

VERSLAG

1989

CENTRAAL ONDERZOEKLABORATORIUM

VOOR DE

WEEFSELKWEK VAN TUINBOUWGEWASSEN

Het Centraal Onderzoeklaboratorium voor de Weefselkweek van Tuinbouwgewassen (COWT) is een samenwerkingsverband tussen het Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland (Aalsmeer), het Proefstation voor de Boomkwekerij (Boskoop) en het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (Lisse).

INHOUD

	blz.
Voorwoord	3
1. Samenstelling stuurgroep COWT	4
2. Personeel, stagiairs, volontairs	5
3. Onderzoekadviescommissie	6
4. Externe activiteiten	7
4.1. Congressen, studiereizen	
4.2. Voordrachten op symposia	
4.3. Overige voordrachten	
4.4. Organisatorische functies	
4.5. Publicaties	
5. Takoverschrijdend onderzoek	12
6. Takgericht onderzoek	17
6.1. Bloemisterijgewassen	17
6.2. Bol- en knolgewassen	19
6.3. Boomkwekerijgewassen	22

Voorwoord

Wat betreft de takoverschrijdende problemen heeft in het COWT-onderzoek de afgelopen drie jaar duidelijk een schifting plaats gehad. De meeste aandacht werd in 1988 besteed aan de afwijkingen-problematiek, de beworteling van scheuten en de ontwikkeling van rust in vitro. Bij ieder van deze onderzoeken was een full-time wetenschappelijk onderzoeker betrokken. De andere projecten werden bewerkt door gasten en stagiairs.

Begin 1990 is besloten om met het vertrek van Dr. Delvallée het onderzoek aan rust af te ronden en in het samenwerkingsverband met het CPO en het INRA een nieuw, vier jaar durend onderzoekproject te beginnen aan somatische embryogenese vanuit celsuspensies. Hiermee heeft het algemeen onderzoek van het COWT regeneratie als centraal thema gekregen. Het onderzoek aan somatische embryogenese en beworteling betreft de recalcitrantie bij resp. embryogenese en organogenese, en het onderzoek aan afwijkingen de variatie die bij geregenereerde planten wordt aangetroffen. Onderzoek aan deze problemen is van belang zowel voor de huidige problematiek bij weefselkweekvermeerdering als voor de lange termijn, nl. voor vermeerdering via somatische embryo's.

Bij het onderzoek aan algemene problemen zijn belangrijke vorderingen gemaakt. Het is eveneens gebleken dat de problematiek meestal complex is. Daarom is het van groot belang dat het COWT samenwerking zoekt met instituten en universiteiten zowel nationaal als internationaal. Nationaal is een nauwe samenwerking met het CABO tot stand gekomen op het gebied van de beworteling. Internationaal is het COWT actief in Europese COST-87 werkgroepen over beworteling, regeneratie van scheuten, variatie en somatische embryogenese. COST-87 vergoedt reis- en verblijfkosten voor bijeenkomsten en, incidenteel, voor studiereizen. Naast uitwisseling van gegevens en eventueel gemeenschappelijke projecten, kunnen deze COST-87-groepen de basis vormen voor nauwere samenwerkingsprogramma's waarvoor de EG in de toekomst ook onderzoekersplaatsen ter beschikking kan stellen. Uit de COST-87-groep *Malus* is reeds een BRIDGE-voorstel voortgekomen, gecoördineerd door CABO en COWT. Hier zal ongetwijfeld verdere samenwerking uit voortvloeien, ook als het voorstel niet gehonoreerd wordt.

April 1990, Dr. G.J.M. de Klerk

1. Samenstelling Stuurgroep Centraal Onderzoeklaboratorium voor de Weefselkweek van Tuinbouwgewassen (COWT)

Dr. R.J. Bogers (voorzitter) namens het Bestuur van het Laboratorium voor
Postbus 85 Bloembollenonderzoek
2160 AB Lisse

C.G. van Gelderen namens de Nederlandse Bond van Boomkwekers
Laag Boskoop 52
2772 GX Boskoop

J.C.M. Leenen namens de Koninklijke Algemeene
Rijksstraatweg 58 Vereeniging voor Bloembollencultuur
2171 AM Sassenheim (op voordracht van de Vereniging tot
Stimulering van de Vermeerdering van
Bolgewassen)

P.W. Lekkerkerk namens de Vereniging van Bloemenveilingen
Lookwatering 30 in Nederland (op voordracht van de
2635 CK Den Hoorn Vereniging van Nederlandse Tuinbouwstude-
groepen)

Dr. Tj. Reitsma namens het Bestuur van het Proefstation voor
Linnaeuslaan 2a de Bloemisterij in Nederland
1431 JV Aalsmeer

Ir. A. van der Schaaf namens het Bestuur van het Proefstation voor
Postbus 118 de Boomkwekerij
2770 AC Boskoop

adviseurs:

C.G.M. van Leeuwen namens het Produktschap voor Siergewassen
Postbus 93099
2509 AB Den Haag

Mevrouw Ir. G.M.J. Loeffen namens het Ministerie van Landbouw,
Postbus 20401 Natuurbeheer en Visserij, Directie Akkerbouw
2500 EK Den Haag en Tuinbouw

2. Personeel COWT

Directeur-beheerder	Dr. R.J. Bogers, LBO
Hoofd laboratorium	Dr. G.J.M. de Klerk, COWT
Onderzoekers algemene problematiek	Dr. G.J.M. de Klerk, COWT Ir. M. Benschop, CABO Dr. H. Bouman, SBW (tot 30-9-'89); COWT (vanaf 1-10-'89) Dr. I. Delvallée, INRA Ing. J. ter Brugge, COWT Th.L.J. Duineveld, COWT (tot 31-3-'89) Ing. A.M.G. Paffen, COWT S. Kostak, Aegean Agricultural Research Institute, Turkije (15-3-'89 tot 15-10-'89) G. Meis, COWT (stagiair, 16-1-'89 tot 11-5-'89) L. Cuijpers, COWT (stagiaire, 20-3-'89 tot 9-5-'89) Drs. A.J.R. van den Berg, COWT/KUN (volontair, vanaf 1-10-'89)
Onderzoekers bloemisterijgewassen	Dr. ir. H.J. van Telgen, PBN Ing. A.M.A. van Mil-Vieveen, PBN
Onderzoekers bolgewassen	Dr. P.C.G. van der Linde, LBO Ing. G.M.G.M. Hol, LBO Drs. A.T.H. te Boekhorst, LBO (vanaf 15-1-'89) Drs. P.M. van der Duyn Schouten, LBO (volontair, tot 30-4-'89) H. de Waal, LBO (stagiair, 1-1-'89 tot 1-10-'89)
Onderzoekers boomkwekerijgewassen	Ir. B.P.A.M. Kunneman, PB Ing. M.R.J. Albers, PB A. de Regt, PB (stagiaire, 2-1-'89 tot 1-4-'89) E. Janssen, PB (stagiaire, 20-3-'89 tot 9-6-'89)

3. Onderzoekadviescommissie

Namens COWT:

Dr. G.J.M. de Klerk (voorz.), ir. M. Benschop (secr.), dr. H. Bouman,
ir. B.P.A.M. Kunneman, dr. P.C.G. van der Linde, dr. ir. H.J. van Telgen.

Namens de Nederlandse Vereniging van Weefselkweekbedrijven:

J.H.M. Zuidgeest, ing. E.J. Jannink.

4. Externe activiteiten

4.1. Onderzoekdagen

Het COWT heeft op 23-11-'89 een onderzoekdag gehouden voor het weefselkweekbedrijfsleven. Deze dag werd door 80 personen bezocht. Acht toeleveringsbedrijven verzorgden produktdemonstraties. Er werden de volgende lezingen gepresenteerd:

Opening (R. Bogers).

De Produktgroep Weefselkweek van de VGB (A. van den Berg).

Invloed van containers op de groei in weefselkweek (B. Kunneman).

Vermeerdering van *Paeonia* in weefselkweek (M. Albers).

Bolinductie en -groei in in vitro vermeerderde irisscheuten (P. v.d. Linde).

Weefselkweek van cyclamen: alternatieve methoden (H.J. van Telgen).

Rust bij in vitro geproduceerde leliebolletjes (G.J. de Klerk).

Weefselkweeksymposium Italië: indrukken (H.J. van Telgen).

'The molecular basis of aging': consequenties voor weefselkweek (P. van der Linde).

Vermeerdering van *Malus* in weefselkweek (B. Kunneman).

