Vermeerderingsonderzoek aan populier in kweekbuizen

P. Evers en A. Prat
Rijksinstituut voor onderzoek in de Bos- en Landschapsbouw "de Dorschkamp"
Wageningen

Inleiding

In vitro technieken bij Populier hebben in de USA, China en Nieuw Zeeland reeds toepassing in de praktijk gevonden (zie bijlage 1). Er resten voor een grootschalige toepassing nog vele problemen. In augustus 1981 werd het onderzoek naar de mogelijkheden van vegetatieve vermeerdering van de Populier in vitro bij de Dorschkamp gestart. Om de bruikbaarheid van de methoden op diverse soorten en hybriden te toetsen werden 3 klonen van zowel P. trichocarpa, P. "Robusta" als P. deltoides in het onderzoek betrokken alsmede 2 alba x glandulosa hybriden. Het doel is te komen tot een methode van massavermeerdering van ziektevrij uniform materiaal die door tijdwinst de uitgifte en toepasbaarheid in de praktijk aanzienlijk versnelt. Basis van deze winst zijn de enorme aantallen planten die in korte tijd met deze methode te kweken zijn. Naast de vermeerdering worden er methoden voor ziektevrije verzending van Populier in vitro en genenbewaring in vitro ontwikkeld. In de toekomst zullen ook Espen in het onderzoek worden betrokken. Het huidige weefselkweekproject, dat een planning heeft tot 1986, wordt financieel ondersteund door de EEG (DG XII).

Voorwoord
Dit artikel beschrijft het onderzoek naar een snelle vermeerderingsmethode voor populier. Het vermeerderen van populieren d.m.v. kweekbuizen maakt het mogelijk om in zeer korte tijd met een minimum aan materiaal, populier in grote hoeveelheden te vermeerderen. Hoezeer deze methode in de belangstelling staat is af te leiden uit de bijdragen van het 'Direktoraat Generaal voor de Energievoorziening' (DG XII) van de EEG. Ook de Nationale Populieren Commissie heeft dit onderzoek gesteund.
Dit artikel is een verslag van een wetenschappelijk onderzoek. Onontkoombaar bij een dergelijk verslag is het gebruik van specifieke vaktermen. Meestal wordt, door de redaktie van 'Populier' en de onderzoeker/auteur, van een wetenschappelijk verslag een, voor niet-deskundigen gemakkelijk leesbaar, artikel samengesteld. Bij dit verslag was dit niet goed mogelijk. Derhalve is hier een verduidelijking gegeven van de in het artikel gebruikte specifieke vakterminilogie.

Red.

in vitro	— in kweekbuizen
in vivo	— in de kas
initieel weefsel	— uitgangsweefsel
het terminale deel	— het eindstuk
stengelstrekking	— verlenging van stengeldelen als gevolg van vochtopname.
Hoogland's zouten, medium van Murashige en Skoog	— oplossing met bepaalde samenstelling
etoileren	— uitschieten en vergelen
endogene infekties	— reeds in het vermeerderingsmateriaal aanwezige infekties
explantaat	— vermeerderingsmateriaal (plantdelen)
terminale knoppen	— eindknoppen
axillaire knoppen	— zijknoppen
Tween	— oppervlaktespanning verlagend middel ('uitvloeier')
lethaal	— dodelijk
medium	— voedingsbodem
apicale	— zie: 'terminale'
meristeem	— knop-beginsels
bladprimordia	— blad-beginsels
auxine	— bewortelings-stimulerend hormoon
cytokinine	— groei-stimulerend hormoon voor bovengrondse plantdelen.
turgor	— vochtspanning van het celvocht

Plantfaktoren

Tijd van plantinname.
Van augustus tot november bleek het in eerste instantie zeer moeilijk knopmateriaal van Populieren in kweekbuizen tot ontwikkeling te brengen. Het is de minst gunstige periode om initieel weefsel te isoleren voor de in vitro vermeerdering indien geen rustverbrekende maatregelen aan boom of takken worden uitgevoerd. Het knopmateriaal kan niet van planten buiten de kas gesneden worden omdat dit teveel infectieproblemen in de kweekbuizen geeft (tot 100%); de stengelstrekking en bladontwikkeling van deze knoppen is langzamer dan bij geforceerd materiaal uit de kas.

