

VERTROUWELIJK

PRODUCTIE VAN UITGANGSMATERIALEN VAN HOUTIGE EN BOTERBLOEMACHTIGE GEWASSEN

Eindverslag Project 11066

Deelnemende bedrijven:

Antigone Plantvermeerdering BV
Ball Holland
Bartels Breeding
BeTe Sierheersers
Boot & Co
Darthuiser Boomkwekerijen BV
Degenhart Vaste planten
Handelskwekerij Koos Hofstede
Moerheim Roses & Trading
Nihot BV, Weefselkweek
Productschap Tuinbouw
SBW International BV
L. M. van Nierop vof
Veredelingcombinatie voor Helleborus orientalis; PRO/SAP
Westerhoud

Projectperiode 01 03 2002 – 28 02 2006

Verslagdatum 30 juni 2006

Opstellers, Arjen van Vark en Michiel van Bennekom, SBW International BV

Dit project is uitgevoerd door



Dit project is mede gefinancierd door



Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	3
1. Probleemstelling.....	4
2. Doelstelling	4
3. Te verwachten resultaten.....	4
4. Voorgestelde plan van aanpak.....	4
5. Resultaten	5
5.1. Protocol Anemone.....	6
5.2. Protocol Berberis.....	8
5.3. Protocol Clematis	11
5.4. Protocol Cotinus.....	14
5.5. Protocol Daphne.....	17
5.6. Protocol Delphinium	20
5.7. Protocol Helleborus.....	23
5.8. Protocol Hippophae.....	26
5.9. Protocol Hydrangea (type macrophylla en quercifolia)	28
5.10. Protocol Liquidambar.....	32
5.11. Protocol Mahonia	35
5.12. Protocol Malus	38
5.13. Protocol Phyllostachys	41
5.14. Protocol Pioen	43
5.15. Protocol Rosa (onderstam en cultivar).....	46
6. Conclusies	48
6.1. Weefselkweek	48
6.2. Praktijk	48
7. Aanbevelingen.....	48

1. Probleemstelling

De productie van uitgangsmaterialen van veel belangrijke houtige en boterbloemachtige gewassen verloopt ronduit slecht. Problemen hierbij zijn de onbestuurbare, grote kwaliteitsverschillen en de te lage en te langzame vermeerdering. Dit geldt niet alleen bij stekken, zaaien of enten maar ook bij weefselkweekvermeerdering, waarbij tevens bewortelings- en afhardproblemen bestaan. Indien er een oplossing voor deze problemen gevonden kan worden komt meer en sneller uitgangsmateriaal beschikbaar voor Nederlandse opkweekbedrijven. Hierdoor komt een veel grotere, wereldwijde miljoenenmarkt beschikbaar voor Nederlandse teelt-, veredelings- en handelsbedrijven die houtige c.q. boterbloemachtige uitgangsmaterialen, half- en eindproducten vervaardigen en verhandelen. Wanneer deze problemen via weefselkweek opgelost kunnen worden is het uitgangsmateriaal, naast meer en sneller, ook nog eens uniformer en gezonder, kortom kwalitatief beter. Bijkomend voordeel is de wereldwijd groeiende behoefte aan schone, ziektevrije uitgangsmaterialen vanuit weefselkweek omdat hiermee voldaan kan worden aan de steeds strengere hygiënische en quarantaine-protocollen van veel landen. In dit project is onderzocht in hoeverre weefselkweek een bijdrage kan leveren aan het oplossen van de problemen met houtige en boterbloemachtige gewassen.

2. Doelstelling

Het doel van het project was het ontwikkelen van weefselkweekwerkwijzen of -protocollen voor vegetatieve vermeerdering van houtige en boterbloemachtige gewassen via weefselkweek. Dit betrof gewassen die van wezenlijk tot groot economisch belang zijn en die met de huidige stand van de techniek nog niet of nauwelijks via weefselkweek vermeerderd konden worden. Het project richtte zich op laanbomen, sierheesters, vruchtbomen en –struiken en onderstammen en de boterbloemachtige (Ranonkelachtige) plantengeslachten zoals bijv. Helleborus en Pioenroos. Uiteindelijk is het onderzoek uitgevoerd met de gewassen Anemone, Berberis, Clematis, Cotinus, Daphne, Delphinium, Helleborus, Hippophae, Hydrangea, Liquidambar, Mahonia, Malus, Paeonia, Phyllostachys, Pseudopanax en Rosa. Hierbij is getracht van ieder gewas twee soorten in het onderzoek mee te nemen.

3. Te verwachten resultaten

Het streven was om voor ieder van de genoemde gewassen een protocol te ontwikkelen waarin de volgende fasen beschrijven worden.

- a) Inzetmateriaal, voorbehandeling
- b) Inzetwijze(n)
- c) Vermeerderen
- d) Bewortelen
- e) Afharderen

4. Voorgestelde plan van aanpak

Het project kent twee delen, te weten een weefselkweekgedeelte en een opkweek- en analysegedeelte. Het eerste deel is uitgevoerd door SBW International BV, die zorg draagt

voor het ontwikkelen van de weefselkweekprotocollen en het produceren van de weefselkweekplantjes. Het verder opkweken en analyseren van deze plantjes in de kas is uitgevoerd door de deelnemende teelt- en veredelingsbedrijven, hierbij ondersteund door SBW International B.V.

In het project is een fasering aangebracht waarin de verschillende stappen gedefinieerd zijn.

Fase 1, inventarisatie van bestaande kennis, waarin er voor de opgenomen houtige en boterbloemachtige gewassen een literatuurstudie en een overige bronnen-inventarisatie wordt uitgevoerd. Hierbij worden de huidige stand van de techniek en specifieke knelpunten per gewas geïnventariseerd.

Fase 2, afstemming weefselkweekmedia op elementen-samenstelling van de plant, waarin er elementenanalyses van diverse weefsels van *in vivo* plantmaterialen worden uitgevoerd, waarna samenstellingen van weefselkweekmedia zo goed mogelijk hierop afgestemd kunnen worden.

Fase 3, hormonale en fysiologische sturing van regeneratie en scheut- en wortelvorming *in vitro*, waarin er onderzoek gedaan zal worden naar zowel de klassieke explantaten als top- en axillaire meristemen, als via adventieve vorming van plantjes vanuit bijvoorbeeld bloemonderdelen (via directe scheutvorming of via somatische embryogenese).