Daarnaast waren er posters over de vermeerdering in vitro van *Calathea* (A. van Mil en H.J. van Telgen) en *Tilia* (B. Kunneman en M. Albers), cryopreservering van leliemeristemmen (H. Bouman), somaklonale variatie (H. Bouman, J. ter Brugge en G.J. de Klerk) en beworteling van appelscheuten (M. Benschop, J. ter Brugge en G.J. de Klerk).

Op 28-9-'89 heeft het COWT, in samenwerking met de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek, een symposium georganiseerd met als thema somaklonale variatie. Aan dit symposium werd door ca. 150 personen deelgenomen.

4.2. Congressen, studiereizen

De COWT-medewerkers hebben, op enkele uitzonderingen na, deelgenomen aan de verschillende symposia van de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek. Daarnaast werd deelgenomen aan de volgende symposia en bijeenkomsten.

M.R.J. Albers

- Studiereis Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau, Bad Zwischenahn, Duitsland (21-9-'89 en 22-9-'89).

- EG-COST 87 werkgroep 'Malus' (1-11-'89 tot 3-11-'89, Boskoop).

M. Benschop

- EG-COST 87 werkgroep 'Malus' (2-11-'89 en 3-11-'89, Boskoop).

R.J. Bogers

- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (5-10-'89 en 6-10-'89, Wageningen).

H. Bouman

- Flow cytometry in botanical science (5-10-'89, Amsterdam)

I. Delvallée

- Réunion du Groupe Dormance (20-1-'89, Clermont-Ferrand).
- The impact of biotechnology in agriculture (10-7-'89 tot 12-7-'89, Amiens)
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (5-10-'89 en 6-10-'89, Wageningen)

G.J.M. de Klerk

- Risicoanalyse van transgene planten (18-1-'89, Wageningen)
- French-Dutch Biotechnology Symposium (8-5-'89 en 9-5-'89, Wageningen).
- In vitro culture and horticultural breeding (30-5-'89 tot 3-6-'89, Cesena).
- The impact of biotechnology in agriculture (10-7-'89 tot 12-7-'89, Amiens).
- EG-COST 87-werkgroep 'Advanced plant regeneration' (13-9-'89 tot 15-9-'89, Rome).
- Flow cytometry in botanical science (5-11-'89, Amsterdam).
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (5-10-'89 en 6-10-'89, Wageningen).
- EG-COST 87-werkgroep 'Malus' (1-11-'89 tot 3-11-'89, Boskoop).

B.P.A.M. Kunneman

- Risicoanalyse van transgene planten (18-1-'89, Wageningen).
- Studiereis naar Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau, Bad Zwischenahn, Duitsland (21-9-'89 en 22-9-'89).
- EG-COST 87-werkgroep 'Malus' (1-11-'89 tot 3-11-'89, Boskoop).
- EG-COST 87 Management Committee (12-12-'89 en 13-12-'89, Brussel).

P.C.G. van der Linde

- NATO Advanced Study Institute on Molecular basis of plant aging (26-6-'89 tot 8-7-'89, Ribadesella, Spanje).
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (5-10-'89 en 6-10-'89, Wageningen).

A.M.G. Paffen

- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (5-10-'89 en 6-10-'89, Wageningen).

H.J. van Telgen

- Detectietechnieken micro-organismen, (16-2-'89, Wageningen).
- In vitro culture and horticultural breeding (30-5-'89 tot 3-6-'89, Cesena).
- EG-COST 87-werkgroep 'Advanced plant regeneration' (13-9-'89 tot 15-9-'89, Rome).
- Detectie en Biotechnologie (5-10-'89, Wageningen).

4.3. Voordrachten op symposia

M. Benschop

- Peroxidase-activiteit en beworteling bij in vitro geproduceerde scheuten van *Malus*. 16-3-'89, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (poster, mede namens J. ter Brugge en G.J. de Klerk).

R.J. Bogers

Op het ISHS-symposium on flowerbulbs, 9-7-'89 tot 13-7-'89, Seattle:

- Micropropagation of bulbous iris (lezing, mede namens P.C.G. van der Linde en G.M.G.M. Hol).
- Warm-water treatment reduces contamination in twin-scale explants of *Narcissus* (poster, mede namens P.C.G. van der Linde en G.M.G.M. Hol).
- The development of dormancy in lily bulblets generated in vitro (lezing, mede namens A.M.G. Paffen, I. Delvallée, P. Aguetzaz en G.J. de Klerk).

H. Bouman

- Cryopreservering van leliemeristemen. 16-3-'89, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (poster, mede namens G.J. de Klerk).

I. Delvallée

- The effect of temperature on the development of dormancy in lily bulblets cultured in vitro. 10-7-'89 tot 12-7-'89, The impact of biotechnology in agriculture, Amiens (poster, mede namens A.M.G. Paffen, P. Aguetzaz en G.J. de Klerk).

P.M. van der Duyn Schouten

- Bruikbaarheid van beschikbare selectiemarkers voor transformatie van schubweefsel van *Lilium*. 16-3-'89, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (poster, mede namens P.C.G. van der Linde).

G.M.G.M. Hol

- Reductie van besmetting in dubbelschubexplantaten van *Narcissus*. 16-3-'89, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (poster, mede namens P.C.G. van der Linde).

G.J.M. de Klerk

- Dormancy induction in lily bulblets cultured in vitro. 16-3-'89, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (lezing, mede namens I. Delvallée, A.M.G. Paffen en P.C.G. van der Linde).
- Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. 31-5-'89, In vitro culture and horticultural breeding, Cesena (lezing, mede namens J. ter Brugge, M.J.M. Smulders en M. Benschop).
- Cryopreservation of lily meristems. 10-7-'89 tot 12-7-'89, The impact of biotechnology in agriculture, Amiens (poster, mede namens H. Bouman).
- The development of dormancy in vitro. 14-9-'89, COST-87 working group 'Advanced plant regeneration' Rome (lezing).
- Een toets voor somaklonale variatie. 28-9-'89, NVPW: Najaarssymposium 'Somaklonale variatie', Wageningen (lezing).

P.C.G. van der Linde

- Hormone action and sensitivity. Possible relation to aging; en: Modulation, purification and function of a soluble auxin receptor. 26-6-'89 tot 8-7-'89, NATO Advanced Study Institute on Molecular basis of plant aging, Ribadesella (lezingen).
- Somaklonale en epigenetische variatie bij lelie. 28-9-'89, NVPW: Najaarssymposium 'Somaklonale variatie', Wageningen (lezing).

H.J. van Telgen

- Weefselkweek van cyclamen. 16-3-'89, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (lezing).
- Micropropagation of *Cyclamen persicum*. 14-9-'89, COST 87 working group 'Advanced plant regeneration, Rome (lezing).

4.4. Overige voordrachten

I. Delvallée:

- 17- 1-'89 CABO, Wageningen
- 6-10-'89 Deelnemers overleg INRA, IVT en COWT, Wageningen

G.M.G.M. Hol:

- 9- 2-'89 KAVB afdeling Texel

G.J.M. de Klerk:

- 11- 1-'89 Docenten Groente- en Bloementeelt, Den Bosch
- 25- 1-'89 AHS, Utrecht
- 30- 1-'89 KAVB afdeling Groningen
- 22- 2-'89 NTS studieclub West-Friesland
- 2- 3-'89 Dutch-German Workshop on secondary plant products from in vitro cultures
- 9- 3-'89 Cursisten RMTuS Hoorn
- 31- 3-'89 Veiling Flora
- 12- 5-'89 AHS, Den Bosch
- 19- 5-'89 TNO, Fytotechnologie, Leiden
- 23- 6-'89 Cursus Plantenbiotechnologie, CAH, Dronten

B.P.A.M. Kunneman:

- 16- 2-'89 Studieclub Opheusden
- 27- 2-'89 Boomteeltvakschool, Vught
- 12- 7-'89 PB
- 13- 7-'89 NVWB
- 15- 9-'89 NAKB
- 15-11-'89 Onderzoekers CNIH, St. Germain- en- Laie

P.C.G. van der Linde:

- 9- 2-'89 KAVB afdeling Texel
- 9- 3-'89 Cursisten RMTuS Hoorn
- 13- 3-'89 Neversie, Akersloot
- 15- 3-'89 NTS lelie, Lisse
- 21- 4-'89 Cursisten Veredeling Siergewassen, RMTuS, Lisse
- 24- 4-'89 Veredelingsgroep lelie van de KAVB, Alkmaar
- 28- 4-'89 Cursisten Veredeling Siergewassen, RMTuS, Lisse