Forceren
Getracht werd de knopaktiviteit te verhogen door het terminale deel van takken van moerstoven in vazen in de kas voor te trekken bij 20°c. De 50-70 cm lange takken werden per 10 in een vaas (Ø 10 cm) geplaatst die 3 l Hoagland's zouten alsmede 3% saccharose bevatte. De forceringsperiode hing uiteraard af van de tijd in het seizoen. Forceren van takken zonder koudebehandeling veroorzaakte vooral in de herfst bij de meeste knoppen een langdurige bloedingsreaktie die de ontwikkeling in vitro remde. Het bloedingsvocht kleefde

aan de zich ontwikkelende blaadjes en was in hoge mate verontreinigd. Het bloeden nam na november en in de herfst na een koudebehandeling sterk af. Een aanzienlijke verbetering van de aanvankelijke ontwikkeling in vitro alsmede een reduktie van de negatieve invloed van het bloeden werd bereikt door de vazen in een gedesinfecteerde plastic tunnel te plaatsen bij een luchtvochtigheid van 85%. Deze hoge vochtigheid resulteerde echter in een sterke toename van het aantal bacteriële infecties later in de kweekbuizen zelfs na het herhaald ontsmetten van de tunnel met Halamid, de takken met zeep (Decon 1:10) en alcohol (96%) en het vaaswater met chloor (2 drup van 16% per liter).

Rustverbreking
Een koudebehandeling van de takken (verpakt in plastic) van 6-8 weken bij 3° C resulteerde in een snelle knopuitloop bij alle soorten in de tunnel (20° C). Na de herfst werd de noodzakelijke koudeperiode korter; na januari kon volstaan worden met de forceringsbehandeling. Knoppen van korter rustverbroken takken waren schoner maar de ontwikkeling was langzamer. Knoppen van takken die in augustus en september van de plant zijn gesneden en daarna bewaard bij 3° C zijn schoner dan die van takken die in de winter van de plant werden gesneden. Na forceren zonder koudebehandeling vertoonden P. trichocarpa takken de snelste ontwikkeling; na afsnijden van de takken in maart (natuurlijke rustverbreking) openden de knoppen bij P. ''Robusta'' het eerst. Na de gecombineerde koude-forceringsbehandeling werden de uitloopverschillen in de plastic tunnel grotendeels genivelleerd. Door koudeopslag en forceringstechnieken is het nu mogelijk het gehele jaar aktief knopmateriaal in kweekbuizen te brengen. Indien takdelen worden gebruikt (met dus aan 2 zijden een snijvlak) bestaat er de kans op plantontwikkeling in de cambiumring, vooral bij P. trichocarpa. Dit materiaal was door de neiging tot etioleren minder geschikt voor de in vitro teelt.

Endogene infecties.
Endogene bacteriële infecties blijven een probleem; bestrijding ervan heeft het leeuwendeel van de inspanningen gekost. De bacteriën begonnen hun ontwikkeling in de kweekbuis normaliter na 3-7 dagen rond de knop, maar in enkele gevallen kwam de verontreiniging pas na 12 maanden aan het licht, hoogstwaarschijnlijk door het herhaald aansnijden van plantjes met sterk gelocaliseerde infecties. Daar de percentages bacterie infecties bij knoppen van in augustus gesneden takken iets terug liepen werd aangenomen dat de endogene bacteriegroei in vitro tijdens het afharden van de bomen toe nam. Geen enkele maatregel bracht echter het infectiepercentage beneden de 50%. Gebleken is wel, dat een te hoge luchtvochtigheid in de tunnel de problemen versterkt.
Bij de pogingen, de endogene infecties kwijt te raken, werden de antibiotica rifampicine (25 mg/1) en trimethoprim (25 mg/1) in het vaaswater gebruikt. Deze stoffen remden de knopuitloop op de vaas maar niet de latere bacteriegroei in de kweekbuizen zelfs bij gelijktijdige toevoeging van beide antibiotica. Waarschijnlijk trad er wel een verschuiving op in de soorten bacteriën, die zich op de voedingsbodem ontwikkelden. De afdeling fytopathologie van de Dorschkamp tracht de belangrijkste endogene bacteriën uit de knoppen te identificeren om een meer specifieke bestrijding met een antibiotica-coctail mogelijk te maken.

