



BIBLIOTHEEK
PPO sector Bloembollen
Postbus 85
2160 AB Lisse
0252 462121

RAPPORT 58

VERMEERDERING ACER DOOR MID- DEL VAN WEEFSELKWEK

M.R.J. Albers

2000
Boomteeltpraktijkonderzoek, Boskoop

ISN 1712633
P-12-B-58

Nadruk of vertaling, ook van gedeelten, is alleen geoorloofd na schriftelijke toestemming van de directie van het proefstation en de auteur. Het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij en de Stichting Boomteeltpraktijkonderzoek zijn niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen, ontstaan door het gebruik van de gegevens die in deze uitgave zijn gepubliceerd.

INHOUD

1. INLEIDING.....	14
Doel weefselkweek onderzoek Acer.....	14
Geschiedenis weefselkweek Acer door het Boomteeltpraktijkonderzoek /COWT.....	14
Verticillium.....	14
Optimaliseren vermeerdering.....	15
Afronding	15
2. KORTE BESCHRIJVING ACER	16
Traditionele vermeerdering	16
Cultuur.....	16
Ziekten.....	16
3. INITIATIE.....	17
Type uitgangsmateriaal	17
Ontsmetting	17
Warmwaterbehandeling	18
Initiatiedia.....	19
Conclusies	20
4. VERMEERDERING	21
Basismedium	22
Hormonen.....	23
Conclusies	29
5. BEWORTELING	31
Conclusies	34
6. AFHARDEN	36
Conclusies	40
7. TEELT WEEFSELKWEKPLANTEN.....	41
Groeivergelijking met traditioneel vermeerderd	41
8. REGENERATIE UIT BLADSTROOKJES	42
Factoren.....	42
Protocol roos.....	42
Resultaat	43
Einde	43
9. LITERATUUR.....	44

WOORD VOORAF

Circa 20% van het areaal boomteelt bestaat uit laanbomen. *Acer* is economisch gezien één van de belangrijkste laanbomen in Nederland. Sommige soorten en cultivar geven bij de vermeerdering via enten en oculeren problemen met bijv. uitgestelde onverenigbaarheid. Onderzocht is of weefselweekvermeerdering (op eigen wortel) een oplossing kon bieden. Daarnaast is er ook behoefte aan een weefselweekvermeerderingsprotocol ten behoeve van het onderzoek naar onderstammen van *Acer platanoides* die niet of minder gevoelig zijn voor *Verticillium*. Geselecteerde onderstammen zouden met behulp van weefselweek snel vermeerderd kunnen worden.

Dit rapport is een samenvatting van de resultaten van de proeven die in de jaren 1985 tot 1998 door het Boomteeltpraktijkonderzoek (BPO) op het Centraal Onderzoekslaboratorium voor Weefselweek van Tuinbouwgewassen (COWT) te Lisse zijn uitgevoerd.

Wij hopen dat de informatie in dit rapport zal bijdragen aan de ontwikkeling van een praktisch toepasbare, snelle vermeerderingsmethode met name voor geselecteerde, minder *Verticillium*-gevoelige, onderstammen.

Boskoop, maart 2000
Ir. B.P.A.M. Kunneman

SAMENVATTING

Circa 20% van het areaal boomteelt bestaat uit laanbomen. *Acer* is economisch gezien één van de belangrijkste laanbomen in Nederland. Sommige soorten en cultivar geven bij de vermeerdering problemen met bijv. uitgestelde onverenigbaarheid. Onderzocht is of weefselkweekvermeerdering (op eigen wortel) een oplossing kon bieden. Daarnaast was er behoefte aan een weefselkweekvermeerderingsprotocol ten behoeve van het onderzoek naar *Verticillium* resistente(-re) onderstammen van *Acer platanoides* (CPRO-DLO). Geselecteerde onderstammen zouden m.b.v. weefselkweek snel vermeerderd kunnen worden.

Initiatie

Bij het in weefselkweek brengen waren er twee problemen. Het was moeilijk om materiaal in weefselkweek te krijgen dat vrij was van schimmels en bacteriën. Het materiaal groeide vervolgens niet goed uit, vormde veel callus en stierf af. Het infectieprobleem is opgelost door als uitgangsmateriaal knoppen in winterrust te nemen en deze vóór de gebruikelijke sterilisatie met chloor een warmwaterbehandeling te geven. Hierdoor nam het aantal schone knoppen zeer sterk toe circa van 10 tot 60-80%. Het tweede probleem, van het niet goed door-groeien van de knoppen is verbeterd door een nieuw vermeerderingshormoon te gebruiken, thidiazuron. De knoppen groeiden goed uit en stierven niet meer af. Op deze manier zijn *Acer platanoides* 'Royal Red', 'Cleveland', 'Columnare' en ter controle *Acer lobelii* in weefselkweek verkregen.

Vermeerdering

Acer platanoides bleek niet goed te vermeerderen volgens de methode die eerder voor *Acer lobelii* ontwikkeld was. Het grootste deel van de experimenten om de methode aan te passen is met *Acer platanoides* 'Royal Red' uitgevoerd. *Acer platanoides* 'Columnare' ging pas vermeerderen toen het macromedium hetzelfde samengesteld werd als bij de vermeerdering van walnoot via weefselkweek (DKW-medium). Ook de andere *platanoides* cultivars groeiden hier goed op. Als hormoon werd ook nu thidiazuron gebruikt (0,01 μ M). Explantaten moeten niet te klein gesneden worden omdat dan het gevaar op afsterven groot is. Kool in het medium had in tegenstelling tot bij de vermeerdering van *Acer lobelii* een negatief effect op de vermeerdering van *Acer platanoides*.

Beworteling en afharderen

Acer lobelii bewortelde al op het vermeerderingsmedium en had geen aparte bewortelingsbehandeling nodig. *Acer platanoides* moest wel eerst in weefselkweek beworteld worden. Van de onbewortelde plantjes overleefde namelijk een groot deel (50 - 60%) het afharderen niet. *Acer platanoides* 'Royal Red' bewortelde het best (80 - 100%). De bewortelingsresultaten van *Acer platanoides* 'Cleveland' waren zeer wisselvallig (50 - 100%). *Acer platanoides* 'Columnare' bewortelde maximaal voor 70%.

Beworteling op 14,7 μ M IBA gaf het hoogste percentage beworteling en aantal wortels maar het afharderen verliep beter na beworteling op een lagere concentratie auxine.

Afharderen ging redelijk goed onder een laag tunneltje afgedekt met plastic. Waarbij men wel alert moet blijven op schimmelinfecties (preventief spuiten)

Najaar 1998 is een groeivergelijking gestart van weefselkweekplanten van *Acer platanoides* met planten die zijn geoculeerd of gestekt.

SUMMARY

Acer is one of the most important trees in the Netherlands. Sometimes multiplication causes problems with delayed incompatibility for example. Research has been done to see if tissue culture can solve this problem (growth on own roots). Beside that tissue culture can be useful for a fast multiplication of selected rootstocks which are less sensitive to *Verticillium* (CPRO-DLO research)

Starting problems

It appeared to be difficult to gain clean starting material that also grew out well. A hot water treatment to dormant buds before sterilisation solved half this problem.

Thidiazuron as a cytokinen in the medium solved the other half. Buds grew out well and started to multiply. By this method aseptic cultures were obtained of *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland', *Acer platanoides* 'Columnare' and *Acer lobelii*.

Multiplication

The multiplication method used to propagate *Acer lobelii* by tissue culture didn't work for *Acer platanoides*. *Acer platanoides* started to multiply when the macro medium was changed into Driver and Kuniyuki (DKW). Good results were obtained with thidiazuron as a cytokinin. Active coal had a negative effect on multiplication.

Rooting and weaning

Acer lobelii formed already roots during the multiplication phase and needed no extra rooting treatment. Rooting of *Acer platanoides* showed reasonably well results on 14.7 μ M IBA. 'Royal Red' rooted for 80-100%, 'Cleveland' rooted for 50-100% and 'Columnare' rooted up to 70%. Weaning results appeared to be better after rooting on a lower auxin level. Explants were sensitive for contamination with fungi's during weaning. Rooting and weaning should be improved.

Tissue culture versus cuttings and crafted plants

In the autumn of 1998 an experiment is started to compare growth of tissue culture plants of *Acer platanoides* with growth of cuttings and crafted plants.

1. INLEIDING

Doel weefselkweek onderzoek Acer

Acer is economisch gezien een van de belangrijkste laanbomen in Nederland. Het *Acer*-aandeel van het areaal laanbomen in Nederland is circa 20%. De vermeerdering van sommige soorten en cultivars geeft echter problemen. *Acer* werd vroeger in Opheusden vermeerderd door afleggen. Door een lage vermeerderingsfactor en een lage flexibiliteit zocht men naar een alternatief. Stekken lukte niet en daarom greep men terug naar een bekende methode, het oculeren. In het algemeen gaat dit goed maar sommige cultivars hebben problemen met uitgestelde onverenigbaarheid. Door een slechte vergroeiing met de onderstam valt de ent er na verloop van tijd spontaan af. Onderzocht werd of weefselkweek vermeerdering (dus op eigen wortel) een oplossing kon bieden. Daarnaast was er ten behoeve van onderzoek naar *Verticillium* resistent(ere) onderstammen van *Acer platanoides* ook behoefte aan een goed werkend weefselkweekvermeerderingsprotocol voor de onderstamselecties.

Geschiedenis weefselkweek Acer door het Boomteeltpraktijkonderzoek /COWT

Het weefselkweekonderzoek begon met de destijds, uit het oogpunt van de teler, lastige *Acer lobelii*. De vergroeiing van deze soort met de onderstammen was vaak slecht. Om het risico van genetische veranderingen gedurende de weefselkweekvermeerdering zoveel mogelijk uit te sluiten werd uitgegaan van bestaande structuren: knoppen, toppen of meristemen. De okselknoppen waren voor een groot deel besmet met schimmels en bacteriën. *Acer lobelii* werd vrij snel in cultuur verkregen vanuit knoppen in winterrust (Albers, Drijver, 1989). De vermeerdering in vitro geschiedt niet door de vorming van zijscheuten maar door het opdelen van de lange gestrekte scheut in internodiën met één of twee bladparen.

Pogingen om andere *Acer*-soorten dan *Acer lobelii* in cultuur te brengen mislukten tot 1993. Het materiaal was in de eerste plaats zwaar geïnfecteerd met schimmels en bacteriën. Op de tweede plaats groeiden de schone knoppen in weefselkweek vervolgens niet goed uit, scheidden fenolen uit, vormden callus en stierven vervolgens af.

Het eerste probleem is opgelost door als uitgangsmateriaal knoppen van *Acer* in winterrust te nemen en deze vóór de gebruikelijke sterilisatie een warmwaterbehandeling te geven om ook inwendige bacteriën te doden.

Het tweede probleem, het niet goed doorgroeien van de schone knoppen, is verbeterd door een ander vermeerderingshormoon te gebruiken. Uit literatuur bleek thidiazuron (TDZ), een stof met een cytokinine-achtige werking vaak zeer goede resultaten te geven bij in vitro vermeerdering van *Acer*. De combinatie warmwaterbehandeling en een medium met een lage concentratie TDZ bleek succesvol. Alle behandelingen hadden ten opzichte van de controle een hoger percentage schone knoppen tot gevolg. De schone knoppen liepen op het TDZ medium vervolgens ook goed uit en stierven niet meer af.

Verticillium

Verticillium dahliae geeft problemen bij de teelt van laanbomen (esdoorn, iep en es). Er is geen bestrijding mogelijk. Symptomen treden vaak in de nazomer op afhankelijk van klimaat, grondsoort, afwatering, inoculumdichtheid, plantensoort/cultivar e.d.. Deze wisselvalligheid maakt het moeilijk vat te krijgen op de ziekte. Om de ziekte onder de knie te krijgen, biedt onderzoek naar waardplantresistentie op korte termijn het meeste perspectief. Voor het selectieonderzoek is het noodzakelijk dat er een methode beschikbaar is om de geselecteerde resistente planten snel te vermeerderen. Weefselkweek zou hier een bijdrage aan kunnen leveren.

Op het CPRO-DLO ging in 1993 een project van start (Albers et al 1995) met *Acer platanoides* als toetsgewas, waarbij gestreefd werd om door selectie *Verticillium*-resistentere onderstammen te krijgen. Dit project was gesplitst in twee onderdelen, nl. zaailingselectie en in vitro selectie. Voor het tweede onderdeel was er behoefte aan een goed werkend weefselkweekprotocol (Roest, Kuiper 1996) en omdat het BPO/COWT al ervaring had met in vitro vermeerdering van *Acer* werkte het BPO/COWT en het CPRO-DLO samen. Gaandeweg het project bleek in vitro selectie te hoog gegrepen en is dit onderdeel omgebogen naar in vitro vermeerdering van geselecteerde resistent(-ere) onderstammen van *Acer*.

Optimaliseren vermeerdering

De *platanoides*-cultivars hebben een andere medium behoefte dan *Acer lobelii*, iets wat in weefselkweek vaker voorkomt. De vermeerdering van *Acer lobelii* via weefselkweek was geen probleem. Het onderzoek op het COWT concentreerde zich voornamelijk op het optimaliseren van de vermeerdering van de in weefselkweek verkregen *Acer platanoides* cultivars. De meeste vermeerderingsexperimenten zijn uitgevoerd met *Acer platanoides* 'Royal Red'. Resultaten hieruit zijn ook toegepast op de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Columnare' en *Acer platanoides* 'Cleveland'.