G. Meis:

- 12- 5-'89 AHS, Den Bosch

A.M.G. Paffen:

- 6-10-'89 Deelnemers overleg INRA, IVT en COWT, Wageningen

H.J. van Telgen:

- 20- 3-'89 KNTP afdeling Wassenaar
- 14- 4-'89 Studenten Wye College, Lisse

4.5. Organisatorische functies

- R.J. Bogers
- Secretaris-generaal van het VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture
 - Lid van de NRL0-taakgroep 'Weefselkweek en Regeneratie'
- M. Benschop
- Secretaris van de studiegroep Weefselkweek
 - Lid van de COST-87-werkgroep *Malus*
- G.J.M. de Klerk
- Voorzitter van de studiegroep Weefselkweek
 - Secretaris van de NRL0-taakgroep 'Weefselkweek en Regeneratie'
 - Lid van de COST-87-werkgroep 'Advanced plant regeneration'
 - Coördinator van de COST-87-werkgroep 'Shoot regeneration and variation'
- B.P.A.M. Kunneman
- Lid van de COST-87-werkgroep *Malus*
 - National delegate COST-87
 - Lid begeleidingscommissie PCLB
 - Lid adviescommissie weefselkweek boomkwekerij
 - Coördinator van de COST-87-werkgroep 'Regeneration of roots'
- P.C.G. van der Linde
- Secretaris van de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek

4.6. Publicaties

Diverse mededelingen

13. M.R.J. Albers & C. Drijver: *Acer lobelii* uit weefselkweek groeit goed. De Boomkwekerij 2(32):26-27.
14. G.M.G.M. Hol & P.C.G. van der Linde: Weefselkweek van narcis: warmwaterbehandeling reduceert besmetting. Vakwerk 63(22):12-13.
- 8a. G.J.M. de Klerk, P. Aguetaz, A.M.G. Paffen & P.C.G. van der Linde: Diepte van rust is te beïnvloeden. Vakblad voor de Bloemisterij 44 (23):46-47.
15. B.P.A.M. Kunneman & M.R.J. Albers: Weefselkweek bij *Tilia* blijkt goed mogelijk. De Boomkwekerij 2(16):10-11.
16. B.P.A.M. Kunneman & M.R.J. Albers: Weefselkweek van pioen verloopt moeizaam en traag. De Boomkwekerij 2(37): 18-19 en Vakblad voor de Bloemisterij 44(35):56-57.
17. H.J. van Telgen & A.M.A. Vieveen: Ziektevrij materiaal *Calathea* uit weefselkweek. Vakblad voor de Bloemisterij 44 (25): 42-43.
- 17a. H.J. van Telgen & A.M.A. Vieveen: Krankheitsfreie *Calathea* aus der Gewebekultur. Deutscher Gartenbau 43 (30) 1820-1821.

5. Takoverschrijdend onderzoek

5.1. Rust in vitro

Onderzoekers: I. Delvallée, A.M.G. Paffen, L. Kuypers, A.J.R. van den Berg en G.J.M. de Klerk.

Bij veel gewassen treedt tijdens de normale groei een rustperiode op. Tijdens de kweek in vitro gaan sommige gewassen eveneens in rust. Soms is deze rust zo diep, dat groei en ontwikkeling geheel tot stilstand komen. Dit is bijvoorbeeld het geval bij *Skimmia*. Het COWT gebruikt bij het onderzoek aan de ontwikkeling van rust in vitro lelie als modelgewas.

Tijdens kweek in vitro van leliebolletjes wordt rust geïnduceerd. Teneinde de bolletjes ex vitro te laten uitgroeien dient de rust vóór uitplanten in de grond te worden doorbroken met een koudebehandeling. Vorig jaar is gerapporteerd over het effect van verschillende weefselkweekfactoren op de inductie van rust. Dit jaar is een aantal factoren opnieuw onderzocht, namelijk temperatuur, suiker, GA_3 en ABA. De resultaten van vorig jaar werden grotendeels gereproduceerd. Opgemerkt dient te worden dat GA_3 bij $25^\circ C$ geen effect had (bij $20^\circ C$ wel) en dat ABA het spruitingspercentage niet beïnvloedde maar wel een gering effect had op de snelheid van spruiten. Toediening van een osmoticum (mannitol) of andere suikers (fructose + glucose in plaats van saccharose) veroorzaakte een zeer laag spruitingspercentage na koudebehandeling. Hierdoor kon niets gezegd worden over het effect op rust (toxisch effect?).

Vorig jaar werd beschreven dat onder standaardcondities ($20^\circ C$, 3% saccharose) rust in de tweede helft van de cultuur geïnduceerd werd, namelijk van 6 tot 10 weken. Met onze normale meetmethode voor rust, bepaling van het spruitingspercentage van bolletjes zonder koudebehandeling, kunnen buiten deze periode geen betrouwbare resultaten verkregen worden. Dit jaar hebben we aangetoond dat tot ca. 7 weken geen rust geïnduceerd wordt (met behulp van overzet-experimenten van $20^\circ C$ naar $15^\circ C$) en dat na 11 weken nog steeds 'extra' rust geïnduceerd wordt (met behulp van verschillende koudebehandelingen).

Het belangrijkste resultaat van dit jaar is dat na de inductie van rust in vitro het aantal schubjes per bolletje blijft toenemen. Er is dus geen sprake van dat de ontwikkeling van het bolletje stilstaat. De inductie van rust valt wel samen met een verandering in de primordia: als er rust geïnduceerd is (bij $20^\circ C$ na 8 weken; bij $25^\circ C$ na 3 à 4 weken) kunnen uit het primordium alleen schubjes ontstaan. Vóór de inductie van rust kan uit het primordium zowel een schubje als een schubje met daarop een blaadje ontstaan. Bij $15^\circ C$ wordt geen rust geïnduceerd en houden de primordia het vermogen om zich tot schubjes met daarop blaadjes te ontwikkelen. Er moet op gewezen worden dat dit tot nu toe alleen onderzocht is tijdens de teelt in vitro bij bolletjes die nog aan het explantaat vastzitten. Of hetzelfde plaats vindt na uitplanten wordt nu onderzocht. Uit de literatuur is bekend, dat in knoppen van houtige gewassen (peer) die in rust zijn, het vers- en drooggewicht en het aantal schubben tijdens de rustperiode toenemen.

Op biochemisch niveau is gevonden dat er grote verschillen zijn tussen bolletjes die bij verschillende temperaturen zijn geteeld wat betreft katalase-activiteit en vrije-aminozuurinhoud (speciaal proline). Om de toestand van de membranen te karakteriseren is de lekkage van aminozuren bepaald: hier bleek bij toenemende incubatietemperatuur de lekkage toe te nemen.

De resultaten suggereren dat de lekkage pas begint toe te nemen bij temperaturen boven 17°C. Deze temperatuur is ook voor de ontwikkeling van rust mogelijk het 'breekpunt'.

Tenslotte is er een begin gemaakt met moleculair werk. In samenwerking met de universiteit van Nijmegen zal onderzocht worden of de inductie van rust gepaard gaat met verschillen in nieuw-gesynthetiseerde eiwitten en in mRNA-populaties.

Het onderzoek aan de ontwikkeling van rust in vitro is in een vergevorderd stadium gekomen. Er zijn daarom discussies gevoerd of dit onderzoek zal worden voortgezet en zo ja, in welke richting.

5.2. Uniforme groei van weefselkweekplanten

Onderzoekers: G. Meis, B.P.A.M. Kunneman en G.J.M. de Klerk.

In 1989 heeft het onderzoek zich toegespitst op het effect van het containertype op de groei in vitro. Er werd een groot aantal typen kuipjes onderzocht. De kuipjes waren van de volgende grondstoffen gemaakt: polypropyleen, polystyrol, polyester, polyvinylchloride, polycarbamaat en durovinyl. Naast de kuipjes zelf werden ook in stukken geknipte kuipjes in weckpotten en verschillende grondstoffen onderzocht. Als testgewassen dienden *Gerbera 'Joyce'*, *Gerbera "1089"*, *Prunus blireiana*, *Prunus glandulosa* 'Alboplena' en *Micranthemum umbrosium*. Voor geen van de typen kuipjes en grondstoffen werd een duidelijk effect gevonden in de twee cycli die onderzocht zijn. In 1990 zal het onderzoek op grotere schaal worden herhaald. Het onderzoek gebeurt in samenwerking met de Produktgroep Weefselkweek van de VGB.

5.3. Achtergronden van verschillen in beworteling van in vitro gekweekt plantmateriaal

Onderzoekers: M. Benschop, J. ter Brugge en G.J.M. de Klerk.