Het explantaat

Oppervlaktesterilisatie.
Van de planten werden geisoleerd: knoppen (terminaal en axillair), knopen met axillaire knoppen en net uitgelopen scheutjes. De laatstgenoemde explantaten vertoonden de sterkste groeikracht in vitro maar gaven de grootste problemen met de sterilisatie: een hoog infectiepercentage en een grote gevoeligheid voor het sterilisatiemiddel. Voor de genoemde explantaten werden 2 methoden van oppervlaktesterilisatie ontwikkeld:
1. Wassen met zeep (Decon 1:4); daarna 10 seconden in alcohol (70%) gevolgd door onderdompeling (20 minuten) in bleekwater (NaOC1 1,6-2,0%) met 2 druppels Tween 20 per 150 ml. Een concentratie NaOC1 van 3% was lethaal. Het NaOC1 werd uitgespoeld met gesteriliseerd water (3x10 minuten). Bij aanwezigheid van zeer jonge bladeren werd de zeepbehandeling niet uitgevoerd. Tevens werd de methode van het in China veel toegepaste herhaald steriliseren tijdens de opeenvolgende fasen van het uitprepareren gebruikt. Hierbij werd alleen de bleek- en uitspoelmethode herhaald. In de gehele procedure werden afhankelijk van de tijd in het seizoen en uitloopstadium van de knoppen modificaties aangebracht.
2. Onderdompeling in kwik ($HgC1_2$ 0,2%) gedurende 10 minuten. Een concentratie van 1% is lethaal. Het kwik werd verwijderd door uitwisseling tegen $CaC1_2$, gevolgd door een naspoeling met gesteriliseerd water (3x10 muniten).
Het voordeel van de kwiksterilisatie was dat deze het zwaarder geinfecteerd weefsel schoon kreeg; tevens valt het kwik de endogeen groeiende bacteriën beter aan. Er trad echter vaak beschadiging van gezond weefsel op. Een ander nadeel is dat uitvoering van de methode gevaarlijk is vanwege de giftigheid van het kwik. De kwiksterilisatie werd vooral toegepast bij uitgelopen

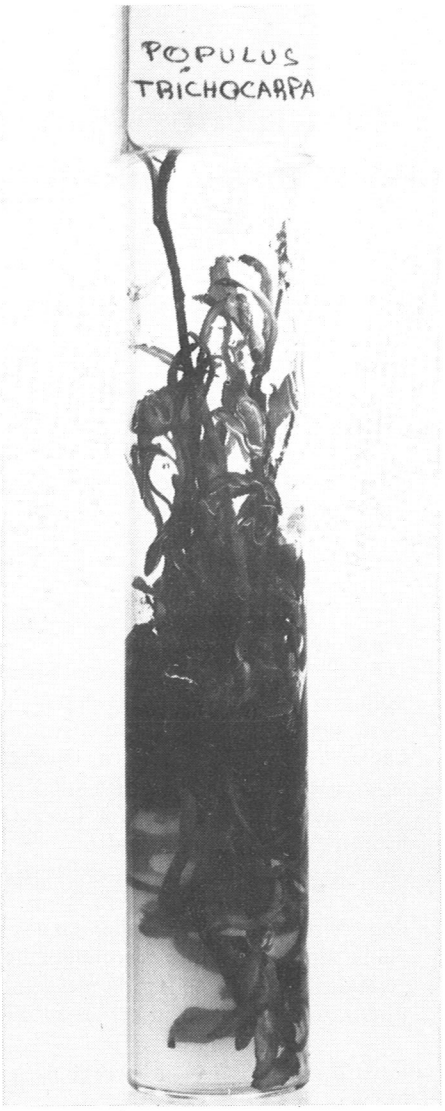


Foto 1. P. trichocarpa op MS bodem met 0,02 mg/1 NAA en 0,2 mg/1 mg/1 BAP.

scheutjes. Bij niet te ver schuivende knoppen had flamberen in combinatie met een van de oppervlaktesteririlisatiemethoden een sterk desinfecterend effekt maar er trad een vrij grote weefselbeschadiging op.

