

VERSLAG

1988

CENTRAAL ONDERZOEKLABORIUM
VOOR DE
WEEFSELKWEK VAN TUINBOUWGEWASSEN

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	11
6. Takgericht onderzoek	15
6.1. Bloemisterijgewassen	15
6.2. Bol- en knolgewassen	17
6.3. Boomkwekerijgewassen	19

Voorwoord

Voor een brede, succesvolle toepassing van weefselkweekvermeerdering is het vereist, dat de resultaten van het fundamenteel en toegepast wetenschappelijk onderzoek snel doorstromen naar de praktijk. Het COWT speelt hier op het ogenblik een tweeledige rol. Het COWT licht de telers voor over de mogelijkheden en onmogelijkheden van de nieuwe biotechnologische methoden. Daarnaast heeft het COWT nauwe contacten met het weefselkweekbedrijfsleven en de veredelaars. Als aanvulling op voordrachten, op artikelen in vakbladen en wetenschappelijke tijdschriften en op informele contacten, heeft het COWT in 1988 voor het eerst een onderzoekdag georganiseerd voor bedrijven die zelf weefselkweek doen. Zo'n dag zal in 1989 wederom georganiseerd worden. Het is te hopen dat door deze dagen de contacten tussen COWT en bedrijfsleven versterkt worden en dat mede daardoor weefselkweekbedrijven, veredelaars en telers optimaal gebruik zullen maken van de nieuwe biotechnologische methoden.

Brede toepassing van weefselkweekvermeerdering in de praktijk wordt bemoeilijkt door verschillende problemen. Op het ogenblik lijken het optreden van afwijkingen en de hoge kostprijs van weefselkweekplantjes hiervan de belangrijkste. Wat betreft het tweede probleem zijn er twee oplossingsrichtingen: robotisering van de bestaande weefselkweekmethoden en ontwikkelen van nieuwe gemakkelijk automatiseerbare weefselkweekvermeerderingsmethoden. De eerste oplossingsrichting ligt op het gebied van de robotica en wordt door sommige technisch georiënteerde bedrijven nagestreefd. Het ligt in de verwachting dat de tweede oplossingsrichting meer kans van slagen heeft. Hier speelt evenwel, naast verschillende andere problemen, eveneens de afwijkingen-problematiek. Vanwege het brede belang van de afwijkingen-problematiek, is besloten dat een nieuw aan te stellen wetenschappelijk onderzoeker op het COWT zich geheel aan deze problematiek gaat wijden. Er moet op gewezen worden dat de afwijkingen-problematiek buitengewoon gecompliceerd is en dat er zowel nationaal als internationaal weinig onderzoek gedaan wordt aan de achtergronden. De nieuwe COWT-onderzoeker zal zich in eerste instantie gaan bezig houden met het ontwikkelen van een toets voor afwijkingen. Dit onderzoek, en vooral het vervolg-onderzoek dat er opgericht zal zijn afwijkingen tegen te gaan, heeft ondersteuning op fundamenteel niveau nodig. Het is daarom zeer gewenst dat het advies van de NRLO-taakgroep 'Weefselkweek en Regeneratie' om het fundamenteel onderzoek aan de afwijkingen-problematiek uit te breiden, op korte termijn zal worden opgevolgd.

Geert-Jan de Klerk, juni 1989.

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

Dr. R.J. Bogers (voorzitter) namens het Bestuur 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 Vereniging 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 Tuinbouwstudie-
groepen)

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

Ir. A. van der Schaaf namens het Bestuur Proefstation voor de
Postbus 118 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 en
Postbus 20401 Visserij, Directie Akkerbouw en Tuinbouw
2500 EK Den Haag

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 Dr. P. Aguetaz, INRA (tot 29-2-'88) Ir. M. Benschop, CABO Dr. H. Bouman, SBW (vanaf 1-7-'88) Dr. I. Delvallée INRA (vanaf 16-4-'88) Ing. J. ter Brugge, COWT Th.L.J. Duineveld, COWT Ing. A.M.G. Paffen, COWT A.J.H. Beijerbergen van Henegouwen, COWT (stagiair, tot 1-5-'87) S. van Eeden, COWT (stagiair, 1-2-'88 tot 15-6-'88)
Onderzoekers bloemisterijgewassen	Dr. ir. H.J. van Telgen, PBN Ing. J.Ch. Hakkert, PBN (tot 1-5-'88) Ing. A.M.A. Vieveen, PBN (vanaf 1-9-'88)
Onderzoekers bolgewassen	Dr. P.C.G. van der Linde, LBO Ing. G.M.G.M. Hol, LBO Drs. P.M. van der Duyn Schouten, LBO (volontair vanaf 1-5-'88)
Onderzoekers boomkwekerijgewassen	Ir. B.P.A.M. Kunneman, PB Ing. M.R.J. Albers, PB

3. Onderzoekadviescommissie

Namens COWI:

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

Namens Nederlandse Vereniging van Weefselkweekbedrijven:

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

4. Externe activiteiten

4.1. Onderzoekdag COWT

Het COWT heeft op 26-10-'88 een onderzoekdag gehouden voor het weefselkweekbedrijfsleven. Deze dag werd door 76 personen van 44 bedrijven bezocht. Er werden de volgende lezingen gepresenteerd:

- Openingstoespraak (R.J. Bogers).
- Relatie COWT en weefselkweekbedrijven (J. Marelis, voorzitter NVWB).
- Somaklonale variatie (G.J. de Klerk).
- Groei-afwijkingen bij in vitro geteelde leliebolletjes (P.C.G. van der Linde).
- Beworteling van appelscheuten (M. Benschop).
- Uitscheiding van toxische stoffen door *Delphinium*-explantaten (H.J. van Telgen).
- Rust bij in vitro geteelde leliebolletjes (G.J. de Klerk).
- Vermeerdering van iris in vitro (P.C.G. van der Linde).

