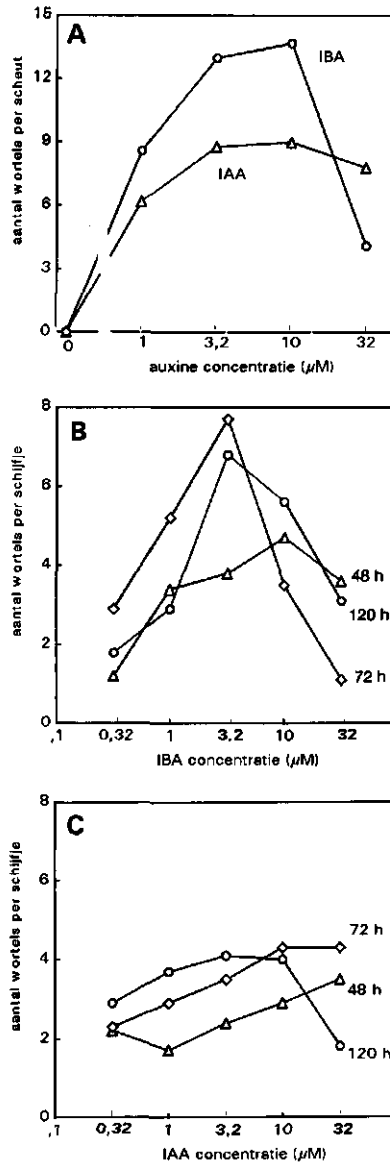
IBA circa 3,2 μM . Voor IAA is het effect sterk afhankelijk van de incubatietijd en minder van de hormoonconcentratie in het medium. Voor scheutjes blijkt het optimum 3,2 tot 10 μM te zijn (Figuur 3.2). De schijfjes hebben dus als voordeel dat er een groter deel van het weefsel bij beworteling betrokken is, en dat ze met een lagere uitwendige dosis (tijd x concentratie) een optimale respons (aantal wortels) vertonen. Daarnaast is het percentage bewortelende schijfjes zeer hoog (95-100%) en zijn de wortels enkele dagen eerder zichtbaar dan in scheutjes. Het maximale aantal wortels blijft in schijfjes echter achter bij dat in scheutjes.

Figuur 3.2. Effect van de IBA- of IAA-concentratie in het medium en de incubatietijd op de beworteling van appel *in vitro*.

A) Groepen van 30 scheuten werden in triplo, op media met verschillende IBA en IAA concentraties gedurende 120 uur geïncubeerd in het donker. Hierna werden ze overgebracht op medium zonder hormonen in het licht. Na 14 d werden de wortels geteld. De SE was < 10% van de waarden in de figuur.

B) Effect van de IBA-concentratie in het medium en de incubatietijd op de beworteling van stengelschijfjes *in vitro*. Groepen van 30 schijfjes werden in triplo, in het donker, op media met verschillende IBA-concentraties gedurende 48, 72 en 120 uur geïncubeerd. Hierna werden ze overgebracht naar het licht op medium zonder hormonen. Na 14 d werden de wortels geteld. De SE was < 10% van de gemiddelde waarden in de figuur.

C) Als B) maar met IAA in het medium.



3.2.2 Omzetting van IBA en IAA

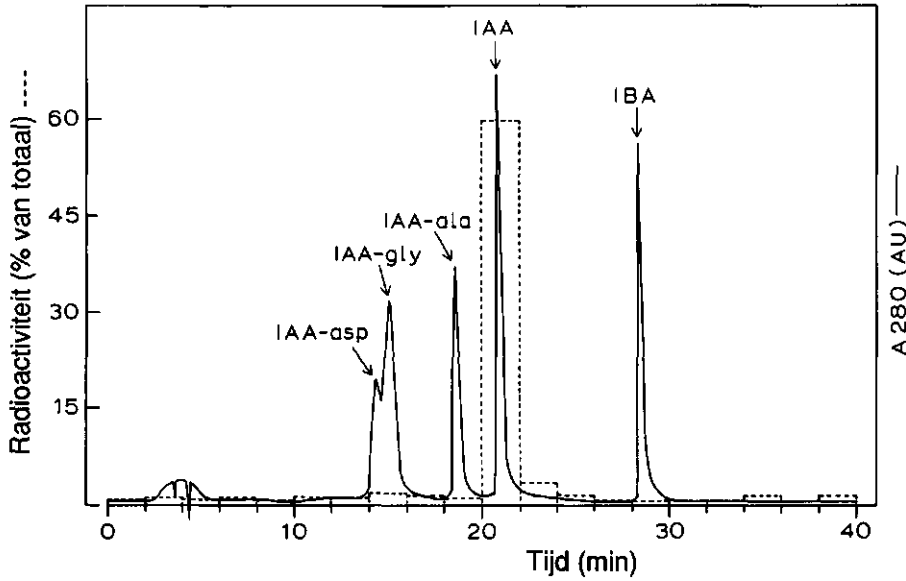
Groepen van 30 schijfjes werden gedurende 48 uur geïncubeerd op medium met 1 μM radioactief gemerkt IBA. Na extractie uit het weefsel van IBA en zijn metabolieten werd onderzocht of IBA omgezet werd in IAA door op 2-D-TLC (Figuur 3.3) te bekijken hoeveel van het extract co-chromatografeert met IAA. Dit bleek slechts 0,6 % te zijn. Omzetting van IBA in IAA bleek dus voor te komen, zij het in geringe mate. Verder bewijs voor de omzetting van IBA naar IAA werd gevonden na een voorzuivering op "normal phase" TLC gevolgd door een scheiding op "reversed phase" HPLC (Figuur 3.3). Ook nu bleek dat ongeveer 0,6 tot 1 % van de opgenomen radioactiviteit co-chromatografeerde met IAA. Soortgelijke proeven met radioactief IAA toonden aan dat uit gemerkt IAA geen gemerkt IBA gevormd werd.

3.2.3 Effect van IAA (afkomstig van IBA) op de wortelvorming

Nagegaan werd of de hoeveelheid IAA die afkomstig is uit IBA fysiologisch gezien van belang kan zijn. De concentratie van IAA in het weefsel werd bepaald na incubatie op IBA en IAA (Figuur 3.4). Het blijkt dat IAA na opname uit het medium snel geconjugeerd wordt. Slechts een kleine fractie (ca 1 %) blijft in de actieve vorm van vrij auxinezuur (IAAH). De concentratie van IAA afkomstig uit IBA blijkt ongeveer gelijk te zijn aan de IAA-concentratie na IAA-opname bij een zelfde uitwendige concentratie van beide auxinen. Het feit dat IBA op schijfjes méér wortels induceert dan IAA (Figuur 3.2B,C) impliceert dat de werking van IBA niet uitsluitend berust op de conversie naar IAA.

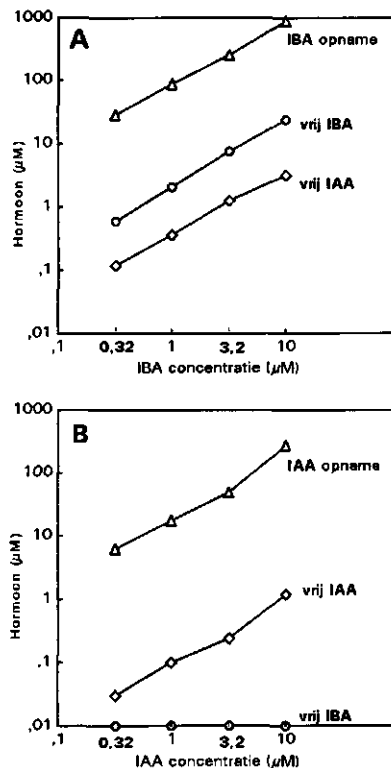
3.2.4 Relatie tussen auxine-concentratie en wortelvorming

Uit de vorige experimenten blijkt dat IBA omgezet wordt in IAA hetgeen leidt tot een concentratie die fysiologisch gezien van belang kan zijn. Om te bepalen of de werkwijze van IBA een dosis- of een concentratie-effect is, werd de inwendige concentratie van zowel IBA als IAA bepaald na IBA-toediening in het medium. Hierbij werden verschillende incubatietijden en verschillende mediumconcentraties gebruikt (Figuur 3.5). Optimale wortelvorming (tenminste 50 % van de maximale respons) treedt op tussen 1 en 10 μM IBA in het medium en na een incubatietijd van 48 tot 120 uur (Figuur 3.2B). De inwendige IBA concentratie is dan respectievelijk 0,3 of 10 μM (Figuur 3.5B) en de IAA concentratie 0,2 of 3 μM (Figuur 3.5C). Uit deze resultaten blijkt dat er een groot dosistraject is waarbinnen optimale wortelvorming optreedt. De dosis nodig voor optimale wortelvorming kan via verschillende combinaties van incubatietijd en mediumconcentratie bereikt worden en tijd of concentratie zijn dus niet erg specifiek gerelateerd aan wortelvorming.

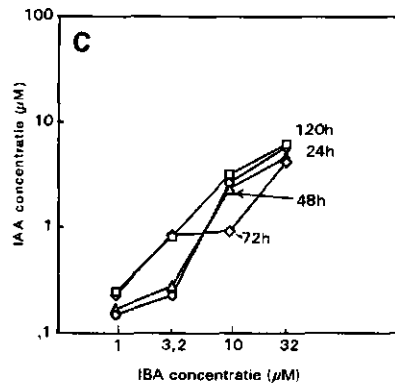
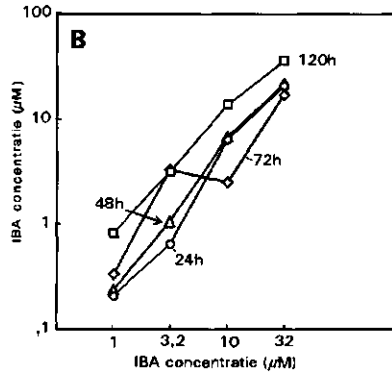
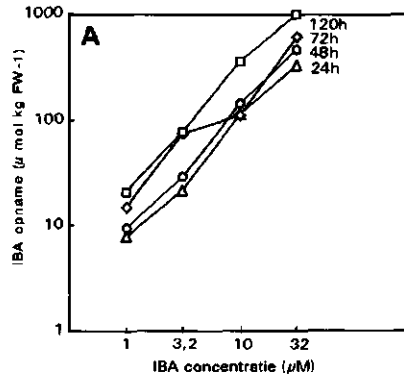


Figuur 3.3. Twee-dimensionale TLC-scheiding (eerste: MeOH:CHCl₃=95:5, v/v; tweede: ethylacetaat:butaan-2-ol:HAc:H₂O=5:3:1:1, v/v/v/v) van een kunstmatig mengsel van IBA en zijn metabolieten (- - -) en deze TLC-scheiding gevolgd door HPLC-scheiding (—) met een RP 18 kolom van 250 mm bij Ø 3 mm, deeltjesgrootte 5 µm, met een lineaire gradiënt van 25% naar 75% MeOH gemengd met 1% (v/v) HAc bij een loopsnelheid van 0,65 ml min⁻¹.

Figuur 3.4. De concentratie van IBA en IAA in stengelschijfjes van appel na incubatie op medium met verschillende concentraties IBA en IAA. A) Groepjes van 30 schijfjes werden gedurende 48 uur op medium met verschillende concentraties radioactief gemerkt IBA geïncubeerd. Na opname werd de hoeveelheid vrij IBA en IAA in het weefsel na zuivering met behulp van TLC en HPLC bepaald (zie Figuur 3.3). Het experiment werd in triplo uitgevoerd en de SE was < 15 % van de gemiddelde waarden. B) Als A) echter met IAA in het medium.



Figuur 3.5. Opname van IBA (A) en de daaruit volgende interne concentratie van IBA (B) en IAA (C). Groepen van 30 schijfjes werden in triplo gedurende verschillende tijden op media met verschillende IBA concentraties geïncubeerd. De SE was < 15 % van de gemiddelde waarden. Mediumconcentraties staan op de x-as.



3.3 Discussie

Het gebruik van dunne stengelschijfjes bleek een goed toetsstelsel voor de bestudering van auxine-gereguleerde wortelregeneratie. Na incubatie van scheuten of stengelschijfjes van appel op kweekmedium met IBA treedt wortelvorming op, die ten dele verklaard kan worden door de omzetting van IBA in IAA in het weefsel. Het werkingsmechanisme van IBA en IAA in het weefsel kan over een breed concentratietraject het beste beschreven worden als een dosis-effect.

Het toetsstelsel van de dunne stengelschijfjes maakt het mogelijk om het proces van wortelvorming te bestuderen, geïsoleerd van de resterende scheut. Dit stelsel heeft de volgende voordelen t.o.v. het werken met scheutjes.

- 1) In schijfjes zijn relatief veel cellen rhizogeen. Hierdoor is het metabolisme véél specifiek dan in scheuten, waar het auxine voornamelijk in cellen die structureel niets met wortelvorming te maken hebben wordt opgenomen en gemetaboliseerd.
- 2) Er treedt geen interferentie op bij de beworteling door stoffen die afkomstig zijn uit de scheut. Deze stoffen zijn bijvoorbeeld suikers en mineralen maar vooral hormonen die in de scheuttop gesynthetiseerd worden, zoals bijvoorbeeld de auxinen. Deze in de plant gevormde auxinen kunnen interfereren met de opname en het metabolisme van het auxine dat uit het medium opgenomen wordt.
- 3) Er worden véél wortels gevormd. Hoewel schijfjes zeer veel kleiner zijn dan scheutjes (<1 mg versgewicht), worden er gemiddeld toch nog 8 wortels gevormd t.o.v. 13 bij een complete scheut. De oorzaak van dit verschil is waarschijnlijk de aanwezigheid van stoffen die onder punt 2 besproken zijn. Het verschil in aantal wortels op scheuten en schijfjes is niet te wijten aan de opname of het metabolisme van het auxine uit het kweekmedium, daar deze vrijwel identiek zijn in beide weefsels.
- 4) Het uitgangsmateriaal bewortelt synchroon. De schijfjes afkomstig van een enkele scheut (ongeveer 30 stuks) kunnen willekeurig over vele petrischalen verdeeld worden met b.v. verschillende auxine-concentratie in het medium en bij verschillende incubatietijden. Hierdoor zijn de resultaten van opname- en metabolismeproeven goed vergelijkbaar en is de spreiding gering. Bovendien kunnen ongeveer 2000 schijfjes per persoon per dag gesneden worden zodat grootschalige experimenten opgezet kunnen worden.

Na opname van IBA in het weefsel wordt dit geïnactiveerd door conjugatie met aminozuren en suikers. Om inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van IBA-geïnduceerde beworteling hebben wij de concentratie van het actieve hormoon in het weefsel gerelateerd aan het aantal gevormde wortels. Verder is er in het algemeen na IBA-toediening aan weefsels onduidelijkheid of IBA zelf fysiologisch actief is of dat IBA werkt via conversie naar IAA. Wij vonden dat 4% van het opgenomen IBA in de vrije vorm voorkwam, 95% vormde conjugaten en circa 1% werd omgezet in IAA. Een belangrijk punt van kritiek op publicaties, waarin melding werd gemaakt van de conversie van IBA in IAA is dat er geen conjugaten gevonden werden van IBA en van het gevormde IAA (Epstein & Lavee, 1984; Alvarez et al., 1989b). De vraag of IBA werkt via conversie naar IAA hebben we als

volgt onderzocht. De opname en het metabolisme van IBA en IAA zijn bestudeerd gebruikmakend van verschillende concentraties in het medium en bij verschillende incubatietijden (Figuur 3.5). Na IBA-opname bleef 4% in de vrije IBA-vorm (IBAH), en werd 1% omgezet tot IAA. Na IAA-opname werd 0% aangetroffen in de IBA-vorm en bleef 1% in de vrije IAA-vorm. Omdat IBA beter opgenomen wordt dan IAA betekent dit dat de IAA-concentratie in het weefsel na IBA-toediening hoger is dan na IAA-toediening (Figuur 3.4A,B). Als de incubaties op medium met IBA evenveel wortels opleveren als met IAA zou geconcludeerd kunnen worden dat IBA werkzaam is via conversie naar IAA. Dit is echter niet het geval: IBA induceert maximaal 8 wortels per schijf en IAA maximaal slechts 4,5 (Figuur 3.2B,C). Blijkbaar heeft IBA dus een synergistisch effect op de beworteling. Het mechanisme voor dit synergisme kan zijn dat IBA zelf óók actief is en bijvoorbeeld tot een ander type beworteling leidt dan IAA. Ook kan het zijn dat er sprake is van compartimentalisatie waardoor IBA op een andere plaats in het weefsel of de rhizogene cel werkzaam is dan IAA. Dit moet echter nog uitgezocht worden. Een ander punt is dat wij de omzetting van IAA in IBA zoals die recentelijk beschreven is bij maïs (Ludwig-Müller & Epstein, 1991) niet in ons weefsel hebben kunnen aantonen (Figuur 3.4B).

Het omzettingspatroon van IBA (zoals eerder genoemd) is ongeveer gelijk bij inductieve en niet-inductieve IBA-concentraties voor beworteling. Hieruit kan afgeleid worden dat het type IBA-metabolisme niet specifiek is voor beworteling.

Het werkingsmechanisme van IBA kan binnen ruime grenzen beschreven worden als een dosis-effect. Binnen een bepaald traject van IBA-concentraties in het medium en bij bepaalde incubatietijden bepaalt het produkt van concentratie en tijd of er een behoorlijke beworteling (meer dan 4 per schijf) optreedt (Figuur 3.2B).

Momenteel bestuderen wij de beworteling van houtige gewassen op moleculair genetisch niveau. Hierbij worden de volgende lijnen gevolgd.

- 1) Isoleren van genen die bij de wortelaanleg betrokken zijn. Deze genen kunnen een markerfunctie hebben voor bewortelbaarheid of kunnen na overbrenging in niet bewortelbare appelcultivars de beworteling vergemakkelijken. Twee cDNA-banken zijn gemaakt en zijn/worden differentieel gescreend.
- 2) Transformatie van weefsel met *rol*-gen (*rol* is root inducing loci) van *Agrobacterium rhizogenes*. Deze transformaties leiden tot overvloedige wortelvorming (hairy root disease). Nagegaan wordt wat de rol van (endogene) auxinen is bij de beworteling van getransformeerde schijfjes: is de gevoeligheid voor auxine veranderd? Is de auxine-opname of het auxinemetabolisme veranderd? Dit wordt momenteel onderzocht in samenwerking met labs in Zweden en Ierland.

3.4 Conclusies

- Het toetsysteem, bestaande uit dunne stengelschijfjes, is zeer geschikt voor de bestudering van beworteling, omdat relatief snel en synchroon véél wortels op erg weinig weefsel gevormd worden.
- IBA wordt na opname ten dele omgezet in IAA, maar het omgekeerde, de conversie van IAA naar IBA kon niet vastgesteld worden.

- Het werkingsmechanisme van IBA loopt niet uitsluitend via conversie naar IAA. IBA opname resulteert in een endogene pool van vrij IBAH en vrij IAAH. IBA heeft een synergistisch effect op beworteling veroorzaakt door IAA, het mechanisme van dit synergisme is nog niet bekend.
- De hormoonwerking verloopt in grote lijnen via een dosiseffect.
- Het verloop van het IBA-metabolisme is niet specifiek voor beworteling.

3.5 Literatuur

Alvares R, Nissen SJ & E.G. Sutter (1989a)

Relationship between indole-3- acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. *Plant Physiology* 89: 439-443

Alvares R, Nissen SJ & E.G. Sutter (1989b)

Relationship of indole-3- butyric acid and adventitious rooting in M.26 apple (*Malus pumila* Mill.) shoots cultured in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation* 8: 263-272

Andreae WA & N.E. Good (1957)

Studies on 3-indoleacetic acid metabolism.IV. Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. *Plant Physiology* 32: 566-572

Bandurski RS, Schulze A & P.J. Hall (1977)

Photo-regulation of the ratio of ester to free indole-3-acetic acid. *Biochemical Biophysical Research Communications* 79: 1219-1223

Cohen JD & R.S. Bandurski (1982)

Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 403-430

Epstein E & S. Lavee (1984)

Conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid by cuttings of grape vine (*Vitis vinifera*) and olive (*Olea europea*). *Plant and Cell Physiology* 25: 679-703.

Feung C, Hamilton RH & R.O. Mumma (1975)

Indole-3-acetic acid. Mass spectra and chromatographic properties of amino acid conjugates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 23: 1120-1124

Feung C., Hamilton R.H. & R.O. Mumma (1976)

Metabolism of indole-3-acetic acid. III. Identification of metabolites isolated from crown gall callus tissue. *Plant Physiology* 58: 666-669

Hangarter R.P. & N.E. Good (1981)

Evidence that IAA conjugates are slow release sources of free IAA in plant tissues. *Plant Physiology* 68: 1424-1427

Kozai, T.(1991)

Some robotic micropropagation systems recently developed in Japan. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27 (1991): 61A

Rosati, P., Thomsen, A. & M. Welander (1988)

Results in the micropropagation of M26 apple rootstock. An interlaboratory study under the auspices of COST 87-E.E.C.-Program. *Acta Horticulturae* 227: 296-301

Ludwig-Müller, J. & E. Epstein (1991)

Indole-3-acetic acid is converted to indole-3-butyric acid by seedlings of *Zea mays* L. Abstracts 14th International Conference on Plant Growth Substances, Amsterdam, p. 5

Pierik, R.L.M. (1991)

Micropropagation of ornamental plants. *Acta Horticulturae* 289: 45-53

Pythoud F. & A.J. Buchala (1989)

The fate of vitamin D₃ and indolebutyric acid applied to cuttings of *Populus tremula* L. during adventitious root formation. *Plant Cell and Environment* 12: 489-494

Rosati, P., Thomsen, A. & M. Welander, 1988

Results in the micropropagation of M26 apple rootstock. An interlaboratory study under the auspices of COST 87 - E.E.C. program. *Acta Horticulturae* 227: 296-301

Van der Krieken, W.M., H. Breteler & M.H.M. Visser (1992)

The role of the conversion of indolebutyric acid into indoleacetic acid in root formation on apple in vitro (aangeboden voor publikatie)

Wiesman Z., Riov J. & E. Epstein (1989)

Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiology* 91: 1080-1084

4 Metabolisme en activiteit van cytokininen in de boliris

C.R.Vonk

DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

Samenvatting

Onder lichtarme omstandigheden worden recent gevormde fotosyntheseprodukten van irisplanten getransporteerd naar de jonge bol, en kan de bloemknop verdrogen. Deze bloemverdroging treedt het meest op in het ontwikkelingsstadium van de plant waarin de stengel het snelst strekt. Het natuurlijk voorkomende cytokinine zeatine kan, aan knoppen toegediend, onder lichtarme omstandigheden de bloemverdroging tegengaan. In dit hoofdstuk wordt onderzoek over metabolisme en activiteit van cytokininen in de boliris besproken tegen de achtergrond van de verdeling van fotosyntheseprodukten met nadruk op de aanwezigheid en het gedrag van cytokininefosfaten. Deze fosfaten spelen waarschijnlijk een grote rol bij het cytokininetransport, de assimilatenverdeling en de ontwikkeling van stengel en bloem, in de fase waarin de stengel snel strekt.

4.1 Inleiding

De irisbol is, onder andere, opgebouwd uit een basale schijf, de bolplaat, waarop bolrokken zijn ingeplant, die een centraal vegetatiepunt omgeven. Op deze bolplaat worden in de loop van de ontwikkeling van de plant ook de nieuwe bollen gevormd. In de irisbol is, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de hyacint en de tulp, op het tijdstip van oogst het groeipunt nog zeer weinig gedifferentieerd.

De ontwikkeling van de bloem is een fysiologisch belangrijk proces, dat behoort tot het terrein van de morfogenese. De processen die bij de voortgang van de differentiatie verlopen, staan onder invloed van factoren in de bol en uitwendige factoren zoals bijvoorbeeld temperatuur en vochtvoorziening (Beyer & Slootweg, 1963).