Beworteling van scheuten vormt in de praktijk vaak een groot probleem, vooral bij houtachtige gewassen. Onderzoek aan recalcitrantie bij beworteling kan daarom ook kennis opleveren over recalcitrantie bij de regeneratie van scheuten en somatische embryo's.

De beworteling is afhankelijk van (1) de genetische achtergrond van de scheut, (2) de fysiologische conditie van de scheut (het aantal malen doorvermeerderen en de omstandigheden tijdens de laatste vermeerderingscyclus), (3) het type weefsel waarin de nieuwe wortels gevormd worden (hoofdscheut/zijnscheut; lengte scheut) en (4) het bewortelingsmedium. Deze factoren hebben waarschijnlijk een complexe wisselwerking. De regeneratie van wortels kan in vier fasen onderverdeeld worden: inductie van celdeling, celdeling, redifferentiatie tot wortelprimordia en uitgroei van de wortelprimordia. Het is niet bekend in welke fase slechte bewortelaars geremd zijn. Daarom is het van belang markers te hebben voor de verschillende fasen van het bewortelingsproces. Op het COWT wordt gezocht naar specifieke isoenzymen. Dit onderzoek heeft reeds geresulteerd in een marker voor het aantal wortels dat gevormd wordt (zie jaarverslag 1988). In het afgelopen jaar is deze correlatie enkele malen opnieuw gevonden. In een aantal andere gevallen kon evenwel geen correlatie worden aangetoond.

In 1989 is het CABO eveneens begonnen aan onderzoek naar de beworteling

van *Malus*-scheuten in vitro. De taakverdeling is dat het COWT zich zal concentreren op het weefselkweekniveau en het CABO op het hormonaal en moleculair niveau. In de eerste plaats worden op het COWT modelsystemen opgezet. Hiertoe worden de appelonderstammen 'M 9' en 'Jork', de appelcultivar Elstar en de pereonderstam 'Leskovacz' onderzocht. De appelonderstam 'M 9' kan geklassificeerd worden als een onderstam die redelijk bewortelt, en 'Jork' als een onderstam die goed bewortelt. De pereonderstam bewortelt slecht. Van de appelcultivar Elstar waren diverse subklonen aanwezig, waarvan de bewortelingspercentages variëren. Van de appelonderstammen en van 'Elstar' is bekend, dat het bewortelingspercentage en het aantal wortels toeneemt met het aantal vermeerderingscycli. Deze toename in beworteling is nog niet waargenomen bij de pereonderstam Leskovacz.

Bij de start van het onderzoek bleken bijna alle scheuten waterig te worden. Hetzelfde werd door andere COWT-onderzoekers bij *Malus* waargenomen. Deze vitrificatie werd waarschijnlijk door de agar veroorzaakt. De nieuwe partij Difco Bacto agar was van een andere samenstelling. Er werden daarom agars van diverse leveranciers getest. De resultaten behaald met BBL-granulated agar waren te vergelijken met de resultaten behaald met de 'oude' Difco Bacto agar. De overgang van (goede kwaliteit) Difco Bacto agar naar BBL-granulated agar gaf een geringe terugslag te zien zowel voor de vermeerderingsfactor als voor het bewortelingspercentage.

Alle gewassen werden vermeerderd op MS-medium aangevuld met vitaminen, hormonen en suiker. Als koolstofbron werd saccharose of sorbitol gebruikt. Sorbitol is een suiker die van nature in appelscheuten voorkomt. Voor saccharose werd een cyclus van 4 weken en voor sorbitol een cyclus van 6 weken aangenomen. De vermeerderingsfactor van 'Leskovacz' en van 'Jork' was groter als de scheuten in een medium met sorbitol hadden gestaan. Voor 'M 9' en 'Elstar' waren deze verschillen niet zo groot. Onderzocht werd het effect van het aantal weken op vermeerderingsmedium tijdens de laatste vermeerderingscyclus op de beworteling. De lengte van de laatste vermeerderingscyclus was voor zowel saccharose als sorbitol 4, 6 of 8 weken. Het hoogste bewortelingspercentage en de meeste wortels per bewortelde scheut werden gevonden bij een vermeerderingscyclus van 4 weken voor saccharose en een cyclus van 6 weken voor sorbitol bij de appelonderstammen 'M 9' en 'Jork' en bij 'Elstar'. Bij de pereonderstam 'Leskovacz' was een vermeerderingscyclus van 4 weken voldoende bij zowel saccharose als sorbitol. Er was geen verschil tussen dosis responscurves voor IBA bij scheuten die resp. vroeg en laat tijdens de vermeerderingscyclus geoogst waren.

5.4. Fenotypische en genotypische stabiliteit van in vitro geproduceerde planten

Onderzoekers: H. Bouman, J. ter Brugge en G.J. de Klerk.

Bij regeneratie van planten uit cellen treedt vaak somaklonale variatie op: door mutaties is de geregenereerde plant niet identiek aan de oorspronkelijke plant. Daarnaast kunnen ook epigenetische (= niet-erfelijke) afwijkingen t.o.v. de moederplant optreden. Het doel van het onderzoek is deze afwijkingen tegen te gaan. Hiertoe wordt het effect van cultuurcondities, uitgangsmateriaal en genotype op de mate van variatie onderzocht (zie ook het onderzoek aan lelie, 6.2).

Het onderzoek richt zich in eerste instantie op ontwikkeling van een methode om de mate van somaklonale variatie te bepalen. In een in 1989 geschreven overzichtsartikel (G.J. de Klerk: 'How to measure

somaclonal variation: a review'; verschijnt in juni 1990 in Acta Botanica Neerlandica) zijn de verschillende mogelijkheden op een rijtje gezet. De conclusie is dat er nog geen adequate, snelle en makkelijk uitvoerbare meetmethode bestaat. Een mogelijke toets die in dit overzichtsartikel wordt voorgesteld en in een experimenteel artikel wordt uitgewerkt is de bepaling van de waarde van de variatie-coëfficiënt voor een kwantitatieve parameter in een somaklonale populatie (zie hier onder).

Als modelgewas wordt *Begonia x hiemalis* cv. Schwabenland Rot gebruikt. Bij deze plant treden volgens vroeger onderzoek veel afwijkingen op na cultuur in vitro. Regeneratie van plantjes werd via de volgende methoden verkregen:

1. directe knopvorming op bladexplantaten ingezet op verschillende voedingsmedia,
2. knopinductie op callus. Dit callus was geïnduceerd op blad, bloemsteel of meristeem, op verschillende wijze aangehouden (variabele cyclus, hormonen, tijdsduur) en daarna voor scheutinductie gebruikt. De regeneratiecapaciteit van de calluskweken op hoog 2,4-D liep snel terug.

Een mogelijkheid voor een toets voor somaklonale variatie is de bepaling van afwijkingen in isoenzym patronen van individuele planten. In isoenzym patronen van peroxidase werden echter geen verschillen gevonden die een maat waren voor de variabiliteit per groep. Wel zijn de peroxidasepatronen zeer kenmerkend voor de fysiologische toestand van het explantaat of plantonderdeel (inductiemedium, leeftijd, ontwikkelingsstadium, e.d.). In het medium werden eiwitten (o.a. peroxidases) afgescheiden die dit patroon deels volgden. In het beginstadium bevinden zich hieronder, speciaal in callus-induceerende media, eiwitten die de regeneratie bevorderen.

Een andere methode om op plantniveau de mate van variatie te bepalen is de spreiding van een kwantitatieve eigenschap in een somaklonale populatie (zie boven). Deze methode is nauwkeuriger en vergt minder planten dan het gebruikelijke tellen van kwalitatief afwijkende planten. Wij vonden met deze methode dat de standaarddeviatie in de bladvorm significant groter was bij een groep planten die op hoog-2,4-D callus geïnduceerd was dan bij groepen van laag-2,4-D callus en direkt gevormde knoppen op bladexplantaten. De gemiddelde bladvorm was in alle gevallen hetzelfde, wat een epigenetisch effect onwaarschijnlijk maakt. Om deze bepalingmethode te evalueren wordt nu ook met behulp van mutagentia variatie geïnduceerd, waarna de variatie in de bladvorm op dezelfde wijze gemeten wordt.

Het effect van weefselkweekomstandigheden op de mate van somaklonale variatie kan het best bestudeerd worden in planten geregenereerd in celsuspensies. Daarom is in 1989 een begin gemaakt met het opzetten van dergelijke culturen voor *Begonia*. Dit onderzoek zal in 1990 worden voortgezet. Er zal eveneens gekeken worden of dergelijke culturen voor andere gewassen gemakkelijker zijn op te zetten. De eerste keus is *Pelargonium*. Van dit gewas is het optreden van somaklonale variatie goed beschreven.