Daarnaast waren er posters over de vermeerdering in vitro van *Cyclamen* en *Calathea* (H.J. van Telgen en A.M.A. Vieveen), *Tilia* en *Paeonia* (B.P.A.M. Kunneman en M.R.J. Albers) en narcis en hyacint (P.C.G. van der Linde en G.M.G.M. Hol).

4.2. Congressen, studiereizen

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

M. Benschop

- EG-COST 87 werkgroep *Malus* (5-10-'88 tot 7-10-'88, Genève).

R.J. Bogers

- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (11-2-'88 en 12-2-'88, Lisse).
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (15-12-'88 en 16-12-'88, INRA, Montfavet).

G.J.M. de Klerk

- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (11-2-'88 en 12-2-'88, Lisse).
- 13th International Conference on Plant Growth Substances (17-7-'88 tot 22-7-'88, Calgary, Canada).
- EG-COST 87 werkgroep Advanced Regeneration Techniques (17-9-'88 en 18-9-'88, Espoo, Finland).
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (15-12-'88 en 16-12-'88, INRA, Montfavet).

B.P.A.M. Kunneman

- EG-COST 87 werkgroep *Malus* (5-10-'88 tot 7-10-'88, Genève).
- EG-COST 87 Management Committee (6-12-'88 en 7-12-'88, Brussel).

P.C.G. van der Linde

- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (11-2-'88 en 12-2-'88, Lisse).
- 13th International Conference on Plant Growth Substances (17-7-'88 tot 22-7-'88, Calgary, Canada).
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (15-12-'88 en 16-12-'88, INRA, Montfavet).

A.M.G. Paffen

- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (11-2-'88 en 12-2-'88, Lisse).
- Bespreking van de Nederlands-Franse samenwerking op het gebied van de plantaardige weefselkweek (15-12-'88 en 16-12-'88, INRA, Montfavet).

4.3. Voordrachten op symposia

G.J.M. de Klerk

- 'Rust bij in vitro geteelde leliebolletjes', 11-3-'88, NVPW: Voorjaars-symposium, Wageningen (mede namens P. Aguetaz, A. Paffen en P. van der Linde).
- 'Induction of dormancy in in-vitro cultured lily bulblets', 17-7-'88-21-7-'88, 13th International Conference on Plant Growth Substances, Calgary (poster, mede namens P. Aguetaz, A. Paffen en P. van der Linde).
- 'Epigenetic and somaclonal variation', 2nd meeting of COST 87 werkgroep 'Advanced Regeneration Techniques', 19-9-'88, Espoo (Finland).

B.P.A.M. Kunneman

- 'Uniforme groei tijdens weefselkweek', 11-3-'88, NVPW: Voorjaarssymposium, Wageningen (mede namens A. Beijerbergen van Henegouwen).

4.4. Overige voordrachten

P. Aguetaz:

12- 2-'88 Deelnemers overleg INRA, IVT en COWT, Lisse

M. Benschop:

29-1-'88 RMTuS, Lisse

I. Delvallée:

16-12-'88 Deelnemers overleg INRA, IVT en COWT, Montfavet

G.J.M. de Klerk:

21- 1-'88 Landelijke Anthuriumcommissie NTS, Bleiswijk

22- 2-'88 NVWB, Aalsmeer

25- 2-'88 Nederlandse Ingenieursvereniging, afdelingen Alkmaar en Haarlem, Lisse

9- 3-'88 Vakgroep Experimentele Plantkunde, KU Nijmegen

16- 3-'88 Landelijke Orchideecommissie NTS, Aalsmeer

8- 6-'88 Taakgroep Weefselkweek en Regeneratie van de NRLO, Wageningen

8- 7-'88 Studenten Vakgroep Plantenveredeling LUW, Lisse

4-10-'88 NTS-regio Aalsmeer, Noorden

15-11-'88 Studenten STOAS, Lisse

24-11-'88 Stiverbol, Lisse

2-12-'88 Cursus Plantenbiotechnologie, CAH, Dronten
13-12-'88 NTS, afdeling Beverwijk

B.P.A.M Kunneman:

22- 2-'88 NVWB, Aalsmeer
13-10-'88 PB, Boskoop
1-12-'88 LTB, afdeling Boskoop

P.C.G. van der Linde:

15- 1-'88 LTB-jongeren, Noordwijk
2 en 3-3'88 Cursus Weefselkweek voor bedrijfsvoorlichters Bloembollenteelt,
Hoorn
18- 3-'88 KMTP, afdeling Bennebroek
25- 3-'88 Cursus Veredeling Sierteeltgewassen, RMTuS, Lisse
1- 4-'88 Cursus Veredeling Sierteeltgewassen, RMTuS, Lisse
24-10-'88 KNBTB, kring Duinstreek, Voorhout
25-10-'88 Theorie en Praktijk, Lisse
1-11-'88 RMTuS, Lisse
10-11-'88 Sectie Hyacint van Stiverbol, Akersloot
24-11-'88 Stiverbol, Lisse

A.M.G. Paffen:

16-12-'88 Deelnemers overleg INRA, IVT en COWT, Montfavet

H.J. van Telgen:

