

Effect van weefselkweek-omstandigheden op de kwaliteit van weefselkweekmateriaal

Dr. G. J. de Klerk

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Juni 2004
PPO nr. 330510

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeleelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.



Projectnummer: 330510

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bloembollen

Adres : Prof. Van Slogterenweg, Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 – 46 21 21

Fax : 0252 – 46 21 00

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
3 RESULTATEN	11
3.1 Huidmondjes	11
3.2 Ethyleen.....	13
3.3 Beschermende stoffen	14
3.4 Extra nutriënten	15
3.5 In vitro versus ex vitro beworteling	16
3.6 Effect ontwikkelingstoestand	17
4 DISCUSSIE	19
5 PRODUCTEN OPGELEVERD GEDURENDE DE GEHELE LOOPTIJD VAN HET PROJECT	21

Samenvatting

In dit project zijn procedures ontwikkeld om de groei van weefselweekmateriaal na uitplanten te verbeteren. Hiertoe werden de condities tijdens de weefselweekfase aangepast en werd onderzocht wat het effect was op de doorgroei na uitplanten. De verbeteringen waren vaak substantieel en de methodes eenvoudig toe te passen. Opsommend zijn de toepassingen (in volgorde wat betreft mogelijkheid tot snelle toepassing in de praktijk):

- Het schadelijke effect van ethyleen en andere organische gassen die ophopen in de *headspace* van weefselweekcontainers kan tegengegaan worden met Power Pellets. Hiervoor zijn zakjes speciaal voor toepassing in weefselweek ontwikkeld.
- Natuurlijk voorkomende beschermende stoffen (putrescine, proline, betaine) toegediend tijdens weefselweek kunnen negatieve effecten van stress bij acclimatisatie tegengaan.
- Bij veel gewassen gaat acclimatiseren van in-vitro bewortelde planten beter. Een ander voordeel van in-vitro beworteling is de grotere flexibiliteit wat betreft het uitplantingstijdstip: als ex vitro wordt beworteld, moet de bewortelingsbehandeling kort na oogsten gegeven worden.
- Extra nutriënten toegediend tijdens weefselweek kunnen acclimatisatie bevorderen.
- Weefselweekplantjes hebben slecht-functionerende huidmondjes. Dit is waarschijnlijk het grootste mankement van weefselweekplantjes. In de praktijk toegepaste oplossingen zijn na uitplanten de luchtvochtigheid langzaam omlaag brengen en uitplanten van bewortelde scheuten. In dit onderzoek zijn geen nieuwe mogelijkheden naar voren gekomen.

1 Inleiding

In weefselkweek geproduceerd uitgangsmateriaal is meestal zeer vitaal en groeit, als het eenmaal is geacclimatiseerd, vaak beter dan normaal stekmateriaal. Direct na uitplanten (tijdens de acclimatisatie) zijn weefselkweekplantjes echter veel zwakker dan conventioneel uitgangsmateriaal. Dat wordt veroorzaakt doordat het plantmateriaal gevormd is onder de speciale weefselkweekcondities en daardoor minder functioneert *ex vitro*. Er is in weefselkweek bijv. weinig fotosynthese en na uitplanten moet het materiaal weer op volle kracht fotosynthetiseren. Het op het oog meest evidente probleem met weefselkweekmateriaal is dat water slecht wordt vastgehouden, waarschijnlijk vooral als gevolg van slecht functionerende huidmondjes (Davies & Santamaria, 2000). Dit heet in de wetenschappelijk literatuur een slechte *Water Retention Capacity* (WRC). Vanwege dit probleem moet weefselkweekmateriaal na uitplanten langzaam aan de normale luchtvochtigheid aangepast worden. Ondanks de voorzichtige acclimatisatie leidt de slechte fysiologische conditie echter vaak tot onvoldoende doorgroei en veel uitval (informatie van weefselkweekbedrijven en van telers). Uitval van meer dan 20% is geen uitzondering. Wanneer er ogenschijnlijk geen problemen lijken te zijn bij uitplanten en al het materiaal aanslaat kan wellicht door het verbeteren van de fysiologische conditie toch een significant betere doorgroei worden verkregen. Het ligt voor de hand dat ook andere condities tijdens weefselkweek dan alleen de hoge luchtvochtigheid in de *headspace* de doorgroei na uitplanten beïnvloeden. Er is in het project daarom voor verschillende benaderingen gekozen, breder dan de problematiek van de WRC. Het doel van dit project was verschillende procedures te ontwikkelen waarmee de kwaliteit van weefselkweekmateriaal verbeterd wordt om na uitplanten betere groei te krijgen. Het onderzoek werd uitgevoerd bij een reeks gewassen. Het is verrassend dat in het wetenschappelijk onderzoek nauwelijks aan dit onderwerp wordt/is gewerkt. Illustratief is dat in een in 2001 gehouden ISHS symposium met de veelbelovende titel *First International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants* slechts een lezing was dat over dit onderwerp ging (en gehouden werd door de projectleider van dit onderzoek). (1) Sommige weefselkweekcondities hebben een negatief effect op het plantmateriaal. Dit betreft met name de eerder genoemde hoge luchtvochtigheid tijdens de weefselkweek dat zoals gezegd waarschijnlijk de oorzaak van de slechte WRC is, en de ophoping van ethyleen in weefselkweekcontainers dat leidt tot een verouderingsreactie van het materiaal. In het project is geprobeerd procedures te vinden om deze negatieve effecten tegen te gaan. (2) Weefselkweek geeft de mogelijkheid om het materiaal voor te bereiden voor uitplanten middels *in vitro* beworteling, het toedienen van beschermende stoffen, het meegeven van extra nutriënten voor groei tijdens de acclimatisatie en het verkrijgen van een geschiktere ontwikkelingsfase zoals juveniele of juist adult, afwezigheid of juist aanwezigheid van rust.