5.5. Uitscheiding van toxische stoffen tijdens kweek in vitro

Onderzoekers: S. Kostak, Th.L.J. Duineveld en H.J. van Telgen.

Door personeelwisseling binnen het COWT is er in het verslagjaar minder tijd aan dit project besteed dan de bedoeling was. De nieuw ontwikkelde nitrobenzeenmethode bleek bij een nadere bestudering toch niet geschikt voor een betrouwbare kwantitatieve bepaling van uitgescheiden fenolen zodat weer is teruggegaan naar de Folin-bepaling. Ondanks diverse herhalingen konden

geen betrouwbare resultaten verkregen worden met betrekking tot het uitscheidingspatroon.

Het lag in de bedoeling om *Aconitum* in het onderzoek te betrekken. Hoewel de plantjes redelijk tot goed groeiden, bleek een hardnekkige inwendige infectie aanwezig te zijn die de waarnemingen ongewenst zou kunnen beïnvloeden. Daarom is verder van dit voornemen afgezien.

Geprobeerd is een biotoets te ontwikkelen voor de mate van giftigheid van de uitscheiding. Kiemingsremming van waterkers bleek niet geschikt: zowel op medium met als zonder exudaat was het kiemingspercentage bijna 100. Groei-remming van tabakscallus was ook niet geschikt. Het exudaat leek de groei van callus juist licht te stimuleren. Dit zou kunnen betekenen dat het exudaat niet toxisch is voor planten. Hierbij moet echter een groot voorbehoud gemaakt worden omdat geen kwantitatieve proeven gedaan zijn.

5.6. Cryopreservering

Onderzoekers: H. Bouman en G.J. de Klerk.

Cryopreservering (bewaring in vloeibare stikstof bij -196°C) is van groot belang voor de instandhouding van waardevol genenmateriaal. Dit geldt speciaal voor soorten en cultivars die niet-uitdrogbare zaden hebben, niet zaadvast zijn of alleen vegetatief vermeerderd kunnen worden. Meristemen zijn het aangewezen materiaal om te bewaren, omdat ze bij hergroei de minste kans op afwijkingen geven. Anderzijds is de cryopreservering van meristemen, vergeleken met cel-, callus- en embryomateriaal, moeilijk.

Als modelsysteem kozen wij adventieve meristemen op lelieschubben. Ter voorbereiding op het invriezen werden twee behandelingen toegepast:

1. 'freeze-hardening', het verbeteren van de bestandheid tegen invriezen.

Gekozen werd voor opkweek bij lage temperatuur en op wateronttrekkende media (hoge suikerconcentratie) gedurende verschillende tijden.

2. 'cryoprotection', het behandelen met beschermingsmiddelen tegen vries-schade. Wij gebruikten dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol en/of suiker in verschillende concentraties en gedurende verschillende tijden.

Beide behandelingen werden in verschillende combinaties toegepast, waarna het materiaal geprogrammeerd werd ingevroren of direkt in vloeibare stikstof gedompeld.

Voor overleving was 'freeze-hardening' noodzakelijk; opkweek van de afgesneden primordia voor minstens 1 week bij 5°C was een vereiste. Zonder cryoprotectie werd eveneens geen overleving gevonden; 15% glycerol plus 5% suiker bleek het beste beschermingsmiddel, als het gedurende 24 uur bij 5°C kon inwerken vóór het geprogrammeerde invriezen. In deze combinatie bedroeg de overleving 20%, een veelbelovend begin voor meristemen-cryopreservering. De combinatie, bescherming met 5% DMSO (in laten werken tijdens de week 'freeze-hardening') en dan direkt dompelen in vloeibare stikstof, gaf 8% overleving, terwijl andere combinaties nog minder succes hadden.

De verkregen bolletjes worden voorjaar 1990 uitgeplant om de soorttecht-heid te onderzoeken.

6. Takgericht onderzoek

6.1. Bloemisterijgewassen

Onderzoekers: H.J. van Telgen, A. van Mil, S. Kostak.

Cyclamen

Het onderzoek aan cyclamen richtte zich in 1989 op twee aspecten:

(1) Is het mogelijk om in vitro geïnduceerde scheutjes na overzetten op een geschikt medium aan te zetten tot knolvorming in vitro en vervolgens te bewortelen? Dit zou een behoorlijke tijdwinst bij de afharding/opkweek kunnen betekenen. Bovendien opent dit mogelijkheden om te vermeerderen door parteren van de (schone) in vitro knolletjes.

(2) Is het mogelijk een stabiele calluskweek op te zetten om hieruit via een proces van somatische embryogenese steeds weer nieuwe plantjes te regenereren? Hierbij is het uiteraard zeer belangrijk dat het aantal afwijkende plantjes beperkt blijft.

Met betrekking tot (1) is het onderzoek moeizaam verlopen. Het gehele jaar werden bij het opzetten van nieuwe culturen problemen ondervonden. Hoge besmettingsgraad van de uitgangsplanten en zeer lage regeneratiepercentages waren er de oorzaak van dat uiteindelijk maar een klein aantal plantjes in vitro werd verkregen. Bij deze plantjes konden in vitro geen knollen geïnduceerd worden, zelfs niet na lange tijd op knolinducerend medium. Beworteling was wel mogelijk en de plantjes konden zonder veel problemen afgehard worden. Voor 1990 staat een herhaling van deze experimenten gepland. Bij deze nieuwe experimenten zal ook gekeken worden of het tijdstip van knolinductie voor of na de wortelvorming moet liggen.

Onderzoek (2) werd ook geplaagd door de hoge besmettingsgraad. Geprobeerd werd embryogeen callus te induceren op standaardmedium (zowel vast als vloeibaar) met als hormonen benzyladenine (BA) alleen of in combinatie met verschillende hoeveelheden naftylazijnzuur (NAA) of 2,4-dichloorfenoxazijnzuur (2,4-D). Het meeste callus werd gevormd op vast medium met 2.2 μM BA en 1.1 μM 2,4-D. Na overzetten op vast medium zonder 2,4-D ontstonden slechts bij een heel klein aantal explantaten organen of embryo's. Bij veel explantaten trad bruinkleuring op en kwam de callusgroei tot stilstand. Toevoeging van 1 μM zilvernitraat ging dit proces tegen.

Enkele goed ontwikkelde embryogene calli werden opgedeeld en naar vloeibaar medium gebracht om een celsuspensiecultuur op te zetten. De culturen werden gekweekt in het donker op een roterende schudder (80 rpm). In geen van de gebruikte media werd een celsuspensie verkregen. Wel groeiden de calli uit tot forse, vrij harde callusklompen. Behalve in medium met hoge concentratie groeiregulator (2.2 μM BA en 4.5 μM 2,4-D) trad in alle gevallen spontaan massale scheutvorming op. Het was niet mogelijk dit proces te beheersen. Daarnaast waren veel scheuten glazig geworden. Er zullen nog enkele experimenten worden uitgevoerd worden om te onderzoeken of het regeneratievermogen na langdurige kweek behouden blijft, of scheutinductie op vast medium tot minder glazigheid leidt en of het aantal afwijkers binnen de perken blijft.

Calathea

Begin 1989 waren met de basismethode een redelijk grote partij *C. ornata* en een kleine partij *C. makoyana* opgebouwd. Grootschalige vermeerdering in vitro werd bemoeilijkt door een vrij lage vermeerderingsfactor (gemiddeld 2,5 nieuwe knoppen per cyclus van vier weken). Om kostprijsconcurrerend te kunnen zijn met traditioneel vermeerderd materiaal is een hogere vermeerderingsfactor gewenst.

Bij *C. ornata* is onderzocht wat de invloed van begingewicht, licht, temperatuur en groeiregulatoren op de vermeerderingsfactor is. Het bleek dat knoppen met een startgewicht onder 50 mg een duidelijk lagere vermeerdering ten opzichte van het gemiddelde vertoonden. Als het startgewicht hoger was dan 50 mg had dit geen significant effect. Standaard werden in de verdere vermeerderingsexperimenten knoppen van 50-150 mg gebruikt.

Het gebruik van wisselende dag/nacht temperaturen (30/25, 27,5/22,5, 25/20, alles in °C) en/of verschillende lichtintensiteiten (21 W.m⁻² of 13 W.m⁻²) gaf eerder een verlaging dan een verhoging ten opzichte van de vermeerdering onder standaardomstandigheden (25/25°C, 21 W.m⁻²).