Fase 4, productie van plantmaterialen met nieuw ontwikkelde weefselkweekprotocollen, waarin op grond van fasen 1, 2 en 3 nieuwe weefselkweekmedia en bijbehorende fysiologische teeltcondities worden samengesteld. Hiermee worden op experimentele schaal weefselkweekplantjes geproduceerd, vervolgens afgehard en daarna overgedragen aan de deelnemende teelt- en veredelingsbedrijven.

Fase 5, verdere opkweek en analyse van weefselkweek-plantmaterialen, waarin de afgeharde, bewortelde weefselkweekplantjes bij de deelnemende teelt- en veredelingsbedrijven verder opgekweekt worden en vervolgens – inclusief controle plantmaterialen - geanalyseerd m.b.t. hun groei, ontwikkeling, bloemvorming, productkwaliteit, uniformiteit en eventuele naijlende weefselkweekeffecten.

Fase 6, de kennisoverdracht, waarin er, naast de tussentijdse rapportages gedurende de projectduur, een eindverslag samengesteld wordt. Dit eindverslag omvat de projectresultaten op vertrouwelijke basis, welke beschikbaar komen voor de deelnemende teelt- en veredelingsbedrijven alsmede het Productschap Tuinbouw. De brede kennisoverdracht aan de complete sectoren Fruitgewassen, Vruchtboomkwekerij, Boomkwekerij en Sierteeltgewassen vindt pas plaats één jaar na afsluiten van het project.

5. Resultaten

Het streven was om voor ieder van de genoemde gewassen een protocol te ontwikkelen dat het gehele weefselkweekproces, inclusief de afhardfase beschrijft. Voor veel van de gewassen is deze opzet geslaagd. Voor een deel is het protocol slechts gedeeltelijk rond. Per gewas volgt hier de beschrijving van het protocol, waarbij er bij de gewassen waarvan het protocol onvolledig is deze fasen met “(voorlopig)” aangeduid zijn. Het gewas *Pseudopanax* is niet opgenomen als protocol aangezien hier naast de inzetfase geen onderzoek gedaan is wegens het uitvallen van het materiaal gedurende de inzetfase en omdat er geen nieuw materiaal voor inzet beschikbaar was.

5.1. Protocol Anemone

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal wordt zaad gebruikt wat uit kiemrust is.

b) Inzet

1. Ontsmettingsprocedure

De zaden worden gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 15 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

2. Explantaten

De zaden worden op het medium geplaatst.

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt met de helft van de gebruikelijke ammoniumnitraat concentratie, per liter aangevuld met 30 gram saccharose en 6 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt één explantaat op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaat een plant van 2 tot 6 cm met aan de basis 1 of meerdere kleine scheuten. De scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij zijn van bacteriën worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit een clumbje van 4 tot 6 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten (foto's 1 en 2) met wat bruin callus en veel uitscheiding aan het wondvlak. Deze worden verdeeld in 1 grote scheut met 1 á 2 kleine scheuten. Bladeren worden ingekort tot 2 cm; eventueel aanwezig callus taps wegsnijden maar de rand met ogen laten zitten.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,8 mg GA₃ en 5,5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

d) Beworteling (voorlopig)

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbs van 4 tot 6 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt tot enkele scheuten gesneden, waarbij te lang blad wordt ingekort. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd waarbij de basis taps gesneden wordt in een v-vorm.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 9 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 tot 6 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

e) Afharden

Onderzoek aan deze fase is gedurende de projectduur uitgevoerd, echter nooit geslaagd omdat de kwaliteit van de planten en het bewortelingspercentage te wensen over liet.



Foto 1. Vermeerdering Anemone in container.



Foto 2. Clumb Anemone vóór snijden.

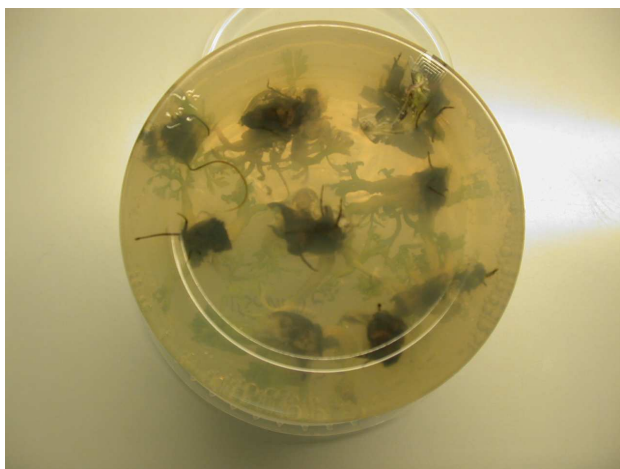


Foto 3. Beworteling Anemone.



Foto 4. Bewortelde planten Anemone.

5.2. Protocol Berberis

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 30 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken van ongeveer 2 - 3 cm gesneden. Hierbij wordt rekening gehouden met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd tot de bladstelen.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,01 mg TDZ en 8 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 1 tot 1,5 cm lang met diverse bladeren en eventueel wat uitscheiding aan de basis. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit clumbjes met scheutjes van 1 tot 1,5 cm lang met diverse bladeren, vaak zijscheuten aan de basis (foto's 5 en 6), eventueel wat callus en uitscheiding aan het wondvlak. De scheuten worden enkel gesneden en bij voldoende scheutlengte (> 2 cm) in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt McCrown Woody Plant Medium, ofwel WPM-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 2,0 mg BAP en 5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 clumbjes op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gedurende 6 weken gekweekt bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling (voorlopig)

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbjes van 1 tot 1,5 cm lang met diverse bladeren, vaak zijscheuten aan de basis en wat callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt enkel gesneden. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt WPM-medium op halve sterkte gebruikt, per liter aangevuld met 25 gram saccharose, 0,3 mg IBA en 7 gram agar. Dit geeft een bewortelingspercentage tussen de 30 en 60%. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 19°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 1,5 cm met verspreid staande bladeren, diverse gele wortels en wat uitscheiding aan de basis. De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het wordt opgeplant op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 7).