2 Materiaal en methoden

Het onderzoek werd gedaan bij een reeks van gewassen (Tabel 1). Het betrof het tegengaan van verschillende negatieve gevolgen van weefselkweek, nl. slecht-functionerende huidmondjes (3.1), de inductie van veroudering door ophoping van ethyleen in weefselkweekcontainers (3.2) en stress bij uitplanten (een combinatie van o. a. droogte-stress, licht-stress, aanrakings-stress) (3.3). Daarnaast werd het 'meegeven' van extra nutriënten onderzocht (3.4) en werd onderzocht of in vitro dan wel ex vitro moet worden beworteld (3.5). Ten slotte komt de ontwikkelingstoestand van weefselkweekmateriaal aan de orde: het al dan niet in rust zijn en de ontogenetische leeftijd (adult of juveniel) (3.6). De verschillende onderdelen werden zo veel mogelijk bij de hele reeks gewassen getest. Een uitzondering hierop waren de experimenten met *Vigna radiata*. Hierbij werd uitgegaan van zaden die in vitro kiemden en ca 10 dagen na zaaien beschikbaar waren. Hier was snelle beschikbaarheid het voornaamste criterium (mede i.v.m. de uitvoering door een stagiair). Een tweede uitzondering waren de experimenten aan de zgn. fasenverandering (in onderdeel ontwikkelingstoestand) waarvoor lelie zeer geschikt is.

Weefselkweektechnieken

Voor in vitro vermeerdering, in vitro beworteling en in vitro kieming werden standaardmethoden gebruikt die reeds gepubliceerd zijn: lelie (Langens-Gerrits and de Klerk, 1999); dahlia (de Klerk 2000a), appel (de Klerk 2002a), roos (de Klerk 2002a), gerbera (de Klerk, 2002b), *Vigna radiata* (de Klerk 2002a). De condities werden aangepast als aangegeven bij de verschillende onderdelen.

Tabel 1. Overzicht van de verschillende onderwerpen en het plantmateriaal waarbij onderzoek is gedaan.

		dahlia	lelie	appel	roos	gerbera	vigna radiata
huidmondjes	3.1			v		v	v
ethyleen-effect	3.2	v	v	v	v		
beschermende stoffen	3.3		v	v	v	v	
extra nutriënten	3.4				v		
in vitro vs ex vitro beworteling	3.5	v	v	v	v		
ontw. toestand	3.6		v	v			

Andere technieken staan beschreven in de Klerk 2000a.

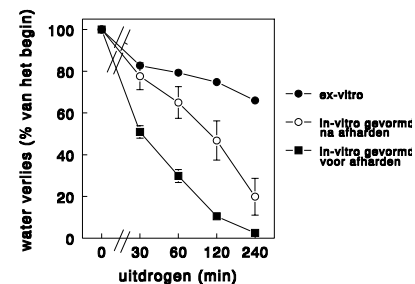
3 Resultaten

3.1 Huidmondjes

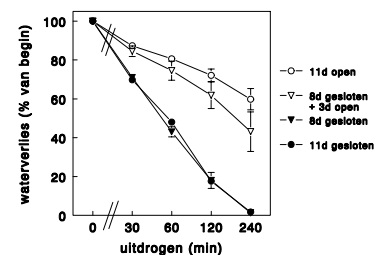
Het grootste mankement van weefselkweekplantjes is dat de huidmondjes zeer slecht functioneren. Daardoor hebben weefselkweekplantjes een slechte *Water Retention Capacity* (WRC). Dit kan op een geavanceerde manier met een infra-rood camera aangetoond worden: als de huidmondjes niet sluiten verdampen de blaadjes meer water en hebben daardoor een lagere temperatuur (Davies en Santamaria, 1999). De slechte WRC bleek ook op een eenvoudige manier te kunnen worden aangetoond met een uitdrogingstest. Blaadjes van weefselkweekplantjes werden afgeknipt en na 0 (FW₀), 30 (FW₃₀), 60 (FW₆₀), 120 (FW₁₂₀) en 240 (FW₂₄₀) minuten gewogen. Tijdens het uitdrogen lagen ze in een open Petri schaal en waren ze blootgesteld aan de normale lab-atmosfeer. Vervolgens werd het drooggewicht (DW) bepaald door overnacht te drogen in een oven bij 80 °C. Het waterverlies op tijdstip t is: $100 \times (FW_0 - FW_t) / (FW_0 - DW)$. Figuur 1 geeft het waterverlies aan van blaadjes van weefselkweekplantjes, van persistente blaadjes van afgeharde weefselkweekplantjes (dit zijn blaadjes die in weefselkweek zijn gevormd en het afharding hebben overleefd) en van nieuw-gevormde blaadjes. Figuur 1 laat zien dat de weefselkweekblaadjes zeer snel water verliezen in vergelijking met nieuw gevormde blaadjes. De persistente blaadjes liggen er tussen in: blijkbaar herstellen ze tijdens het afharding maar lang niet helemaal. Deze proef was gedaan met materiaal van gerbera en vrijwel identieke gegevens werden verkregen met appel en roos.