Andere methoden van infektiebestrijding.
De bij het vaaswater voor de takken toegepaste toevoegingen van antibiotica werden ook op explantaatniveau getoetst via onderdompeling (1 uur bij een concentratie van 25 mg/1) alvorens te enten of via toevoeging aan het medium (25 mg/1, gefiltersteriliseerd). Wederom kon geconcludeerd worden dat deze antibiotica de groei van de bacteriën niet afdoende remmen, zelfs niet als ze achtereenvolgens aan de tak, de knop en het medium worden toegediend. De groei van het explantaat werd wel geremd.
Schimmelinfekties werden meestal afdoende bestreden door de oppervlaktesterilisatie. De resterende schimmels werden door

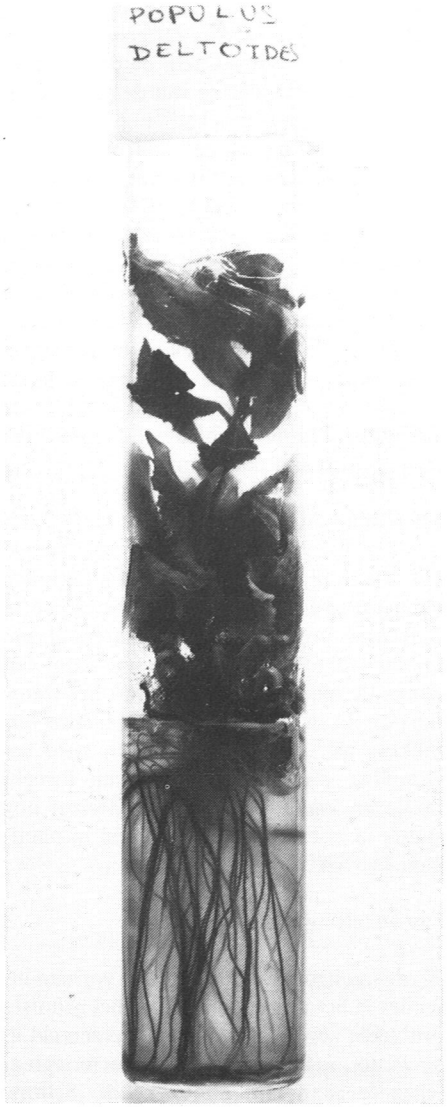


Foto 2. P. deltoides op MS bodem met 0,2 mg/l NAA (wortelontwikkeling te sterk voor uitplant).

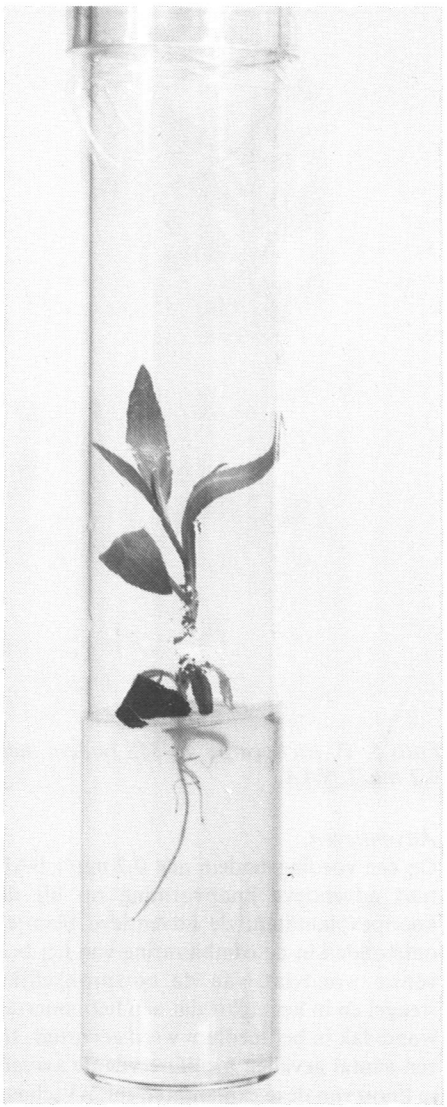


Foto 3. P. deltoides op MS bodem met 0,2 mg/l NAA (wortelontwikkeling geschikt voor uitplant).

het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO) geanalyseerd. Het fungicide Benlate (1 mg/ml) bleek als tussenspoeling (5 minuten) bij het overenten goed in staat de resterende schimmels te bestrijden zonder de kwaliteit van de in vitro planten aan te tasten.