19- 5-'88 Deelnemers IAC-cursus 'Plant Breeding', Aalsmeer
8- 9-'88 Orchideeënwerkgroep Westland en De Kring, Naaldwijk
4-10-'88 Contactcommissie Vegetatieve Vermeerdering
19-10-'88 KMTP, regio Leiden
16-12-'88 Docenten Groente- en Bloementeelt, 's Hertogenbosch

4.5. Organisatorische functies

R.J. Bogers - Secretaris-generaal van het VII International
Congress on Plant Tissue and Cell Culture
- Lid van de NRLO-taakgroep 'Weefselkweek en
Regeneratie'

M. Benschop - Secretaris van de studiegroep Weefselkweek
- Lid van de EG-COST-werkgroep *Malus*

G.J.M. de Klerk - Voorzitter van de studiegroep Weefselkweek
- Secretaris van de NRLO-taakgroep
'Weefselkweek en Regeneratie'
- Lid van de EG-COST-werkgroep 'Advanced
Regeneration Techniques'

B.P.A.M. Kunneman - Lid van de EG-COST-werkgroep *Malus*
- National delegate COST 87
- Lid begeleidingscommissie PCLB

P.C.G. van der Linde - Secretaris van de Nederlandse Vereniging
voor Plantecel- en -weefselkweek

4.6. Publicaties

Wetenschappelijke publicaties:

1. B.P.A.M. Kunneman & G.P.M. Faaij-Groenen:
Elimination of bacterial contaminants: a matter of detection and transplanting procedures. Acta Hort. 225: 183-188.
2. P.C.G. van der Linde, G.M.G.M. Hol, G.J. Blom-Barnhoorn, J. van Aartrijk & G.J. de Klerk:
In vitro propagation of *Iris hollandica* Tub. cv. Prof. Blaauw. I. Regeneration on bulb-scale explants. Acta Hort. 226: 121-128.

Diverse mededelingen:

6. G.J.M. de Klerk: Het centraal onderzoeklaboratorium voor de weefselkweek van tuinbouwgewassen. Prophyta 42 (2): 49-50.
7. G.J.M. de Klerk: Het centraal onderzoeklaboratorium voor de weefselkweek van tuinbouwgewassen. Theorie & Praktijk 202:17-21.
8. G.J.M. de Klerk, P. Aguetz, A.M.G. Paffen & P.C.G. van der Linde:
Rust bij in vitro geproduceerde leliebolletjes. Suikerconcentratie en temperatuur beïnvloeden diepte rust. Bloembollencultuur 99 (24): 30-31.
9. B.P.A.M. Kunneman: In vitro vermeerdering *Malus*-onderstammen internationaal bekeken. Plantenbeurs 101 (4):5.
10. P.C.G. van der Linde & G.M.G.M. Hol: Weefselkweek van hyacint. Vloeibaar medium biedt perspectieven. Vakwerk 62(46), 6-8.
11. P.C.G. van der Linde & G.M.G.M. Hol: Weefselkweek van iris. Vermeerdering sterk verbeterd. Vakwerk 62(50): 11-15.
12. F. van der Mark & B.P.A.M. Kunneman: Beworteling van appelonderstammen verbeteren met bacterie. De Fruitteelt 78(19): 28-29.
- 12a. F. van der Mark & B.P.A.M. Kunneman: Onderzoek verbetering beworteling appelonderstammen. Plantenbeurs 100(34): 1-3.

5. Takoverschrijdend onderzoek

5.1. Rust in vitro

Onderzoekers: I. Delvallée, A.M.G. Paffen, P. Aguetaz en G.J. 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 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.

Bij bolletjes die na 11 weken teelt in vitro waren geoogst, bleken 3 factoren de diepte van rust te beïnvloeden, namelijk temperatuur, suikerconcentratie en GA_3 . De rust was minder diep bij lage temperatuur ($15^\circ C$), lage suikerconcentratie (1% of minder) en hoge GA_3 -concentratie (1 mg. l^{-1}). Geen van de onderzochte factoren, toediening van verschillende concentraties ABA, NAA, IAA, TIBA, BA of MS-zouten, korte dag/ lange dag en licht/donker, had een effect op de diepte van rust.

Rust wordt bij standaardcondities ($20^\circ C$, 3% suiker) in de tweede helft van de cultuur geïnduceerd, namelijk na 6 weken. Een lage suikerconcentratie (10 g. l^{-1} of geen suiker) verschoof de periode van inductie van rust: uiteindelijk waren de bolletjes die bij 0% suiker waren geteeld even diep in rust als de bolletjes die bij 3% suiker waren geteeld. In overeenstemming hiermee hadden bolletjes die 11 weken bij 3, 6, 9 of 12% geteeld waren, het zelfde niveau van rust.

De temperatuur waarbij de bolletjes waren geteeld, verschoof eveneens de tijd van rustinductie: bij $25^\circ C$ werd de rust eerder geïnduceerd dan bij $20^\circ C$. Daarnaast was er ook een effect op de diepte van rust: bij $15^\circ C$ werd (ook na lange cultuur) vrijwel geen rust geïnduceerd, terwijl bij $25^\circ C$ een zeer diepe rust werd geïnduceerd.

Bij zaden wordt rust geïnduceerd onder invloed van ABA: als er geen ABA wordt gesynthetiseerd gaan de zaden niet in rust. De tijd van inductie van rust valt samen met een ABA-piek. Als ABA bij leliebolletjes aan het begin van de kweek in vitro werd toegediend aan de $15^\circ C$ -cultuur (bij $15^\circ C$ wordt nauwelijks rust geïnduceerd, zie boven), werd er geen extra rust geïnduceerd. Dit was ook niet het geval als ABA op verschillende tijdstippen tijdens de kweek werd toegediend. Tijdens de cultuur in vitro bleef de hoeveelheid ABA (bepaald met een ELISA-toets als mg ABA per g versgewicht) constant.