Het herstel van de huidmondjes werd uitvoeriger onderzocht bij kiemplantjes van *Vigna radiata*. Zaadjes werden gekiemd in cultuurbuizen met agar en de deksel werd er niet opgezet ("open" buizen) dan wel juist extra dicht getaped ("gesloten" buizen). Bij blaadjes uit de open buizen was er weinig waterverlies, terwijl plantjes die de eerste 8 dagen in een gesloten buis waren gegroeid en daarna 3 dagen in een open buis grotendeels herstelden (Fig. 2).

Er is geprobeerd om al tijdens de weefselkweek de luchtvochtigheid wat om laag te brengen zodat er minder problemen verwacht mogen worden bij afharding. Dit had een gunstig effect op de WRC, maar er was geen betere groei na uitplanten. Het bleek *tricky* om de juiste condities te vinden om de luchtvochtigheid in de weefselkweekcontainers voor een aantal dagen terug te brengen. De WRC was beter als er ABA of paclobutrazol in het medium waren. Dit remde de groei echter zodanig dat dit geen optie is.



Figuur 1. Uitdroogtest bij blaadjes van gerbera. De blaadjes waren in vitro gevormd en met en zonder afharding getest of ex-vitro gevormd.



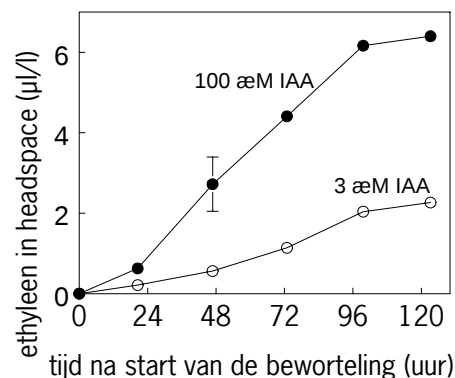
Figuur 2. Uitdroogtest bij blaadjes van *Vigna radiata*. De blaadjes waren gevormd in een open dan wel een gesloten cultuurbuis. Bij een aantal plantjes die gekiemd waren in een gesloten buis was na 8 dagen de deksel verwijderd.

Verder is in ons onderzoek aangetoond dat de slechte WRC van weefselkweekplantjes inderdaad het gevolg is van slecht functionerende huidmondjes en dat dit weer veroorzaakt wordt door de hoge luchtvochtigheid in de weefselkweekcontainers (je zou je kunnen voorstellen dat andere weefselkweekcondities, bijv. de aanwezigheid van hoge concentraties cytokinine of suiker het probleem veroorzaken.) Het zou kunnen dat persistente blaadjes na afharding als een lek gaan functioneren waardoor opgenomen water snel uit de plant verdampt en dat ze daarom na afharding verwijderd moeten worden. Dit bleek onder onze omstandigheden niet zo te zijn. In dit onderdeel van het onderzoek wilden we vaststellen wat de oorzaak van de slechte WRC is wat gelukt is, maar het is niet gelukt om de WRC op een eenvoudige manier te verbeteren.