De meest geschikte methode om alle verontreinigingen te voorkomen was het uitvoeren van meristeemkultuur: het uitpreparereren en in kultuur brengen van apicale meristeem van de knop met enkele bladprimordia. De techniek is echter moeilijk en zeer arbeidsintensief. De meest geschikte meristemen waren die van aktief in vitro groeiende knoppen. Reeds geinfecteerde knoppen waren niet geschikt voor meristeemkultuur: de verontreiniging wordt tijdens het prepareren blijkbaar op het meristeem gebracht. Een ander groot voordeel van het toepassen van meristeemkultuur is dat in principe alle ziekten van de boom in vitro kunnen worden geëlimineerd.

Prepareren.

Het prepareren gaf bij de grotere explantaten (scheuten en knoppen) enkele problemen. Bij alle kultures dienen er na een zekere aanpassingsperiode kleine in vitro blaadjes te ontstaan die blijkbaar beter functioneren dan jonge bladeren met in vivo afmetingen: deze laatsten vallen vroeger of later af. Ook bij het wortelstelsel ontstaan kleine aangepaste vormen.

In een aantal gevallen weerhielden schubben de ontwikkeling van de jongste blaadjes en dus de verdere strekking en ontwikkeling; na wegprepareren van deze schubben en opnieuw openten vervolgde de plant zijn groei. Bij de knoppen werd deze negatieve rol gespeeld door de buitenste blaadjes in wording; ook hier werd deze hindernis weggeprepareerd. Bij een voldoende groeikracht van de explantaten was een dergelijk ingrijpen niet nodig: schubben en/of bladeren werden opzij gedrukt en vielen af. Deze groeikracht hing wederom af van het tijdstip van isoleren van het plantmateriaal alsmede van de methode van koudebehandeling en rustverbreking.

Het medium

Macro/micro zouten.

De voedingsbodem heeft na de forceringsmethode de belangrijkste invloed op de richting van de ontwikkeling van de explantaten in vitro. Diverse macro- en microzoutenmedia werden in verschillende sterktes getoetst op hun invloed op de groei en ontwikkeling van de knoppen in vitro. Het medium van Murashige en Skoog had bij een sterkte van 0,5-1,0 x de meest positieve werking op de bladontwikkeling, strekking en axillairuitloop van het plantmateriaal. Knoppen van P. trichocarpa vertoonden de grootste tolerantie ten aanzien van de zoutsterkte: een goede ontwikkeling werd waargenomen op M&S bodems met een sterkte van 0,5-1,4 x alsmede op zoutarme bodems zoals die van Heller.

Suiker.

Het plantenmateriaal van populier had een relatief lage suikerbehoefte bij de initiële kultures: de optimale saccharose concentratie was 2% terwijl deze concentratie bij de douglas op 3% en bij de berk op 5% ligt. Bij sub- en supraoptimale suikerconcentraties trad er een remming van de lengtegroei van de hoofdas op.

Groeiregulatoren.

Het meest cruciale punt in de samenstelling van de voedingsbodem was de combinatie en de concentraties van de groeiregulatoren. Een normale knopontwikkeling (bladontwikkeling en een zekere strekking) trad op bij een hoge auxine-cytokinine verhouding (Naphtaleenazijnzuur:6-benzyl-amninopurine = 0,2 : 0,02 mg/1). Alvorens over te gaan tot de ''multiple shoot production'' (vorming van vele zijassen door stimulering van de axillaire knopuitloop) was een verlenging van de hoofdas en de vorming van bladeren noodzakelijk. Het stimuleren van de zijasvorming kon mechanisch decapitatie dan wel chemisch (lopmedia met alleen NAA) geschieden. Bij de mechanische methode werd de eindknop verwijderd of de hoofdas in delen gesneden. Na opnieuw enten van het plantmateriaal liepen de axillaire knoppen uit hetgeen sneller geschiedde naarmate de in vitro leeftijd van het plantmateriaal hoger was. Na 3-6 maanden (en even zovele overentingen na de eerste ingreep) verliep het vertakken steeds intensiever en werden er ook vertakkingen van de tweede orde gevormd; de zijasvorming ging in toenemende mate spontaan en werd steeds langer op dezelfde voedingsbodem gecontinueerd. Het isoleren van de axillaire scheuten en het opnieuw openten op het