Er is uitgebreid onderzoek gedaan naar biochemische markers voor de inductie van rust. Omdat uit de literatuur bekend is dat peroxidase-isoenzymen goede markers zijn voor de verschillende ontwikkelingsstadia van organen, lag de meeste nadruk op peroxidases. Er konden geen veranderingen tijdens de weefselkweekperiode aangetoond worden die samenvielen met de periode van inductie van rust. Als de rust doorbroken werd door een koudebehandeling verscheen er een specifieke zure-peroxidaseband, zowel in het primordium als in de schubben. Onderzoek van de eiwitten met SDS-elektroforese liet zien dat enkele eiwitten in grote hoeveelheden aanwezig waren. Mogelijk zijn dit reserve-eiwitten. Er werden verschillende hoeveelheden van deze eiwitten gevonden in de binnenste, middelste en buitenste schubben.

5.2. Relatie tussen groei in vitro en parameters op biochemisch niveau

Onderzoekers: A.M.G. Paffen en P.C.G. van der Linde.

Door de contaminatie van de hyacinteschubben konden geen ethyleenbepalingen verricht worden. Besloten werd de uitvoering van dit project op te schorten.

5.3. Uniforme groei van weefselkweekplanten

Onderzoekers: A.J.H. Beijerbergen van Henegouwen en B.P.A.M. Kunneman.

Enkele experimenten van vorig jaar werden herhaald en gaven een zelfde resultaat. Het onderzoek is opgeschort.

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

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

Als modelsysteem voor beworteling wordt op het COWT appel gebruikt, namelijk de cultivars Elstar en 'M 9'. Van de cv. Elstar waren een goed en een slecht wortelvormende subkloon aanwezig.

Bij de rhizogenese zijn de volgende fasen te onderscheiden: a) de inductie tot celdeling, b) celdelingen, c) differentiatie tot wortelprimordium en d) de ontwikkeling en uitgroei van de wortels. Volgens literatuurgegevens zou de verandering in de basische-peroxidaseactiviteit een marker voor de verschillende fasen kunnen zijn, namelijk een toename gedurende de inductiefase en een afname tijdens de initiatiefase. In onze experimenten werd een toename gevonden in de totale peroxidaseactiviteit gedurende de 21 dagen dat de appelscheuten op het bewortelingsmedium stonden. Basische-peroxidaseactiviteit gaf eenzelfde beeld te zien. Microscopisch onderzoek liet zien dat de wortelprimordia na 7 à 10 dagen waren aangelegd. In tegenstelling tot de literatuurgegevens was er dus geen afname na 10 dagen. Er werd ook een toename van basische peroxidase gevonden in scheuten op bewortelingsmedium die niet bewortelden en in scheuten op vermeerderingsmedium en medium zonder hormonen. Bij de uitgroei van de primordia was de aanwezigheid van IBA niet meer vereist. Integendeel: in de aanwezigheid van IBA groeide maximaal 50% van de primordia niet uit. De twee Elstar-subklonen verschilden wat betreft het aantal aangelegde primordia maar er was geen verschil in het uitgroei-percentage.

Er was een positieve correlatie tussen de activiteit van basische peroxidase op het moment van overenten op bewortelingsmedium en het aantal wortels dat werd geregenereerd. Deze correlatie werd echter niet in alle onderzochte gevallen gevonden.

In de loop van het jaar bewortelde de slecht-wortelende Elstar subkloon steeds beter. Verschillende aanwezige klonen worden nu op beworteling onderzocht om in nieuw onderzoek als model te dienen.

5.5. Fenotypische en genotypische stabiliteit van in vitro geproduceerde planten.

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

Bij inductie van nieuwe groeipunten kunnen genetische (=somaklonale variatie) en epigenetische (=niet-erfelijke) afwijkingen ten opzichte van de moederplant optreden. Door cultuurcondities te variëren wordt onderzocht hoe dit probleem zo veel mogelijk beperkt kan worden (vgl. 6.2. lelie). Tevens wordt geprobeerd een toets te ontwikkelen om afwijkingen (speciaal somaklonale variatie) al in een vroeg stadium van de cultuur in vitro te onderkennen.

Als modelgewas is *Begonia x hiëmalis* cv. 'Schwabenland Rot' gekozen, omdat bij vroeger onderzoek is gevonden dat deze plant bij cultuur in vitro veel afwijkingen geeft.

Regeneratie van scheutjes werd verkregen via directe knopvorming op bladexplantaten in verschillende voedingsmedia, en op callus van verschillende leeftijd. Directe knopvorming zou volgens de literatuur weinig en een callustussenfase meer somaklonale variatie geven, speciaal bij lange cyclusduur.

Bij de toets wordt gekeken naar verschillen in isoenzym- en eiwitpatronen na iso-elektrische focussing (IEF) van jonge bladeren van de verschillende planten. Na uitgroei wordt de plant verder beoordeeld op duidelijke groei-afwijkingen en, zo aanwezig, wordt gekeken of er een correlatie is met verschillen in de IEF-patronen van het jonge in-vitro blad. Twee groepen planten, op verschillende wijze geïnduceerd, gaven geen verschil in peroxidase-patroon, hoewel per groep verschillende groei optrad. Dit zou op een epigenetisch effect duiden. 'Callus-plantjes' worden nu geïnduceerd op jong callus, terwijl 'callus-plantjes' ook over enige maanden geïnduceerd zullen worden op oud callus.