Foto 5. Vermeerdering Berberis in container.



Foto 6. Clumbs Berberis voor snijden.



Foto 7. Afharderen Berberis.

5.3. Protocol Clematis

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Van belang voor een goede start van de cultuur is het nemen van materiaal met enkelvoudig blad; juveniel materiaal. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken van ongeveer 3 cm gesneden. Hierbij wordt rekening gehouden met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Omdat er verschillende typen Clematis bestaan worden bij de inzet twee voedingsmedia gebruikt, te weten Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 6 gram agar, en DKW/Juglans-medium, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,01 mg TDZ en 8 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 3 tot 6 cm lang met diverse bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit scheutjes van 3 tot 6 cm lang met diverse bladparen (foto's 8 en 9), wat bruin callus, uitscheiding aan het wondvlak, eventueel wortelvorming. Deze worden in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt een aangepast voedingsmedium gebruikt (tabel 1), per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,3 mg kinetine en 1,5 tot 2,5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met

100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit scheutjes van 3 tot 6 cm lang met diverse bladparen, wat bruin callus, uitscheiding aan het wondvlak en eventueel wortelvorming, wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt een aangepast voedingmedium gebruikt (tabel 2), per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 5 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 tot 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 3 cm met diverse bladparen, diverse bruine wortels en wat uitscheiding aan de basis (foto's 10 en 11). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het wordt opgeplant op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden.

Tabel 1. Overzicht zoutensamenstelling vermeerderingsmedium.

Zouten		Aantal mg per liter
Macro	Kaliumsulfaat	1559
	Amoniumnitraat	1416
	Calciumnitraat	1367
	Calciumchloride	149
	Magnesiumsulfaat	740
	Kaliumwaterstoffsfaat	264
	ijzerEDTA	37.5
Micro	MS	

Tabel 2. Overzicht zoutensamenstelling bewortelingsmedium.

Zouten		Aantal mg per liter
Macro	Kaliumnitraat	495
	Amoniumnitraat	830
	Calciumnitraat	1181
	Magnesiumsulfaat	185
	Kaliumwaterstoffosfaat	85
	Natriumwaterstoffosfaat	136
	ijzerEDTA	25
Micro	$\frac{1}{2}$ MS	



Foto 8. Vermeerdering Clematis in container.



Foto 9. Vermeerdering Clematis.



Foto 10. Beworteling Clematis in container.

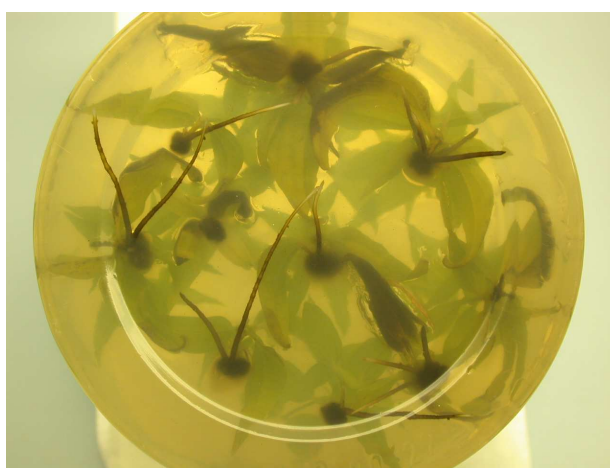


Foto 11. Beworteling Clematis, onderaanzicht.

5.4. Protocol *Cotinus*

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 30 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken gesneden. Aangezien de bladeren verspreid over de stengel zitten worden er stekken van ongeveer 3 cm genomen, waarbij er rekening gehouden wordt met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 6 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 2 tot 4 cm lang met diverse verspreid aanwezige bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit scheutjes van 2 tot 4 cm lang met verspreid staande bladeren (foto 12), wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak. Deze worden in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 6 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit scheutjes van 2 tot 4 cm lang met verspreid staande bladeren, wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 7 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 tot 6 weken bij 19°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 1,5 cm met verspreid staande bladeren, diverse bruine, lange wortels en wat uitscheiding aan de basis (foto's 13 en 14). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het opgeplant wordt op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 15).



Foto 12. Vermeerdering Cotinus in container.



Foto 13. Beworteling Cotinus in container.

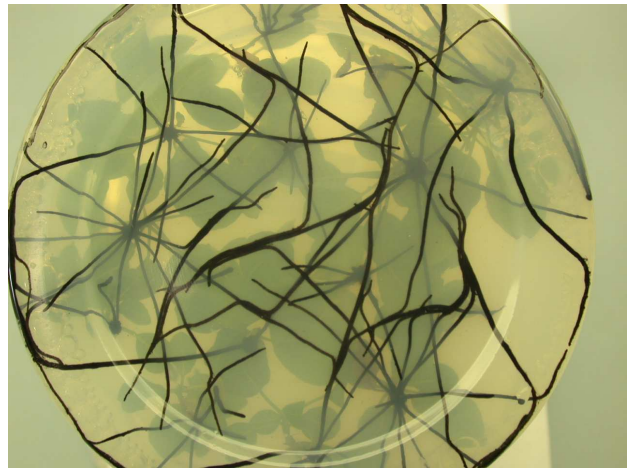


Foto 14. Beworteling Cotinus, onderaanzicht.



Foto 15. Afharden Cotinus

5.5. Protocol Daphne

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 20 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken gesneden. Aangezien de bladeren verspreid over de stengel zitten worden er stekken van ongeveer 3 cm genomen, waarbij er rekening gehouden wordt met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 7 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 3 tot 6 cm lang met diverse verspreid aanwezige bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit scheutjes van 3 tot 6 cm lang met verspreid staande bladeren (foto's 16 en 17), eventueel wat callus aan het wondvlak. Deze worden in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 7 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling**1. Tussenfase**

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit scheutjes van 3 tot 6 cm lang met verspreid staande bladeren en eventueel wat callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium voor de tussenfase wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose en 8 gram agar. Voor de tussenfase worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33

2. Beworteling

Het materiaal uit de tussenfase bestaat uit scheutjes van 3 tot 6 cm lang met verspreid staande bladeren en eventueel wat callus en uitscheiding aan het wondvlak. Dit wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt, afhankelijk van het ras, DKW/Juglans-medium op een kwart sterkte gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 9 gram agar, of McCrown Woody Plant Medium, WPM-medium, per liter aangevuld met 25 gram saccharose, 1,0 mg IAA en 7 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 19°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharder

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 3 cm met verspreid staande bladeren en diverse bruine lange wortels (foto's 18 en 19). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het opgeplant wordt op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 20).