Afronding

Eind 1997 werd met het inzetten van de laatste bewortelingsproeven toegewerkt naar afronding van het project. Bewortelde explantaten werden zo optimaal mogelijk afgehard in Boskoop. De groei van een aantal planten op eigen wortel zal een aantal jaren gevolgd worden en vergeleken met de groei van geoculeerde planten.

Begin 1998 werd op het COWT het project afgerond. Het CPRO-DLO project; dat toen ook werd afgerond, had een aantal geselecteerde resistent(er)e onderstammen opgeleverd.

Het rapport is als volgt ingedeeld:

- korte beschrijving *Acer*
- de initiatie, het verkrijgen van schoon uitgangsmateriaal in de buis
- de vermeerdering van de explantaten
- de beworteling
- het afharden van de bewortelde plantjes.

Mogelijk dat de resultaten in dit verslag bijdragen tot een goede, snelle vermeerdering van deze geselecteerde onderstammen.

2. KORTE BESCHRIJVING ACER

Acer is een groot geslacht van bomen en struiken. Het is opvallend gevarieerd door de verschillen in bloei, wijze van uitlopen, vruchtdracht, schors en herfstkleur. De esdoorns die in Nederland worden gebruikt zijn bladverliezend. Esdoorns hebben tegenoverstaande bladeren en knoppen. Het blad van de gebruikte *Acers* is meestal handlobbig tot handdelig, soms handvormig of veervormig samengesteld. De één- of tweeslachtige bloemen zitten in trossen of tuilen bijeen en zijn bij een aantal soorten zeer opvallend. De gevleugelde tweedelige nootvruchten (propellertjes) zijn kenmerkend. Sommige *Acer*-soorten worden in Nederland niet ouder dan 60 - 150 jaar. De *Acer*-soorten die het Boomteeltpraktijkonderzoek in het onderzoek heeft kunnen onder gunstige omstandigheden 200 - 400 jaar oud worden. Het hout van *Acer platanoides* en *Acer pseudoplatanus* is wit tot geelwit. De Amerikaanse soorten *Acer rubrum* en *Acer saccharinum* en de inheemse *Acer campestre* hebben lichtbruin tot roodbruin getint hout. Er is geen verschil waarneembaar tussen kern- en spinthout. Soms ontstaat er op oudere leeftijd een bruine 'valse kern'. De jaarringen zijn goed zichtbaar. Het hout is verspreidporig en rot matig tot snel.

Traditionele vermeerdering

In Opheusden worden veel cultivars vermeerderd door oculeren. In Boskoop maakt men vaak enten met blad. De afzet van dit product is gericht op de pakkethandel. De producten die uit deze twee verschillende vermeerderingsmethoden ontstaan zijn totaal verschillend. De oculatie groeit veel harder en vormt daardoor veel eerder een boom dan de ent.

Cultuur

Het is aan te bevelen om op grond te telen, waarop een aantal jaren geen *Acers* hebben gestaan. De meeste *Acer*-soorten groeien in de kwekerij op een kalkhoudende rivierklei wat steviger en beter vertakt dan op een zandgrond. *Acer saccharinum* en *Acer negundo* groeien zowel op zand als op klei goed. *Acer rubrum* groeit niet op de meeste rivierkleigronden i.v.m. ijzergebrek dat ontstaat door de hoge pH van dergelijke gronden. *Acers* zijn erg gevoelig voor wateroverlast. Esdoorns verdragen lichte schaduw (*Acer campestre* ook meer schaduw). Bij snoei in de nawinter en het voorjaar is de kans op bloeden zeer groot. Snoeien dient in de voorwinter (vóór januari) of bij voorkeur in de zomermaanden juli, augustus (of september) te geschieden.

Ziekten

Een aantal ziekten en plagen die bij *Acer* voorkomen zijn:

- *Verticillium dahliae*, een verwelkingsziekte waarvan microsclerotia, structuren van circa 0,1 mm grootte, langdurig in de grond kunnen overleven.;
- *Nectria cinnabarina*, vuur of meniezwammetje, komt vaak voor vooral als er veel gesnoeid wordt;
- Meeldauw: witte meelachtige vlekken die later bruin worden.
- Bladsnuitkevers, bladluizen en spint;
- Entschimmel

Zonnebrand komt als gevolg van dunne schors vooral voor op jeugdige leeftijd

Bladverbranding, treedt met name op langs asfaltwegen op hete dagen, vooral bij de bontbladige cultivars.

3. INITIATIE

De initiatiefase is de eerste fase van weefselkweek waarbij plantmateriaal ontsmet en in weefselkweek gebracht wordt en de eerste groei plaatsvindt. Om de kans op afwijkingen zo klein mogelijk te houden werden telkens bestaande structuren, knoppen, jonge scheuttoppen of meristemen ingezet. Boomkwekerijgewassen blijken vaak sterk geïnfecteerd met schimmels en bacteriën. In het begin viel een groot deel van de explantaten uit door infectie. Bij het in weefselkweek brengen van bolgewassen wordt een warmwaterbehandeling toegepast vóór de gebruikelijke sterilisatie om inwendige infecties te elimineren. Er is nagegaan welke temperatuur-tijdsduur (Grondeau, 1994) combinatie enerzijds de infecties vermindert en anderzijds de meristemen in leven laat. Knoppen in winterrust vormden goed uitgangsmateriaal voor een warmwaterbehandeling, het meristeem was voldoende beschermd en behield zijn capaciteit om uit te lopen. Door knoppen van *Acer* in winterrust voor sterilisatie eerst een warmwaterbehandeling te geven werd de kans op schoon uitgangsmateriaal sterk vergroot.

Type uitgangsmateriaal

Om schone explantaten in cultuur te krijgen is in de eerste jaren van het project onderzocht welk plantmateriaal het best als uitgangsmateriaal gebruikt kon worden. Onderzocht zijn knoppen in winterrust, knoppen die op punt van uitlopen stonden, jonge scheuttopjes en knoppen van moederplanten die in de kas voorbehandeld waren met cytokininebespuitingen. Over het beste uitgangsmateriaal kon echter geen uitspraak gedaan worden omdat destijds zeer veel explantaten geïnfecteerd waren en de schone explantaten vaak niet goed uitliepen en doorgroeiden. Alleen *Acer lobellii* kon, uitgaande van knoppen in winterrust en éénmaal door middel van uitgelopen knoppen, in cultuur verkregen worden.

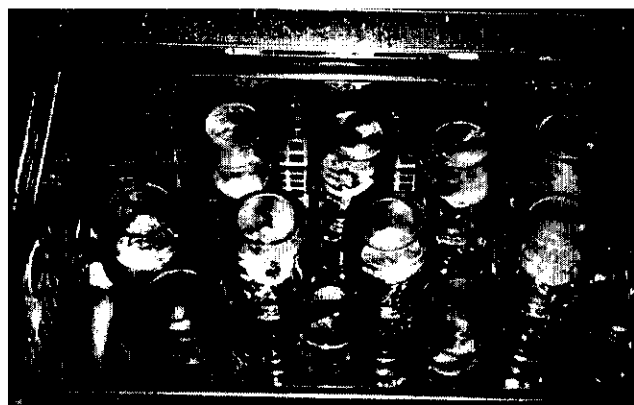


Fig.1 Knoppen van *Acer* in winterrust krijgen een warmwaterbehandeling in een waterbad

Ontsmetting

De sterilisatie werd aangepast aan het plantmateriaal. Een knop kan een zwaardere ontsmetting doorstaan dan een scheuttopje. Bij knoppen werd in het begin van het project vaak een dubbele sterilisatie toegepast. De knop werd eerst ontsmet gedurende 30 min. 1,5% NaOCl-oplossing + 3 x spoelen met steriel water. Vervolgens werden de knoppen groten-deels uit geprepareerd (op de laatste paar schubben na) en werd er nogmaals een ontsmetting gedurende 10 min. in 2,5% CaOCl-oplossing + 3 x spoelen met steriel water uitgevoerd. Hierna werd de knop verder uit geprepareerd en op de (schuin gestolde) voedingsbodem geplaatst. Scheuttopjes werden eenmaal ontsmet in 1% NaOCl-oplossing + 3 x spoelen met steriel demi.

Warmwaterbehandeling

Een nieuwe behandelingsmethode bleek vanaf 1993 zeer succesvol om schone explantaten in weefselkweek te verkrijgen van *Acer lobelii*, *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Royal Red'.

Bij de NAKB werden takken besteld met knoppen in winterrust (geoogst in januari). De takken werden in plastic bewaard bij 2°C. Materiaal op deze wijze bewaard kon zelfs na acht maanden nog in cultuur gebracht worden, (wel regelmatig op schimmel controleren en beschimmelde knoppen verwijderen). Als start van de behandeling werden de takken in stukjes geknipt met twee knoppen. Deze werden verdeeld over een aantal erlenmeyers van 200 ml. Aan de knoppen werd 50 ml steriel demiwater toegevoegd en de erlenmeyer werd afgesloten met aluminiumfolie. Vervolgens werden de erlenmeyers in een waterbad geplaatst (Fig.1) met iets zwaars erop om het wegdrijven tegen te gaan. Na 15 min. had het water in de erlenmeyers dezelfde temperatuur als het waterbad en ging de warmwaterbehandeling (WWB) van start. Het effect van diverse temperaturen (35 tot 50°C) en tijdsduren (0 tot 5 uur) op het infectiepercentage en de groei werd onderzocht (Fig 2 en 3).

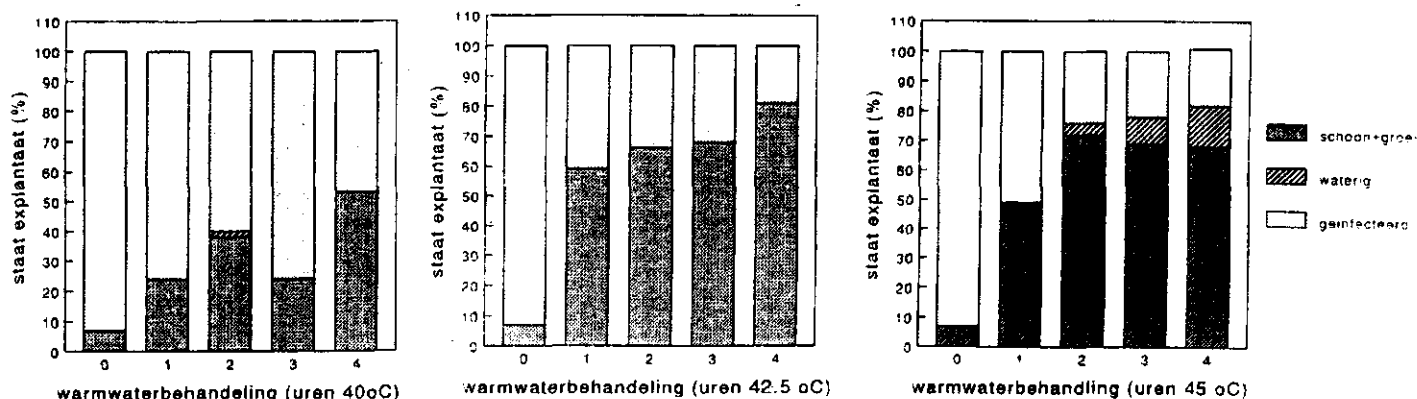


Fig. 2. Het effect van een warmwaterbehandeling van knoppen van *Acer lobelii* in winterrust (januari geoogst) op het infectiepercentage bij de initiatie.

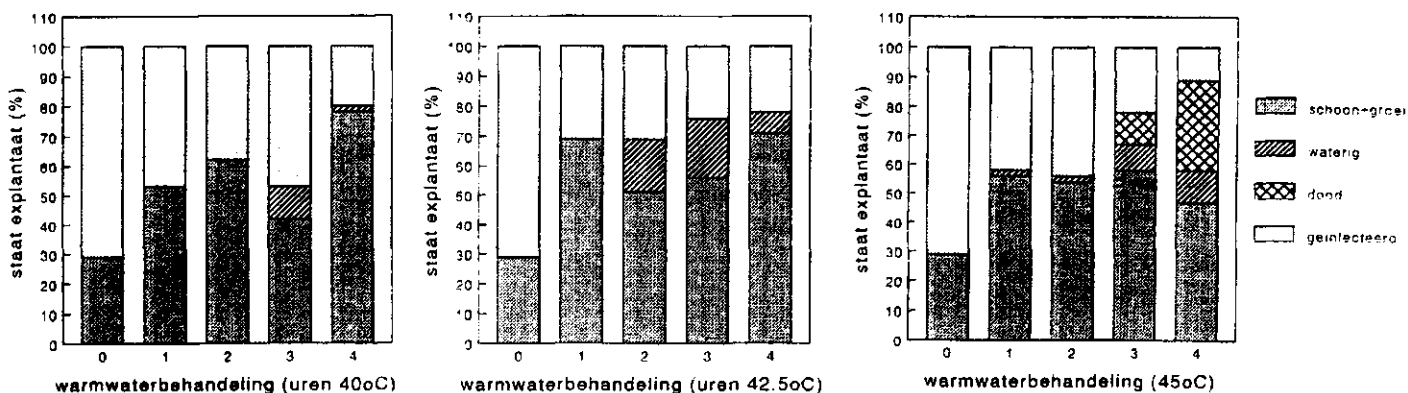


Fig. 3 Het effect van een warmwaterbehandeling van knoppen van *Acer lobelii* aan het einde van winterrust (maart geoogst) op het infectiepercentage bij de initiatie.