Voor de bloembollenteler is het van belang gedurende een zo groot mogelijke periode van het jaar bloeiende irissen te kunnen leveren. Voor dit doel worden irisbollen aan een temperatuurbehandeling blootgesteld vóór het opplanten. Een nadeel van een versnelde of vertraagde bloei is, dat deze vaak gepaard gaat met een hoog

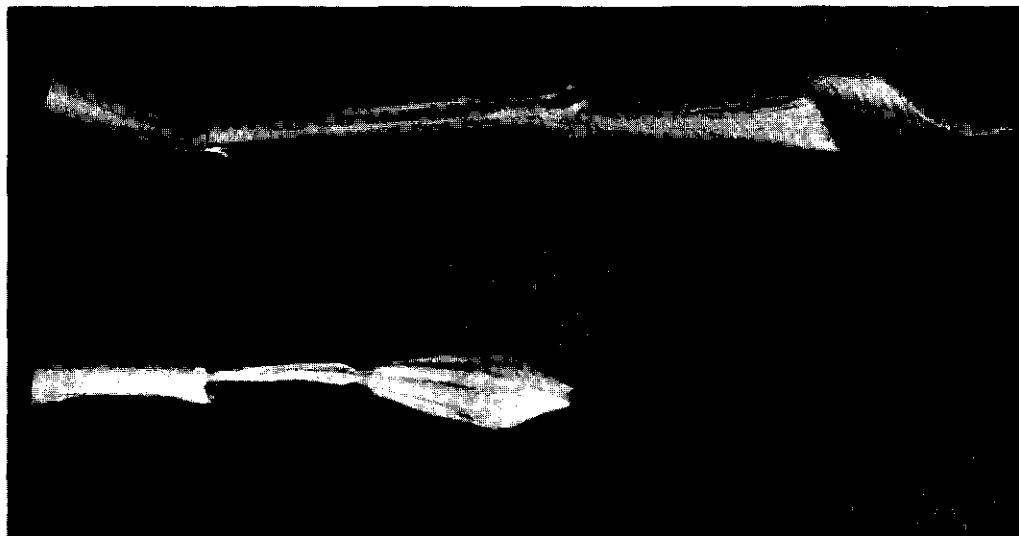
percentage verdroogde bloemen. Deze verdroging van de bloemknop kan veroorzaakt worden door:

- de temperatuurbehandeling vóór het opplanten;
- een te kleine bolmaat;
- een te hoge temperatuur ná het planten;
- onvoldoende belichting;
- een tekort aan suiker in bloem en stengel.

Aanwijzingen verkregen op het gebied van de laatste twee oorzaken vormden de aanleiding tot onderzoek op CABO-DLO naar een beter inzicht in de achtergronden van het verschijnsel bloemknopverdroging ("budblast").

4.2 Verdeling van recente fotosyntheseprodukten en bloemverdroging

Door onderzoek van Hartsema en Luyten (1962) over de lichtbehoefte van de iris gedurende de ontwikkeling van de plant werd bekend dat het bloeipercentage van de irisplant proportioneel is met de lichthoeveelheid. Daaruit kon de conclusie getrokken worden dat een tekort aan assimilaten oorzaak van bloemverdroging zou kunnen zijn. Met andere woorden, een extra aanbod van recente fotosyntaten zal nodig zijn, indien de reserves van de bol zijn uitgeput of niet of onvoldoende beschikbaar komen (Kamerbeek & Beijer, 1964). Extra belichting bleek het meest effectief te zijn één of twee weken voor de bloei. In die periode blijkt de stengel het snelst te strekken en in die periode is de iris ook het meest gevoelig voor bloemverdroging (Figuur 4.1). Deze periode wordt dan ook als de kritische periode voor bloemverdroging aangeduid (Fortanier & van Zevenbergen, 1973).



Figuur 4.1. Bloemknopverdroging bij de boliris. Na verwijdering van de schutbladeren zijn de normaal ontwikkelde bloemknop en bloemsteel zichtbaar (onder). Bij de verdroogde bloemknop is de bloemsteel niet gestrekt (boven).

Resultaten van onderzoek, waarbij gebruik werd gemaakt van radioactief CO_2 , waren in overeenstemming met bovenstaande gegevens. Gevonden werd dat onder standaard lichtcondities recent gevormde fotosyntheseprodukten in de kritische periode voor bloemverdroging vooral worden getransporteerd naar de bovenste delen van de stengel en de knop. Door het inlassen van een donkerperiode tijdens de kritische periode bleek het transport in de richting van de knop duidelijk te stagneren. Transport naar de bolplaat, met daarop de jonge bol, werd echter in het donker duidelijk gestimuleerd (Mae & Vonk, 1974).

Het bloeipercentage van de iris blijkt in de kritische periode meer van de lichtintensiteit, in de periode voordat bloemverdroging kan optreden, afhankelijk te zijn dan van de CO_2 -concentratie (Tabel 4.1).

De invloed van licht met betrekking tot het verschijnen bloemverdroging moet dus niet uitsluitend worden gezocht in een extra aanbod van fotosyntheseprodukten, maar vooral in de verdeling van die produkten over de plant.

4.3 De werking van cytokininen en de verdeling van assimilaten

Wanneer tijdens de kritische periode voor bloemverdroging een donkerperiode van vijf dagen wordt gegeven, treedt bloemknopverdroging op. Daarbij is een opvallend verschijnsel dat de bloemsteel niet uitgroeit maar verschrompelt. Door injectie van waterige oplossingen van groeiregulatoren in knoppen werd getracht invloed uit te oefenen op de uitgroei van de bloemsteel van zulke donkerbehandelde planten. Toediening van cytokininen kon de groeistagnatie van de bloemsteel opheffen (Tabel 4.2). Door cytokinine-injectie in de knop werd ook het bloeipercentage van donkerbehandelde planten verhoogd (Tabel 4.3). Andere plantegroeieregulatoren hadden, wanneer ze werden geïnjecteerd in de knop, geen effect op het bloeipercentage.

Het transport van ^{14}C -gemerkte fotosyntheseprodukten uit bladeren in de richting van de knop werd sterk negatief beïnvloed door het inlassen van een donkerperiode van zeven dagen. Zeatine-injectie in knoppen van op dezelfde wijze behandelde planten verhoogde het bloeipercentage en het transport van ^{14}C naar de knop (Tabel 4.4). Het positieve effect op de uitgroei van de bloemsteel en het bloeipercentage kon worden bereikt met de cytokininen benzyladenine en met het natuurlijk voorkomende cytokinine zeatine. Het effect bleek bovendien afhankelijk van de concentratie te zijn (Mae & Vonk, 1974).

Tabel 4.1. De invloed van de CO₂-concentratie en de lichtintensiteit op drooggewicht (g) en bloeipercentage (volledige bloemopening) van iris. De behandeling werd gestart 19 dagen voor de bloei. De planten werden geogst, toen de controleplanten bloeiden (Mae & Vonk, 1974).

Licht intensiteit (W m ⁻²)	56	2,6	48
CO ₂ -concentratie (% v/v)	0,03	0,03	0,003
Bloeipercentage (%)	100	58	100
Bloem	0,30	0,12	0,32
Stengel	0,84	0,68	0,62
Bladeren	1,32	1,25	1,36
Jonge bol	0,32	0,30	0,21
Oude bol	0,93	0,76	0,64
Wortels	0,38	0,37	0,35
Totaal	4,09	3,48	3,50

Tabel 4.2. De invloed van zeatine-injectie op de gemiddelde bloemsteellengte (cm) van irisplanten die een donkerbehandeling van verschillende duur ontvingen. Zeatine-injecties, Z3 en Z5, vonden plaats op respectievelijk dag 3 en dag 5 van de donkerbehandeling. De behandeling werd 13 dagen voor de bloei gestart. De gemiddelde bloemsteellengte werd bij de oogst bepaald (Vonc & Ribôt, 1982).

	Donkerperiode (d)				
	0	4	6	8	10
Licht (controle)	5,8	5,6	5,9	5,5	5,5
Donker	---	5,1	3,7	3,0	3,5
Donker Z3	---	5,4	5,1	5,8	4,1
Donker Z5	---	---	5,4	5,2	4,5

Tabel 4.3. Bloeipercentage van irisplanten behandeld als beschreven in Tabel 4.2. Na behandeling werden de planten overgebracht naar standaard lichtcondities en geogst toen het maximale bloeipercentage was bereikt (Vonc & Ribôt, 1982).

	Donkerperiode (d)				
	0	4	6	8	10
Licht (controle)	90	95	95	90	95
Donker	--	85	50	40	35
Donker Z3	--	90	90	90	40
Donker Z5	--	--	95	80	70

Tabel 4.4. Effect van zeatine-injectie op de verdeling van radioactiviteit in stengel en knop van iris, 24 uur na een gift van CO₂ aan het tweede basale blad.

Donkerbehandelde planten (7 dagen) ontvingen 5 uur standaard lichtcondities voor de ¹⁴C- CO₂-gift. Injecties in de knop werden gegeven op de vierde dag van de donkerbehandeling. Het bloeipercentage werd bepaald aan parallele groepen planten (Vonk & Ribôt, 1982).

	Controle licht	Donker	Donker
Bloeipercentage	100	10	50
	radioactiviteit (GBq orgaan ⁻¹)		
Bloemknop	0,44	0,00	0,49
Stengel	0,18	0,14	0,35

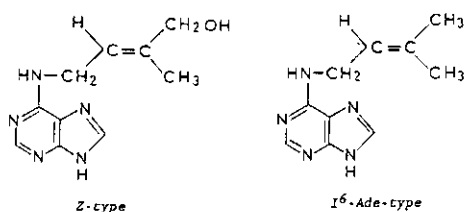
Uit genoemde gegevens valt te concluderen dat cytokinine geïnjecteerd in knoppen van irisplanten, die te weinig licht ontvangen tijdens de kritische periode voor bloemverdroging, lichtvervangend kan werken. Daarbij kan als hypothese gedacht worden aan een endogeen cytokinineniveau, dat door verlaging van de lichtintensiteit onder een noodzakelijke grenswaarde zakt. Anderzijds kan de werking van endogene cytokininen worden belemmerd door de negatieve werking van een plantegroeieregulator als abscissinezuur (Vonk & Ribôt, 1982). Een sterke toename van abscissinezuur kon door deze auteurs worden aangetoond in knoppen van donkerbehandelde irisplanten. Deze toename van abscissinezuur wordt inderdaad onderdrukt door zeatine-injectie.

4.4 Endogene cytokininen in irisknoppen

Het is algemeen aanvaard dat de worteltoppen van de plant de voornaamste syntheseplaats van cytokininen zijn en dat de cytokininen, nadat ze zijn getransporteerd, een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van de spruit (Letham, 1978; Incoll & Jewer, 1987).

Cytokininen worden niet alleen door houtvaten maar ook door zeefvaten getransporteerd. In houtvaten worden zeatine en zeatineriboside als voornaamste cytokininen aangetroffen (Jones, 1973; Ahokas, 1985; Tromp & Ovaa, 1990). Ook in zeefvaten van *Xanthium* (Philips & Cleland, 1972) en *Salix babylonica* (Van Staden, 1976) komt zeatine voor als respectievelijk riboside en glucoside. In de monocotyle plant *Yucca flaccida* werd echter zeatineriboside-5-fosfaat aangetoond in het zeefvatensap. Als ¹⁴C-zeatine door de houtvaten wordt opgenomen wordt ¹⁴C-zeatineriboside-5-fosfaat in de zeefvaten teruggevonden (Vonk, 1974; 1978).

Met behulp van immunologische toetsen, waarbij gebruik gemaakt wordt van antilichamen, die gemaakt zijn tegen cytokininen (Vonk et al., 1986), kon worden aangetoond dat in iris twee typen cytokininen voorkomen. Het zeatine-type (Z-type) en het isopentenyladenine-type (¹⁶Ade-type; Figuur 4.2).



Figuur 4.2. Structuurformules van zeatine-type (z-type) en isopentenyladenine-type ($I^6\text{Ade-type}$) cytokininen.

Het cytokinine isopentenyladenine ($I^6\text{Ade-type}$) heeft echter bij inspuiting in de kritieke periode voor bloemverdroging geen positief effect op bloemsteelontwikkeling of bloeipercentage van donkerbehandelde planten. Het is daarom opvallend dat bij extractie van irisknoppen, opgekweekt onder standaard lichtcondities, tienmaal meer van dit cytokinine-type voorkomt dan van het Z-type. Beide cytokininen komen ongeveer veertien dagen voor de bloei van de plant in de hoogste concentraties voor. Invoering van een donkerperiode resulteert voor beide cytokinine-typen in een dramatische daling (Tabel 4.5). De gegevens ondersteunen de hypothese dat het positieve effect van cytokinine-injectie in knoppen van planten, die in de gevoelige periode voor bloemverdroging te weinig licht ontvangen, veroorzaakt wordt door verlaging van de abscissinezuurconcentratie (Vonk et al., 1986). De waarneming dat $I^6\text{Ade-type}$ cytokininen kunnen worden omgezet via hydroxylatie, in Z-type cytokininen (Chen, 1982; Chen & Leisner, 1984), kon voor iris niet worden bevestigd.

Tabel 4.5 Versgewicht en endogene cytokininen in de knop plus bloemsteel van iris. Planten werden opgekweekt onder standaard lichtcondities tot aan de kritische periode. Licht- en donkerbehandelde (5 dagen) planten werden geoogst 10 dagen voor de bloei van de controleplanten (Vonk et al., 1986).

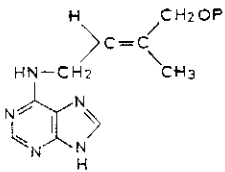
Behandeling	Versgewicht (g)	$I^6\text{Ade-type}$ cytoki- ninen ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	Z-type cytokininen ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Licht	8,4	90	22
Donker	4,3	59	8

4.5 Endogeen zeatine, gebonden of vrij?

Het is bekend dat tijdens extractie van plantaardig materiaal door werking van hydrolytische enzymen fosfaat- of suikergebonden vormen van cytokininen kunnen worden afgebroken (Horgan, 1978).

De gevonden vrije cytokininen zeatine en zeatineriboside, zouden ook op deze wijze na hydrolyse ontstaan kunnen zijn. Met andere woorden, de gevonden cytokininevorm behoeft niet de fysiologisch werkzame vorm te zijn.

Bij extractie van irisknoppen werd gevonden dat, bij directe doding van weefsel in kokend water, geen vrije zeatine aantoonbaar is. Werd zo'n extract behandeld met zure of alkalische fosfatase dan kon wél zeatine worden aangetoond. Zonder kokend-waterbehandeling werd bij de extractie zeatine steeds als de meest voorkomende component gevonden. Deze waarneming duidt op het voorkomen van een mogelijke fosfaatgebonden vorm van zeatine. Het bestaan van zo'n fosfaat werd reeds eerder door anderen gesuggereerd (Shaw et al., 1967; Dekhuijzen, 1980). Binding van een fosfaatgroep aan een zeatinemolecuul is slechts mogelijk aan de hydroxylgroep van de zijketen. Door chemische synthese van dit zeatine allysch fosfaat (ZAP, Figuur 4.3) kwam deze verbinding als referentiestof beschikbaar. De uit iris geïsoleerde fosfaatverbinding kwam met het synthetisch fosfaat overeen (Shadid et al., 1989; Vonk et al., 1989).



Figuur 4.3. Structuurformule van zeatine-allysch-fosfaat (ZAP).

Uit bovenstaand onderzoek kon worden geconcludeerd dat zeatine als een allysch gebonden fosfaatverbinding in iris voorkomt. Het bestaan van zeatineriboside fosfaat en mogelijk ook een dubbelfosfaat in iris kan niet worden uitgesloten.

4.6 Biosynthese van zeatine allysch fosfaat (ZAP)

De bolplaat speelt een belangrijke rol bij de vorming van wortels (voornaamste bron van cytokininesynthese) en andere organen. Bij ongeplante bollen is de stengel op de bolplaat nog in gecompriëerde vorm aanwezig. Om deze reden werd van bolplaatweefsel uitgegaan om te onderzoeken of op die plaats synthese van ZAP zou kunnen plaatsvinden. Met behulp van ^{14}C radioactief gemerkt zeatine kon worden aangetoond dat door een geïsoleerde microsomale fractie uit bolbodemweefsel ^{14}C -ZAP wordt gevormd. Deze ZAP-vorming kon ook worden aangetoond in een microsomale fractie geïsoleerd uit knollen van de aardpeer (*Helianthus tuberosus*, Vonk et al., 1989).

De microsomale fractie van *Helianthus* kon, door een scheiding in verschillende fasen, worden onderverdeeld in een gezuiverde plasmamembraanfractie en een intracellulaire fractie (Kjellbom & Larsson, 1984). De specifieke activiteit van ZAP gevormd door de intracellulaire fractie blijkt dan hoger te zijn dan de specifieke activiteit van ZAP gevormd door de plasmamembraanfractie. Gebleken is dat ZAP gevormd kan worden uit zeatine en laag-energetische fosfaten als adenosine-5-monofosfaat en uridine-5-monofosfaat. Deze omzetting vindt plaats met behulp van een enzym dat voorkomt in *Helianthus*-knollen en in de bolplaat van iris. Het enzym blijkt mem-

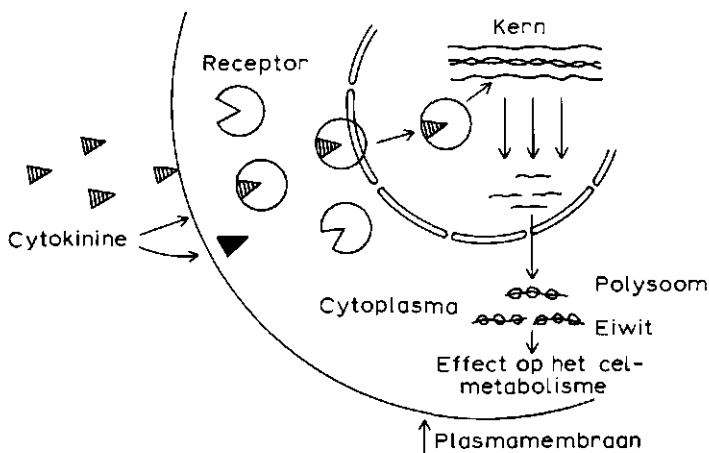
braangebonden te zijn, maar bevindt zich waarschijnlijk niet op de plasmamembraan (Vonk & Davelaar, 1991).

4.7 Hoe werkt zeatine allylisch fosfaat?

ZAP kan als transportvorm van zeatine worden gezien. Langs deze weg kan het cytokinine naar de plaats van actie worden gebracht.

De werking van cytokininen op cellulair niveau is nog niet opgehelderd. Er zijn aanwijzingen gevonden (Romanov et al., 1988), dat het cytokinine eerst bindt aan een cytoplasmatisch eiwit, tentatief receptor genoemd (Figuur 4.4), en dat het gevormde complex van receptor en cytokinine de activiteit van RNA-polymerase I in de kern stimuleert. Synthese van bepaalde eiwitten leek daarna op gang te komen. Of ZAP als zodanig of in combinatie met een cytoplasmatisch eiwit ook tot stimulatie van RNA-polymerase in staat is, is onbekend.

De werking van ZAP zou ook kunnen berusten op een stimulatie van de polysoomvorming door reeds vooraf gevormd mRNA. Ook op deze wijze zou de eiwitsynthese beïnvloed kunnen worden (Kulaeva, 1981).



Figuur 4.4. Hypothetisch model van de werking van cytokinine (naar Kulaeva, 1981).

4.8 Conclusies

Uit het onderzoek zijn de volgende conclusies te trekken:

- Het natuurlijke cytokinine zeatine blijkt lichtvervangend te werken wanneer het wordt toegediend aan irisknoppen die in de snelle strekkingsfase van de stengel te weinig licht ontvangen.
- De uitgroei van de bloemsteel wordt positief beïnvloed door zeatine-injectie en is negatief gecorreleerd met een hoog abscissinezuurgehalte in de bloemknop.
- Zeatine komt in de boliris als natuurlijke verbinding voor en wordt daarin, mogelijk als zeatinefosfaat, getransporteerd.

- De fosfaatgroep van zeatinefosfaat kan geleverd worden door laag-energetische mononucleotiden.
- De omzetting van zeatine naar zeatinefosfaat vindt plaats onder invloed van een membraangebonden enzym dat niet aan de plasmamembraan gebonden is.
- De werking van het cytokinefosfaat op cellulair niveau is nog niet opgehelderd.

Het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek over cytokine-metabolisme en cytokine-activiteit in de boliris heeft geleid tot een beter begrip van de regulatie van het verschijnsel bloemknopverdroging.

4.9 Literatuur

Ahokas, H., 1985.

Cytokinins in the spring sap of curly birch (*Betula pendula* f. *carelica*) and the non-curly form. *Journal of Plant Physiology* 118, 33-39.

Beijer, J.J. & A.F.G.Slootweg, 1963.

Bloeibeïnvloeding bij bolirissen. *Weekblad Bloembollenkultuur* 73, 1101-1103.

Chen, C.M., 1982.

Cytokinin biosynthesis in cell-free systems. In: P.F.Wareing (Ed) *Plant Growth Substances*: Academic Press, New York, 155-163.

Chen, C.M. & S.M.Leisner, 1984.

Modification of cytokinins by cauliflower microsomal enzymes. *Plant Physiology* 75, 442-446.

Dekhuijzen, H.M., 1980.

The occurrence of free and bound cytokinins in clubroots and *Plasmodiophora brassicae* infected turnips tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 49, 169-176.

Fortanier, E.J. & A.van Zevenbergen, 1973.

Analysis of the effects of temperature and light after planting on bud blasting of Iris. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 21, 145-163.

Hartsema, A.M. & I.Luyten, 1962.

Snelle bloei van hollandse irissen "Imperator" VI Proceedings van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, C 65, 1-21.

Horgan, R., 1978.

Analytical procedures for cytokinins. In: J.R.Hillman (Ed), *Isolation of plant growth substances*. Cambridge University Press Cambridge. 97-114.

Incoll, L.D. & P.C.Jewer, 1987.

Cytokinins and the water relations of whole plants. In: Horgan, R. & B.Jeffcoat (Eds), *Cytokinins: Plant hormones in search of a role*. Monograph 14, pp 85-99. British Plant Growth Regulator Group.

Jones, O.P., 1973.

Effects of cytokinins in xylem sap from apple trees on apple shoot growth. *Journal of Horticultural Science* 48, 181-188.

Kamerbeek, G.A. & J.J.Beijer, 1964.

Early flowering of Dutch Iris "Wedgwood" *Mededelingen van de Directie Tuinbouw* 27, 598-604.

Kjellbom, P. & C.Larsson, 1984.

Preparation and polypeptide composition of chlorophyll free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley. *Physiologia Plantarum* 62, 501-509.

Kulaeva, O.N., 1981.

Cytokinin action on transcription and translation in plants. In: J. Guern & C. Péaud-Lenoël (Eds) *Metabolism and molecular activities of cytokinins*. Springer Verlag, Berlin, 218-227.

Letham, D.S., 1978.

In: D.S. Letham, P.B. Goodwin & T.J.V. Higgins (Eds), *Phytohormones and related compounds - A comprehensive treatise*. Elsevier/North Holland. Biomedical Press, Amsterdam, 205-263.

Mae, T. & C.R. Vonk, 1974.

Effect of light and growth substances on flowering of *Iris x Hollandica* cv. Wedgwood. *Acta Botanica Neerlandica* 23, 321-331.

Philips, D.A. & C.F. Cleland, 1972.

Cytokinin activity from the phloem sap of *Xanthium strumarium* L. *Planta* 102, 173-178.

Romanov, G.A., V. Ya. Taran, L. Chvojka & O.N. Kulaeva, 1988

Receptor-like cytokinin-binding protein(s) from barley leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* 7, 1-17.

Shadid, B., H.C. Van der Plas, C.R. Vonk, E. Davelaar & S.A. Ribôt, 1989.

The synthesis of allylic phosphoric derivatives of trans zeatin. *Tetrahedron* 45, 3889-3896.

Shaw, G., B.M. Smalwood & D.V. Wilson, 1967.

Phosphorylated derivatives of the cytokinin zeatin and its 9D-ribofuranoside. Naturally occurring adenine and adenosine derivatives with plant cell division promoting activity. *Experientia* 23, 515-518.

Tromp, J. & J.C. Ova, 1990.

Seasonal changes in the cytokinin composition of xylem sap of apple. *J. of Plant Physiology* 136, 606-610.

Van Staden, J., 1976.

Occurrence of a cytokinin glucoside in the leaves and in honeydew of *Salix babylonica*. *Physiologia Plantarum* 36, 225-228.

Vonk, C.R., 1974.

Studies on phloem exudation from *Yucca flaccida* Haw. XIII. Evidence for the occurrence of a cytokinin nucleotide in the exudate. *Acta Botanica Neerlandica* 23, 541-548.

Vonk, C.R., 1978.

Formation of cytokinin nucleotide in a detached inflorescence stalk and the occurrence of nucleotides in phloem exudate from attached *Yucca* plants. *Physiologia Plantarum* 44, 161-166.

Vonk, C.R. & S.A. Ribôt, 1982

Assimilate distribution and the role of abscisic acid and zeatin in relation to flower-bud blasting, induced by lack of light, in *Iris* cv. Ideal. *Plant Growth Regulation* 1, 93-105.

Vonk, C.R., E. Davelaar & S.A. Ribôt, 1986

The role of cytokinins in relation to flower bud blasting in *Iris* cv. Ideal: Cytokinin determination by an improved enzyme linked immunosorbent assay. *Plant Growth Regulation* 4, 65-74.