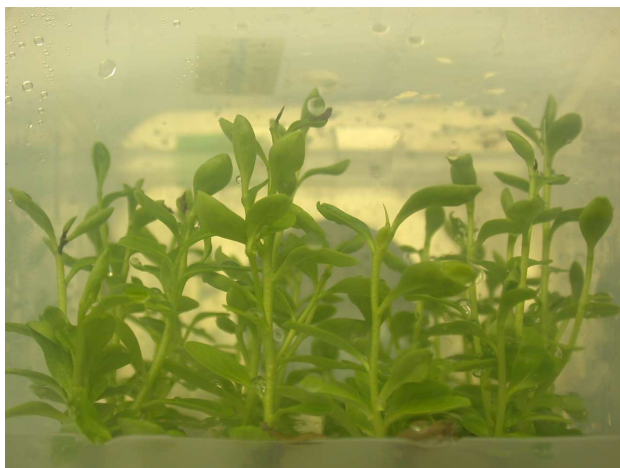


Foto 16. Vermeerdering Daphne in container.



Foto 17. Uitgroei Daphne voor snijden.



Foto 18. Beworteling Daphne.



Foto 19. Beworteling Daphne, onderaanzicht.



Foto 20. Afharden Daphne.

5.6. Protocol Delphinium

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen planten met goed ontwikkelde ogen aan de basis die zich op de verharde plantendelen onder de grond bevinden. Inzet kan het gehele jaar door plaats vinden echter bij voorkeur vroeg in het voorjaar of in het najaar wanneer de nieuwe ogen nog niet zijn uitgelopen. Indien ze al uitgelopen zijn dienen deze niet groter te zijn dan 5 cm. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

Van de plantdelen wordt de grond verwijderd en gespoeld onder stromend water. De ogen worden ruim uit de verharde plantendelen gesneden.

2. Ontsmettingsprocedure

De uitgesneden ogen worden gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 15 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

Uit het oog wordt grofweg het groeipunt geprepareerd met behulp van een binoculair. Het groeipunt wordt nogmaals gesteriliseerd met 1% (w/v) natriumhypochloriet-oplossing gedurende 1 tot 2 minuten, gevolgd door 1 keer spoelen met steriel water gedurende 5 minuten. Het groeipunt wordt verder uitgeprepareerd tot een meristeem met een grootte van 2 tot 4 mm.

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,01 mg IBA en 2 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat geënt waarbij het groeipunt op het medium geplaatst wordt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaat een plant van 2 tot 4 cm met aan de basis een of meerdere kleine scheuten. De scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit clumbjes van 2 tot 4 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten (foto's 21 en 22) met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak. Deze worden verdeeld in 1 grote scheut met 1 á 2 kleine scheuten. Bladeren worden ingekort tot 2 cm; eventueel aanwezig callus taps wegsnijden maar rand met ogen laten zitten.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,01 mg IBA en 2 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per

container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbs van 2 tot 4 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt tot enkele scheuten gesneden, waarbij te lang blad wordt ingekort. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd waarbij de basis taps gesneden wordt in een v-vorm. Let op dat de groeipunten niet afgesneden worden.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 9 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 tot 6 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 4 cm met diverse, verspreid staande bladeren en wat uitscheiding aan de basis (foto 23). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het opgeplant wordt op een 104-gaats tray in een mix van finnpeat en perlite. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 24).



Foto 21. Vermeerdering Delphinium in container.



Foto 22. Clumbs Delphinium voor snijden.



Foto 23. Beworteling Delphinium, onderaanzicht.



Foto 24. Afharden Delphinium.

5.7. Protocol Helleborus

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen planten met goed ontwikkelde ogen aan de basis op de verharde plantendelen die zich onder de grond bevinden. Inzet kan het gehele jaar door plaats vinden maar bij voorkeur in het voorjaar na de bloei. Uitgelopen scheuten dienen niet groter te zijn dan 5 cm. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

Van de plantdelen wordt de grond verwijderd en gespoeld onder stromend water. De ogen worden ruim uit de verharde plantendelen gesneden.

2. Ontsmettingsprocedure

De uitgesneden ogen worden gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 15 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

Uit het oog wordt grofweg het groeipunt geprepareerd met behulp van een binoculair. Het groeipunt wordt nogmaals gesteriliseerd met 1% (w/v) natriumhypochloriet-oplossing gedurende 1 tot 2 minuten, gevolgd door 1 keer spoelen met steriel water gedurende 5 minuten. Het groeipunt wordt verder uitgerepareerd tot een meristeem met een grootte van 2 tot 4 mm

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,8 mg GA₃ en 7 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat geënt waarbij het groeipunt op het medium geplaatst wordt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaat een plant van 2 tot 6 cm met aan de basis een of meerdere kleine scheuten. De scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit clumbs van 4 tot 6 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten (foto's 25 en 26) met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak. Deze worden verdeeld in 1 grote scheut met 1 à 2 kleine scheuten. Bladeren worden ingekort tot 2 cm; eventueel aanwezig callus taps wegsnijden maar rand met ogen laten zitten.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,8 mg GA₃ en 7 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbs van 4 tot 6 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt tot enkele scheuten gesneden, waarbij te lang blad wordt ingekort. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd waarbij de basis taps gesneden wordt in een v-vorm.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 9 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 tot 6 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 4 cm met diverse, verspreid staande bladeren en wat uitscheiding aan de basis (foto 27). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het wordt opgeplant op een 104-gaats tray in een mix van finnpeat en perlite. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 8 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 28).



Foto 25. Vermeerdering Helleborus in container.



Foto 26. Clumbs Helleborus voor snijden.



Foto 27.. Beworteling Helleborus, onderaanzicht.



Foto 28. Afharden Helleborus.