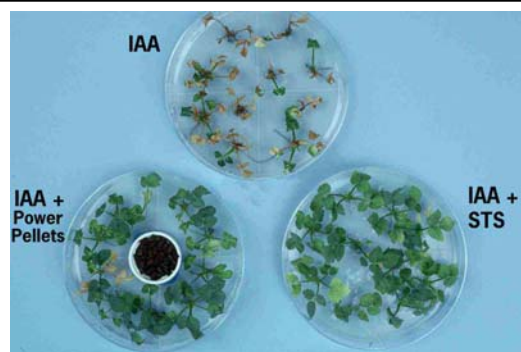
3.2 Ethyleen

In weefselkweek wordt de invloed van de *headspace* (dat is de gasfase in een weefselkweek-container) nauwelijks onderzocht. De kenmerken van de *headspace* zijn (1) hoge luchtvochtigheid (wat o.a. slecht functionerende huidmondjes tot gevolg heeft, zie boven in 3.1), (2) lage CO₂ en hoge O₂ tijdens de lichtperiode, (3) hoge CO₂ en lage O₂ tijdens de donkerperiode en (4) ophoping van organische gassen, met name ethyleen. De ophoping van ethyleen gebeurt tijdens de vermeerderings- en de in-vitro bewortelingsfase. Vooral in de laatste fase is dit te verwachten omdat van auxine, dat toegevoegd moet worden om beworteling te verkrijgen, ook bekend is dat het de ethyleen synthese stimuleert (Fig. 3). Ophoping van ethyleen kan desastreuze effecten hebben zoals te zien is in Figuur 4 bij roos. (Foto is genomen aan het eind van een 3- weken durende bewortelingsfase.) Met toediening van STS, een stof die ethyleen werking tegengaat, zien de scheutjes er mooi groen uit, maar STS remt in roos ook de beworteling en meer in het algemeen wortelhaar vorming. Als ethyleen wordt weggevangen door Power Pellets (poreuze zeoliet korrels gecoat met KMnO₄, te koop bij de firma Ryan Instruments in Sassenheim) blijven de scheutjes groen en is de beworteling niet geremd. Bij roos zijn overleving en groei na uitplanten slecht als ethyleen niet wordt weggevangen. Bij appel was er aan het eind van de bewortelingsbehandeling geen effect van de Power Pellets te zien. Vier weken na uitplanten was er echter wel een groot verschil (Fig. 5). Blijkbaar had ethyleen verouderingsprocessen in gang gezet die pas later zichtbaar werden (ethyleen is het verouderingshormoon). Bij Gerbera was er maar een klein effect van de Power Pellets (ca 10% hogere groei), en bij dahlia en lelie was er geen effect. Power Pellets verwijderen niet alleen ethyleen maar alle andere oxideerbare gassen. Als er een dopje met alcohol in een container tussen de plantjes werd geplaatst, hadden de plantjes hier veel van te leiden, maar met Power Pellets groeiden ze weer goed.

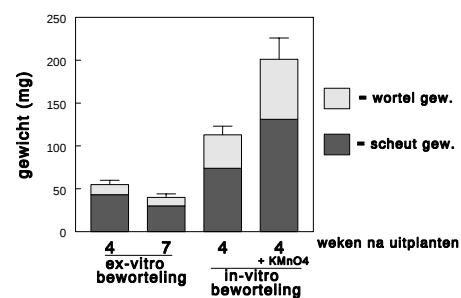
In de meeste experimenten werden (steriele) dopjes met Power Pellets in de containers gezet. Er zijn met de firma Ryan zakjes ontwikkeld die in de containers geplaatst kunnen worden (Figuur 6). De zakjes zijn gemaakt van een membraan dat doorlaatbaar is voor gassen als ethyleen maar niet doorlaatbaar is voor water. Ze zijn technisch nog niet geheel afgerond.



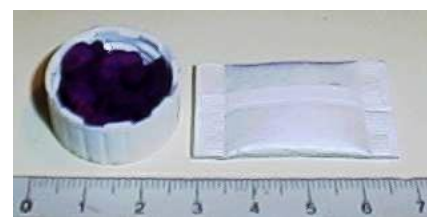
Figuur 3. Effect van auxine op de accumulatie van ethyleen in de headspace tijdens beworteling van appelscheutjes.



Figuur 4. Rozenscheutjes na 3 weken in vitro beworteling met alleen IAA, IAA met STS (ethyleen antagonist) of IAA met Power Pellets (verwijderen



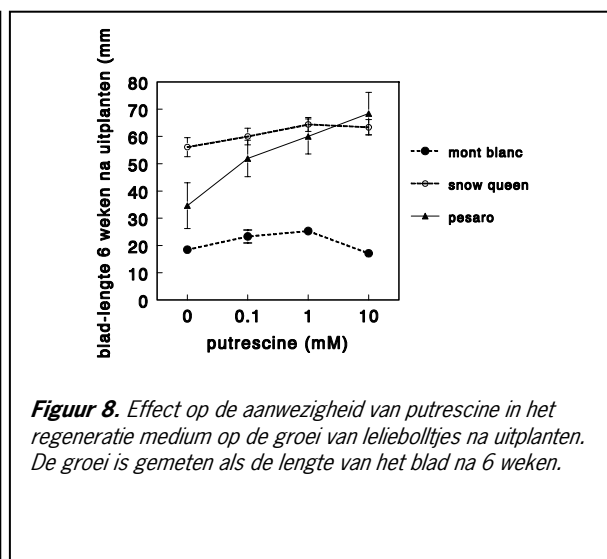
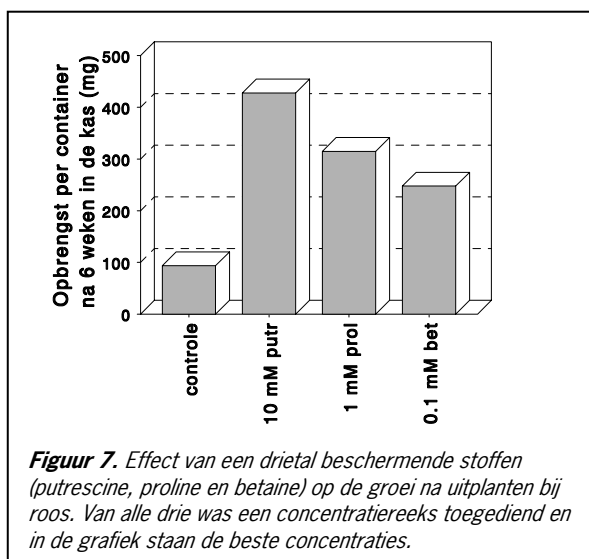
Figuur 5. Groei van weefselkweekplantjes van appel die in vitro dan wel ex-vitro waren beworteld. In vitro was bij een deel van de scheuten Power Pellets toegevoegd.