Gemiddeld genomen was twee uur 42,5°C de beste behandeling. Temperatuur en tijdsduur moeten evt. aangepast worden aan het formaat van de knoppen. Dit is ook het geval als de knoppen niet meer volledig in rust zijn. Dan moeten temperatuur en/of tijdsduur verlaagd worden. Aan het einde van de WWB werd het water uit de erlenmeyer afgegoten en werden de knoppen gedurende één minuut met 70% ethanol gespoeld. Vervolgens werden de knoppen gedurende 2x 10 min. in een 2% NaOCl-oplossing ontsmet en 3 x gespoeld met steriel demiwater. De knoppen waren nu klaar om uit geprepareerd te worden. Indien het meristeem niet geheel 'kaal' werd uit geprepareerd, maar één á twee schubparen bleven zitten, groeide het meristeem in het algemeen beter uit. De controle op infectie werd steeds verder uitgebreid. Na eerst alleen visuele waarneming in de buis met het explantaat werd later ook op infectie getoetst. Stukjes, van het explantaat afgesneden, plantenweefsel werden op vast bacteriemedium en vloeibaar medium op de 'oude cultuurbuis' gebracht. De meeste infecties werden aangetoond op het vaste bacteriemedium (Fig.4).

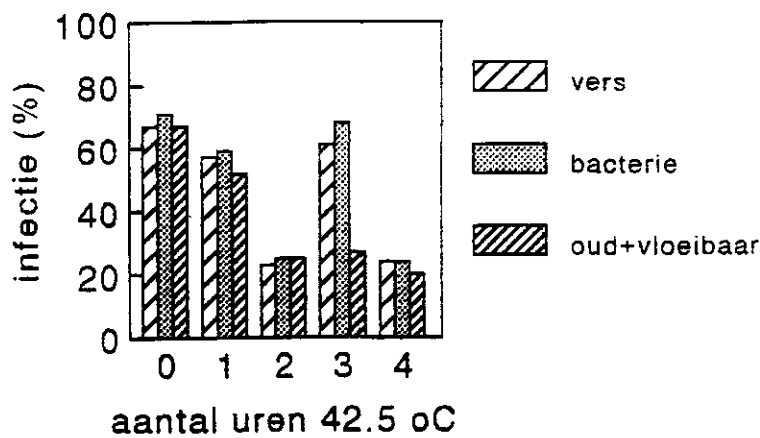


Fig. 4 Het effect van een warmwaterbehandeling van knoppen van *Acer platanoides* 'Cleveland' in winterrust (januari geoogst) op het infectiepercentage bij de initiatie.

Na de laatste initiatieproef waarbij 'Cleveland' in cultuur gebracht werd m.b.v. een WWB zijn de schone explantaten één jaar doorvermeerderd. Deze partij is nogmaals getoetst op infecties. Naast rechtstreeks plantmateriaal op een vast bacteriemedium te brengen werd ook afgesneden plantenweefsel overgebracht in een vloeibaar bacteriemedium, zodat eventuele bacteriën zich konden ophopen. Dit vloeibaar medium is vervolgens overgebracht op een vast bacteriemedium. Alle explantaten bleken schoon te zijn. (methode van SBW, Roelofarendsveen)

Indien de knoppen niet meer mooi gesloten zijn, maar al iets zijn gaan schuiven, kan er voor gekozen worden om de knoppen geen WWB meer te geven, maar de takken op water bij kamertemperatuur te plaatsen. Na een week kunnen de jonge scheutjes geoogst worden en na een mildere ontsmetting van 10 tot 20 min. 1,5 % NaOCl-oplossing en 3 x spoelen + evt. bijsnijden op de voedingsbodem geplaatst worden. Van *Acer platanoides* 'Erectum' was na drie weken 27% van de 117 knoppen niet geïnfecteerd. Omdat het medium nog niet goed was, is deze cultivar uiteindelijk niet goed gaan vermeerderen en stierven alle explantaten af.

Initiatiedia

Als uitgangspunt werd het medium genomen dat in East Malling goede resultaten bij de weefselweekvermeerdering van *Acer* gaf. In dit medium was ten opzichte van het MS-medium de concentratie $MgSO_4$ gehalveerd en was de concentratie KH_2PO_4 en NaFeEDTA verdubbeld. Verder bevatte dit medium 4,4 μM BA en 200 mg/l kool. Op dit medium groeide

alleen *Acer lobelii* na een aantal keer overzetten op vers medium door. Om ook andere *Ace*-soorten aan de groei te krijgen is het effect onderzocht van:

- "East-Malling medium" en MS medium als basis
- cytokininen: BA (0 - 4,4 μ M), 2IP (1,1 - 4,4 μ M), TDZ (0,01 - 0,1 - 4,5 μ M)
- wél en géén kool onderzocht.

De groei op het MS-basismedium ging goed. Alleen op 0,01 μ M TDZ (Chin-Yi Lu, 1993/ Huetteman, Preece, 1993/ Kerns, Meyer 1986) groeide de andere *Acer* soorten goed uit. Kool in het medium werkte negatief. Indien fenolvorming werd waargenomen moesten de knoppen zo spoedig mogelijk op vers medium geplaatst worden om volledig afsterven te voorkomen.

In later vermeerderingsonderzoek kwam DKW-basismedium als goed geschikt naar voren. Waarschijnlijk kan dit ook als basismedium bij de initiatie gebruikt worden.

Conclusies

Takken in winterrust oogsten in plastic bewaren bij maximaal 2°C. Regelmatig controleren op schimmel. Beschimmelde knoppen verwijderen.

Takken in stukjes knippen met twee knoppen. Knoppen een WWB geven bijv. twee uur 42,5°C (temperatuur en tijdsduur evt. aanpassen aan knopgrootte). Aansluitend 1 min. spoelen met 70% ethanol, 2x10 min. met 2% NaOCl-oplossing, en 3 x 10 min. met steriel demi-water. Knoppen uitprepareren tot de laatste één á twee schubparen. Knop op voedingsbodem plaatsen MS (of DKW), 30 g/l sacharose, EEG vitaminen, 0,01 μ M TDZ, 8g/l Daichin agar en pH = 5,7. Opkweek bij 25°C, 16 uur 30 μ M m-2 s-1 (Philips TL 33W).

In geval er fenolvorming optreedt zo spoedig mogelijk overzetten op vers medium.

Infecties kunnen op diverse wijzen goed aangetoond worden. 'Kleinere knoppen' en knoppen die niet meer volledig in winterrust zijn reageren gevoeliger op de WWB. Geadviseerd wordt om de temperatuur van de WWB te verlagen en/of de tijdsduur ervan te verkorten voor een zo optimaal mogelijk resultaat.

Op deze wijze zijn de volgende *Acers* in cultuur verkregen voor verder onderzoek:

- *Acer platanoides* 'Royal Red'
- *Acer platanoides* 'Columnare'
- *Acer platanoides* 'Cleveland'
- *Acer lobelii*

4. VERMEERDERING

In een reeks experimenten is onderzocht welke factoren een positief effect hebben op de vermeerdering van *Acer* in weefselkweek. Tot 1993 zijn de meeste experimenten uitgevoerd met *Acer lobelii*. Vanaf 1993 zijn de proeven voornamelijk met *Acer platanoides* 'Royal Red' uitgevoerd. Alleen de factoren die positief werkten op de vermeerdering van deze *Acers* zijn eventueel later ook getoetst op de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Columnare' en *Acer platanoides* 'Cleveland'.

Acer lobelii in weefselkweek reageerde vaak anders dan de *Acer platanoides* cultivars. *Acer lobelii* strekte op het vermeerderingsmedium met 200 mg/l kool tot een lange scheut die tevens al wortels vormde. Toppen strekten meer dan midden of basisexplantaten (Fig.5).

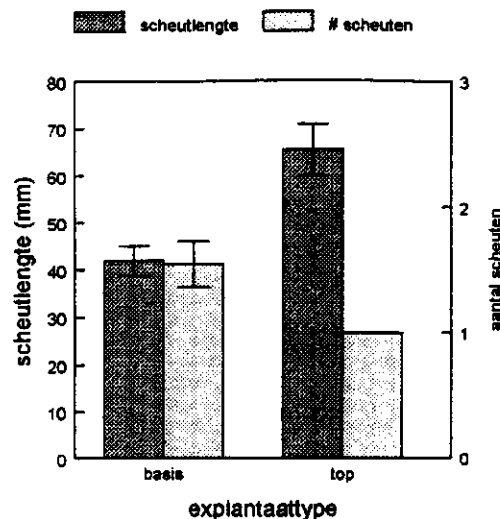


Fig.5. Het effect van het explantaatype op de scheutlengte en het aantal scheuten bij de vermeerdering van *Acer lobelii*.

Vermeerdering vond plaats door de scheut op te delen in internodiën met één á twee bladparen. De *Acer platanoides* cultivars vormden meestal een clustertje van kleine scheutjes waarvan één scheut iets groter werd dan de rest (Fig.6.).



Fig.6. Op vermeerderingsmedium vormde *Acer platanoides* meestal een cluster met scheutjes waarbij vaak één scheut groter werd dan de rest. Vermeerdering vond plaats door het opsnijden van de cluster in kleinere groepjes met scheutjes. Gestrekte scheuten werden opgedeeld in internodiën met 1 á 2 bladparen.

Vermeerdering vond plaats door het opsnijden van de cluster in kleinere groepjes met scheutjes. De grote scheut werd zo mogelijk opgesneden in internodiën met één á twee bladparen.

Iets dat voor alle *Acers* in weefselweek geldt is dat de explantaten niet te klein gesneden moeten worden (< 7 mm) omdat het explantaat dan vaak niet meer groeit.

Basismedium

Vaak wordt bij weefselweek als basis het MS medium gebruikt. Een andere concentratie van de macro-zouten leidt bij sommige gewassen tot zeer grote groeiverschillen (Preece 1995). Daarom werd het effect onderzocht van negen verschillende bij houtige gewassen gebruikte macrozout samenstellingen, gecombineerd met twee verschillende hormonen (2,2 μM BA of 0,01 μM TDZ) op de groei van *Acer platanoides* 'Royal Red' (Leeuwen v., 1996).

Getoetst werd: Driver & Kuniyuki (DKW), Woody Plant Medium (WPM), MS 1/1, MS 1/2, Anderson, Lepoivre, Nitsch. Gamborg B5 en N6 in combinatie met 2,2 μM BA of 0,01 μM TDZ. De pH werd bij alle proeven vóór het toevoegen van de agar gesteld op 5,7.

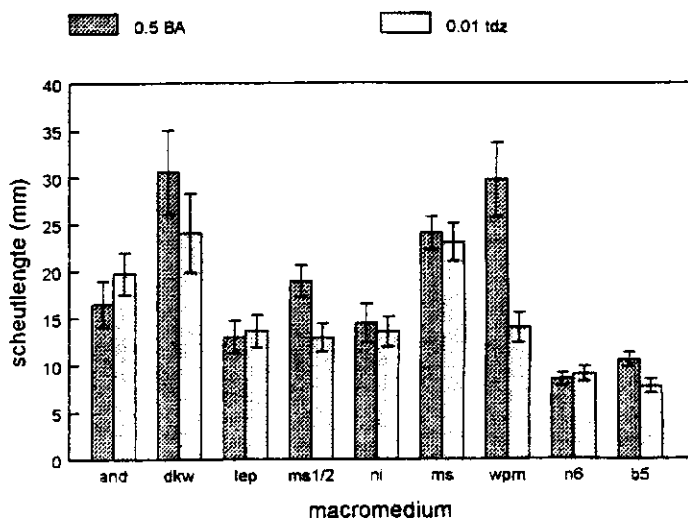


Fig.7. Het effect van verschillende macromedia (Anderson (and), Driver and Kuniyuki (dkw), Lepoivre (lep), Murashige and Skoog 1/2 (ms 1/2), Nitsch (ni), Murashige and Skoog (ms), Woody Plant Medium (wpm), N6, Gamborg B5 (b5) in combinatie met 2,2 μM BA of 0,01 μM TDZ op de scheutlengte *Acer platanoides* 'Royal Red'.

De opkweek vond telkens plaats bij 25°C, 16 uur 30 μM m⁻² s⁻¹ (Philips TL 33W).

Het DKW, WPM en MS medium gaven gemiddeld gezien de beste groei (Fig.7) en de mooiste explantaten. Op MS 1/2, Anderson, Lepoivre en Nitsch was de groei gemiddeld matig. Gamborg B5 en N6 gaven gemiddeld een slechte groei. Op media met TDZ ontstonden meer kleine scheutjes dan op media met BA. Losgesneden zijn deze scheutjes te klein voor vermeerdering maar als clustertje zijn ze goed bruikbaar voor verdere vermeerdering (Fig.8.) Bij *lobelii* is enkel de groei op MS medium vergeleken met de groei op East Malling medium waarbij de hoeveelheid MgSO₄ gehalveerd en KH₂PO₄ en NaFeEDTA verdubbeld is. Op het East Malling medium zou de kleur van de explantaten mooier groen moeten zijn. Dit kon echter niet aangetoond worden waarna vermeerdering verder op MS-basis medium plaatsvond.