Vonk, C.R., E. Davelaar, S.A. Ribôt, B. Shadid & H.C. Van der Plas, 1989

Formation of zeatin allylic phosphate by the microsomal fractions of bulb disks of *Iris x hollandica* Tub. and tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Plant Growth Regulation* 8, 263-276.

Vonk, C.R. & E. Davelaar, 1991.

Zeatin allylic phosphate: occurrence, formation and possible role. *Proceedings of the 14th International conference on plant growth substances*. Amsterdam 1991 (in druk).

5 Fysiologie van de groei en bloemknopopening van de roos

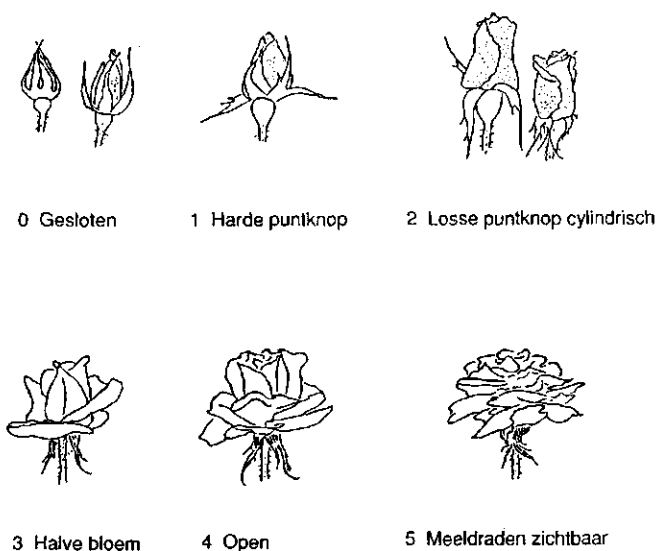
D. Kuiper, N. Marissen*, H.S. van Reenen en S.A. Ribôt
DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen;
*Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland, Aalsmeer

Samenvatting

Tijdens het proces van bloemknopopening vindt er een enorme toename plaats in vers- en drooggewicht van de bloem. De stijging in drooggewicht en het verbruik van koolhydraten door de tamelijk hoge ademhalingsnelheid van de petalen kan slechts gedurende een kwart dagdeel afgedekt worden door de voorraad koolhydraten, die in de petalen aanwezig is op het moment van afsnijden. Derhalve is een flux van koolhydraten e.d. vanuit de rest van de tak naar de bloem essentieel voor een correcte bloemknopopening. Naast een voldoende beschikbaarheid van koolhydraten moet ook de sinkwerking van de petalen voldoende zijn. Binnen de bloem zijn drie categorieën petalen aanwezig, ingedeeld naar hun behoefte aan water, koolhydraten en GA₃ om los van de rest van de bloem tot een normale strekking te komen. Het aantal GA₃-afhankelijke petalen neemt af naarmate de bloemknopopening verder gevorderd is. Deze GA₃-afhankelijkheid zou veroorzaakt kunnen worden door de afwezigheid van GA-biosynthese in de betreffende petalen. Op de rol van GA en cytokininen bij sinkwerking wordt nader ingegaan. Afkortingen: CCCP, carbonyl cyanide m-chlorofenylhydrazon; FCCP, carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)-fenylhydrazon; GA, gibberellinezuur; PMF, proton motive force.

5.1 Inleiding

Binnen het kader van de landelijke projectgroep "Inwendige Kwaliteit van Glastuinbouwproducten" vindt op CABO-DLO samen met het PBN onderzoek plaats naar de oorzaken van de slechte bloemknopopening van de roos 'Madelon'. Het slechte openbloeien van afgesneden 'Madelon' op de vaas onder uitbloeicondities (1,5 W m⁻², 60% RH, 20°C, lichtperiode 14 uur) is afhankelijk van het ontwikkelingsstadium. Naarmate de roos in een rijper ontwikkelingsstadium (Figuur 5.1) gesneden



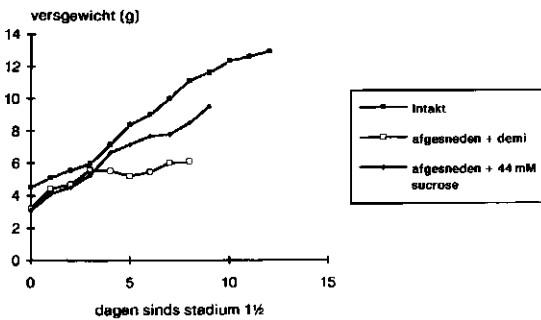
Figuur 5.1 Stadia in de bloemknopopening van de roos.



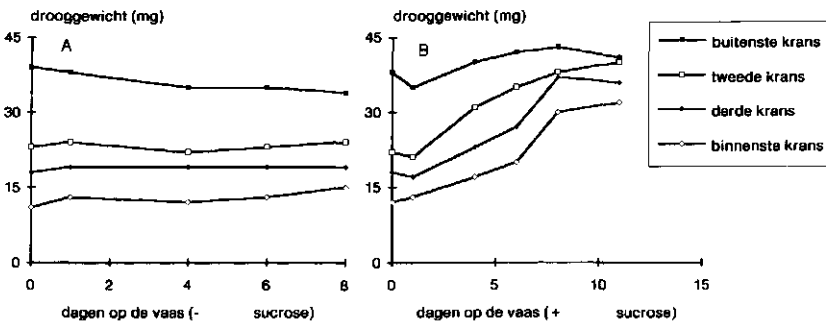
Figuur 5.2 Een slecht (links) en een goed (rechts) ontwikkelde bloem

wordt, is de kans op een succesvolle bloemknopopening groter. Rozen geoogst in stadium drie of later vertonen een goede bloemontwikkeling, d.w.z. de bloem bereikt qua kleur, vorm en grootte het finale stadium (= 5). Rozen van het commerciële snijstadium (stadium 2 of iets eerder) kunnen door een toevoeging van $\geq 1,5\%$ (44 mM) sucrose + 1 ppm AgNO_3 (Kuiper et al., 1990a; Marissen & Kuiper, 1991) zich goed ontwikkelen (Figuur 5.2). Het versgewicht van de totale corolla ontwikkelt zich geheel verschillend, in intacte rozen en in afgesneden rozen met of zonder sucrose in het vaaswater (Figuur 5.3). Het versgewicht van een opengebloede intacte roos is ca. 13 g, dat van een met sucrose behandelde afgesneden roos ca.

10 g en een dito roos op demiwater (+ 1 ppm AgNO_3) weegt 5 à 6 g vers. Figuur 5.4 laat zien dat een suikertoevoeging aan de vaasoplossing het drooggewicht van de buitenste krans petalen op peil houdt, en het drooggewicht in de rest van de petalen doet stijgen ten opzichte van overeenkomstige petalen van *niet* met suiker behandelde rozen. Daarentegen blijven de drooggewichten van de overige petalen in afgesneden rozen op demiwater constant.



Figuur 5.3 Het verloop van het bloemgewicht van intacte en afgesneden rozen.



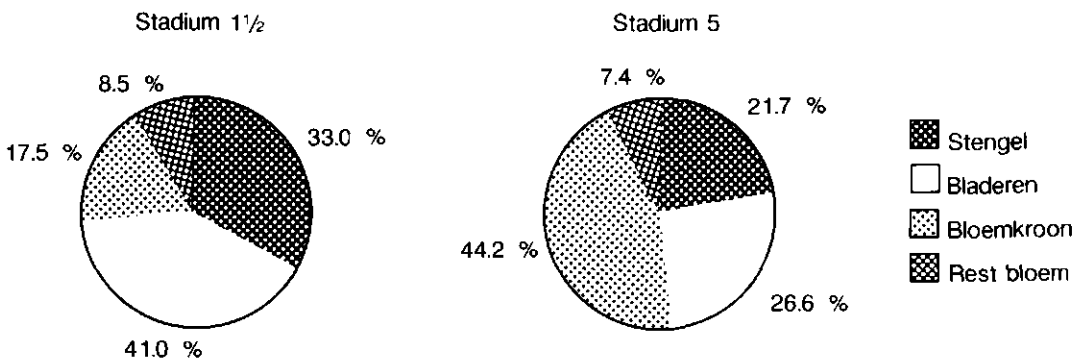
Figuur 5.4 Het verloop van het drooggewicht van vier kransen petalen van afgesneden rozen op een vaasoplossing zonder (A) en met (B) 44 mM sucrose (Hoogweg, 1990).

5.2 De bloemknopontwikkeling en wat daarvoor nodig is

Gedurende de bloemknopopening verandert er veel in de gewichtsverdeling binnen een rozentak (Figuur 5.5); het gewichtsaandeel van de bloemkroon neemt sterk toe. Tabel 5.1 maakt duidelijk hoe de gewichtsonwikkeling van de bloemkroon van afgesneden rozen, die onder uitbloeicondities op een suikerhoudende vaasoplossing staan, verloopt. Het versgewicht neemt 8500 mg toe, terwijl dit voor het drooggewicht ca. 1900 mg is. Er wordt dus gedurende een succesvolle bloemknopopening ca. 6600 mg (= 6.6 ml) water netto in de petalen ingesloten en dit komt overeen met 3% van het totale waterverbruik van een 65 cm lange tak met een bladoppervlak van ca. 750 cm². Het drogestofpercentage neemt toe van 16,5 (stadium 1½) naar 20,7% (stadium 5). De relatieve groeisnelheid op basis van het drooggewicht bedraagt 46% per dag en dit is vergeleken met literatuurgegevens een heel hoge snelheid. Een weefsel, dat zo hard groeit, heeft een grote behoefte aan energie en intermediären voor de biosynthese van macromolekulen. De ademhalingsnelheid is dan ook hoog (Jiao et al., 1991; van Reenen, mededeling) en omgerekend verbruikt de bloem hiervoor tijdens de groei van stadium 1½ naar stadium 5 ca. 450 mg droge stof. Samen met de reële toename in drooggewicht bedraagt het drogestofverbruik van deze bloem dus 2340 mg. In stadium 1½ bedraagt de voorraad aan koolhydraten ca. 60 mg per bloem (Tabel 5.1). Wat kan een afgesneden roos daarmee? De behoefte aan koolhydraten gedurende de eerste dag van het vaasleven is ca. 290 mg. Dat betekent, dat de 60 mg voorraad de behoefte van de bloem gedurende slechts 6 uur dekt.

Deze conclusie heeft een aantal consequenties:

- Tijdens het vaasleven is aanvoer van koolhydraten uit de rest van de afgesneden roos zeer belangrijk. Hierbij kan gedacht worden aan blad, steel, bloembodem en sepalen.
- Gehaltes aan koolhydraten in de petalen op het moment van afsnijden kunnen niet gebruikt worden als indicator voor de kwaliteit van bloemknopopening en levensduur van 'Madelon' rozen.

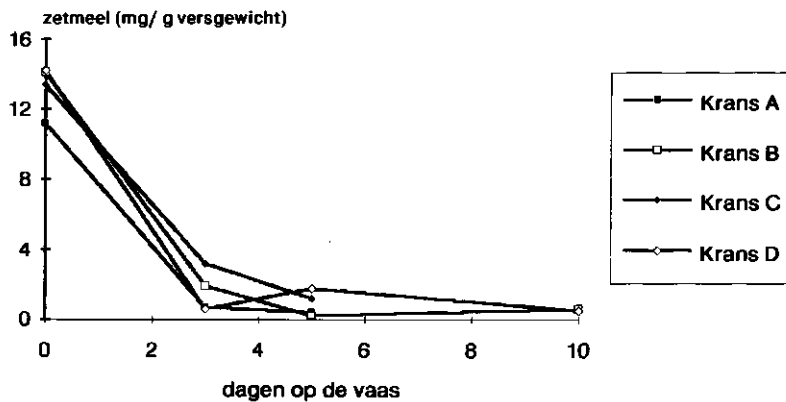


Figuur 5.5 De versgewichtverdeling in procenten tussen verschillende onderdelen van de rozentak uit stadia 1½ en 5.

Tabel 5.1 Een vergelijking van enkele parameters van bloemen (alleen de petalen) uit stadia 1½ en 5 en het verschil (stadium 5 - 1½). Alle gegevens in mg per bloem.

	Stadium 1½	Stadium 5	Stadium 5 - 1½
Versgewicht	3100	11600	8500
Drooggewicht	510	2400	1890
Water	2590	9200	6610
Zetmeel	41,7	36	-5,7
Oplosbare suikers	18,5	358,4	339,9

Onlangs verscheen een publikatie (Van Doorn et al., 1991), waarin het lagere zetmeelgehalte van de petalen van 'Madelon' rozen als de oorzaak van de slechte bloemknopopening geduid werd. In deze publikatie werd aangetoond, dat "Sonia" rozen wel een goede bloemknopopening op de vaas hebben en dat deze met tweemaal zoveel koolhydraten in de petalen beginnen. Het is duidelijk uit het voorgaande, dat een twee- of driemaal grotere suikervoorraad in 'Madelon' petalen niet de 24-uur-behoefte van de bloemknop dekt. De voorraad aan koolhydraten op het moment van afsnijden heeft alleen een voorspellende toetswaarde, indien deze voorraad op enige manier correleert met de mogelijkheid van de bloem om koolhydraten aan te trekken uit de rest van de bloemtak (= sinkwerking). Figuur 5.6 illustreert hoe snel de voorraad aan zetmeel verdwijnt in de diverse kransen van de bloem.

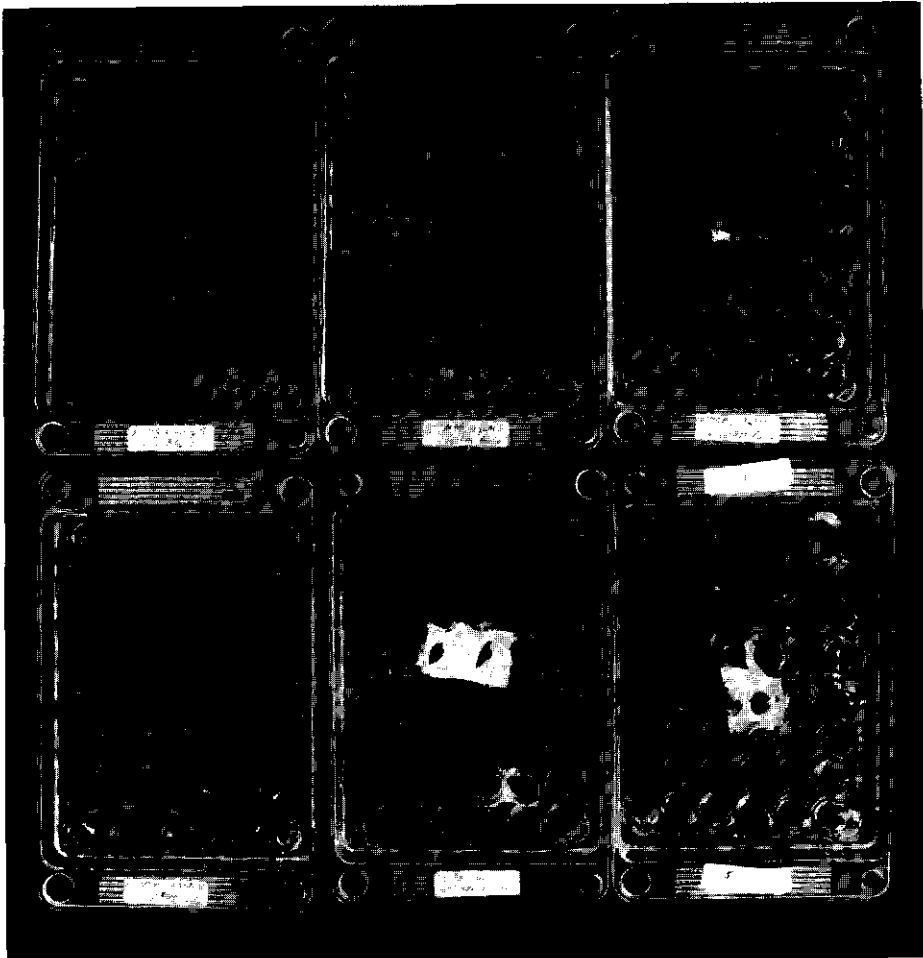


Figuur 5.6 Het verloop van de zetmeelgehalten in de vier kransen petalen van afgesneden rozen op een oplossing zonder sucrose. Krans A is de buitenste, B de daaropvolgende, enz.

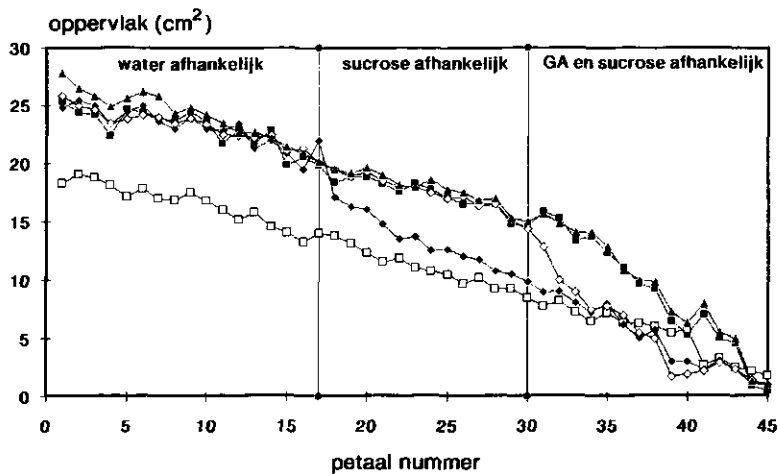
5.3 De petalen als sink

In sectie 5.2 constateerden we, dat de bloem haast volledig afhankelijk is van "extern aangevoerde" koolhydraten voor een correcte bloemknopopening. In het

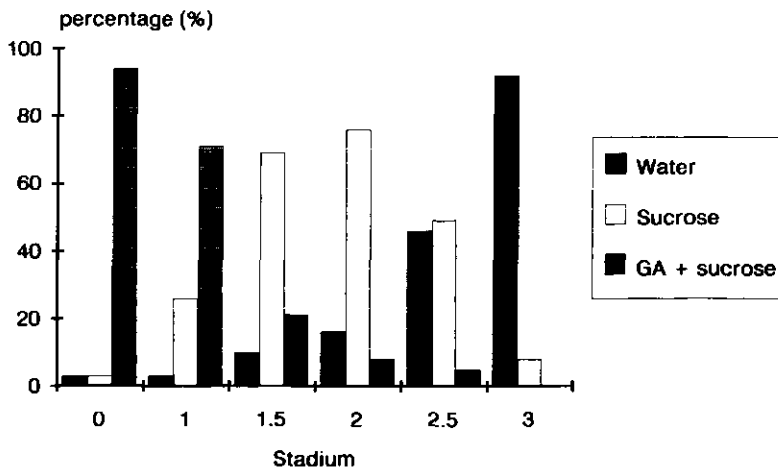
geval van 'Madelon' rozen is dat ontoereikend, aangezien alleen rozen op sucrosehoudende oplossing goed openen. Dit kan door twee processen veroorzaakt worden: de sink-activiteit van de bloem is te gering en/of de source-werking van het blad is te gering. Dit laatste aspect is een onderdeel van het onderzoek van één van de auteurs (van Reenen). In een publikatie van Kuiper et al. (1990a) werd indirect een derde hypothetische (mede)oorzaak genoemd, namelijk concurrentie tussen petalen op één bloembodem. De gewichten, oppervlaktes en gehalten aan koolhydraten (Marissen 1991) van de binnenste 10 petalen van afgesneden rozen op een 1 ppm AgNO_3 -oplossing nemen toe en benaderen de waarden in de intacte plant, indien er buiten deze tien om geen of weinig andere petalen staan. De concurrentiekracht van de binnenste petalen lijkt derhalve niet groot in een gewone bloem. Dit kan een gevolg zijn van de anatomie, de "suikerstroom" zou bijvoorbeeld eerst langs de buitenste petalen kunnen lopen.



Figuur 5.7 Titerplaatexperimenten.



Figuur 5.8 Het oppervlak (cm²) van individuele petalen van een stadium 1½ roos. Afgeplukte petalen werden in aparte kuiltjes van een titerplaat geplaatst met daarin verschillende oplossingen: water (◆), 11,7 mM sucrose (◇), 11,7 mM sucrose en 0,1 mM GA₃ (■). Na 7 dagen werden de oppervlaktes van de petalen gemeten en vergeleken met petalen uit intacte stadium 5 (volledig open) rozen (▲) en met petalen van onbehandelde stadium 1½ rozen (□). De petalen zijn genummerd vanaf de buitenkant van de corolla naar binnen.



Figuur 5.9 De relatieve verdeling van "water-afhankelijke" (wit), "sucrose-afhankelijke" (zwart) en "GA₃ + sucrose-afhankelijke" petalen (gestreept) gedurende diverse stadia van de bloemknopopening.

Een serie experimenten met gescheiden petalen in titerplaten (Figuur 5.7) toont aan dat in de roos Madelon, die afgesneden wordt in stadium 1½, drie groepen petalen voorkomen (Kuiper et al., 1991). Figuur 5.8 laat zien, dat de groep buitenste petalen slechts water nodig heeft om het juiste petalooppervlak te krijgen en een middelste groep heeft daarvoor 0,4% (11,7 mM) sucrose of 0,8% (44,4 mM) D-glucose nodig. De binnenste petalen hebben naast deze koolhydraatbron ook 10⁻⁴ M GA₃ nodig. De titerplaten staan twee aan twee in gesloten vleeswarenbakjes, voorzien van een

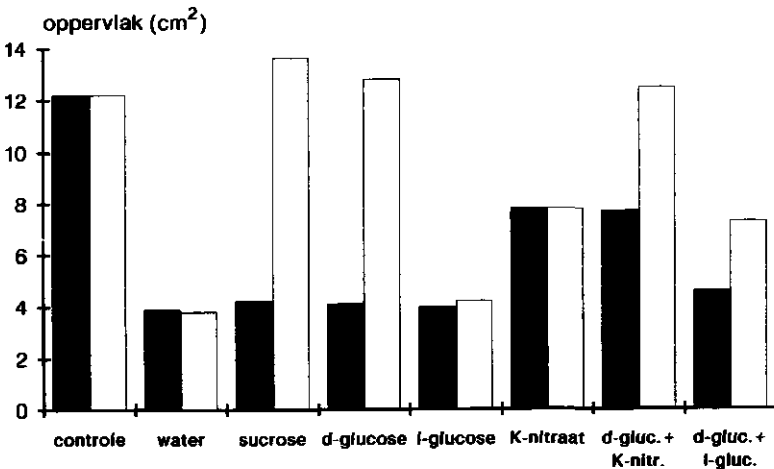
laagje water, bij uitbloeicondities. Na deze constatering was het noodzakelijk vast te stellen of deze driedeling een permanente verdeling is, of dat er ook sprake is van een ontogenische verschuiving van dit patroon. De bloemknopstadia 0 tot en met 3 (Figuur 5.1) werden getest. Figuur 5.9 demonstreert duidelijk, dat het aandeel van de GA-afhankelijke petalen van ongeveer 95% (stadium 0) daalt naar $\leq 10\%$ in stadium 3. Het aandeel van de water-afhankelijke petalen stijgt navenant. Een eerste indruk van wat GA_3 doet volgt uit Tabel 5.2. In deze tabel zijn de petalen geclusterd. Onder stadium 5 staan de gemiddelde drooggewichten van de petaalgroepen van intacte rozen uit stadium 5. Hoofdje 1½ betekent hetzelfde voor stadium 1½ in intacte rozen. De rest van de kolommen betreft het gemiddeld gewicht, dat in stadium 1½ geplukte petalen op diverse oplossingen in titerplaten bereiken. Cluster (petaal 1 tot en met 10) vertoonde een correcte strekking in de aanwezigheid van water, maar nam, indien aangeboden, wel sucrose op. In zekere mate is hier dus sprake van inefficiëntie. Verder vertonen clusters (petaal 31 tot en met 40) en (petaal 41 tot en met 45) alleen een GA_3 -afhankelijke stijging van het drooggewicht ten gevolge van de opname van sucrose (Tabel 5.2). Deze tabel laat ook zien, dat de zogenaamde "water-afhankelijke" petalen wel degelijk sucrose opnemen, indien dit wordt aangeboden. Een gelijksoortig effect werd aangetoond bij met GA_3 behandelde bladeren van alstroemeria (Elzenga & van Doorn 1990). Het zou hier gaan om de stimulering van de actieve (= energie-afhankelijke) component van het koolhydraattransport over de plasmalemma en de tonoplast. Om hier wat meer inzicht in te krijgen zijn proeven uitgevoerd met L-glucose,

Tabel 5.2 Drooggewichten (mg) van petalen van afgesneden rozen. De sucroseconcentratie was 44 mM en de GA-concentratie 0,1 mM. Zie verder Figuur 5.8.