Figuur 6. Links is een dopje gevuld met Power Pellets, rechts een in dit onderzoek ontwikkeld zakje dat direct in een weefselkweekcontainer kan worden geplaatst.

3.3 Beschermende stoffen

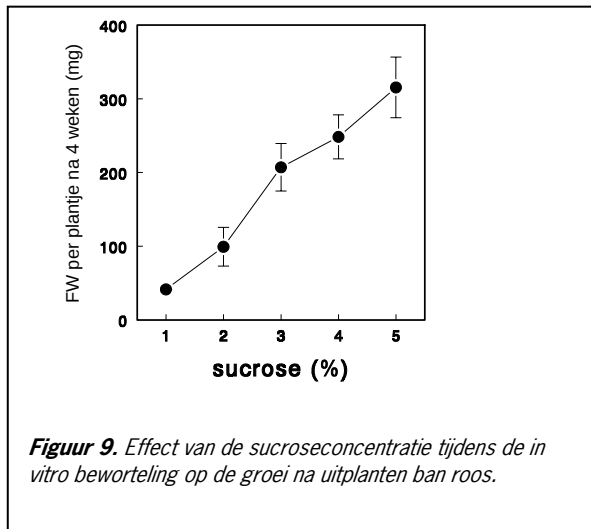
Voor weefselkweekmateriaal is de overgang van de in vitro omstandigheden naar de grond waarschijnlijk de belangrijkste vorm van stress. Planten in de natuur beschermen zich tegen abiotische stress met de aanmaak van bepaalde stoffen, o.a. putrescine, proline en glycinebetaine. Als deze stoffen tijdens de in vitro beworteling van roos werden toegediend, was de groei na uitplanten veel beter (Fig. 7). Leliebolletjes kunnen zonder acclimatisatie uitgeplant worden maar ook bij lelie kunnen beschermende stoffen een positief effect hebben (Fig. 8). Behalve bij de overgang naar ex-vitro condities zijn er nog een aantal andere vormen van stress waar beschermende stoffen in weefselkweek een positief effect kunnen hebben. Dat zijn warmte-behandeling om pathogenen te verwijderen, cultuur van kleine stukjes weefsel, bijv. meristemen, en cryopreserving.



Er moet opgemerkt worden dat putrescine, proline en glycinebetaine zelf direct kwetsbare celcomponenten beschermen. Daarnaast zijn planten tijdens bepaalde ontwikkelingstoestanden meer tolerant tegen stress. Planten ontwikkelen bijv. rust om negatieve klimaatcondities te kunnen overleven. Dormante leliebolletjes overleven mannitol-stress, terwijl niet-dormante bolletjes dood gaan (De Klerk en Paffen, 1995). Behalve de direct beschermende stoffen kunnen in weefselkweek ook stoffen toegevoegd worden die indirect een beschermend effect hebben door zo'n ontwikkelingstoestand te induceren. Dit zijn signaalstoffen als ABA en salicylzuur. Voor salicylzuur is dit aangetoond bij tabak in vitro (Dat et al., 2000).

