

Ontwerpen van weefselkweekmedia met een gewasspecifieke samenstelling aan minerale nutriënten

H. Bouman

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

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

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

PPO Publicatienr. 716.; € 10,00



Projectnummer: 330509

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, Lisse
: Postbus85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 462121
Fax : 0252 - 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

VOORAF	5
1 INLEIDING	7
1.1 Wat achtergrondinformatie.....	7
1.2 Opzet van het rapport.....	8
2 SCHEMA VOOR HET ONTWERPEN VAN AANGEPASTE MEDIA	9
3 TOELICHTING OP DE VIJF STAPPEN	11
3.1 Stap 1: Plantanalyse.....	11
3.1.1 Keuze plantendelen.....	11
3.1.2 Keuze laboratorium.....	11
3.2 Stap 2: Berekening van minerale concentraties in medium	11
3.2.1 Stikstofconcentratie	11
3.3 Stap 3: Samenstellen medium.....	12
3.3.1 Vaststellen zoutmengsel om berekende concentraties te bereiken.....	12
3.3.2 Keuze van ammonium-nitraatverhouding voor stikstof	12
3.3.3 Evenwicht positieve en negatieve ionen	12
3.3.4 Variabiliteit in keuze concentraties en zouten:	12
3.4 Stap 4: Bereiden medium	13
3.4.1 Neerslagen.....	13
3.4.2 Zachte agar.....	13
3.5 Stap 5: Evaluatie effect nieuwe media.....	13
3.5.1 Groei tijdens weefselweekfase	13
3.5.2 Groei na weefselweekvermeerdering	13
4 VOORBEELDEN VAN AANGEPASTE MEDIA	15
4.1 Alstroemeria	15
4.1.1 Inleiding	15
4.1.2 Werkwijze.....	15
4.1.3 Resultaten en discussie	16
4.1.4 Conclusie	16
4.2 Appel	16
4.2.1 Inleiding	16
4.2.2 Werkwijze.....	17
4.2.3 Resultaten en discussie	17
4.2.4 Plantanalyses	20
4.2.5 Conclusies	21
4.3 Cymbidium	21
4.3.1 Inleiding	21
4.3.2 Werkwijze.....	22
4.3.3 Resultaten en discussie	22
4.3.4 Conclusie	23
4.4 Dahlia.....	24
4.4.1 Inleiding	24
4.4.2 Werkwijze.....	24
4.4.3 Resultaten en discussie	24
4.4.4 Conclusie	26
4.5 Gerbera.....	27
4.5.1 Inleiding	27
4.5.2 Werkwijze.....	27

4.5.3	Resultaten en discussie	27
4.5.4	Conclusie	36
4.6	Lelie	36
4.6.1	Inleiding	36
4.6.2	Werkwijze.....	37
4.6.3	Resultaten en discussie	37
4.6.4	Conclusie	38
4.7	Roos	38
4.7.1	Inleiding	38
4.7.2	Werkwijze.....	38
4.7.3	Resultaten en discussie	39
4.7.4	Conclusie	42
4.8	Tulp43	
4.8.1	Inleiding	43
4.8.2	Werkwijze.....	43
4.8.3	Resultaten en discussie	43
4.8.4	Conclusie	45
5	NEERSLAGEN EN 'ZACHTE' AGAR BIJ BEREIDEN VAN (AANGEPASTE) MEDIA.....	47
5.1	Neerslagen	47
5.1.1	Werkwijze.....	47
5.1.2	Resultaten en discussie	47
5.2	'Zachte' agar en neerslagen	48
5.2.1	Werkwijze.....	48
5.2.2	Resultaten en discussie	49
5.3	Conclusie	50
6	ALGEMENE CONCLUSIE EN KANTTEKENINGEN	51
6.1	Algemeen	51
6.2	Hoeveel kan een plant groeien met de toegediende nutriënten?.....	51
6.3	Tekorten en mobiliteit van elementen	52
6.4	Micro-elementen en agar.....	52
6.5	Kanttekeningen	52
7	LITERATUUR.....	55
7.1	Algemeen	55
7.2	Specifiek (selectie)	55
	BIJLAGE I: UITGEWERKTE METHODE VOOR BEREKENEN VAN AANGEPASTE MEDIA VANUIT DE ELEMENTANALYSE VAN DE PLANT	57
	BIJLAGE II: OORSPRONKELIJKE PROJECTBESCHRIJVING	61

Vooraf

In dit rapport wordt een handleiding aangeboden voor het ontwerpen van soortspecifieke weefselkweekvermeerderingsmedia. De handleiding bestaat uit een methode met vijf stappen. Bij de verschillende stappen wordt achtergrondinformatie gegeven om het geheel te verduidelijken. Voor een aantal gewassen zijn de soortspecifieke media getest.

Dit rapport is dus in de eerste plaats een handleiding; het is niet een publicatie volgens alle wetenschappelijke-tijdschriftnormen met uitgebreide discussie en literatuurverantwoording. Voor meer achtergrondinformatie en wetenschappelijke beschouwingen wordt verwezen naar algemene literatuur en enkele specifieke artikelen genoemd aan het eind van het rapport.

Een belangrijk deel van de praktische uitvoering en uitwerking van gegevens lag in de voortreffelijke handen van Annemiek Tiekstra. Verder hebben meegewerkt Ben Morris (medium bereiding en praktische weefselkweek) en Jolanda ter Brugge (bij roos). Maria Zwart en Fred Geers hebben op uitstekende wijze geholpen bij de voor u liggende eindversie.

1 Inleiding

Planten hebben mineralen nodig voor hun groei. In weefselweekmedia worden mineralen toegevoegd samen met suikers, vitamines en groeistoffen (plantenhormonen). Om de groei per plantensoort te optimaliseren wordt in de praktijk het meeste gevarieerd bij de plantenhormonen. Wat betreft suikers is er gevarieerd met verschillende soorten carbonhydraten maar het bleek vrijwel altijd dat sucrose de beste resultaten gaf. Dit is niet verwonderlijk omdat sucrose in planten de transportvorm voor carbonhydraten is. Voor de mineralen wordt nog steeds meestal een minerale formulering gebruikt die (nu 40 jaar geleden) ontwikkeld is door Murashige en Skoog voor optimale groei van tabakscallus: het "MS-medium". (Tabaks)callus is geen plantje maar weekerweefsel, en het lijkt voor de hand liggend dat "normale" planten voor hun groei aan een ander mineraalmengsel de voorkeur geven. Het grote probleem is dat het een zeer moeizame aangelegenheid is om voor de verschillende gewassen optimale media te ontwikkelen via de wijze waarop dat voor de andere mediumcomponenten gebeurt, het maken van dosisrespons curven. Er zijn in media 8 macronutriënten (N, P, S, Cl, K, Na, Mg, Ca) en een groot aantal micronutriënten. Om voor al deze elementen dosisrespons curven te maken is een ondoenlijke zaak alleen al omdat ze als positieve en negatieve ionen moeten worden gegeven (er moeten evenveel positieve als negatieve ionen gegeven worden, dus variaties per element is niet mogelijk: er moeten altijd twee elementen tegelijk gewijzigd worden; om fosfaat te wijzigen zal bijv. KPO_4 toegevoegd moeten worden) en omdat er interactie is tussen de verschillende elementen. De in dit rapport gepresenteerde manier is een manier om snel een optimaal medium te verkrijgen: er vanuit gaand dat in goed groeiende planten een optimale samenstelling van de verschillende elementen is wordt deze samenstelling als referentie genomen om media te ontwerpen. Voor substraatteelten bestaan afhankelijk van substraat en doseringssysteem per plantensoort al optimale mineralenmengsels vaak ontworpen volgens deze gedachtegang.

1.1 Wat achtergrondinformatie

Reeds in 1984 heeft Rugini media ontworpen specifiek voor olijven; hij ging uit van analyses van jong plantmateriaal (embryo en groeipunt). In 1997 berichtte een groep Franse onderzoekers over weefselweekmedia qua mineralen aangepast per soort. Zij gingen hierbij uit van het principe dat de minerale behoefte van een groeiende plant overeenkomt met de elementsamenstelling van de volwassen plant. Deze elementsamenstelling van de plant moet dan weer de basis zijn voor het weefselweekmedium: een niet onlogische gedachte, die ook toegepast wordt in de substraatteelten. Recente publicaties laten zien dat ook voor andere gewassen (speciaal houtige) deze aanpak succesvol was.

Wij moeten echter niet vergeten dat weefselweekomstandigheden sterk afwijken van de groei buiten de buis. Weefselweekplanten groeien i.h.a. niet foto-autotroof, d.w.z. dat ze niet (of slechts ten dele) hun eigen suikers maken uit water en koolzuur, omdat de lichtintensiteit te laag is. Daarnaast beschikken ze tijdens de vermeerderingsfase in weefselweek meestal niet over wortels, de gespecialiseerde organen voor opname van mineralen.

Aan de hand van elementanalyses van plantensoorten werden in ons onderzoek weefselweekmedia ontworpen. Naast de bovengenoemde aanpak uitgaande van de elementsamenstelling van de plant is ook de minerale samenstelling van substraatteeltoplossingen met die van gangbare weefselweekmedia vergeleken. Bij enkele micromineralen, speciaal koper en mangaan, zijn opvallende verschillen gevonden tussen beide samenstellingen. Aan de hand hiervan werden mediumaanpassingen gedaan waarvan het effect op de weefselweekgroei bij een aantal gewassen werd onderzocht.

1.2 Opzet van het rapport

De kern van dit rapport bestaat uit een handleiding die beschrijft hoe men weefselkweekmedia kan ontwerpen die qua minerale samenstelling aangepast zijn aan de te kweken soort. Aan de hand van een schema wordt getoond hoe - uitgaande van de elementanalyse van plantenweefsel - voor een specifieke soort of cultivar een aangepast weefselkweekmedium verkregen wordt in 5 stappen (hoofdstuk 2).

In aanvullende paragrafen van hoofdstuk 3 worden de diverse stappen toegelicht, keuzemogelijkheden behandeld, en (soms) optredende problemen genoemd met mogelijke oplossingen. Het aspect van neerslagen en zachte agar wordt in hoofdstuk 5 uitgediept met resultaten uit specifieke experimenten.

In hoofdstuk 4 worden voorbeelden van succesvolle aangepaste media gegeven: gerbera, Cymbidium, appel, roos en dahlia. Ook enkele soorten (Alstroemeria, tulp en lelie) waar de benaderingswijze geen of minder succes had, worden besproken. Bij de behandeling van de diverse soorten komen verschillende aspecten uit de vijf stappen nogmaals aan de orde. De behandelde voorbeelden dienen slechts als illustratie: hoewel er per soort vele experimenten gedaan zijn, worden over het algemeen alleen opvallende conclusies genoemd. Een enkel experiment wordt uitvoeriger behandeld.

Hoofdstuk 6 geeft algemene conclusies. Ook worden hierin enkel kanttekeningen en wat vragen beantwoord, die vaak gesteld worden. Literatuur, zowel algemeen als meer specifiek of specialistisch, wordt in hoofdstuk 7 opgesomd.

In bijlage I wordt de methode van het berekenen van aangepaste media uitgewerkt. Tot slot is in bijlage II de oorspronkelijke projectbeschrijving opgenomen.

2 Schema voor het ontwerpen van aangepaste media

In onderstaand schema wordt beschreven hoe in 5 stappen aangepaste media gemaakt worden. De aanpassing betreft de minerale samenstelling van het medium waarbij de elementanalyse van de plant als startpunt dient.

Stap 1: Plantanalyse

- elementanalyse van de plant geeft gehalten van macro-elementen in drooggewichtpercentages of andere eenheden als mmol/kg, en micro-elementen vaak in ppm of $\mu\text{mol/kg}$.
- Keuze welk deel van de plant, ouderdom, oorsprong van de plant (bemestingstoestand, kas, buitenteelt, etc.) geanalyseerd wordt

Stap2: Berekening van minerale concentraties in medium

- Aan de hand van de analyse worden de minerale concentraties berekend
- keuze van stikstofconcentratie als referentiepunt voor berekening

Stap 3: Samenstellen medium

- Vaststellen zoutmengsel om berekende concentraties te bereiken
- keuze van ammonium-nitratverhouding voor stikstof
- evenwicht positieve en negatieve ionen, welke ionen mogen extra toegevoegd worden (natrium, chloride, organische buffer)
- welke minerale concentraties staan 'vast', welke zijn flexibel (hoger of lager toelaatbaar)

Stap 4: Bereiden medium

Bij de mediumbereiding kunnen problemen optreden:

- vóór en na autoklaveren, neerslagen
- structuur agar: zacht worden

Stap 5: Evaluatie effect nieuwe medium t.o.v. 'oude' medium

De groei en performance van het materiaal afkomstig van het nieuwe, soort aangepaste medium moet vergeleken worden met materiaal afkomstig van het normaal gebruikte medium.

1. effecten tijdens in-vitro groei: vermeerderingsfactor, gewicht, habitus
2. effecten na weefselkweek: doorgroeisnelheid, kwaliteit plantje

3 Toelichting op de vijf stappen

3.1 Stap 1: Plantanalyse

- **Elementanalyse van plant geeft gehalten van macro-elementen in drooggewichtpercentages of andere eenheden als mmol/kg, en micro-elementen vaak in ppm of $\mu\text{mol/kg}$**
- **Keuze welk deel van de plant, ouderdom, oorsprong van de plant (bemestingstoestand, kas, buitenteelt, etc.) geanalyseerd wordt**

3.1.1 Keuze plantdelen

Voor vele plantensoorten kunnen in de literatuur analyses van planten(-delen) gevonden worden. Hier wordt meestal een bereik van gevonden waarden per element gegeven waarbij de plant nog optimaal groeit. Deze waarden zijn afhankelijk van een aantal factoren, bijv. ouderdom, plantendeel, voedingsbodem, bemestingstoestand en fysiologische toestand van de plant.

In navolging van alle gepubliceerde, recente onderzoeken hebben wij bijna altijd gekozen voor analyses van het juist volgroeide volwassen blad van gezonde planten als uitgangspunt voor de berekeningen van het aangepaste soortspecifieke medium. Wij hebben altijd het gemiddelde van de minimale en maximale 'optimum'-waarden gekozen. Optimumwaarden zijn de plantelementgehalten zoals gevonden bij de analyse van planten die naar alle kwaliteitsmaatstaven optimaal groeiden.

In de behandelde voorbeelden van hoofdstuk 5 wordt deze keuze bij gerbera naar aanleiding van enkele proeven besproken. Ook worden enkele uitzonderingen behandeld.

3.1.2 Keuze laboratorium

Elementanalyses worden gedaan door specialistische, dienstverlenende laboratoria, waarvan er verschillende zijn in ons land. Alle bedrijven die deze diensten ten behoeve van substraatteeltonderzoek in hun pakket hebben kunnen deze analyses ook voor weefselkweekplantjes en – media uitvoeren. Het is raadzaam om verschillende aanbiedingen te vergelijken, omdat elk lab zijn eigen pakket heeft.

Overwegingen bij de keuze voor een bepaalde aanbieder kunnen zijn:

- prijs: de ene aanbieder is aantrekkelijker bij een groot aantal analyses terwijl de ander betere mogelijkheden heeft voor een kleiner aantal. Bij weer een ander bestaat de mogelijkheid een abonnement/contract af te sluiten;
- type analyse: alleen macromineralen, of ook (een deel van de) micromineralen;
- kwaliteit: hoe nauwkeurig is de bepaling, en hoe groot is de vereiste nauwkeurigheid;
- tijd: de uitslag van de analyse kan bij het ene lab veel langer op zich laten wachten dan bij het andere.

3.2 Stap 2: Berekening van minerale concentraties in medium

- **Aan de hand van de analyse worden de minerale concentraties berekend**
- **Keuze van stikstofconcentratie als referentiepunt voor berekening**

Hoe de berekening precies gedaan wordt, kan gevonden worden in de bijlage I 'Uitgewerkte rekenmethode'. Hierbij wordt zowel in formules als met een rekenvoorbeeld het geheel verduidelijkt.

3.2.1 Stikstofconcentratie

Belangrijk in onze methode is de keuze van de stikstofconcentratie, omdat vanuit deze basisconcentratie stikstof (nitraat plus ammonium) de concentraties van de andere macro-elementen worden berekend. Tevens bepaalt dit vervolgens de totale ionenconcentratie, de ionsterkte (EC) van het medium. Deze kan gemeten worden met een geleidbaarheidsmeter. M.b.v. metingen van de geleidbaarheid kan de totale

hoeveelheid ionen gedurende een cyclus bepaald worden. Het geeft een maat van het totale mineralengebruik als aan het begin en eind van de weefselkweekcyclus gemeten wordt. Deze meting geeft echter geen uitkomst of een specifiek element(mineraal) aan het opraken is. Daarover kunnen alleen specifiek mineraalanalyses uitsluitsel geven

De keuze van de absolute concentratie stikstof is niet uit de minerale samenstelling van de plant af te leiden. Wij hebben de concentratie aan stikstof van gebruikelijke weefselkweekmedia als basis genomen. In MS is dit 60 mM, in DKW 50 mM. Bij enkele media werd gestart met 40 mM omdat door velen wordt aangenomen dat MS een hoge ionsterkte heeft. In proeven werden dan hogere concentraties getest. Voor orchideeënmedia worden lagere concentraties genomen, omdat van orchidee bekend is dat ionensterktes van meer dan ca 30 mM slechtere groei geven; in ons geval namen wij ook 30 mM (zie hoofdstuk 5 bij Cymbidium).

3.3 Stap 3: Samenstellen medium

- **Vaststellen zoutmengsel om berekende concentraties te bereiken**
- **Keuze van ammonium-nitratverhouding voor stikstof**
- **Evenwicht positieve en negatieve ionen, welke ionen mogen extra toegevoegd worden (natrium, chloride, organische buffer)**
- **Welke minerale concentraties staan 'vast', welke zijn flexibel (hoger of lager toelaatbaar)**

3.3.1 Vaststellen zoutmengsel om berekende concentraties te bereiken

De elementanalyse geeft de hoeveelheden van de verschillende elementen die in een plant aanwezig zijn en daarmee de verhouding waarin ze tijdens de weefselkweek moeten worden toegediend. Hiervoor staan veel verschillende zouten ter beschikking. Stikstof kan in de vorm van ammonium of nitraat gegeven worden. Voor de andere elementen is meestal slechts een vorm geschikt. Voor de macro-elementen zijn dat de negatieve ionen fosfaat (PO_4^{3-}) en sulfaat (SO_4^{2-}) voor resp. fosfor en zwavel; voor kalium, calcium en magnesium zijn dat de 'kale' positieve ionen. Zij kunnen dus als elkanders tegenion dienen om het evenwicht tussen positieve en negatieve ionen te bereiken zonder dat te veel andere tegenionen gebruikt moeten worden (zie 3.3.3).

3.3.2 Keuze van ammonium-nitratverhouding voor stikstof

De keuze van de nitraat-ammonium verhouding, is niet uit de elementsamenstelling van de plant af te leiden. Het is bekend dat deze verhouding grote invloed op groei en ontwikkeling kan hebben. Wij zijn meestal uitgegaan van een nitraat/ammonium verhouding van 2:1. Dit is dezelfde die in MS en DKW voorkomt. Bij gerbera is een proef aan andere verhoudingen gewijd. Het is lastig om dit soort wijzigingen door te voeren, omdat altijd ook andere ionconcentraties veranderd moeten worden teneinde het evenwicht in positieve en negatieve ionen te bewaren.

3.3.3 Evenwicht positieve en negatieve ionen

Het evenwicht tussen positieve en negatieve ionen vraagt een keuze. Meestal is een hogere concentratie van negatieve ionen vereist dan strikt nodig om tot de juiste concentratie positieve ionen (Ca, Mg, K, ammonium) te komen. Via stikstof-nitraten, sulfaten en eventueel chloriden, wordt een evenwicht bereikt, maar niet altijd is de ideale combinatie mogelijk. Vaak wordt chloride gebruikt, dat slechts in minieme hoeveelheden nodig is. Vaak is het al in voldoende mate aanwezig als tegenion bij de gebruikte micro- en sporenelementen.

In hogere concentraties kan chloride zelfs ongunstig zijn voor de weefselkweekgroei. Vaak hebben wij dan ook de keuze gemaakt om sulfaat als tegenion in hogere concentraties te gebruiken, hoger dan nodig volgens elementanalyses. In proeven met gerbera is onderzocht wat het effect is van het gebruik van chloride en sulfaat als tegenion.

3.3.4 Variabiliteit in keuze concentraties en zouten:

Uit 3.3.3 blijkt dat soms minerale concentraties gebruikt moeten worden die niet 'ideaal' zijn. Belangrijk is dan te beslissen aan welke berekende minerale concentraties vastgehouden moet worden en welke flexibel

(hoger of lager) kunnen worden toegevoegd. Hierboven werd al op chloride in gegaan. Ook van kalium zijn de concentraties gevarieerd. In enkele proeven is gekeken hoe kritisch deze veranderingen waren.

Van enkele minerale concentraties werd de 'ideale' concentratie als vast beschouwd. Voor ionen als fosfaat en calcium werden bijna altijd de berekende concentraties toegevoegd. Ook magnesium werd op deze wijze behandeld.

Aan de concentraties van sulfaat en kalium werd daarentegen minder rigide vastgehouden. Proeven gaven aan dat dit eigenlijk altijd kon. Hoewel wij geen chloride of organisch kation als tegenion voor metaalionen en/of ammonium gebruikt hebben om het geheel 'kloppend' te maken, wil dit niet zeggen dat hier geen mogelijkheden liggen. Dit zal soort- en doelafhankelijk zijn.

3.4 Stap 4: Bereiden medium

Bij de mediumbereiding kunnen problemen optreden:

- **vóór en na autoklaveren, neerslagen**
- **structuur agar: zacht worden**

3.4.1 Neerslagen

Bij het bereiden van aangepaste media traden soms neerslagen op, soms vóór autoklaveren en vaker erna. Omdat in de aangepaste media fosfaat en vooral calcium aanzienlijk hogere concentraties hebben dan in gangbare media, ligt het voor de hand dat neerslagvorming zouten van deze ionen betreft.

Apart steriliseren van een fosfaatoplossing en vervolgens de oplossing in de juiste hoeveelheid toevoegen bij de laatste stap van het mediumbereiden kan dit grotendeels voorkomen. Bij DKW media werd ook neerslagvorming van ijzerzouten gevonden soms samen met calcium en fosfaat. Apart steriliseren van de ijzeroplossing (Fe-EDTA) kan ook in deze gevallen oplossing bieden.

3.4.2 Zachte agar

Daarnaast bleek soms na autoklaveren van de media de vastheid van de agar te variëren; in het bijzonder de aangepaste media waren soms zachter.

In hoofdstuk 4 wordt ingegaan op verschillende aspecten van neerslagvorming en stevigheid van agarbodems.

3.5 Stap 5: Evaluatie effect nieuwe media

De groei en performance van het materiaal afkomstig van het nieuwe, soort aangepaste medium moet vergeleken worden met materiaal afkomstig van het normaal gebruikte medium.

1. **effecten tijdens in-vitro groei: vermeerderingsfactor, gewicht, habitus**
2. **effecten na weefselkweek: dOorgroeisnelheid, kwaliteit plantje**

3.5.1 Groei tijdens weefselkweekfase

De groei en kwaliteit van de planten groeiend op de nieuwe media wordt vergeleken met de groei op de gebruikelijke, 'oude' media. Op welke aspecten beoordeeld wordt, is afhankelijk van de richting waarin verbetering verwacht kan worden. Te denken valt tijdens de vermeerdering aan vermeerderingsfactor, grootte (zowel gewicht als lengte) van de plantjes/eenheden, habitus, en snij-eigenschappen.

3.5.2 Groei na weefselkweekvermeerdering

Een belangrijk beoordelingscriterium is ook de kwaliteit van de plantjes na de weefselkweekfase. Hoe bewortelen de plantjes, hoe is de uitval, hoe snel is de groei tijdens en na beworteling in vivo of in vitro en hoe is de verdere groei in de ex-vitro fase? Bij gerbera, roos en appel is daarom gekeken naar de groei na

de weefselweekfase. Voor Cymbidium is dit door de leverancier van het uitgangsmateriaal gedaan. Resultaten staan bij de verschillende soorten in hoofdstuk 4.