De rol van groeiregulatoren bij de vermeerdering werd onderzocht door verschillende soorten en concentraties cytokininen te testen. Gebruikt werden o.a. kinetine (al dan niet in combinatie met 2-isopentenyladenine (2-iP), BA alleen of in combinatie met de auxintransportremmer trijodobenzoëzuur (TIBA). Bij geen enkele combinatie of concentratie trad een significante verhoging van de vermeerderingsfactor ten opzichte van de standaardconcentratie (4,4 µM) BA op.

Beworteling vormde geen probleem. Vaak vond reeds spontaan wortelvorming plaats op het vermeerderingsmedium met BA. Deze wortels waren echter niet functioneel: het bleek dat plantjes na oppotten een grote groefachterstand opliepen ten opzichte van plantjes die een bewortelingsbehandeling hadden gekregen. Deze behandeling bestond uit vier weken op standaardmedium zonder hormoon of met 2,0 µM auxine (indolazijnzuur of -boterzuur). Het bleek heel goed mogelijk de scheutjes in vitro in een ander substraat dan agar te bewortelen, vooropgesteld dat saccharose in het medium aanwezig was. Steenwolplugjes gaven daarbij een iets hoger bewortelingspercentage te zien dan agar, terwijl perlite en sorbarods juist iets lager uit vielen. Voor begin 1990 ligt het in de bedoeling te onderzoeken of directe beworteling in steenwolpluggen haalbaar is. Daarmee zal het onderzoek aan *Calathea* worden afgesloten.

Nieuwe gewassen

Van een aantal slecht vermeerderbare, maar potentieel interessante, Australische gewassen is onderzocht of in vitro vermeerdering mogelijk is. Het ging hierbij om de gewassen *Ptilotus macrocephalus*, *Elaeocarpus reticulatus* en *Pimelea spectabilis*. Er zijn een aantal oriënterende proeven gedaan. Daaruit bleek dat vooral de twee eerstgenoemde gewassen moeilijk te vermeerderen en sterk verontreinigd waren. In de zes maanden van deze proef kon geen vermeerderingsprotocol voor deze twee gewassen opgesteld worden. Inmiddels is normale vermeerdering van *Ptilotus* wel mogelijk gebleken. Voor *Pimelea* werd wel een basisprotocol ontwikkeld. Hoewel dit zeker nog niet optimaal is (topnecrose, soms callusvorming, beworteling niet onderzocht) is verder onderzoek hieraan gestopt.

6.2. Bol- en knolgewassen

Onderzoekers: P.C.G. van der Linde, G.M.G.M. Hol, A.H.T. te Boekhorst, P.M. van der Duyn Schouten en H. de Waal.

Iris

Het afgelopen jaar werd geprobeerd methodes op te stellen voor inductie van bollen uit minstens vijf keer vermeerdere scheuten en voor groei van deze bollen. Hiertoe werd een groot aantal experimenten uitgevoerd. De uitkomsten kunnen als volgt worden samengevat.

Voor optimale inductie van bollen was een koudebehandeling van 8 weken 5°C nodig. Deze kon het best worden gegeven 3 tot 6 weken na het overzetten van 7 weken oude scheuten uit de vermeerdering op bolgroeimedium (1/2 x MS, 0,4 mg/l thiamine, 100 mg/l inositol, 50-70 g/l saccharose, 6 g/l agar (Bacto-agar, Difco), pH = 5,5). Voor de koudebehandeling werden de scheuten in het licht gekweekt bij die temperatuur, waarbij ze vermeerderd waren. Na de koudebehandeling werden de scheuten bij 20°C in het donker gekweekt. Na 14 weken konden er ongeveer 2 bolletjes/scheut geoogst worden. Het gewicht van de bolletjes per scheut was ongeveer 500 mg. De scheuten konden het best vermeerderd worden bij 15°C. Scheuten die bij 20°C vermeerderd waren gaven een lager percentage bolvorming, een hoger percentage bolletjes met een laag gewicht (kleiner dan 100 mg) en een hoger percentage gesproten bolletjes op het moment van oogsten dan scheuten, die bij 15°C waren vermeerderd. De bolletjes bleken na een droge bewaring van 6 weken bij 30°C goed aan te slaan in de grond. Hiermee is het vermeerderingsonderzoek aan iris afgesloten. Een volledig protocol voor de vermeerdering van iris is aan belangstellenden uitgereikt op de onderzoekdag van het COWT.

Hyacint

Er werd onderzoek gedaan aan de groei van plantjes uit 1e en 2e fase in vloeibaar medium onder verschillende lichtomstandigheden en het effect daarvan op de doorgroei na planten in grond. Het bleek dat de kleur van het licht een grote invloed had op de groei van de plantjes. Bij rood licht en in het donker bleef de groei achter en werden veel plantjes glazig in vergelijking tot het materiaal dat bij normaal TL- en blauw licht werd gekweekt. De plantjes uit de laatste twee behandelingen overleefden de overgang naar de grond ook beter en groeiden aanmerkelijk beter uit.

Op grond van eerdere gegevens werd de relatie onderzocht tussen de mate van rust in de geproduceerde bolletjes en de lichtomstandigheden tijdens de kweek. Een aantal proeven bevestigden de vorig jaar verkregen resultaten, maar er werden ook tegenstrijdigheden gevonden. Het lijkt erop dat bolletjes gekweekt onder blauw licht dieper in rust zijn dan bolletjes die in het donker zijn gekweekt. Rood licht voorkomt rust in de bolletjes, evenals normaal TL-licht. Deze voorlopige resultaten zullen dit jaar bevestigd moeten worden.

Op grond van deze resultaten is getracht een relatie te leggen tussen de peroxidase-, invertase- en amylase-activiteit en de mate van rust. De enzymactiviteit werd zowel bepaald in het weefsel als in het medium. De activiteit in het medium is het resultaat van uitscheiding door het weefsel. Er werden grote verschillen gevonden in uitgescheiden peroxidase- en amylase-activiteit onder verschillende lichtomstandigheden. Deze verschillen waren niet aantoonbaar tussen de onder dezelfde lichtomstandigheden verkregen

bolletjes (met uitgescheiden enzym-activiteit). Ook deze resultaten zullen dit jaar moeten worden bevestigd. Verder werd getracht om bolletjes uit weefselkweek in substraatteelt te laten groeien. Alhoewel de opkomst van de bolletjes zeer groot was, was de groei allerbelabberd. Komend jaar zal getracht worden het substraat medium voor bolgroei te optimaliseren.

Narcis

Het onderzoek naar een optimale warmwaterbehandeling ter voorkoming van besmetting in dubbelschubexplantaten werd afgerond. Een behandeling van 1 uur 54°C bleek een vermindering van de besmetting van 40-60% tot bijna 0% te geven. Deze behandeling kon zelfs na 5 maanden droge bewaring van de bollen bij 30°C nog met succes worden uitgevoerd. Ook een hogere temperatuur (58 of 62°C) verminderde de besmetting maar er trad geen regeneratie meer op. Een lagere temperatuur (50°C) gaf al een redelijke vermindering van de besmetting maar niet zo veel als 54°C. Een langere behandeling (2 of 3 uur) gaf geen beter resultaat, maar de geregeneerde bolletjes hadden de neiging veel blad te vormen. Deze gegevens werden verkregen met de cultivar Golden Harvest. Er werd onderzocht of een zelfde behandeling ook kon worden toegepast bij andere cultivars, namelijk Carlton, Tête à Tête, Saint Patrick's Day, Tahiti en Dick Wilden. Ook voor deze narcissen werd de behandeling met succes uitgevoerd, zelfs na 5 maanden bewaring van de bollen bij 30°C.

Het onderzoek naar het voorkomen van slapers heeft dit jaar nog niet tot succes geleid. Getracht werd om de vorming van slapers te voorkomen door de bolletjes niet bij een constante temperatuur (15°C) maar bij een dag/nacht ritme in temperatuur (10/20°C, elk 12 uur per dag) te kweken. Dit had echter geen enkel effect. Dit jaar zal getracht worden met andere middelen de inductie van slapers te voorkomen.