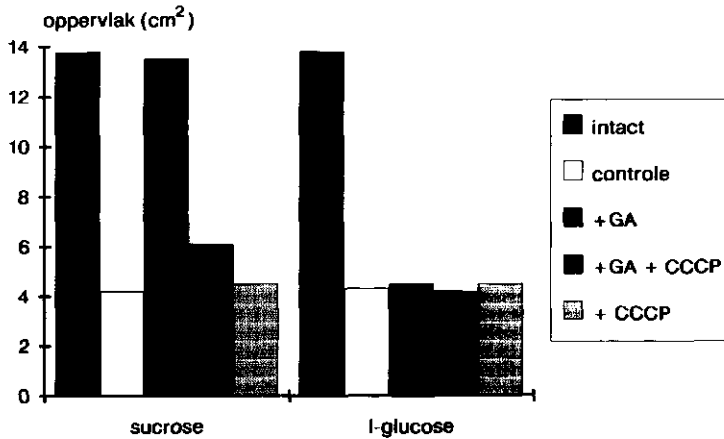
Petaal- nummer	Stadium 5 intact	Stadium 1½ intact	Stadium 1½ los			
			water	sucrose	GA	sucrose + GA
1-10	78	44	39	95	38	94
11-20	67	27	20	88	21	85
21-30	56	19	15	65	14	66
31-40	41	12	10	17	12	49
41-50	29	9	9	15	8	41

een molecuul waarvoor geen carrier bestaat, zodat al het transport d.m.v. diffusie moet geschieden. De GA_3 -afhankelijke petalen laten een correcte strekking zien indien zij van sucrose of D-glucose plus GA_3 worden voorzien. Een concentratie van 44,4 mM L-glucose +/- GA_3 heeft geen effect (Figuur 5.10). Dus een koolhydraat, waarvoor geen membraancarrier bestaat, wordt in de aanwezigheid van GA_3 niet sneller/meer over een membraan getransporteerd. Er is echter een andere verklaring mogelijk. Van L-glucose is bekend, dat het in het algemeen niet gemetaboliseerd wordt in de plantecel. Dus de plant kan L-glucose alleen maar als osmoticum gebruiken. In Figuur 5.10 is het effect van 22,1 mM KNO_3 op de strekking van

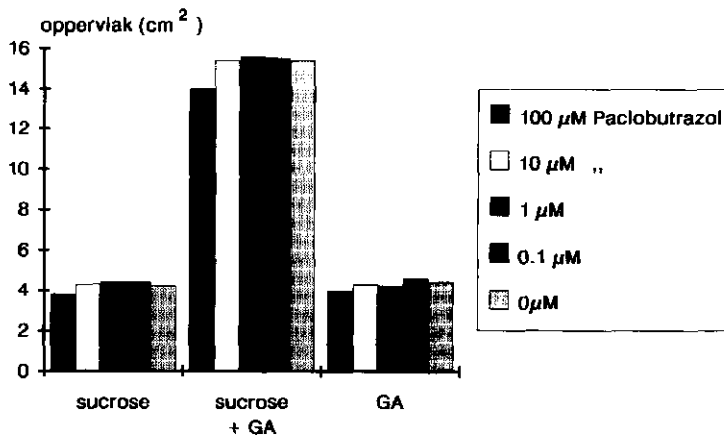
GA₃-afhankelijke petalen te zien. Met of zonder GA₃ is er een gedeeltelijke strekking waar te nemen vermoedelijk omdat KNO₃ werkt als osmoticum. GA₃ heeft geen extra effect op de KNO₃-afhankelijke strekking. Dezelfde resultaten werden verkregen met KCl, waardoor een NO₃-specifiek effect kan worden uitgesloten. De twee resterende kolommen in Figuur 5.10 bevestigen dit beeld nog eens; 11,1 mM D-glucose, normaal niet genoeg voor volledige strekking is dat wel met 14 mM KNO₃ en uiteraard GA₃. De opgenomen D-glucose kan in dit geval geheel aangewend worden voor de energiehuishouding en de biosynthese in de petalen. Indien in plaats van KNO₃ L-glucose wordt gebruikt, is slechts een gedeeltelijke strekking waarneembaar, namelijk die welke geïnduceerd wordt door de suboptimale D-glucose-concentratie. Dit bevestigt het idee, dat in de GA₃-afhankelijke petalen L-glucose niet meetbaar binnenkomt, hetgeen betekent, dat het transport van koolhydraten over het membraan bijna geheel via de actieve component gaat. Een manier om het actieve, door de proton motorische kracht (pmf) gedreven, koolhydraattransport te remmen is het gebruik van protonoforen als CCCP en FCCP. Deze remstoffen maken de membraan specifiek lek voor protonen, waardoor de opbouw van een pmf onmogelijk wordt en derhalve alleen de diffusiecomponent van het koolhydraattransport overblijft. Indien 5 µM CCCP (of 0,5 µM FCCP) wordt toegediend aan GA₃-afhankelijke petalen verdwijnt nagenoeg het GA₃ + sucrose effect op de petaalstrekking (Figuur 5.11). Dit en het gegeven uit dezelfde figuur dat CCCP niet van invloed is op de L-glucose effecten onderstrepen de interactie tussen GA₃ en de pmf afhankelijke koolhydraattransport. Gegevens, die hier niet gepresenteerd worden, tonen aan dat ook in de petalen die voor hun strekking alleen afhankelijk waren van water of van sucrose, actief transport van koolhydraten (aangetoond door effecten van FCCP) plaatsvindt. Wel is in deze petalen duidelijk een diffusiecomponent van het koolhydraattransport meetbaar.



Figuur 5.10 Petaaloppervlaktes (cm²) van "GA₃ + sucrose-afhankelijke" petalen na een periode van 8 dagen op verschillende oplossingen, 11,7 mM sucrose, 44,4 mM D- of L-glucose, 22,1 mM KNO₃, 11,1 mM D-glucose + 16 mM KNO₃, 11,1 mM D- + 33,3 mM L-glucose, met (wit) of zonder GA₃ (donker).



Figuur 5.11 Petaaloppervlaktes (cm²) van "GA₃ + sucrose-afhankelijke" petalen na een periode van 8 dagen op verschillende oplossingen.



Figuur 5.12 Idem als Figuur 5.11.

Is het actieve koolhydraattransport in de water- en in de sucrose-afhankelijke petalen ook in enige mate afhankelijk van GA₃? Als dit zo is, dan moeten deze petalen een eigen voorraad en/of synthese van GA's hebben, aangezien toevoegingen van GA₃ geen effect hebben in termen van petaalstrekking. Paclobutrazol is een remstof, die één van de eerste stappen van de GA-biosynthese remt. Deze remstof, toegevoegd in verschillende concentraties aan GA₃-afhankelijke petalen (Figuur 5.12), heeft geen enkel effect op de petaalstrekking, ook niet in combinatie met sucrose en/of GA₃. In de sucrose-afhankelijke petalen remt paclobutrazol ($\geq 1 \mu\text{M}$) duidelijk de petaalstrekking (Figuur 5.13). Er vindt wel enige strekking plaats, in vergelijking met de controle (water), die overeenkomt met de resterende petaalstrekking in aanwezigheid van CCCP en sucrose. Het remmend effect van paclobutrazol wordt teniet gedaan door 10^{-4} M GA₃.

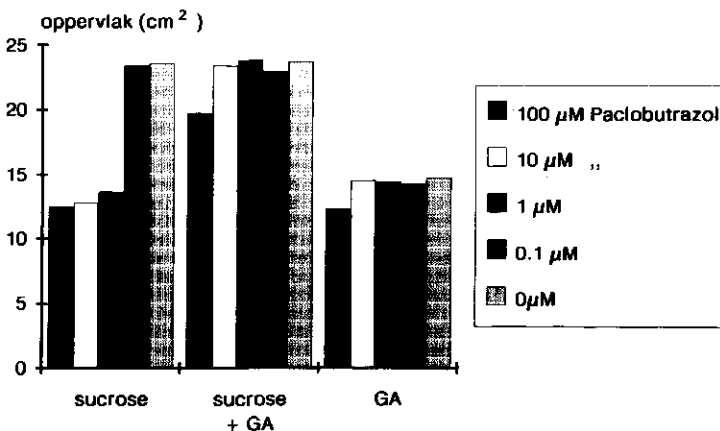
Uit het voorgaande blijkt, dat in de petalen een actieve component van het koolhydraat transport voorkomt en dat deze naarmate de petalen jonger zijn meer bijdraagt aan het totale transport. De geconstateerde GA₃-afhankelijkheid van het koolhydraattransport berust waarschijnlijk op het ontbreken van een eigen GA-bio-

synthese en is ook belangrijker in jongere petalen. Waar in de intacte plant de petalen, die (nog) geen GA synthetiseren, de benodigde GA vandaan halen is een punt van verder onderzoek. De oudere petalen en de meeldraden zijn de meest aanneemelijke potentiële leveranciers (Pharis & King, 1985).

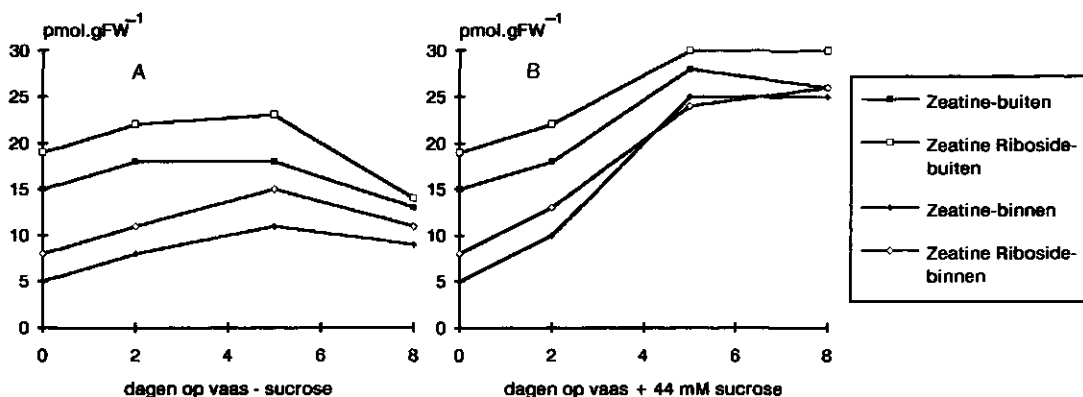
Bij slecht openende rozen kan de distributie van GA een knelpunt zijn, waardoor de actieve component van de koolhydraatopname niet of maar deels werkt. In dat geval zijn de betrokken petalen meer aangewezen op de diffusiecomponent, die een lagere affiniteit tot het substraat heeft (Rausch, 1991), waardoor er behoefte is aan een meer geconcentreerde flux van koolhydraten naar de petalen. Dit gebeurt feitelijk als sucrose wordt toegediend aan het vaaswater, of in het geval dat het aantal petalen op de bloembodem gereduceerd wordt. Ook de lichtcondities kunnen hierbij een rol spelen. Er zijn aanwijzingen dat fotosynthetisch-actief licht ook of in plaats van GA het actieve suikertransport stimuleert (Roubelakis-Angelakis & Theodoropoulos, 1990). Belichting onder de gebruikte uitbloeicondities zou deze stimulus weghalen.

5.4 Hormonale regulatie

De vorige paragraaf is afgesloten met de conclusie, dat het GA-metabolisme betrokken is bij de sinkactiviteit van de petalen en zodoende bij het proces van de bloemknopopening (Steinitz & Cohen, 1982). Een andere groep van plantehormonen, die in dit verband vaak genoemd worden, is die van de cytokininen. Concentraties van één of meer cytokininen zijn vaak positief gecorreleerd met groeisnelheden (Kuiper et al., 1990b) en mate van sinkactiviteit, uitgedrukt in bijvoorbeeld chlorofyl- en eiwitgehalte (Smiciklas & Below, 1991). Cytokininen remmen ook de veroudering doordat ze de biosyntheseprocessen op peil houden. Dit uit zich o.a. in een grotere houdbaarheid van intacte en losse petalen van de anjer (Bossè & Van Staden, 1989; Van Staden & Bossè 1989).



Figuur 5.13 Idem als Figuur 5.11, maar nu werden "sucrose-afhankelijke" petalen gebruikt.



Figuur 5.14 Het verloop van de zeatine- en ribosideconcentraties in de petalen uit de buitenste en binnenste helft van de bloem van afgesneden rozen op vaaswater met (B) en zonder (A) sucrose.

Een enkelvoudige proef ter bepaling van cytokininen werd uitgevoerd in samenwerking met het Department of Plant Physiology (SLU, Uppsala, Zweden). In Figuur 5.14 zijn de concentraties aan zeatine en zeatineriboside uit petalen van afgesneden stadium 1½ rozen, die onder uitbloeicondities op vaaswater met (B) en zonder sucrose (A) hebben gestaan. De petalen zijn verdeeld in een buitenste en een binnenste groep. De concentraties in de buitenste groep petalen van de met sucrose behandelde rozen verschillen op dag 2 niet van de controle. Dit is wel het geval op dag 5 en 8. In "+ sucrose" petalen stijgen de concentraties tussen dag 2 en 5 en vlakken daarna af, terwijl in "- sucrose" petalen de concentraties tussen dag 2 en 5 afvlakken en daarna dalen. Bij de binnenste groep petalen is een gelijksoortig verschil waar te nemen. De gemiddelde concentratie zeatine + -riboside per gram versgewicht is in "+ sucrose" bloemen 55 pmol g⁻¹, terwijl die in "- sucrose" bloemen 23 pmol g⁻¹ is. De concentraties van een aantal andere cytokininen, zoals dihydrozeatine en -riboside gedragen zich overeenkomstig. Ook andere bloem- en takdelen zijn geanalyseerd. De samenstelling aan cytokininen in de bloembodem is in Tabel 5.3 weergegeven. In afgesneden rozen met correcte bloemknopopening stijgen de concentraties over de hele linie, terwijl deze in rozen op demiwater dalen tussen dag 0 en 5. Aangezien de bloembodem zelf geen cytokininen maakt, zijn deze waarschijnlijk vanuit de bladeren via het floëem aangevoerd. Gegevens van de bladeren onderschrijven dit. Vooral een daling in de concentratie cytokinine-O-glucosiden is duidelijk.

Uit de hier gepresenteerde gegevens kan geconcludeerd worden, dat in correct opende bloemen het gehalte aan cytokininen in de jongere petalen aanvankelijk lager is, maar tijdens het openbloeien stijgt. Het verschil tussen buitenste en binnenste petalen bestaat ook bij de "-sucrose", maar in geringere mate en de gehalten blijven veel lager. Of dit een oorzakelijk verband is, is nu nog onduidelijk. De oplopende concentraties aan cytokininen in de bloembodem correleren met de grotere koolhydraatflux naar de bloem. Nadere studie moet ook uitwijzen of cytokininen

vanuit de bloembodem naar andere bloemdelen gedistribueerd zijn en of de bloem, bijvoorbeeld in de stamper, zelf cytokininen produceert.

Tabel 5.3. Concentraties van verschillende cytokininen en de totale concentratie aan cytokininen uit de bloembodem van afgesneden rozen op dag 0 en 5 van de uitbloeiperiode op vaaswater met of zonder sucrose. Z, zeatine; ZR, zeatineriboside; ZMP, zeatineribosidemonofosfaat; DHZ, dihydrozeatine; DHZR, dihydrozeatine riboside; IPA, isopentenyladenine; IPAR, isopentenyladenosine; IPMP; isopentenyladenosine monofosfaat.

Bloem bodem	Z	ZR	ZMP	DHZ	DHZR	IPA	IPAR	IPMP	Totaal
t=0	15	18	6	5	7	0	2	5	58
t=5 sucrose	25	35	12	15	14	0	6	10	117
t=5 demi	6	8	0	0	4	0	2	4	24

5.5 Evaluatie

De problematiek betreffende de bloemknopopening van de roos "Madelon" wordt van twee kanten onderzocht.

Een analyse van de koolstofbalans van een intacte en een afgesneden roos, is één benadering. Deze studie moet antwoord geven op de vraag hoeveel van de fotosynthetische produktie naar de bloem gaat en hoeveel reallokatie van koolhydraten e.d. vanuit de bladeren en stengel naar de bloem plaatsvindt. Is deze toevoer te mager, of ligt het probleem deels of geheel aan de povere aantrekkingskracht, die de bloem uitoefent op benodigde koolhydraten e.d. vanuit de rest van de tak? In dit kader zijn in het voorgaande petaalkarakteristieken gepresenteerd, die gecontroleerd zullen worden met behulp van experimenten met ponsjes en protoplasten van petalen. Een voordeel hiervan is, dat het probleem van een klein uitwisselingsvlak tussen intacte petaal en het medium in de titerplaat vermeden wordt. Dit uitwisselingsvlak kon wel eens verantwoordelijk zijn voor de hoge GA_3 -concentratie, die in onze petaalproeven nodig is om effecten te meten.

Voorts kan met protoplasten het koolhydraattransportsysteem beter gekarakteriseerd worden, bijvoorbeeld hoe specifiek is het GA_3 ? Daartoe zullen meer GA 's getest worden.

Afhankelijk van de resultaten uit de GA -specificiteitsproeven zal overwogen worden of de GA -gehalten in diverse onderdelen van de afgesneden roos gemeten worden. Er zullen ook proeven uitgevoerd worden, waarin gepoogd zal worden middels exogeen toe te dienen plantegroeistoffen, de drogestof-distributie binnen een rozetak te beïnvloeden. Het succes van dit soort proeven is bepalend voor de vraag of een voorbehandeling van "Madelon" rozen bij teler of veiling mogelijk en te controleren is middels een simpele doch betrouwbare test. Dit alles met als doel een goede bloemknopopening van "Madelon" rozen zoveel mogelijk te bevorderen.

5.6 Literatuur

Bossè, C.A., Van Staden, J., 1989

Cytokinins in cut carnation flowers. V. Effects of cytokinin type, concentration and mode of application on flower longevity. *Journal of Plant Physiology* 135: 155-159.

Elzenga, J. Th. & W.G. van Doorn, 1990

Membrantransport van assimilaten gedurende de veroudering van alstroemeribladeren. In: H.M. Dekhuijzen & S.C. van de Geijn, *Fysiologie en kwaliteit van tuinbouwproducten, CABO-DLO, Wageningen*, pp. 91-100.

Hoogweg, J., 1990

Bloemknopopening van de roos Madelon. PBN-verslag.

Jiao, J., Tsujita, M.J., Grodzinski, B., 1991

Influence of temperature on net CO₂ exchange in roses. *Canadian Journal of Plant Science* 71: 235-243.

Kuiper, D., Ribôt, S.A., Marissen, N., 1990a.

Het belang van de assimilatenverdeling bij de bloemknopopening van de roos. In: Dekhuijzen, H.M. & S.C. van de Geijn (red.), *Fysiologie en kwaliteit van tuinbouwproducten, CABO-DLO, Wageningen*, pp. 75-89.

Kuiper, D., Schuit, J., Kuiper, P.J.C., 1990b.

Actual cytokinin concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereals. *Plant and Soil* 123: 243-250.

Kuiper, D., Van Reenen, H.S., Ribôt, S.A., 1991

Effect of gibberellic acid on sugar transport into petals of "Madelon" rose flowers during bud opening. *Proceedings of Hortifroid symposium, Acta Horticulturae* (in druk).

Marissen, N., Kuiper, D., 1991

Water en koolhydraten mede bepalend voor opening bloemknop. *Vakblad voor de Bloemisterij* 6: 58-59.

Marissen, N., 1991

Osmotic potential and carbohydrate contents in the corolla of the rose cv. Madelon. *Proceedings of hortifroid symposium, Acta Horticulturae* (in druk)

Pharis, R.P., King, R.W., 1985

Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 517-568.

Rausch, T., 1991

The hexose transporters at the plasma membrane and the tonoplast of higher plants. *Physiologia Plantarum* 82: 134-142.

Roubelakis-Angelakis, K.A., Theodoropoulos, P.A., 1990

Uptake characteristics of sugars and amino acids. In "Plant aging; Basic and applied approaches" (eds.R. Rodriguez et al.) pp. 151-159, Plenum Press, New York.

Smicklas, K.D., Below, F.E., 1992

Role of cytokinin in enhanced productivity of maize supplied with mixed nitrogen. *Plant and Soil* (in druk).

Steinitz, B., Cohen, A., 1982

Gibberellic acid promotes flower bud opening on detached flower stalks of statice (*Limonium sinuatum* L.) *HortScience* 17: 903-904.

Van Doorn, W.G., Groenewegen, G., Van de Pol, P.A., Berkholst, C.E.M., 1991

Effects of carbohydrate and water status on flower opening of cut madelon roses. *Postharvest Biology and Technology* 1: 47-57.

Van Staden, J., Bossè, C.A., 1989

Cytokinins in cut carnation flowers. VI. The transport and metabolism of zeatin and dihydrozeatin. *Journal of Plant Physiology* 135: 160-163.

6 Stuurlichteffecten in de tuinbouw

F.M. Maas

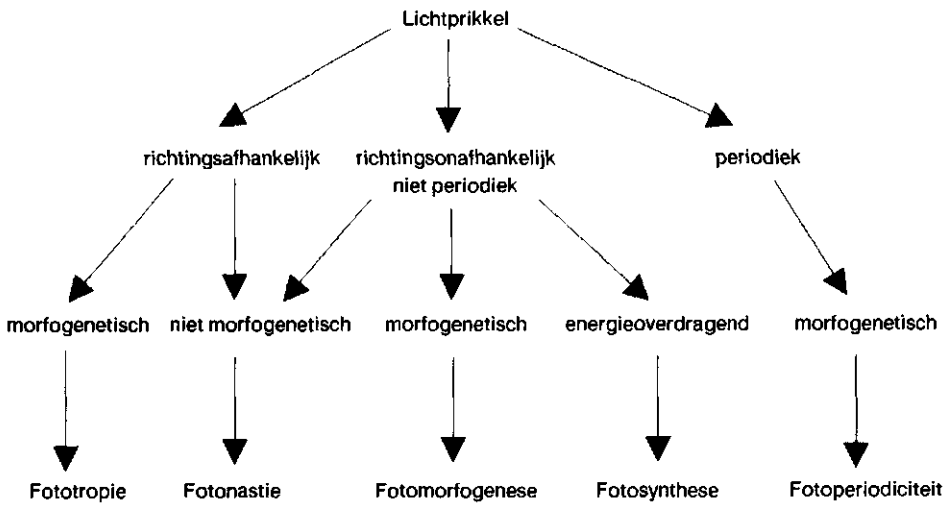
DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

Samenvatting

Licht is voor planten in de eerste plaats de energiebron die hun groei mogelijk maakt. Vanwege deze levensbelangrijke functie hebben planten allerlei mechanismen ontwikkeld om bij een verandering in de lichtomstandigheden hun groeipatroon zodanig te wijzigen dat zij het beschikbare licht zo optimaal mogelijk kunnen blijven gebruiken. Naast energie bevat het licht dus ook informatie op grond waarvan het ontwikkelingspatroon van planten wordt gestuurd. Zo wordt het seizoensafhankelijke verloop in daglengte, dat van jaar tot jaar veel constanter is dan dat in temperatuur, door veel plantesoorten gebruikt als een signaal voor de initiatie van bepaalde ontwikkelingsprocessen zoals knopuitloop, bladval en bloei. De kwaliteit of spectrale samenstelling van het licht, met name de hoeveelheid blauw licht en de rood/verrood-verhouding van het licht, hebben een grote invloed op tal van fysiologische en morfogenetische processen in planten.

Stuurlicht is een term die wordt gebruikt voor het gericht beïnvloeden van het ontwikkelingspatroon van planten via specifieke wijzigingen in de kwaliteit van het licht of de lengte van de lichtperiode waaraan de planten worden blootgesteld. Bloei-beïnvloeding van potplanten en snijbloemen is hiervan het meest bekende en wijdst verbreide voorbeeld in de tuinbouw. Ook de vertakking, lengtegroei, kleur en chemische samenstelling van de plant kunnen echter door stuurlicht worden beïnvloed.

In dit hoofdstuk ligt de nadruk op de meest algemene reacties van planten op veranderingen in lichtkwaliteit; zowel die veranderingen die kunnen optreden in de natuurlijke habitat als die waaraan planten die in kassen of klimaatkamers worden opgekweekt worden blootgesteld. Tevens wordt er een beknopt overzicht gegeven over de stand van zaken op het gebied van zowel het fundamentele als het praktijkgerichte onderzoek aan de effecten van licht op de ontwikkeling van planten. Tenslotte wordt een aantal studies in Nederland op dit gebied beschreven, waarbij de nadruk ligt op het deels praktijk- en deels fundamenteel georiënteerde lichtonderzoek dat op CABO-DLO wordt verricht.