Langere termijnen na de acclimatisering en doorgroei in de kas, bij voorbeeld bloei en groei in de productieve fase, zijn niet door ons getest.

4 Voorbeelden van aangepaste media

In dit hoofdstuk geven we voorbeelden van testresultaten van aangepaste, soortspecifieke media voor verschillende soorten planten. De soorten die worden besproken zijn resp. Alstroemeria, appel, Cymbidium, dahlia, gerbera, lelie, roos en tulp.

Per plantensoort wordt, na een korte inleiding, allereerst onder werkwijze in het kort de weefselkweekmethode van de soort besproken. Hier staat ook de eerste tabel met a. de elementsamenstelling van de plant of plantorgaan die dienden voor de berekeningen van de aangepaste media. De minerale samenstelling van resp. het 'ideaal' aangepaste medium, het gebruikte aangepaste medium, en de gebruikelijke media staan in dezelfde tabel. Onder resultaten en discussie worden de experimenten besproken, waarin de verschillende media vergeleken worden. Een groot deel van de resultaten wordt in tabelvorm gegeven, waarbij een representatief voorbeeld van een experiment gegeven wordt. Indien mogelijk zijn statistische bewerkingen toegepast die geresulteerd hebben in se-waarden van numerieke gegevens. Deze staan dan vermeld in de tabellen in de tabellen. Een deel van de experimenten worden alleen kwalitatief in de tekst behandeld.

Bij een aantal soorten worden nog verdere veranderingen in het aangepaste medium doorgevoerd, waarbij deelaspecten van het 5-stappen-schema voor bepalen van de samenstelling van medium aan de orde komen. Een korte conclusie per soort besluit elk deel.

De soorten worden op alfabet behandeld. Voor gerbera zijn de meeste experimenten uitgevoerd. Lezing van dit deel geeft een idee hoe door verdere experimenten het eerst gevonden aangepaste medium per soort verder ontwikkeld kan worden. Bij dahlia wordt specifiek ingegaan op problemen die kunnen ontstaan door neerslagvorming bij mediumbereiding; bij roos komen uitplantresultaten specifiek aan de orde.

4.1 Alstroemeria

4.1.1 Inleiding

Voor Alstroemeria zijn vermeerderingsexperimenten gedaan op 3 verschillende vloeibare media. Voor vloeibaar medium is gekozen omdat in een parallel project bij het COWT gebleken was dat de vermeerdering in vloeibaar medium beter was dan op vaste agarmedia. Wij wilden proberen deze verbetering nog uit te breiden met aanpassing van het medium volgens onze richtlijnen.

In het eerste experiment is uitgegaan van bladanalyse voor aanpassing van het medium (resultaat AIAM I). De groei op dit medium is vergeleken met groei op MS en DKW. In een tweede experiment is gezien het type groei in weefselkweek van deze soort (rhizoom-vermeerdering: topgroei en zijrhizomen) uitgegaan van de analyse van de stengel, omdat de structuur en samenstelling van het rhizoom hier meer op zou kunnen lijken. Dit resulteerde in medium AIAM II. Van rhizomen was geen analyse beschikbaar.

4.1.2 Werkwijze

Er werd vloeibaar medium gebruikt. In 300 ml erlenmeyers werd 50 ml medium gesteriliseerd; voor de nutriënten samenstelling wordt verwezen naar de tabel. Verder werd 3 % sacharose, CABO-vitaminen en 4,4 μM BA toegevoegd. Er werd gestart met 5 rhizoom eenheden met elk minstens 2 grote of 1 grote en 2 kleinere toppen, met een totaal gewicht van 12 tot 14 g per erlenmeyer.

Cyclusduur was 3 weken zonder schudden. Het materiaal werd beoordeeld op groei (gewicht, aantal rhizomen en het aantal mogelijke nieuwe inzeteenheden) en de algemene habitus van het materiaal als kleur, scheut- en bladlengte.

Tabel 4.1.1. Minerale gehalte van volwassen blad en stengel, en samenstelling van weefselweekmedia, alleen voornaamste elementen

Mineraal	Plant- gehalte blad	Plant- gehalte stengel	Ideaal aangepast mmol/l		Alstr. Aangepast Medium I	Alstr. Aangepast Medium II	DKW	MS
	mmol/g	mmol/g	blad	stengel	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	4.52	2.62	60	60	14.3	15	17	20
NO ₃ ⁻					45.7	50	33	40
K	2.09	2.37	27.8	54.2	22.7	18	18	20
Ca	0.43	0.17	5.6	3.8	5.7	3.8	9.3	3
Mg	0.25	0.12	3.3	2.7	3.3	2.7	3	1.5
SO ₄ ⁻²	0.04	0.01	0.5	0.2	3.3	2.7	12	1.5
PO ₄ ⁻³	0.20	0.27	2.7	6.2	2.7	4.1	1.95	1.25

4.1.3 Resultaten en discussie

De media met de gebruikte drooggewichtanalyses staan vermeld in bovenstaande tabel. De aangepaste media zijn niet opvallend verschillend van MS en DKW; slechts het P-gehalte was bij het aangepaste medium altijd hoger.

Voor de aangepaste media is het kaliumgehalte lager genomen, om geen problemen te krijgen met tegenionconcentraties. Resultaten bij andere planten, bijv. gerbera, lieten zien dat dit mogelijk was zonder tot verminderde kalium opname te leiden. AIAM II heeft naast het veel te lage kalium ook minder P dan zou moeten volgens de analyse. Hogere fosfaatgehaltenes gaven echter grote neerslagen. Om deze hogere P toch te bereiken zou fosfaat apart gesteriliseerd moeten worden en pas bij afkoelen van de media weer toegevoegd moeten worden. Dit is niet gedaan tijdens dit onderzoekdeel.

De vermeerderingsresultaten worden hier niet uitgebreid besproken. MS gaf relatief minder lange scheuten, wat als voordeel moet worden beschouwd, omdat de groei het liefst in de rhizomen wordt gezien.

Desondanks was de vermeerderingsfactor gemeten aan inzetbare rhizomen voor alle behandelingen ongeveer hetzelfde gemeten over meerdere cycli. De spreiding is vrij groot door de lage vermeerderingsfactor van deze cultivar, gemiddeld ca 2, en de groeiwijze van alstroemeria waarbij per cyclus de groei per stukje/vermeerderingseenheid veel kan verschillen. Ook de gewichttoename was per medium niet duidelijk verschillend. Drooggewichtanalyses van de rhizomen vertoonden ook geen verschillen.

4.1.4 Conclusie

Voor Alstroemeria werden geen verbeteringen gevonden bij het gebruik van de beide aangepaste media. Dit kon het gevolg zijn een 'verkeerd' aangepast medium:

1. er was immers niet uitgegaan van rhizoom analyse,
2. kalium en/of fosfaat werden niet optimaal aangepast (zie boven).

Opvallend is verder dat ook het DKW medium niet beter was dan het MS medium wat bij andere soorten bijna altijd wel het geval was. Bij planten die niet via stimulering van scheut- of okselknopuitgroei vermeerderd worden lijkt de methode minder toepasbaar (vgl. ook lelie en tulp). Wel is nog belangrijk te vermelden dat de resultaten van dahlia lieten zien dat bij weefselweek op agar de uitkomsten anders kunnen zijn dan in vloeibaar medium (alleen positieve invloed van aanpassing in agarmedium).

4.2 Appel

4.2.1 Inleiding

Hoewel appel een plant is die in Nederland niet of nauwelijks in weefselweek vermeerderd wordt, is deze soort in het onderzoek opgenomen om enkele redenen. Het is een (vrucht-)boom en kan als voorbeeld

dienen als houtig gewas. Met appel is bij het COWT in de loop der jaren een grote ervaring opgebouwd in vele andere projecten, zodat al veel vergelijkingskennis aanwezig was.

4.2.2 Werkwijze

De weefselkweek van appel wordt uitgebreid beschreven in artikelen van De Klerk et al (zie literatuur). Normaal wordt appel gekweekt op een MS-medium versterkt met agar. De weefselkweekresultaten behaald op de verschillende media werden gemeten aan gewicht groepje plantjes, aantal plantjes (=vermeerderingseenheden), gemiddelde grootte van de plantjes in willekeurige eenheden (1 klein, 2 middel en 3 groot)

Bij de vermeerdering van appel werden vaak glazige (= Engels: hyperhydrated) plantjes waargenomen. Deze plantjes waren niet verder te gebruiken in de vermeerdering en ook bij beworteling valt hiervan een groot deel weg. Daarom zijn bij de berekeningen van de resultaten glazige planten niet meegenomen.

In de inleiding werd

In de experimenten met verhoging van de Cu-concentratie werd i.p.v 0,1 μM zoals bij MS 16 x zoveel genomen, dus 1,6 μM .

Voor beworteling werd één medium (zie De Klerk et al.1990) gebruikt voor alle planten, onverschillig van welk medium zij afkomstig waren.

4.2.3 Resultaten en discussie

Tabel 4.2.1. Minerale gehalte van volwassen blad, en samenstelling van weefselkweekmedia, alleen voornaamste macro- en micro-elementen

Mineraal	Plant- gehalte	'ideaal' aangepast	Aangepast Medium I	DKW	MS
	mmol/g	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	1.79	40	6	17	20
NO ₃ ⁻			32	33	40
K	0.35	7.7	11.7	18	20
Ca	0.41	9.2	8	9.3	3
Mg	0.11	2.5	2.5	3	1.5
SO ₄ ⁻²			2.5	12	1.5
PO ₄ ⁻³	0.08	1.7	1.7	1.95	1.25
			MS micro		
	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$
Fe			100	120	100
Mn	1.3	29	100	200	100
Zn	0.5	11.2	30	72	30
B	3.6	80.4	100	78	100
Cu	0.13	2.9	0.1	1	0.1
Mo	0.002	0.045	1	1.6	1

Agar vergeleken met gelrite als gelerend agens

Appel was de eerste soort die in het nutriëntenproject getest werd. Omdat gelrite als gelerend agens andere eigenschappen heeft dan agar, en deze eigenschappen de beschikbaarheid van mineralen zou kunnen beïnvloeden zijn deze twee gel-makers getest. In het eerste experiment werd de vermeerdering van appel op gelrite en agar vergeleken met als minerale nutriëntenbasis MS en het aangepaste medium AAM I (zie tabel 4.2.1). De groei op agarmedia was veel beter dan op gelrite versterkte media. Al na één cyclus hadden de inzettingen op gelrite meer glazigheid dan op agar (50 tot 100 % t.o.v 0 tot 30 %), was de vermeerdering per groepje 4 x lager, waren de scheutjes ¼ kleiner, en was de gewichtstoename ook een ¼ minder. In verdere proeven is daarom slechts agar als 'solidifier' gebruikt.

Vergelijking MS en AAM I

Als de minerale samenstelling van MS vergeleken wordt met die van AAM I, zijn de verschillen in twee aspecten groot. Het Ca gehalte van AAM I is veel hoger. Het tweede verschil zit in de zoutsterkte; MS gebruikt 60 mM N; AAM I 40 mM. Dit laatset zorgt ervoor dat ook de andere mineralen (behalve N natuurlijk) relatief hoger zijn. Toch was er na één cyclus nog geen duidelijk verschil te zien tussen MS en AAM als minerale basis. Na de 2^e cyclus waren er echter grote verschillen. Planten in buizen vermeerderd lieten daarbij een groter verschil tussen de media zien dan planten vermeerderd in potten. In tabel 2 wordt dit geïllustreerd aan de vergelijking van groei en vermeerdering op AAM I en MS op beide typen containers. De verdere experimenten zijn daarom in buizen gedaan.

Tabel 4.2.2. Vermeerdering van appel op twee verschillende media en containers, 2^e cyclus. 30 –50 plantjes ingezet per meting

Container en medium	Gewicht groepje plantjes in mg		Aantal plantjes		Grootte *) per plantje		Glazigheid %
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	gemidd	se	
Buis							
MS	668	54	9.6	0.9	1.2	0.1	47
AAM I	499	43	7.4	0.5	1.4	0.1	13
Glazen pot							
MS	530	51	7.2	0.8	1.4	0.2	60
AAM I	529	26	7.3	0.3	1.4	0.1	32

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein, 2 middel, 3 groot

Het optreden van glazigheid bij appel kan sterk fluctueren in de tijd. In hierop volgende vermeerderingscycli werd het beeld echter bevestigd dat op MS altijd meer glazigheid optrad dan op aangepaste media. Hoger Ca en lagere zoutsterkte zoals gebruikt in AAM I) zijn beide aanpassingen die de glazigheid kunnen verminderen. Verder was het aantal plantjes per groepje op MS hoger dan op aangepaste media of DKW (zie later). De gemiddelde grootte was kleiner. Dit gaf vaak snijproblemen en had ook tot gevolg dat bij latere bewortelingsexperimenten de te bewortelen plantjes aan de kleine kant waren. Dit had meer uitval tot gevolg. Als plantjes, gekweekt op de beide media, van ongeveer dezelfde grootte beworteld werden, was na de in-vitro beworteling visueel en in gewichtstoename geen verschil.

Verdere aanpassingen in mineralen

Calcium:

Omdat er bij de bereiding van het aangepaste medium vrij veel neerslag optrad werd een experiment gedaan met een wat lagere calciumconcentratie van 6 (AAM II) in plaats van 8 mM. Daarnaast werd in dit experiment ter vergelijking ook DKW als grondslag voor de mineralen gebruikt. DKW gaf ook een goed resultaat, vergelijkbaar met het aangepaste medium. Ook was het optreden van glazigheid op hetzelfde peil als bij AAM. Er waren geen verschillen tussen AAM I en II.

Stikstof:

Uit medianalyses bleek dat de stikstofconcentratie aan het einde van een cyclus laag was. Het ammonium was op, en van nitraat was nog ca 15 % over. De rest van de elementen leek nog niet beperkend. Er is daarom een serie experimenten gedaan met de bedoeling de startconcentratie stikstof te verhogen. Dit werd op verschillende manieren bereikt: AAM III met 10 mM extra N in de vorm van 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ t.o.v. AAM I, AAM IV met 20 mM extra N als 5mM NH_4NO_3 en 10 mM NH_4Cl en AAM V [20 mM extra N, als 5 mM NH_4NO_3 en 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Vooral de vermeerderingsresultaten werden vergeleken, maar voor plantjes van enkele voedingsbodems werd ook gekeken naar beworteling en doorgroei in de eerste weken ex vitro.

Tabel 4.2.3. Vermeerdering van appel op 5 verschillende media.

medium	Gewicht groepje plantjes in mg		Aantal plantjes		Gemiddelde grootte*)		glazigheid
	Gemidd.	se	gemidd.	se	gemidd	se	%
MS	563	69	7,6	0,9	1,7	0,2	68
DKW	449	21	4,7	0,3	2,2	0,1	12
AAM III	342	31	5,0	0,5	1,9	0,1	46
AAM IV	341	42	4,0	0,5	2,2	0,1	57
AAM V	398	30	5,3	0,5	2,0	0,1	29

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein, 2 middel, 3 groot

Samenvattend was de conclusie dat AAM V een vermeerdering gaf, die beter was dan de andere AAM's. De vermeerderingsfactor bleef lager dan bij MS, maar de plantgrootte was groter dan bij MS en ongeveer gelijk aan de andere AAM's (tabel 4.2.3). Echter het DKW medium gaf op zijn minst dezelfde en soms betere resultaten. Het DKW medium had minder last van glazigheid. Opvallend is dat AAM III en AAM IV meer glazigheid vertoonden dan DKW en AAM V, en ook wat meer dan AAM I en II (niet in tabel). Als we de samenstelling van de media vergelijken is hiervoor moeilijk een duidelijke oorzaak te vinden.

Beworteling- en uitplantresultaten

Van 4 media werden plantjes beworteld en uitgeplant (zie tabellen 4.2.4 en 4.2.5). Hoewel de algemene resultaten bijzonder (zie slechte groei in tabel 4.2.5) waren, bleken de plantjes van het DKW-medium het het beste te doen. DKW geeft bij beworteling de beste plantjes en de meeste wortels. Van AAM V zijn geen resultaten.

Tabel 4.2.4. Eigenschappen van plantjes afkomstig van 4 vermeerderingsmedia na in-vitro bewortelingsfase.

medium	Plantgew. mg		Aantal wortels		Lengte mm*)		Bew %
	Gem	se	Gem.	se	Gem.	se	
MS	108	7	2,8	0,5	4,2	0,6	80
DKW	168	13	3,0	0,5	3,6	0,6	60
AAM I	123	8	2,1	0,4	2,2	0,4	58
AAM IV	163	12	2,5	0,5	2,5	0,4	64

*) lengte langste wortel

Tabel 4.2.5. Eigenschappen van plantjes van 4 media na in-vitro beworteling en 5 weken na uitplanten in grond.

medium	Gew. Plantje mg		Gew. Plantje zonder wortels		Lengte langste wortel mm		% plantjes met wortel		% slechte groeiers
	Gem	se	Gem	se	Gem	se	Gem	se	
MS	207	33	97	15	7,6	1,0	100	12	67
DKW	272	26	156	14	8,1	0,6	93	6	45
AAM I	209	31	116	16	5,8	0,7	97	10	73
AAM IV	270	46	171	41	6,3	0,8	90	9	70

Invloed van micro-elementaanpassingen, i.e. Cu

Omdat bij gerbera en roos via een verhoging van Cu een spectaculaire verbetering van de vermeerdering verkregen werd, is dit ook getest bij appel. De volgende media werden getest: MS, MS + Cu, DKW, AAM-V en AAM-V + Cu (16x).

Toevoeging van koper had geen effect op de vermeerderingsresultaten. Er was echter een opvallend verschil in de glazigheid van de plantgroepjes. Meer Cu gaf minder glazigheid. Zelfs Cu-verhoging alleen had dit effect al bij MS, terwijl bij AAM V geen glazigheid meer werd gevonden na verhoging van Cu. Dat

DKW weinig glazigheid gaf, zou dus een gevolg kunnen zijn van het hogere Cu-gehalte van dit medium t.o.v. MS.

Tabel 4.2.6. Effect van Cu-verhoging (16 x MS-microgehalte) op vermeerdering vergeleken met vermeerdering op dezelfde media zonder Cu verhoging, en DKW.

medium	Gewicht groepje plantjes in mg		Aantal plantjes		Gemiddelde grootte *)		glazigheid %
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se	
MS	413	66	5,6	0,4	1,2	0,1	72,0
MS+Cu	422	34	7,2	0,5	1,1	0,0	10,0
DKW	375	21	4,1	0,3	1,9	0,1	14,0
AAM V	350	21	5,2	0,4	1,6	0,1	16,0
AAM V +Cu	353	14	3,9	0,3	1,6	0,1	0,0

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein, 2 middel, 3 groot

In een volgende proef werden de volgende media vergeleken: MS, AAM I N-40 en AAM I N-60 en AAM V (ook een N-60 medium. Een verhoging van de stikstof samen met de andere macro-elementen in AAM I N-60 is anders dan AAM V waarbij alleen de N verhoogd werd (zie boven). Dit experiment liet weer zien dat AAM V en DKW het beste waren, maar dat nu ook AAM I N-60 net als MS een hoge glazigheid gaf en zelfs, net als MS, niet verder vermeerderd kon worden, omdat de glazigheid opliep tot 100 %. Dus een lage zoutsterkte geeft in ieder geval een verlaagd risico op glazigheid, een vuistregel die ook in de praktijk de ronde doet. Echter AAM V heeft wel dezelfde hoge zoutsterkte als MS, zodat hier de specifieke verhoging van N via sulfaat een rol kan spelen. DKW heeft een lager N-gehalte als MS, en ook een hoger sulfaatgehalte. Dit zou de lagere glazigheid kunnen verklaren van het DKW medium. Daarnaast bleek uit de vorige proef dat verhoogd Cu een duidelijk positief effect had op het beperken van glazigheid. Cu is in DKW een factor 10 hoger dan in MS.

Stikstofgave: ammonium-nitraat verhouding

In de literatuur worden experimenten beschreven waar veranderingen in N-gave via ammonium en/of nitraat grote gevolgen hebben op groei en groeiwijze. Dit is getoetst. MS en DKW hebben een N-verhouding van ongeveer 1 : 2. Er werd een reeks vermeerderingen uitgevoerd op 'AAM'- media waarbij de verhoudingen ammonium/nitraat gevarieerd werden zonder grote veranderingen in de gehalten aan andere macro-elementen, behalve S in de vorm van sulfaat. Bij twee media moest ook als tegen-ion chloride toegevoegd worden vergelijkbaar met MS. Er werden geen spectaculaire verschillen gevonden, hoewel de verhouding wisselde van 1 : 1,5 tot 1:11, en er voor het eerst chloride aan een aangepast medium werd toegevoegd. Ammoniumopname wordt gezegd gepaard te gaan met verzuring van het medium. Echter de pH aan het eind van de vermeerderingscyclus was bij alle media ongeveer gelijk: ca 5,4. Uitzondering was de verhouding 1 : 11, waar het medium alkalischer was met een pH van 6. De 'plant' en/of de buffering van het medium zorgden er dus voor dat niet in de eind-pH tot uitdrukking kwam dat bij de opname van ammonium een mogelijke verzuring opgetreden was.

De verschillen in verhoudingen hadden voorts ook geen invloed op percentages glazigheid.

4.2.4 Plantanalyses

Analyse van de weefselweekplantjes van MS, DKW en AAM I liet allereerst de verwachte verschillen van jonge plantjes t.o.v. de volwassen plant(blad) zien. In de jonge plantjes zijn Ca lager en P hoger dan in de volwassen plant. Daarnaast valt vooral het hogere N-gehalte van het MS-plantje op, en het hogere Ca- en Mg- gehalte van het AAM materiaal. Het hogere S-gehalte van DKW plantjes was te verklaren door het hoge sulfaatgehalte in het DKW medium.

Tabel 4.2.7 Minerale analyses van plantmateriaal van appel in mmol/g

	N	P	K	Ca	Mg	S
Volwassen plant	2.5	0.24	1.35	1.65	0.28	Niet bekend
MS-plantje	3.8	0.6	2.1	0.22	0.22	0.40
DKW-plantje	2.6	0.6	2	0.32	0.28	1.06
AAM I-plantje	2.3	0.8	2.1	0.53	0.40	0.49

4.2.5 Conclusies

Uit bovenstaande blijkt allereerst dat voor appel de minerale samenstelling van het MS medium het minst voldeed. DKW mineralen voldeden duidelijk beter. Verder was medium AAM V verhoogd waren, het beste aangepaste medium. De N werd hierbij verhoogd met ammonium via sulfaat en niet via chloride, of alleen nitraat, zoals bij II en IV die minder voldeden. Door het hoge sulfaatgehalte lijkt AAM V dus enigszins op DKW.

Een duidelijk positief effect wat betreft voorkómen van glazigheid werd gevonden als de Cu-concentratie verhoogd werd.

4.3 Cymbidium

4.3.1 Inleiding

Orchideeën waren bij de eerste soorten die in weefselweek vermeerderd werden. De media wijken vaak af van de gebruikelijke voor andere soorten. De door ons gebruikte cultivar wordt echter op een “normaal” MS-medium van halve sterkte gekweekt. Daarnaast hebben wij het Knudson orchideeënmedium gebruikt en het aangepaste cymbidiummedium (CAM). De resultaten waren zeer duidelijk: het CAM-medium bleek verreweg het beste. In een volgende serie proeven werd, ook gestimuleerd door de resultaten bij gerbera, DKW medium op halve sterkte gebruikt. Dit medium gaf betere groei dan ½ MS, maar niet zo goed als het nieuwe Cymbidium-medium.