5.8. Protocol Hippophae

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen net uit rust zijnde, jonge scheuten van ongeveer 5 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in stekken van ongeveer 2 cm gesneden. Eventueel blad wordt verwijderd indien dit groot is.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde stekken worden tot 1,5 cm gesneden. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt McCrown Woody Plant Medium, ofwel WPM-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,25 mg BAP en 6,5 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 19°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan er scheutjes van ongeveer 2 tot 4 cm lang. De scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit een clumbje scheutjes van ongeveer 2 tot 4 cm lang met verspreid staande bladeren en wat bruin callus (foto 29). De clumbjes worden in tweeën of drieën gedeeld waarbij de lange scheutjes nog gedeeld worden in top- en tussenstekken. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt WPM-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,5 mg BAP en 6,5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 clumbjes op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 19°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling (voorlopig)

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbjes van ongeveer 2 tot 4 cm lang met verspreid staande bladeren, scheutjes aan de basis en wat bruin callus wordt in clumbjes van 2 tot 3 scheutjes gesneden, waarbij de basis niet schoongesneden wordt. De clumbjes worden ingekort tot ongeveer 1,5 cm.

Als medium wordt WPM-medium gebruikt, per liter aangevuld met 25 gram saccharose, 0.1 mg BA, 0,1 mg IBA en 7 gram agar. Dit geeft een bewortelingspercentage tussen de 10 en 30%. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal (foto 30) bestaat uit een clumbje van ongeveer 2,5 cm met verspreid staande bladeren en diverse wortels. De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden.

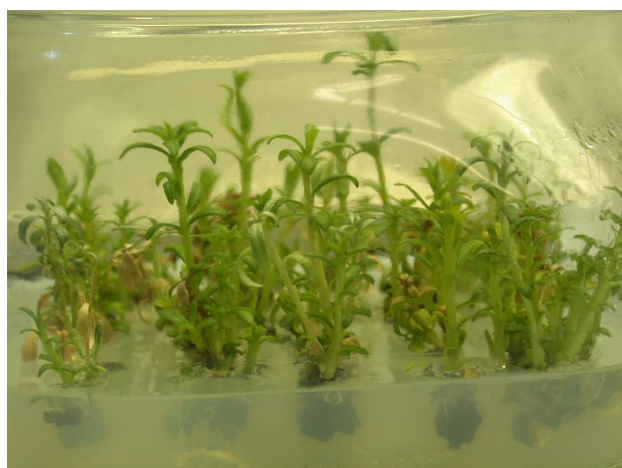


Foto 29. Vermeerdering Hippophae in container.



Foto 30. Beworteling Hippophae.

5.9. Protocol Hydrangea (type macrophylla en quercifolia)

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 20 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

Voor type macrophylla worden van de jonge scheuten de toppen gesneden. Voor type quercifolia worden de jonge scheuten in oogstekken van ongeveer 3 cm gesneden. Bij het snijden wordt rekening gehouden met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden ingekort tot 1 - 1,5 cm.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

Voor type macrophylla wordt uit de top met behulp van een binoculair het groeipunt geprepareerd. Het groeipunt wordt nogmaals gesteriliseerd met 0,5 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing gedurende 1 tot 2 minuten, gevolgd door 1 keer spoelen met steriel water gedurende 5 minuten. Het groeipunt wordt verder uitgeprepareerd tot een meristeem met een grootte van 2 tot 4 mm. Voor type quercifolia worden de gesteriliseerde oogstekken tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt voor type macrophylla Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 8 gram agar gebruikt. Voor type quercifolia wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 7 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan bij type macrophylla kleine plantjes die uitgroeien tot 1 à 2 cm. Type quercifolia geeft uit de inzet scheutjes van 3 tot 6 cm lang met diverse bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit scheutjes van 2 tot 6 cm lang met diverse bladeren, voor type macrophylla als enkele scheutjes (foto 31) en type quercifolia vaak

met zijzscheuten aan de basis (foto 32) met eventueel wat callus aan het wondvlak. De scheuten worden enkel en in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt voor type macrophylla MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,5 mg BAP en 6 gram agar. Voor type quercifolia wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 1 mg zeatine en 7 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit scheutjes van 2 tot 6 cm lang met diverse bladeren, voor type macrophylla als enkele scheutjes en type quercifolia vaak met zijzscheuten aan de basis, met eventueel wat callus aan het wondvlak, wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt voor type macrophylla MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,3 mg IAA en 6 gram agar. Voor type quercifolia wordt een aangepast voedingmedium gebruikt (tabel 3), per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 5 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 tot 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 1,5 cm met verspreid staande bladeren, diverse wortels en wat uitscheiding aan de basis (foto's 33 en 34). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto's 35 en 36).

Tabel 3. Overzicht zoutensamenstelling bewortelingsmedium.

Zouten		Aantal mg per liter
Macro	Kaliumnitraat	495
	Amoniumnitraat	830
	Calciumnitraat	1181
	Magnesiumsulfaat	185
	Kaliumwaterstoffosfaat	85
	Natriumwaterstoffosfaat	136
	ijzerEDTA	25
Micro	$\frac{1}{2}$ MS	
Vitaminen	MS	



Foto 31. Vermeerdering *H. macrophylla*.



Foto 32. Vermeerdering *H. quercifolia*.



Foto 33. Beworteling *H. quercifolia*.

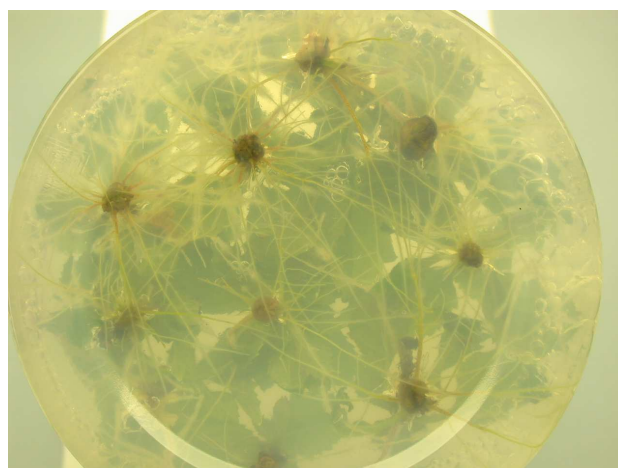


Foto 34. Beworteling *H. quercifolia*, onderaanzicht.