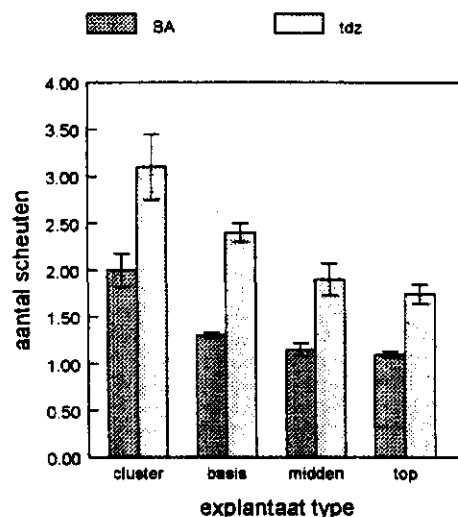


Fig.8. Het effect van het explantaatype op het aantal scheuten bij de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red'. Het vermeerderingsmedium bevatte 0,01 µM TDZ of 2,2 µM BA.

Hormonen

Cytokinen

Voor de vermeerdering in weefselkweek wordt in het algemeen cytokinine aan het medium toegevoegd. Cytokinen zijn plantenhormonen die onder andere de uitloop van okselknoppen stimuleren. De meest effectieve cytokinine en de optimale concentratie wisselen van gewas tot gewas en soms zelfs van cultivar tot cultivar.

Onderzocht is het effect van BA (2,2 en 6,6 µM), TDZ (0,001 en 0,1 µM), 2IP (5 en 50 µM), kinetine (0,92 µM) en zeatine (1 en 10 µM) in combinatie met DKW, WPM of MS basismedium. TDZ in een hogere dan wel lagere concentratie dan de standaard 0,01 µM gaf slechtere groei. 6,6 µM BA gaf vooral in combinatie met DKW goede resultaten. 10 µM zeatine leidde bij zowel MS als DKW tot goede groei. 2IP had in beide concentraties slechte resultaten.

Gibberellinen

Gibberellinen zijn hormonen die onder andere de strekking beïnvloeden. Bij de vermeerdering van 'Royal Red' ontstaan vaak kleine scheutjes. Onderzocht is of toevoeging van GA3 een positief effect had op de lengtegroei van deze kleine scheutjes. Aan het basismedium met 2,2 µM BA of 0,01 µM TDZ werd 0, 0,28, 2,8 of 28,8 µM GA3 toegevoegd.

De hoogste twee concentraties gaven binnen één week al strekking. Deze snel gestrekte scheuten stierven echter later af door topnecrose. Op het BA-basis medium is er een licht stijgende lijn van de scheutlengte bij toenemende concentratie GA3. Op het TDZ-basis medium waren er geen significante verschillen. GA3 leek bij beide basismedia een klein positief effect te hebben op het aantal scheutjes en de vermeerderingsfactor.

4 PU

Bij de vermeerdering van roos werden goede resultaten met 4 PU gekregen, een stof met een sterk cytokinine-achtige werking. Het effect van 4 PU is in vier concentraties (0,044 - 8,8 µM) op de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red' onderzocht. In de concentraties 0,44 µM tot 8,8 µM leidde 4 PU tot meer callus dan de controle op 0,01 µM TDZ. Gemiddeld was er weinig scheutstrekking. De groei op 0,044 µM 4 PU was iets slechter dan op 0,01 µM TDZ.

Suiker

In weefselkweek wordt voor een goede groei een koolstofbron aan het medium toegevoegd. De fotosynthese van het explantaat is vaak onvoldoende of vindt soms geheel niet plaats. Meestal wordt als koolstofbron sacharose gebruikt.

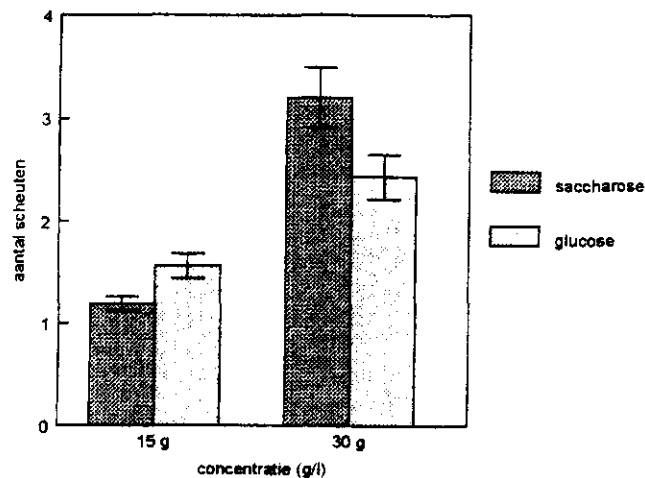


Fig.9. Het effect van het suiker-type (saccharose of glucose) en -concentratie op de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red'

Onderzocht is het effect van sacharose in verschillende concentraties en het effect van andere suikers in verschillende concentraties.

In het eerste experiment werd sacharose tot de concentratie van 30 g/l getoetst. Hierbij werd een positief effect op de groei waargenomen bij de hoogste concentratie sacharose (Fig.9). Omdat 30 g/l mogelijk niet de optimale concentratie was werden in een vervollexperiment concentraties tot 60 g/l onderzocht. Door onbekende redenen fluctueerden de resultaten sterk waardoor een uitspraak over de optimale concentratie niet mogelijk was. Bij een experiment, waarbij het effect van andere koolstofbronnen (glucose (15, 30 g/l), fructose (15, 30)) onderzocht werd in verschillende combinaties, kon door een onverklaarbare slechte groei en het optreden van veel vitrificatie ook geen uitspraak gedaan worden.

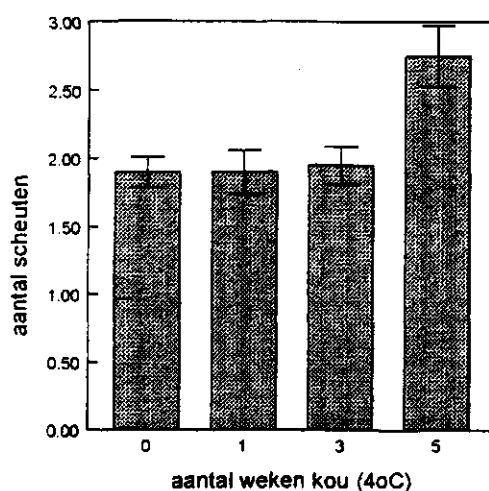


Fig.10. Het effect van een koudebehandeling (aantal weken 4°C) op het aantal scheuten bij de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red'.

Temperatuur

Oriënterend is het effect van een koudebehandeling (4°C) van 0, 1, 3 of 5 weken op de vermeerdering van 'Royal Red' onderzocht. Gevonden werd een positief effect van 5 weken koude op de strekking, de vermeerderingsfactor en het aantal korte scheutjes (Fig.10) dat werd gevormd. Het effect van een koudebehandeling zou nader onderzocht moeten worden. Als opkweektemperatuur was zowel 20°C als 25°C geschikt.

Lichtintensiteit

De explantaten die in de kweekkamer aan de kant stonden waar ze veel licht van de 'buurkar' ontvingen zagen er anders uit dan de explantaten die aan de 'donkere' kant stonden. Daarom is het effect onderzocht van 0 tot 3 TL (16 uur) op de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red' bij 20°C en bij 25°C gedurende twee cycli. Het meest duidelijke effect dat de lichtintensiteit had was het effect op de bladkleur bij 'Royal Red' (Fig. 11).



De hoogste lichtintensiteit resulteerde in een dieprode bladkleur iets dat op het veld ook voorkomt. Bij enkel strooilicht bleef het blad mooi frisgroen.

Fig.11. Het effect van de lichtintensiteit (0 - 3 TL) op de bladkleur bij de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red'.

Over het effect van de lichtintensiteit op de vermeerderingsfactor kan geen uitspraak gedaan worden. Het effect was of geheel afwezig of de resultaten in de eerste cyclus waren tegengesteld aan de resultaten in de herhaling.

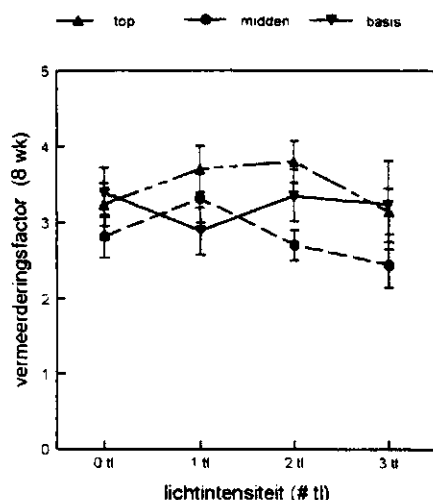


Fig.12. Het effect van de lichtintensiteit (0 - 3 TL) en het explantaatype (top, midden, basis) op de vermeerderingsfactor van *Acer lobelii*

Bij *Acer lobelii* is het effect van de lichtintensiteit in combinatie met het explantaatype (basis, midden of top) op de vermeerdering onderzocht. Het effect van de lichtintensiteit op de vermeerderingsfactor was gering (Fig. 12). Opkweek van de explantaten werd in latere experimenten bij 2 (of 1) TL uitgevoerd. Top-explantaten van *Acer lobelii* vermeerderden het beste.

Kool

Kool absorbeert stoffen uit het medium. Bij de vermeerdering van *Acer lobelii* op een medium met 200 mg/l kool voorkomt kool de vorming van callus en vormen de explantaten al tijdens de vermeerderingsfase wortels. Om te onderzoeken of toevoeging van cytokinine aan een medium met kool nog zinvol is, werd de groei vergeleken van *Acer lobelii* op twee media met kool waaraan wel of niet 4,4 μM BA toegevoegd was. Ter controle werd ook de groei onderzocht op een hormoonloos medium en op een medium met 4,4 μM BA zonder kool. Toevoeging van BA aan het koolmedium bleek weinig effect te hebben op de scheutlengte, het bewortelingspercentage en het aantal wortels. Enkel het percentage explantaten dat meer dan één scheut vormde was op het kool/BA medium bijna 10% hoger dan op het kool medium zonder BA. De scheutlengte en het percentage explantaten met meer dan een scheut was het laagst op het hormoonloze medium. Het bewortelingspercentage en het aantal wortels was het laagst op het medium met BA zonder kool. De callusvorming was op de media met kool het laagst.

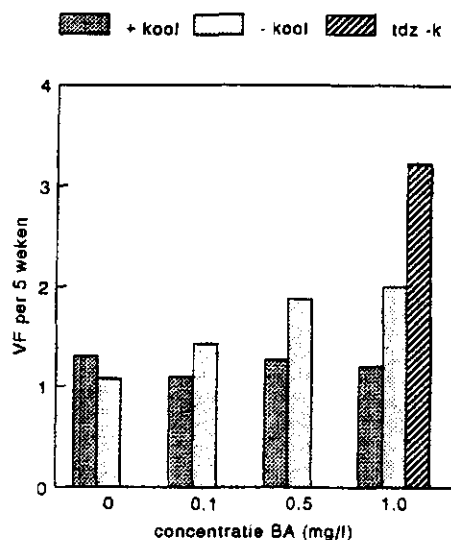


Fig. 13. Het effect van de BA concentratie (0 - 4,4 μM) mét of zonder toevoeging van 200 mg/l kool op de vermeerdering van *Acer platanooides* 'Royal Red'. De vermeerderingsfactor op MS 0,01 μM TDZ is ter vergelijking ook in de figuur uitgezet.

Omdat 'Royal Red' op het medium met 0,01 μM TDZ ook redelijk veel callus vormt is het effect van kool (50 - 200 mg/l) op de vermeerdering van 'Royal Red' op media met diverse concentraties BA of op het medium met 0,01 μM TDZ onderzocht.

Kool had in alle concentraties hetzelfde effect, de callus nam beduidend af van gemiddeld 1,0 - 1,5 cm doorsnede tot 0 - 5 mm doorsnede maar de scheutstrekking en de vorming van nieuwe scheutjes werd ook negatief beïnvloed waardoor de vermeerdering sterk afnam. De vermeerderingsfactor was het hoogst op het controlemedium MS 0,01 μM TDZ zonder kool (Fig. 13).

PCIB

Callusvorming kan veroorzaakt worden door een hoog endogeen gehalte aan auxinen. PCIB is een remmer van de auxinewerking en zou eventuele callusvorming kunnen verminderen. Onderzocht is het effect van drie concentraties PCIB (0 - 10 μM) op de vermeerdering en de callushoeveelheid.

PCIB had in géén van deze concentraties effect op de callusvorming en vermeerdering.

Tweefasen medium

Bij *Malus* en *Rosa* werkt een zogenaamd tweefasen medium waarbij een vloeibaar medium op een vast medium toegevoegd wordt, positief op de scheutstrekking en/of de uitloop van scheuten. Onderzocht is of toevoeging van vloeibaar medium dit effect ook bij de weefselkweekvermeerdering van *Acer* had en wat het effect op de callusvorming (ingedeeld in vier klassen) was.