Tabel 4.3.1. Elementgehalten van Cymbidiumblad, en samenstellingen van ‘ideaal aangepast’ medium en media gebruikt voor Cymbidiumvermeerdering

Mineraal	Plantgehalte	‘ideaal’ aangepast medium	Aangepast Medium I CAM I	½ DKW	½ MS	Knudson C
	mmol/g DW	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	1.79	30	11.6	8.5	10	13,8
NO ₃ ⁻			23.4	16.5	20	9,1
K	0.64	10.8	15	9	10	5,2
Ca	0.40	6.7	6.7	4.6	1.5	1,4
Mg	0.17	2.8	2.8	1.5	0.75	1,0
SO ₄ ⁻²			7.5	6	0.75	4,8
PO ₄ ⁻³	0.10	1.5	1.6	1.0	0.7	1,8
	µmol/g DW	µmol/l	µmol/l	µmol/l	µmol/l	µmol/l
Fe			50+50 extra	60	50	90
Mn	1.1	18	20)*	100	50	34
Zn	0.9	15	15	36	15	0
B	5.1	85	85)*	39	50	0
Cu	0.13	2.2	2)*	0.5	0.05	0
Mo	0.004	0.07	0.5	0.8	0.5	0

*) deze micromineraal aanpassingen werden alleen gebruikt bij CAM III; in de andere CAM media: werden voor de microelementen de concentraties van MS gebruikt + 50 µmol/l ijzer extra (Fe-EDTA)

4.3.2 Werkwijze

Het vermeerderen van protocormen gebeurde in vloeibaar medium bij 22 °C op een schudder (120 rpm) met 16 h licht. Er werd altijd begonnen met een begingewicht van ongeveer 1.5 gram per 25 ml medium in een 100 ml erlenmeyer. Na 3 weken werd het materiaal beoordeeld: gewogen om de gewichtstoename te meten, en naar de habitus gekeken (veel of weinig scheutvorming, kleur, structuur protocormen, etc.)

4.3.3 Resultaten en discussie

De volgende media werden in de eerste proeven met één cv getest: CAM I, CAM II, ½ MS, ½ DKW en Knudson C. Naast CAM I ($\text{NH}_4:\text{NO}_3=1:1\frac{1}{2}$) werd CAM II ($\text{NH}_4:\text{NO}_3=1:1$) getest omdat een hoger ammonium beter voor orchidee zou zijn, getuige de verhouding in de meeste, specifieke orchideeënmedia.

Knudson C medium

Protocormen gevormd in Knudson C medium zagen er erg slecht uit en vermeerderden ook slecht. De minerale samenstelling van dit medium is zeer afwijkend en bevat behalve ijzer en mangaan geen micro-elementen. Waarschijnlijk treden hier gebrekverschijnselen op die bij gebruik van onzuivere chemicaliën en/of leidingwater niet optreden. Dit laatste was tijdens het ontwerp van dit medium waarschijnlijk nog het geval.

Vergelijking ½ MS met CAM I en II

Volgens het bedrijf dat het plantmateriaal ter beschikking stelde is ½ MS het medium dat wordt gebruikt voor de vermeerdering. Echter ook hierop zagen de protocormen er na verloop van tijd slecht uit. CAM I, II en ½ DKW gaven alle drie goede resultaten waarbij CAM I steeds beter was dan de andere twee. De verschillen waren soms klein, speciaal tussen CAM I en II.

Tabel 4.3.2. Resultaten van een reeks vermeerderingscycli op 5 verschillende media. De gemiddelden zijn de gewichtstoenamefactoren van protocormen na 3 weken kweken. CAM II en ½ DKW zijn later gestart.

cyclus	Knudson		½ MS		CAM I		CAM II		½ DKW	
	gemidd	se	gemidd	se	gemidd	se	gemidd	se	gemidd	se
1	2.22	0.08	2.80	0.15	3.28	0.16				
2	1.98	0.05	2.65	0.11	3.35	0.21				
3	1.76	0.05	3.31	0.08	4.07	0.11				
4			2.87	0.06	3.71	0.10	3.42	0.14		
5			3.07	0.06	3.60	0.09	3.27	0.12		
6			3.14	0.09	4.19	0.18	4.13	0.11	3.82	0.08
7			2.89	0.07	3.77	0.09	3.71	0.08	3.29	0.08
8			2.48	0.08	3.57	0.10	3.29	0.11	3.33	0.05
9			2.78	0.10	3.93	0.20	3.72	0.10	3.58	0.09

Test op verdere groei na vermeerdering op MS en CAM

Er is ook protocorm-materiaal teruggedaan naar de leverancier van deze cultivar; dit was afkomstig van de 4 verschillende media. Volgens uitkomsten aldaar was CAM I iets moeilijker te scheiden voor de volgende fasen voor uitplanting: tussenkweek en bewortelen. CAM II groeide weliswaar wat slechter maar was erg mooi te scheiden door de erg "korrelige" structuur. Verdere groei was voor alle materiaal normaal, zodat de winst van gebruik van CAM bij deze plant vooral in de snellere vermeerdering zit en niet in een betere kwaliteit.

Invloed micro-elementaanpassingen

Micro-elementaanpassingen kunnen grote invloed hebben op de groei in vitro (vergelijk bijv. Gerbera). In een volgende proef werden CAM I, CAM III (aangepast macro + micro), ½ MS, en ½ MS III (met aangepast micro volgens analyse, vergelijk CAM III) vergeleken. Om het effect van microaanpassingen op zich te zien werden in ½ MS de micro-elementen aangepast op CAM III niveau.

Verrassend was dat de microminerale aanpassing bij MS gaf een veel betere groei dan ½ MS, hoewel ook

bij gerbra dit later gevonden werd.. De groei op dit medium bereikte echter niet de groei van de groei op de beide CAM media. Het is ook verrassend dat een micro-minerale aanpassing bij CAM niet een dergelijk grote verbetering gaf. Hier werd bij gerbera wel een extra groeiverbetering gevonden door micro-element aanpassing bovenop de macro-element aanpassing. CAM III had na de normale cyclus van 3 weken slechts een iets hogere vermeerderingsfactor maar die verschilde niet significant van CAM I.

Tabel 4.3.3. Resultaten van drie vermeerderingscycli op 4 verschillende media. De gemiddelden zijn de gewichtstoenamefactoren van protocormen na 3 weken kweek.

cyclus	½ MS I		½ MS III		CAM I		CAM III	
	Gem.	se	Gem.	se	Gem.	se	Gem.	se
1	2,92	0,08	3,06	0,10	3,43	0,12	3,24	0,10
2	3,06	0,08	3,60	0,07	3,87	0,09	3,96	0,09
3	2,78	0,06	3,43	0,10	3,66	0,16	3,88	0,07

Brede toepasbaarheid: aangepast medium getest op twee nieuwe cultivars

Om de brede toepasbaarheid van de aanpassing te bepalen werden twee nieuwe cultivars in de proef betrokken. Naast cv 1 werden een wat lastiger te vermeerderen cv 2 en een 'normale' cv 3 getest. Voor beide nieuwe cultivars gold dat als medium CAM I en CAM III (niet in tabel opgenomen maar resultaten als CAM I) de beste zijn, maar DKW gaf ook redelijke resultaten. Cv 2 vormde veel scheuten op MS, wat een nadeel is omdat slechts de protocormen voor de vermeerdering gebruikt kunnen worden. Dit is ook de reden van de lage vermeerderingsfactor. Bij bepaling van deze factor werd alleen het protocormmateriaal gewogen. De gewichtstoename inclusief bladmateriaal was bij cv 2 wel net zo hoog als voor cv 1 en 3. Kennelijk is de absolute groei ongeveer even groot, maar de 'nuttige' protocorm-groei minder.

Tabel 4.3.4. Groei van drie Cymbidium-cultivars op drie verschillende media; gewichtstoenamefactor van het protocormmateriaal per 3 weken; representatief voorbeeld van één cyclus.

medium	Cultivar 1	Cultivar 2	Cultivar 3
½ MS	2.82 ± 0.08	1.98 ± 0.05	2.78 ± 0.06
½ DKW	3.56 ± 0.07	2.99 ± 0.06	3.19 ± 0.07
CAM I	3.87 ± 0.14	3.33 ± 0.12	3.70 ± 0.15

Het is met deze resultaten duidelijk geworden dat mediaaanpassing breder in het sortiment toegepast kan worden.

Mediuanalyse na een groeicyclus

Na de 3-weekse groeicyclus werd een macro-elementanalyse van het nog aanwezige medium uitgevoerd. Hieruit bleek dat geen enkel element totaal uitgeput was. Van fosfaat was slechts 8% over, en dit element zou beperkend kunnen worden. Van fosfaatopname is echter bekend dat de plant meer opneemt dan nodig voor de directe, optimale groei ('luxe opname'). Voor sulfaat wordt hetzelfde beweerd; hier van was echter nog meer dan 40% aanwezig, zodat dit hier niet speelde.. Bij stikstof bleek het merendeel (ca. 90%) van de ammonium opgenomen, maar was nog 50% van de nitraat in oplossing. Suikeranalyse toonde aan dat door de snelle groei het suikergehalte laag was en gezakt van 2 % naar minder dan 0,5% (CAM zelfs 0,1%). In een groeicurve bleek ook dat in het CAM medium de groei afnam na 3 weken, terwijl dat in het MS medium en in mindere mate DKW nog enige tijd op het zelfde peil doorging.

De samenstelling van het medium, en speciaal de relatieve concentraties van de mineralen (immers er is geen uitputting waargenomen) zorgden dus voor de betere groei.

4.3.4 Conclusie

Voor Cymbidium bleek het zeer aantrekkelijk om een soortaanangepast medium te gebruiken. Voor alle drie geteste cultivars werd de vermeerdering sterk bevorderd ten opzichte van ½ MS, het gebruikelijke medium. ½ MS lijkt qua minerale samenstelling sterk op het ook veel gebruikte OrchiMax medium, dat niet in ons vergelijkend onderzoek was opgenomen. Weliswaar gaf ½ DKW een betere groei vergeleken met ½ MS,

maar de CAM-media waren ook t.o.v. DKW significant beter. Samen met de analyse resultaten (geen uitputting van een specifiek element) lijkt de conclusie dat speciaal de verhouding van de aangeboden elementen/mineralen in het aangepaste medium belangrijk is voor de betere groei.

4.4 Dahlia

4.4.1 Inleiding

Gelijktijdig met dit nutriëntenonderzoek liep bij het COWT een project voor vermeerdering van dahlia in vloeibaar medium. Hierbij werd standaard de minerale samenstelling van DKW gebruikt. Daarom hebben wij in dit onderzoek DKW dan ook vergeleken met het aangepaste medium, DAM. Omdat dahlia ook op vast medium vermeerderd wordt, hebben wij zowel op vast als in vloeibaar medium vermeerderd.

4.4.2 Werkwijze

Voor dahlia weefselweek werden knopen (bladparen met zowel boven als onder het bladpaar een halve knoop lengte) ingezet. In vloeibaar medium werden 5 enkele knopen genomen; bij vast soms dubbelknopen (2 bladparen aanwezig). Het vloeibare medium bestond uit 50 ml DKW met DKW vitamines of dahlia aangepast medium (=DAM) met MS vitamines, 3 % sacharose, pH 5.8 Voor het vaste medium werd 100 ml met dezelfde samenstelling gebruikt met 0,6 % BBL agar. Na 4 weken werden de planten beoordeeld op vermeerdering (hoeveel nieuwe bladparen kunnen ingezet worden), habitus (kleur, glazigheid, etc), gewicht, en drooggewicht. Niet alle aspecten werden bij elke proef meegenomen.

4.4.3 Resultaten en discussie

Tabel 4.4.1. Plantgehalte en samenstelling media van dahlia

Mineraal	Plant-gehalte	'ideaal' aangepast	Aangepast Medium DAM	DKW
	mmol/g	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	1.12	50	15.6	17
NO ₃ ⁻			34.9	33
K	0.73	32.8	19.1	18
Ca	0.22	9.7	9.7	9.3
Mg	0.056	2.5	2.5	3
SO ₄ ⁻²	0.23	10.1	10.1	12
PO ₄ ⁻³	0.10	4.5	4.5	1.95
			MS micro	
	µmol/g	µmol/l	µmol/l	µmol/l
Fe			100	120
Mn	1.3	29	100	200
Zn	0.5	11.2	30	72
B	3.6	80.4	100	78
Cu	0.13	2.9	0.1	1
Mo	0.002	0.045	1	1.6

Media vergeleken

In tabel 4.4.1 zijn naast de plantanalyse en het afgeleide 'ideale medium' de twee media weergegeven zoals gebruikt voor dahlia. Het opvallendste verschil tussen deze twee media zit in het fosfaatgehalte. Verder is het hoge sulfaatgehalte van de plant dahlia opvallend als we dit vergelijken met het gehalte van andere plantensoorten. Dit zou de reden kunnen zijn dat dahlia in de praktijk op DKW, en niet op MS gekweekt wordt zoals de meeste soorten. DKW heeft immers een veel hoger sulfaat gehalte dan MS. De gekozen

kalium-concentratie is laag, maar bij proeven in appel en gerbera bleek dat dit geen invloed had op het gehalte aan kalium in de plant. Proeven met verhoogd kalium lieten bij deze soorten geen betere groei zien.

Er werden geen experimenten met micro-element aanpassingen gedaan, hoewel een verhoging van Cu en verlaging van Mn ook hier verbeteringen had kunnen geven (vergelijk resultaten gerbera). De ideale concentratie koper ligt immers een factor 29 hoger dan de daadwerkelijk toegepaste

Vergelijking groei op vast en vloeibaar DKW en DAM medium

Plantjes werden vermeerderd op vast en in vloeibaar medium, met als minerale basis de DKW en DAM concentraties uit tabel 4.4.1. Planten groeiden op vast medium (veel) slechter dan in vloeibaar. Dit is ook vastgesteld in het bovengenoemde parallelproject. De gegevens in tabel 4.4.2 zijn afkomstig van een experiment waarbij voor de vermeerdering op vast medium gestart is met gelijkvormig materiaal van vloeibaar medium. Dit werd twee maal op vast medium vermeerderd en vervolgens gemeten na deze 2^e cyclus.

Tabel 4.4.2. Vermeerdering op 4 verschillende media bij dahlia; vermeerdering uitgedrukt in opbrengst aan te vermeerderen bladparen als 5 vermeerderingseenheden zijn ingezet.

medium	Gewicht na cyclus In mg se		Te vermeerderen bladparen se		Drooggewicht% se	
DKW vast	4045	394	10.8	1.0	8.6	0.3
vloeibaar	13749	1027	16.0	0.9	6.5	0.0
DAM vast	6845	947	14.8	1.4	8.9	0.8
vloeibaar	12421	661	18.5	1.1	7.2	0.1

De aantallen gevormde bladparen in vloeibaar en vast medium lagen niet erg ver uit elkaar voor DAM. Bij DKW was het verschil groter. Vloeibaar medium gaf een betere vermeerdering, terwijl bij vast medium wel 2x zoveel medium gebruikt werd. Voor DAM vloeibaar en DKW vloeibaar werd een ongeveer gelijke vermeerdering gevonden, en de verschillen in versgewicht zijn niet significant. Drooggewichtspercentages zijn lager voor het 'vloeibaar'-vermeerderde materiaal, hoewel het voor de DAM plantjes iets hoger was dan voor DKW. Het versgewicht van de plantjes was in vloeibaar veel hoger, grotendeels door de robuustere plant, voor een kleiner deel door het lagere drooggewicht.

Neerslagen bij bereiding van dahliamedia

Belangrijk was de waarneming dat planten, die 2 cycli op DKW vast medium vermeerderd waren, erg geel werden. De kwaliteit liep zover terug dat verdere vermeerdering zeer moeilijk werd. Dit leek op een gebrekverschijnsel te duiden. Neerslagen bij de mediumbereiding zouden tot gevolg kunnen hebben dat essentiële elementen weggevangen worden. Omdat er zowel bij DAM als DKW neerslag ontstond bij de bereiding van het medium, is een experiment opgezet om deze neerslagen, en de invloed van het wegvangen van het neerslag te onderzoeken. Dit imiteerde de situatie bij DKW- en DAM-agarmedia waar het neerslag niet weer in oplossing ging tijdens de vermeerderingscyclus van 4 weken. In vloeibare media gingen de neerslagen na enige dagen weer in oplossing.

De volgende vloeibare media werden gebruikt: DKW-gefilterd, DKW-ongefilterd, DAM- gefilterd, DAM-ongefilterd, en DAM-fosfaat. Bij DAM-fosfaat werd het fosfaat apart gesteriliseerd en toegevoegd na autoklaveren. Bij deze bereidingswijze ontstond geen neerslag.

Na drie cycli was er tussen DKW-gefilterd en DKW-ongefilterd een groot verschil te zien: planten van DKW-gefilterd waren geel en klein en niet meer te vermeerderen. Zij hadden dezelfde habitus als de DKW-agar planten. Op DKW-ongefilterd was het eerste nieuwgevormde bladpaar soms wel gelig, maar de daarna gevormde niet meer. Dit viel samen met het oplossen van de gevormde neerslag.

Tabel 4.4.3. Vergelijking van dahliavermeerdering na de 1^e en 3^e cyclus op verschillende media, al dan niet gefilterd (verdere verklaring, zie tekst).

Medium	Gefilterd	Groei 1 ^e cyclus gewichtstoename factor	Groei 3 ^e cyclus gewichtstoename factor	Aantal vermeerde. eenheden ^{**}) na 1 ^e cyclus	Aantal vermeerde. eenheden na 3 ^e cyclus
DKW	Nee	7.2 ± 0.4	7.6 ± 0.6	22 ± 1	17 ± 1
	Ja	5.2 ± 0.7	-***)	17 ± 3	-***)
DAM	Nee	10.0 ± 2.3	8.0 ± 0.4	18 ± 2	20 ± 1
	Ja	8.1 ± 0.8	6.4 ± 1.1	16 ± 3	19 ± 1
DAM -P	Nee *)	9.4 ± 1.6	9.8 ± 0.9	24 ± 1	22 ± 1

*) K-fosfaat apart gesteriliseerd toegevoegd; **) bladparen die ingezet kunnen worden; ***) kon niet meer goed vermeerderd worden

Metingen van pH toonden aan dat waarschijnlijk door pH-verlaging tijdens de vermeerdering op het vloeibare medium het neerslag weer in oplossing ging. Deze verlaging was wisselend maar lag rond 0,6 pH eenheid. Hieruit bleek dat er door het filtreren van het medium essentiële elementen zijn verdwenen die tijdens de weefselkweek in vloeibaar medium weer terug in oplossing gaan. Uit analyse bleek dat het neerslag dat weggefilterd was bestond uit ijzerfosfaat plus een geringe hoeveelheid calciumfosfaat. De kleur van de plantjes gaf al aanwijzingen dat er ijzeregebrek ontstaan was.

Tussen DAM-gefilterd en -ongefilterd was bijna geen verschil in vermeerdering te zien. Ondanks het gegeven dat ook hier een neerslag weggefilterd was, bleek het dus niet om bijna wegvangen van een essentieel element als ijzer zoals bij DKW te gaan. Uit analyse bleek dat het neerslag hoofdzakelijk calciumfosfaat was. Omdat het verdwijnen hiervan nauwelijks invloed op de groei had, zou het om een geringe hoeveelheid moeten gaan. Metingen bij appel lieten zien dat daar minder dan 10 % van beide elementen neergeslagen was. DAM-medium waaraan het fosfaat apart was toegevoegd, liet een wat hogere gewichtstoename zien na de 3^e cyclus, maar de vermeerdering was dezelfde. Fosfaat was dus nauwelijks beperkend geworden.

Vastheid agar

In een ander experiment is nog gekeken naar de invloed van de vastheid van agar. Het DAM agarmedium bleef zachter dan het DKW agarmedium, wanneer BBL agar werd gebruikt. Dit wordt veroorzaakt door de grotere pH-daling tijdens het autoklaveren (zie bijlage II). Door de lagere waterspanning zou dit ook een verbeterde beschikbaarheid van nutriënten tot gevolg gehad kunnen hebben. Door snellere diffusie zullen geen plaatselijke tekorten ontstaan. Met Daishin agar was de vastheid van beide media ongeveer hetzelfde, maar bleven de verschillen in groei hetzelfde. Ook werd nog gelrite getest. Hoewel de waterspanning lager is dan bij agarmedia, was de groei 50 % slechter dan op de agarmedia.

4.4.4 Conclusie

Het gebruik van aangepast medium had bij dahlia een sterk verbetering t.o.v. DKW medium als vermeerderd werd op vast medium. Bij vermeerdering op vloeibaar was er geen significant verschil. Dit grote verschil kon volledig verklaard worden door de neerslagvorming bij vast DKW-medium waarbij ijzer weggevangen werd. Doordat de neerslagen, ontstaan tijdens autoklaveren, niet weer in oplossing gingen, ontstonden er dus tekorten.

Grote verschillen bij vloeibaar medium waren minder te verwachten, omdat hier niet vergeleken werd met op MS-mineralen gebaseerd medium. De verschillen tussen MS en aangepaste media zijn veel groter dan tussen DKW en aangepaste media. Het verschil in mineraalgehalte tussen DAM en DKW is vooral te vinden in fosfaatgehalte. Het fosfaat is nauwelijks beperkend voor de groei wat ook bleek uit de experimenten met apart toevoegen van gesteriliseerd fosfaat, waarbij in de 3^e cyclus pas een lichte verbetering in groei maar niet in vermeerdering werd gevonden.

4.5 Gerbera

4.5.1 Inleiding

Gerbera is een belangrijke plant voor het weefselkweekbedrijfsleven, omdat alle uitgangsmateriaal via weefselkweek verkregen wordt. Voor deze soort zou het dus zeer aantrekkelijk zijn om een mediumaanpassing te vinden, die de resultaten in de weefselkweek verbetert.

Bij gerbera is ervoor gekozen om tot een beter medium te komen via twee methoden: ten eerste de elementsamenstelling van de plant, en ten tweede het vergelijken van de samenstelling van nutriënten zoals gebruikt in de substraatteelt, en die in weefselkweekmedia.

4.5.2 Werkwijze

Twee gerberacultivars zijn voor het onderzoek gebruikt. Zij zijn onder nummer verkregen van een weefselkweekbedrijf. In het verslag worden ze verder cv 1 (een goed vermeerderende en eenvoudig te snijden cultivar) en cv 2 (een lastiger cultivar) genoemd. Begonnen zijn de experimenten met cv 1.

Beide cultivars werden normaal vermeerderd op MS medium met de volgende vitaminen (per l: 100 mg m-inositol, 30 mg thiamine-HCl, 10 mg nicotinezuur, 1 mg pyridoxin-HCl), 3 % sacharose, en als groeistof 2,5 mg kinetine per l. In enkele experimenten werd aanvankelijk in plaats van agar ook 0,3 % gelrite als bodemversteviger gebruikt, in alle latere alleen agar 0,6%. In de vergelijkingsexperimenten werd verder DKW gebruikt als minerale basis en aangepaste media, waarvan de samenstelling hieronder besproken wordt in resultaten en discussie.

Ingezet werden altijd enkele plantjes van vergelijkbare grootte. Beoordeeld werd de vermeerdering op het gewicht van het groepje planten ontstaan uit één plantje, de vermeerderingsfactor en de gemiddelde plantgrootte in arbitraire eenheden. Beoordeling vond plaats na 24 tot 30 dagen, zodat de gegeven representatieve voorbeelden uit verschillende experimenten niet met elkaar vergeleken kunnen worden. Zes dagen langer kweken gaf een aanzienlijke groei- en gewichtstoename. Experimenten werden over minstens 3, maar meestal 5 vermeerderingscycli voortgezet.

Voor beworteling werd slechts één medium gebruikt, een gemodificeerd MS-medium: NH_4NO_3 was met de helft verlaagd tot 10,3 mM. Na 3 weken werden de bewortelde plantjes uitgeplant in de kas.

4.5.3 Resultaten en discussie

Samenstelling GAM vergeleken met MS

De analyse van gerberablاد uit Bergmann (1992) werd gebruikt voor de berekening van het aangepaste medium. Voor gerbera viel bij vergelijking direct op dat als het gebruikelijke MS-medium vergeleken wordt met de plantgehalten, calcium erg laag is en in mindere mate ook magnesium en fosfor. Het nieuwe medium heeft hogere concentraties van deze drie macro-elementen. De verschillen in micro-elementen worden later specifiek besproken, maar duidelijk is dat koper erg laag is en molybdeen hoog.