Lelie: het ontstaan van afwijkingen

Bolletjes van cv. White Mountain werden 10 keer doorvermeerderd op medium met verschillende concentraties benzyladenine (BA). Daarna werden de bolletjes op 30 en 60 g/l saccharose bevattend medium gezet zonder BA om voldoende groot te worden. Op dit medium trad nog sterke vermeerdering op bij bolletjes, die tijdens het vermeerderen op 0,3-3 mg/l BA in het medium hadden gekregen. Hierna kregen de bolletjes een koudebehandeling van 12 weken 5°C of van 13 weken 2°C en vervolgens werden ze in de kas geplant. Na opkomst werden de bladafwijkingen waargenomen. Het percentage kromme en verbogen bladeren was lager, naarmate de bolletjes meer BA in het medium hadden gekregen tijdens de vermeerdering. Deze afwijking werd over het algemeen meer gevonden bij de bolletjes, die de 2°C behandeling hadden ondergaan. Het percentage vlekkerige en verkleurde bladeren nam toe met de BA-concentratie. Ook deze afwijking was groter bij de bolletjes die de 2°C behandeling hadden ondergaan. Het geheel doet sterk denken aan koudeschade, hetgeen mogelijk ook in relatie kan staan met de auxineconcentratie in het medium. Het bladmateriaal van deze planten is verzameld en zal in 1990 aan biochemische analyse worden onderworpen. Tevens zal er een experiment met nieuw uitgangsmateriaal worden opgezet, waarbij tijdens de vermeerdering ook de auxineconcentratie zal worden gevarieerd.

Transformatie van bloembolgewassen

Bij bolschubweefsel van lelie werd de bruikbaarheid van een aantal beschikbare selectiemarkers voor transformatie getest. Kanamycine en neomycine werden niet bruikbaar geacht, omdat bij 100 mg/l van deze stoffen nog volop regeneratie optrad. Dit werd niet gevonden wanneer hygromycine B en meta-thraxaat werden gebruikt in dezelfde concentratie. Verder is getracht een callus- en celsuspensiecultuur op te zetten. De resultaten uit deze experimenten waren zeer wisselend. Vier voor het transformatieonderzoek benodigde cultivars van lelie zijn in weefselkweek gebracht.

6.3. Boomkwekerijgewassen

Onderzoekers: B.P.A.M. Kunneman, M.R.J. Albers, A. de Regt en E. Janssen.

Malus

Het onderzoek aan de vermeerdering van *Malus* via weefselkweek geniet een brede belangstelling. Vooral bij de snelle introductie van nieuwe onderstammen, nieuwe rassen en in de toekomst dwergrassen op eigen wortel biedt weefselkweek perspectieven. Weefselkweek is eveneens van groot belang voor genetische manipulatie. In aansluiting op het onderzoek van de voorgaande jaren richtte het onderzoek zich vooral op de beworteling van moeilijk te vermeerderen cultivars, toetsing van de toepasbaarheid van de opgestelde methodes bij nieuwe onderstamtypen en het acclimatiseren van planten.

Agar

Eind 1988 is een batch Difco Bacto agar gebruikt die waarschijnlijk een slechte kwaliteit had en daardoor een slechte invloed had op alle appelcultivars die in cultuur waren. Vervolgens is overgeschakeld op een andere agar. Er zijn zeven agars getest. Bij alle agars is een concentratie van 6 g/l gebruikt. Als toets-appel is *Malus* 'COST' gebruikt. Van deze appel is de vermeerdering gedurende 4 cycli gevolgd. Tevens is 3 maal beworteld. Er was geen duidelijk verschil in vermeerderingsfactor bij de verschillende agars. Eén agar veroorzaakte soms waterigheid. Gewassen Difco-Bacto gaf gemiddeld de beste vermeerdering. Bij de beworteling waren de verschillen groter. De agar 'BBL granulated' bleek een goede vervanger voor Difco agar en vanaf mei 1989 is deze agar gebruikt in het verdere onderzoek.

Nieuw in cultuur

De aanlooperperiode van de sierappels 'Rudolph' en 'Red Sentinel' en de consumptie-appel 'Alkmene' zijn duidelijk verschillend. Van *Malus* 'Rudolph' waren na één jaar voldoende scheuten verkregen voor bewortelingsproeven. Het bewortelingspercentage was gemiddeld 67. Voor een eerste keer is dat zeer hoog. Bij de beworteling van deze cultivar worden geen problemen verwacht. 'Red Sentinel' vermeerdert trager en strekt nauwelijks. De beworteling kan pas in 1990 worden onderzocht. 'Alkmene' blijft last houden van waterigheid. Bij deze cultivar is zelfs na één jaar nog geen goede vermeerdering bereikt.

In 1989 zijn er drie experimenten gedaan om de initiatiefase te verbeteren. In het eerste experiment werd aan het standaard initiatie-medium met saccharose of sorbitol (30 g/l) phloroglucinol (80 mg/l) toegevoegd. Er werd uitgegaan van meristemen van *Malus* 'M 9' kloon T337 en *Malus* 'COST'. Toevoegen van phloroglucinol aan het medium had geen effect. Bij media met sorbitol zagen de explantaten er beter uit. Van T337 was na 2 maanden nog 39% van de explantaten over.

Uiteindelijk stierf na overenten op het standaard vermeerderingsmedium alles af. Bij *Malus* 'COST' waren vrijwel alle meristemen geïnfecteerd.

In de tweede proef is de invloed van de cytokinines BA en 2-IP onderzocht bij 15°C en bij 20°C. Deze proef is ingezet met meristemen van 'M 9' kloon Nicolai. Binnen 4 weken was 50% uitgevallen door infectie. De meristemen waren bij 15°C beter gegroeid dan bij 20°C. Bij de lagere concentratie BA was de groei het beste. Bij 2-IP in concentraties van 0,2 en 1,0 mg/l waren de meristemen ook redelijk uitgegroeid.

Bij het laatste experiment is niet uitgegaan van meristemen maar van scheuttopjes. Na ontsmetting met CaOCl werden de scheuttopjes op het initiatie-medium met 0,04 mg/l BA geplaatst. Er is materiaal ingezet van de

'M 9' klonen Nicolai 29, T340 en T338, 5 nieuwe pereonderstammen en 2 nieuwe appelonderstammen. Het infectiepercentage was laag; uitval werd meer veroorzaakt door afsterven. In cultuur zijn verkregen 'M 9' klonen Nicolai 29 en T340, de pereonderstammen ZPO2, ZPO4 en ZPO5 en de appelonderstammen P16 en P22. Eind 1989 zijn de eerste bewortelingsproeven met P16 en P22 gedaan. Op standaard bewortelingsmedium met proline (100 mg/l) en riboflavine (1 mg/l) en 0,8 mg/l IAA waren de bewortelingspercentages resp. 26 en 63.

Regeneratie van scheuten

In de toekomst zal genetische manipulatie mogelijk worden gebruikt bij de veredeling van *Malus*. Daarom is nagegaan of bij enkele cultivars regeneratie kon worden verkregen. Dit bleek bij alle cultivars mogelijk hoewel de frequentie laag was. De ontstane scheutjes worden nu vermeerderd, en beworteld en uitgeplant om na te gaan in hoeverre er bij de regeneratie genetische afwijkingen zijn ontstaan.

Meristeeemcultuur van planten met een getransformeerd wortelstelsel

Van *Malus*-planten die in 1987 met behulp van *Agrobacterium rhizogenes* van een getransformeerd wortelstelsel waren voorzien, zijn meristemen in weefselkweek gebracht. De meristemen bleken, na toetsing, niet getransformeerd. Uitgaande van de meristemen is een beperkt aantal scheuten vermeerderd en vervolgens beworteld. De scheuten afkomstig van planten met een getransformeerd wortelstelsel bewortelden veel beter dan die afkomstig van planten die geen getransformeerd wortelstelsel hadden.

Groeivergelijking

Van drie klonen van *Malus* 'M26', vermeerderd via weefselkweek of via aflaggers, zijn in Horst moerbedden aangelegd. Tevens zijn 50 onderstammen per groep geoculeerd met een toetsras. De groei en produktie van de verkregen moerbedden en vruchtbomen wordt gedurende een aantal jaren gevolgd.

Rhododendron

Als afsluiting van dit project is in de serie rapporten van het proefstation in Boskoop verschenen: Vermeerdering van *Rhododendron* via weefselkweek, rapport 7.