Figuur 6.1. Schema voor de karakterisering van lichtreacties in planten (Uit: Smith, 1975).

6.1 Algemene inleiding

Licht is voor planten één van de belangrijkste voorwaarden voor groei. Via het proces van de fotosynthese kunnen planten lichtenergie omzetten in chemische energie waarmee zij vervolgens suikers vormen uit koolzuurgas en water, alsmede alle overige bouwstenen die een plant nodig heeft om te groeien. Gezien vanuit het primaire belang van licht voor de groei van planten is het niet verwonderlijk dat planten zich gedurende de evolutie op allerlei manieren hebben weten aan te passen aan veranderingen die zich in het natuurlijk lichtmilieu kunnen voordoen. Om veranderingen in het lichtklimaat te kunnen waarnemen moet een plant over fotoreceptoren beschikken die specifieke lichtsignalen kunnen waarnemen en over signaal-transductieketens waardoor deze lichtsignalen worden omgezet in biochemische reacties die leiden tot een bepaalde fysiologische respons in de plant of de aanzet zijn voor specifieke morfogenetische ontwikkelingsprocessen. Afhankelijk van de aard van de lichtprikkel en het type reactie van de plant worden een vijftal typen lichtreacties in planten onderscheiden: fototropie, fotonastie, fotoperiodiciteit, fotomorfogenese en fotosynthese (Figuur 6.1). Het uiteindelijke lichteffect op de morfogenese van de plant wordt echter meestal niet uitsluitend door één van deze vijf lichtreacties afzonderlijk bepaald maar door een combinatie van twee of meer van deze reacties. Hoewel fotomorfogenese *in senso stricto* gedefinieerd is als een morfogenetische aanpassing van de plant op een richtingsonafhankelijk en niet-periodiek lichtsignaal, die onafhankelijk is van de fotosynthese, wordt de term fotomorfogenese vaak in bredere zin gebruikt. In het laatste geval worden ook fototropische en fotoperiodische ontwikkelingsreacties tot de fotomorfogenese gerekend. In bredere zin omvat fotomorfogenese alle door licht gestuurde ontwikkelingsprocessen in de plant die niet primair veroorzaakt worden door verschillen in

fotosynthesesnelheid. Aangezien fotomorfo-genetische reacties van planten tot uiting komen in veranderingen in de relatieve groeisnelheden of ontwikkelingen van bepaalde organen van een plant, zijn zij voor hun realisatie direct of indirect toch afhankelijk van de energie en assimilaten geproduceerd via de fotosynthese. Daarnaast bestaan er ook talrijke interacties met andere omgevingsfactoren zoals temperatuur en nutriëntenbeschikbaarheid. Experimenten in klimaatkamers onder geconditioneerde opkweekcondities zijn noodzakelijk om de afzonderlijke bijdrage van een bepaalde verandering van het licht te kunnen bestuderen en om inzicht te krijgen in het belang van de betreffende lichtreacties voor het functioneren van planten in het veld of in de kas. Een goed begrip van de fotomorfo-genese is van belang voor een juiste teelt van planten in kassen en fytotrons waarin een groot deel van de klimaatcondities kan worden geregeld. Tevens maakt deze kennis het mogelijk om de ontwikkeling van planten met behulp van veranderingen in het lichtklimaat in een gewenste richting te beïnvloeden. Voor een dergelijke gerichte beïnvloeding van de morfo-genese door licht wordt de term *stuurlicht* gebruikt.

6.2 Het licht toegelicht

6.2.1 Definities en eenheden

Licht is gedefinieerd als dat deel van het elektromagnetisch spectrum dat door het menselijk oog kan worden waargenomen. Licht heeft een tweevoudig karakter. Het kan worden gekarakteriseerd aan de hand van de golflengte van de golfbeweging waarmee het zich voortbeweegt, maar ook worden beschreven als een verzameling deeltjes. Deze lichtdeeltjes worden fotonen genoemd en ieder foton bestaat uit een bepaalde hoeveelheid energie (quantum). De energie-inhoud is afhankelijk van de golflengte en is hoger naarmate de golflengte korter is. Een 400 nm foton bevat 1,75 maal zoveel energie als een 700 nm foton. De absorptie van een foton is de drijvende kracht voor fotochemische processen, zoals de fotosynthese. Hierbij geldt dat het aantal fotonen telt en niet hun energie-inhoud. De absorptie van een 400 nm foton leidt dan ook in principe tot dezelfde fotosynthesesnelheid als die van een 700 nm foton dat slecht 57% van de energie-inhoud van een 400 nm bevat. Om deze reden kunnen lichthoeveelheden met betrekking tot fotochemische processen het best worden uitgedrukt als het aantal fotonen dat een plant per tijdseenheid bereikt ($\mu\text{mol fotonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of door de plant wordt geabsorbeerd en niet als de hoeveelheid energie (W m^{-2}). Voor het menselijk oog is straling met golflengten van ongeveer 400 tot 740 nm zichtbaar. Zowel het menselijk oog als de luxmeter vertonen een maximale gevoeligheid voor licht met een golflengte rond de 550 nm en zijn veel minder gevoelig voor licht met een kortere of een langere golflengte. Vanwege het grote verschil in lichtwaarneming tussen planten enerzijds en het menselijk oog en de luxmeter anderzijds, is de luxmeter niet geschikt voor het meten van de hoeveelheid fotosynthetisch actieve staling die een lichtbron geeft. Lichtbronnen met sterk afwijkende spectra kunnen bij eenzelfde hoeveelheid lux

een groot verschil te zien geven in het aantal fotonen. Zo bevat zonlicht bij een lichtintensiteit van 1000 lux 18 μmol fotonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, terwijl dezelfde hoeveelheid lux afkomstig van een hogedruk natriumlamp slechts 12 μmol fotonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bevat. Verschillende fotoreceptoren in het oog maken het ons mogelijk de relatieve bijdragen van de verschillende golflengten in het gebied van 400 tot 740 nm als kleuren te onderscheiden. Grofweg worden de golflengtegebieden van 400 tot 500 nm waargenomen als blauw, 500 tot 600 nm als groen en 600 tot 700 nm als rood. Uit allerlei experimenten is gebleken dat planten reageren op veranderingen in de spectrale samenstelling (lichtkleur of lichtkwaliteit) van het licht en dat zij met betrekking tot hun fotomorfogenese gevoelig zijn voor golflengten vanaf ca. 300 (ultraviolet) tot ca. 750 nm (verrood).

6.2.2 Het natuurlijk lichtklimaat: de evolutionaire achtergrond van de fotomorfogenese

In hun natuurlijke omgeving kunnen planten aan de volgende veranderingen in lichtklimaat worden blootgesteld:

- lichtintensiteit (=lichtkwantiteit)
- daglengte (=fotoperiode)
- richting van het licht
- verandering van spectrale samenstelling (=lichtkwaliteit).

Veranderingen in lichtintensiteit en richting van het licht treden dagelijks op van zonsopgang tot zonsondergang. Daarnaast kan de intensiteit afnemen als gevolg van beschaduwing. Afhankelijk van het feit of bij beschaduwing naast een verandering in lichtkwantiteit ook een verandering van lichtkwaliteit optreedt wordt beschaduwing aangeduid als neutrale schaduw (geen verandering in lichtkwaliteit, bijvoorbeeld als gevolg van een muur of een kaspant) of vegetatieschaduw (verandering in lichtkwaliteit als gevolg van absorptie van bepaalde golflengten door naburige bladeren).

Natuurlijke veranderingen in lichtkwaliteit zijn waarneembaar tijdens de zonsopgang en -ondergang. Wanneer het invallende zonlicht een hoek $< 10^\circ$ met het aardoppervlak maakt, treedt er een duidelijke toename in de relatieve hoeveelheid blauw licht en verrood licht op (Hughes et al., 1984). Licht dat door een bovenliggende bladlaag is gefilterd of door naburige planten is gereflecteerd bevat door de absorptie van licht met golflengten tussen 400 en 700 nm relatief meer verrood licht (Smith, 1982). Blauw licht en de rood/verrood verhouding van het licht zijn beide belangrijke lichtfactoren die de morfogenese van planten kunnen beïnvloeden. Gedurende de evolutie hebben planten een aantal ontwikkelingsprocessen of fysiologische reacties afgestemd op specifieke veranderingen in lichtkwaliteit die zich in hun habitat kunnen voordoen (zie 6.3).

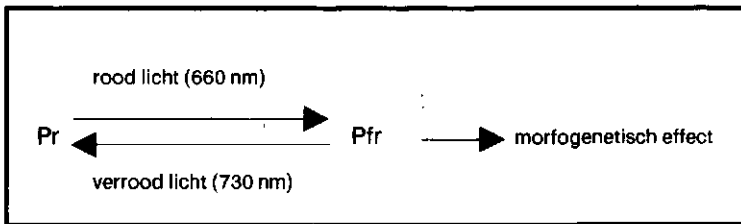
De veranderingen in daglengte op een bepaalde breedtegraad zijn van jaar tot jaar veel constanter dan die in temperatuur of lichtintensiteit. Door het meten van de daglengten kunnen de planten zeer precies vaststellen welke periode van het jaar het is en kunnen zij hun ontwikkeling hierop afstemmen. Veel ontwikkelingsprocessen van planten, zoals het uitlopen van knoppen of het gaan bloeien worden dan ook in sterke mate gereguleerd door de daglengte. In het laatste geval leidt dit tot

een synchronisatie van de bloei van de verschillende individuen van een populatie, waardoor kruisbestuiving mogelijk wordt.

6.3 Reacties van planten op veranderingen in het lichtklimaat

De geografische positie alsmede de biotoop waaraan een plantesoort zich in de loop van de evolutie heeft aangepast, is in hoge mate bepalend voor de reacties van een plant op veranderingen in één of meerdere van bovengenoemde lichtfactoren.

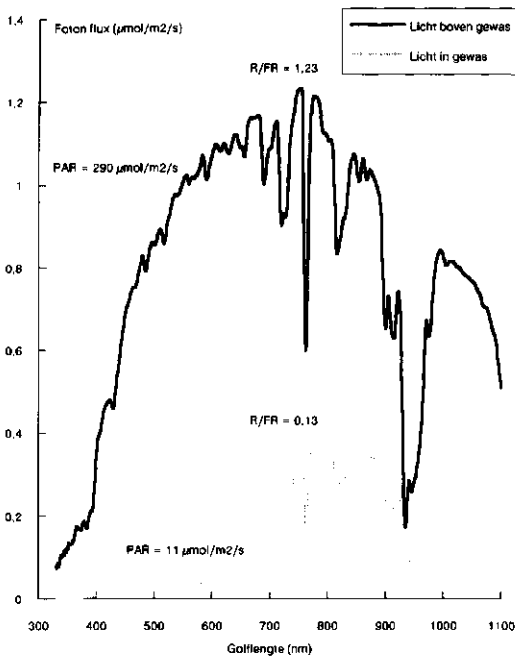
Op grond van talrijke experimenten met verschillende lichtkleuren, vele plantesoorten en aan zeer diverse fysiologische processen wordt verondersteld dat planten tenminste drie fotoreceptoren bezitten die betrokken zijn bij het waarnemen van veranderingen in daglengte en lichtkwaliteit en die derhalve betrokken zijn bij de fotomorfogenese: de UV-B-receptor, de UV-A/blauw-licht-receptor of cryptochroom, en fytochroom. Hiervan is tot dusver alleen fytochroom met zekerheid uit planten geïsoleerd en biochemisch en moleculair gekarakteriseerd.



Figuur 6.2. Vereenvoudigd model voor fytochroom-gestuurde rood en verrood licht-reversibele morfogenetische reacties in planten.

Fytochroom is een bichromatisch pigment. Het komt in de plant in twee verschillende vormen voor. De ene vorm, genaamd Pr (= Phytochrome red), absorbeert rood licht en wordt hierdoor in de andere vorm omgezet die verrood licht absorbeert en wordt aangeduid als Pfr (= Phytochrome far-red). Pfr wordt op zijn beurt door verrood licht weer omgezet in Pr (Figuur 6.2). Omdat de absorptiespectra van Pr en Pfr elkaar gedeeltelijk overlappen komt fytochroom nooit voor 100% in één van beide vormen voor. Puur rood licht leidt tot een omzetting van maximaal ongeveer 86% van al het fytochroom in Pfr, terwijl puur verrood licht leidt tot een minimum gehalte aan Pfr van ongeveer 14% (Vierstra & Quail, 1986). Omdat rood licht in de meeste gevallen de morfogenetische reactie in de plant teweegbrengt ten opzichte van onbelichte planten of met verrood belichte planten (bijvoorbeeld zaadkieming en chlorofylsynthese), wordt Pfr als de actieve vorm van fytochroom beschouwd. Met andere woorden, fytochroom wordt geactiveerd door rood licht en geïnactiveerd door verrood licht. Door de overlappende absorptiespectra is fytochroom in staat de verhouding tussen de hoeveelheden rood en verrood in het licht te meten.

Deze verhouding wordt aangeduid als R/FR en bij iedere R/FR behoort een bepaalde verhouding Pfr/Pr, het fytochroomevenwicht. Meestal wordt het fytochroomevenwicht aangegeven als de fractie die Pfr van het totale gehalte aan fytochroom (Pfr+Pr) uitmaakt (Pfr/Ptotaal). De grootste veranderingen in fytochroomevenwicht worden veroorzaakt door veranderingen in R/FR van 0 tot 1,2. (Smith, 1982). Dit zijn R/FR waarden die in natuurlijke lichtmilieus kunnen worden gemeten, waarbij licht dat door een dicht bladerdek gefilterd is een R/FR dicht bij 0 zal hebben en 1,2 de R/FR van ongefilterd zonlicht is. Zonlicht dat in een kas 70 cm diep een rozengekas is binnengedrongen is niet alleen een factor 25 in intensiteit afgenomen, maar is door de selectieve absorptie van golflengten tussen de 400 en 700 nm relatief ook sterk verrijkt in verrood licht, zoals blijkt uit de afname van de R/FR van 1,23 naar 0,13 (Figuur 6.3).

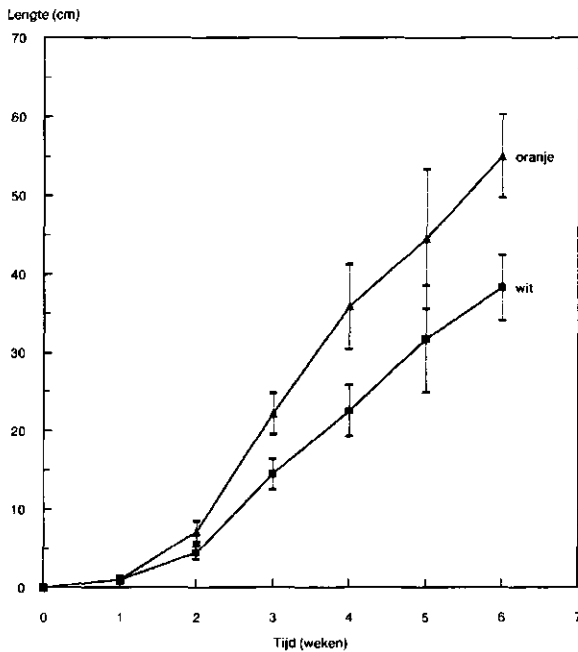


Figuur 6.3. Fotosynthetisch actieve straling (PAR, 400-700 nm) en rood/verrood-verhouding (R/FR, (655-665 nm)/(725-735 nm)) van het licht in een kas boven en in een rozengekas (2 september 1991, 14.00 uur).

Moleculair-biologisch onderzoek heeft aangetoond dat er tenminste drie typen fytochroom in planten voorkomen. Deze typen zijn allemaal verschillende genproducten. De twee meest bekende vormen zijn het lichtlabiele of type I fytochroom en het lichtstabiele of type II fytochroom. Type I komt voornamelijk en in relatief hoge gehalten voor in geëtiolerde planten en neemt snel in hoeveelheid af wanneer de plant wordt belicht. Type II is vrijwel afwezig in geëtiolerde planten en neemt juist sterk in hoeveelheid toe wanneer de plant wordt belicht. Beide typen fytochroom vertonen de rood en verrood reversibele omzetting van de Pr-vorm naar de Pfr-vorm. De betekenis voor de fotomorfogenese van de plant die aan type I en type II wordt toegekend wordt besproken in 6.4.2.

Proeven in klimaatkamers, waarin lichtintensiteit en lichtkwaliteit onafhankelijk van

elkaar konden worden gevarieerd toonden aan dat bij eenzelfde lichtintensiteit een afname in de rood/verrood ratio van het licht de karakteristieke schaduwrijdende groeireactie veroorzaakt in planten die elkaar om licht beconcurreren. Lichtkwaliteitsmetingen in het veld of in de kas laten een duidelijke afname in de R/FR van het licht zien van de top van het gewas naar de grond. Als gevolg van het feit dat bladeren relatief ook meer verrood licht reflecteren dan rood licht, kunnen planten ook waarnemen dat er andere planten in hun buurt groeien en kunnen zij hun ontwikkeling hieraan aanpassen (Smith et al., 1990). Het voordeel van de schaduwrijdende groeireactie is overduidelijk: de beschaduwde plant gaat meer van haar energie en assimilaten investeren in stengelgroei ten koste van de groei van wortels en bladeren om hierdoor zo snel mogelijk boven haar lichtconcurrenten uit te groeien. Vervolgens gaat de plant dan weer grotere bladeren vormen om zo veel mogelijk fotosynthetische actieve straling te kunnen absorberen en haar groeivoorzprong te behouden. Deze strategie is vergelijkbaar met die van kiemplanten in het donker. Een schaduwrijdende groeireactie is natuurlijk alleen zinvol voor planten van dezelfde soort of ongeveer even grote planten en komt dan bijvoorbeeld ook veel minder sterk tot uiting in planten die zich hebben aangepast aan het groeien in de schaduw van andere planten, zoals plantesoorten die de onderlaag in een bos vormen (Smith, 1982). Één van de duidelijkste voorbeelden van toepassing van deze fotomorfogenetische respons is die in de bosbouw, waar door het dicht opeen planten van bomen wordt voorkomen dat deze gaan vertakken en waardoor lange rechte boomstammen ontstaan.



Figuur 6.4. Lengtegroei van de bovenste zijscheut van een rozeplant (cultivar Mercedes) vanaf het moment van terugsnoei van de primaire scheut (zie Figuur 6.5) in oranje en wit licht. De hoeveelheid fotosynthetisch actieve straling en de rood/verrood-verhouding waren hetzelfde in beide lichtkleuren ($PAR = 130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $R/FR=9$).

Veel planten hebben een absolute behoefte aan blauw licht. In afwezigheid van deze golflengten ontstaan veelal langere planten als gevolg van een toename in de strekking van de internodia (Figuur 6.4). Het groeipatroon in blauw warm licht lijkt sterk op dat in licht met een lage R/FR. Omdat de blauwlichtrespons echter ook optreedt bij zeer hoge R/FR is het niet waarschijnlijk dat fytochroom de voor deze groeireactie verantwoordelijke fotoreceptor is. Licht zonder of met zeer weinig blauwe golflengten is onnatuurlijk en deze situatie doet zich alleen voor bij het gebruik van bepaalde lamptypen (bijvoorbeeld natriumlampen) in klimaatkamers of in kassen bij bijbelichting met deze lampen gedurende de donkerperiode. Vanwege de hoge efficiëntie waarmee een hogedruk-natriumlamp electriciteit in fotosynthetisch actieve straling omzet (ca. 30%), is deze lamp verreweg de meest gebruikte lamp voor bijbelichting. Het afwijkende spectrum ten opzichte van zonlicht (weinig blauwe golflengten) kan vooral in afwezigheid van voldoende daglicht leiden tot een verandering in de morfogenese van de planten. Blauw licht is met name voor jonge kiemplanten van belang, omdat het blauwe licht het signaal is voor de fototropisch reactie waarmee ze hun kiembladeren loodrecht op de richting van het invallende licht kunnen oriënteren en hun geringe bladoppervlak zo efficiënt mogelijk kunnen gebruiken voor fotosynthese. Bij sla leidt geen of te weinig blauw licht tot kiemplanten met zeer lange hypocotylen en bladstelen en smalle bladeren (Vince-Prue & Canham, 1983). Huidmondjes van planten zijn ook zeer gevoelig voor de hoeveelheid blauw licht die de plant ontvangt. Blauw licht stimuleert hun opening en men vermoedt dat de "puls" blauw licht in het zonlicht die aan het begin van iedere dag optreedt door de plant als signaal voor de naderende lichtperiode wordt gebruikt. De plant heeft hierdoor op het moment dat er voldoende licht voor de fotosynthese is haar huidmondjes al geopend en kan hierdoor direct beginnen met de opname van CO₂. Bij sommige soorten, zoals *Paphiopedilum* (Zeiger et al., 1985), kan door verhoging van de relatieve hoeveelheid blauw licht de huidmondjesopening worden gestimuleerd en kan de plant hierdoor bij dezelfde lichtintensiteit meer CO₂ opnemen en sneller groeien.

De laatste jaren wordt er vanwege de dreigende toename van de hoeveelheid UV-B straling als gevolg van de aantasting van de ozonlaag veel onderzoek verricht naar de eventuele effecten van UV-B op de groei van planten. Kleinere, dikkere bladeren en een toename aan flavonoïden zijn tot dusver de algemene effecten die bij diverse plantesoorten zijn waargenomen (Tevini et al., 1989). In vergelijking met de rol die blauw licht en de R/FR van het licht spelen in de morfogenese van planten is de kennis omtrent UV-B-specifieke ontwikkelingsprocessen in planten nog zeer beperkt. Hoewel door middel van lage, goed gedoseerde UV-B bestraling van planten wellicht compactere en qua kleur (meer flavonoiden) kwalitatief betere planten kunnen worden gekweekt, zijn er nog te weinig experimentele gegevens beschikbaar om UV-B in dit hoofdstuk als stuurlichtfactor te behandelen.

6.4 Fotomorfogenese-onderzoek: richtingen en ontwikkelingen

6.4.1 Fundamenteel onderzoek

Hoe planten een lichtsignaal na absorptie door één of meer fotoreceptoren omzetten in biochemische reacties die leiden tot een verandering in hun morfogenese (signaal-transductie) is een onderzoeksgebied waarin de laatste jaren veel vooruitgang is geboekt. Deze onderzoekslijn vertoont een grote mate van analogie met die van de werking van plantegroei-regulatoren. Dit is een logisch gevolg van het feit dat veel morfogenetische effecten die door licht worden beïnvloed ook door groeiregulatoren teweeggebracht kunnen worden.

De veroudering van bladeren van tomaat en komkommer kan zowel worden geremd door kinetine als door rood licht (Tucker, 1981). Ook de sterke bladvergeling die optreedt tijdens het vaasleven van sommige cultivars van *alstroemeria* kan worden geremd door zowel rood licht als de toediening van een plantegroei-regulator zoals gibberelline (Hibma, 1988, Elzenga & Van Doorn, 1990). In hoeverre de signaal-transductieketen van de rood-licht respons en de plantegroei-regulator respons overlappen is nog niet opgehelderd. Calcium als zogenaamde "second messenger" tussen de perceptie van het licht of de groeiregulator door een specifieke receptor en het aanschakelen van allerlei biochemische processen is een belangrijk onderwerp van studie in beide onderzoeksgebieden.

Verder heeft de introductie van moleculair-biologische technieken het mogelijk gemaakt om aan te tonen dat de expressie van bepaalde genen specifiek door licht wordt gereguleerd. Van diverse plantesoorten zijn mutanten geïsoleerd met een afwijkende fotomorfogenese. Deze mutanten vormen te zamen met moleculair-biologische technieken een belangrijke bijdrage aan het ophelderen van de signaal-transductieketen vanaf de perceptie van het licht door een bepaald fotoreceptor-pigment tot het aan- of uitschakelen van genen die betrokken zijn bij het tot stand komen van een fotomorfogenetische reactie in een plant. In het laboratorium voor Plantenfysiologisch Onderzoek van de Landbouwniversiteit in Wageningen wordt in de onderzoeksgroep van R.E. Kendrick gebruik gemaakt van specifieke fotoreceptormutanten van tomaat en komkommer. De fotomorfogenetische reacties van deze mutanten geven duidelijk aan welke fotoreceptorpigmenten betrokken zijn bij een bepaalde fotomorfogenetische reactie. Dit onderzoek heeft onder andere aangetoond dat het zeer waarschijnlijk is dat de schaduwmijdende reactie van veel planten als reactie op een afname van de R/FR van het licht wordt gereguleerd door het stabiele of type II fytochroom. Dit is afgeleid uit experimenten met mutanten van komkommer (López-Juez et al., 1990) en tomaat (Kerkhoffs & Kendrick, persoonlijke mededeling) die respectievelijk geen aantoonbare hoeveelheid lichtstabiel en lichtlabiel fytochroom bezitten en waarvan de plantlengte respectievelijk niet en wel door de R/FR van het licht kon worden beïnvloed.