Op buizen met een vaste voedingsbodem (hormoonloos, 2,2 μM BA of 0,01 μM TDZ) werd na twee weken géén of twee ml vloeibaar medium toegediend met 2,2 μM BA of 0,01 μM TDZ.

Een hormoonloos vast medium zonder toediening van vloeibaar medium gaf gemiddeld de minste callusvorming en minste aantal scheuten. Toevoeging van een vloeibaar medium met BA of TDZ leidde tot callustoename. Vloeibaar medium met TDZ had tevens toename van de scheutlengte tot gevolg. Op een vast medium met BA en TDZ vormden vrijwel alle explantaten een hoeveelheid callus van gemiddeld meer dan 1 cm doorsnede. Een vast TDZ medium gaf gemiddeld de meeste scheuten. Na toevoeging van een vloeibaar medium met TDZ nam dit aantal nog iets toe. Deze, niet significante, toename was te gering om verder standaard tot toediening van vloeibaar medium over te gaan. Op het vaste TDZ medium was er sprake van een positieve correlatie van de callushoeveelheid met zowel de scheutlengte als het aantal scheuten (Fig. 14).

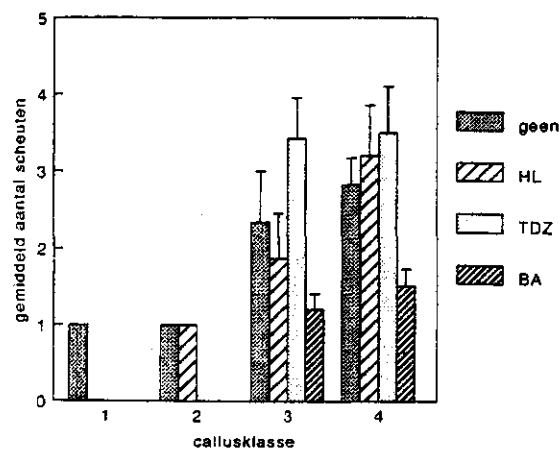


Fig.14. Op een tweefasen medium (vast TDZ + divers vloeibaar medium) was er een positieve correlatie van de callushoeveelheid (klasse 1-4) en het aantal scheuten dat bij de vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red' gevormd werd.

Op het vaste BA medium was er een positieve correlatie tussen callushoeveelheid en scheutlengte. Blijkbaar gaat callusvorming niet altijd ten koste van de vermeerdering en heeft het zelfs in dit geval een positief effect op de vermeerdering.

Ook is het effect van toediening van een vloeibaar cytokinine één week na inzetten op een vast auxine-bewortelingsmedium onderzocht. De opzet was om bij een explantaat wortels te induceren waardoor het beter in staat is voedingsstoffen op te nemen uit het medium en vervolgens door toediening van een vloeibaar cytokininemedium meerdere scheuten uit te laten lopen. Een beworteld explantaat strekt in het algemeen ook meer in vergelijking met onbewortelde explantaten. Aan het bewortelingsmedium werd niets, demiwater, hormoonloos medium of een BA of TDZ vloeibaar medium toegevoegd.

Na toediening van een vloeibaar cytokininemedium op een bewortelingsmedium één week na het enten bleef wortelvorming achterwege. Explantaten op medium zonder vloeibaar medium of explantaten waarbij demi of hormoonloos medium toegediend werd vormden over

het algemeen een goed wortelstelsel. De bewortelde explantaten strekten inderdaad meer dan de onbewortelde explantaten.

Een tweefasen systeem gaf ten opzichte van vermeerdering op enkel vast medium meer kans op vitrificatie en afstervende explantaten en verbeterde groei en beworteling niet.

MELA

MELA (Methyl Ester of Lauric Acid) is een stof die bij roos de hoofdtop laat afsterven waardoor de uitloop van zijscheuten bevorderd wordt. Onderzocht is het effect van diverse concentraties MELA (0 - 200 mg/l) op de vermeerdering van 'Royal Red' en *Acer lobellii*. Het basismedium van 'Royal Red' bevatte 0,01 μ M TDZ of 2,2 μ M BA.

Het aantal scheuten en de vermeerderingsfactor was op de TDZ media significant hoger dan op BA media. MELA had geen significant effect op het aantal scheuten en de scheutlengte met als uitzondering bij 200 mg/l MELA op het BA basismedium; de scheuten werden hier iets langer op. De vermeerdering werd door MELA in combinatie met het TDZ medium licht verhoogd (Fig.15 a en b).

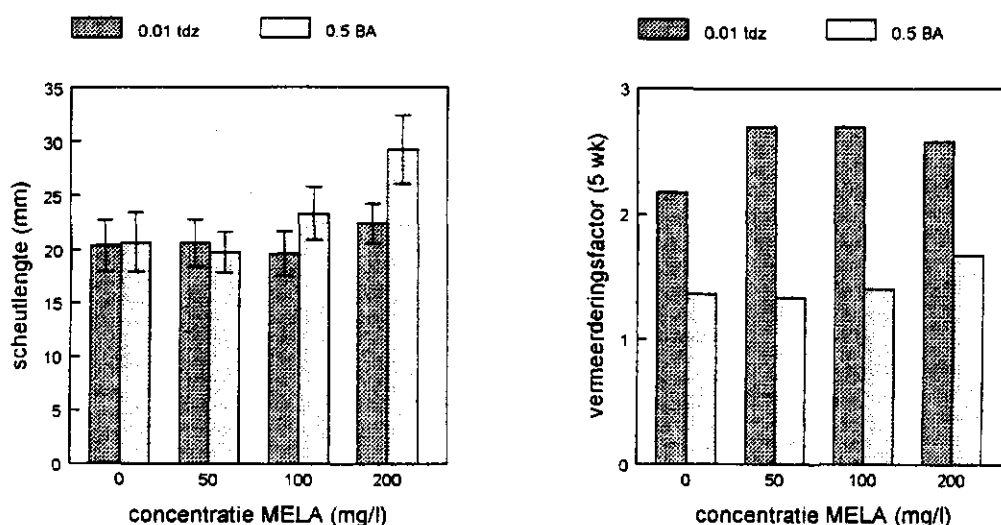


Fig.15. Het effect van Methyl Ester of Lauric Acid (MELA 0 - 200 mg/l) in combinatie met 2,2 μ M BA of 0,01 μ M TDZ op de scheutlengte (a) en de vermeerderingsfactor van *Acer platano-ides* 'Royal Red' (b).

Bij de herhaling werd het effect op de scheutlengte nogmaals waargenomen maar toen werd bij de behandeling met 100 mg/l MELA een zeer groot deel van de scheuten (67%) en bij 200 mg/l MELA een groot deel (34%) waterig.

Het basismedium van *lobellii* bevatte 4,4 μ M BA mét of zonder 200 mg/l kool.

Het aantal scheuten en de callushoeveelheid was op de media met kool lager dan op de media zonder kool. Het aantal scheuten was op het medium zonder kool + 50 mg/l MELA significant hoger, maar dit kwam niet tot uitdrukking in de vermeerderingsfactor. MELA had bij *lobellii* geen significant effect op de scheutlengte. Het standaard medium met kool zonder MELA had de hoogste vermeerderingsfactor.

Het hoge percentage waterige scheuten bij 'Royal Red' en het geringe effect van MELA op de vermeerdering van *lobellii* hebben tot het besluit geleid om MELA niet aan het standaard vermeerderingsmedium toe te voegen.

Agar soort en concentratie

Boomkwekerijgewassen kunnen zeer gevoelig reageren op de gebruikte soort agar. Vanwege problemen met de zuiverheid van de tot dan toe gebruikte agar moest overgegaan wor-

den op een ander agar. Hiervoor is het effect van vier verschillende agars (Lab associates, Oxoid nr 3, Daichin en BBL granulated) in drie concentraties (6, 7 of 8 g/l) uitgetest op de vermeerdering van *Acer lobellii* (Fig. 16).

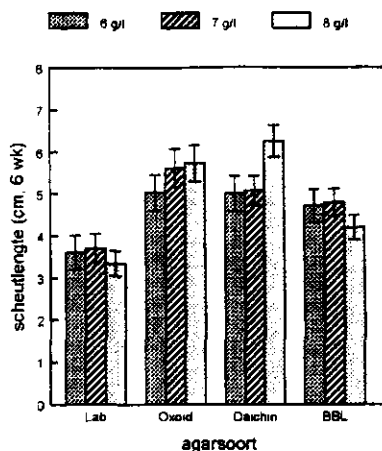


Fig.16. Het effect van de agarsoort (Lab associates, Oxoid nr.3, Daichin of BBL granulated, 6,7 of 8 g/l) op de vermeerdering van *Acer lobellii*.

De agar die gemiddeld de beste vermeerdering gaf was Daichin in de concentratie van 8 g/l. Eénmalig is ook nog een hogere concentratie geprobeerd maar dat gaf geen verbetering meer ten opzichte van 8 g/l. Bij verdere vermeerdering van *Acer* is verder 8 g/l Daichin gebruikt. Oxoid nr 3 kwam als een goede tweede naar voren.

Conclusies

De vermeerdering van *Acer platanoides* 'Royal Red' (vermeerderingsfactor 2,3 - 3,3), *Acer platanoides* 'Columnare' (vermeerderingsfactor 1,4 - 2,2) en *Acer platanoides* 'Cleveland' (vermeerderingsfactor 1,5 - 2,2) was redelijk tot goed op een DKW basismedium (Royal Red evt. ook op MS), 30 g/l sacharose, EEG vitaminen, 0,01 μ M TDZ, 8 g/l Daichin, pH= 5,7. Opkweek bij 25°C, 16 uur 30 μ M m-2 s-1 (Philips TL 33W). Indien een iets langzamer groei gewenst is dan kan ook bij 20°C gekweekt worden.

Vermeerdering vond plaats door het opsnijden van de cluster scheutjes in kleine clustertjes met scheutjes en het opdelen van evt. gestrekte scheuten in internodiën met één á twee bladparen. Er werd een cyclisduur aangehouden van vijf á zes weken.

De explantaten konden beter niet te klein gesneden worden (<7 mm) omdat de groei dan zeer moeizaam ging en het scheutje vaak afstierf.

Een aantal factoren die een licht positief effect hadden en nader onderzocht zouden kunnen worden zijn:

- GA3, een hormoon dat filtersteriel toegediend werd waarbij bepaald moet worden of het positieve effect op de vermeerdering opweegt tegen de extra arbeid die dit meebrengt,
- Zeatine, in meerdere concentraties,
- BA in een hogere concentratie dan 4,4 μ M,
- Een koudebehandeling van meer dan vijf weken bij 4°C.

De vermeerdering van *Acer lobellii* ging goed (vermeerderingsfactor 4 - 6) op een MS basismedium, 30 g/l sacharose, EEG vitaminen, 4,4 μ M BA of 0,01 μ M TDZ, 0,2 g/l kool, 8 g/l Daichin, pH=5,7. Opkweek bij 20 of 25°C, 16 uur 30 μ M m-2 s-1 (Philips TL 33W). Vermeerdering vond plaats door het opdelen van de scheut in internodiën met één á twee bladparen. Er werd een cyclisduur van circa zeven weken aangehouden.

Ook bij *lobellii* gold dat de explantaten niet te klein gesneden moeten worden.

5. BEWORTELING

Omdat *Acer lobelii* al op het vermeerderingsmedium bewortelt is er met *lobelii* geen bewortelingsonderzoek uitgevoerd. De volgende resultaten zijn afkomstig van proeven met de *Acer platanoides* cultivars. Omdat tijd en materiaal beperkt waren zijn de proeven éénmalig en op kleine schaal (10 - 15 explantaten) uitgevoerd. Na plaatsing op het bewortelingsmedium werden de explantaten voor circa één week in het donker geplaatst bij 20°C waarbij de wortels geïnduceerd werden. Na deze periode werden de explantaten in het licht geplaatst waarbij de wortels konden uitgroeien. Per behandeling werd na vier weken het bewortelingspercentage en het aantal wortels bepaald.

IBA - concentratie

Om wortelvorming te stimuleren wordt aan het basismedium auxine toegevoegd. De optimale concentratie verschilt per gewas en vaak zelfs per cultivar. Onderzocht werd het effect van het auxine IBA (0 - 14,7 μ M).

Acer platanoides 'Columnare' bewortelde het slechtst. Bewortelingspercentages lagen tussen de 15 en de 33. Deze percentages schommelde bij *Acer platanoides* 'Cleveland' tussen de 20 en 80 en bij *Acer platanoides* 'Royal Red' liepen de percentages op van 17 tot 91 (Fig.17). De hoogste concentratie IBA gaf het hoogste aantal (korte en dikke) wortels ('Columnare' circa vier wortels, 'Cleveland' circa vijf wortels en 'Royal Red' circa zeven wortels).