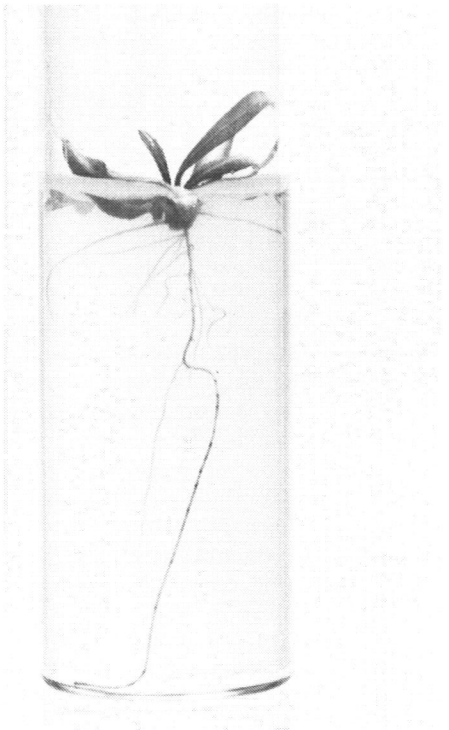


Foto 4. P. 'Robusta' op MS bodem met 0,2 mg/l NAA.

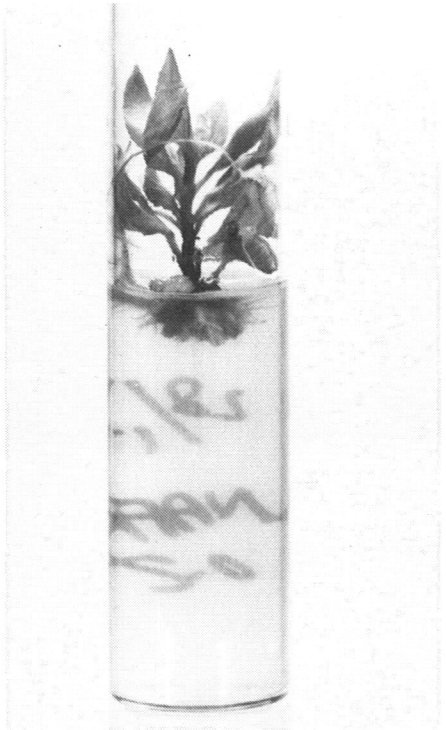


Foto 5. P. trichocarpa op MS bodem met 0,2 mg/l NAA.

uitgangsmedium leverde geen problemen op: een nieuwe "multiple shoot" behandeling kon direkt worden herhaald, ook na het in segmenten verdelen van de nieuwe zijtakken. In dit microvermeerderingssysteem was de minimum explantaatgrootte voor een goede overlevingskans in vitro 2 knopen met 2 blaadjes.

Microstekproduktie.
Gebruikmakend van de boven beschreven methoden konden de vermenigvuldigingsfaktoren in de kweekbuizen na de eerste gewenningsperiode worden bepaald bij de verschillende typen populierenmateriaal. Hierbij moet echter direct worden aangetekend, dat het om een potentiële vermenigvuldigingsfaktor gaat waarin niet de uitval in de latere vermeerderingsfasen (uitplanten etc) is verdisconteerd en die niet op praktijkschaal (1000 tallen) is getoetst. Verder zijn er aanwijzigingen, dat de faktor werd beinvloed door endogene bacteriële infekties, die niet direkt op het mediumoppervlak zichtbaar werden. Voor P. trichocarpa kon de grootste vermenigvuldigingsfaktor worden vastgesteld: ± 14 nieuwe scheutjes uit een oorspronkelijk explantaat per maand (2 overentingen). Bij maximale groei zou dit een produktie van vele miljoenen planten per jaar kunnen betekenen maar de praktijk, met name in Nieuw Zeeland, wees al uit dat een aantal secundaire faktoren (capaciteit, uitval, etc.) dit aantal niet haalbaar maakte. De vermenigvuldigingsfaktor voor P. 'Robusta' was 9, voor P. deltoides 7 per maand.