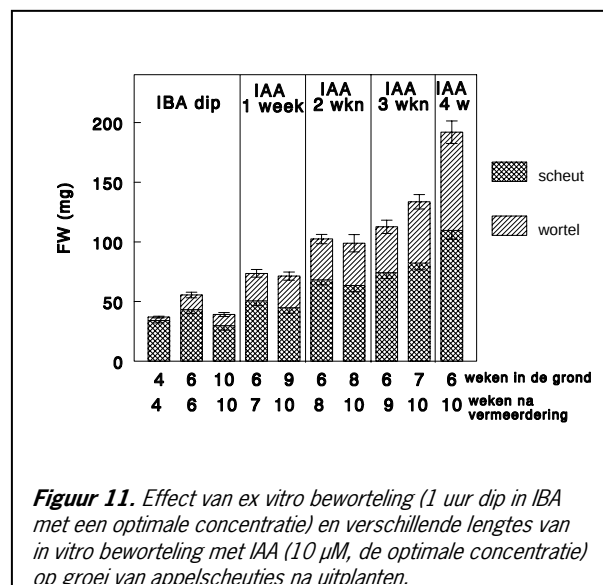
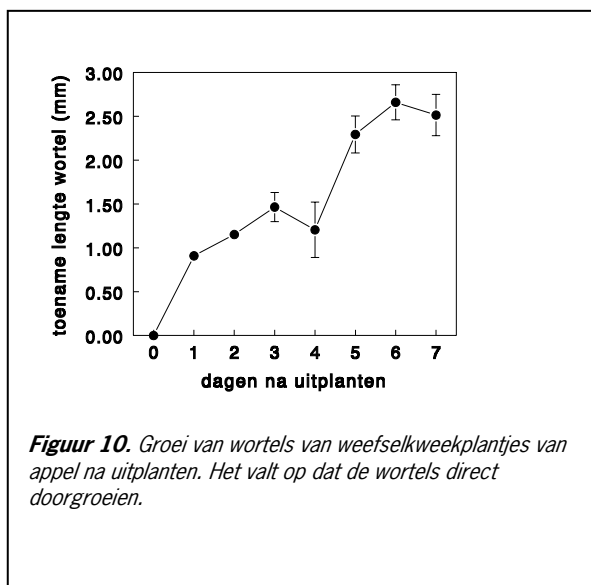
3.4 Extra nutriënten

Wanneer planten uit weefselweek naar de grond overgebracht worden, moeten ze voor energievoorziening overschakelen van heterotrofe groei (suiker=energie wordt uit de voedingsbodem opgenomen) naar autotrofe groei (suiker=energie moet door de plant zelf geproduceerd worden in de fotosynthese). Als er tijdens de weefselweek extra suiker wordt meegegeven kunnen de plantjes wellicht de overgang beter maken. Dat bleek bij roos zo te zijn (Fig. 9), maar bij andere gewassen was er geen of nauwelijks effect.



3.5 In vitro versus ex vitro beworteling

Omdat het niet goed mogelijk bleek de WRC van weefselkweekplantjes te verbeteren (zie 3.1), is het gewenst dat weefselkweekplantjes zo snel mogelijk na uitplanten een goed-functionerend wortelstelsel vormen om het waterverlies te kunnen aanvullen. Het zou daarom voordelig zijn om weefselkweekscheutjes in weefselkweek te bewortelen en met wortel uit te planten. Er wordt echter vaak aan getwijfeld of weefselkweek-wortels na uitplanten functioneren. Figuur 10 laat zien dat deze wortels na uitplanten direct doorgroeien. Dat hoeft nog niet te betekenen dat ze goed functioneren maar is er wel een aanwijzing voor. Figuur 11 laat zien hoe de groei is van scheutjes die in vitro een bewortelingsbehandeling hebben gekregen. Het is in dit geval (appel) gunstig om de scheutjes al in weefselkweek te wortels te laten vormen ('in-vitro beworteling') i.p.v. ze onbeworteld uit te planten. Bij gerbera was het minder gunstig. Bij lelie leek het weer wel gunstig. Per gewas moet uitgerekend worden of de voordelen (minder uitval + snellere groei) opwegen tegen de hogere kosten door het in weefselkweek bewortelen. Er moeten bij in-vitro beworteling nog een aantal opmerkingen gemaakt worden. (1) Bij in vitro beworteling produceren scheutjes veel ethyleen. Door Power Pellets in de containers te zetten, werd het negatief effect van ethyleen teniet gedaan (zie 3.2). (2) Tijdens de in-vitro beworteling kunnen stoffen die de groei na uitplanten bevorderen relatief eenvoudig worden toegediend (zie 3.3 en 3.4). (3) Bij beworteling in vitro, groeien de wortels in de agar, dus onder anaërobe condities. Het is bekend dat wortels van normale, ex-vitro groeiende planten (in uiterwaarden) dan negatieve signalen naar de scheut zenden: ze sturen minder cytokinine en meer ABA (abscisinezuur) en ACC (directe voorloper van ethyleen) naar de scheut (Jackson, 1997). Er zijn aanwijzingen gevonden dat dit ook bij in-vitro beworteling gebeurt. Omdat dit in het laatste half jaar van het project is gevonden, kon niet voldoende aandacht aan besteed worden. (4) Bij ex-vitro beworteling moet men op de tijd tussen snijden en bewortelingsbehandeling letten. Als scheutjes afgesneden zijn moet binnen enkele dagen een bewortelingsbehandeling gegeven worden, anders worden de scheutjes ongevoelig voor auxine (De Klerk et al., 1995). Bij ex-vitro beworteling is er daarom minder flexibiliteit wat betreft de timing van het uitplanten.



3.6 Effect ontwikkelingstoestand

In het kader van dit onderzoek zijn de fasenovergang van juveniel naar adult en het optreden van rust belangrijk.