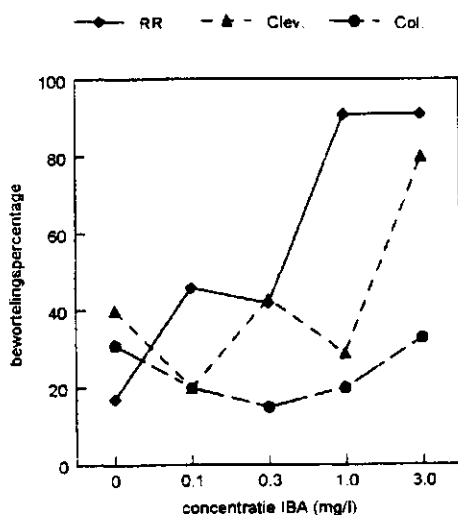


Fig.17. Het effect van de IBA concentratie (0 - 14,7 μ M) op het bewortelingspercentage van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

IAA - concentratie

Een veel gebruikt auxine in de weefselkweek is IBA maar bij sommige gewassen worden betere resultaten verkregen met andere auxinen bijv. IAA. Onderzocht is het effect van IAA (0 - 57 μ M) op de beworteling van *Acer platanoides*.

Acer platanoides 'Royal Red' bewortelde voor 100% op 5,7 μ M IAA en had de meeste wortels op 17,1 μ M IAA, gemiddeld 18,7 wortels. *Acer platanoides* 'Cleveland' bewortelde het best op 17,1 μ M IAA, 58 % beworteling en gemiddeld 9.3 wortels (Fig.18.). Op de hoogste concentratie IAA (57 μ M) stierven de explantaten af. De scheuten op 5,7 μ M zagen er het mooiste uit.

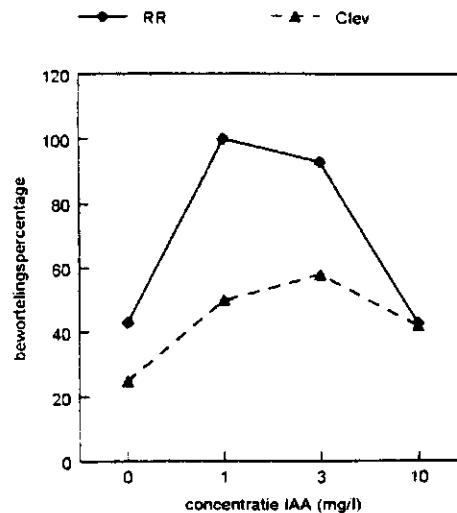


Fig.18. Het effect van de IAA concentratie (0 - 57 μ M) op het bewortelingspercentage van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

STS concentratie

In het algemeen bewortelingsonderzoek van het COWT had toediening van zilver in de vorm van zilverthiosulfaat (STS) een positief effect op het aantal wortels en de kwaliteit van de appelscheutjes. Onderzocht is het effect van 0 - 10 μ M STS op de beworteling van *Acer platanoides*. Bij *Acer platanoides* 'Columnare' gaf 1 μ M STS een significante stijging van het bewortelingspercentage tot 69% (Fig.19.).

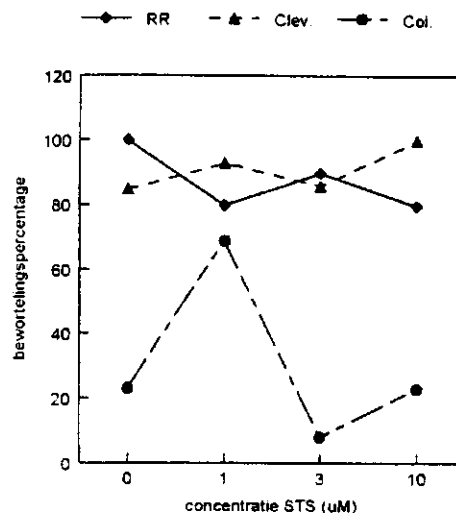


Fig.19. Het effect van diverse concentraties zilverthiosulfaat (0 - 10 μ M STS) in het bewortelingsmedium (MS-14,7 μ M IBA) op de beworteling van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

Bij *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Royal Red' had geen van de concentraties STS effect. Het aantal wortels van 'Royal Red' nam af van circa 12 (0 μ M STS) tot 5 (10 μ M STS), bij 'Cleveland' was het aantal wortels bij alle behandelingen circa 12 en bij 'Columnare' waren de aantallen circa 5 (0 μ M STS), circa 11 (1 μ M STS) wat weer afnam tot circa (10 μ M STS).

Macro-medium

Bij beworteling wordt vaak een andere, meestal lagere concentratie macro-medium gebruikt dan bij de vermeerdering. Onderzocht is de beworteling van *Acer platanoides* op een MS, een DKW of een Lepoivre basis in combinatie met twee sacharosenconcentraties (10 of 30 g/l). De macro-medium samenstelling had nauwelijks invloed op het bewortelingspercentage van 'Royal Red'. Het bewortelingspercentage op 30 g/l sacharose was steeds 10 % lager dan op 10 g/l sacharose. Het aantal wortels was gemiddeld het laagst op beide DKW-media (circa 7 wortels) en het hoogst op beide MS-media (circa 14 wortels) (Fig. 20 a en b)

Bij 'Columnare' had de sacharosenconcentratie op het MS- en DKW macro-medium duidelijk effect op het bewortelingspercentage. Het bewortelingspercentage nam op het MS-medium toe van 30 (10 g/l sacharose) tot 67 (30 g/l sacharose), en op het DKW-medium van 30 (10 g/l sacharose) tot 70 (30 g/l sacharose). Op het Lepoivre medium was de beworteling bij beide sacharosenconcentraties 10%. De aantallen wortels waren op het MS-medium circa vier, op het DKW-medium circa 6,5 en op het Lepoivre-medium circa 4,5 (Fig 21 a en b).

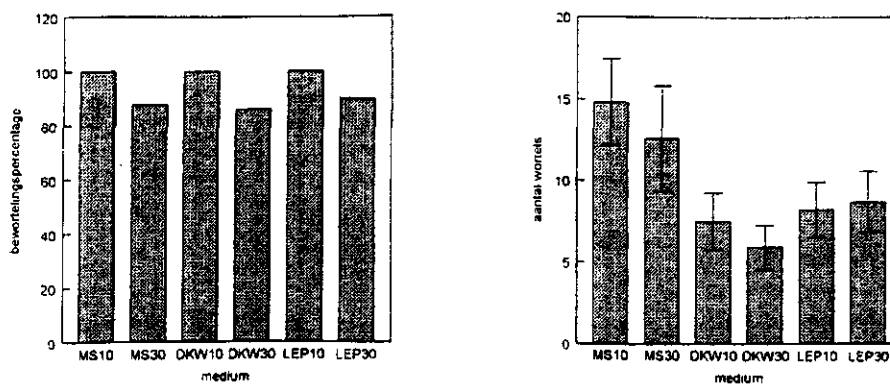


Fig.20. Het effect van het macro-medium (Murashige and Skoog (MS), Driver and Kuniyuki (DKW), en Lepoivre (LEP)) en de sacharose concentratie (10 of 30 g/l) op het bewortelingspercentage (a) en het aantal wortels (b) van *Acer platanoides* "Royal Red".

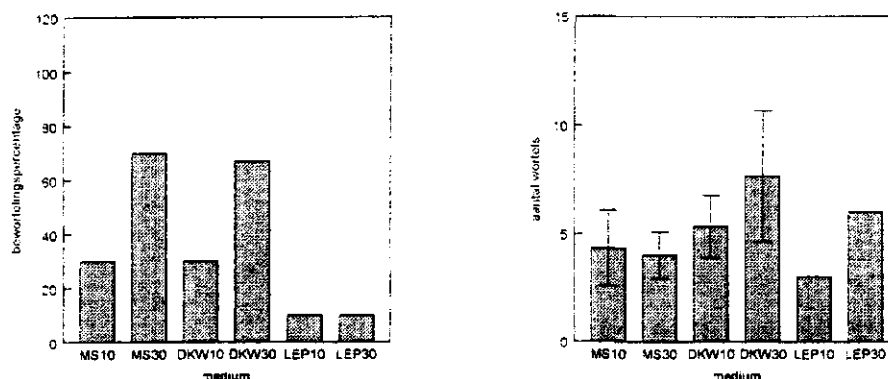


Fig.21. Het effect van het macro-medium (Murashige and Skoog (MS), Driver and Kuniyuki (DKW), en Lepoivre (LEP)) en de sacharose-concentratie (10 of 30 g/l) op het bewortelingspercentage (a) en het aantal wortels (b) van *Acer platanoides* 'Columnare'.

Lengte donkerperiode

In het donker worden auxinen nog niet afgebroken en zijn ze beschikbaar voor het explanaat om op te nemen en wortels te induceren. Bij appel wordt een donkerbehandeling van één week aangehouden maar misschien is een donkerbehandeling van kortere duur beter voor *Acer*. Onderzocht is het effect van één, drie of zeven dagen donker op de beworteling van *Acer platanoides*. Het bewortelingsmedium had een MS-basis, 30 g/l sacharose 4,9 of 14,7 μM IBA. Bij 'Royal Red' was er wel of niet 1 mg/l riboflavine aan het medium toegevoegd, een stof die onder invloed van licht de auxine vrij snel afbreekt, waardoor de uitgroei van de wortelprimordia beter uitgroeien. Bij 'Columnare' en 'Cleveland' was er standaard 1 mg/l riboflavine toegevoegd.

Het bewortelingspercentage bij 'Columnare' en 'Royal Red' was het hoogst na drie dagen donker op 14,7 μM IBA (40 % respectievelijk 100%), bij 'Cleveland' was dat na zeven dagen op 14,7 μM IBA (100%) (Fig.22).

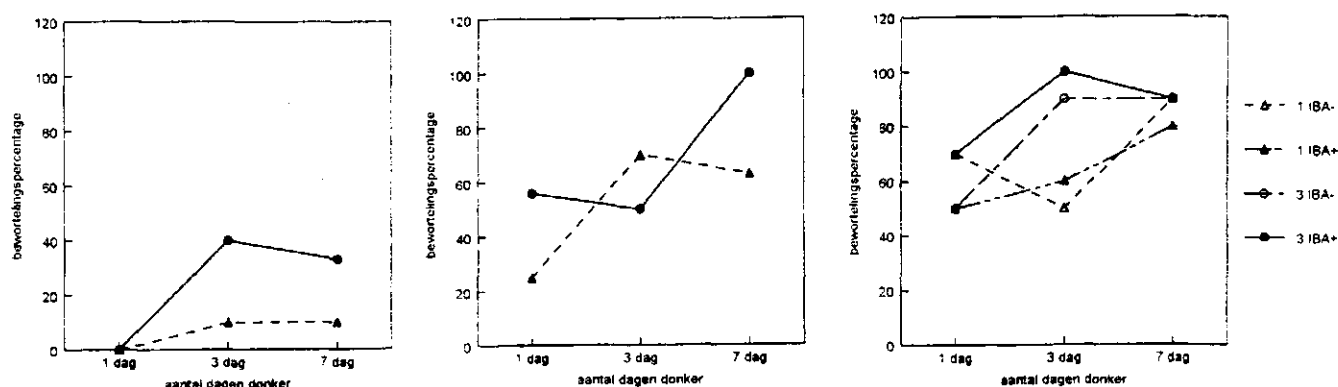


Fig.22. Het effect van het aantal dagen donker aan het begin van de bewortelingsbehandeling op het bewortelingspercentage van *Acer platanoides* 'Columnare' (a), *Acer platanoides* 'Cleveland' (b) en *Acer platanoides* 'Royal Red' (c).

Het aantal wortels nam bij alle cultivars bij een toenemend aantal dagen donker toe.

Op 14,7 μM IBA en zeven dagen donker vormde 'Columnare' circa 5,5 wortels, 'Cleveland' circa 9 wortels en 'Royal Red' circa 15 (met en zonder ribo).

Riboflavine in het medium gaf een mooier fijner wortelstelsel. Zonder riboflavine was er rond de basis van de wortel vaak een laag callus gevormd.

Na het afharden zou duidelijk worden of de wortels hier wel of niet last van hadden.

Conclusies

Naar aanleiding van de resultaten van deze kleinschalige bewortelingsproeven is geprobeerd de beste bewortelingsbehandeling te bepalen.

De eindbeworteling van *Acer platanoides* 'Royal Red' en *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare' vond plaats op een MS basis medium, EEG vitaminemengsel, 30 g/l sacharose, 14,7 μM IBA, 1 mg/l riboflavine, 8 g/l Daichin agar een pH= 5,7.

Aan het begin van de bewortelingsperiode werden de buizen één week in het donker geplaatst en vervolgens bij 20°C, 2 TL. Voor de beworteling van *Acer platanoides* 'Columnare' was er tevens 1 μM STS aan het medium toegevoegd.

Er is gekozen voor IBA in plaats van IAA omdat het bewortelingspercentage van 'Cleveland' op 14,7 μM IBA (80%) hoger was dan op IAA (max. 58%) en 'Cleveland' in de overige proeven ook goed bewortelde op 14,7 μM IBA. *Acer platanoides* 'Columnare' is nog nooit beworteld op IAA. Beide hormonen zouden nogmaals in één proef bij alle drie de cultivars naast elkaar getoetst kunnen.

Bij de 'eindbeworteling' bewortelde *Acer platanoides* 'Royal Red' voor 98% (n=148) met gemiddeld 20 wortels. *Acer platanoides* 'Cleveland' bewortelde voor 54%, circa 6 wortels (n=78), en *Acer platanoides* 'Columnare' bewortelde voor 50%, circa 5 wortels (n=134) (Fig. 23).