Tabel 4.5.1. Minerale gehalte van volwassen blad, en samenstelling van weefselkweekmedia en voedingsoplossing bij substraatteelt van voornaamste elementen

ION	Gesloten substraat-teelt	Plant-gehalte	'ideaal' aangepast medium	Aangepast medium GAM I	DKW	MS
	mmol/l	mmol/kg DW	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	0.75	2.1	40	6	17	20
NO ₃ ⁻	7.25			32	33	40
K ⁺	4.5	1.1	20.7	11.7	18	20
Ca ²⁺	1.6	0.35	7.7	8	9.3	3
Mg	0.4	0.12	2.4	2.5	3	1.5
SO ₄ ⁻²	0.7			2.5	12	1.5
PO ₄ ⁻³	0.6	0.10	1.9	1.7	1.95	1.25
Mineraal	µmol/l	µmol/kg DW	µmol/l	µmol/l Als MS	µmol/l	µmol/l
Fe	25			100	120	100
Mn	5	1.2	23	100	200	100
Zn	3	0.8	15	30	72	30
B	20	3.2	61	100	78	100
Cu	0.5	0.13	2.5	0.1	1	0.1
Mo	0.5	0.004	0.075	1	1.6	1

Vergelijking van gelrite en agar als gelerend agens; het optreden van glazigheid

Omdat gelrite als gelerend voordelen kan bieden, werd het eerste weefselkweekexperiment van gerbera gestart op zowel agar als gelrite. Voordelen van gelrite zijn bijv. constantere kwaliteit en snellere diffusie van nutriënten naar de explantaten. Er werden 3 macrominerale samenstellingen getest. Media: G-MS, GAM I (aangepast medium) en DKW (zie tabel 4.5.1 voor samenstelling media, en tabel 4.5.3 voor resultaten).

De eerste cyclus, en in het geval van aangepast medium ook nog de tweede, op gelrite gaf zeer goede groei: een 2 x zo hoog eindgewicht van de te snijden plantgroepjes als op agar, en daardoor een hogere vermeerderingsfactor en grotere plantjes. Maar in volgende cycli werden alle planten glazig op gelrite en waren ze niet meer te gebruiken (tabel 4.5.2). Dit wijst erop dat de voedingsstoffen weliswaar veel sneller gebruikt konden worden in gelrite (meer vergelijkbaar met vloeibaar medium), maar dat de verdere fysiologie van de plant er voor zorgde dat er glazigheid ontstond. Deze cultivar vertoonde ook glazigheid op agarmedia, maar in veel mindere mate. Daarbij had GAM I -agar altijd het laagste aantal glazige planten, terwijl er vaak cycli waren zonder glazigheid in de GAM -planten. Besloten werd om geen gelrite meer te gebruiken in verdere experimenten.

Als er later nog eens glazigheid was in sommige cycli op agar, dan trad deze op bij MS of bij DKW. Het betrof altijd lage aantallen, hoogstens in 3 van 30 plantgroepjes maar meestal minder. Deze groepjes werden altijd uitgesloten van verdere vermeerdering; ook als slechts een deel van de te snijden plantjes glazig was.

Tabel 4.5.2. Ontwikkeling van glazigheid (%) in opeenvolgende cycli; bij elke nieuwe cyclus werden zo mogelijk de overgebleven niet-glazige plantjes uit de vorige cyclus ingezet .

Vermeerderingscyclus	G-MS		DKW		GAM I	
	gelrite	agar	gelrite	agar	gelrite	agar
1	0	0	0	0	0	0
2	3.3	20	10	10	0	0
3	96.7	0	90	23.3	16.7	0
4	83.3 *)	16.7	100	30	70	13.3
5	gestopt	20	gestopt	29	100	0

(* GAM-gelrite plantjes uit cyclus 3 gebruikt)

Vergelijking van de groei op MS, DKW en GAM I

Bij de vermeerdering op de agarmedia voldeed GAM I het beste, hoewel ook DKW goede resultaten gaf (tabel 4.5.3). Hiervoor is een verklaring: DKW lijkt qua elementsamenstelling meer op de 'gemiddelde' plant dan MS, afgezien van de zwavelconcentratie.

Tabel 4.5.3. Vermeerdering van gerbera op 3 verschillende media. Voorbeeld van een representatieve cyclus.

medium	Gewicht groep plantjes	Vermeerderingsfactor	Glazigheid %
MS	305 ± 28	3,5 ± 0,2	20
DKW	719 ± 54	4,0 ± 0,2	0
GAM I	773 ± 66	4,2 ± 0,3	0

Verhoging stikstofconcentratie; sulfaat tegen neerslag

Bij het GAM I medium is uitgegaan van 40 mM N als basis voor de berekeningen. Dit is een lagere stikstofconcentratie dan in MS en DKW, die resp. 60 en 50 mM N hebben. Bij GAM I trad in lichte mate neerslag op. Sulfaattoevoeging leek in separate experimenten neerslagvorming te verminderen. Om deze reden werd een GAM II medium getest waarin via 10 mM extra $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zowel de N verhoogd werd als meer sulfaat gegeven wordt tegen neerslagvorming. Alleen N verhoging werd getest met GAM III medium waarin deze N extra bereikt werd met 20 mM NH_4Cl . Bij de bereiding van GAM II bleek dat extra sulfaat inderdaad het optreden van troebelheid (= weinig neerslag) verminderde.

Zowel GAM II (ondanks minder neerslag) als III gaf een slechtere vermeerdering dan GAM I met cv 1 (tabel 4.5.4). Omdat hierbij de andere elementen dan N niet proportioneel mee verhoogd werden, waren de onderlinge verhoudingen dus veranderd en voldeed deze aanpassing niet meer aan ons uitgangspunt. In een later experiment werd een medium GAM I (N60) getest, waarbij voor de totale aanpassing van de macromineralen N 60 als uitgangspunt diende.

Tabel 4.5.4. Vermeerdering van gerbera op 5 verschillende media. Voorbeeld van een representatieve cyclus.

Medium	Gewicht plantgroepje		Aantal plantjes per groepje		Grootte plantjes *)		Glazigheid %
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	SE	
G-MS	425	25	5.2	0.2	1.45	0.08	0
DKW	712	75	6.5	0.4	1.98 **)	0.07	6.7
GAM I	696	66	6.6	0.4	1.70	0.06	0
GAM II	427	37	4.6	0.2	1.56	0.09	3.4
GAM III	516	32	5.8	0.4	1.51	0.07	0

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein; 2 middel; 3 groot

***) DKW plantjes uitzonderlijk groot; normaliter dezelfde grootte als GAM I

Extra kalium in GAM-medium

Medium GAM I bevat relatief weinig K (zie tabel 4.5.1. samenstelling GAM I). Omdat extra sulfaat neerslag voorkwam en om naast extra N ook extra K in het medium te brengen, werd ook het medium GAM IV getest. Hierin werd K verhoogd met 10 mM via 5 mM K_2SO_4 . N werd verhoogd met 20 mM via 5 mM NH_4NO_3 en 10 mM NH_4Cl extra. Hierbij werden voor het eerst de beide cultivars 1 en 2 gebruikt.

Het positieve effect van GAM I t.o.v. MS en DKW wat wij reeds vonden voor cv 1 werd bevestigd voor cv 2 (tabel 4.5.5). GAM I was iets beter dan GAM IV, wat zich vooral uitte in grootte en aantal plantjes geschikt voor verdere vermeerdering. Daarbij zijn de verschillen voor cv 1 groter dan voor cv 2.

Tabel 4.5.5. Vermeerdering van gerbera op 5 verschillende media. Voorbeeld van een representatieve cyclus.

Medium	cultivar	Gewicht groepje		Aantal plantjes		Grootte *)	
		Gemidd	se	Gemidd	se	Gemidd	se
G- MS	1	161	9	3.1	0.1	1.06	0.03
DKW	1	277	19	4.2	0.2	1.38	0.05
GAM I	1	311	19	4.6	0.3	1.72	0.06
GAM IV	1	248	17	4.0	0.2	1.25	0.04
G- MS	2	273	17	4.8	0.3	1.06	0.02
DKW	2	375	27	5.4	0.3	1.36	0.06
GAM I	2	404	25	6.2	0.3	1.60	0.05
GAM IV	2	447	31	6.0	0.4	1.40	0.06

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein; 2 middel; 3 groot

Vergelijking van minerale concentraties in substraatteelt en weefselweek

In de substraatteelt bestaat een langjarige ervaring met aanpassingen van minerale voeding, zowel in gesloten als open systemen, om tot optimale groei te komen. Voor onze vergelijkingen van minerale concentraties in weefselweek en substraatteelt gebruikten wij de waarden van het gesloten systeem. Dit komt meer dan andere systemen overeen met de 'gesloten' weefselweek.

Over het algemeen liggen de concentraties voor zowel macro- als micro- elementen in het weefselweekmedium een factor 3 tot 10 hoger dan in gesloten substraatteelt (zie tabel 4.5.6). Dit is een aanwijzing dat opname in weefselweek minder effectief is om tot optimale groei te komen. Een reden zou kunnen zijn dat gespecialiseerde organen als wortels ontbreken. Daarnaast moet om de factor arbeid niet te groot te maken met een zo hoog mogelijke concentratie aan nutriënten begonnen worden. Immers anders met de cycluslengte verkort worden, omdat eerder uitputting van het medium gaat optreden.

Macro-elementen.

Als uitgegaan wordt van een 'N 60' voor het macromineraal aangepaste medium, zoals in de latere experimenten, worden de getallen voor deze elementen $1\frac{1}{2}$ x zo hoog in het aangepaste medium t.o.v '40 N'. Dit zijn de cursieve getallen in tabel 5.6. Van de macro-elementen zijn Ca en P relatief laag in MS met verhoudingsgetallen van 1,7 en 1,8. In het aangepaste medium zijn deze dan ook hoger. Bij DKW val het hoge gehalte aan S op.

Micro-elementen

De opvallende afwijkingen van de normale verhoudingen zijn **koper** en **mangaan**. In de substraatteelt worden veel hogere concentraties kopersulfaat gebruikt dan in weefselweek, terwijl de concentratie mangaan in substraatteelt veel lager is.

Molybdeen is een apart geval. Dit is het enige element dat in hogere concentratie gegeven wordt in weefselweek en substraatteelt dan volgens de plantanalyse nodig zou moeten zijn. Waarschijnlijk is hier een bepaalde minimumconcentratie nodig om tot enige opname te komen.

Tabel 4.5.6. Verhouding tussen gebruikte minerale concentraties in 3 media en gesloten substraatteelt. Voor macromineralen berekend voor zowel 40 als 60 mM als basis.

Mineraal	'Ideaal' aangep.		GAM I – 40N				MS		DKW	
	40 N	60N			- 60N					
N NH ₄ ⁺	5		4.8		8.0	12.0	7.5	26.7	6.3	22.6
NO ₃ ⁻		7.5		7.2	4.4	6.6		5.5		4.6
K	4.6	6.9		2.6	3.9		4.4		4.0	
Ca	4.8	7.2		5.0	7.5		1.7		5.8	
Mg	6.0	9.0		6.3	9.4		3.8		7.5	
SO ₄ ⁻²				3.6	5.4		2.1		17.1	
PO ₄ ⁻³	3.2	4.8		2.8	4.2		1.8		2.8	
Fe				4.0			4.0		4.8	
Mn		4.6		20			20		40	
Zn		5.0		10			10		24	
B		3.1		5.0			5.0		3.9	
Cu		5.0		0.2			0.2		2.0	
Mo		0.15		2.0			2.0		3.2	

Cu en Mn aanpassingen in MS medium

De sterke relatieve afwijkingen van weefselweek- t.o.v. substraatteelt concentraties bij Cu was aanleiding om in weefselweek de koperconcentratie sterk te verhogen (t.o.v. van normaal MS met een factor 16!). Het had bij de door ons eerst geteste gerbera cultivar 1 een enorm effect: de groei in het voor de rest onveranderde MS medium was bijna twee keer zo hoog en de kleur van de plantjes was opvallend groener. Ook zag de bladvorm er veel 'volwassener' uit wat een snellere ontwikkeling zou kunnen betekenen, omdat de plant al 'volwassener' is. Of dit in latere stadia na uitplanten inderdaad tot versnelde groei zou leiden, is niet getest. Mangaanvermindering met een factor 10 gaf ook een verbetering van de groei, maar de plantjes werden wat chlorotisch. Combineren van beide aanpassingen gaf de beste plantjes, hoewel de beide verbeteringen niet cumulatief waren.

Tabel 4.5.7. Representatieve vermeerderingscyclus van gerbera cv 1 op MS medium: zonder aanpassingen, met verhoogd Cu en met verlaagd Mn. Gemiddelde waarden over 50 inzettingen (5 potten van 10)

Medium	Gewicht groepje in mg		Aantal plantjes		Grootte *)	
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se
G-MS	230	12	5.0	0.2	1.0	0.1
- Mn	536	27	7.2	0.3	1.5	0.1
+ Cu	618	36	7.2	0.4	1.7	0.1

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein; 2 middel; 3 groot

Ten opzichte van het normale G-MS medium geven G-MS-Mn en G-MS + Cu een duidelijke verbetering in zowel de groei als de vermeerdering (tabel 4.5.7). Het extra koper heeft een groter effect dan het minder mangaan. Planten op extra koper zijn ongeveer 2x zo groot als de controle en planten op minder mangaan zijn ongeveer 1.5x zo groot. Er was nog een belangrijke verbetering. Glazigheid trad nog steeds af en toe op, maar veel minder dan bij MS zonder aanpassingen in Cu. Ook bij appel werd dit reeds gevonden.

Cu en Mn aanpassingen in GAM medium

Omdat aanpassing van de micro-nutriënten Mn en Cu een opvallende verbetering gaf bij G-MS, werden bij GAM I dezelfde aanpassingen in deze elementen onderzocht. Ook bij GAM I gaven deze aanpassingen goede resultaten in beide cultivars. Wanneer zowel Mn als Cu in het zelfde medium, dus de combinatie van beide, werden aangepast gaf dit het beste resultaat (tabel 4.5.8). De verbetering gevonden bij GAM I -Mn + Cu t.o.v. GAM I normaal was 1.5 tot 2 x in de groei gemeten als gewichtstoename zonder een effect op de

vermeerderingsfactor. Dat betekende dat de plantjes aanmerkelijk groter waren, en dus eenvoudiger te 'handelen'.

Tabel 4.5.8. Representatieve vermeerderingscyclus van gerbera cv 1 en 2 op GAM I medium: zonder aanpassingen, met verhoogde Cu, met verlaagd Mn en beide. Gemiddelde waarden over 50 inzettingen (5 potten van 10)

Cultivar 1		Gewicht groepje		Aantal plantjes		Gemidd. grootte *)	
		Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se
G - MS	Normaal	309	20	4,9	0,3	1,0	<0,1
GAM I	normaal	513	29	6,5	0,3	1,4	<0,1
GAM I	- Mn	793	40	7,1	0,3	1,6	0,1
GAM I	+ Cu	648	33	5,8	0,3	1,8	0,1
GAM I	- Mn + Cu	776	40	6,3	0,3	2,0	0,1

Cultivar 2		Gewicht groepje		Aantal plantjes		Gemidd. grootte *)	
		Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se
G - MS	Normaal	166	11	3,8	0,2	1,0	<0,1
GAM I	normaal	411	24	6,4	0,3	1,3	<0,1
GAM I	- Mn	453	22	6,1	0,3	1,6	<0,1
GAM I	+ Cu	590	27	6,3	0,3	1,6	<0,1
GAM I	- Mn + Cu	631	25	5,8	0,3	1,7	0,1

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein; 2 middel; 3 groot

Effect van stikstofbasisverandering voor mediaaanpassing van 40 naar 60 mM

Hierboven werd reeds een experiment behandeld waar een verhoging van uitsluitend de N tot 60 mM geen positief effect had op de vermeerdering. In de volgende reeks experimenten werden media vergeleken waarin alle macro-elementen aangepast op niveau N 60 als basis, en alle macro- en micro-elementen aangepast op niveau N 40 (GAM VI) waren. Deze werden vergeleken met GAM I N 40 en GAM I N40 – Mn + Cu. Beide cultivars werden getest (zie tabel 4.5.9).

Tabel 4.5.9. Representatieve vermeerderingscyclus van gerbera cv 1 en 2 op 4 media (zie tekst). Gemiddelde waarden over 50 inzettingen (5 potten van 10)

Cultivar 1	Gewicht groepje planten		Aantal plantjes		Gemidd. grootte *)	
	Gemidd. in mg	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se
GAM I N 40	255	17	4,4	0,3	1,1	0,0
GAM I N 60	600	39	7,0	0,3	1,5	0,1
GAM I + Cu - Mn	764	36	6,2	0,3	1,7	0,1
GAM VI	674	30	6,2	0,4	1,7	0,1
Cv 2						
GAM I N 40	266	14	4,4	0,2	1,1	0,0
GAM I N 60	582	34	6,2	0,3	1,5	0,1
GAM I + Cu - Mn	526	22	5,8	0,4	1,7	0,1
GAM VI	515	24	5,0	0,2	1,7	0,1

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein; 2 middel; 3 groot

N60 geeft een verbeterde groei t.o.v. N40. Dus een verhoging van de zoutsterkte terwijl de verhoudingen tussen de macromineralen hetzelfde bleven gaf wel een verbeterde groei, terwijl alleen verhoging van de stikstof een negatief effect had (zie boven). Het toonde aan dat inderdaad de verhouding waarin de mineralen aangeboden werden belangrijk was. Er is weinig verschil in vermeerdering tussen GAM I N60, GAM I –Mn+Cu en GAM VI. De vermeerderingsfactor bij N60 lag soms wat hoger, terwijl de plantjes bij de micro-element aanpassingen groter waren. Verder bleek uit dit experiment dat micro-element aanpassingen anders dan bij Cu en Mn geen grote invloed hadden op de groei.

Verrassend was dat bleek dat er na een groter aantal cycli wel verschillen optraden tussen GAM I N60 en GAM I N40–Mn+Cu, waarbij de laatste beter was. Een logische volgende stap is medium GAM I N60–Mn+Cu nu te testen. Dit gaf een verrassende uitkomst. De verwachting was dat dit medium de beste groei en vermeerdering zou geven. Hoewel geen significant verschillen gevonden werden, bleek speciaal cv 1 meestal beter te groeien op GAM I –Mn+Cu op basis van N40. Voor cv 2 was dit omgekeerd, en was medium op basis van N 60 iets beter, maar ook niet significant verschillend. Er scheen een verschil in 'zout'tolerantie tussen beide cultivars te bestaan, waarbij cv 1 een hoge zoutsterkte (basis 60N) van het medium minder goed verdroeg.

Andere micro-element aanpassingen

Hoewel we in bovenstaande experimenten slechts Cu en Mn aangepast hebben, zou het aantrekkelijk kunnen zijn om ook de Zn-concentratie aan te passen. Uit tabel 5.6 blijkt dat deze hoog is t.o.v. de substraatteeltconcentratie speciaal in DKW. Verlaging bij Mn had immers een positief effect op de groei. Hoewel er geen Fe-bepalingen beschikbaar waren voor gerbera, lijkt een aanpassing hiervoor niet nodig. Uit de waarden die in groene plantjes gevonden worden blijkt dat het Fe gehalte van MS en daarmee van het aangepaste medium binnen de 3 tot 10 verhouding valt die hierboven besproken werd.

Uitplantproeven

Na beworteling overleefden plantjes van alle geteste media het uitplanten. Op MS en DKW vermeerderde plantjes groeiden na beworteling slechter dan plantjes van GAM media. In het hieronder behandelde experiment werden alleen aangepaste media vergeleken: twee N-gehalten met en zonder micro-elementaanpassingen in het vermeerderingsmedium.

Tabel 4.5.10. Resultaten uitplantproeven met gerbera plantjes van cv2 van verschillende media. Gewicht en aantal wortels plantjes, vergeleken na beworteling voor uitplanten met 3 weken na uitplanten

Medium	Gewicht per plantje in mg				Relat. groei-factor	Aantal wortels			
	Voor uitplanten		Na uitplanten			Voor uitplanten		Na uitplanten	
GAM I basis	Gemidd.	se	Gemidd.	se		Gemidd.	se	Gemidd.	se
N 40	164	11	1212	53	7,4	2,7	0,3	3,4	0,2
N 40 + Cu - Mn	142	6	1104	46	7,8	2,0	0,2	2,7	0,2
N 60	164	11	1324	69	8,1	1,9	0,2	2,6	0,1
N 60 + Cu - Mn	173	10	1369	59	8,0	1,7	0,1	2,1	0,1

Tijdens de groei in de kas namen de planten van macro en microaangepaste media absoluut meer in gewicht toe dan alleen macro aangepaste (zie tabel 4.5.10 voor voorbeeld met cv 2), hoewel de relatieve groei alleen voor N 40 significant lager was. De wortellengtes waren ongeveer gelijk bij de verschillende groepjes planten, maar er was een verschil in wortelaantal op moment van uitplanten. Deze was significant hoger bij N 40, hoewel alle plantjes op het zelfde medium beworteld waren gedurende 3 weken. Na acclimatisering en verdere groei in de grond bleef dit zo. GAM N60 met micro-aanpassing maakte minder wortels. Dit zou veroorzaakt kunnen zijn doordat de plantjes in een betere 'voedingstoestand' waren door het aangepaste vermeerderingsmedium. Tijdens de vermeerderingsfase werden de plantjes in deze optimale voedingstoestand gebracht en 'loaded' met de mineralen, die beperkend kunnen worden tijdens de ex-vitro (=uitplant) fase. Vooral

Een belangrijke test die niet uitgevoerd werd, zou ook macro- en micro-elementaanpassing van het bewortelingsmedium zijn. Het 'loaden' met beperkende elementen wordt dan voortgezet tijdens de in-vitro beworteling. Gezien de verschillen tussen MS, DKW en aangepaste media zou het hier vooral om Ca, Mg, P en misschien Cu kunnen gaan.

Effect van ammonium/nitrat-verhouding in aangepast medium

Hoewel het niet helemaal past binnen het kader van minerale concentratie-aanpassingen, is er één experiment uitgevoerd waarbij binnen N60 de verhouding tussen ammonium en nitraat in het medium gewijzigd is, in het bereik van 1:1,5 tot 1:11 (MS en DKW ca 1: 2), via gebruik van andere zouten Hierbij

deed zich het probleem voor dat of hoge concentraties sulfaat en/of chloride gebruikt moesten worden, waarbij om de verhoudingen te bereiken ook nog kalium tot 10 mM verlaagd moest worden. Dit laatste bleek zeer slecht voor de gemiddelde groei te zijn. Van alle groepen zijn wel plantjes beworteld en uitgeplant, waarbij uitgaande van dezelfde grootte plantjes geen opvallende verschillen in de groei gevonden werden.

Element-analyse plant

De waargenomen verschillen in groei kunnen verklaard worden door een veranderde opname van hoeveelheden van de minerale nutriënten. Door relatieve verschillen in beschikbaarheid zal de opname van anders beperkende elementen eenvoudiger gaan bij die elementen die verhoogd zijn en omgekeerd. Dit moet zich dan weerspiegelen in de elementsamenstelling van de weefselweekplantjes.

Tabel 4.5.11. Elementanalyse van plantmateriaal voor de 6 macromineralen: jong-volwassen blad, en weefselweekplantjes van 3 media op moment van snijden.