Foto 35. Afharden *H. macrophylla*.



Foto 36. Afharden *H. quercifolia*.

5.10. Protocol Liquidambar

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 30 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken gesneden. Aangezien de bladeren verspreid over de stengel zitten, worden er stekken van ongeveer 3 cm genomen, waarbij er rekening gehouden wordt met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt McCrown Woody Plant Medium, ofwel WPM-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,5 mg BAP en 6,5 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan er scheutjes van ongeveer 2 cm lang met zijscheutjes aan de basis. De scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit een clumbje scheutjes van ongeveer 2 cm lang met verspreid staande bladeren (foto 37), scheutjes aan de basis en wat bruin callus. De clumbjes worden in tweeën of drieën gedeeld waarbij de lange scheutjes nog gedeeld worden in top- en tussenstekken. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd. Als medium wordt WPM-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,5 mg BAP en 6,5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 clumbjes op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbjes van ongeveer 2 cm lang met verspreid staande bladeren, scheutjes aan de basis en wat bruin callus wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd. De enkele scheutjes worden op bewortelingsmedium geplaatst.

Als medium wordt WPM-medium op halve sterkte gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 0,1 mg IBA en 6 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 1,5 cm met verspreid staande bladeren en diverse bruine lange wortels. De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 38).



Foto 37. Vermeerdering clumbs Liquidambar voor snijden.



Foto 38. Afharden Liquidambar.

5.11. Protocol Mahonia

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 15 - 20 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken van ongeveer 2 - 3 cm gesneden. Hierbij wordt rekening gehouden met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 7 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 1 tot 1,5 cm lang met diverse bladeren en eventueel wat uitscheiding aan de basis. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit clumbjes met scheutjes van 1 tot 1,5 cm lang met diverse bladeren, vaak zijscheuten aan de basis (foto 39), eventueel wat callus en uitscheiding aan het wondvlak. De scheuten worden enkel gesneden en bij voldoende scheutlengte (> 2 cm) in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 3 mg BAP en 8 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbjes van 1 tot 1,5 cm lang met diverse bladeren, vaak zijscheuten aan de basis en wat callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt enkel gesneden. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt McCrown Woody Plant Medium, ofwel WPM-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 2,0 mg IBA en 5 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 1,5 cm met verspreid staande bladeren, diverse gele wortels en wat uitscheiding aan de basis (foto's 40 en 41). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 42).



Foto 39. Vermeerdering clumbs Mahonia voor snijden.



Foto 40. Beworteling Mahonia in container.



Foto 41. Beworteling Mahonia, onderaanzicht



Foto 42. Afharden Mahonia.

5.12. Protocol Malus

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten (beworteld stek) van ongeveer 15 cm. Onder normale omstandigheden is dit het voorjaar/zomer. Dit kan vervroegd worden door de planten in een kas voor te trekken. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken gesneden. Aangezien de bladeren verspreid over de stengel zitten worden er stekken van ongeveer 3 cm genomen, waarbij er rekening gehouden wordt met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 1,0 mg BAP, 0,3 mg/l IBA en 6 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 2 tot 4 cm lang met diverse verspreid aanwezige bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat een clumbje scheutjes van 2 tot 4 cm lang met verspreid staande bladeren (foto's 43 en 44), eventueel wat callus aan het wondvlak. Deze worden in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,5 mg BAP en 6 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling (voorlopig)

Het materiaal, dat bestaat uit clumbjes van 2 tot 4 cm lang met verspreid staande bladeren, eventueel wat callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt MS-medium op halve sterkte gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 6 gram agar. Dit geeft een bewortelingspercentage tussen de 30 en 50%. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 19°C en 12 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33, waarbij de eerste week het materiaal in volledig donker geplaatst wordt.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 2 tot 3 cm met verspreid staande bladeren en diverse wortels (foto 45). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 46).



Foto 43. Vermeerdering Malus in container.



Foto 44. Clumbs Malus voor snijden.



Foto 45. Beworteling Malus in buis.



Foto 46. Afharden Malus.

5.13. Protocol *Phyllostachys*

a) Voorfase (voorlopig)

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende scheuten. Onder normale omstandigheden geldt hiervoor het voorjaar/zomer. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet (voorlopig)

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken gesneden en het blad wordt verwijderd.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 3,0 mg BAP en 400 mg actieve kool. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 5 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering (voorlopig)

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 3 tot 6 cm lang met diverse aanwezige bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het inzetmateriaal dient wortel te schieten om tot vermeerdering over te kunnen gaan. Het aanzetten tot wortelvorming is niet gevonden, echter spontaan schieten enkele explantaten wortel.

Het vermeerderingsmateriaal bestaat een clumbje scheutjes van 5 tot 10 cm lang met verspreid staande bladeren (foto 47). Deze worden in clumbjes van 2 tot 3 scheuten gesneden, waarbij ieder clumbje van een wortel voorzien moet zijn. Scheuten worden ingekort tot ongeveer 3 cm.

Als medium worden afwisselend twee media gebruikt, op basis van MS-medium, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 3,0 mg BAP, 2,0 mg kinetine en afwisselend met en zonder 400 mg actieve kool. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 50 ml medium gebruikt. Per container worden 5 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling (voorlopig)

Het materiaal, dat bestaat uit clumbjes van 5 tot 10 cm lang met verspreid staande bladeren, wordt in clumbjes van 2 tot 3 scheuten gesneden, waarbij ieder clumbje van een wortel voorzien moet zijn. Lange scheuten worden ingekort tot ongeveer 3 cm.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 3,0 mg BAP en 400 mg actieve kool. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een clumbje scheutjes van ongeveer 4 tot 7 cm met verspreid staande bladeren en diverse wortels. De plantjes worden in het laboratorium of in de kas, voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden.



Foto 47. Vermeerdering Phyllostachys voor snijden.

5.14. Protocol Pioen

a) 1. Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen planten met goed ontwikkelde ogen op de knolvormige wortels. Inzet vindt bij voorkeur in het voorjaar plaats na dat de kiemrust gebroken is. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) 2. Inzet

1. Voorbereiding

Van de knolvormige wortels wordt de grond verwijderd. Vervolgens worden ze gespoeld onder stromend water. De ogen worden ruim uit de wortels gesneden.