Om het regeneratieproces goed te kunnen vergelijken is begonnen met microscopisch onderzoek. Tevens wordt gekeken of eiwitten die met regeneratie gecorreleerd zijn, in het medium afgescheiden worden (bv peroxidases). Zij kunnen worden vergeleken met de eiwitpatronen van plantedelen in verschillende ontwikkelingsstadia. Peroxidasepatronen bleken zeer kenmerkend te zijn voor orgaan, leeftijd en fysiologische toestand van *Begonia*. Zure fosfatase en esterase gaven minder duidelijke resultaten.

5.6. Uitscheiding van toxische stoffen tijdens kweek in vitro

Onderzoekers: Th.L.J. Duineveld en H.J. van Telgen.

Het afgelopen jaar is het gelukt weefselkweekvermeerdering van *Delphinium* op te zetten, uitgaande van grondscheuten van najaarsplanten en van zaailingen. Op deze wijze konden voldoende plantjes verkregen worden om de invloed van mediumsamenstelling en -toevoegingen op de uitscheiding van 'toxische' produkten te onderzoeken.

Bruinverkleuring kon beïnvloed worden door anorganische mediumcomponenten en de hoeveelheid NaFeEDTA in het medium. Voorts zijn enkele anti-oxidantia en/of fenoloxidaseremmers onderzocht op mogelijk neutraliserende werking. Alleen citroenzuur had in enkele experimenten een remmend effect. Het ontbreken van een betrouwbare kwantificeringsmethode voor de geproduceerde stoffen vormde een groot probleem bij het bepalen van de mate van neutralisering/remming. Extractie uit agar gaat slecht en is waarschijnlijk niet kwantitatief. Gebruik van vloeibaar medium maakte de extractie makkelijker, maar had een nadelige invloed op vermeerdering. De Folin-bepaling voor fenolen was niet goed bruikbaar door reactie met mediumcomponenten. Daarom is een nieuwe bepaling ontwikkeld met 4-nitrobenzol, dat ook bij het zichtbaar maken van vlekken op TLC wordt gebruikt. Fractionering van het exudaat

met dunne-laag-chromatografie in twee dimensies (2D-TLC) leverde een vijftal vlekken op, waarvan drie alleen zichtbaar waren onder UV-licht en niet reageerden met 4-nitrobenzol. Het is niet bekend om welke stoffen het hier gaat.

5.7. Cryopreservering

Onderzoekers: H. Bouman, S. van Eeden 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 worden. Meristemen zijn het meest aangewezen materiaal om te bewaren, omdat ze bij hergroei de minste kans op afwijkingen geven (zie 5.5.). Anderzijds is de cryopreservering van meristemen moeilijk vergeleken met cel-, callus- en embryomateriaal.

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).
2. 'cryoprotection', het behandelen met beschermingsmiddelen tegen koude. 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. Na overzetting op vers medium werd na één of meer maanden in enkele gevallen overleving gevonden.

Het bepalen van overleving via een enzymatische levensvatbaarheidstest direkt na ontdooien gaf geen betrouwbare resultaten. De leliebolletjes die na de hergroei van de ingevroren meristemen waren ontstaan, konden op de normale wijze in vitro worden vermeerderd. Met dit materiaal zal worden onderzocht of de leliemeristemen na de cryopreserveringsbehandeling nog soortecht zijn.

6. Takgericht onderzoek

6.1. Bloemisterijgewassen

Onderzoekers: H.J. van Telgen, J.C. Hakkert en A.M.A. Vieveen

Cyclamen

Met de methode die vorig jaar werd ontwikkeld, konden op bladstukjes van een diploïde en een tetraploïde selectie ('Pastel' resp. 'Vuurbaak') scheuten geregenereerd worden. Tussen planten van één selectie traden echter grote verschillen in de mate van regeneratie op. Regeneratie werd verbeterd door een donkerperiode direct na het inzetten en een concentratie van de anorganische mediumcomponenten op de helft van de normale sterkte. Uitgroei van de bij 20°C geïnduceerde scheuten verliep het best bij 15°C. Het aantal geïnduceerde scheuten was sterk afhankelijk van de concentraties van de groeiregulatoren. Lage concentraties BA en NAA gaven zeer veel (>100) nieuwe groeipunten per explantaat. Deze groeiden echter zeer slecht uit, mogelijk als gevolg van onderlinge concurrentie. Gebruik van hoge concentraties gaf een lager aantal scheuten (<10) die veel steviger waren en uitgroeiden. Het aantal morfologische afwijkers was echter groot. De scheuten werden samen met een stukje callus afgenomen, beworteld en opgepot.

Scheuten die in de buis reeds duidelijk afwijkend waren, bleven dit na oppotten. De 'normaal' uitziende weefselkweekplantjes ontwikkelden zich na een groeistilstand van 2-3 maanden tot normale planten en bloeiden 7 maanden na oppotten. Het bleek dat tijdens de periode van groeistilstand ondergronds een knolachtige structuur was gevormd. Daar knolvorming ook een van de eerste gebeurtenissen is na kieming, lijkt voor een goede ontwikkeling van een weefselkweekplantje van cyclamen de aanwezigheid van een knolachtige structuur ook noodzakelijk. Wellicht kan aanzienlijke tijdswinst geboekt worden door deze knollen reeds in vitro te induceren. Door verhoging van de kweektemperatuur, verlaging van de zoutsterkte en verhoging van het saccharose-gehalte in de voedingsbodem, konden uit bladstukjes direct structuren verkregen worden die morfologisch zeer sterk op knollen leken. Op deze knolachtige structuren konden geen nieuwe groeipunten geïnduceerd worden. De route bladstuk ---> knol loopt dus waarschijnlijk dood. De route bladstuk ---> scheut ---> scheut+knol ---> beworteling levert waarschijnlijk betere resultaten op.