	N	P	K	Ca	Mg	S
Volw. plant	2.9	0.3	4.2	1.4	0.3	Niet bekend
MS wkw plant	3.8	0.8	2.4	0.2	0.18	0.3
DKW wkw plant	3.5	0.8	2.7	0.5	0.25	1.1
GAM N-40 wkw plant	2.4	0.9	2.8	0.6	0.40	0.5

Uit deze tabel een paar gevolgtrekkingen te maken. Als weefselweekplantjes, anders dan planten met wortels, hoofdzakelijk via diffusie (George 1993) hun mineralen opnemen, zal de analyse een afspiegeling zijn van het gebruikte medium. Een voorbeeld is het hoge zwavelgehalte bij de DKW plantjes. En ook het lagere N-gehalte van de GAM N40 plantjes zou hiermee verklaard kunnen worden. N60-plantjes zouden dan wel vergelijkbaar moeten zijn met MS en DKW, maar van N60 zijn geen analyses voor handen. Echter, dit bleek niet algemeen op te gaan. Hoewel het kalium gehalte in het GAM-medium lager is dan in DKW en MS, was desondanks het gehalte van de GAM-weefselweekplantjes van hoger dan dat van de twee andere media. Een ander voorbeeld is Mg: de magnesiumconcentratie is 1,7 x zo hoog in GAM als in MS, en in de plantjes 2,2. Dit is geen spectaculair verschil, maar het plantje van DKW, waarin de Mg concentratie 20 % hoger is dan in GAM, heeft een Mg gehalte wat bijna 40 % lager is.

Er spelen dus meer factoren een rol bij de opname van mineralen in weefselweek dan alleen diffusie. Kennelijk zijn de relatief aanwezige concentraties wel degelijk van belang. Niet in de tabel opgenomen zijn de analyses van de micro-elementen. Deze waren vaak niet erg reproduceerbaar en de resultaten daardoor minder betrouwbaar. Wel bleek dat de opname van ijzer uit het GAM-medium over het algemeen beter was.

Weefselweek op media gebaseerd op elementanalyse van jong plantmateriaal

Een uitgangspunt in ons concept was om de analyse van jong volwassen blad als basis voor de berekeningen van het aangepaste medium te nemen. Vaak werd gedurende dit onderzoek de vraag opgeworpen of elementanalyse van jonge plantjes of zelfs weefselweekplantjes niet als basis konden of moesten dienen. Vele andere onderzoekers gebruiken 'ons' uitgangsmateriaal (jong-volwassen blad of plant) als basis voor mediumberekeningen en behaalden daarmee ook goede resultaten.

Er zijn analyses uitgevoerd van weefselweekplantjes van de drie media MS, DKW en GAM (tabel 4.5.11). Voor een medium dat uitgaat van de elementanalyse van weefselweekplantjes, bleek vooral fosfaat nog extra verhoogd te moeten worden, terwijl calcium veel lager zou worden. Wij zijn uitgegaan van het GAM weefselweekplantje voor onze experimenten, omdat op GAM de beste groei waargenomen was., MS en DKW (behalve in S) gaven geen fundamenteel ander beeld. De opvallende verschillen zijn: P is veel hoger in de jonge plant, terwijl Ca lager is. Het P-gehalte van groeiende plantdelen is altijd hoog omdat deze veel fosfor nodig hebben voor energie en DNA synthese van de actief delende cellen. Ca is onder andere nodig

voor het plantskelet, en zal daarom hoger zijn in oudere plantendelen.

In een oriënterend experiment werden de volgende media vergeleken:

- **GAM I 60 –Mn +Cu**
dit is het vergelijkingsmedium, wat de beste resultaten gaf in de meeste experimenten;
- **GAM weefselweek(wkw)**
hierbij zijn de mineralen gebaseerd op analyse van het GAM weefselweekplantje;
- **GAM juveniel:**
met gehalten van macro-elementen die liggen tussen GAM wkw en GAM I. Dit zijn de gehalten van jonge groeiende plantjes van gerbera;
- **MS '+' medium**
dit is MS aangepast in Ca, P, Cu en Mn als bij GAM N 60. Dit is een aanpassing in de elementconcentraties waarvan het grootste effect te verwachten viel op de groei;
- **5 x medium**
waarin alle elementconcentraties 5 keer zo hoog waren als in de substraatteelt. Alleen Molybdeen werd op MS niveau gehandhaafd.

Dit vermeerderingsexperiment (zie tabel 4.5.12) werd slechts één keer uitgevoerd, zodat niet alle conclusies even hard zijn.

Media gebaseerd op analyses van jong materiaal bij gerbera (GAM wkw zowel als -juv)gaven grote problemen bij het bereiden. Door de hoge gehalten aan P sloegen geelwitte fosfaatzouten neer, waarschijnlijk calcium en ijzertzouten. Vooral het laatste neerslag zou een ijzertekort en daarmee e oorzaak kunnen worden van chlorotische, slecht groeiende plantjes. Bij dahlia is dit verschijnsel behandeld. Om dit te vermijden moest fosfaat apart gesteriliseerd en toegevoegd worden, een lastige en in de praktijk moeilijk doorvoerbare handeling (zie ook Hoofdstuk 5: Neerslagen en zachte agar).

Tabel 4.5.12. Groeikarakteristieken van gerberavermeerdering op 5 verschillende media

Medium	Gew. groepje planten in mg		Aantal plantjes		Gemidd. grootte*)		Bijzonderheden
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se	
GAM I N60 + micro	496	27	5,0	0,2	1,8	0,1	3 % sprietig
GAM juv **)	540	43	5,1	0,3	1,7	0,1	10 % sprietig 10 % glazigheid
GAM wkw	541	32	5,1	0,3	1,7	0,1	13 % sprietig 13 % glazigheid
'5 x'- medium ***)	439	27	3,7	0,3	1,8	0,1	
MS plus* ***)	871	59	4,7	0,3	2,3	0,1	43 % glazigheid

*) grootte in willekeurige eenheden 1 klein; 2 middel; 3 groot

**) GAM juv intermediair tussen GAM N 60 en GAM wkw qua macromineralen

***) Medium qua macro- en microelementen 5 x concentraties van substraatcultuur

****) MS plus = MS gewijzigd tot GAM 60 wat betreft Ca, P, Cu en Mn

Het GAM N 60 + micro medium bleek het beste resultaat te geven, als zowel groei (grootte en vermeerdering) als de kwaliteit van de plantjes meegenomen werd. De beide andere GAM media gaven weliswaar een vergelijkbare vermeerdering maar waren slechter vanwege hun kwaliteit: meer glazigheid en/of afwijkende plantjes. Het '5 x' medium gaf kwalitatief goede plantjes, maar de vermeerdering was aanmerkelijk lager. Het MS '+' medium bleef vrij zacht, wat deels de gevonden glazigheid en het hoge

gewicht van de groepjes planten zou kunnen verklaren. Reeds na één cyclus was de glazigheid 43%, wat het waarschijnlijk maakte dat na nog één cyclus bijna alle plantjes glazig zouden zijn. Als glazigheid een maal gevonden wordt bij vermeerdering (zie tabel 4.5.2), was dit vaak een aanwijzing dat gedurende verdere vermeerdering op het zelfde medium dit alleen maar toeneemt. Voor GAM juv en wkw kan daarom ook een toename in glazigheid verwacht worden in volgende cycli.

Het '5x'-medium vertoonde geen glazigheid, maar had een lagere vermeerdering. Toch was dit resultaat beter dan verkregen werd met het normale MS medium. Het zou dus het proberen waard zijn om via deze snelle weg (zonder elementanalyse van de plant) weefselweekmedia te ontwerpen voor planten die in substraatteelt gekweekt worden. Een inleidende proef geeft dan aanwijzingen of veranderingen via elementanalyse kans op succes bieden.

De uitslag van deze proef bevestigde dat voor medianaanpassingen in minerale nutriënten het beste de analyse van het jong-volwassen blad gebruikt kan worden.

Mediumanalyse

Analyse van de verschillende, gebruikte media (MS, DKW en GAM 40) na afloop van de groeicyclus toonde aan dat geen enkel macromineraal uitgeput was. Het meest afgenomen was ammonium tot 15 %, maar voor stikstofopname was echter nog 41% van het nitraat aanwezig. De andere macro-elementen hadden nog restwaardes die ook 40 % of hoger waren.

Voor de micro-elementen waren de bepalingen niet erg duidelijk. De reproduceerbaarheid was slecht, omdat in de ondergrens van het bepalingsbereik gewerkt werd. Er leek geen uitputting op te treden voor Mn, Zn en B. Cu, welk element voor ons erg interessant is, was bij de start al onder de detectiegrens. De Fe - bepaling was redelijk reproduceerbaar, en hieruit bleek dat Fe tot 10 % afgenomen was, wat aan de lage kant is. Extra Fe-EDTA zou bij snel groeiende cultures van gerbera dus een positief effect kunnen hebben.

Er zijn dus geen specifieke elementen uitgeput op het moment van overzetten. De verbeterde groei lijkt toegeschreven te moeten worden aan de verhoudingsverschillen van de elementen in de aangeboden mineralen, en aan de daarmee samengaande verschillen in relatieve opname van deze mineralen.

4.5.4 Conclusie

Voor gerbera bleken medianaanpassingen volgens onze richtlijnen grote verbeteringen te geven in vermeerdering en habitus van de plantjes. Met deze soort is een groot aantal extra proeven uitgevoerd om te testen of extra aanpassingen en veranderingen nog meer verbeteringen brachten. Micro-element aanpassingen in Cu en Mn waren zeer succesvol; ammonium/nitraat verhoudingsveranderingen bleken geen verbetering te geven. Zoutsterkte (het verschil tussen N40 en N60) had een minder duidelijke invloed en het effect was afhankelijk van concentraties in ionen als sulfaat en chloride.

4.6 Lelie

4.6.1 Inleiding

Voor lelie zijn uitgebreide analyses beschikbaar bij PPO Bollen van bovengrondse (de groeiende plant) en ondergrondse delen (plantgoed bollen, leeglopende en weer groeiende bol). Hiervoor zijn metingen uitgevoerd over meer seizoenen en aan verscheidene cultivars; de spreiding is vrij groot over alle cultivars en jaren (standplaats- en groeiseizoeninvloeden). Deze spreiding is groter dan de verschillen tussen cultivars. Als uitgangspunt voor de mediumberekeningen is gekozen voor een langjarig gemiddelde van de jonge bol (plantgoed), omdat bij lelie in weefselweek een klein bolletje gevormd wordt. Indien de keuze op jong volwassen blad zou zijn gevallen had dit vooral een hoger Ca-gehalte van het medium gegeven.

Tabel 4.6.1. Elementanalyse van lelie, en minerale concentraties in berekend 'ideaal' medium, twee aangepaste media, MS en DKW

Mineraal	Plantgehalte jonge bol*)	'ideaal' medium	Aangepast Medium LAM I	Aangepast Medium LAM II	DKW	MS
	mmol/g	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	1.09	60	21.1	21.1	17	20
NO ₃ ⁻			38.9	38.9	33	40
K	0.66	36.6	16.3	27	18	20
Ca	0.071	3.9	3.9	3.9	9.3	3
Mg	0.035	1.9	1.9	1.9	3	1.5
SO ₄ ⁻²	onbekend	-	1.9	8.9	12	1.5
PO ₄ ⁻³	0.114	6.3	6.3	3.0	1.95	1.25

*) Jonge bol/plantgoed: gemiddelde van 3 cultivars over enkele seizoenen; S-gehalte was niet gemeten maar was bij andere bestanddelen gelijk of hoger dan Mg

4.6.2 Werkwijze

Experimenten werden uitgevoerd met de cv Stargazer (een Oriëntal -type). Deze cultivar was in weefselkweek voorradig en groeide op MS medium met 0.05 µM NAA; 3 % sacharose; 0,6 % agar; 16 h licht, 20 °C. Elke 12 weken werden de ontstane weefselkweekbolletjes geschubd en op deze schubjes ontstonden dan opnieuw bolletjes, enz. Verder werden DKW en enkele aangepaste media getest (zie tabel 4.6.1).

Voor de beoordeling van de media werd zowel het totale bolletjesgewicht per explantaat als het aantal ontstane bolletjes gemeten over enkele vermeerderingscycli.

4.6.3 Resultaten en discussie

Agar en gelrite; hoog en laag stikstof

De verschillende media zijn uitgetest met zowel agar als gelrite als drager. In de praktijk worden beide gebruikt. Tijdens een reeks van experimenten werd voor deze cultivar meestal een beter resultaat gekregen op agar. Dit gold voor alle media, dus zowel voor MS en DKW als LAM, het aangepaste medium. Aanvankelijk is met twee aanpassingen gewerkt, gebaseerd op een hoog en laag uitgangshehalte aan stikstof. De bijbehorende media aangepast aan de lage gehalten van mineralen berekend op 40 i.p.v. 60 mM N worden hier niet besproken: uit de eerste experimenten bleek nl. dat bij het lage gehalte aan stikstof de groei van bolletjes duidelijk slechter was.

Neerslagen bij LAM I

LAM I gaf problemen wat betreft de hoeveelheid neerslag: door de hoge P concentratie sloeg zowel calciumfosfaat als waarschijnlijk ijzerfosfaat neer: het neerslag was gelig. Vooral het laatste neerslag bleek veel ijzer te kunnen bevatten (zie dahlia) en dan snel tot specifieke gebrekverschijnselen in de plant kunnen leiden. Daarom is als 2e aanpassing LAM II gemaakt, dat lager in fosfaat is om neerslagvorming te vermijden. Het hogere sulfaat kan eveneens neerslagvorming verminderen. Daarnaast werd meer sulfaat gebruikt om de andere elementen binnen de gewenste aangepaste concentraties te houden.

Een andere mogelijkheid die niet getest is en toch verbeteringen zou kunnen bieden is om LAM I zonder neerslag te bereiden door het ijzer en fosfaat apart te steriliseren en toe te voegen na uitgieten. In de inleiding is deze optie al bediscussieerd. Omdat het meer werk geeft en praktische bezwaren heeft, zou de verbetering groot moeten zijn om deze extra investering goed te maken. Gezien de het feit dat LAM II ondanks de hogere P geen verbetering gaf in groei, leek deze verwachting niet gerechtvaardigd. Een probleem kan voor leliegroei de hoge sulfaatconcentratie zijn. Dit is echter niet getest.

Weefselkweek op vier media

Vergeleken werd in een reeks van experimenten MS medium met LAM I en II. Altijd bleek het MS medium op zijn minst dezelfde maar meestal betere resultaten te geven dan LAM media. In een paar experimenten werd ook DKW, wat een zeer hoog sulfaatgehalte heeft, gebruikt. Hoewel dit medium voor veel planten minstens dezelfde en vaak betere resultaten gaf dan MS, was dit voor lelie niet het geval. De bolgroei- en vorming bleef over het algemeen zelfs achter t.o.v. MS. Omdat DKW-medium (met het hogere Ca) geen verbetering gaf, is een medium aangepast aan bladanalyse niet getest. Het meest opvallende verschil t.o.v. mineraalgehalten van de bol lag immers in het Ca-gehalte (zie paragraaf 4.6.1: inleiding).

4.6.4 Conclusie

Hoewel de aanpassing van het medium gebaseerd was op de jonge bol, c.q. plantgoed, lijkt het medium toch qua samenstelling (zeker aanpassing II) op de media zoals ze bij aanpassing aan jong-volwassen blad voor andere planten gevonden en toegepast werden. Desondanks werd met aangepaste media voor lelie geen verbetering van de groei gevonden. Ook voor *Alstroemeria* (en tulp in mindere mate) werd geen of een onduidelijke verbetering gevonden. Alle drie zijn dit gewassen die geen 'groene' vermeerdering geven maar via vorming van bolletjes of embryomateriaal, of groei van rhizomen vermeerderen (zie ook bij deze twee gewassen).

Bij deze gewassen lijkt het erop dat het explantaat zelf een veel grotere rol speelt dan de precieze minerale samenstelling van de voedingsbodem, tenminste zover het niet te grote wijzigingen in de mineralen betreft vergeleken met MS.

4.7 Roos

4.7.1 Inleiding

Hoewel roos een gewas is dat niet of nauwelijks in weefselkweek vermeerderd wordt, kan het gezien worden als een model voor houtige gewassen en overjarige planten. Ook is de samenstelling van de voedingsoplossingen uit de substraatcultures bekend, zodat ook met deze gegevens aanpassingen gemaakt kunnen worden.

4.7.2 Werkwijze

Alle experimenten werden uitgevoerd met de cultivar Madelon. Normale vermeerdering was op een MS medium met extra fosfaat in de vorm van 85 mg NaH_2PO_4 per liter (= 0,62 mmol/l extra), 45 g/l sacharose, 6,6 μM BA, pH 5,8 en BBL agar 0,6 %.

Voor in-vitro beworteling werd als zoutmengsel gebruikt CABO zouten 1,43 g/l (samenstelling: macromineralen in mM NH_4NO_3 2,5; KNO_3 9,4; KH_2PO_4 1; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2,5 en MgSO_4 0,75, en micromineralen als MS behalve Mn waarvan de concentratie lager was nl. 4,5 μM i.p.v. 100 μM). verder MS vitamines, 10 μM IAA en 0,6 % BBL agar.

De verenkelde plantjes werden eerst 6 dagen in het donker op bewortelingsmedium gekweekt en dan overgebracht naar het licht. Na in totaal 3 weken op dit medium werden ze uitgeplant.

Voor de ex-vitro beworteling werden de verenkelde plantjes gedurende 1 uur in een oplossing met 100 μM kalium-zout van IBA gezet en dan uitgeplant.

Tabel 4.7.1. Elementanalyse van roos, substraatconcentraties in gesloten teelt, en minerale concentraties in berekend medium, aangepast medium en MS en DKW medium

Mineraal	Gesloten Teelt	Plant-gehalte	"Ideaal" aangepast	RAM I N 60	DKW	MS
	mmol/l			mmol/gDW	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	0.8	2.6	60	15	17	20
NO ₃ ⁻	4.3			37.6	33	40
K	2.2	0.61	14.0	12.7 (20.7)*	18	20
Ca	0.8	0.31	7.2	6.3	9.3	3
Mg	0.6	0.19	4.2	4.2 (3.0)*	3	1.5
SO ₄ ⁻²	0.5			4.2 (7.0)*	12	1.5
PO ₄ ⁻³	0.5	0.12	2.7	2.7	1.95	1.87***)
	µmol/l	µmol/g	µmol/l	µmol/l	µmol/l	µmol/l
Fe	15			100	120	100
Mn	5	1.5	23	100 (10**)	200	100
Zn	3	0.8	12	30	72	30
B	20	4.9	75	100	78	100
Cu	0.5	0.18	2.3	0.1 (1.6**)	1	0.1
Mo	0.5	0.006	0.09	1	1.6	1
Si Kalium-Metasilicaat	0.75 mmol/l					

*) aangepaste concentraties van betreffende mineralen in RAM II;

**) micro-element aanpassing van Cu en Mn in sommige experimenten ;

***) gehalte van fosfaat inclusief extra P

4.7.3 Resultaten en discussie

Vermeerdering op aangepaste media op basis van N40 en N60, vergeleken met MS en DKW

In een aantal experimenten zijn vermeerdering op verschillende, aangepaste media vergeleken met de vermeerdering op het gebruikelijke MS incl. P aanpassing en DKW. RAM N 40 (d.w.z. macro-elementen aangepast op basis N 40 mM [niet in tabel]) en DKW bleken in deze experimenten over het algemeen een betere vermeerdering als MS te geven, terwijl DKW gemiddeld een wat hoger plantgewicht gaf. Deze verschillen waren niet significant. Verrassend was dat er ook geen groot verschil tussen vermeerdering op agar en gelrite werd gevonden. Dit is een grote tegenstelling tot appel en gerbera (zie desbetreffende paragrafen) waar vermeerdering op gelrite grote problemen gaf.

Omdat bij gerbera al bleek dat aanpassingen op basis van N40 waarschijnlijk toch te weinig voedingszouten bevatten voor optimale groei, is in een volgend experiment aangepast medium op basis van N60 getest. Bij roos was de N concentratie niet 60, maar slechts 52. Wij noemden dit in analogie met de andere soort-specifieke media toch N60. RAM N60 bleek een betere groei te geven dan N40 en de groeieresultaten waren vergelijkbaar met DKW. RAM N60 gaf hetzelfde plantgewicht en dezelfde vermeerdering als DKW maar de gemiddelde grootte van de plantjes was iets hoger.

Beworteling- en uitplantproeven met plantjes van de verschillende media

Van deze media zijn plantjes beworteld, zowel in als ex vitro. Ook hierbij waren geen opvallende verschillen: de groei na ex-vitro bewortelingsbehandeling was bijna altijd beter. Verder waren de resultaten erg variabel, zodat de verschillen niet significant waren. Bij de in-vitro bewortelingsbehandeling waren na 6 weken in de kas de MS-plantjes wat zwaarder, had DKW de meeste wortels en RAM de langste wortels. Bij ex-vitro was RAM N60 in alle opzichten de betere. Bij een tweede experiment werd het laatste bevestigd, maar nu was RAM N40 beter gegroeid dan MS en DKW.

Kaliumaanpassing

Omdat in RAM I de kalium vrij laag is, is in een andere aanpassing (zie tabel 4.7.1) via toevoeging van K_2SO_4 en vermindering van $MgSO_4$ medium RAM II ontworpen. Dit medium is vergeleken met RAM I, DKW en MS: hoewel de verschillen weer klein waren, gaf medium II een iets hoger plantgewicht. Verder werden de conclusies uit de vorige experimenten bevestigd.

Silicium in het aangepaste medium

In de substraatteelt van roos wordt naast de normale micro-elementen silicium toegevoegd om een 'steviger' plant te verkrijgen. Er is daarom een proef gedaan met toevoeging van silicium aan het aangepaste medium. Dit gebeurde in de vorm kaliummetasilicaat dat hetzelfde mineraal is als in de substraatteelt gebruikt wordt. Er werd gekozen voor een concentratie die in het aangepaste medium 5 x hoger lag dan in deze teelt (zie tabel 4.7.1). Dit komt overeen met de verhouding bij andere elementen.

Hierbij was de vraag of hetzelfde resultaat, een steviger plantje, in weefselweek kon worden verkregen als in de normale teelt. Er is echter geen effect van Si gevonden bij de vermeerdering. In de opvolgende beworteling en ex-vitro fase waren de plantjes van siliciumhoudend RAM wel iets groter.

Zachte agar

Het RAM I en II medium waren erg zacht en het zou kunnen dat daardoor extra veel water (en voeding?) werd opgenomen. Om te bestuderen of het aan de hardheid van het medium lag dat RAM I en II beter voldeden dan MS en DKW is, naast BBL agar, in enkele experimenten Daishin agar gebruikt. De RAM media werden een stuk steviger bij gebruik van Daishin agar. Het gemiddelde plantgewicht werd wat lager bij alle media, als Daishin agar gebruikt werd. Dit ondersteunde de veronderstelling dat zachtere agar een hoger plantgewicht tot gevolg heeft. Maar de rest als plantgrootte en vermeerderingsfactor veranderde niet: RAM I en II bleven de hoogste vermeerdering geven, en RAM II de betere, grotere plantjes.

Micro-elementen Cu en Mn

Als we de relatieve concentraties van mineralen gebruikt in weefselweek en substraatteelt bij roos vergelijken (tabel 4.7.2), valt weer het grote verschil in Cu-gave op. Macro-elementen vertonen geen opvallende verhoudingsverschillen en liggen alle tussen 2, 5 en 9, behalve Ca in DKW. De vermeerderingsresultaten bevestigden dit, te zien aan het feit dat aanpassingen geen opvallende verbeteringen opleverden. In een serie vermeerderingsexperimenten werd nu de verhoging van Cu met een factor 16 en de vermindering van Mn met een factor 10 in analogie met gerbera-experimenten getest.

Tabel 4.7.2. Verhouding tussen minerale concentraties in weefselweekmedia en concentraties gebruikt in gesloten substraatteelt van rozen.

Mineraal	RAM I		RAM II Micro		MS		DKW		
N	7.5	12.5	7.5	12.5	11.8	25	9.8	21.3	
NH_4^+									6.6
NO_3^-									
K	5.4	8.8	9.1	8.2					
Ca	5.3	5.3	3.75	11.6					
Mg	4.7	3.4	2.5	5.0					
SO_4^{-2}	5.6	9.3	3.0	24					
PO_4^{-3}	3.6	3.6	2.5	3.9					
Fe	4.0	4.0	4.0	4.8					
Mn	20	4.6	20	40					
Zn	10	4.0	10	24					
B	5.0	3.8	5.0	3.9					
Cu	0.13	3.1	0.13	1.3					
Mo	1.3	1.3	1.3	2.1					

In de vermeerdering werden geen opvallende verschillen gevonden; in de beworteling en na uitplanting kwamen wel verschillen te voorschijn.