De overgang van juveniel (plant kan niet bloeien) naar adult (plant kan wel bloeien) is in de literatuur vooral onderzocht bij houtige gewassen. Hier speelt een groot praktisch belang. I.h.a. kan als de overgang eenmaal gemaakt is, niet meer via stekken vermeerderd worden omdat de stek geen wortels meer kan vormen. Aan dit aspect is in dit project geen onderzoek gedaan. Leliebolletjes spruiten als ze deze overgang gemaakt hebben met een stengel en niet als een roset en groeien bijgevolg veel beter (Figuur 9). In dit project is onderzocht of hormonale toedieningen (alle vijf 'klassieke' hormonen) de fasenovergang bevorderen maar er was alleen een klein (maar statistisch significant) effect van gibberelline.

Van de fysiologische stadia is rust onderzocht. In eerder onderzoek bij lelie bleek dat er slechts enkele factoren het rustniveau sterk beïnvloeden (De Klerk en Gerrits, 1996). Dit is voor

de praktijk gunstig omdat het rustniveau dus goed voorspelbaar is en er steeds dezelfde rustdoorbrekingsbehandeling kan worden gegeven. In dit onderzoek zijn enkele experimenten gedaan met rustinductie in appel. In weefselweek van appel (en veel andere houtige gewassen) kunnen bruine knoppen gevormd worden. Men denkt dan meestal dat er sprake is van topnecrose. Wij vonden bij bepaalde condities, met name bij wat lagere temperatuur (15 °C) er meer bruine knoppen waren. Door toediening van fluridon was het aantal bruine knoppen veel minder. De doorgroei na uitplanten was slechter bij scheutjes met bruine knoppen. Deze gegevens bieden veel aanknopingspunten voor verder onderzoek aan de ontwikkeling van rust in houtige gewassen.



Figuur 12. Spruiten van lelie op de juveniele wijze (links) en de adulte wijze (rechts). Bij uitplanten waren de bolletjes even groot. De groei na spruiting op de adulte wijze is veel groter. (Foto: M. Langens)

4 Discussie

Het meeste onderzoek aan weefselweekvermeerdering betreft het ontwikkelen van protocols waarbij men zich meestal tevreden stelt met onderzoek aan initiatie, vermeerdering en beworteling. De aanpak in dit project was anders. Het ligt voor de hand dat de weefselweekcondities de fysiologische en ontwikkelingstoestand in van het weefselweekmateriaal beïnvloeden en het achterliggende doel van dit project was om door aanpassen van de weefselweek de fysiologische en ontwikkelingstoestand positief te beïnvloeden. Een dergelijke aanpak is in de wetenschappelijke literatuur niet of incidenteel terug te vinden. De beïnvloeding door de weefselweekcondities is enerzijds negatief: Weefselweekmateriaal heeft een slechte *Water Retention Capacity* (WRC) als gevolg van de hoge luchtvochtigheid in de *headspace* van weefselweekcontainers en door ethyleen dat in de *headspace* kan accumuleren wordt veroudering getriggert. Het is niet gelukt een bruikbare methode te vinden om de WRC van weefselweekmateriaal te verbeteren maar het negatieve ethyleen effect bleek met succes tegengegaan kunnen worden. Anderzijds kan weefselweekmateriaal tijdens de weefselweek positief beïnvloed worden en zo ‘geprogrammeerd’ te kunnen worden dat het beter presteert. Zo’n aanpak is vrijwel onbekend in de weefselweek vermeerdering. Er is alleen onderzoek gedaan aan het meegeven van extra nutriënten tijdens de weefselweek (onderzoek van de groep van Pierre Debergh in Gent). Ook wij vonden zo’n positief effect. In het huidige onderzoek zijn daarnaast stress-werende stoffen tijdens de weefselweek toegevoegd en het bleek dat die de groei na uitplanten konden bevorderen. Een derde aanpak in dit kader is de ontwikkelingstoestand van het materiaal te beïnvloeden. De rusttoestand kan hierbij belangrijk zijn. Rust is soms gewenst omdat het de weerbaarheid van het materiaal bevordert. Anderzijds kan rustontwikkeling de groei afremmen. Mogelijk speelt dit laatste probleem bij het afharden van pioenroos. Een andere ontwikkelingstoestand die van belang is, is de fasenverandering (van juveniel naar adult of omgekeerd). Het is gevonden dat bij lelie adult materiaal veel beter doorgroeit. Er was in dit onderzoek onvoldoende tijd om eventuele beïnvloedende factoren te identificeren. Er is aan de regulatie van fasenverandering in de literatuur veel onderzoek gedaan omdat het bij houtige gewassen van groot belang is, maar men tast vrijwel geheel in het donker.

Het gebied van dit onderzoek is erg breed en kon te weinig uitgediept worden. Het onderzoek heeft desalniettemin allerlei mogelijkheden geboden voor weefselweekvermeerdering. Buiten de weefselweek, m.n. bij voedingsgewassen, wordt steeds meer onderzoek aan beschermende stoffen gedaan waarbij deze stoffen worden “toegediend” door via genetische modificatie genen in te bouwen die er voor zorgen dat de planten extra beschermende stoffen gaan maken. Vaak heeft dit onderzoek zeer positieve resultaten. Een dergelijke aanpak in de sierteelt is moeizaam omdat de sierteelt zo veel gewassen en van ieder gewas zo veel rassen heeft. Toch zou voor de lange termijn overwogen kunnen worden of dergelijke genen ingebouwd kunnen worden in kruisingsouders. Toedienen van de stoffen zelf is in weefselweek eenvoudig maar buiten de weefselweek moeizaam omdat ze dan snel geconsumeerd zullen worden door micro-organismen. Toch zijn er wellicht mogelijkheden om de stoffen toe te dienen.