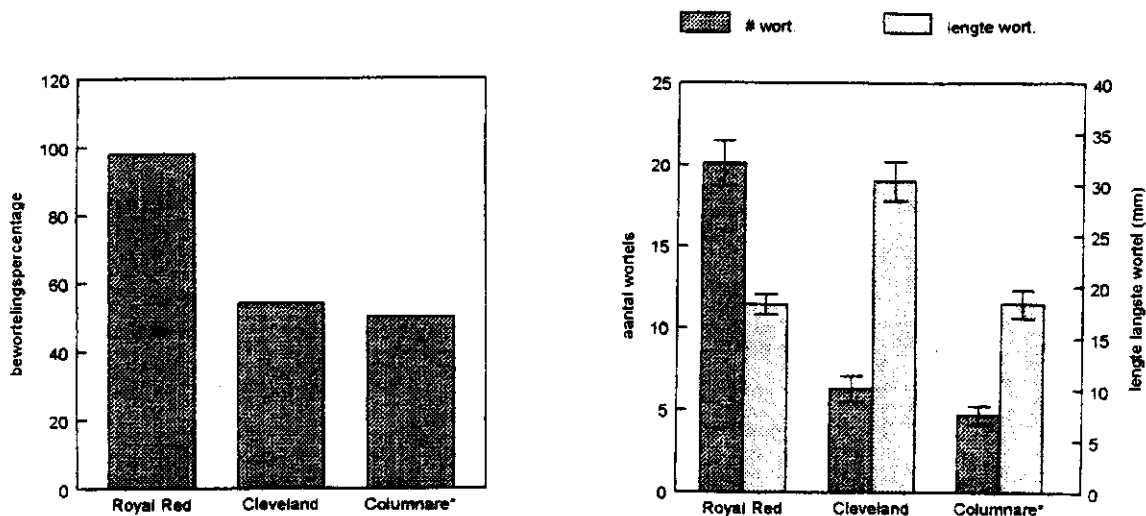


Fig.23. Het eind-beworteling-resultaat op het medium gebaseerd op de resultaten van voorgaande bewortelingsproeven van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'. De medium samenstelling was als volgt: MS-basis-30 g/l sacharose, EEG-vitaminen, 1,7 μM IBA, 8 g/l Daichin, pH= 5,7, 7 dagen donker. Fig. 23a - bewortelingspercentage, Fig.23b - aantal wortels en lengte van de langste wortel (mm)

6. AFHARDEN

De fase na de buis is zeer belangrijk. De plantjes moeten van het gunstige klimaat in de buis omschakelen naar een heel ander klimaat in de kas. De normale teeltomstandigheden kenmerken zich door wisselingen in temperatuur, vochtvoorziening en bemesting. Bovendien kunnen aantastingen door schimmels en bacteriën optreden. In het begin van het afharderen moet de situatie zoveel mogelijk worden aangepast aan de omstandigheden in het laboratorium (Kunneman, 1995). Dit betekent dat een preventieve bestrijding nodig is van vooral schimmels. Bij één van de afhardproeven viel al het plantmateriaal weg door *Botrytis*, het is zaak om de plantjes regelmatig te controleren.

In de winter is het nodig bij te belichten tot een daglengte van 16 uur en de temperatuur zoveel mogelijk op hetzelfde niveau te houden, voor de meeste gewassen ligt dit niveau op 20 tot 25°C. Bij zonnig weer moet tijdig worden geschermd.

De relatieve vochtigheid moet in het begin hoog zijn (plastic, nevel of mist).

Aan het eind van de afhardperiode van zes -zeven weken zijn de planten voldoende afgehard om in een kas te worden doorgeteeld zonder extra voorzieningen om de luchtvochtigheid te vergroten.

Voor het afharderen van weefselkweekplanten wordt vaak gebruik gemaakt van een grondmengsel bestaande uit 50-70% turfmolm en 50-30% perliet. Dit mengsel is redelijk vrij van bacteriën en schimmels en kan voldoende water en lucht bevatten voor een goede groei. Bij onbewortelde stekken wordt uitgegaan van onbemeste turf (met 3 kg landbouwkalk per m²). Bij bewortelde stekken van bemeste turfmolm.

Het afharderen van weefselkweekplanten vond plaats op het Proefstation voor de Boomkwekerij in Boskoop. Het afharderen van *Acer lobelii* ging goed indien de plantjes minimaal één goede wortel hadden. Deze wijze is daarom bij het afharderen van *Acer platanoides* als uitgangspunt genomen en eventueel op kleine punten aangepast. De beste afhardresultaten werden bij *lobelii* in de nazomer verkregen. Het blad van *Acer* is vrij dun waardoor snel uitdrogingsgevaar ontstaat zodat het zaak is om de periode tussen het uit de buis halen en onder plastic plaatsen zo kort mogelijk te houden.

In principe werden alleen de bewortelde explantaten uit de verschillende bewortelingsproeven naar Boskoop overgebracht om af te harden. Per proef is vervolgens het overlevingspercentage en de scheutlengte bepaald.

Acer lobelii

Het afharderen van *Acer lobelii* ging als volgt:

- Oppotten in speedling-platen in een mengsel van Finnpeat B6:perliet in een verhouding 1:1,
- Onder plastic plaatsen bij een temperatuur van 20°C eventueel bijbelichten met SON-T lampen tot een daglengte van 16 uur,
- Wekelijks bespuiten met fungicide (Rovral of Eupareen 0,5 g/l),
- Na 2 weken met afharderen beginnen door het plastic er elke dag voor een steeds langere tijd open te slaan,
- Na 4 weken bijmesten met 1 g/l Kristalon blauw,
- Na 6 - 9 weken oppotten in P9 in Finnpeat.

Royal Red

De plantjes werden opgepot in speedling-platen (48 cups) en onder plastic geplaatst onder een laag tunneltje gedurende zes weken. Daarna werden ze één week onder vliesdoek geplaatst. Nadat het vliesdoek verwijderd was werden de plantjes 1 x per week bij bemest met een lage concentratie mest (Kristalon blauw 1 g/l).

De kasomstandigheden waren dagtemperatuur min. 20°C - max. 22°C, nachttemperatuur min. 18°C - max. 20°C, schermen bij 120 J/cm²/h (40% scherm).

Stekmengsel

Bij Royal Red is het overlevingspercentage en de groei op twee stekmengsels vergeleken. Mengsel 1 was samengesteld uit licht bemeste, zeer fijn gezeefde bemeste potgrond en perliet nr.2 in de verhouding 1:1 en mengsel 2 in de verhouding 3:1. De plantjes werden verdeeld op basis van het wortelstelsel in vier klassen (onbeworteld, 1 slechte/kleine wortel, 1 tot 3 goede wortels, meer dan 3 goede wortels).

Het overlevingspercentage van de onbewortelde plantjes was hoger op het 1:1 mengsel dan op het 3:1 mengsel (31% versus 8%). Bij de overig klassen was het overlevingspercentage op het 3:1 mengsel beter of gelijk. De lengtegroei en de bladgroei was bij alle klassen beter op het 3:1 mengsel (Fig. 24).

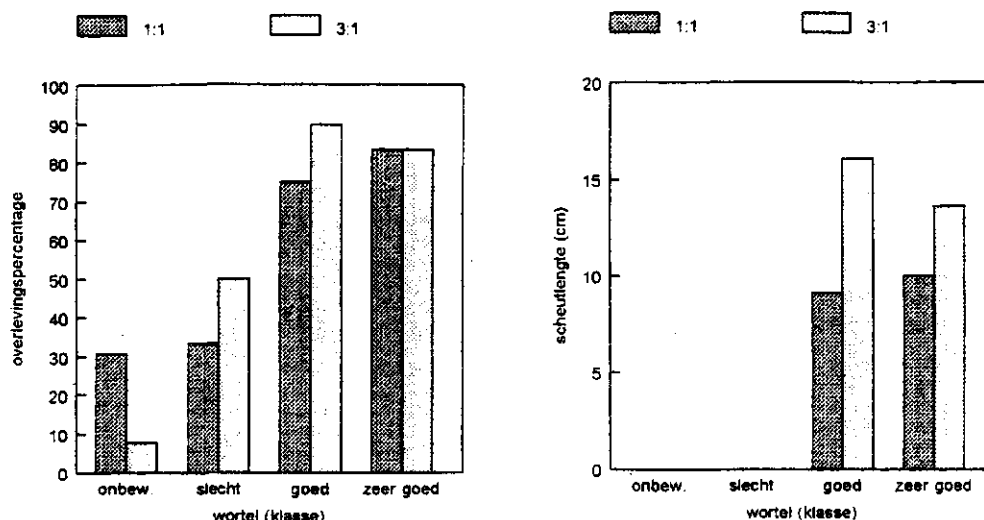


Fig.24. Het effect van de verhouding potgrond:perliet (1:1 of 3:1) in het stekmengsel op het overlevingspercentage (a) en de scheutlengte (b) bij het afharden van *Acer platanoides* 'Royal Red'

Na-effect IBA

Het naeffect van de IBA concentratie (0 - 14,7 μM) op het afharden van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare' kon niet worden bepaald omdat alle plantjes bij het afharden geveld werden door *Botrytis* waardoor de overleving 0% was.

Na-effect IAA

Het overlevingspercentage van explantaten was het hoogst na beworteling op 0 μM IAA bij zowel *Acer platanoides* 'Royal Red' (100%) als *Acer platanoides* 'Cleveland' (60%). Bij een toenemende IAA concentratie tot 17,1 μM nam het overlevingspercentage van 'Royal Red' af tot circa 60% en dat van 'Cleveland' tot 0% (Fig. 25). De explantaten die beworteld waren op 57 μM IAA, waren kwalitatief zo slecht dat ze niet meer opgepot waren om af te harden.

Na-effect STS

Een toenemende concentratie STS in het bewortelingsmedium leidde tot een afnemende scheutlengte bij het afharden. Bij 'Columnare' vertoonde het overlevingspercentage dezelfde lijn, van 100% (0 μM STS, 23 % beworteling), 30% (1 μM STS) tot 0% na beworteling op 3 en 10 μM STS.

Het overlevingspercentage van 'Royal Red' schommelde tussen de 37 en 62% en van 'Cleveland' overleefde tussen de 8 en 28% van de plantjes het afharden (Fig. 26).

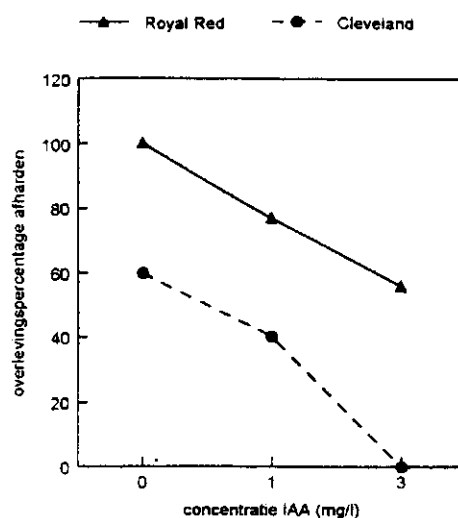


Fig.25. Het na-effect van de IAA concentratie in het bewortelingsmedium (0 - 57 μ M) op het overlevingspercentage bij het afharden van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

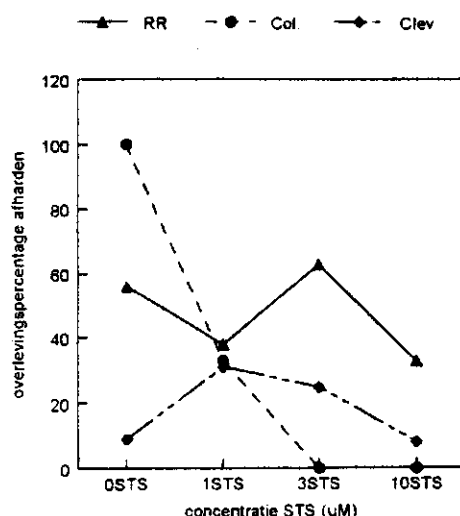


Fig.26. Het na-effect van de STS concentratie in het bewortelingsmedium (0 - 10 μ M) op het overlevingspercentage bij het afharden van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

Na-effect macromedium en sacharosenconcentratie

Opvallend was dat, hoewel het bewortelingspercentage van 'Columnare' niet erg hoog was op MS en DKW medium met 10 g/l sacharose circa 30% en op Lepoivre medium met 10 g/l sacharose circa 10%, wel al deze bewortelde scheutjes het afharden overleefde. Het overlevingspercentage van de op 30 g/l sacharose bewortelde scheuten was circa 70% (Fig. 27).

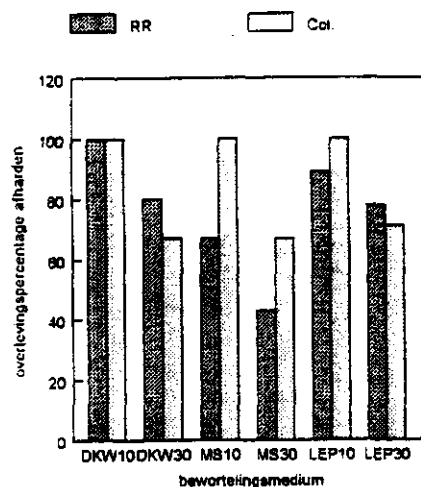


Fig.27. Het na-effect van het macro-medium (Murashige and Skoog (MS), Driver and Kuniyuki (DKW), en Lepoivre (LEP)) en de sacharosenconcentratie (10 of 30 g/l) op het overlevingspercentage bij het afharderen van *Acer platanoides* 'Royal Red' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

Bij 'Royal Red' was de overleving het hoogst na beworteling op DKW 10 (100%), en het laagst na beworteling op MS 30 (40%). De overleving na beworteling op 30 g/l sacharose was steeds lager dan na beworteling op 10 g/l sacharose.