6.4.2. Praktijkgericht onderzoek

Een groot deel van het fotomorfogenese-onderzoek in Nederland is vanwege de belangrijke rol van licht in de produktie van tuinbouw-, bloemisterij- en bolbloemgewassen in meer of mindere mate praktijkgericht. In het praktijkgerichte onderzoek ligt het zwaartepunt voornamelijk op de mogelijkheden om met licht een produktieverhoging en kwaliteitsverbetering op gehele plantniveau te realiseren, terwijl in het fundamenteel onderzoek de nadruk ligt op de moleculaire, biochemische en fysiologische processen die door het lichtsignaal worden beïnvloed en het ophelderen van de mechanismen waardoor deze leiden tot een verandering in de ontwikkeling van een plant.

Voor het begrijpen en verklaren van groeireacties van planten als gevolg van bepaalde veranderingen in de belichting en het bewust manipuleren van de lichtcondities om de ontwikkelingen van een plant te sturen, is echter de kennis opgedaan in het fundamentele onderzoek onontbeerlijk. Helaas wordt veel van het fundamenteel fotomorfogenetisch onderzoek verricht aan kiemplantjes die slechts aan korte lichtpulsen worden blootgesteld en waarbij vooral naar snelle effecten als remming van hypocotylstrekking en de synthese van chlorofyl en anthocyanen wordt gekeken. Hierdoor is het vaak niet goed mogelijk de gevonden effecten te extrapoleren naar lange termijneffecten in verder ontwikkelde planten. Het aantal fundamenteel georiënteerde fotomorfogenese experimenten met volgroeide planten is relatief gering. Deze laatste experimenten zijn met name voor de praktijkteelt van allerlei kasgewassen die 's winters worden bijbelicht zeer waardevol.

Verandering van lichtkwaliteit en verlenging van de daglichtperiode kunnen namelijk grote gevolgen hebben voor een aantal belangrijke kwaliteitskenmerken van planten zoals de vorm en de kleur van de bloem en het blad.

Het toenemend gebruik van assimilatiebelichting in de glastuinbouw heeft de afgelopen jaren geleid tot een verhoogde belangstelling voor de rol van licht bij de groei en ontwikkeling van planten. Aangezien de gebruikte lichtbronnen voor bijbelichting vrijwel altijd een sterk afwijkend lightspectrum hebben ten opzicht van zonlicht en er dikwijls onnatuurlijke lange belichtingsperioden worden toegepast, bestaat er vooral vanuit de tuinbouwsector grote belangstelling voor de effecten van licht op de groei van planten. Hierbij gaat het niet alleen om positieve effecten als verhoging van de produktie, maar ook om het in kaart brengen van negatieve effecten van assimilatiebelichting zoals bijvoorbeeld ongewenste groeireacties in zowel het belichte kascompartiment als in naburige compartimenten, het zogenaamde buurmanlicht (Blacquièrre, 1991). Recent onderzoek van J.A. Bakker en Tj. Blacquièrre op het proefstation voor de Bloemisterij in Aalsmeer heeft aangetoond dat lichtintensiteiten van ca. 0,4 tot 1,8 nmol m⁻² s⁻¹ (4 tot 20 lux) gedurende een deel van de donkerperiode voldoende zijn om de groei en bloemvorming bij gewassen als komkommer, chrysant en Chinese aster te beïnvloeden.

Veel bolgewassen (o.a. tulp, narcis en hyacint) kunnen bij lage lichtintensiteiten in bloei worden getrokken. De bloem en bladeren zijn al in de bol aanwezig en alle energie die voor de uitgroei van deze organen en het bloeiproces nodig is, is in de bol aanwezig. Het licht is alleen nodig voor een goede kleurontwikkeling van zowel de bladeren als de bloem. Experimenten van H. Gude op het Laboratorium voor

Bloembollenonderzoek in Lisse hebben aangetoond dat bij tulpen en hyacinten de bloemkleur en bloemkwaliteit mede afhankelijk zijn van de kwaliteit van het licht, waarbij blauw licht over het algemeen tot een betere bloemkleur leidt. Daarnaast werd ontdekt dat licht de rust van hyacintebolletjes die via de zogenaamde holbol-vermeerderingsmethode kunnen worden verkregen beïnvloedt. Licht gegeven tijdens de vorming van de jonge bolletjes stimuleert de differentiatie en pigmentvorming van de bolletjes en vermindert hun rustduur na uitplanten.

Fotoperiodische bloei-beïnvloeding en de toepassingsmogelijkheden van assimilatiebelichting vormen vanwege het steeds veranderend assortiment snijbloemen en bloeiende en groene potplanten een belangrijk onderdeel van het lichtonderzoek van de proefstations. Hierbij wordt gedurende de laatste jaren ook gekeken naar de effectiviteit van de verschillende lamptypen die op de markt verkrijgbaar zijn. Van oudsher is de gloeilamp de meest populaire lichtbron voor fotoperiodische belichting. In korte dagplanten is het tijdens korte natuurlijke daglengten mogelijk de bloemknopontwikkeling uit te stellen tot het gewenste tijdstip of de gewenste plantgrootte. Dit is mogelijk door gedurende een deel van de donkerperiode de planten te belichten. In sommige planten is een belichting van avond- tot ochtend-schemering met een lichtintensiteit van slechts $2,3 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($0,46 \text{ mW m}^{-2}$) gedurende een inductieve donkerperiode voldoende om bloei-inductie te voorkomen (Cockshull, 1984). Rood licht is voor dit effect de meest efficiënte lichtkwaliteit, maar belichting met gloeilampen is ook effectief. In tegenstelling tot het uit bloei houden van kortedag planten is het over het algemeen moeilijker om lange dag planten onder natuurlijke korte daglengten in bloei te krijgen door de dag met kunstlicht te verlengen. Hiervoor zijn in het algemeen hogere lichtintensiteiten nodig, waardoor het economisch minder snel haalbaar wordt. Voor een aantal langedag planten is aangetoond dat voor de meest optimale dagverlenging licht met zowel rode als verrode golflengten nodig is (Deitzer, 1984).

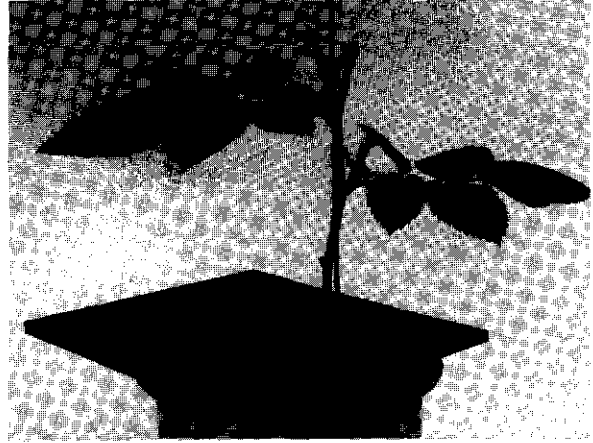
6.4.3. Lichtkwaliteitseffecten op de groei en bloei van rozen

Het fotomorfogenese-onderzoek aan rozen is op CABO-DLO deels praktisch en deels fundamenteel gericht. De afgelopen jaren is onderzocht in hoeverre zijscheutontwikkeling en de bloemknopontwikkeling in zijscheuten die uitgroeien onder lage lichtcondities te beïnvloeden zijn door lichtkwaliteit. Gezien het veronderstelde verband tussen assimilatenbeschikbaarheid en het uitgroeien van okselknoppen tot scheuten met een goed ontwikkelde bloem, vormt ook het verloop van de gehalten van de belangrijkste koolhydraten in de verschillende delen van de plant tijdens de ontwikkeling van de zijscheuten in licht van verschillende kwaliteiten een belangrijk punt van onderzoek. Hierbij wordt naast de uiteindelijke en voor de praktijk meest relevante effecten op de ontwikkeling van de plant ook veel aandacht besteed aan de fysiologische processen die tot deze veranderingen leiden en hoe deze door licht worden beïnvloed.

Rozen behoren tot de groep van dagneutrale planten. Deze planten zijn in tegenstelling tot de korte- en langedagplanten voor de inductie van bloemknoppen niet afhankelijk is van een bepaalde kritische daglengte. Iedere okselknop die uitloopt kan in principe een bloemtak opleveren, omdat in iedere scheut de initiatie van een

bloemknop plaatsvindt. De scheutlengte waarbij deze initiatie optreedt is cultivaraf-hankelijk en varieert van 1 tot 4 cm (Zieslin and Moe, 1985). Zowel het uitlopen als de bloemknopontwikkeling worden door licht gestuurd. Een lage R/FR, karakteristiek voor vegetatieschaduw (Figuur 6.3), verkleint de kans dat een okselknop onder in het gewas uitloopt en bevordert de abortie van bloemknoppen in een vroeg stadium van hun ontwikkeling. Ook lage lichtintensiteiten in de kas gedurende de winterperiode leiden tot een afname in het aantal uitlopende okselknoppen en in een toename van het aantal loze of blinde scheuten als gevolg van bloemknopabortie. Een tekort aan assimilaten in een jonge zijscheut tijdens de beginfase van de bloemknopontwikkeling wordt algemeen beschouwd als de reden voor de abortie van de bloemknop. Teeltmaatregelen die de assimilatenbeschikbaarheid in de plant verhogen, zoals een verhoging van de fotosynthesesnelheid door CO₂-bemesting en bijbelichting, verminderen het percentage loze scheuten (Cockshull, 1975; Hand & Cockshull, 1979). Ook een betere verdeling van de beschikbare assimilaten naar jonge scheuten kan bij een gelijkblijvende fotosynthese tot vermindering van bloemknopabortie leiden. Stengelstrekking en het uitlopen van okselknoppen behoren tot de meest in het oog springende lange-termijnontwikkelingsprocessen die (mede) gestuurd worden door de kwaliteit van het licht. Bij rozen wordt het uitlopen van okselknoppen gestimuleerd door licht, waarbij rood licht het meest effectief is (Mor & Halevy, 1980). Lage intensiteiten rood licht en cytokininen toegediend aan jonge rozescheuten in het beginstadium van bloemknopaanleg stimuleren het transport van suikers naar deze scheuten en verminderen de kans op abortie. Het is niet duidelijk of de verhoogde aanvoer van suikers naar deze scheuten de oorzaak van de afname in bloemknopabortie is of dat het licht en de cytokininen via een ander proces de abortie kunnen voorkomen als gevolg waarvan er meer suikers door de ontwikkelende bloemknoppen worden aangetrokken. Het stuurlichtonderzoek aan rozen op CABO-DLO wordt verricht met 6 weken oude rozepplanten met één scheut die vanuit stengelstek op voedingsoplossing worden opgekweekt onder geconditioneerde klimaatsomstandigheden in een klimaatkamer. Vanwege het ontstaan van veel loze scheuten tijdens perioden met weinig licht is gekozen voor de cultivar Mercedes. De stuurlichtexperimenten met de verschillende lichtkwaliteiten worden gestart na terugsnoui van de eerste ofwel primaire scheut op de twee meest basale volgroeide vijfbladeren. Eventuele lagere drie- of vierbladeren en het stekblad worden verwijderd. Tijdens de volgende 5 tot 6 weken mogen alleen de okselknoppen van deze beide bladeren uitgroeien (Figuur 6.5) en worden alle andere knoppen die uitlopen in een zo vroeg mogelijk stadium weggebroken. De beide zijscheuten die mogen uitgroeien worden op grond van hun stengelpositie in de rest van dit hoofdstuk aangeduid als bovenste en onderste zijscheut.

Figuur 6.5. Rozeplant (cultivar Mercedes) circa 10 dagen na snoei van de primaire scheut en bij aanvang van een belichtingsexperiment.



Tabel 6.1 Lengte en bloei van de bovenste en onderste zijscheut van een rozeplant (cultivar Mercedes) 6 weken na terug snoei van de primaire scheut (zie Figuur 6.5) en groei in verschillende lichtkwaliteiten. Amber en oranje licht (exp. I) werden verkregen door filtering van het witte licht door amber- of oranje kleurig folie, waardoor respectievelijk 85 en 100% van het licht met golflengten van 400 tot 500 nm werd verwijderd. In experiment II werd gedurende 6 weken aan het einde van iedere lichtperiode met wit licht een eind-van-de-dag-nabelichting gegeven van 20 minuten met $4,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ rood licht (600-700 nm) (wit/rood) of van 10 minuten $4,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ rood licht gevolgd door 10 minuten $14,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verrood licht (700-800) (wit/rood/verrood) of omgekeerd (wit/verrood/rood). De planten werden dagelijks 12 uur belicht ($\text{PAR}=130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De lengtes zijn de gemiddelden ($\pm\text{SD}$) van 18 (exp. I) of 12 (exp. II) planten. Lengtes gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend (Student t-toets, $p < 0,05$).

Lichtkwaliteit	Lengte zijscheut (cm)		Bloeiende scheuten (%)	
	Bovenste	Onderste	Bovenste	Onderste
Experiment I				
Wit	$38,3 \pm 4,2^a$	$35,2 \pm 6,2^a$	56	33
Amber	$48,7 \pm 3,8^b$	$44,1 \pm 8,5^b$	58	32
Oranje	$55,0 \pm 5,3^c$	$50,4 \pm 6,0^c$	65	18
Experiment II				
Wit/rood	$35,8 \pm 4,0^a$	$29,9 \pm 6,5^a$	42	18
Wit/rood/verrood	$43,1 \pm 5,8^b$	$38,6 \pm 3,9^b$	15	2
Wit/verrood/rood	$37,6 \pm 4,2^a$	$33,1 \pm 5,1^{ab}$	40	23

Tabel 6.2. Drogestofverdeling in roos (cultivar Mercedes) opgekweekt in verschillende lichtkwaliteiten met een gelijke hoeveelheid fotosynthetisch actieve straling ($130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12 uur dag^{-1}) Drooggewichten (g) werden bepaald 6 weken na het terugsnijden van de primaire scheut en zijn de gemiddelden ($\pm\text{SD}$) van drie metingen met ieder 3 (exp. I) of 4 planten (exp. II). Gemiddelden van eenzelfde plantdeel gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend (Student t-toets, $p < 0,05$).

Plantdeel	Lichtkwaliteit		
Experiment I	Wit	Amber	Oranje
Bovenste zijzscheut	$3,7 \pm 0,4^a$	$4,4 \pm 0,5^{ab}$	$4,4 \pm 0,3^b$
Onderste zijzscheut	$3,3 \pm 0,3^a$	$4,2 \pm 1,0^a$	$3,9 \pm 0,7^a$
Primair hout	$1,0 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,1^a$	$0,9 \pm 0,2^a$
Wortels	$1,6 \pm 0,2^a$	$1,7 \pm 0,3^a$	$1,8 \pm 0,1^a$
Gehele plant	$10,6 \pm 1,2^a$	$13,0 \pm 2,5^a$	$12,3 \pm 1,7^a$
Experiment II	Wit/rood	Wit/rood/verrood	Wit/rood/verrood
Bovenste zijzscheut	$2,6 \pm 0,2^a$	$3,0 \pm 0,2^a$	$2,8 \pm 0,1^a$
Onderste zijzscheut	$2,0 \pm 0,2^a$	$2,2 \pm 0,3^a$	$2,2 \pm 0,4^a$
Primair hout	$0,9 \pm 0,1^a$	$1,1 \pm 0,1^b$	$1,2 \pm 0,1^a$
Wortels	$1,2 \pm 0,1^a$	$1,3 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,1^a$
Gehele plant	$6,8 \pm 0,1^a$	$7,5 \pm 0,6^a$	$7,4 \pm 0,5^a$

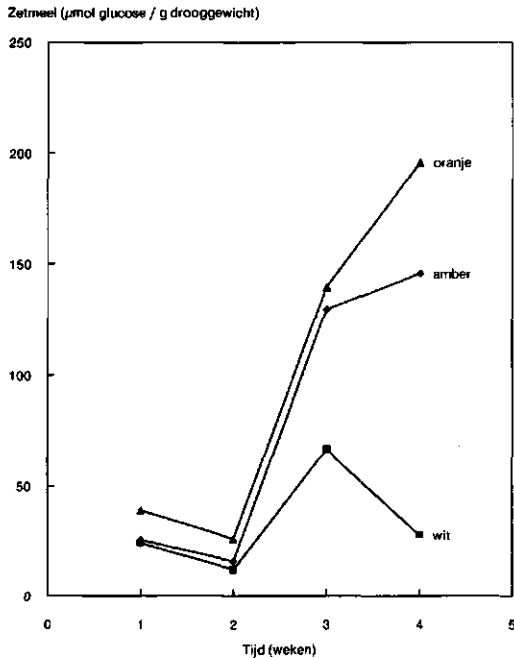
Verhoging van het relatieve aandeel rood licht door het geheel of gedeeltelijk wegfilteren van het blauwe licht uit het spectrum van witte TL-buizen heeft een zeer groot effect op de lengtegroei van zowel de bovenste als de onderste zijzscheut. Een reductie van de hoeveelheid blauw licht met 85% of met 100%, resulterend in respectievelijk amber- en oranjekeurig licht, leidde ten opzichte van de wit-licht planten tot een toename van de lengtegroei van beide zijzscheuten met ongeveer 26% (amber) en 44% (oranje) (Tabel 6.1, exp. I). Alleen voor de bovenste zijzscheut opgekweekt in oranje licht kon een significante toename in drooggewicht worden vastgesteld (Tabel 6.2, exp.I). In zowel amber als oranje licht werd een duidelijke verschuiving van de drogestofverdeling tussen blad en stengelhout van de zijzscheuten waargenomen. Blauw-arm licht leidt tot een hogere investering van drogestof in stengelhout ten koste van die in bladeren (Tabel 6.3, exp. I). De snellere groei van de zijzscheuten en de veranderde drogestofverdeling onder invloed van een afname van de blauw/rood ratio (B/R) van het licht had geen significant effect op de bloemknopontwikkeling van beide zijzscheuten (Tabel 6.1, exp.I).

Tabel 6.3. Verhouding van drogestof in bladeren en stengel van zijzscheuten van rozecultivar Mercedes opgekweekt in verschillende lichtkwaliteiten met een gelijke hoeveelheid fotosynthetisch actieve straling ($130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12 uur dag^{-1}). Overige teeltomstandigheden als beschreven in bijschrift Tabel 6.1. Drooggewichten werden bepaald vier weken na het terugsnijden van de primaire scheut en de weergegeven verhoudingen zijn de gemiddelden (\pm SD) van 3 metingen met ieder 3 (exp. I) of 4 (exp. II) planten. Gemiddelden van eenzelfde zijzscheut en experiment gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend (Student t-toets, $p < 0,05$).

Lichtkwaliteit	Bovenste zijzscheut blad/stengel	Onderste zijzscheut blad/stengel
Experiment I		
Wit	$3,5 \pm 0,3^a$	$3,8 \pm 0,2^a$
Amber	$2,4 \pm 0,4^b$	$3,2 \pm 0,3^{ab}$
Oranje	$2,4 \pm 0,2^b$	$2,6 \pm 0,2^{bc}$
Experiment II		
Wit/rood	$3,8 \pm 0,2^a$	$3,9 \pm 0,3^a$
Wit/rood/verrood	$3,1 \pm 0,1^b$	$3,3 \pm 0,3^a$
Wit/verrood/rood	$3,8 \pm 0,1^a$	$3,8 \pm 0,2^a$

In tegenstelling tot de B/R van het licht gedurende de gehele lichtperiode had verandering van de R/FR aan het einde van de lichtperiode bij rozecultivar Mercedes nauwelijks of een veel geringer effect op de stengelstrekking van de zijzscheuten, terwijl de bloemknopontwikkeling er juist zeer sterk door beïnvloed werd. Indien als laatste belichting voor het begin van de donkerperiode verrood licht wordt gegeven neemt het percentage bloeiende bovenste en onderste zijzscheuten af met respectievelijk 64% en 89% (Tabel 6.1, exp. II). Dit effect van verrood licht is omkeerbaar door direct na het verrood weer rood licht te geven voor de donkerperiode begint. Deze rood/verrood omkeerbaarheid van de bloei bij de roos geeft aan dat fytochroom de verantwoordelijke fotoreceptor is. In vervollexperimenten zal nagegaan worden in welk stadium van scheutontwikkeling de scheut gevoelig is voor de eind van de dag R/FR-verhouding van het licht.

Het is onwaarschijnlijk dat fytochroom ook de fotoreceptor is die betrokken is bij de lichtkwaliteitsafhankelijke stengelstrekking. Een eind-van-de-dag-verrood-belichting die leidt tot een grote en snelle verandering van het fytochroomevenwicht in de plant heeft namelijk een veel minder drastisch effect op de lengtegroei van rozescheuten dan een verandering in B/R bij gelijkblijvende R/FR-ratio. Het waargenomen blauwlicht-effect op de lengtegroei van rozescheuten wordt om deze redenen hoogstwaarschijnlijk gereguleerd via de fotoreceptor cryptochroom. Het is op dit moment nog onbekend in welk deel van de plant de fotoreceptoren zitten die het R/FR- en B/R-signaal waarnemen en hoe de signaal-transductieketens verlopen die uiteindelijk leiden tot de effecten op de bloemknopontwikkeling en de stengelstrekking in de roos.



Figuur 6.6. Zetmeelgehalte in de bladeren van de bovenste zijscheut van een rozeplant (cultivar Mercedes) vanaf 1 week na terugsnijden van de primaire scheut in oranje, amber of wit licht. De hoeveelheid fotosynthetisch actieve straling en rood/verrood-verhouding was in alle lichtkleuren hetzelfde ($PAR \approx 130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $R/FR=9$).

De B/R van het licht heeft naast de duidelijk waarneembare effecten op de lengtegroei van rozescheuten tevens een zeer grote invloed op de koolhydraatsamenstelling van de zijscheuten. De grootste verandering is de toename in zetmeelgehalte in de bladeren van de scheuten die ontstaat in licht waarin weinig of geen blauwe golflengten zitten. De zetmeeltoename was het grootst in de bladeren van de bovenste zijscheuten. De sterkste toename trad op tussen de tweede en derde week van de zijscheutontwikkeling. Bladeren van vier weken oude zijscheuten hadden een 7 maal hoger zetmeelgehalte in oranje dan in wit licht (Figuur 6.6). Hoewel de zetmeeltoename ten opzichte van de wit-licht-planten zeer groot is, maakt het zetmeel in de oranje-licht-planten na 4 weken toch slechts enkele procenten van het drooggewicht van de bladeren uit. Experimenten met radioactief CO_2 hebben aangetoond dat in oranje licht vooral tijdens het midden van de lichtperiode een groter percentage van het opgenomen CO_2 in zetmeel wordt ingebouwd. De opname van sucrose door bladponsjes, een maat voor de capaciteit van een blad om sucrose in de floëemvaten te laden, verschilde niet tussen bladeren opgegroeid in oranje of wit licht. Hieruit kan worden afgeleid dat de zetmeelophoping niet het gevolg is van een verminderde afvoercapaciteit van suikers in de oranje-licht-bladeren, maar dat andere biochemische processen in het blad leiden tot een verhoogde zetmeelsynthese. Een sterkere ophoping van zetmeel in bladeren van rozen werd ook waargenomen in planten die in kassen werden bijbelicht met hogedruk natrium-

lampen (overwegend oranje licht) ten opzichte van planten die bijbelicht werden met hogedruk kwikjodidelampen (blauw-wit licht). Of deze ophoping van zetmeel van invloed is op de kwaliteit van de te oogsten bloemtakken is niet bekend. Tevens zou het interessant zijn om te onderzoeken of de waargenomen verstoring van de licht-donker regulatie van de opening van de huidmondjes van rozen die optreedt bij langdurige belichting van de planten met hogedruk natriumlampen (Van Meeteren, 1990) maar niet bij belichting met hogedruk kwikjodidelampen (J.A. Bakker, PBN, persoonlijke mededeling) iets te maken zou kunnen hebben met bijvoorbeeld de ophoping van zetmeel in de sluitcellen van de huidmondjes.

6.5 Literatuur

Blacquièrè Tj. 1991

Effect buurmanschade leidt tot claims. Schade moeilijk aantoonbaar. Vakblad Bloemisterij 33: 40-41.

Cockshull K.E. 1975

Roses II: The effects of supplementary light on winter bloom production. *Journal of Horticultural Science* 50:193-206.

Cockshull K.E. 1984

The photoperiodic induction of flowering in short-day plants. In: *Light and the flowering process*. D.Vince-Prue, B. Thomas & K.E. Cockshull (eds), pp. 33-49, Academic Press, London.

Deitzer G.T. 1984

Photoperiodic induction in long-day plants. In: *Light and the flowering process*. D. Vince-Prue, B. Thomas and K.E. Cockshull (eds), pp. 51-63. Academic Press, London.