In het komend jaar zullen, naast het probleem van de afwijkers, doorvermeerderen en somatische embryogenese in celculturen worden onderzocht.

Calathea

Calathea-planten zijn inwendig sterk verontreinigd met schimmels en bacteriën. Rigoureuze ontsmetting (minimaal 1 min. 70 of 96% alcohol en 15 min. 3% actieve chloor) leverde bij *C. ornata* 12% en bij *C. makoyana* 42% schone explantaten op. Het aantal nog levende explantaten bedroeg echter nog geen 2%. Pogingen om dit percentage omhoog te brengen door mildere ontsmetting of antibiotica hadden een negatief resultaat. Antibiotica gaven slechts een tijdelijke verbetering: na wegnemen keerden de bacteriële infecties weer terug. Warmwaterbehandeling [bij narcis (bol) en gember (wortelstok) effectief in het terugdringen van bacterie- en schimmel-, resp. aaltjesinfecties] gaf geen verbetering, mede omdat de temperatuur niet boven 45°C kon worden gebracht (boven 45°C gingen de knoppen dood). Uitdroging van de donorplant, gevolgd door een periode van snelle groei bij verhoogde temperatuur, gaf evenmin verbetering.

De schone, nog levende explantaten van *C. ornata* en *C. makoyana* groeiden slechts zeer langzaam uit. Kweek bij wisselende temperatuur (12 uur 30°C, licht/ 12 uur 24°C, donker) stimuleerde de uitgroei bij *C. ornata*, maar veroorzaakte juist afsterving bij *C. makoyana*. Inmiddels kon een redelijke partij van *C. ornata* worden opgebouwd. De vermeerderingsfactor is nog laag (gemiddeld 2,6 bij een cyclus van 4 weken). Een aantal oudere explantaten is beworteld en opgepot teneinde uitgroei en behoud van raszuiverheid tijdens de weefselkweekfase te kunnen beoordelen.

6.2. Bol- en knolgewassen

Onderzoekers: P.C.G. van der Linde, G.M.G.M. Hol, en P.M. van der Duyn Schouten.

Iris

Vorig jaar werd een methode ontwikkeld voor vermeerdering van adventief gevormde scheuten. Dit jaar konden met deze methode opnieuw veel scheuten geproduceerd worden in een cyclusduur van 7 weken en een vermeerderingsfactor van ca. 4. Met deze scheuten zijn experimenten uitgevoerd om ze aan te zetten tot de vorming van bolletjes. Scheuten die bij 15°C werden verkregen konden het best tot bolvorming worden aangezet. De meeste in rust gaande bolletjes werden verkregen door de scheuten 6 weken na het overzetten op bolinduktie-medium gedurende een periode van 8 weken bij 5°C te zetten en vervolgens bij 20°C in het donker verder te kweken. Dit jaar zullen de bolinductie-experimenten worden herhaald en uitgebreid, waarna het irisonderzoek kan worden afgesloten.

Hyacint

Het afgelopen jaar werden de effecten van mediumcomponenten en groeiomstandigheden op de bolgroei van tweede-faseplantjes in vloeibaar medium onderzocht. De grootste bolletjes werden verkregen bij 25°C, 1/2 MS, 30 g l⁻¹ saccharose, 0,4 mg l⁻¹ thiamine, 100 mg l⁻¹ myo-inositol, pH = 5,5. Er was een lineaire relatie tussen het aantal plantjes per kolfje en het percentage glazige plantjes. Glazigheid trad vooral op bij plantjes die in het donker werden gekweekt.

Bolletjes gekweekt in het donker met saccharose als koolstofbron gingen in rust terwijl bolletjes gekweekt bij 16 uur licht met saccharose niet in rust gingen. Wanneer een fructose-glucosemengsel als koolstofbron werd gebruikt gingen zowel de in licht als de in donker gekweekte bolletjes niet in rust.

Narcis

Vorig jaar werd een sterke afname gevonden van de infectie in dubbelschubexplantaten van Golden Harvest na een warmwaterbehandeling (1 uur 54°C) van bij 30°C bewaarde bollen. Dit jaar werden de beste resultaten eveneens verkregen met een behandeling van 1 uur 54°C. De bruikbaarheid van deze behandeling werd bij een aantal cultivars getoetst, namelijk bij Carlton, Dick Wilden, St. Patrick's Day, Tahiti en Tête à Tête. De bollen werden direct na de oogst bij 30°C bewaard en kregen na 1, 3 of 5 maanden bewaring een behandeling van 1 uur 54°C. In alle gevallen werd een grote afname van de infectie verkregen zonder aantasting van het regeneratievermogen. Het onderzoek zal zich nu volledig richten op het tegengaan van slapers in het geproduceerde materiaal.

Lelie: het ontstaan van afwijkingen

Bolletjes van de cultivar White Mountain werden vermeerderd met een cyclusduur van 10 weken op media met verschillende cytokinineconcentraties. Hierna werden de verkregen bolletjes op uitgroei-medium gezet en bij 20°C verder gekweekt. De bolletjes werden geoogst en in vijf groepen verdeeld. Eén groep werd direct geplant terwijl de andere groepen bij 5°C werden gezet. Na 4, 8, 12 of 16 weken bij 5°C werden ook deze groepen geplant. De opkomst van de bolletjes werd gescored. Tevens werd gekeken of de bolletjes afwijkende blaadjes vormden.