Na de in-vitro beworteling en uitplanten hadden de planten met extra Cu en minder Mn een betere wortelvorming; de rest had nauwelijks wortels. De plantjes van dit medium waren ook wat groener. Ook na uitplanten met *ex-vitro* beworteling waren de RAM II + Cu-Mn planten het meeste gegroeid, hadden de langste wortels en overleefden ook het beste. Van RAM II, dus zonder Cu, was 90 % van de planten afgestorven.

Verdere aanpassingen in micro-element aanpassingen

In volgende experimenten met Cu en Mn aanpassingen werden als macrominerale basis steeds RAM II gebruikt, terwijl voor de microminerale concentraties nu de 'ideale' aanpassing uit tabel 4.7.1 genomen werden behalve voor Mo waar de MS concentratie genomen werd. Dit laatste werd gedaan om in de buurt van de verhouding te blijven zoals normaal gevonden tussen substraatteelt en medium. Dit medium werd RAM II micro genoemd.

Vergeleken werd eerst de vermeerdering op MS, RAM II en RAM II micro en weer werd geen duidelijke verschil gevonden in een groot aantal cycli. Hoewel niet significant waren de groepjes plantjes op RAM meestal iets zwaarder dan op MS, maar qua vermeerdering gaf dit geen verschillen.

Resultaten van beworteling en uitplanten

Met de plantjes van bovenstaande drie media MS, RAM II en RAM II micro werden nu bewortelings- en uitplant-experimenten gedaan. Na in-vitro beworteling hadden de plantjes nog steeds ongeveer hetzelfde gewicht; slechts die van RAM II + micro waren iets lichter. Tijdens de beworteling in vitro kregen de RAM II micro plantjes de meeste en langste wortels. Opvallend was wel dat slechts een minderheid van de plantjes überhaupt wortels maakte.

Tabel 4.7.3 Eigenschappen vòòr uitplanten van rozenplantjes afkomstig van drie verschillende vermeerderingsmedia en beworteld in vitro.

Medium	Gewicht plantje, mg		Aantal wortels per plantje		Lengte langste wortel, mm		% bew. plantjes
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	Gemidd.	se	
MS	105,3	4,2	0,53	0,26	0,30	0,14	16
RAM II	106,1	6,0	0,30	0,15	0,37	0,21	16
RAM II + micro	91,6	5,5	0,77	0,21	1,23	0,37	40

De plantjes zoals beschreven in tabel 4.7.3 werden nu uitgeplant. Nu bleken de plantjes van RAM II micro veel beter te groeien (tabel 4.7.4). De verschillen in beworteling verdwenen echter nagenoeg. Wel was de overleving ook stukken beter.

Tabel 4.7.4. Eigenschappen van rozenplantjes uit tabel 4.7.3 na uitplanten en 6 weken groei.

Medium	Gewicht plantje, mg		Gewicht zonder wortels, mg		Aantal wortels per plantje		Lengte langste wortel, mm		% overleving
	Gemidd	se	Gemidd	se	Gemidd	se	Gemidd	se	
MS	584	51	466	40	7,1	0,7	54	3	67
RAM II	518	52	409	43	6,6	0,5	51	2	77
RAM II + micro	825	46	653	36	8,8	0,5	59	2	97

In-vivo en in vitro beworteling, plus uitplanten

Deze verrassende uitkomst werd gecontroleerd in een tweede experiment waarbij naast de in-vitro nu ook een in-vivo beworteling werd opgenomen. Deze methode was ontwikkeld bij het COWT in het project - Kwaliteit van Weefselkweekmateriaal - van Geert-Jan de Klerk en Jolanda ter Brugge (zie paragraaf 4.7.2, Werkwijze). Plantjes waren bij het begin van de in-vivo bewortelingsbehandeling en na de in-vitro beworteling alle van gelijk uiterlijk en gewicht ongeacht het vermeerderingsmedium.

Tabel 4.7.5. Karakteristieken van rozenplantjes 6 weken na uitplanten; Plantjes afkomstig van drie verschillende vermeerderingsmedia, onderworpen aan twee bewortelingsbehandelingen

Medium + beworteling:	Gewicht per plantje in mg		Relatieve groei mg/mg		% overleving na 6 wk
	Gemidd.	se	Gemidd.	se	
MS in-vitro	246,1	59,0	2,0	0,8	46,7
MS ex-vitro	292,1	23,9	2,3	0,4	43,3
RAM II in-vitro	237,2	31,3	1,6	0,4	43,3
RAM II ex-vitro	292,0	63,2	1,9	0,5	20,0
RAM II micro in-vitro	337,7	15,8	2,8	0,2	70,0
RAM II micro ex-vitro	426,0	24,5	4,0	0,4	90,0

De groeimetingen 6 weken na uitplanten bevestigden het resultaat van het eerste experiment (tabel 4.7.5) Weer waren de plantjes van het, ook in micromineralen aangepaste, medium veel beter gegroeid na uitplanten. In dit experiment werden deels andere metingen uitgevoerd, maar de kolom -gewicht per plantje geeft dezelfde gegevens als in het eerste experiment, dus metingen 6 weken na uitplanten. Ook de overlevingspercentages werden op het zelfde moment na uitplanten en groei bepaald. De relatieve groei laat ook duidelijk zien dat ex-vitro beworteling een beter resultaat gaf. Dit is nog geflatteerd voor de in-vitro beworteling, omdat deze plantjes nog 3 weken op bewortelingsmedium hebben gestaan en toen pas de 6 'weken-na-uitplanten' zijn begonnen. Deze planten zijn dus 3 weken extra 'gegroeid'. Het bewortelingspercentage van deze plantjes lag rond 60 %. Het aantal wortels per scheutjes varieerde sterk van 1 tot 3, maar het was hoger voor plantjes van de aangepaste media. Overlevingspercentages waren lager dan in het vorige experiment. De lage overleving bij RAM II ex-vitro kon niet verklaard worden.

4.7.4 Conclusie

Bij roos werd een duidelijke verbetering gevonden in de uitgroei van de plantjes in de ex-vitro fase. Tijdens de vermeerdering waren er geen duidelijke, waarneembare verschillen. Wel waren natuurlijk de minerale gehalten van de plantjes verschillend afhankelijk van het vermeerderingsmedium, en dit moet dus een groot effect op de doorgroei in vivo gehad hebben. Waarschijnlijk hebben de jonge weefselkweekplantjes van MS een gebrek aan één van de mineralen die direct van belang zijn in de ex-vitro fase. Daar vooral de micro-aanpassing een betere uitgroei geeft, zou vooral het verhoogde Cu de positieve factor kunnen zijn. Koper is nodig voor een paar essentiële eiwitten in de fotosynthese. Bij deze planten kan dan de fotosynthese starten op het moment van uitplanten, en hoeven deze eiwitten niet eerst nog aangemaakt worden na mobilisatie van koper uit de grond of de voedingsoplossing.

De resultaten bij roos lieten zien dat aangepaste media niet alleen grote verbeteringen in weefselkweekvermeerdering kunnen geven, maar ook in de volgende fase van beworteling en uitgroei aanpassingen in media aanzienlijke voordelen kunnen opleveren.

4.8 Tulp

4.8.1 Inleiding

Voor tulp is de keuze erg lastig welk uitgangswefsel voor de elementanalyse te gebruiken. Bij de gebruikte weefselkweekmethode worden op bloemstengelplakjes, en in de volgende cycli op embryo-/scheutplakjes, embryo's en scheuten geïnduceerd. Voor de berekening is voor TAM I het minerale gehalte van spruiten als uitgangspunt genomen, bij TAM II het plantgoed/jonge bolgehalte. Er zijn alleen macrominerale aanpassingen gedaan. Normaal wordt in de weefselkweek van tulp de minerale samenstelling van MS gebruikt. De opvallende verschillen t.o.v. MS zijn voor beide aangepaste media in de hogere concentraties van fosfaat en sulfaat gelegen; t.o.v. DKW is alleen fosfaat hoger. De andere verschillen zijn kleiner (zie tabel 4.8.1) en worden bepaald door de verschillen tussen TAM I en II.

Tabel 4.8.1. Minerale gehalten van tulp en samenstelling van media.

Mineraal	Plant-gehalte spruit *)	Plant-gehalte plantgoed *)	Aangepast Medium TAM I spruit **)	Aangepast Medium TAM II plantgoed	DKW	MS
	mmol/g	mmol/g	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
NH ₄ ⁺	1.47	0.55	15	22.5	17	20
NO ₃ ⁻			44	37.5	33	40
K	0.56	0.255	13.1	15.1	18	20
Ca	0.237	0.023	9.5	2.5	9.3	3
Mg	0.085	0.026	3.4	2.8	3	1.5
SO ₄ ⁻²	onbekend	onbekend	3.4	2.8	12	1.5
PO ₄ ⁻³	0.077	0.047	3.1	5.1	1.95	1.25

*) deze waarden zijn gemiddelden van verschillende cultivars gemeten over meer jaren

**) 'ideaal aangepast I en II is weggelaten; in beide gevallen zou K hoger moeten zijn: ca. 25 mmol/l.

4.8.2 Werkwijze

Gestart werd met de tulpecultivar Apeldoorn. Deze was in weefselkweek aanwezig of werd ingezet volgens de literatuur (Langens et al. 2001). Later werden nog enkele andere cultivars getest (zie paragraaf 4.8.3: Resultaten en discussie). Naast de mineralen aangepast volgens tabel 8.1 voor TAM I en II werden aan het medium toegevoegd sacharose 30 g/l, vitaminen, en als hormonen 0.5 µM BA en 5 µM 2,4-D, of 15 µM 2iP en 5 µM NAA. Daarnaast werd 0.5 g caseïne-hydrolysaat per l toegevoegd, wat vooral scheutvorming/embryogenese bevorderde. Het fungeerde slechts in geringe mate ook als voedingsbron (zie paragraaf 4.8.4: Conclusie). Vergeleken werd de groei met MS en DKW als minerale basis plus dezelfde toevoegingen.

4.8.3 Resultaten en discussie

TAM I

De resultaten met weefselkweek van tulp zijn altijd zeer variabel en een algemeen werkend protocol is nog steeds niet beschikbaar. Dit weerspiegelde zich ook in de resultaten van onze experimenten. De eerste proeven zijn met TAM I gedaan, omdat ervan uitgegaan werd dat er scheutjes, c.q. embryo's ontstaan die qua minerale samenstelling op bladmateriaal zouden lijken. Er werden hierbij echter geen verbeteringen gevonden t.o.v. van MS.

TAM II

Daarom is vervolgens als tweede aanpassing voor de minerale samenstelling van jong bolmateriaal gekozen (TAM II). Er werd nog gedifferentieerd met betrekking tot de hoeveelheid stikstof, 40 of 60 mM. In de tabel wordt alleen 60 mM aangegeven, omdat 40 mM te laag bleek te zijn en de slechtere resultaten gaf in alle

vergelijkingen. Ook nu werd alleen met MS vergeleken.

In tabel 4.8.2 worden de resultaten getoond van twee identieke experimenten. Op MS medium werden gedurende 3 weken embryo's/scheutjes geïnduceerd op bloemstengel plakjes van Apeldoorn via een 5 µm 2,4-D/0,5 µM BA behandeling. Voor uitgroei werden de plakjes op TAM II en MS medium gezet. Er werd elke 4 weken medium ververs, totaal 3 maal.

Tabel 4.8.2. Resultaten inductie van embryo's op stengelexplantaten met twee media. Twee experimenten met materiaal ingezet in december, experiment 1, en februari, experiment 2.

	Experiment 1		Experiment 2	
Medium >	MS	TAM II	MS	TAM II
Aantal inzettingen	111	90	116	113
Inzettingen zonder reactie	10.8%	13.3%	59.5%	38.1%
Alleen callus	55.0%	52.2%	31.0%	23.9%
met grote embryo's	30.6%	30.0%	5.2%	34.5%
aantal inzettingen -N- met embryo's > 1.5 cm (N)	34 (46)	27 (56)	6 (7) *	39 (58)

*) d.w.z. 6 inzettingen met 7 grote embryo's (meer dan 1,5 cm)

Op beide uitgroei-media zijn de verschillen tussen beide experimenten groot. In experiment 1 waren de aantallen reacties (callus, mini-embryo's, grote embryo's, en onduidelijk materiaal) hoger. Op TAM II en MS was het aantal zettingen met grote embryo's ongeveer gelijk, maar hadden de inzettingen op TAM II er meer per inzetting. In experiment 2 was er minder reactie, omdat met ouder, langer bewaard materiaal gewerkt werd. Nu waren de verschillen groter en was TAM II veel beter. Dit verschil werd niet veroorzaakt door het aantal reagerende explantaten maar door de hogere reactie van meer dan 2 per goed reagerend explantaat. De grote embryo's bleken bolletjes te vormen na bolinductie die voldoende gewicht hadden om uit te planten. Het gemiddeld gewicht van de bolletjes na bolvorming lag bij MS wat hoger dan bij TAM I, 180 en 250 mg, resp.

In twee herhalingsexperimenten werden opnieuw met Apeldoorn weer inducties uitgevoerd. De resultaten waren minder eenduidig: de aantallen explantaten reagerend met embryo's waren 48 en 67 % voor resp. MS en TAM II. In het volgende experiment waarbij ook DKW als minerale bron ter vergelijking gebruikt werd, was de reactie voor alle media ongeveer gelijk met ca 60 %. Er waren deze keer geen grote verschillen in de (grote) embryo-aantallen.

Inductie op 2-iP en NAA, vergeleken met 2,4-D en BA

Bij gebruik van de inductiemethode op 15 µM 2-iP en 5 µM NAA waarbij de explantaten op dit medium ca 12 weken zonder overzetten blijven staan voor uitgroei tot embryo's, werd de drie minerale samenstellingen, MS, DKW en TAM II, gebruikt. In dit geval was de reactie met twee geteste cultivars Gander en Apeldoorn slechter dan op 5 µM 2,4-D en 0,5 µM BA. De meeste grote embryo's werden nu gevormd op DKW. De verschillen waren klein, en niet significant.

Vergelijking van MS, DKW en TAM II bij vier cultivars

In een laatste proef werden weer met 2,4-D/BA inductie, en met het 2-iP/ NAA medium vier cultivars (Ad Rem, Sevilla, Apeldoorn en Gander) tot embryo-vorming aangezet. Uitval en reacties waren bij de vier cultivars ongeveer gelijk. De 2,4 inductie leverde voor alle cultivars meer embryo's op dan de 2-iP/NAA inductie. Daarom worden alleen deze gegevens getoond (tabel 4.8.3). Het aangepaste TAM II medium was niet beter dan MS bij Apeldoorn, en zelfs slechter bij de andere drie. DKW bleek nu voor drie van de vier cultivars, het beste medium. Alleen Ad Rem was een duidelijke uitzondering. De vorming van embryo's met voldoende grootte voor bolvorming was vrij laag. Het experiment is slechts één maal uitgevoerd. Daarom is gezien de grote variabiliteit in experimenten in tulpenweefselweek, een conclusie niet gerechtvaardigd. Een voorbeeld is Apeldoorn: in dit laatste experiment was MS niet minder dan TAM II zoals in de eerste beide experimenten.

Tabel 4.8.3. Gemiddeld aantal embryo's gevormd per explantaat na 2,4 D inductie

Cultivar	Embryo's op MS		Embryo's op DKW		Embryo's op TAM II	
	< 1 cm	> 1 cm	< 1 cm	> 1 cm	< 1 cm	> 1 cm
Sevilla	7,10	0,34	8,20	0,37	3,28	0,14
Ad Rem	2,14	0,29	1,29	0,09	1,63	0,31
Gander	5,61	0,23	7,63	0,52	4,59	0,01
Apeldoorn	1,75	0,25	2,98	0,18	1,75	0,25

4.8.4 Conclusie

Bij tulp waren er in twee experimenten sterke aanwijzingen gevonden dat het aangepaste medium TAM II bij Apeldoorn een (sterke) verbetering gaf in reactie en groei van embryo's. In volgende experimenten kon dit niet herhaald worden, ook niet voor andere cultivars. Wel is interessant dat DKW medium veel betere resultaten gaf dan het gebruikelijke MS-medium. DKW lijkt meer op TAM I, zodat het interessant is dit medium nog eens met andere cultivars te testen. Het gebruik van caseïnehydrolysate en variaties in hoeveelheid hiervan werd niet in dit onderzoek betrokken. Omgerekend is het geen grote, absolute bijdrage in de macromineralen. Voor N als hoogste bedraagt dit ongeveer 4 %.

Evenals voor lelie en Alstroemeria, waarbij ook geen scheutvermeerdering plaats vindt, lijkt ook voor tulp een minerale aanpassing van het medium die verbeteringen geeft in weefselkweek, moeilijk te vinden.

5 Neerslagen en 'zachte' agar bij bereiden van (aangepaste) media

5.1 Neerslagen

Bij analyse van de media waarbij neerslagvorming optrad bleek dat zowel calcium als fosfaat verhoogd aanwezig moesten zijn om neerslagvorming te krijgen. Deze neerslagen kunnen extreem onoplosbaar zijn, zodat de effectieve concentraties in het medium van deze elementen voor de planten lager zouden kunnen worden. Bekend is verder dat pH invloed heeft op de vorming en eventueel weer oplossen van calciumfosfaatneerslagen.

5.1.1 Werkwijze

Volgens onderstaande tabel werden aan een MS medium zonder Ca^{2+} en PO_4^{3-} , deze beide ionen toegevoegd in steeds hogere concentraties. Daarnaast werd het medium al dan niet gebufferd om de pH invloed te testen. De waarnemingen werden gedaan na autoklaveren.

5.1.2 Resultaten en discussie

Tabel 5.1.1. Invloed van pH, en van calcium- en fosfaatconcentraties in (mM) op neerslagvorming in MS medium, al dan niet gebufferd met MES

Concentratie in medium 'MS' *)		Neerslag**)		pH na autoklaveren ***)	
PO_4^{3-}	Ca^{2+}	Geen MES-buffer ****)	Wel MES-buffer	Geen MES-buffer	Wel MES-buffer
1.25	3	geen	+	5.4	5.8
2	6	(+)	++	5.3	5.9
2	9	+	+++	5.2	5.9

*) 'MS': MS zouten zonder Ca^{2+} en PO_4^{3-}

**) (+) nauwelijks waarneembaar, + weinig, ++ duidelijk en +++ 'veel' neerslag

***) pH voor autoklaveren 6,0

****) 5 mm MES in MS;

De resultaten staan in de tabel. Hieruit blijkt dat de verwachte correlatie van concentraties calcium en fosfaat met de neerslaghoeveelheid optrad. Echter de kleine verlaging in pH die optreedt na autoklaveren is genoeg om de neerslaghoeveelheid sterk te verminderen.

Ook DKW medium vertoonde troebeling, maar dan reeds bij het oplossen van het zoutmengsel zoals geleverd door de fabrikant. Het maakte hierbij voor de neerslagvorming in DKW niet uit of het zoutmengsel al langer (afgesloten) bewaard was of vers besteld. Voor meer bijzonderheden over de neerslagvorming bij DKW wordt verwezen naar de resultaten bij dahlia.

Omdat de neerslagen pas waargenomen worden na autoklaveren, is de neerslagvorming in aangepaste media kennelijk een endotherme reactie die energie/warmte toevoer nodig heeft. Om neerslagvorming tijdens autoklaveren te voorkomen kunnen enkele voorzorgen genomen worden:

1. fosfaat toevoegen op het moment dat het medium al op eindvolume gebracht is; dus net voor het instellen van de pH. Dit voorkomt bij hoge concentraties wel de neerslagvorming vóór het autoklaveren, maar niet erna.
2. Het beste werkt echter om het op pH gestelde fosfaat apart te steriliseren en na autoklaveren te mengen met de rest van het medium. Dit geeft echter meer werk en is niet altijd mogelijk uit

praktische overwegingen.

- Daarnaast kan ook het ijzer nog apart of samen met het fosfaat gesteriliseerd worden om ijzernerslagen te voorkomen.

De gepresenteerde waarnemingen uit tabel 1 waren kwalitatieve resultaten. De hoeveelheden fosfaat, calcium en eventueel andere elementen die neersloegen werden niet kwantitatief bepaald. Elders (bijlage dahlia) wordt behandeld dat bij DKW een belangrijk deel van de Fe kon neerslaan. Uit mediumanalyses van aangepaste media bleek dat er geen substantiële (< 10 %) verliezen op van geteste elementen Ca en P opgetreden waren ondanks het duidelijke waarnemen van neerslagen.

Neerslagen hebben als bijkomend nadeel dat ze visuele controle op infecties kunnen bemoeilijken.

5.2 'Zachte' agar en neerslagen

Indien vaste media gebruikt worden, is er de keus tussen agar en gelrite als 'versteviger' van de bodem. Voor de meeste planten lijkt nog steeds agar de eerste keus, andere planten zijn indifferent en weer andere geven de voorkeur aan gelrite. Hierbij moet aangetekend worden dat merk, type en fabrieknummer van agar en gelrite vaak een zeer grote rol spelen. Hierover zijn vele publicaties verschenen.

In ons geval speelt als belangrijke factor bij de agarkeuze natuurlijk ook de resthoeveelheden van elementen in agar en gelrite (zie hiervoor bijlage II: Oorspronkelijke uitvoerige projectbeschrijving en hoofdstuk 7: Literatuur, waarin vermeld o.a. Scholten en Pierik, 1998b). Speciaal de gehalten aan micro-elementen kunnen sterk verschillen. Er zijn zelfs voorbeelden dat meer dan de behoefte aan deze elementen door de toegevoegde agar gedekt zou kunnen worden. Ook kunnen potentieel nadelige ionen als aluminium in agar voorkomen. Of echter de gevonden gehalten ook als vrije ionen beschikbaar zijn is niet helemaal duidelijk. Het zou kunnen dat een deel aan de agar gebonden blijft. Hierop wordt verder in dit rapport niet ingegaan. Ook fysische agar-eigenschappen kunnen een rol spelen bij de beschikbaarheid van mediumbestanddelen. Bij de ene agar zal er snellere diffusie van mineralen zijn dan bij de andere. Ook de concentratie van de agar in het medium beïnvloedt dit sterk. Omdat bij hogere concentratie van agar het medium 'harder' wordt, en omdat wij soms bij aangepaste media zachtere agar zagen, is er een experiment gewijd aan dit verschijnsel van zachte agar.

Als voorbeeld wordt hier de invloed van het merk en de partij agar behandeld op het zacht blijven van agar na autoklaveren. De eventuele invloed hiervan op groei komt bij voorbeelden van aangepaste media aan de orde.

5.2.1 Werkwijze

Er zijn twee merken agar getest, waarvan bij één twee partijnummers. Getest zijn 0.6 % BBL (oud en nieuw lotnummer) en 0.7 % Daichin, met de volgende mediumsamenstellingen:

alleen water, MS Duchefa, DKW Duchefa oudere partij, DKW Duchefa nieuwere partij, en zelf samengestelde media Gerbera Aangepast Medium I, en GAM I met extra Cu en minder Mn. De samenstelling van GAM staat te lezen in de bijlage gerbera. De pH werd voor autoklaveren op 5,9 gesteld. In tabel vorm wordt het proefschema gepresenteerd in tabel 5.2.1.

Tabel 5.2.1. Schema van experiment om invloed van agarpartij en mediumsamenstelling te bepalen op aangegeven eigenschappen.

Agarmerk en -partij	Medium					
	water	MS Duchefa	DKW Duchefa oud	DKW Duchefa nieuw	GAM I	GAM +Cu -Mn
0,6 % BBL Oud						
0,6 % BBL nieuw	Bepaald worden: neerslagen (kwalitatief), pH na autoklaveren, en stevigheid agar (kwalitatief).					
0,7 % Daichin						

5.2.2 Resultaten en discussie

Neerslagen

Op het moment van medium bereiden werden geen neerslagen waargenomen, behalve enige troebelheid bij het oplossen van DKW mineralen.