Na-effect IBA concentratie en riboflavine

Het overlevingspercentage van de scheuten van 'Royal Red' beworteld op 4,9 μ M IBA was zonder riboflavine ietsjes lager dan met riboflavine (87 versus 80). Het verschil in overleving na beworteling op 14,7 μ M met of zonder riboflavine was groter, met riboflavine overleefde 67%, zonder 41% (Fig. 28).

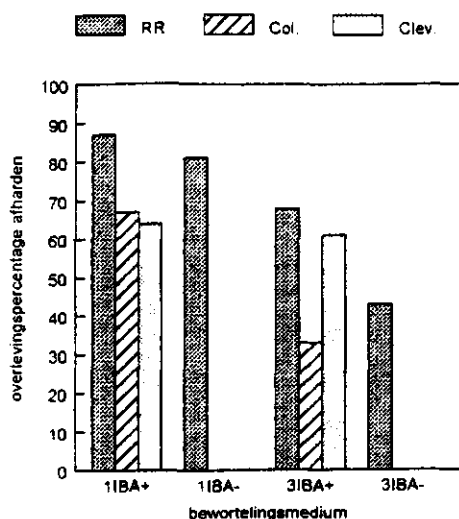


Fig.28. Het na-effect van de IBA-concentratie (4.9 of 14.7 μ M) en wel of geen riboflavine (1 mg/l, alleen bij 'Royal Red) op het overlevingspercentage bij het afharderen van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare'.

De overleving van 'Columnare' was hoger na beworteling op 4,9 μM IBA (66%) dan op 14,7 μM IBA (34%). Bij 'Cleveland' had de IBA concentratie weinig na-effect op het afharderen (circa 65% overleving).

Eindbeworteling

Aan de hand van de bewortelingsgegevens was het beste bewortelingsmedium gekozen waarop de laatste explantaten beworteld werden. Explantaten van 'Royal Red' overleefde voor 77% het afharderen. De gemiddelde scheutlengte na zes weken was 12 cm. De afhardresultaten van 'Cleveland' en 'Columnare' waren beduidend slechter.

Het overlevingspercentage van 'Cleveland' was 39, de gemiddelde scheutlengte was acht cm. Het overlevingspercentage van 'Columnare' was 27% ook met een gemiddelde scheutlengte van acht cm.

Conclusies

Naar aanleiding van de afhardresultaten komt DKW basis- 10 g/l sacharose, 0 - 4,9 μM IBA, EEG-vitaminen, 1 mg/l riboflavine, geen STS als beste bewortelingsbehandeling naar voren. Wanneer de explantaten dan minstens één goede wortel hebben en schimmelvorming goed bestreden wordt dan lijkt een hoog overlevingspercentage haalbaar. Deze bewortelingsbehandeling is echter niet uitgevoerd omdat de afhardresultaten toen nog niet bekend waren en zou alsnog getoetst moeten worden.

Redelijk goede afhardresultaten werden verkregen op de volgende wijze:

- Oppotten in speedling-platen (48 cups) in een mengsel van Finnpeat B6:perliet in een verhouding 3:1,
- Onder plastic onder een laag tunneltje plaatsen bij een temperatuur van 20°C eventueel bij belichten met SON-T lampen tot een daglengte van 16 uur, gedurende circa 6 weken,
- Wekelijks bespuiten met fungicide (Rovral of Eupareen 0,5 g/l),
- Na 2 weken met afharderen beginnen door het plastic er elke dag voor een steeds langere tijd open te slaan,
- Na 4 weken bijmesten met 1 g/l Kristalon blauw,
- Na 6 weken de plantjes onder vliesdoek plaatsen gedurende 1 week,
- Na 6 - 9 weken oppotten in P9 in Finnpeat,
- Kasomstandigheden: dagtemperatuur min. 20°C - max. 22°C, nachttemperatuur min. 18°C - max. 20°C, schermen bij 120 J/cm²/h (40% scherm).

Het afharderen moet nog verbeterd worden door de beworteling te optimaliseren en op de tweede plaats door nog betere afhardcondities.

7. TEELT WEEFSELKWEKPLANTEN

Weefselkweekplanten kunnen in principe jaarrond geproduceerd en afgehard worden. Planten kunnen wanneer het buitenklimaat het nog niet toelaat evt. opgepot in P9 in de kas verblijven. Bij overgang naar buiten moet men alert blijven op bladverbranding. Indien mogelijk in de herfst naar buiten brengen waar ze dan op een normale manier kunnen overwinteren.

Groeivergelijking met traditioneel vermeerderd

Op boomteeltproeftuin De Boutenburg in Lienden is plantgoed van *Acer* uitgeplant. Gedurende enkele jaren is de groei en ontwikkeling vergeleken met materiaal dat op traditionele manier is vermeerderd. De groei van weefselkweekplanten van *Acer lobelii* is vergeleken met zaailingen, stekken en enten op *Acer pseudoplatanus* of *Acer rubrum*.

Het slagingspercentage van zomerstek was laag, slechts 25% kon na de winter uitgeplant worden (Albers, Drijver 1989). Het enten van *Acer lobelii* op *Acer pseudoplatanus* en *Acer rubrum* ging slecht. Het slagingspercentage was respectievelijk 40 en 25. Bij beide onderstammen trad onverenigbaarheid op.

De groei van de weefselkweekplanten was goed en uniform. De lengtegroei van de zomerstekken en van *Acer lobelii* op *Acer rubrum* bleef achter. Wat betreft de diktegroei waren er weinig verschillen tussen weefselkweekplanten, stekken en zaailingen. Alleen het kleine overschot van *Acer lobelii* op *Acer pseudoplatanus* groeide sneller.

Bij *Acer lobelii* vermeerderd via zomerstek en weefselkweek waren na drie jaar de planten uitgegroeid tot bomen 6/8. Het aantal spillen was bij weefselkweekplanten het laagst en bij enten op *Acer pseudoplatanus* het hoogst. De variatie was het grootst bij geënte planten. De beworteling van de bomen was goed. Bij het rooien bleken alleen de zaailingen gemakkelijk te scheuren. Verdere verschillen in teelt of ziektegevoeligheid werden niet geconstateerd. Wel waren de groeikoppen en de bladstelen van *Acer lobelii* uit weefselkweek roodbruin in tegenstelling tot de geelgroene groeikoppen en bladstelen van de overige planten. Weefselkweek planten van *Acer platanoides* 'Royal Red' die het afharden hebben overleefd groeien in de kas goed door (Fig. 29).

Najaar 1998 wordt een groeivergelijking gestart met planten van *Acer platanoides* 'Royal Red', *Acer platanoides* 'Cleveland' en *Acer platanoides* 'Columnare' uit weefselkweek en planten die worden geoculeerd of worden gestekt.



Fig.29. *Acer platanoides* 'Royal Red' uit weefselkweek groeide in de kas goed door.

8. REGENERATIE UIT BLADSTROOKJES

In 1994 werd, o.a. in het kader van de samenwerking met CPRO-DLO betreffende de vermeerdering van *Acer* via weefselkweek, gestart met onderzoek naar een regeneratiemethode. Ontwikkelen van een dergelijke methode was een noodzakelijk onderdeel voor in vitro selectie naar *Verticillium* resistente(-re) *Acer platanoides*.

Gestreefd werd naar directe scheutvorming op bladexplantaten van *Acer*.

Bladstrookjes van circa 2-4 mm breed werden in petrischalen gelegd zodanig dat de bovenkant van het blad in contact was met het medium (adaxiaal, 2 blaadjes) of de onderkant (abaxiaal, 1 blaadje). Per petrischaal werden drie hele weefselkweek-blaadjes uitgelegd. De petrischalen werden afgedicht met parafilm.

Factoren

Factoren die gevarieerd zijn in het onderzoek naar regeneratie:

- De leeftijd van het bladmateriaal uit weefselkweek, 4, 6 of 10 weken,
- Hormonen NAA/TDZ en NAA/BA, in 20 verschillende concentratiecombinaties,
- Lengte donkerincubatie,
- Strookjes overzetten op vers medium, op hormoonloos medium of op het oude medium laten,
- Adeninesulfaat, verschillende concentraties,
- Casseïne/glutamine, in verschillende concentratiecombinaties,
- Zilvernitraat, diverse concentraties.



Fig. 30. Scheutjes op bladstrookexplantaten van *Acer platanoides* 'Royal Red' door regeneratie ontstaan.

Protocol roos

Op het CPRO-DLO werden regeneranten verkregen wanneer men bij gebruik van kas-materiaal van *Acer* het regeneratie-protocol van roos volgde. Onderzocht is of op het COWT ook regeneranten verkregen konden worden bij gebruik van weefselkweekmateriaal van *Acer*. Alle proeven werden gedaan met *Acer platanoides* 'Royal Red' en *Acer lobeli*. Blaadjes werden eerst op een inductiemedium geplaatst en vervolgens op een uitgroei-medium.

Resultaat

Er ontstond veel callus, groen, rood, wit of bruin.

In totaal zijn er zes scheutregeneranten (Fig. 30) op bladstrookexplantaten van *Acer platano-*
ides 'Royal Red' ontstaan, waarvan drie regeneranten ontstonden wanneer het roosprotocol
gevolgd werd.

Alle regeneranten ontstonden op het 'bladsteel-explantaat'.

Vijf regeneranten zijn overgeplaatst naar standaard-vermeerderingsmedium en hebben deze
overgang uiteindelijk niet overleefd. Eén regenerant werd al op het uitgroeimedium waterig.

Einde

Het onderzoek is in 1995 stopgezet, omdat de doelstelling van het CPRO-DLO onderzoek,
selectie naar *Verticillium* resistentie op in vitro niveau, niet meer haalbaar geacht werd bin-
nen de projectduur. Hieruit vloeide voort dat er geen behoefte meer was aan een regenera-
tieprotocol van weefselkweekmateriaal.

9. LITERATUUR

- Albers, M.R.J., Drijver, C.A., 1989. *Acer lobelii* uit weefselkweek groeit goed. De Boomkwekerij 32:26-27
- Albers, M.R.J., Roest, S., Kuiper, G. 1995. Weefselkweek maakt *Acer* vrij van *Verticillium*. De Boomkwekerij 3:24-25
- Berg van den, G. 1997. Tijdrovend onderzoek levert *Verticillium* resistente *Acer platanoides* op. De Boomkwekerij 31/32: 18-19
- Chin-Yi Lu, 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. In vitro Cell. Dev. Biol. 29P:92-96
- Grondeau, C., Samson, R., 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. Critical reviews in plant science. 13(1):57-75
- Hillman, J.R., Advanced plant physiology, Chap. 6, apical dominance :127-148
- Huetteman, C.A., Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinen for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 33: 105-119
- Kerns, H.R., Meyer, M.M., 1986. Tissue Culture Propagation of *Acer x freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. Hort Science, vol. 21 (5): 1209-1210
- Kunneman B.P.A.M., 1995. Groeivergelijking van *Ulmus* en *Tilia* cultivars op onderstam en op eigen wortel. Rapport 36, Boomteeltpraktijkonderzoek
- Kunneman, B.P.A.M., Albers, M.R.J., 1990. Afharden van weefselkweekplanten vereist veel aandacht. De Boomkwekerij 35:20-21
- Langens-Gerrits, M., Albers, M., Klerk de, G.J., 1998. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lillium* and *Acer*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 75-77
- Leeuwen van, H., 1996. Vegetatieve vermeerdering van *Acer platanoides* 6210 in vitro. Stage-/afstudeer-verslag.
- Marks, T.R., Simpson, S.E., 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. Journal of Hort. Sci. 65 (2): 103-111
- Marks, T.R., Simpson, S.E., 1994. Factors affecting shoot development in apically dominant *Acer* cultivars in vitro. J. Hort. Sci. 69 (3):543-537
- Preece, J.E., Huetteman, C.A., Ashby, C., Roth, P.L., 1991. Micro- and cutting propagation of Silver Maple. I Results with adult and juvenile propagules. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 116(1): 142-148
- Preece, J.E., Huetteman, C.A., Ashby, C., Roth, P.L., 1991. Micro- and cutting propagation of Silver Maple. II Genotype and provenance affect performance. J. Ame. Soc. Hort. Sci., 116(1): 149-155
- Preece, J.E., 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators. Plant Tiss. Cult. And Biotechn. Vol. 1, No. 1:26-37
- Roest, S., Kuiper, G., Vermeerdering Noorse esdoorn in weefselkweek. 1996. De Boomkwekerij 34:28-29
- Telgen v. H.J., Elagoz, V., Mil v. A., Paffen, A., Klerk, de G.J., 1992. Role of plant hormones in lateral bud growth of rose and apple in vitro. Acta Hort. 319: 137-142
- Wilkens, C.L., Graves, W.R., Townsend, A.M., 1995. Development of plants from single node cuttings differs among cultivars of red maple and freeman maple. HortScience 30(2): 360-362.