De bolletjes die geen koude hadden gekregen, kwamen niet boven de grond, terwijl de bolletjes die 16 weken koude hadden gekregen tijdens de bewaring al zo'n groot blad hadden ontwikkeld, dat uitplanten niet zinvol leek. De bolletjes die 4 weken koude hadden gekregen kwamen zeer traag op. De 8 weken bewaarde bolletjes waren na 3 weken allemaal gesproten, terwijl de 12 weken bewaarde bolletjes al na 1 week boven de grond stonden. Er kwamen veel afwijkingen in de blaadjes voor. Er was een verband tussen het aantal afwijkingen en de voorgeschiedenis van de bolletjes. Daar de opkweekcondities (vooral de belichting) van het geplante materiaal niet optimaal waren, kunnen hierover echter nog geen definitieve conclusies worden getrokken. De experimenten zullen dit jaar worden herhaald.

Transformatie van bloembolgewassen

De plantjes van lelie en hyacint die vorig jaar op kanamycine-houdend medium waren verkregen, werden vermeerderd en onderzocht op aanwezigheid van T-DNA- genproducten. Er kon geen transformatie worden aangetoond.

Het onderzoek heeft zich dit jaar geconcentreerd op de bruikbaarheid van andere selectiemarkers voor transformatie van bolschubweefsel van lelie. Hiertoe werden bolschubjes gekweekt bij 20°C in het donker op medium met 100 mg.l⁻¹ kanamycine, neomycine, meta-threxaat of hygromycine B. De schubjes werden iedere twee weken overgezet op vers medium. Het bleek dat op medium met kanamycine en neomycine meer dan 50% van de schubjes regeneratie vertoonde, terwijl op meta-threxaat nauwelijks en op hygromycine B geen regeneratie optrad. Op medium met kanamycine en neomycine was de groei afname minder dan 50%. Op medium met meta-threxaat vond vrijwel geen groei plaats. Uit deze experimenten werd geconcludeerd dat hygromycine B de beste selectiemarker is voor de transformatie van bolschubweefsel van lelie.

In aansluiting op eerder werk werd een methode ontwikkeld om op in vitro geproduceerde bladsteeltjes leliebolletjes te regenereren. Deze methode werd bij verscheidene cultivars getoetst. Tevens werd er geprobeerd via calluskweken celsuspensies op te zetten. De groei van callus van tulp kon verbeterd worden door toevoeging van een niet-proteïnoogeen aminozuur.

6.3. Boomkwekerijgewassen

Onderzoekers: B.P.A.M. Kunneman en M.R.J. Albers

Malus

Het onderzoek naar de vermeerdering van *Malus* via weefselkweek geniet een brede belangstelling. Vooral bij de snelle introductie van nieuwe onderstammen, rassen en in de toekomst dwerggrassen op eigen wortel biedt de weefselkweek perspectieven.

Nieuw in cultuur

De methode van vermeerderen die is ontwikkeld voor 'Elstar', 'M 26' en 'M 9' is gebruikt om enkele sierappels ('Lizet', 'Red Sentimel', 'Van Eseltine', 'Rudolph', *M. torringo* 'Roseae'), een tropische appelonderstam, een Nederlandse kloon van 'M 9' (T337), een Belgische kloon van 'M 9' (Nicolai 29) en een consumptie-appel ('Alkmene') te vermeerderen. De sierappels ('Red Sentinel' en 'Rudolph'), de tropische appel en 'Alkmene' gingen zich na de initiatiefase vermeerderen. De andere cultivars takelden echter steeds meer af.

De tropische appel vermeerderde zich vanaf het begin van de cultuur uitzonderlijk goed. Normaal heeft een cultivar een paar maanden tot ruim een jaar nodig om op gang te komen. Dit ras had na 1 maand al een vermeerderingsfaktor van meer dan 4. Bij bewortelingsexperimenten bleek dat het bewortelingspercentage de eerste keer gemiddeld al 55 was.

Vermeerdering

Gedurende 4 opeenvolgende vermeerderingscycli bij 'M 9' zijn saccharose en sorbitol naast elkaar getoetst. Aan de helft van de buizen werd bij beide behandelingen in het midden van de cyclus vloeibaar medium toegevoegd.

Het bleek dat de explantaten die op saccharose stonden na 4-5 weken overgezet moesten worden. De scheuten op sorbitol konden 6-8 weken blijven staan. Een iets langere cyclus is bij sorbitol zelfs aan te raden, omdat de scheuten zich meer strekken en het bewortelingspercentage omhoog gaat. Toediening van vloeibaar medium had een gunstig effect op de strekking en de vermeerderingsfaktor.

Beworteling

Het onderzoek aan de beworteling van 'M 9' werd voortgezet. Onderzocht werd wat de optimale periode op vermeerderingsmedium is, alvorens de scheutjes te bewortelen. Een cyclusduur van minimaal 6 weken was nodig voor een optimale beworteling.

In 1987 is in samenwerking met het IVT een project opgezet waarbij wordt getracht om door transformatie met *Agrobacterium rhizogenes* de beworteling te verbeteren. In het onderzoek worden zowel planten in de buis als reeds afgeharde planten betrokken. Transformatie lukte bij reeds afgeharde planten, maar niet bij planten in weefselkweek. 'Elstar' en 'M 9' met getransformeerde wortelstelsels vormden meer zijtakken dan controleplanten. De komende jaren zullen groei en ontwikkeling van de getransformeerde planten worden gevolgd.