Verschillende zaken die onderzocht zijn, zijn in meer detail gepubliceerd (of zullen gepubliceerd worden) in wetenschappelijke artikelen (zie lijst output). Kopieën van deze artikelen kunnen opgevraagd worden bij de projectleider (geertjan.deklerk@wur.nl).

Referenties

- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H. & Scott, I.M. (2000) Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J. Plant Physiol.* 156: 659-665.
- Davies, W.J. & Santamaria, J.M. (2000) Physiological markers for microplant and root quality. *Acta Hort.* 530: 363-375.
- de Klerk, G.J.** (2000a): Rooting treatment and the ex-vitrum performance of micropropagated plants. *Acta Hort.* 530: 277-288.
- de Klerk, G.J. (2000b) Vermeerdering van weefselweekplanten in vloeibaar medium. Rapport COWT-Lisse
- de Klerk G.J. (2002a): Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38: 415-422.
- de Klerk G.J. (2002b): Rooting of microcuttings. In: Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkaki (eds.) *Plant Roots: the Hidden Half*. Marcel Dekker, New York. Pp 349-357.
- de Klerk, G.J.M. & Gerrits, M.M. (1996) Development of dormancy in tissue-cultured lily bulblets and apple shoots. In: *Plant Dormancy - Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Lang, G.A., ed.), CAB International, Wallingford, pp. 115-131.
- de Klerk, G.J., Keppel, M., ter Brugge, J. & Meekes, H. (1995) Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *J. Exp. Bot.* 46: 965-972.
- de Klerk, G.J. & Paffen, A. (1995) The effects of environmental conditions on sprouting of micropropagated lily bulblets with various levels of dormancy. *Acta Bot. Neerl.* 44: 33-39.
- Jackson, M. (1997) Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. *Trends Plant Sci.* 2, 22-28
- Langens-Gerrits, . & de Klerk G.J.M (1999): Micropropagation of flower bulbs. Lily and Narcissus. in: R.D. Hall (ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 111: *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 141-147.

5 Producten opgeleverd gedurende de gehele looptijd van het project

Output overige producten:

- Er zijn zakjes met Power Pellets voor toepassing in weefselkweek ontwikkeld om ethyleen en andere schadelijke organische gassen te verwijderen. Deze zakjes komen naar verwachting in de loop van 2004 op de markt.
- Er zijn verschillende makkelijk toepasbare procedures ontwikkeld om een betere kwaliteit te verkrijgen.
- Er is een toets ontwikkeld om de *Water Retention Capacity* te bepalen.

Output artikelen:

- G.-J. de Klerk, A. Paffen, J. Jasik & V. Haralampieva (1999) A dual effect of ethylene during rooting of apple microcuttings. In: A. Altman, M. Ziv, and S. Izhar eds. Proceedings Congress Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. Kluwer, Dordrecht. pp 41-44.
- G.-J. de Klerk, W. van der Krieken & J. de Jong (1999): The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In Vitro Cell. Dev. Biol. 35: 189-199.
- G.-J. de Klerk (2000): Rooting treatment and the ex-vitrum performance of micropropagated plants. Acta Hortic. 530: 277-288.
- H. Guan & G.-J. de Klerk (2000): Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermis. Sci. Hortic. 86: 23-32.
- G.-J. de Klerk & W. van der Krieken (2000): Stekbeworteling: tussen talk en gentechnologie. Vakblad voor de Bloemisterij 55 (4): 38-39.
- G.-J. de Klerk & W. van der Krieken (2000): Information exchange boosts progression. Prophyta november 2000: 28-29.
- G.-J. de Klerk & A. Paffen (2000): Ethyleen dwarsboomt weefselkweek. De Boomkwekerij 13 (50): 11.
- G.-J. de Klerk, J. Hanecakova and J. Jasik (2001): The role of cytokinins in rooting of stem slices from apple microcuttings. Plant Biosystems 135: 79-84.
- G.-J. de Klerk (2002): Rooting of microcuttings. In: Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkaki (eds.) Plant Roots: the Hidden Half. Marcel Dekker, New York. Pp 349-357.
- G.-J. de Klerk (2002): Rooting of microcuttings: theory and practice. In Vitro Cell. Dev. Biol. 38: 415-422.
- A. Calamar, and G.-J. de Klerk (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70: 207-212.
- G.-J. de Klerk (2004) Rapid progress in a poorly developed are. Prophyta annual 2004: 49-50.

Output lezingen:

Tijdens de looptijd circa 10 lezingen op nationale en internationale bijeenkomsten.