Na toevoegen van agar en autoklaveren werden geen 'extreme' veranderingen in de pH gevonden. De pH veranderde nauwelijks (soms iets lager) behalve bij GAM-Cu/Mn waar deze wat meer terugliep naar 5,5 bij BBL-agars. Dit was verrassend omdat bij de neerslagproef (zie boven) grotere verlagingen van pH gevonden werden. De meest waarschijnlijke verklaring zou de lage buffercapaciteit van de media kunnen zijn, zodat kleine verschillen in media samenstelling al grote gevolgen hebben. Speciaal de concentratie fosfaat wat de grootste bufferende factor in media is, hoeft slechts licht af te wijken om deze veranderingen sterk te beïnvloeden. Na het autoklaveren traden de zichtbare neerslagen op (tabel 5.2.2).

Tabel 5.2.2. Hoeveelheden neerslag waargenomen in verschillende combinaties van agar en medium, na autoclaveren.

Agarmerk en -partij	Medium					
	water	MS Duchefa	DKW Duchefa oud	DKW Duchefa nieuw	GAM I	GAM +Cu -Mn
Geen agar	- *)	±	++	++	+	+
0,6 % BBL Oud	-	-	+	++	-	±
0,6 % BBL nieuw	-	-	+	++	-	±
0,7 % Daichin	-	-	-	-	-	-

*) – geen neerslag; ± zeer weinig neerslag; + neerslag; ++ duidelijk neerslag

Bij alle media (zonder agar) was er zichtbaar neerslag (zeer weinig bij MS). Wanneer agar bij MS is toegevoegd is het neerslag niet zichtbaar meer. Het is duidelijk dat de agar het waarnemen van dergelijke geringe neerslaghoeveelheden verhinderde.

Bij Daishin agar zagen we geen zichtbare neerslagen meer bij alle 4 media. Dus ook de wat beter zichtbare DKW neerslagen waren niet te zien. Bij BBL (oud en nieuw) was er nog steeds duidelijk neerslag te zien met DKW (speciaal bij de nieuwere partij) en heel weinig neerslag met GAM Cu/Mn.

Agarstevigheid

De stevigheid van het agar werd subjectief bepaald door schudden van het medium waardoor het medium een slurrig werd (snel > zacht, of langzaam > hard); en mechanische druktoefening en dan subjectief vergelijkend vaststellen of agar snel breekt.

Tabel 5.2.3. Stevigheid van agarmedia waargenomen in verschillende combinaties van agar en medium, na autoclaveren.

Agarmerk en -partij	Medium					
	water	MS Duchefa	DKW Duchefa oud	DKW Duchefa nieuw	GAM I	GAM +Cu -Mn
0,6 % BBL Oud	+	+	-	-	±	-
0,6 % BBL nieuw	+	+	+	+	+	±
0,7 % Daichin	+	+	+	+	+	+

*) – zacht; redelijk stevig; + stevig

Voor de 'wateragar' was er kwalitatief geen verschil waar te nemen wat de agarstevigheid betrof. Het MS medium had met alle drie agars ook een goede stevigheid. Verschillen traden op bij de andere media: daar bleek 'BBL oud' slechts matig tot redelijk vast te worden met DKW en de aangepaste media. Deze agar was

volgens de 'expiry date' (houdbaarheidsdatum) echter ook al enige tijd verlopen. Of dit of het lotnummer bepalend is voor de afwijkende fysische eigenschappen kon niet nagegaan worden. Met 'BBL agar nieuw' waren de aangepaste media en DKW wel goed 'vast' geworden, behalve het GAM Cu/Mn, dat wat zachter bleef. Met Daishin agar werden na autoklaveren alle media goed stevig.

Er is geen voor de hand liggende verklaring voor de verschillen in hardheid bij de verschillen in media. Misschien dat kleine verschillen in pH bij de oude BBL agar reeds het zachter worden van de agar veroorzaakten. Het is een waarschuwing dat ondanks het feit dat bij MS media de agar nog goed vast wordt, er toch al veranderingen opgetreden zijn. Wat de invloed hiervan op weefselkweek kan zijn, is onbekend.

Zachte 'agars' zouden enerzijds eerder glazigheid in plantjes kunnen veroorzaken door lagere waterspanning, maar anderzijds door snellere diffusie een betere beschikbaarheid van opgeloste nutriënten, en daarmee dan juist snellere groei kunnen geven. Bij appel en gerbera werd dit waargenomen; gelrite met een lagere waterspanning en betere diffusie gaf veel snellere groei, maar daarbij een oplopende glazigheid (tot 100% na 3 cycli).

5.3 Conclusie

Ons onderzoek hield zich bezig met minerale aanpassingen per soort. De aspecten van vloeibaar of vast medium, welk gellend agens – agar of gelrite-, en welk merk of type worden niet behandeld. Zij werden bij enkele gewassen wel aangestipt. Ook in de oorspronkelijke projectbeschrijving wordt erop ingegaan, maar werd reeds gezegd dat het geen inhoud van dit project zou zijn.

In de literatuurlijst staan ook enige verwijzingen naar deze aspecten. Het is onbekend per plantensoort wat de effecten zijn. Dat er echter belangrijke keuzes gemoeid zijn bij merken en typen agar of gelrite of dat men kiest voor vloeibaar medium lijkt geen twijfel. Dit werd geïllustreerd door de bovenbesproken experimenten. Het heeft niet alleen invloed op de 'vastheid' van het medium, maar o.a. door invloed op pH-verlaging na autoklaveren ook op de neerslagen, die op kunnen treden in geautoklaveerde media.

6 Algemene conclusie en kanttekeningen

6.1 Algemeen

Het idee dat het mogelijk moet zijn om media per soort aan te passen en zo de vermeerdering en kwaliteit van het weefselkweekplantje te verbeteren is juist gebleken. Uit hoofdstuk 4 met voorbeelden blijkt echter dat het concept niet voor alle planten gewerkt heeft. Vooral in de gevallen waarbij voor vermeerdering geen scheutvermeerdering gebruikt werd (Alstroemeria, lelie en tulp) konden we geen goed aangepast medium vinden. Bij de desbetreffende plantvoorbeelden werd op het mogelijke waarom ingegaan.

6.2 Hoeveel kan een plant groeien met de toegediende nutriënten?

Met de mediumsamenstelling van MS en elementgehalten van de 'gemiddelde' plant heeft De Klerk (persoonlijke mededeling) interessante berekeningen gemaakt. Hij berekent per 100 ml MS de mogelijke gewichtstoename in drooggewicht aan 'plant'. Het grootste deel van de gewichtstoename is koolhydraten. Bij veronachtzaming van CO₂-verlies (verademing, e.d.) en CO₂-opname (fotosynthese) kan een plant maximaal ca 3,2 g aan drooggewicht toenemen per 100 ml MS. De plant groeit dan op een 3 % sacharose medium, en de rest van de nutriënten wordt niet beperkend. Voor bijna alle macro- en micro-elementen ligt deze gewichtstoename hoger, bij voorbeeld voor N 5,6; K 7,8; Fe 5,6 en Mn 11 g.

Macro-elementen

Bij de macro-elementen zijn er drie uitzonderingen: Ca 2,4, P 1,9 en Mg 1,8 g. Dit betekent als het weefselkweekmateriaal meer groeit dan 3 gram er gemeten aan de volwassen plant een deficiëntie is ontstaan voor deze elementen. Jonge plantjes hebben een lager gehalte aan Ca en een hoger aan P, zodat P eerder beperkend zal worden dan Ca. Mg is ongeveer gelijk bij beide leeftijden.

Micro-elementen

Bij de micro-elementen wordt alleen Cu beperkend; hiervoor berekenen we de extreem lage gewichtstoename van slechts 0,1 g. Voor koper zal er dus een extreem tekort in de plantjes in weefselkweek zijn ontstaan gedurende de groei, weer uitgaande van de berekeningen aan de volwassen plant. Kennelijk reageert niet elke plant hetzelfde op dit waarschijnlijke kopergebrek in weefselkweek en zijn de Cu-effecten niet altijd dezelfde. Maar de spectaculaire verbeteringen bij bijv. Gerbera in vermeerdering en roos bij uitplanten, lieten zien dat koper vaak beperkend zal zijn geweest. Omdat koper voorkomt in bij de fotosynthese betrokken eiwitten, is het effect misschien ook afhankelijk van de mate waarin er fotosynthese plaats vindt in vitro. Bij gerbera zou dan in vitro de fotosynthese al een bijdrage aan de groei geven. Bij roos zou de fotosynthese bij uitplanten van plantjes van media met meer Cu veel sneller optimaal op gang komen. Dit zal dan direct een bijdrage kunnen geven aan de verdere groei, en daarmee verklaren dat de plantjes veel sneller 'weggroeien'. Omdat in-vivo effecten niet voor alle planten zijn onderzocht, zou dit voor meer planten het geval hebben kunnen zijn. Om het uitplanteffect van Cu-verhoging te bereiken zou het nog een extra bijdrage kunnen leveren aan het positieve effect door Cu te verhogen in de beoordelingsmedia. Alleen Cu-verhoging van bewortelingsmedia, zou ook al een effect kunnen hebben.

De elementen die beperkend zijn volgens de berekening, bleken (natuurlijk) dezelfde als degenen die verhoogd werden bij de aanpassingen via elementanalyse en bij de vergelijkingen van concentraties in weefselkweekmedia met die in de substraatteelt. De aangepaste media hebben ook de grootste verhogingen in concentratie bij Ca en P en in mindere mate Mg wat betreft de macro-elementen. Dus met extra hoeveelheden van deze elementen kan de plant meer groeien in weefselkweek en door de betere verhouding waarschijnlijk ook sneller, voordat uitputting van een element bereikt is.

6.3 Tekorten en mobiliteit van elementen

Als er (relatieve) tekorten aan bepaalde elementen in het medium ontstaan, zal dat een verschillende uitwerking hebben per element. Er wordt hier niet ingaan op specifieke gebrekverschijnselen en daarop volgende fysiologische ziektes. Deze zullen over het algemeen voorafgegaan worden door langzamere groei in weefselkweek.

Het is in dit verband belangrijk dat sommige elementen zeer gemakkelijk getransporteerd worden, terwijl andere meer 'vast liggen'. Een voorbeeld van de eerste is kalium, van de laatste calcium. Zo zal dus een relatief gebrek aan kalium makkelijker gedeeld kunnen worden, omdat andere plantendelen ook kalium kunnen afstaan aan jong en groeiend weefsel. Bij calciumgebrek zal echter het groeiende weefsel direct getroffen worden, omdat calcium vastgelegd is in de oudere plantenweefsels, en er dus van hieruit nauwelijks calcium getransporteerd zal worden.

6.4 Micro-elementen en agar

Voor het regelen de concentraties aan micro-elementen in vaste weefselkweekmedia komt er nog een complicerende factor bij en dat betreft het gehalte aan deze elementen in agar. In de bijgevoegde oorspronkelijke projectbeschrijving worden berekeningen getoond aan de hand van cijfers van Scholten en Pierik (1998b). Hieruit blijkt dat sommige merken agar (en gelrite?) hoge gehalten van micro-elementen bevatten. Daardoor kunnen speciaal voor agarmedia, verschillend per agarmerk en -type, micro-element tekorten soms opgeheven worden, ondanks dat het medium te weinig van de betreffende elementen bevat.

Ook kunnen in agar schadelijke metalen als aluminium in relatief hoge concentraties voorkomen. Hoe makkelijk deze beschikbaar zijn voor weefselkweekplantjes is niet bekend, maar afhankelijk van plantensoort en zuurgraad van het medium zal allicht een deel gebruikt kunnen worden.

6.5 Kanttekeningen

Gedurende het onderzoek zijn veel vragen gesteld bij presentaties en in gesprekken. Een aantal hiervan worden hieronder nog eens behandeld. Het geeft de gelegenheid wat onduidelijkheden weg te nemen en (on-)mogelijkheden van de methode te verklaren.

1. Het lijkt erop dat vooral de verhoging van calcium en fosfaat het belangrijkste zijn voor de verbeteringen gevonden bij toepassing van het aangepaste medium.

Vraag:

Zou alleen aanpassing van de macromineralen calcium en fosfaat ook voldoende zijn?

Antwoord:

Er zijn geen uitgebreide experimenten gedaan om dit te onderzoeken. Wel is een experiment met MS + gedaan bij gerbera, waarbij ook nog Cu aangepast was. Dit gaf problemen met zachtere agar (door de Ca en P aanpassing) en daarmee glazige planten. Dit werkt dus niet, hoewel het medium wel beter voldeed dan normaal MS.

2. De plantanalyse die de basis vormt voor de aanpassingen wordt standaard uitgevoerd met jong volgroeid bladmateriaal.

Vraag:

Waarom wordt voor deze analyse geen jong plantmateriaal of (zelfs) weefselkweekmateriaal genomen?

Antwoord:

Hierop is met de resultaten van ons onderzoek geen sluitend antwoord te geven. Wel is gebleken dat bij alle planten die via okselknoppen en/of stengelgroei vermeerderd werden ('groene' vermeerdering) media gebaseerd op onze analyses voldeden, d.w.z. dat er verbeteringen in vermeerdering en/of beworteling plus doorgroei verkregen werden. Ook andere onderzoekers zijn uitgegaan van analyses van net volgroeid bladmateriaal als basis voor mediaaanpassingen met goed resultaat.

In een experiment met gebera zijn ook analyses gebruikt van weefselkweekmateriaal en jonge plantjes. De uitkomst was dat het medium gebaseerd op volwassen bladanalyse beter voldeden dan media gebaseerd op jonger materiaal.

Vooraf het uiterlijk van de plantjes was slechter. Bij bolvermeerdering (lelie en tulp) en rhizoomvermeerdering (Alstroemeria) zijn wij er niet in geslaagd om de ideale aanpassing te vinden.

3. De analyse van plantmateriaal zal beïnvloed worden door de bemestingstoestand en/of standplaats. Daarmee wordt ook de aangepaste mediumsamenstelling beïnvloed.

Vraag:

Hoe kan dan toch gezien bovenstaande een aangepast medium ontworpen worden?

Antwoord:

Dat is soms een probleem, maar kleiner dan men denkt/verwacht. Voor planten gekweekt in de kas op substraatteelt wordt altijd uitgegaan van planten die optimaal gegroeid zijn en waarvoor dus optimale voedingsomstandigheden al ontwikkeld zijn in vivo. Hetzelfde geldt voor planten onder andere omstandigheden. Hier wordt een waarde genomen voor planten die ook optimaal gegroeid zijn. De middenwaarden van de uitkomsten per element dienen dan als basis voor deze plant.

4. De analyses van soorten onderling verschillen niet genoeg om individueel aanpassingen te maken.

Vraag:

Zou een algemene gemiddelde plantanalyse voor "PAM", het plant-aangepaste medium niet kunnen volstaan?

Antwoord:

In de substraatteelt wordt dit principe niet toegepast, maar op zich is dat geen argument. Toch geeft dit al wel een indicatie dat soortspecifieke aanpassingen waardevol kunnen zijn. Als de gebruikte analyses voor de planten waarbij aanpassingen waardevol waren, onderling en met in gesloten substraatteelt gebruikte concentraties vergeleken worden, blijkt dat er toch wel aanzienlijke soortverschillen zijn.

Verder moet er natuurlijk nog gekeken worden hoe hoog de totale N concentratie, c.q. ionensterkte, is die per plant de beste resultaten geeft.

5. Planten hebben het vermogen om selectief ionen op te nemen.

Vraag:

Waarom aanpassen aan elementgehalte van de plant; misschien is een andere verhouding nog beter als het ene element beter opgenomen wordt dan het andere?

Antwoord:

In principe volgen wij dezelfde weg en methode als gevolgd is in het optimaliseren van substraatteelt. Daar heeft deze weg goed gewerkt.

Het is hierbij echter wel zo dat bij substraatteelt planten wortels gebruiken voor mineralen-opname. Bij weefselkweek zullen diffusie en opname via andere weefsels dan wortel meestal het belangrijkste zijn (zie 6).

6. Planten in substraatteelt hebben wortels; weefselkweekplantjes meestal niet tijdens de vermeerdering.

Vraag:

Opname van mineralen in weefselkweek is anders dan in substraatteelt of in de volle grond.

Waarom toch ook substraatteeltoptima naast plantanalyses, gebruiken voor het ontwerpen van weefselkweekmedia?

Antwoord:

De opname in weefselweek (vooral het plantje, plantfragment, e.d. zonder wortel) zal inderdaad anders zijn dan in vivo. Deels wordt gedacht dat concentratieverschillen in mineralen direct weerspiegeld worden in het gehalte van het plantje. Dit is waargenomen voor S; in DKW is het sulfaatgehalte zeer hoog en de resulterende plantjes hadden ook een hoog S-gehalte. Ca en P lieten hetzelfde beeld zien. Bij K was dit niet zo; ondanks het feit dat in veel aangepaste media minder/weinig kalium aanwezig was, werd altijd een K-gehalte gevonden bij analyse dat hetzelfde of soms zelfs hoger was dan bij MS en DKW. Opvallend was ook dat Mg vaak hoger was bij de aangepaste media vergeleken met DKW en MS. Hetzelfde effect leek voor ijzer te gelden. Hoewel de analyses niet altijd reproduceerbaar waren en grote spreiding vertoonden (en daardoor verschillen niet significant waren), was de algemene indruk dat het ijzergehalte van de planten van aangepaste media hoger was.

Een duidelijk antwoord is niet te geven. Het waardevolle is dat het werkt. Waarnemingen die gemaakt werden tijdens de experimenten verduidelijkten de aanname dat opname van mineralen ook bij weefselweekplantjes niet alleen via diffusie gaat en dat metingen en waarnemingen gedaan bij substraatteelt gebruikt kunnen worden.

7 Literatuur

7.1 Algemeen

- Acta Horticulturae 401** (1995) International symposium on growing media and plant nutrition in horticulture.
- Bemestingsadviesbasis Glastuinbouw** (1994) IKC Akker- en Tuinbouw, afd. Glasgroente, Aalsmeer, Naaldwijk
- Bergmann, W.** (1992) Nutritional disorders of plants. Fischer, Jena.
- George, E.F.** (1993) Plant propagation by tissue culture, part 1. The technology. Exegetics Ltd, Edington GB pp 274–420
- George, E.F., D.F.M. Puttock & H.J. George** (1987) Plant culture media; vol 1 Formulations and uses, vol 2 Commentary and analysis. Exegetics Ltd, Edington GB reprint 1997
- Leifert, C. et al** (1995) Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Crit.Rev.Plant Sci.* 14, 83-109
- Marschner, H.** (1990) Mineral nutrition of plants. Academic Press, Londen 4e druk

Deze boeken en overzichten bevatten een overdaad aan verdere literatuurverwijzingen.

7.2 Specifiek (selectie)

- Avila, A. de L et al** (1998) Nitrogen concentration and proportion of NH_4^+ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience* 33, 336-338
- Bach, A. et al** (1992) Growth and mineral uptake by explants of *Hyacinthus orientalis* L. under different temperature treatment. *Acta Horticult.* 325, 481-486
- Driver J.A. & Kuniyuki A.H.** (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19, 507-509
- Dunlap, J.R. & K.M. Robacker** (1988) Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant Physiol.* 88, 379-382
- El Badaoui, H. et al** (1996) Stimulation of the growth and solamargine production by *Solanum paludosum* multiple shoot cultures using a new culture medium. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 45, 153-158
- Faria, J.L.C. & J. Segura** (1997) *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silverthiosulphate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *In Vitro Dev.Biol.-Plant* 33, 209-212
- De Klerk. G.J., Ter Brugge, J., Smulders, R. & Benschop M.** (1990) Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. *Acta Hortic.* 280, 29-36
- Langens, M.M., Bouman, H. & Custers, J.** (2001) Toepassing van weefselkweek en embryogenese bij vermeerdering en veredeling van tulp. PPO rapport 405, Lisse
- Langens-Gerrits M.M. & De Klerk G.J.** (1998) Micropropagation of flower bulbs: lily and narcissus. In: *Methods in molecular biology*, vol 111: Plant cell culture (Hall R.D. ed) pp.141-147. Humana Press, Totowa
- Morard, P. et al** (1998) Kinetics of mineral nutrient uptake by *Saponaria officinalis* L. suspension cell cultures in different media. *Plant Cell Rep.* 18, 260-265
- Murashige, T. & F. Skoog** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol.Plan.* 15, 473-497
- Preil, W. & M. Schneidereit** (1997) Effects of reduced chloride concentration of growth of embryogenic *Cyclamen persicum* suspension cultures. Report of COST 822 working group 2, September 1997 Amiens, F.
- Pryce, S. et al** (1993) Effect of plant density and macronutrient nutrition on *Delphinium* shoot cultures. *J.Horticult,Sci.* 68, 807-813

- Rugini E.** (1984) In vitro propagation of some olive (*Olea europea sativa* L.) cultivars with different rootability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Sci. Horticult*, 24: 123-124
- Sarma, K.S. et al** (1990) Effect of method of agar addition on post-autoclave pH of the tissue culture media. *Ann.Bot.* 65, 37-40
- Scholten, H.J. & R.L.M. Pierik** (1998a) Agar as a gelling agent: differential biological effects in vitro. *Scientia Horticult.* 77, 109-116
- Scholten, H.J. & R.L.M. Pierik** (1998b) Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Rep.* 17, 230-235
- Singha, S. et al** (1987) Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.*11, 209-220

Bijlage I: Uitgewerkte methode voor berekenen van aangepaste media vanuit de elementanalyse van de plant

Inleiding

Een plant of deel ervan is opgestuurd naar een servicelaboratorium waar een elementanalyse is uitgevoerd. Dit levert een reeks van getallen op voor de elementen waarvoor de analyseresultaten gevraagd zijn. Soms zijn analyseresultaten al bekend via literatuurverwijzingen of uit rapporten (bijv. uit onderzoek naar bemesting en/of groeiomstandigheden). Met de getallen uit één van beide bronnen kan dan gerekend worden om tot een aangepast medium te komen.

Er wordt een rekenvoorbeeld in 'formule' gegeven, maar het blijkt vaak dat een getallenvoorbeeld verhelderend werkt. Dat volgt erna.

Rekenwijze

Om van het drooggewichtspercentage X (gram / 100 gram drooggewicht) van het element stikstof (N) te komen tot de millimolaire concentratie YN (in mM/ kg drooggewicht) voor het medium, volge men de volgende stappen:

1. Drooggewicht stikstof = X %, dus X gram per 100 gram per plant.
Millimolaire concentratie (YN) per 1000 gram =
X gedeeld door 14 (= molecuulgewicht van stikstof) x 10
Eenheid: $\mu\text{M}/\text{gram}$ drooggewicht of mM/kg drooggewicht;
Dit is het analyseresultaat/-getal dat meestal geleverd wordt door de analyselaboratoria na opsturen voor een plant(enweefsel)analyse).

Voor de berekening van de millimolaire (mM-)waarden per kg drooggewicht van resp. fosfor (YP), kalium (YK), calcium (YCa) en magnesium (YMg) zijn de resp. molecuulgewichten (de factoren waardoor het Drooggewichts-% gedeeld wordt om Y te krijgen):

P : 31,0;
K : 39,1;
Ca : 40,1
Mg : 24,3 .

2. Stel we willen een ionsterkte in het medium van Z mM/liter stikstof (symbool N), dan levert Z gedeeld door YN de vermenigvuldigingsfactor op die nodig is om de equivalente sterkte te bereiken voor de andere elementen.
3. Dus nu is $Z/YN \times [Y \text{ (gehalte) ander macro-element in mM/kg DW}] = \text{mmolaire sterkte van dit element in het aangepaste medium}$; dus gewenste YP, YK, YCa en/of YMg.

Hierna wordt een rekenvoorbeeld gegeven.

