

Verbetering weefselkweek met pilotgewas *Alstroemeria*

Geert-Jan de Klerk

WUR Plant Breeding

PT projectnummer: 13817

Voorwoord

Alstroemeria is een van de siergewassen die op grote schaal in weefselkweek vermeerderd wordt. Vergeleken met andere in vitro vermeerderde gewassen is de vermeerdering echter onder de maat. In dit verslag wordt het promotieonderzoek van Paweena Pumisitapon samengevat. Het onderzoek liep van april 2007 tot eind 2011. Paweena Pumisitapon heeft vanuit twee invalshoeken getracht de vermeerdering te verbeteren: verbetering van de groei (=gewichtstoename) van de rizomen en stimulering van de uitgroei van okselknoppen. Zij is gepromoveerd op 8 mei 2012. De titel van haar proefschrift luidde: "Apical dominance and growth in vitro of *Alstroemeria*". Prof. R.G.F. Visser was promotor en Dr. G.J. de Klerk co-promotor. Het PT heeft gedurende 3 jaar de begeleiding van het onderzoek door Geert-Jan de Klerk financieel ondersteund. Paweena Pumisitapon had een beurs van de Thaise overheid. Dr. Pumisitapon is nu terug in Thailand en werkt aan de Maejo University, Chiangmai, Thailand. Een exemplaar van het proefschrift kan aangevraagd worden bij Geert-Jan de Klerk.

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
1. Inleiding	5
1.1. Algemeen	5
1.2. Vermeerdering	7
1.3. Verbetering van groei van de rizomen	8
1.4. Stimulering van de uitgroei van okselknoppen	10
2. Materiaal en methode	13
2.1. Plantmateriaal en weefselkweekcondities	13
2.2. Scoring aan het plantmateriaal	14
Vermeerdering	14
Gewichtstoename	14
2.3. Stress behandelingen (H. 3.2)	14
Hitte stress	14
Andere stressen	15
Bepaling van anorganische elementen en suiker in medium en weefsels	16
Meting van het auxin-transport	17
3. Resultaten en Discussie	19
3.1. Voeding	19
3.2. De invloed van milde stress op rizoombegroei	22
3.3. De hormonale regulering van de uitgroei van zijrizoombegroei	25
4. Conclusies en samenvatting	29
5. Literatuur	30
6. Publicaties, lezingen en presentaties	31
Publicaties	31
Symposia	31

1. Inleiding

1.1. Algemeen

Alstroemeria maakt deel uit van de familie van de *Alstroemeriaceae*, orde Liliales (Dahlgren et al. 1985). *Alstroemeria* soorten zijn meestal diploïd met 16 chromosomen ($2n=2x=16$) en de meeste rassen zijn triploïd ($2n=3x=24$) (Tsuchiya and Hang 1987). *Alstroemeria* komt voor in Zuid-Amerika, hoofdzakelijk in Chili en Brazilië. Sommige soorten worden gevonden in Argentinië, Paraguay, Bolivia, Peru, Ecuador en Venezuela (Aker and Healy 1990). De habitat is breed en strekt zich uit van het tropische Amazone gebied tot de sneeuwlijn van de Andes en van woestijnen tot de rivier valleien aan de kusten van de Stille Oceaan (Fig. 1.1). Daarom tolereert de soort extreme milieus (Verboom 1979).



Verschillende onderzoekers rapporteren over de botanische eigenschappen van *Alstroemeria*. Bovengronds bestaat de plant uit verticaal groeiende scheuten en ondergronds uit rizomen (wortelstokken) en wortels. Rizomen en wortels dienen ook als opslagorganen. De groei van *Alstroemeria* is sympodiaal. Sympodiale groei staat tegenover monopodiale groei. Bij sympodiale groei wordt de groei van de hoofdstengel bij een knoop niet voortgezet door het hoofdgroei punt maar door een okselknop. Bij monopodiale groei wordt de groei van de hoofdstengel wel voortgezet door het hoofdgroei punt. Bij *Alstroemeria* houdt dit het volgende in. De rizoontop groeit horizontaal ondergronds. Bij de eerste knoop verandert de groeirichting van de rizoontop naar verticaal en genereert een (verticaal groeiende) scheut.