Acer

Acer wordt in de praktijk vermeerderd door enten of oculeren. Enkele soorten, o.a. *Acer lobelii*, blijken vaak onverenigbaar te zijn met de gebruikelijke onderstammen. Stekresultaten bij *Acer* zijn vaak zeer slecht. Het doel van het weefselkweekonderzoek bij *Acer* was in eerste instantie om een vermeerderingsmethode te vinden voor *A. lobelii*. De opgestelde methode bleek echter alleen voor *A. lobelii* geschikt te zijn: pogingen om andere soorten *Acer* op dezelfde wijze in cultuur te brengen mislukten telkens weer. In voorgaande jaren is onderzocht of verandering van het initiatiemedium bij *A. platanoides* 'Crimson King', *A. platanoides* 'Royal Red', *A. platanoides* 'Erectum' en *A. palmatum* tot verbetering leidde. De meeste ingezette knoppen reageerden evenwel geheel niet en de okselknoppen die wel uitliepen stierven na verloop van tijd af.

In 1989 is onderzocht of voorbehandeling van de moerplanten door bespuiten met BA, GA₃ of BA + GA₃ een positief effect op de initiatie heeft.

Vanaf februari werden de moederplanten in een verwarmde kas (20°C) met bijbelichting geteeld. Elke week werden de planten bespoten met een oplossing van 100 ppm GA₃ en/of BA. Van de uitgelopen scheutjes van deze planten werden de okselknoppen gebruikt voor initiatie. De knoppen werden op het standaard Acer-medium (0.2 g/l actieve kool) geplaatst met BA (concentraties; 0, 0,25; 1,0 of 4,0 mg/l), 2-IP (1,0 of 4,0 mg/l) of thiadiazuron (0,02; 0,1; 0,5 of 1,0 mg/l). Er is vier keer materiaal ingezet van *A. platanoides* 'Crimson King', *A. platanoides* 'Erectum' en *A. palmatum*. De eerste twee series (half en eind maart) hadden geen uitgelopen okselknoppen tot resultaat. Bij de derde serie (half april) liep van *A. 'Erectum'* en van *A. 'Crimson King'* 14% uit. Hiervan had een derde deel een voorbehandeling gehad met BA (15 stuks). Bij de vierde serie (eind mei) werd er geen rekening meer gehouden met de voorbehandeling omdat er te weinig materiaal was. Van *A. 'Royal Red'* liep 17% van de okselknoppen uit, van *A. 'Crimson King'* 7% en van *A. 'Erectum'* 5%. Alle uitgelopen knoppen werden in juli overgezet op vers medium. De knoppen groeiden echter niet verder uit maar gingen in rust. Een koude periode van 2 maanden brak de rust niet. Eind november zijn de nog groene knoppen overgezet op het standaard Acer-medium.

Paeonia

In de praktijk bestaat veel belangstelling voor de vermeerdering van *Paeonia* via weefselkweek. Dit wordt veroorzaakt door een toenemende vraag, vooral door een groeiende export. Doordat de vermeerdering via scheuren traag verloopt, kan onvoldoende aan de vraag worden voldaan. Een snelle vermeerderingsmethode is ook van belang voor virusvrij gemaakt materiaal. Daarom is in 1984 begonnen met onderzoek naar vermeerdering van *Paeonia*.

Beworteling

In 1989 was het onderzoek voornamelijk op de beworteling gericht. Omdat ook in vitro de vermeerdering traag verloopt, was er toen pas voldoende materiaal hiervoor beschikbaar. De experimenten zijn, tenzij anders vermeld, uitgevoerd met *Paeonia lactiflora* 'Sarah Bernhardt'. Het bewortelingsmedium was op hormoon- en suikerconcentratie na hetzelfde als het vermeerderingsmedium (1 mg/l IBA i.p.v. 1 mg/l BA, en 30 g/l saccharose i.p.v. 20g).

In de eerste proef zijn periodes kou (4°C) van 0, 2, 4, en 6 weken gecombineerd met opkweektemperaturen van 5, 10, 12,5 en 15°C. Tien weken nadat de explantaten bij de opkweektemperatuur waren geplaatst, werd het bewortelingspercentage en het aantal wortels bepaald. Uit de resultaten viel geen conclusie te trekken.

Bij het tweede experiment is het effect van licht (donker, rood, wit), gecombineerd met diverse opkweektemperaturen (5, 10, 12,5 en 15°C) onderzocht. Een duidelijk temperatuureffect werd niet waargenomen. Wel was de beworteling in donker beter dan in wit en rood licht. De beste behandeling in deze proef was opkweek in donker bij 12,5°C. Het bewortelingspercentage was 80. Deze proef is ook uitgevoerd met *P. suffruticosa*. De resultaten waren slecht. Slechts 2 van de 293 explantaten vormden een wortel. Kwalitatief zagen de explantaten er slecht uit.

Daarna is onderzocht wat het effect was van het auxinetype en de concentratie op de beworteling. Onderzocht werden IAA, IBA en NAA in de concentraties 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 en 2,0 mg/l. De resultaten met NAA waren het slechtst. IBA en IAA in de twee laagste concentraties gaven het hoogste percentage beworteling, nl. bijna 60%. Tenslotte is het effect onderzocht van de suikerconcentratie op de beworteling. Aan het standaard

bewortelingsmedium was 15, 20, 25, 30 of 35 g/l saccharose toegevoegd. De standaardconcentratie, 30 g/l, kwam er als beste uit.

Afharden

De bewortelde explantaten zijn gebruikt om de eerste afhardexperimenten in te zetten. De pioenen werden 2-4 min. gedompeld in een fungicide-oplossing en daarna opgepot in een mengsel van half turf /half zand, of half turf/ half perlite. De opkweek vond plaats in klimaatkasten bij 5, 10 of 15°C, een daglengte van 16 uur en een lichtintensiteit van 9 W/m². Twee maal per week werden de pioenen bespoten met fungiciden.

De groei in het zandmengsel bleef de eerste 3-4 weken bij alle drie de temperaturen achter ten opzichte van de groei in het perlitemengsel. Ook was de kleur van de pioenen in zand iets donkerder. In zijn geheel genomen was er veel uitval door schimmels. De niet-geïnfecteerde pioenen groeiden goed uit. Ook de wortelstelsels groeiden redelijk tot goed door. Na 10 weken zijn de planten overgebracht naar een koude kas in Boskoop. Daar zal de groei worden gevolgd.

Om het infectiepercentage bij de tweede afhardproef omlaag te brengen zijn de explantaten langer (minimaal 5 min.) in de fungicide-oplossing gedompeld. Bij deze proef werd de daglengte gevarieerd: 8, 12 of 16 uur, 9 W/m². Na een week strekten de eerste pioenen al. Ook nu bleven planten in zand de eerste vier weken in groei achter ten opzichte van planten in perlite. Na drie weken was er een duidelijk daglengte-effect. Bij een toenemende daglengte nam de strekking en ook de bladgrootte toe. Het verschil in strekking vervaagde in de loop van 10 weken, maar het verschil in bladgrootte bleef, enigszins afgezwakt, bestaan tot het moment dat ook deze proef naar Boskoop is overgebracht. In 1990 wordt nagegaan hoe de verdere groei verloopt.

Tilia

De vermeerdering van *Tilia* op onderstam leidt soms tot veel opslag. Daarnaast zijn de zaailingonderstammen nogal variabel hetgeen de homogeniteit van het eindprodukt niet ten goede komt. *Tilia* op eigen wortel vermeerderd door afleggen, stekken of weefselkweek heeft deze problemen niet. Als afsluiting van het weefselkweekgedeelte van dit project is nagegaan of de beworteling van *T. euchlora* verbetert naarmate het aantal doorlopen vermeerderingscycli toeneemt. Het percentage bewortelde scheuten na 3, 4, 5, 7 en 9 cycli bedroeg resp. 15, 30, 55 en 93. Ook is *Tilia* gebruikt om te bepalen welke agar geschikt is voor de vermeerdering. In tegenstelling tot *Malus* waren de resultaten bij de verschillende agartypen min of meer vergelijkbaar.

Gedurende een aantal jaren zal nu de groei van de vermeerderde planten worden vergeleken met die van op andere manieren vermeerderde planten.

Wisteria

In de praktijk wordt *Wisteria* via enten vermeerderd. Vereenvoudiging en versnelling van dit vermeerderingssysteem is gewenst. Weefselkweek van cultivars zou een oplossing kunnen bieden voor problemen als opslag en het onvoldoende beschikbaar zijn onderstammen. Tot nu toe vormen infecties van het uitgangsmateriaal, ook al wordt dit in de kas opgekweekt, een groot probleem. Daarnaast groeien de explantaten slecht, is er een overmatige callusproductie en vergelen de bladeren snel. Zowel *Wisteria floribunda* als

Wisteria sinensis vertoont deze verschijnselen. In 1989 zijn geen nieuwe proeven ingezet. In 1990 zal worden uitgegaan van zaailingen om de mediumsamenstelling te optimaliseren.