Rekenvoorbeeld

Een getallenvoorbeeld aan de hand van de elementanalyse van het blad van een 'typische' groene plant:

1. Gevonden analysewaarden - X - : N 2,9 %, P 0,3 %, K 4,2 %, Ca 1,4 %, gedeeld door molecuulgewichten ==> mmol per 100 gram x 10 ==> mmol per kg (eventueel X 1000 ==> μmol per kg):
Hieruit komt dan voor N, P, K en Ca:
 $Y_N = 2,071$; $Y_P = 0,097$; $Y_K = 1,074$ en $Y_{Ca} = 0,349$ mmol/kg drooggewicht (DW).
2. Wij willen 50 mmol/liter stikstof (N) in het medium (ZN).
 $Z_N = 50$ mM; $Y_N = 2,071$ ==> omrekeningsfactor $Z_N/Y_N = 50/2,071 = 24,14$.
Met deze factor moeten de andere Y-waarden der macro-elementen vermenigvuldigd worden om de vereiste mM waarden in het aangepaste medium te verkrijgen:
 $Z_P: 24,14 \times 0,097 = 2,34$ mmol/liter;
 $Z_K: 24,14 \times 1,074 = 25,9$ mmol/liter.
Voor Ca, Mg en andere elementen kunnen op dezelfde wijze de concentraties berekend worden.

Gehaltes van sporenelementen worden in de literatuur vaak in ppm-eenheden aangegeven (bedoeld wordt hiermee mg per kg drooggewicht). Ppm is niet een correcte eenheid in dit verband; beter is nmol per g of μmol per kg drooggewicht te geven. Deze eenheid wordt bereikt door het ppm-getal te delen door het molecuulgewicht van het betreffende micro-element (zie stap 1). Dit zijn ook de getallen die bijna altijd door de analyselaboratoria geleverd worden.

Voor sporenelementen wordt dan verder dezelfde soort berekening gevolgd, indien men aanpassingen wil doorvoeren. De getallen komen dan echter uit op μmol per liter.

Bereiding medium

In de praktijk is het, wat betreft macro-elementen, eenvoudig om uitgaande van 100 mM stockoplossingen de juiste samenstelling van het medium te verkrijgen. Als het medium getest is en voldoet, kan bij leveranciers van mediummengsels het medium in zijn definitieve samenstelling 'ready-made' besteld worden.

De volgende stocks (ieder dus met een concentratie van 100 mM) zijn het meest gebruikelijk en praktisch om tot de gewenste concentraties van de elementen te komen:

- KNO_3
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
- NH_4NO_3
- MgSO_4
- KH_2PO_4 (of K_2HPO_4) de laatste geeft aanvankelijk weliswaar meer K, maar als bij pH instelling KOH gebruikt wordt zal het eindresultaat hetzelfde zijn. Bij gebruik van NaOH zal er wel wat extra K op deze wijze in het medium komen. Anderzijds zal bij gebruik van HPO_4^{2-} -zouten eerder een zure oplossing van HCl gebruikt moeten worden om de pH rond de vereiste 6 te brengen dan een loogoplossing.

In andere gevallen is het soms handig om nog andere stocks ter beschikking te hebben:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, speciaal als ammonium/nitrat verhouding hoog moet zijn.
- NH_4Cl , in zelfde gevallen waarbij chloride niet nadelig is en al genoeg S in het medium is.
- KCl, om kalium te verhogen in gevallen waar chloride niet nadelig is.

Als voorbeeld volgt hier een gerberamedium. Dit zou betekenen dat dan volgende volumina gebruikt moeten worden om te komen tot het door ons gebruikte GAM N40, voor 1 liter medium:

- KNO_3 100ml = 10 mM K en 10 mM N in de vorm van nitraat
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 80 ml = 8 mM Ca en 16 mM N in nitraatvorm
- NH_4NO_3 60 ml = 12 mM N - 6 in de vorm van ammonium en 6 in de vorm van nitraat
- MgSO_4 25 ml = 2,5 mM Mg en 2,5 mM S
- KH_2PO_4 17 ml = 1,7 mM P en 1,7 mM K, als laatste toevoegen om neerslagen te voorkomen (als oplossing bijna al op eindvolume is gebracht, direct voor het op pH brengen).

Vaak zijn er trouwens meerdere mogelijkheden om tot dezelfde eindconcentraties te komen. Dit geldt zeker voor media waar de concentraties chloride en sulfaat niet kritisch zijn, of waar de verhouding tussen ammonium en nitraat variabel mag zijn.

Voor micro-elementen kunnen μ molaire of ook mmolaire oplossingen gebruikt worden afhankelijk van het element. Voor Fe en Mn zal een hogere concentratie in de stock gebruikt worden dan voor Co en Cu, waarvoor 1000 x minder nodig is.

Bijlage II: Oorspronkelijke projectbeschrijving

UITGEBREIDE PROJEKTBESCHRIJVING

6.3. NUTRIENTENOPNAME IN WEEFSELKWEK Programma Innovatie Sierteelt

looptijd: 1 januari 1999 – 31 december 2002 (tussenevaluatie halverwege het project)

trekkerinstituut: PPO (COWT)

deelprogramma: Vermeerdering

beknopte omschrijving:

Bij weefselkweekvermeerdering wordt vrijwel altijd standaard het medium gebruikt dat bijna 40 jaar geleden ontwikkeld is door Murashige and Skoog ("MS-medium"), of media die op kleine modificaties na hetzelfde zijn als MS. Wel wordt vaak het macronutriënten gehalte gehalveerd. Voor sommige planten bestaan specifieke, afwijkende media, bijv. voor orchideeën en houtige gewassen.

Er zijn sterke aanwijzingen dat de vermeerdering verbeterd kan worden door het medium aan de speciale eisen van de soort plant aan te passen. De eisen van de soort kunnen wellicht vastgesteld worden door een chemische analyse van de plant (elementanalyse). Bij scheutcultures van *Solanum paludosum* kon op deze manier de groei bijna verdubbeld worden. Andere weefselkweekfactoren, m.n. suiker en vitaminen, zijn ook vaak traditioneel bepaald, hoewel type en concentratie suiker nog wel eens gewijzigd wordt voor specifieke doeleinden als bolgroei en embryo-ontwikkeling.

doel:

Het doel van dit project is vast te stellen of er een relatie is tussen de elementsamenstelling van gewassen en de nutriëntensamenstelling van media waarop de gewassen goed groeien. Er zal hierbij aandacht besteed worden hoeveel van de verschillende nutriënten daadwerkelijk opgenomen wordt uit het medium. Als zo'n relatie er is kan het medium makkelijk aangepast worden om betere vermeerdering en plantkwaliteit te verkrijgen.

De verkregen resultaten zijn direct van belang zijn de weefselkweekindustrie, de afhardbedrijven en de telers. Door het onderzoek zal de keten verstevigd worden, en zal door het efficiënter gebruik van medium het afval verminderen.

specificatie output:

- methodes om door elementanalyse eenvoudig gewasspecifieke media te ontwerpen.
- kennis van nutriëntenconsumptie in weefselkweek op vast medium
- analyse van de kwaliteit van plantjes die uit deze vermeerderingsprotocollen afkomstig zijn.
- verbeteringen in vermeerderingsprotocollen van een aantal gewassen, waarmee het onderzoek is uitgevoerd

werkplan 1999:

Elementanalyses zullen gedaan worden bij enkele gewassen die voor het onderzoek in afstemming met het bedrijfsleven gekozen worden. Verder zullen voedingssamenstelling/elementverhoudingen bij hydroponische culturen en bemestingsadviezen voor gewone teelt meegenomen worden.

Met aanpassingen geïndiceerd door deze gegevens zullen media samengesteld worden die voor de betreffende plantensoorten vergeleken zullen worden met de bestaande weefselkweekmedia. De groei in een aantal cycli en, indien al mogelijk, de kwaliteit na uitplanten zal geanalyseerd worden.

Consumptie en beschikbaarheid van nutriënten bij vermeerdering op vaste (standaard en aangepaste) media zal onderzocht worden.

Samenstelling van weefselkweekmedia

Het Murashige-Skoog medium

In 1962 publiceerden Murashige and Skoog hun onderzoek aan de nutriëntenbehoefte van tabakscallus. Murashige en Skoog baseerden hun onderzoek en uitgangsmiddeel op onderzoeken van White uit 1943 en 1951 voor de groei van wortelcultures van tomaat. White had op zijn beurt weer teruggerept op nog oudere media voor o.a. algengroei. Uitgaande van het White medium voegden Murashige en Skoog de verschillende nutriënten in dubbele, viervoudige en achtevoudige hoeveelheid toe, en vervolgens werd de groei van het tabakscallus gemeten. Vervolgens werden met verbeteringen voor een element, de verdubbelingen enz. nog eens uitgevoerd voor andere elementen. De uitkomsten waren een (sterke) verhoging van de concentratie van alle elementen in het basismiddeel. Andere uitkomsten betroffen o.a. toevoeging van plantenextracten (tabaksblad) en verhoging van de sacharose naar 3 %.

Nagenoeg alle tegenwoordig gebruikte media, zeker procentueel gezien, zijn gebaseerd op het basismiddeel ontwikkeld door Murashige en Skoog. Na de publicatie van Murashige en Skoog is er verrassend weinig gericht onderzoek gedaan om media te ontwikkelen om optimale groei te bereiken voor specifieke gewassen.

Nadere bestudering van de minerale samenstelling van MS toont dat het zeer zoutrijk is in vergelijking met media die bijv. bij hydroponische cultures worden gebruikt, speciaal wat betreft stikstof (nitraat en ammonium). In weefselkweek wordt daarom vaak het macronutriënt gehalte gehalveerd bij gelijkblijvende hoeveelheid microzouten. Dit betekent echter nog steeds een sterke verhoging van de macromineralen t.o.v. White. In de loop der jaren zijn verder, behalve de wijzigingen in stikstofbalans (ammoniumnitraat hoeveelheden en verhouding tussen deze beide), vooral verhoging van ijzer en fosfaat de meest toegepaste veranderingen geweest ter verbetering van het basis MS-middeel.

Voedingszoutensamenstelling gebruikt in substraatteelt

De adviezen voor samenstelling worden regelmatig bijgesteld, maar belangrijke verschillen liggen allereerst in de veel lagere zoutsterkte, de verhouding ammonium/nitraat die veel lager is ca 1:10 tot 1:15. Bij MS ligt deze verhouding op 1:2. Bij *Cymbidium* is het verschil kleiner, maar de samenstelling is verder geheel afwijkend. Ook in weefselkweek wijkt het middeel sterk af van de gebruikelijke MS-basis.

Natuurlijk zijn de samenstellingen afhankelijk van het substraat (steenwol, kokos, veen) en of het systeem gesloten is of met vrije drainage. De laatste zal hogere concentraties gebruiken. Van drie gewassen worden in tabel 1 de concentraties gegeven. Opvallend is de toevoeging van Si, in de vorm van metasilicaat bij rozeteelt. Bij cultures op glas zal misschien genoeg silicaat vrijkomen voor planten, evenals soms borium, omdat het borosilicaat glas altijd ionen afgeeft. Bij langere teelt op kunststof zou er wel gebrek kunnen optreden van Si.

Bij vergelijkingen van de relatieve gehalten van elementen (tabel 2) vallen de volgende zaken in het MS middeel op: de hoge concentratie kalium t.o.v. calcium bij de macro-elementen, de hogere concentratie ijzer t.o.v. van de andere metalen en de hoge Mn/Cu verhouding, d.w.z. de relatief lage Cu-concentratie.

Zoals hierna nog eens ter sprake komt, zal een (groot) deel van de verschillen misschien minder relevant zijn omdat de 'vivo'-planten wortels bezitten en dus actief bepaalde bestanddelen opnemen.

Mineralgehaltenes van planten

Mineralgehaltenes van planten zijn vastgesteld aan 'vivo'-planten en dan grotendeels aan bladweefsel. In tabel 1 worden gehalten van een groot aantal mineralen gegeven afkomstig van verschillende planten, waarbij een opvallende spreiding aanwezig is. Deze verschillen worden deels veroorzaakt door de aangeboden voeding, deels door het onderzochte weefsel (type, ouderdom, fysiologische toestand) en deels door de plantensoort. In dit laatste aspect liggen mogelijkheden om per plantensoort ook in weefselkweek optimale(re) voedingsmedia te bereiken dan de algemene MS door naar gehalten van mineralen per plant te kijken. Eenmaal, voor Solanum, is dit gevonden. Ter vergelijking worden in tabel 1 de minerale gehalten van MS vermeld. De verhoudingen liggen in dezelfde orde van grootte. Dit is niet verrassend omdat de eerste voedingsmedia ontworpen zijn aan de hand van elementanalyse van planten.

Dat aangeboden voeding zich tot op zekere hoogte weerspiegelt in gehalten is begrijpelijk, gegeven de wijze van opname van vele voedingsstoffen. Enkele micro-elementen ontbreken in MS, maar worden geacht wel in sommige planten aanwezig te moeten zijn als Al, Ni, Si en Se. Si en Al zijn bij zorgvuldige analyse van voedingsmedia altijd gevonden als 'verontreinigingen' in voldoende concentratie; voor Ni en Se is dit minder duidelijk. Andersom is voor I, jodide, nog nooit duidelijk aangetoond dat het enige rol speelt in de plant. Slechts als antioxidant zou het een voordelige invloed kunnen hebben. Ook de oorspronkelijke publicatie van MS toont geen positieve invloed van jodium. Desondanks bleef het als bestanddeel gehandhaafd in het recept. Voor vele vitamines geldt hetzelfde; slechts voor thiamine is een duidelijke positieve invloed aangetoond, terwijl vele onderzoeken geen enkele invloed vonden bij het weglaten van pyridoxine, nicotine, biotine, etc. uit het medium. Myo-inositol dat bij de gebruikelijke toegevoegde hoeveelheden eigenlijk geen vitamine genoemd kan worden heeft wel een positief effect op de groei.

Opname en transport van voedingsstoffen in en buiten de plant

Een groot verschil tussen vivo- en vitroplanten is zeker tijdens de meeste vermeerderingsmethoden de afwezigheid van wortels bij weefselweekcultures. Wortels zijn voor de plant gespecialiseerde organen voor opname. Daarnaast zullen suspensie- of andere vloeibare cultures zich totaal anders gedragen dan weefselweekcultures op vaste media. Hoewel verreweg het meeste onderzoek in weefselweek wat betreft nutriëntenopname en gebruik gedaan is aan suspensie cultures, heeft een deel van deze resultaten genoeg algemene geldigheid om ook voor studie aan vaste media mee in overwegingen betrokken te worden.

De grootste opname bij vaste media zal plaats vinden via het snijvlak van het weefsel voor zover het in het medium steekt, en na de wondreactie via eventueel callusweefsel, waarvan de ongedifferentieerde cellen zich enigszins als suspensiecellen zullen gedragen. Echter ook andere plantendelen zullen voedingsstoffen opnemen. Ook bij planten buiten het laboratorium wordt immers met succes bladbemesting toegepast, bijv. Fe, Mn en Mo. Omdat de cuticula van weefselweekplanten i.h.a. minder dik is, zal deze mogelijkheid bij weefselweek planten misschien relatief belangrijker zijn. Onderzoek bij het COWT heeft laten zien dat IAA vooral via het snijvlak wordt opgenomen.

Er zijn nog enkele andere factoren die in dit verband genoemd moeten worden. De relatieve opname van ammonium en nitraationen wordt beïnvloed door de pH van het medium (hogere pH relatief betere nitraatopname), terwijl de opname op zich van ammonium de pH van het medium beïnvloedt, nl. pH verlaging. Bij het gebruikelijke pH-bereik in weefselweek zullen van de metalen geen hydroxiden of andere neerslagen gevormd worden, terwijl ijzer dat bij de gebruikte concentratie voor problemen zou kunnen zorgen als complex wordt toegediend (meestal met EDTA). Wel kunnen andere ionen voor problemen zorgen.

De onderlinge interacties bij opname van ionen kunnen belangrijk zijn: zo werd gevonden bij suspensiecultures van cycloam, dat chloride slechts voor 25 % opgenomen was na drie weken, terwijl andere bestanddelen al opraakten. Echter verlaging van het calciumchloride door vervanging met calciumsulfaat leverde een veel slechtere groei op.

Ook aspecten als diffusie door agar en binding aan agar, zullen per ion en ook voor organische bestanddelen verschillend zijn. Hierin zullen ook de verschillende merken agar verschillen (zie volgende paragraaf).

Agar

Een van de aspecten die de laatste jaren wel veel aandacht heeft gehad is de invloed van agar *per se* op de samenstelling van het medium en de invloed van het type/merk agar op de groei van weefselweekmateriaal. Vergelijking van de samenstelling van MS-medium met de gehalten van verschillende mineralen van enkele merken agar gaf opvallende resultaten (zie tabel 3). Aan de hand van de analyses van de auteurs berekenden wij de percentages van elk element die de agar bij 7 %-ig gebruik al bevat, van het totaal van de elementen in 1 liter MS medium. Niet alles zal echter vrij aanwezig zijn, zoals wassen met water aantoonde. Anderzijds zal bij een eenvoudige wassing met water niet zoveel vrijkomen, als gedurende een cultuurperiode op medium na autoklaveren. In dit opzicht gedragen de verschillende merken agar zich echter verschillend voor zover getest. Opvallend zijn de hoge gehalten van Cu, Na, S, en enkele mineralen als Al, Sn en Cr die normaal niet in MS voorhanden zijn. Van Co, Mo, I en B ontbreken jammer genoeg bepalingen

Er is dus een groot verschil van agarmedia vergeleken met vloeibare media wat betreft verborgen

toevoegingen van 'onbekende' bestanddelen. Gelritemediën waarvan de minerale verontreinigingen i.h.a. lager zijn, verschillen van agarmedia en zijn in dit opzicht meer vergelijkbaar met vloeibare media. Er zijn echter gegevens dat ook bij gelrite merken verschillen bestaan. Zo zijn hoge concentraties Mg en K aangetroffen, tot 30 maal de concentratie bij agar.

Bij overgangen van agar naar vloeibaar, of bestudering en vergelijking van vloeibare en agarmedia moet rekening gehouden worden met het verlies van dergelijke bronnen van mineralen en organische bestanddelen. Voor verdere conclusies waar nog meer aspecten als fysische eigenschappen en organische verontreinigingen wordt naar de literatuurlijst verwezen.

Conclusie

Uit bovenstaande blijkt dat er voor het werkplan zoals globaal op de eerste pagina vermeld voldoende aangrijpingspunten zijn voor een goede start van dit project. Een belangrijke beslissing zal liggen in de keuze van de gewassen die in het onderzoek opgenomen worden. Want naast de algemene aspecten die beschikbaarheid bij vaste media betreffen, zullen juist de specifieke verbeteringen de echte verbeteringen moeten opleveren.

Samenhang met andere projecten:

Hiernaast zullen twee verwante projecten lopen, getiteld Nieuwe vermeerderingstechnieken, waarbij speciaal mediumanalyse en plantkwaliteit aandacht krijgen, en Kwaliteit van weefselweekmateriaal, waarbij speciaal naar de oorzaken van verbeterde kwaliteit van weefselweekplantjes gezocht worden tijdens de bewortelingsfase.

Betere vermeerderingstechnieken zijn van belang voor alle andere projecten waarin weefselweek toegepast wordt, zoals het snel vermeerderen van planten afkomstig uit transformatie of kruisingen, en voor het verbeteren van specifieke, gewasgerichte protocolontwikkeling.

Tabel 1. Gehaltes aan elementen van MS in normaal MS-medium, drooggewichtsbepalingen van planten(ref 1 Leiffert, en ref 2 Marschner), en de concentraties gebruik bij hydroponische cultures in gesloten en vrije drainage systemen bij vier gewassen.

element	MS μmol/l	plant ref 1 mg/g DW	plant ref 2 mg/g DW	Anjer/aster mM/l		gerbera		roos		MS μM/l	element
N	60000	15	37-49	7,75	14	8,0	12,75	5,1	12,5	60000	N
K	20000	1	12-40	3,9	6,25	4,5	5,5	2,15	4,5	20000	K
Ca	3000	5	0,6-25	1,6	3,75	1,6	3,0	0,9	3,25	3000	Ca
Mg	1500	2	1-5	0,6	1,0	0,4	1,0	0,5	1,125	1500	Mg
Na	202									202	Na
P	1250	2	1,75-6,8	0,7	1,25	0,6	1,25	0,5	1,25	1250	P
S	1600	1	1,1-2,6	0,7	1,25	0,7	1,25	0,5	1,25	1600	S
Cl	6000	0,1	2-20							6000	Cl
	MS nM/l	μg/g DW	μg/g DW	μM/l						MS nM/l	
Cu	100		7,9	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	100	Cu
Mn	100000	50		5	10	5	5	5	5	100000	Mn
Fe	100000	100		20	25	25	35	15	25	100000	Fe
Al	0									0	Al
Cr	0									0	Cr
Cd	0									0	Cd
Zn	30000		20	3	4	3	4	3	3,5	30000	Zn
Sn	0									0	Sn
Ni	0		0,1-1							0	Ni
Co	110		0,04nodule							110	Co
Mo	1000		0,03-0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1000	Mo
B	100000	0,02	6-100	20	30	20	30	15	20	100000	B
I	5000									5000	I
											Si 0,75

Tabel 2. Molare verhoudingen van enkele geselecteerde voedingselementen in verschillende bestanddelen; resp MS medium, drooggewichten uit 2 referenties, anjer, gerbera en roos voedingsoplossingen bij hydroponische cultuur op gesloten en vrije systemen.

	MS	d.w. 1	d.w. 2	anjel		gerbera		roos	
7.2.1.1	3	4.2	4.6	2	2.2	1.8	2.3	2.4	2.8
K/Ca	6.7	2	2.2	2.4	1.7	2.8	1.8	2.4	1.4
Ca/Mg	2	1.5	2.4	2.7	3.8	4	3	1.8	2.9
S/P	1.3	1	0.4	1	1	1.2	1	1	1
Fe/Mn	1	2		4	2.5	5	7	3	5
Fe/Zn	3.3	5.8		6.7	6.3	8.3	8.8	5	7.1
Mn/Cu	1000	7.3		10	13.3	10	6.7	10	6.7

Tabel 3. Samenstelling van MS in µM/l in normale samenstelling vergeleken met gehalten aan mineralen van agar gebruikt bij 0,7 %, en de relatieve hoeveelheid t.o.v. van de MS-zoutbijdrage. De gegevens van drie merken agar uit de publicatie van Scholten en Pierik zijn gebruikt. Onderstreept = > 10 %, **vet** = > 50 %, **vet**** = >100 %; ! => 100, !! => 1000, !!!=> 10.000 nmol /l aanwezig van niet-essentiële elementen (misschien zelfs remmend voor groei).

	µM/l	agar 1	Percent	opm.	agar 2	percent	opm.	agar 3	percent	opm.
N	60.000	370	0,62		7	0,01		1246	2,08	
K	20.000	14	0,07		7	0,04		112	0,56	
Ca	3000	477	<u>15,90</u>		287	9,57		238	7,93	
Mg	1500	200	<u>13,33</u>		168	<u>11,20</u>		217	<u>14,47</u>	
Na	202	1400	693,07	**	392	194,06	**	3864	1912,87	**
P	1250	7	0,56		126	<u>10,08</u>		7	0,56	
S	1600	1300	81,25		546	<u>34,13</u>		1624	101,50	**
Cl	6000	329	5,48		231	3,85		1540	<u>25,67</u>	
	MS									
	nM/l									
Cu	100	105	105,00		238	238,00	**	126	126,00	**
Mn	100.000	511	0,51		7000	7,00		258	0,26	
Fe	100.000	3500	3,50		37632	<u>37,63</u>		3948	3,95	
Al	0	2100	!!		87108	!!!		9331	!!	
Cr	0	280	!		786	!		203	!	
Cd	0	91			483	!		56		
Zn	30.000	634	2,11		749	2,50		378	1,26	
Sn	0	13272	!!!		10794	!!!				
Ni	0	259	!		315	!				
Co	110									
Mo	1000									
B	100.000									
I	5000									