Opkweek weefselkweekplanten

Evenals in 1987 zijn dit jaar 'M 26'-planten opgekweekt afkomstig van drie klonen. Ook dit jaar was er weer verschil in groei tussen de klonen nadat de planten uit weefselkweek waren gekomen.

Paeonia

In de praktijk bestaat veel belangstelling voor de vermeerdering van *Paeonia* via weefselkweek, omdat de vermeerdering via scheuren traag verloopt. Een snelle vermeerderingsmethode is ook van belang voor virusvrij gemaakt materiaal. Daarom is begonnen met onderzoek naar de vermeerdering van *Paeonia lactiflora*. Dit jaar is nieuw materiaal ingezet van de cultivar 'Karl Rosenfield' en ook van *P. officinalis* 'Rubra Plena'. De planten werden opgekweekt in plastic bakken en een aantal keer bespoten met fungicide. Na de standaard-ontsmetting werden explantaten op een medium met antibiotica geplaatst. Het materiaal bleek redelijk schoon.

Omdat de vermeerdering traag verliep, is onderzocht welke factoren invloed hebben op de vermeerderingssnelheid. Temperatuur was de faktor met de meeste invloed: bij lage temperatuur (15°C) verliep de vermeerdering beter. De vermeerderingsfaktor bleef echter aan de lage kant. Een koudebehandeling (4°C) of het gebruik van vloeibaar medium hadden strekking tot gevolg.

Rhododendron

Rhododendron is een gewas dat in relatief grote aantallen wordt geteeld. Een deel van het sortiment is moeilijk te vermeerderen. Voor de cultivars die via enten worden vermeerderd en de cultivars waarbij de stekresultaten nogal wisselen, lijkt weefselkweek een goede vermeerderingsmethode te zijn. Tevens zijn weefselkweekplanten van *Rhododendron* vaak beter vertakt. Gedurende de afgelopen jaren is bij een aantal cultivars onderzocht of ze via weefselkweek kunnen worden vermeerderd. Dit jaar is als afsluiting van dit project een rapport samengesteld waarin de belangrijkste resultaten van het onderzoek zijn samengevat.

Tilia

De vermeerdering van *Tilia* op onderstam leidt soms tot veel opslag. Daarnaast zijn de zaailingonderstammen nogal variabel. *Tilia* op eigen wortel geproduceerd via afleggen, stekken of weefselkweek heeft deze problemen niet.

In 1988 richtte het onderzoek zich vooral op de beworteling van soorten en cultivars waarmee in de voorgaande jaren nog geen ervaring was opgedaan. Alle cultivars bewortelden goed tot zeer goed, met uitzondering van *Tilia euchlora*. De verklaring ligt mogelijk bij het beperkte aantal vermeerderingscycli dat was doorlopen. Gedurende een aantal jaren zal de groei van de vermeerderde planten worden vergeleken met die van planten die op andere manieren zijn vermeerderd.

Wisteria

In de praktijk wordt *Wisteria* via enten vermeerderd. Vereenvoudiging en versnelling van dit vermeerderingssysteem zijn gewenst. Weefselkweek zou ook een oplossing kunnen bieden voor problemen als opslag en beschikbaarheid van onderstammen.

Tot nu toe vormden infecties van het uitgangsmateriaal een groot probleem. Bij materiaal dat in de kas was opgekweekt, was het infectiepercentage eveneens hoog. Daarnaast groeiden de explantaten slecht, was er een

overmatige callusproductie en vergeelden de bladeren snel. Dit jaar werden een aantal media (in totaal 12) getoetst om de initiatiefase te verbeteren. Media met BA in plaats van kinetine gaven een beter resultaat. Er was geen verschil tussen media met en media zonder actieve kool. Van de drie 'basis'-media bleek het 'standaard'-Acer-medium het beste. Na geruime tijd in cultuur vergeelden de explantaten toch en stierven af.

Acer

Acer wordt in de praktijk vermeerderd door enten of oculeren. Enkele soorten zoals *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 *Acer lobelii*. De ontwikkelde methode bleek alleen voor *Acer lobelii* geschikt te zijn. Pogingen om andere soorten *Acer* op dezelfde wijze in cultuur te brengen mislukten.

Afgelopen jaar is onderzocht of verschillende media de initiatie van *Acer platanoides* 'Crimson King', *A. platanoides* 'Royal Red', *A. pseudoplatanus* 'Erectum' en *A. palmatum* verbeterden. In totaal werden 12 bodems getoetst. Het standaard *Acer*-medium gaf de beste resultaten.

Een teeltproef, waarbij de groei van weefselkweekplanten van *Acer lobelii* werd vergeleken met die van zaailingen, gestekte en geoculeerde planten, liet zien dat het slagingspercentage van stekken en enten erg laag was. De groei van stekken, zaailingen en weefselkweekplanten was vergelijkbaar. De kwaliteit van het wortelstelsel van de weefselkweekplanten was goed.

Afkortingen

ABA	- abscisine zuur
BA	- benzylaminopurine
GA ₃	- gibberellinezuur
IAA	- indolazijnzuur
IBA	- indolboterzuur
2IP	- N ⁶ -(2-isopentenyl)adenine
MS-medium	- medium volgens Murashige en Skoog
NAA	- naftylazijnzuur
TIBA	- tri-joodbenzoëzuur
TLC	- dunne-laag chromatografie