2. Ontsmettingsprocedure

De uitgesneden ogen worden gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 15 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

Uit het oog wordt grofweg het groeipunt geprepareerd met behulp van een binoculair. Het groeipunt wordt nogmaals gesteriliseerd met 1% (w/v) natriumhypochloriet-oplossing gedurende 1 tot 2 minuten, gevolgd door 1 keer spoelen met steriel water gedurende 5 minuten. Het groeipunt wordt verder uitgerepareerd tot een meristeem met een grootte van 2 tot 4 mm

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,8 mg GA₃ en 7 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

c) 3. Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaat een plant van 2 tot 6 cm met aan de basis een of meerdere kleine scheuten (foto 48). De scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit clumbs van 4 tot 6 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten (foto 49) met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak. Deze worden verdeeld in 1 grote scheut met 1 á 2 kleine scheuten. Bladeren worden ingekort tot 2 cm; eventueel aanwezig callus taps wegsnijden maar rand met ogen laten zitten.

Als medium wordt MS-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 10 gram glucose, 2,0 mg BAP, 0,8 mg GA₃ en 5,5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 8 weken bij 15°C en 12 uur TL licht, 35 µE/s/m² per dag, kleur 33.

d) 4. Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit clumbs van 4 tot 6 cm lang met een hoofdscheut en verschillende kleinere scheuten met wat bruin callus en uitscheiding aan het wondvlak, wordt tot enkele scheuten gesneden, waarbij te lang blad wordt ingekort. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd waarbij de basis taps gesneden wordt in een v-vorm.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose, 1,0 mg IBA en 9 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt. Het materiaal wordt gedurende 4 weken geïnduceerd bij 9°C in het donker en daarna bij 9°C in het licht, 12 uur TL, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33. Vervolgens wordt het materiaal 8 weken bij 5°C geplaatst in het licht, 12 uur TL, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33. Vóór het afharden wordt het materiaal 1 week bij 15°C geplaatst in het licht, 12 uur TL, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) 5. Afharden (voorlopig)

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 4 cm met verspreid staande bladeren, diverse wortels en wat uitscheiding aan de basis (foto 50 en 51). De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104-gaats tray in een mix van finnpeat en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 8 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden (foto 52). Het slagingspercentage in deze fase ligt echter niet hoger dan 25 procent.

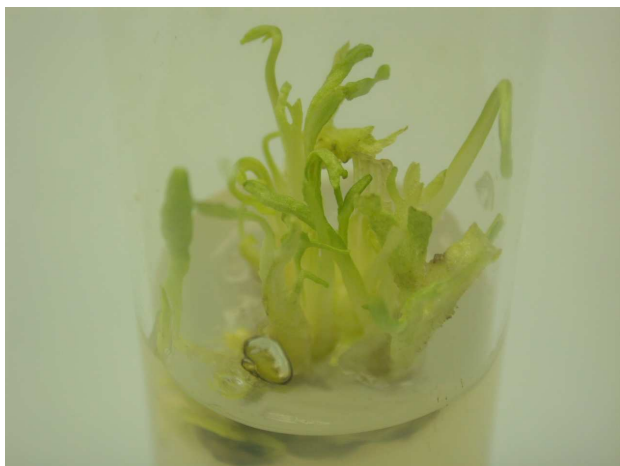


Foto 48. Uitgroei meristeam pioen na initiatie.



Foto 49. Vermeerdering pioen in container.



Foto 50. Beworteling pioen, onderaanzicht.



Foto 51. Beworteling pioen, planten uitgehaald.



Foto 52. Afharderen pioen.

5.15. Protocol Rosa (onderstam en cultivar)

a) Voorfase

Als uitgangsmateriaal dienen goed groeiende, jonge scheuten van ongeveer 30 cm. Dit kan in principe jaarrond indien de planten in een kas gekweekt worden. Verder dient het materiaal gezond te zijn. De selectie van goed uitgangsmateriaal is bepalend voor het slagen van weefselkweek en het soortecht terugkomen van het materiaal.

b) Inzet

1. Voorbereiding

De jonge scheuten worden in oogstekken gesneden. Aangezien de bladeren verspreid over de stengel zitten worden er stekken van ongeveer 3 cm genomen, waarbij er rekening gehouden wordt met ongeveer 1 - 1,5 cm extra stengel onder en boven de ogen. Het blad wordt verwijderd en de bladstelen worden tot 1 - 1,5 cm ingekort.

2. Ontsmettingsprocedure

Indien het materiaal vuil is worden de stekjes onder stromend water gespoeld. Vervolgens worden ze gesteriliseerd door ze achtereenvolgens 10 seconden te dompelen in 80 % (v/v) ethanol-oplossing, gevolgd door 30 minuten 1 % (w/v) natriumhypochloriet-oplossing met 1 druppel Tween 20 per liter. Na de sterilisatie wordt er 3 keer gespoeld met steriel water gedurende 1, 5 en 15 minuten.

3. Explantaten

De gesteriliseerde oogstekken worden tot enkele ogen gesneden. Onder het oog moet er een stukje steel blijven zitten van $\pm 0,5$ cm. Alle door chloor aangetaste delen worden weggesneden.

Als medium wordt Murashige en Skoog 1962, ofwel MS-medium, gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP en 6 gram agar. Voor de inzet worden glazen buizen (2,5 x 15 cm.) met 15 ml medium gebruikt. Per buis wordt een explantaat op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

c) Vermeerdering

1. Eerste fase vermeerdering

Uit de inzetfase ontstaan scheutjes van 3 tot 7 cm lang met diverse verspreid aanwezige bladeren. De goed groeiende scheutjes worden visueel op besmetting gecontroleerd, gevolgd door een toets op de aanwezigheid van latente bacteriën, waarbij ieder scheutje individueel getest wordt. Alleen de scheuten die vrij van bacteriën zijn worden voor het vervolg in weefselkweek gebruikt.

2. Vermeerdering

Het vermeerderingsmateriaal bestaat uit scheutjes van 3 tot 7 cm lang met verspreid staande bladeren (foto's 53 en 54) en eventueel wat uitscheiding aan het wondvlak. Deze worden in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft. Eventueel aanwezig callus wordt verwijderd.