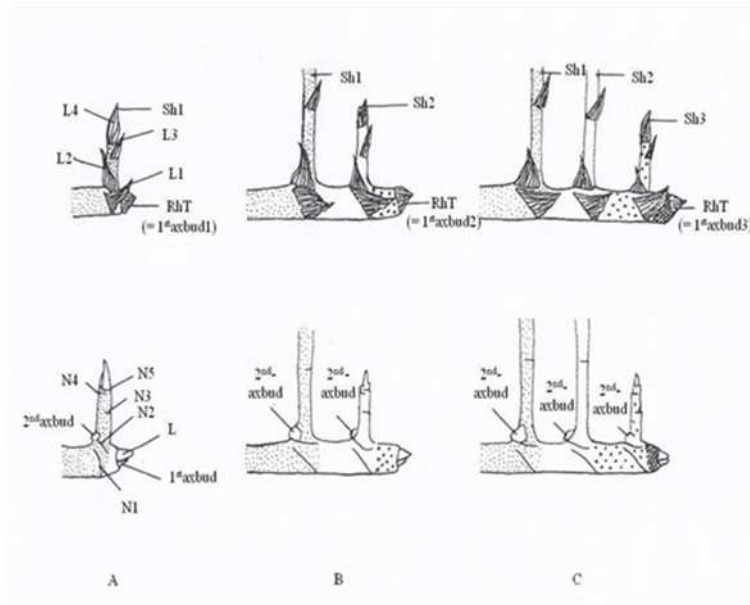


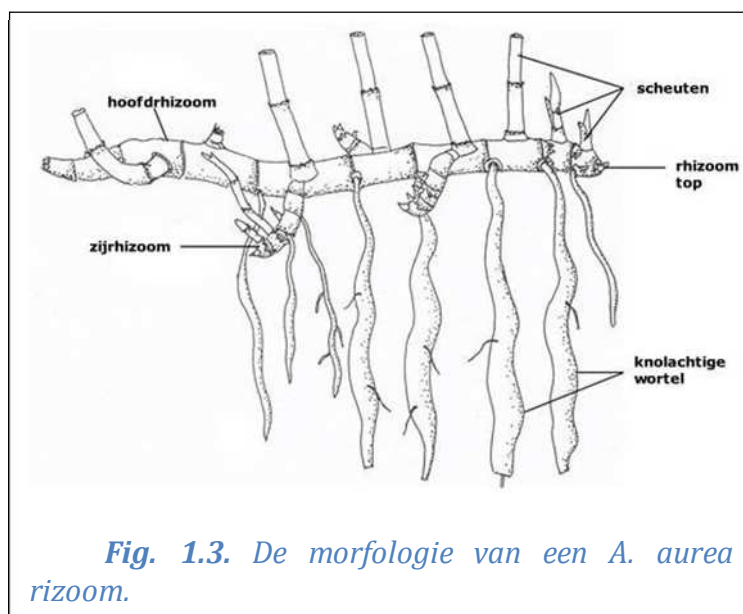
Fig. 1.2. Ontwikkelingsstadia van het *Alstroemeria* rizoom. In de onderste reeks zijn de schutblaadjes weggenomen. Vermenigvuldiging gebeurt door uitlopen van de tweede okselknop (2^{nd} axbud) die op de verticale scheut net boven het rizoom ligt.

De okselknop op deze knoop loopt altijd uit en groeit verder als het horizontaal rizoom. Bij de volgende knoop verandert de rizoomtop weer van groeirichting en genereert een tweede scheut, terwijl ook de okselknop in deze knoop uitloopt en verder groeit als rizoom enz. Er ontstaat dus een ondergronds horizontaal groeiend rizoom dat op iedere knoop een verticaal groeiende scheut draagt en dat bestaat uit een keten

van eerste internodia van zijscheuten. Elke scheut heeft bij zijn basis een tweede okselknop. Die kan dormant blijven of uitlopen zodat er een zijrizaam ontstaat. Figuur 1.2 laat de ontwikkelingsstadia van het rizaam zien. Figuur 1.3 toont de morfologie van *A. aurea* rizaamen. Hybriden van *Alstroemeria* zijn gedurende de laatste halve eeuw een belangrijk siergewas geworden en worden geteeld als snijbloem, potplant en tuinplant (Bridgen 1993).