Elzenga J. Th. & W.G. van Doorn 1990

Membraantransport van assimilaten gedurende de veroudering van alstroemeribladeren. In: *Fysiologie en kwaliteit van tuinbouwproducten*. H.M. Dekhuijzen en S.C. van de Geijn (red.), CABO-DLO, Wageningen, pp. 91-100.

Hand D.W. & Cockshull K.E. 1979

The effect of CO₂ concentration on the canopy photosynthesis and winter bloom production of the glasshouse rose 'Sonia' (syn. 'Sweet Promise'). *Acta Horticulturae* 51: 243-252.

Hibma J.T. 1988

Ontwikkeling van een toets ter controle op het gebruik van voorbehandelingsmiddelen tegen bladvergeling bij Alstroemeria. Verslag 91, CABO-DLO, Wageningen.

Hughes J.E., Morgan D.C., Lambton P.A., Black C.R. & H. Smith 1984

Photoperiodic time signals during twilight. *Plant Cell Environment* 7: 269-277.

López-Juez E., Buurmeijer, W.F., heeringa, G.H., Kendrick, R.E. & J.C. Wesselius 1990

Response of light-grown wild-type and long hypocotyl mutant cucumber plants to end-of-day far-red light. *Photochemistry and Photobiology* 52: 143-149.

Mor Y. & Halevy A.H. 1980

Promotion of sink activity of developing rose shoots by light. *Plant Physiology* 66: 990-995.

Smith H. 1975

Phytochrome and photomorphogenesis. McGraw Hill Book Company Ltd, London.

Smith H. 1982

Light quality, photoperception and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 481-518.

Smith H., Casal J.J. & Jackson G.M. 1990

Reflection signals and the perception by phytochrome of the proximity of neighbouring plants. *Plant Cell Environment* 13: 73-78.

Tevini M., Teramura A.H., Kulandaivelu G., Caldwell M.M. & Björn L.O. 1989

In: Environmental effects panel report, United Nations Environment Programme, pp. 25-37.

Tucker D.J. 1981

Phytochrome regulation of leaf senescence in cucumber and tomato. *Plant Science Letters* 23: 103-108.

Van Meeteren U. 1990

Houdbaarheid sierteeltgewassen. In: *Fysiologie en kwaliteit van tuinbouwprodukten*, H.M. Dekhuijzen en S.C. van de Geijn (red.), CABO-DLO, Wageningen, pp. 53-62.

Vierstra R.D. & Quail P.H. 1986

Phytochrome. The protein. In: *Photomorphogenesis in plants*. R.E. Kendrick and G.H.M. Kronenberg (eds), pp. 35-60. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht.

Vince-Prue D. & Canham A.E. 1983

Horticultural Significance of Photomorphogenesis. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, Vol. 16B. Photomorphogenesis. W. Shropshire and H. Mohr (eds), pp. 518-544. Springer-Verlag, Berlin. ISBN 3-540-12143-9.

Zeiger E., Grivet C., Assmann S.M., Deitzer G.F. & Hannegan M.W. 1985

Stomatal limitation to carbon gain in *Paphiopedilum* spp. and its reversal by blue light. *Plant Physiology* 77: 456-460.

Zieslin N. & Moe R. 1985

Rosa. In: *Handbook of flowering*. A.H. Halevy (ed.), Vol IV, pp. 214-225. CRC Press, Boca Raton.

7 Het groeistofonderzoek in vogelvlucht, 1960-1990

H.M.Dekhuijzen

DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO), Wageningen

Samenvatting

Op grond van concepties uit heden en verleden wordt geschetst welke visies er de afgelopen decennia zijn geweest over het werkingsmechanisme van plantegroei-stoffen. In vogelvlucht worden onder andere besproken: de enzym-hormoon-theorie, de hormoon-gen-theorie, de signaaltransductieketen en de hormoonbalans-theorie. Het overzicht wordt geïllustreerd met resultaten van eigen werk uit de afgelopen 30 jaar.

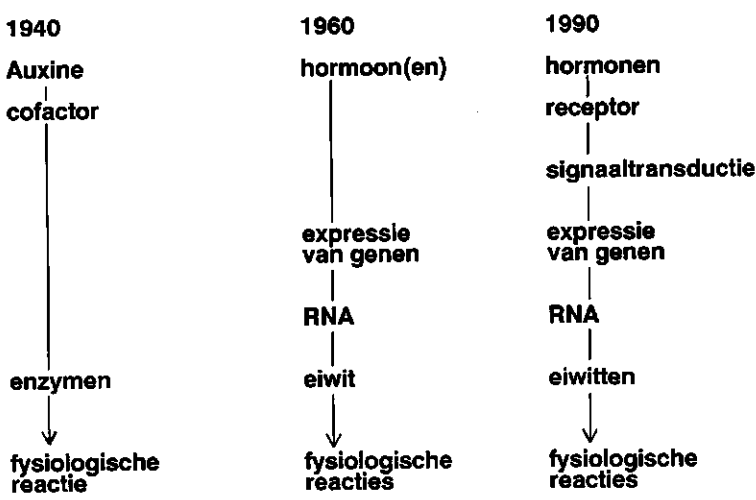
7.1 Inleiding

In een terugblik op 30 jaren groeistofonderzoek wil ik globaal ingaan op een aantal veranderingen in de inzichten over het werkingsmechanisme van hormonen. Ik heb gekozen voor het thema groeistofonderzoek omdat ik in de loop van de jaren op verschillende instituten daaraan gewerkt heb. Daarbij versta ik onder groeistoffen of plantenregulatoren al die stoffen die groeistofeigenschappen hebben en die al of niet van nature in de plant voorkomen. Hormonen zijn groeistoffen die van nature in planten voorkomen en vanaf de plaats van synthese getransporteerd worden naar andere delen van de plant waar ze fysiologisch werkzaam zijn.

7.2 Het werkingsmechanisme van hormonen

Er zijn vele pogingen gedaan om een duidelijk model te bouwen uit een paar stukjes van een grote legpuzzel. Men heeft lang getracht om de werking van hormonen, stoffen met een zeer verschillende chemische structuur en met zeer verschillende eigenschappen, vanuit één grondprincipe te verklaren. Het zeer fundamentele probleem van de specificiteit van de hormoonwerking is in feite nog steeds ver van een oplossing verwijderd. De verklaringen die men gegeven heeft hebben daarbij steeds in het licht gestaan van nieuwe ontwikkelingen die in hun tijd sterk de aandacht trokken. Zo werd in 1941 door Green de hormoon-enzym-theorie

opgesteld. Hormonen waren zelf enzymen of ze fungeerden als onderdelen van enzymen (co-enzymen). Deze theorie is al lang verlaten, maar sloeg in die tijd geweldig aan. We moeten deze theorie dan ook op de juiste waarde schatten en plaatsen in de eigen tijd, namelijk die waarin de enzymologie zeer sterk in de belangstelling stond (Stegwee, 1967). Precies 20 jaar later werd een nieuwe theorie gelanceerd die sterk de aandacht trok. In 1961 werd door Zalokar de hormoon-gen-hypothese geformuleerd. Hormonen zouden de aard en de hoeveelheid van het gevormde RNA bepalen. Het is nu niet zo verwonderlijk dat deze theorie gelanceerd werd in een periode waarin nieuwe inzichten verworven waren over de achtergrond van de relatie tussen genen en de eiwitsynthese. De hormoon-afhankelijke genexpressie kent nog vele aanhangers, maar daarnaast heeft er een uitbreiding van de theorie plaatsgevonden (Figuur 7.1). Het hormoon wordt niet aan een gen gebonden, maar aan een receptor, een eiwitcomponent die meestal aan een membraan gebonden is. Hierdoor verandert de structuur van dit eiwit, en daarmee de eigenschappen van het membraan, en dat leidt tot een cascade van reacties, de signaaltransductieketen, wat uiteindelijk tot gevolg heeft dat genen tot expressie komen (Figuur 7.1). Voor de morfogenetische verandering in een plant heb je dus niet alleen een hoeveelheid van een bepaald hormoon nodig, maar ook een receptor. In de laatste jaren zijn een hele serie membraan- en niet-membraangebonden eiwitten geïsoleerd die hormonen kunnen binden. Of dit nu werkelijk receptoren zijn is nog zeer de vraag, want dan moet eerst bewezen worden dat deze binding uiteindelijk tot gevolg heeft dat er een fysiologische reactie optreedt, bijvoorbeeld celstrekking onder invloed van auxine, waarbij auxine eerst aan een eiwit wordt gebonden (Jones, 1990).



Figuur 7.1. Verschillende opvattingen over het werkingsmechanisme van hormonen. Zie Stegwee (1967), Guern (1987) en Jones (1990).

In de huidige periode meent men dat plantehormonen slechts een deel uitmaken van een arsenaal van chemische signalen binnen de plant die gebruikt worden voor de ontwikkeling van de plant (Guern, 1987). De hormonen zijn een groep van stoffen geworden die een onderdeel vormen van signaaltransductieketens die uiteindelijk leiden tot morfogenetische reacties. Hormonen zijn dan niet meer exclusief verantwoordelijk voor het bepalen van de morfogenese van de plant. Dat is één van de veranderingen in de inzichten over het werkingsmechanisme van hormonen. Deze gedachtengangen zijn sterk beïnvloed door de ontwikkelingen in de kennis van het werkingsmechanisme van dierlijke steroïdhormonen.

Tabel 7.1. Enige voorbeelden van hormonale regulatie van de expressie van genen die betrokken zijn bij de vorming van een eiwit. Weefsel-specifieke genexpressie is vet gedrukt. (Bron: 14de IPGSA-Congres, juli 1991, Amsterdam)

Hormoon	Eiwit/enzym	Processen	Soort/orgaan	Auteurs
IAA	glyoxylase	celdeling	sojabooncel-cultuur	Paulus & Jacobsen
Cytokinenen	nitraatreductase	NO ₃ ⁻ -reductie	gerstblad	Chen et al.
Ethyleen	cellulase	abscissie	perzikblad	Bonghi et al.
Ethyleen	galacturonase	afrijping	tomaat	Deikman
GA	α-amylase	zaadkieming	aleuronlaag gerst	Jacobsen
GA	chalcon-synthase	bloemkleur-vorming	bloembladeren petunia	Weiss et al.
ABA	eiwit Em	zaadvorming afrijping	tarwe-embryo	Quatrano

7.3 Hormonale regulatie van de genexpressie

Er zijn zeker overeenkomsten tussen de eigenschappen van dierlijke en plantaardige cellen, maar er zijn ook duidelijke verschillen. Een plantecel is totipotent; uit één cel kan een hele plant tot ontwikkeling gebracht worden. De ontwikkeling kan gestuurd worden in de richting van wortelvorming of van scheutvorming. Uit dierlijke cellen kunnen geen nieuwe organismen ontstaan, en daarin onderscheidt een dierlijke cel zich zeer sterk van een plantaardige cel. Bij dierlijke cellen komt vaak voor dat cellen weefsel-specifieke stoffen maken. Dit verschijnsel komt bij plantecellen veel minder voor. In Tabel 7.1 zijn enkele voorbeelden gegeven van hormonale

regulatie van genexpressie. Onder invloed van een hormoon wordt een gen geïnduceerd tot de vorming van een eiwit, maar met uitzondering van de aleuronlaag bij gerst is er vrijwel geen systeem bekend waarbij de vorming van het eiwit weefsel-specifiek is. Gibberelline (GA) induceert de vorming van alfa- amylase in de aleuronlaag en dit enzym breekt bij de kieming van de gerstkorrel het opgeslagen zetmeel af.

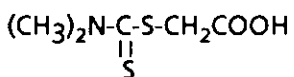
De hormonale regulering van weefsel-specifieke genexpressie is nu onderwerp van intensief onderzoek waarbij men genen isoleert en er stukken uitknipt om na te gaan welke basevolgorde nodig is om de genexpressie tot stand te brengen. In veel gevallen vindt men wel genexpressie, maar kent men de functie van het genproduct niet. Zeker is dat hormonaal gereguleerde genexpressie en de daaraan voorafgaande signaaltransductie in de komende jaren "hot topics" zullen zijn.

Naast deze nieuwe ontwikkelingen is er op methodisch gebied ook zeer veel veranderd. In 1960 was het gebruik van papierchromatografie voor het scheiden van stoffen nog zeer modern . Vandaag de dag heb je minstens HPLC nodig en nog beter is het gebruik van GC-MS of LC-MS voor de analyse van hormonen.

Iedereen die aan groeistofonderzoek gewerkt heeft , heeft met deze ontwikkelingen te maken gehad en ik wil U aangegeven waar dat voor mij gold.

7.4 Carboxymethyldimethyldithiocarbamaat

Tijdens de studie in Utrecht werd er natuurlijk aandacht besteed aan groeistofonderzoek, maar het eigenlijke werk begon toen ik voor het Organisch Chemisch Instituut TNO in Utrecht ging werken. Daarbij werd ik gedetacheerd in Wageningen bij de Werkgroep voor inwendige therapie bij planten. Dat verdient een korte toelichting. In de jaren vijftig probeerde men in verschillende groepen in de wereld om systemische fungiciden te ontwikkelen. Systemische insecticiden en systemische nematiciden waren reeds bekend. Systemische fungiciden, die door de plant konden worden opgenomen en daarna de plant konden beschermen tegen schimmelaantastingen, waren er nog niet. Het zou tot 1968 duren voordat de eerste publikaties over het benomyl in Amerika zouden verschijnen. In 1951 werd onder leiding van Professor Oort, de toenmalige hoogleraar in de fytopathologie in Wageningen en Professor van der Kerk, directeur van het Organisch Chemisch Instituut TNO, in Utrecht de werkgroep voor inwendige therapie bij planten opgericht. In 1955 verschijnt dan de volgende publikatie: *Van der Kerk, G.J.M., M.H. van Raalte, A. Kaars Sijpesteijn & R. van der Veen. 1955. A new type of plant growth-regulating substances. Nature 176, 308-310.* Van Raalte werd korte tijd later directeur van het Centrum voor Plantenfysiologisch Onderzoek (CPO) en later hoogleraar in de plantenfysiologie in Groningen. Mw. Kaars Sijpesteijn werd hoofd van de afdeling Biochemie bij het OCI in Utrecht en van der Veen werd enige jaren later hoogleraar in de plantenfysiologie in Utrecht. De resultaten van hun onderzoek werden in Nature gepubliceerd en daar was alle reden toe, want ze hadden iets bijzonders gevonden:



(carboxymethyldimethyldithiocarbamaat)

waarbij het dimethyldithiocarbamaat-gedeelte van het molecuul fungitoxische eigenschappen heeft. De verbinding is nauw verwant aan stoffen zoals het thiram of TMTD. Vroeger waren deze stoffen bekend als schimmelbestrijdingsmiddelen, tegenwoordig zijn het gewasbeschermingsmiddelen. Welnu, G33, zoals de code-naam luidde, had helemaal geen fungitoxische eigenschappen *in vitro*, maar kon na opname door de wortels van komkommerplanten wel deze planten een paar dagen beschermen tegen aantasting door *Cladosporium cucumerinum*. Het leverde een vertraging van het ziekteverloop op. De tweede eigenschap was dat de verbinding groeistofeigenschappen had, weliswaar niet bij komkommerplanten, maar wel bij tomatenplanten waar deze verbinding epinastie van de bladstelen veroorzaakte. De verbinding had in een aantal toetsen duidelijke auxine-achtige eigenschappen en dat was vreemd want alle tot dan toe bekende auxinen hadden een basale ring-structuur en een carboxylgroep zoals bijvoorbeeld naphthylazijnzuur en 2,4-dichloorphenoxyazijnzuur (Veldstra, 1953).

Daarbij moeten we ons bedenken dat we nog in het auxinetijdperk leefden, de cytokininen kwamen er pas in de jaren zestig bij. Men was geïnteresseerd in wetmatigheden tussen de chemische structuur en de activiteit van deze stoffen in biologische toetsen en verwachtte dat hiermee een antwoord gegeven zou worden op de vraag hoe de receptor was opgebouwd. Hecht een groeistof zich aan één of meer bindingsplaatsen van de receptor? U ziet dat het zoeken naar de eigenschappen van de bindingsplaatsen van de receptor helemaal niet nieuw is. Nu dertig jaar later kennen we een aantal eiwitten die auxine kunnen binden (de ABP's) en de discussie is in volle gang over de vraag of de ABP's ook werkelijk deel uit maken van een receptor (Jones, 1990).

Men zocht naar een verklaring voor het werkingsmechanisme en suggereerde al snel dat het dimethyldithiocarbamaat-gedeelte zou worden afgesplitst in de plant en dat dit deel van het molecuul de plant zou beschermen tegen de schimmelinfectie. Uit het onderzoek van collega Kaslander et al. (1962) in Utrecht en ons onderzoek in Wageningen bleek dat dan ook het geval te zijn, echter dit gedeelte van het molecuul werd onmiddellijk geglucosideerd of omgezet in het alaninederivaat (Dekhuijzen, 1961; 1964). Het alaninederivaat is fungitoxisch, maar de hoeveelheid die in de plant gevormd werd was veel te gering om daarmee de bescherming tegen de schimmelziekte te verklaren. We kennen dus het werkingsmechanisme van deze groeistofachtige verbinding niet en aangezien de beschermende werking veel te gering was voor de praktijk is de verbinding uit de onderzoeksprogramma's verdwenen. Het onderzoek heeft dus behalve een aantal wetenschappelijke publikaties niets blijvends opgeleverd. Echter zoals zo vaak in het onderzoek leverde het een volkomen onverwacht nevenresultaat op, de "fringe benefits", want in 1962 verschijnt het boek *Silent Spring* van Rachel Carson, die wees op de ernstige gevolgen die het gebruik van pesticiden op grote schaal had voor flora en fauna. Op het vijfde Internationale Pesticiden Congres in Londen (juli 1963) liepen de emoties zeer hoog op, want enerzijds waren er onderzoekers die zeer goed wisten dat veel pesticiden "gemeengoed" waren geworden, anderzijds waren er velen die het als hun taak zagen om ziekten en plagen te bestrijden, "to the benefit of mankind". In ieder geval leverde het voor mij veel benefits op, want in Amerika werd een conferentie belegd waarin het lot van pesticiden in planten en in de grond aan de orde werd gesteld. Het toeval wilde dat de groep in Utrecht en Wageningen één van de

weinige groepen was die iets kon zeggen over het lot van een aantal schimmelbestrijdingsmiddelen in planten en dat bracht mij naar Amerika. Dit had weer tot gevolg dat ik van 1966 tot 1968 op het Boyce Thompson Institute for Plant Research (BTI) kon gaan werken aan een voor mij totaal nieuw groeistofprobleem.

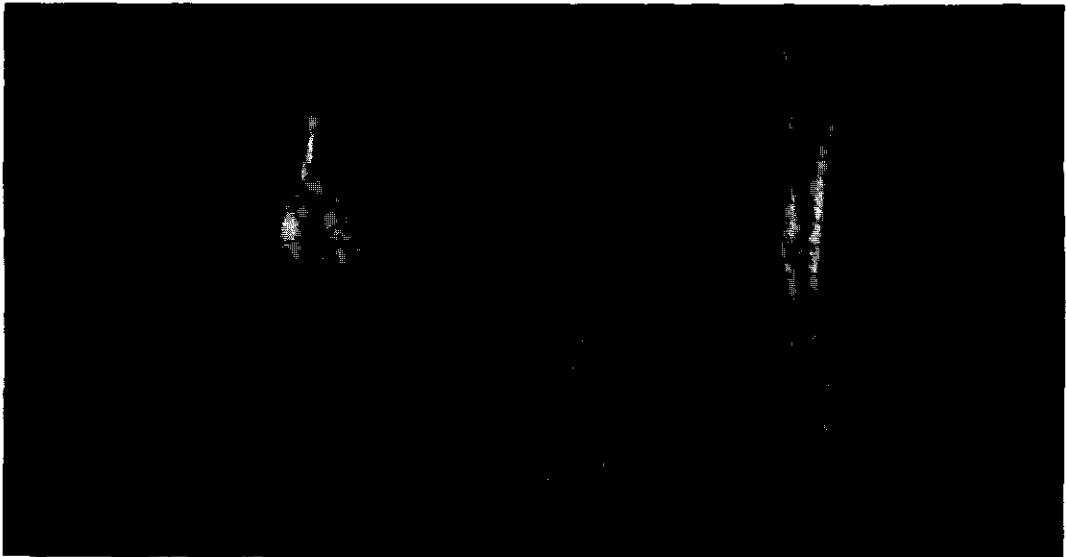
7.5 Hormonen en de vorming van groene eilanden

De aantasting van bladeren van *Phaseolus vulgaris* door de roestschimmel *Uromyces phaseoli* leidt tot de vorming van zogenaamde groene eilanden. Terwijl het chlorofyl in de bladeren wordt afgebroken, blijft om de schimmelaantasting een groene fotosynthetisch actieve zone bestaan. Nu was uit het werk van Mothes en Engelbrecht (1961) in Oost-Duitsland bekend dat de vorming van groene eilanden kon worden nagebootst door kinetine aan de bladeren toe te dienen. Zij hadden bovendien al aangetoond dat dit leidde tot een transport van stoffen naar de groene zone. Er was dus duidelijk sprake van een *metabolic sink* in die bladeren en het lag dus voor de hand om te veronderstellen dat het groene-eilandeffect bij de door roest aangetaste bladeren veroorzaakt werd door de aanwezigheid van cytokininen in de roestschimmel en een secretie van deze stoffen uit de schimmel in de bladeren. Men concludeerde dat de schimmel zelf geen cytokininen produceerde, maar dat de schimmel de plant dwong tot een verhoogde productie van cytokininen. En misschien is het waar, maar als ik nu de toen gevolgde methoden nog eens nalees dan denk ik dat deze hele studie nog eens grondig overgedaan zou moeten worden en dan met behulp van het hele arsenaal van methoden die ons nu ter beschikking staan. HPLC gecombineerd met monoklonale antilichamen en GC-MS-analyses aan kleine hoeveelheden materiaal. In ieder geval zijn die twee Amerikaanse jaren voor mij van grote betekenis geweest. Toentertijd was het heel gewoon dat je na je promotie een tijd in het buitenland ging werken. Het was een voorrecht en ik vind het jammer dat zo weinig jonge collega's nu die gelegenheid krijgen of aangrijpen. In die Amerikaanse periode ben ik zijdelings ook in contact gekomen met het weefselweekonderzoek dat toen al op het BTI gedaan werd. Daar heb ik in Nederland later veel plezier van gehad. Eén van de problemen van het groeistofonderzoek is altijd geweest dat deze verbindingen een geringe toepasbaarheid hadden en voor de vegetatieve vermeerdering van planten, heb je groeistoffen absoluut nodig. Het gebruik van groeistoffen in de weefselweek en de toepassing van deze stoffen om de houdbaarheid van snijbloemen te verhogen zijn sterke stimulansen geweest voor het groeistofonderzoek. Op CABO-DLO heeft wijlen Henk Veen de stoot gegeven tot het houdbaarheidsonderzoek. Een andere sterke stimulans voor het groeistofonderzoek is de ontwikkeling op moleculair-biologisch gebied geweest, waardoor het mogelijk werd om de hormonale regulatie van de genexpressie te bestuderen.

In de jaren 1966-1968 zitten we echter nog midden in de periode waarin men grote waarde toekende aan hormoonniveaus. De groei en ontwikkeling van planten was afhankelijk van de balans van verschillende hoeveelheden hormonen in planten. En dat kwam ook tot uiting in het volgende groeistofonderzoekproject waar ik na terugkomst in Nederland aan ging werken .

7.6 De rol van hormonen bij de knolvoetziekte

De knolvoetziekte bij cruciferen wordt veroorzaakt door een schimmel (*Plasmodiophora brassicae*) die in de grond zit en de wortels aantast (Figuur 7.2). Dit leidt tot overmatige celdeling van het hypocotyl en tenslotte tot de vorming van galachtige woekeringen. De vraag rees of de schimmel hormonen zoals bijvoorbeeld cytokininen produceerde die de plantecel zouden dwingen tot deling. Dit materiaal had grote voordelen boven de bladeren van bonen die geïnfecteerd waren met de bonenroestschimmel. We konden namelijk over grote hoeveelheden geïnfecteerde stoppelknollen beschikken door samen te werken met de Stichting Voor Plantenveredeling (SVP). Op dat Instituut was Toxopeus bezig om lijnen van stoppelknollen (*Brassica campestris*) te selecteren die resistent waren tegen *Plasmodiophora*. De stoppelknollen werden direct na de oogst van het graan, half augustus, gezaaid en de knollen konden in november geoogst worden. Alle aangetaste knollen hadden geen waarde voor verder veredelingsonderzoek en konden voor extractie van cytokininen gebruikt worden. Zo werd uiteindelijk uit 360 kg materiaal een fractie verkregen die voldoende cytokininen bevatte om gaschromatografisch geanalyseerd te worden (Dekhuijzen & Overeem, 1971; Dekhuijzen, 1976). De zieke planten bevatten 10 tot 100 maal meer zeatine dan niet geïnfecteerde knollen. Inmiddels was duidelijk geworden dat er tijdens de extractie en zuivering van de cytokininen grote verliezen geleden werden. Het toeval wilde dat de heer Vonk bij CABO-DLO op precies hetzelfde probleem was gestoten, maar dan wel bij heel ander plantemateriaal (de iris). Hij heeft daarbij een duidelijke bijdrage aan het voorzuiveringsprobleem geleverd en daarnaast is het duidelijk geworden dat er in plantemateriaal naast de bekende cytokininen zoals het nucleotide van zeatine ook allylisch-fosfaatgebonden zeatine, aanwezig was.