Als medium wordt DKW/Juglans-medium gebruikt, per liter aangevuld met 30 gram saccharose, 0,1 mg BAP, 5 mg/l GA_3 en 3,5 gram agar. In de vermeerdering worden grotere kweekeenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt, waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 6 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

d) Beworteling

Het vermeerderingsmateriaal, dat bestaat uit scheutjes van 3 tot 7 cm lang met verspreid staande bladeren en eventueel wat uitscheiding aan het wondvlak, wordt in top- en tussenstekken gesneden, waarbij er onder het gesneden oog een stukje stengel aanwezig blijft.

Als medium wordt MS-medium op halve sterkte gebruikt, per liter aangevuld met 20 gram saccharose en 3,5 gram agar. Voor de beworteling worden grotere eenheden als glazen pot of plastic doosje met 100 ml medium gebruikt. Per container worden 16 explantaten op het medium geënt waarbij het oog boven het medium blijft. Het materiaal wordt gekweekt gedurende 4 weken bij 23°C en 14 uur TL licht, 35 $\mu\text{E/s/m}^2$ per dag, kleur 33.

e) Afharden

Het bewortelde materiaal bestaat uit een scheutje van ongeveer 2 cm met verspreid staande bladeren, diverse bruine lange wortels en wat uitscheiding aan de basis. De plantjes worden in het laboratorium of in de kas voorzichtig uit het medium gehaald. Eventuele mediumresten worden verwijderd waarna het op een 104gaats tray in een mix van turf en perlite opgeplant wordt. De trays worden bevochtigd en onder tunnels geplaatst. Het materiaal wordt de eerste twee weken onder hoge luchtvochtigheid aangezet tot de vorming van nieuwe wortels en de eerste uitgroei van de scheut. Na de eerste weken wordt gestart met luchten waarmee de plantjes wennen aan de lagere luchtvochtigheid. Na 6 weken is het materiaal voldoende uitgegroeid en spreken we van een semi-afgehard plantje dat uitgeleverd kan worden.



Foto 53. Vermeerdering Rosa (onderstam).

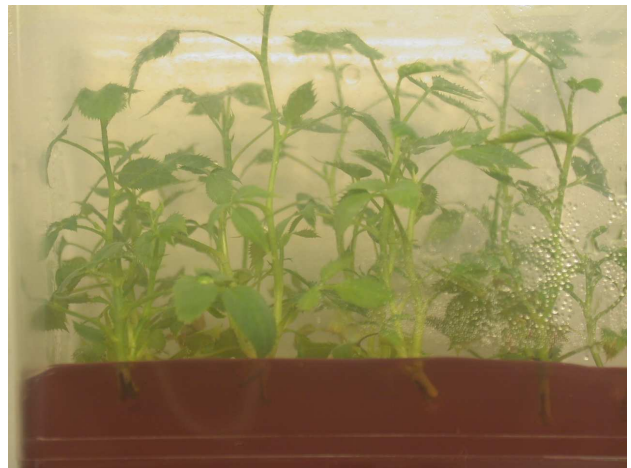


Foto 54. Vermeerdering Rosa (cultivar).

6. Conclusies

6.1. Weefselkweek

Het ontwikkelen van weefselkweekprotocollen voor de in het project opgenomen gewassen is goed verlopen. Voor de gewassen Clematis, Cotinus, Daphne, Delphinium, Helleborus, Hydrangea, Liquidambar, Mahonia en Rosa is een volledig protocol ontwikkeld. Van de gewassen Anemone, Berberis, Hippophae, Malus, Paeonia en Phyllostachys is een groot deel van het protocol ontwikkeld, waarbij er bij diverse van deze gewassen het protocol binnen handbereik is. De ontwikkeling van het protocol voor het gewas Pseudopanax is niet uitgevoerd wegens het uitvallen van het materiaal gedurende de inzetfase en het niet beschikbaar zijn van nieuw materiaal ter inzet.

6.2. Praktijk

Van de gewassen Berberis, Cotinus, Daphne, Delphinium, Helleborus, Hippophae, Hydrangea, Liquidambar, Mahonia, Malus, Phyllostachys en Rosa (1 ras) is materiaal uitgeleverd. Van de geleverde Delphiniumrassen is gebleken dat de verbeterde kwaliteit door het gebruik van antioxidanten niet tot een betere of snellere doorgroei in de kas leidt; het materiaal groeit normaal weg, gelijk de controle. Van het gebruik van een type oxidatieremmer is gebleken dat het tot bloeiafwijkingen leidt. Om die reden wordt dit type antioxidant niet verder gebruikt. Van de uitgeleverde Hydrangea (quercifolia) is gebleken dat het weefselkweek vermeerderingsmateriaal direct te stekken is en een betere doorgroei heeft dan het materiaal dat eerst beworteld is. De Liquidambar, ingebracht vanwege de kleur van de stam, vertoont dezelfde eigenschappen als de moederplant. Ook het materiaal van de Mahonia is volledig soortecht beoordeeld. Van de overige gewassen is geen reactie ontvangen. Voor een deel komt dit omdat het materiaal nog niet voldoende gegroeid is.

7. Aanbevelingen

Met het afronden van het project is het verloop geëvalueerd. Vooropgesteld dat dit project bewezen heeft dat er via het samenwerkingsverband tussen sector en laboratorium een goede wending aan de problematiek van de houtige en boterbloemachtige gewassen gegeven is, zijn er een aantal punten ter aanbeveling te noemen. Omdat niet voor alle gewassen het eindresultaat volledig gehaald is, is het opzetten van een aanvullend project waarin de aanpak van deze problemen gecontinueerd kan worden een goed vervolg. Wanneer het project organisatorisch bekeken wordt is gebleken dat toezeggen en deelnemen twee verschillende zaken gebleken zijn. Voor de toekomst is het verstandiger de bedrijven die interesse in deelname hebben deze eerst contractueel vast te leggen. Dit zal een hoop aanloopproblemen voorkomen en de continuïteit bevorderen. Daarnaast is gebleken dat het tweede gedeelte van het project, de kwekersbijdrage in tijd, lastig te documenteren is gebleken. Vanuit de kwekers is nauwelijks reactie ontvangen op de declaratie van tijdsbesteding, terwijl de tijd hieraan wel besteed is.