Adventieven.
Op een voedingsbodem met 0,2 mg/l BAP trad adventieve knopvorming op bij de knoopexplantaten: de adventieve plantjes ontstonden in de cambiumring van het bovenste wondvlak van de oorspronkelijke stengel en in het callus dat aan het onderste wondvlak in het medium werd gevormd. In een aantal gevallen prolifereerde de axillaire knop van deze explantaten tot 2-3 scheuten: tijdens de ontwikkeling van de axillaire knop werden in de nieuwe bladoksels alweer scheuten gevormd. Deze verschijnselen traden vooral op bij stengeldelen van P. trichocarpa. De adventieve scheuten ontstonden uit het cambium via een callus tussenfase. Gezien het risico van het ontstaan van genetische afwijkingen bij het gebruik van deze adventieve scheuten uit callus werd dit type microstek niet verder in het onderzoek betrokken.

De beworteling

Auxines.
De beworteling in vitro leverde weinig problemen op indien gebruik werd gemaakt van groene, niet geëtioleerde explantaten. Op een voedingsbodem met 0,2 mg/l van het auxine NAA bewortelde 90-100% van de plantjes. De wortels ontstonden na 5-14 dagen en bereikten na enkele dagen de bodem van de buis. De beworteling en/of uitgroei van wortels hing niet af van de grootte van de plant: ook het kleinste explantaat (2 knopen) bewortelde goed.

Het uitplanten.
Het uitplanten in de kas gaf geen probleem tenzij te lang werd gewacht na de wortelinduktie. Bij verwijdering van de plant uit de buis trad er dan beschadiging op van de wortels. Soms bleken de in vitro te ver ontwikkelde wortelstelsels in de in vivo situatie geheel niet functioneel te zijn. Uitplanten dient daarom met wortels van ongeveer 2 cm lengte te geschieden. De microstekjes werden aan de lagere luchtvochtigheid in de kas aangepast door ze gedurende 2 weken in een plastic box te kweken die langzaam werd geopend. Plantjes met een te lange stengel kregen zelfs na de gewenning aan de vochtigheid turgorproblemen: de microstek moet korter zijn dan 5 cm.

Verzending in vitro

Uit Nieuw Zeeland werden enkele klonen (Yeogi 1, Yeogi 2, Eridano) ontvangen in buizen en petrischalen. Het materiaal was onbeschadigd overgekomen en kon ondanks de temperatuurschok van het transport direkt in het systeem van axillaire vertakking worden gebracht. De in vitro beworteling was normaal. Na een kweekbuisleven van 2 jaar is het materiaal nog steeds in continue groei en goed uitplantbaar in vivo.

Samenvatting

Bij de in vitro teelt van populier vormen infecties in het uitgangsmateriaal het grootste probleem vooral bij materiaal verzameld in de winter: maatregelen om de bacteriegroei tegen te gaan zijn noodzakelijk. Schone knoppen en net uitgelopen knoppen aan takken in vazen groeien uit tot plantjes met een aangepaste bladgrootte voor de situatie in vitro. Het is nodig, de groei van de moederplaat te stimuleren voor het isoleren van explantaten dan wel het materiaal te nemen direkt voor het uitlopen in vivo. Strekking van de hoofdas, het uitlopen van axillaire knoppen en de beworteling worden sterk beinvloed door de hormoonbalans van het medium. De methoden zijn nu toepasbaar voor de praktijk; enkele prognoses worden gegeven voor de potentiële plantproduktie in vitro.

Dankbetuiging

Het onderzoek werd mede mogelijk gemaakt door financiële bijdragen van de NPC en EEG (DG XII). Technische hulp in het laboratorium werd geboden door A. Prat; supervisie in de kas had Cor Das die tevens het constructiewerk van de planttunnels verzorgde.