Figuur 7.2. Aantasting van stoppelknollen (*Brassica campestris*) door *Plasmodiophora brassicae*. Links gezonde, rechts aangetaste knollen.

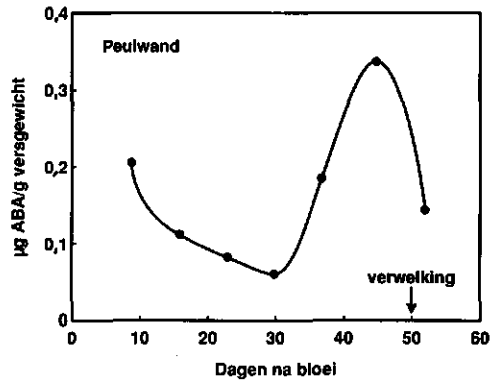
Met dit onderzoek zaten we nog midden in de periode waarin men grote betekenis toekende aan de hormoonbalansen voor de groei en ontwikkeling van de plant (1970-1980). Bij de knolvoetziekte werd dat idee versterkt door het feit dat je callusweefsel van geïnfecteerde planten kon laten groeien zonder toediening van cytokininen en auxinen aan het medium, terwijl callus van gezonde planten alleen kon groeien indien deze hormonen aan het medium werden toegediend. Er was dus een balans van auxinen en cytokininen nodig om de cellen te laten delen. In ieder geval werd het knolvoetprobleem bij stoppelknollen opgelost, niet zo zeer door het nijvere werk van Toxopeus en mij zelve, maar doordat de hele stoppelknollencultuur uit de akkerbouw verdween en plaats moest maken voor maïs, een gewas dat zo goed bestand was tegen hoge organische stikstofgiften. We weten nu wat voor gevolgen het toedienen van hoge mestgiften voor het milieu heeft.

7.7 Hormonen en de afrijping van *Vicia faba* peulen: het gehalte aan hormonen en de gevoeligheid voor hormonen.

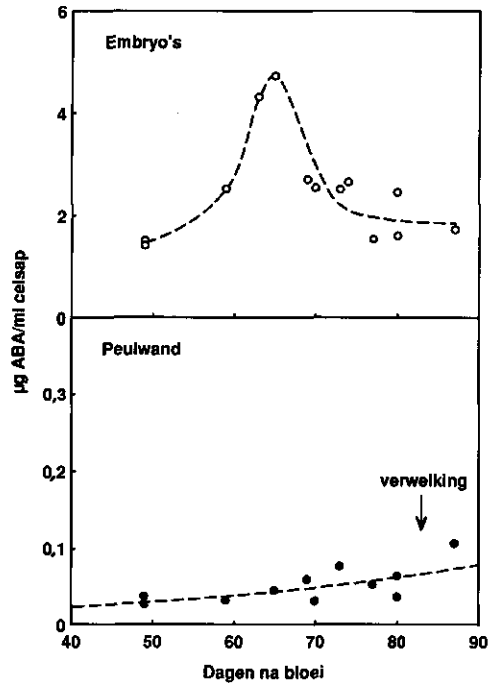
Tenslotte wil ik een aantal processen bespreken die een rol spelen bij de afrijping van zaden en peulwanden. In de afgelopen 10-15 jaren heeft men gestreefd naar een uitbreiding van de teelt van leguminosen in West-Europa. Daarbij heeft men zich als doel gesteld om aan het einde van het groeiseizoen zaden te oogsten die geschikt zijn voor de verwerking in de veevoederindustrie. Aan het einde van de groeiperiode verliezen peulwanden en zaden in 1 tot 2 dagen zeer veel water. Dat proces van waterverlies verloopt zeer snel en is afhankelijk van de temperatuur. De vraag is nu hoe het komt dat de peulwanden zo snel water verliezen. Er bestaan verschillende hypothesen en één hiervan is dat de veroudering van de peulwand en de zaadhuid hormonaal gereguleerd wordt. In analogie met wat bekend is over de rol die ethyleen en abscisinezuur (ABA) spelen bij de veroudering van bloemen en vruchten veronderstelt men dat deze hormonen ook een rol spelen bij de veroudering van de peulwanden en zaadhuizen. Bij de anjer wordt de veroudering van de bloembladeren voorafgegaan door de produktie van ethyleen door de bloem zelf. Toediening van ethyleen aan de anjerbloem leidt tot een versnelde veroudering van de bloemen. Nu is gebleken dat de peul ook ethyleen produceert, maar dat gebeurt vooral in de periode na de verwelking van de peulwanden en niet er voor zoals bij de anjer. Bovendien leidt toediening van ethyleen aan de peulen niet tot een versnelde veroudering. Hoe zit dat nu met abscisinezuur? Volgens Quebedeaux et al. (1976) wordt de verwelking van de peulwanden bij soja voorafgegaan door een verhoging in de produktie van ABA. De auteurs suggereren een verband tussen het ABA-gehalte en de veroudering van de sojaplant. Bij *Vicia faba* vinden we een heel ander resultaat. Onderzoek met behulp van monoklonale antilichamen tegen ABA liet helemaal geen maximale produktie van ABA zien voordat de verwelking 85 dagen na anthese optrad. Het ABA-gehalte steeg van 0,03 µg/ml, 45 dagen na anthese, naar 0,10 µg/ml nadat de peulwand al verwelkt was (85 dagen na anthese). De embryo's bevatten veel meer ABA dan de peulwanden. De ABA-concentratie in

de embryo's bereikte een maximumniveau van 5 µg/ml halfweg de zaadgroei (85 dagen na anthese). Daarna daalde het gehalte snel naar 1,5 µg/ml (Fig. 7.3 en 7.4).

Figuur 7.3. Veranderingen in concentraties van abscisinezuur (ABA) in zich ontwikkelende peulwanden van *Glycine max*. Naar Quebedeaux et al. (1976).



Figuur 7.4. Veranderingen in concentraties van abscisinezuur (ABA) in zich ontwikkelende peulwanden en embryo's van *Vicia faba*. (Dekhuijzen, samenvatting IPGSA congres, Amsterdam, 1991).



Intussen zijn we in de periode 1980-1990 gekomen waarin men tot de conclusie was gekomen dat men bij dit soort onderzoek niet uitsluitend het gehalte aan hormonen moet bepalen, maar ook de gevoeligheid van weefsel voor hormonen in het onderzoek moet betrekken. Maar hoe bepaal je de gevoeligheid van weefsel voor

een hormoon en hoe druk je dat kwantitatief uit? We hebben uiteindelijk een toets gebruikt die gebaseerd was op de waarneming van Sacher (1959) dat de veroudering van peulwandsegmenten geremd kan worden door toediening van naphthylazijnzuur. Uit ons onderzoek is nu gebleken dat toediening van ABA de veroudering versnelt waarbij elektrolieten in het medium worden afgescheiden en de mate van geleidbaarheid kan men kwantitatief vastleggen. Men kan dus het hele proces van peulwandveroudering aan de intacte plant nabootsen door ABA toe te

Tabel 7.2 A. Maximale ABA-gehalten in wanden van peulen die groeiden bij 16 °C. De peulen verwelkten 85 dagen na anthese. B. ABA toegediend aan peulwandsegmenten. Peulen werden 79 dagen na anthese bij 16 °C geoogst. ABA werd toegediend aan steriele segmenten van deze peulwanden gedurende drie dagen bij 25 °C.

A. Peulen aan intacte plant		B. Peulwandsegmenten		
dagen na anthese	ABA-gehalte (mg/l)	dagen na anthese	ABA toegediend (mg/l)	ABA in segmenten (mg/l)
45	0,03	79	5	5,7
85	0,1	79	10	13

dienen aan peulwandsegmenten. Toch hebben deze twee verschijnselen niets met elkaar te maken, want de hoeveelheid ABA die in de segmenten terecht komt bleek 100 tot 200 maal hoger te zijn dan de hoeveelheid die in de peulwand tijdens de natuurlijke veroudering aanwezig is (Tabel 7.2). Dit konden we bepalen door een kleine hoeveelheid radioactief ABA aan het medium toe te voegen en hieruit kon berekend worden hoeveel ABA er in de segmenten terecht was gekomen. We moeten dan wel concluderen dat de veroudering van de peulwanden niet alleen door ethyleen of alleen ABA veroorzaakt wordt. Misschien wordt het veroorzaakt door een combinatie van de twee hormonen, maar daar hebben we geen gegevens over. Het is dus zeer twijfelachtig of hormonen werkelijk een rol spelen bij de veroudering van peulwanden. De peulwand is morfologisch een blad en de vraag rijst dan of hormonen een rol spelen bij de bladveroudering. Men veronderstelt dat vaak, omdat dit verschijnsel kan worden gestimuleerd met behulp van ABA en ethyleen en kan worden tegengegaan door toevoeging van cytokininen. Voor de beantwoording van deze vragen kan men veel beter gebruik maken van mutanten die al of niet gevoelig zijn voor hormonen. Die zijn er bij akkerbouwgewassen of sierteeltplanten nog maar zeer weinig. Een veelbelovende aanpak van dit type onderzoek kan men vinden bij Zacarias en Reid (1990). Zij beschikken over *Arabidopsis* mutanten die ongevoelig zijn voor ethyleen en zij stellen de oude vraag aan de orde, spelen hormonen een rol bij de bladveroudering? We zien dus dat: old problems never die, they only fade away.

7.8 Literatuur

Carson, R., 1962.

Silent Spring. Houghton Mifflin Company. The Riverside Press Cambridge (USA)

Dekhuijzen, H.M., 1961.

Transformation in plants of sodium dimethyldithiocarbamates into other fungitoxic compounds. *Nature* 191, 198-199.

Dekhuijzen, H.M., 1964.

The systemic action of dimethyldithiocarbamates on cucumber scab caused by *Cladosporium cucumerinum* and the conversion of these compounds by plants. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 70, suppl. 1-75.

Dekhuijzen, H.M., 1976.

Natural growth regulators. Endogenous cytokinins in healthy and diseased plants. In: R. Heitefuss and P.H. Williams (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, 4, Springer Verlag- Berlin, 526-559.

Dekhuijzen, H.M. & J.C. Overeem, 1971.

The role of cytokinins in clubroot formation. *Physiological Plant Pathology* 1, 151-162.

Green, D.E., 1941.

Enzymes and trace substances. *Advances in Enzymology* 1: 177-198.

Guern, J., 1987.

Regulation from within: The hormone dilemma. *Annals of Botany, Suppl.* 4; 75-102.

IPGSA-Congres, juli 1991, Amsterdam (14th International Conference on Plant Growth Substances. Book of Abstracts and Proceedings.

Jones, A.M., 1990.

Do we have the auxin receptor yet? *Physiologia Plantarum* 80, 154-158.

Kaslander, J., A. Kaars Sijpesteijn & G.J.M. Van der Kerk, 1962.

On the Transformation of the fungicide sodium dimethyldithiocarbamate into its alanine derivative by plant tissue. *Biochimica Biophysica Acta* 60, 417-419.

Kerk, G.J.M. van der, M.H. van Raalte, A. Kaars Sijpesteijn, & R. Van der Veen 1955.

A new type of plant growth -regulating substances. *Nature* 176, 308-310.

Mothes, K., & L. Engelbrecht, 1961.

Kinetin-induced directed transport of substances in excised leaves in the dark. *Phytochemistry* 1, 58-62.

Quebedeaux, B., B.P. Sweetser, & J.C. Rowell, 1976.

Abscisic acid levels in soybean reproductive structures during development. *Plant Physiology*. 58, 363-366.

Sacher, J.A. 1959.

Studies on auxin-membrane permeability relations in fruit and leaf tissues. *Plant Physiology* 34, 365-374.

Stegwee, D., 1967.

Moleculaire endocrinologie. Pudoc, Centrum voor Landbouwpublikatie en Landbouwdocumentatie, Wageningen, pp. 157-173.

Veldstra, H. 1953.

The relation of chemical structure to biological activity in growth substances. *Annual Review of Plant Physiology* 4, 151-198.

Zacarias, L., & M.S. Reid, 1990.

Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum* 80, 549-554.

Zalokar, M., 1961

Ribonucleic acid and the control of cellular processes. In: Bonner, D.M. (ed.), Control Mechanisms in Cellular Processes. Ronald Press, New York, pp. 87-103.

De auteurs

Dr. H. Breteler

Hans Breteler (48) volgde een opleiding in de bodemkunde en bemestingsleer in Wageningen. Na zijn afstuderen was hij 5 jaar verbonden aan het Laboratorium voor Landbouwscheikunde van de Landbouwhogeschool waar hij onderzoek deed aan de ionenbalans en de stikstofopname door de plant. Hij promoveerde in 1975 op de thesis: "Carboxylates and the uptake of ammonium by excised maize roots". Van 1975-1989 werkte hij bij het Instituut voor Toepassing van Atoomenergie in de Landbouw (ITAL) aan de relatie tussen de opname en verwerking van verschillende stikstofvormen door de plant, rhizosfeerprocessen en het secundair metabolisme in vitro. In 1987 werd hij hoofd van de afdeling Planteceldifferentiatie van de Stichting Ital. In 1977 was hij een jaar gastmedewerker aan het Botanisch Lab van de Universiteit van Bergen (Noorwegen). Sinds 1989 werkt hij bij CABO-DLO, thans als hoofd van de afdeling Biochemie en Celfysiologie.

Dr. A.F. Croes

Ton Croes werkt sinds 1962 aan het Botanisch Laboratorium van de Nijmeegse Universiteit, eerst als promovendus, momenteel als universitair hoofddocent. Tot 1981 was zijn onderzoeksgebied: differentiatie bij micro-organismen (meiose bij gist, sporulatie van waterschimmels). Sindsdien werkt hij aan twee onderzoeksthema's bij hogere planten. Eén daarvan is de in vitro bloemknopvorming op explantaten van bloemstelen van tabak, een modelsysteem, dat vooral bruikbaar is gebleken voor de precieze ontrafeling van de effecten van de individuele, bij de regeneratie betrokken, hormonen. Het andere thema is de relatie tussen morfogenese en secundair metabolisme. Dit probleemgebied wordt zowel van de celbiologische als de moleculair-biologische kant benaderd. Als modelsysteem worden vooral wortelculturen gebruikt.

Dr. H.M. Dekhuijzen

Harold Dekhuijzen (61) studeerde in Utrecht biologie met als hoofdvak plantenfyysiologie. In 1958 kwam hij in dienst van het Organisch Chemisch Instituut T.N.O. (O.C.I.) te Utrecht. Hij werd gedetacheerd op het Laboratorium voor Fytopathologie te Wageningen, waar hij werkzaam was in de werkgroep voor Inwendige Therapie T.N.O. bij planten. In 1964 promoveerde hij te Utrecht op een proefschrift getiteld: "The systemic action of dimethyldithiocarbamates on cucumber scab caused by *Cladosporium cucumerinum* and the conversion of these compounds by plants". Van 1966 tot 1968 werkte hij bij het Boyce Thompson Institute for Plant Research in Yonkers NY, USA, aan de rol die cytokininen spelen bij de vorming van zogenaamde

groene eilanden na de aantasting van *Phaseolus*-bladeren door een roestschimmel. Teruggekeerd in Nederland werd in samenwerking met de Stichting voor Plantenveredeling (SVP) onderzoek verricht naar de rol die cytokininen spelen bij de vorming van woekeringen bij cruciferen na aantasting door *Plasmidiophora brassicae*. In 1970 werd hij door het O.C.I. gedetacheerd bij het toenmalige Centrum voor Plantenfysiologisch Onderzoek (C.P.O.). Na de fusie van het C.P.O. met het Instituut voor Biologisch en Scheikundig Onderzoek in de landbouw (I.B.S.) ging hij over in dienst van het Ministerie van Landbouw. Daar werd hij in 1976 hoofd van de afdeling Plantenfysiologie (later Biochemie en Fysiologie) van het DLO-Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO). Deze functie werd beëindigd op 31 december 1990. Vanaf 1 januari 1992 zal hij gebruik maken van de regeling voor vervoegde uittreding.

Dr. W.M. van der Krieken

Wim van der Krieken (33) studeerde biologie aan de Katholieke Universiteit van Nijmegen. Vervolgens was hij 4 jaar als wetenschappelijk medewerker verbonden aan de afdeling Moleculaire Plantenfysiologie van de KUN. In die periode werkte hij aan een proefschrift "Cytokinin regulated flower bud formation in vitro in tobacco", waarop hij in maart 1990 promoveerde. Sinds oktober 1989 werkt hij bij CABO-DLO aan onderzoek naar wortelvorming in recalcitrante gewassen.

Dr. D. Kuiper

Daan Kuiper (38) studeerde biologie, met hoofdvak plantenfysiologie, aan de Universiteit van Groningen. In de periode 1978-1980 was hij docent biologie in Barendrecht, om in 1980 te beginnen met een promotieonderzoek bij de vakgroep Plantenfysiologie van de Universiteit van Groningen. In 1984 verscheen het proefschrift "Genetic differentiation and phenotypic plasticity in *Plantago* species". In dat jaar begon hij als postdoc-onderzoeker bij de vakgroep Plantenfysiologie te Groningen aan een STW-project, waarin een mechanisme dat ten grondslag ligt aan de fenotypische plasticiteit, werd onderzocht. In deze periode verbleef hij drie maanden als gastmedewerker aan de vakgroep Plantenfysiologie van de Universiteit van Lund (Zweden). In 1987 kwam hij als wetenschappelijk onderzoeker in dienst van het Proefstation voor de Bloemisterij te Aalsmeer. Substraatteelt, bemestingsvraagstukken en wortelgroei en -ontwikkeling in afhankelijkheid van lucht- en waterhuishouding vormden daar zijn onderzoeksterrein. Sinds 1 oktober 1988 is hij in dienst van CABO-DLO en verricht hij onderzoek naar de rol van koolhydraten, plantegroeistoffen en membranen in het proces van de bloemknopopening van de roos.

Dr. F.M. Maas

Frank Maas (34) studeerde vanaf 1977 tot 1982 biologie, met als hoofdvak plantenfysiologie, aan de Universiteit van Amsterdam. In 1983 begon hij bij de vakgroep Plantenfysiologie van de Rijksuniversiteit Groningen aan een promotieonderzoek

naar de effecten van zwavelhoudende luchtverontreinigingscomponenten op de groei en het zwavelmetabolisme van planten. Dit onderzoek werd in 1987 afgesloten met het proefschrift "Responses of Plants to Sulfur-containing Air Pollutants (H_2S and SO_2)". In hetzelfde jaar werd hij als wetenschappelijk onderzoeker aangesteld bij CABO-DLO, waar hij onderzoek verricht naar de effecten van lichtkwaliteit op de ontwikkeling van planten. In het kader van dit onderzoek werkte hij in 1988 gedurende 4 maanden in de vakgroep Botanie van de Universiteit van Southampton (Verenigd Koninkrijk). Zijn onderzoek is er met name op gericht vast te stellen in hoeverre het mogelijk is de ontwikkeling van planten, in het bijzonder die van sierteeltgewassen, in positieve zin te beïnvloeden door middel van bepaalde lichtbehandelingen. De sturende invloed van de kwaliteit of kleur van het licht op de verdeling van assimilaten in de plant vormt naast de morfogenetische effecten van het licht een belangrijk onderdeel van het onderzoek.

Dr. N. Marissen

Nollie Marissen (36) beëindigde haar studie biologie aan de Vrije Universiteit te Amsterdam in 1983. Vervolgens werd aan dezelfde universiteit een promotie-onderzoek verricht, in samenwerking met het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse, dat in 1989 werd afgerond met een proefschrift getiteld: "Mitochondrial respiration in relation to flower induction in iris bulbs". Sinds januari 1987 is zij in dienst van het Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland als wetenschappelijk onderzoeker in de kerngroep Naoogst.

Drs. H.S. van Reenen

Helen van Reenen (26) studeerde biologie nieuwe stijl aan de Vrije Universiteit van Amsterdam, met als hoofdvak plantenfysiologie. Sinds 1 februari 1990 is zij als AIO in dienst van de LUW bij de vakgroep Plantenfysiologie, maar permanent gedetacheerd bij CABO-DLO. Zij verricht hier onderzoek naar de rol van het koolhydraatmetabolisme en plantegroeistoffen tijdens de bloemknopopening van de roos.

S.A. Ribôt

Simon Ribôt (44) kwam na een middelbare tuinbouwschoolopleiding in 1970 in dienst bij het toenmalige CPO, thans CABO-DLO. Als verdere opleiding behaalde hij in 1973 het HBO-A-diploma en in 1977 het HBO-B-diploma botanie. Sinds 1988 neemt hij deel als onderzoeksassistent aan het project bloemknopopening van rozen.

Dr. J.A. Traas

Jan Traas (34) studeerde biologie aan de Universiteit van Amsterdam. In 1982 behaalde hij zijn doctoraalexamen. In hetzelfde jaar begon hij zijn promotieonderzoek naar de rol van het cytoskelet en de celwand bij de morfogenese van plante-

cellen aan de Katholieke Universiteit Nijmegen. Na zijn promotie in 1986 was hij werkzaam op het John Innes Institute (Norwich, GB) als EMBO-fellow. Hier deed hij onderzoek naar de rol van tubuline en actine bij de regulering van celdeling. Vervolgens was hij werkzaam in Frankrijk in een samenwerkingsproject tussen DLO (IVT en CPRO) en het INRA betreffende de fundamentele aspecten van de regeneratie. Per 1 november 1991 heeft hij het CPRO-DLO verlaten en hij is thans werkzaam bij het INRA te Versailles, waar hij verantwoordelijk is voor de celbiologische analyse van ontwikkelingsmutanten bij *Arabidopsis thaliana*.

M.H.M. Visser

Marcel Visser (31) volgde een HBO-opleiding aan de voormalige Stova te Wageningen in de richting Botanie. Hij werkte tot 1989 bij de Stichting Ital mee aan het onderzoek over thiofeenproductie bij cel- en weefselkweekcultures van *Tagetes*-soorten. Sinds 1989 is hij werkzaam bij CABO-DLO in het project over wortelregeneratie bij houtige gewassen.

C.R.Vonk

Cock Vonk (57) behaalde het diploma Rijksmiddelbare Tuinbouwschool te Boskoop (1951) en was na een tuinbouwkundige periode, twee jaar verbonden aan het handels- en researchlaboratorium Dr D. van Duyn te Rotterdam. In 1960 trad hij in dienst van het toenmalige CPO, thans CABO-DLO. Hij behaalde het diploma Biochemisch laboratorium-assistent en was betrokken bij onderzoek naar aminozuursynthese en -transport in de tomataplant en floëemtransport in *Yucca flaccida*. Sinds 1974 doet hij, als projectleider, onderzoek naar de achtergronden van bloemknopverdroging en abscissie bij tuinbouwgewassen. Bij dit onderzoek ligt het accent op gedrag en functie van planteregulatoren.

Prof.dr. G.J. Wullems

George Wullems (44) studeerde biologie, hoofdvak biochemie (prof.dr. H. Bloemendal), aan de Katholieke Universiteit Nijmegen. Hij promoveerde in 1976 aan de Erasmusuniversiteit te Rotterdam bij prof.dr. D. Bootsma op een proefschrift getiteld: Introduction of genetic information in cultured animal cells by means of isolated human metaphase chromosomes. Van 1976 tot 1987 werkte hij als Wetenschappelijk Hoofdmedewerker, later als Universitair Hoofd Docent bij de vakgroep Biochemie, later Moleculaire Plantkunde van de Rijksuniversiteit te Leiden, waar hij de dagelijkse leiding had van het celbiologisch onderzoek van de werkgroep Molbas o.l.v. prof.dr. R.A. Schilperoort. In 1987 werd hij benoemd tot hoogleraar in de Plantkunde aan de Katholieke Universiteit Nijmegen. Hij leidt daar thans de afdeling Moleculaire Plantenfysiologie van de vakgroep Experimentele Plantkunde.