1.2. Vermeerdering

Omdat er geen homozygote lijnen beschikbaar zijn worden *Alstroemeria* cultivars net als de rassen van de meeste andere siergewassen vegetatief vermeerderd. Er zijn verschillende bezwaren tegen conventionele vermeerdering middels scheuren van rizaamen: de vermeerdering is traag en tijdrovend en ziektes worden meestal naar de volgende generatie doorgegeven (Van Zaayen 1995). Tegenwoordig wordt *Alstroemeria* vrijwel uitsluitend *in vitro* vermeerderd (Pedersen et al. 1996). De *in-vitro* vermeerdering is gebaseerd op het geforceerd uitlopen van okselknoppen. *Alstroemeria* heeft twee types okselknoppen (zie



vorige sectie). Op iedere rizoom-knoop bevindt zich een okselknoop die altijd uitloopt en het rizoom continueert terwijl de hoofdknoop van groeirichting verandert en een verticale scheut vormt. Op deze verticale scheut ligt vlak boven het rizoom een tweede okselknoop. Zoals eerder gezegd loopt deze okselknoop af en toe uit en genereert dan een zijrizoom. In weefselkweek kan hij door manipulatie veel vaker uitlopen. Wanneer zo'n zijrizoom groot genoeg is kan het losgesneden worden van het hoofdtrizoom (Bond 1991). Met deze methode wordt een vermenigvuldigingsfactor van 1.2-1.8 per cyclus van 4 weken bereikt. De vermeerdering in weefselkweek is traag vergeleken met andere gewassen maar veel sneller dan de conventionele ex-vitro vermeerdering. Recent zijn nieuwe vermeerderingsmethodes ontwikkeld zoals indirecte somatische embryogenese (Lin et al. 1998). Omdat men bang is voor afwijkingen wordt in het bedrijfsleven echter alleen de rizoomvermeerdering toegepast.

Het onderzoek dat in dit verslag wordt beschreven was een promotieonderzoek en werd uitgevoerd door Paweena Pumisitapon. Het was er op gericht om vanuit twee invalshoeken de vermeerdering te stimuleren: de verbetering van de groei van de rizomen en de stimulering van de uitgroei van okselknoppen.

1.3. Verbetering van groei van de rizomen

Dit betreft twee vragen: (i) in het algemeen de vraag hoe groei in weefselkweek gestimuleerd kan worden en (ii) hoe rizoomgroei gestimuleerd kan worden.

Aan algemene factoren die groei in weefselkweek beïnvloeden is weinig onderzoek gedaan en het ligt buiten het bereik van dit project om dit in detail te onderzoeken. Wij hebben ons tot één aspect beperkt: de beschikbaarheid van voedingsstoffen die via het medium worden

aangeboden en meer specifiek het effect van de dikte van de laag voedingsmedium. De achtergrond hiervan is dat volgens Fick's diffusiewet verplaatsing van opgeloste stoffen over relatief grote afstanden (> 5 mm) extreem traag gaat. Dit komt er op neer dat tijdens een groeicyclus van 4 weken alleen suiker dat zich in een straal van, naar schatting, 1 à 2 cm van het scheutje bevindt kan worden opgenomen. Als de laag twee maal zo dik is kan er bijna twee maal zo veel worden opgenomen (Fig. 1.4). Dit zijn theoretische overwegingen maar zijn ze ook meetbaar? Dit werd onderzocht.

Stimulering van groei kan uiteraard ook bewerkstelligd worden door de samenstelling van de voeding te optimaliseren. Er is veel weefselkweekonderzoek gedaan aan het type suiker maar sucrose bleek vrijwel altijd het beste carbonhydraat. Dat is niet verwonderlijk omdat sucrose in het plantenrijk universeel als transport-carbonhydraat wordt gebruikt (Zimmermann and Ziegler 1975). Aan het type suiker is daarom geen aandacht besteed. In weefselkweek wordt anorganische voeding meestal volgens de formulering van Murashige en Skoog gegeven. Die bevat 7 macro-elementen (N, K, Ca, Mg, P, S en Cl) en 7 micro-elementen (Fe, Mn, B, Zn, Cu, Mo, en Na). Het is ondoenlijk om voor de verschillende elementen m.b.v. dosis-respons curves de optimale samenstelling voor ieder gewas te bepalen gezien het grote aantal elementen en de interacties tussen elementen. In een van Dit probleem werd recent



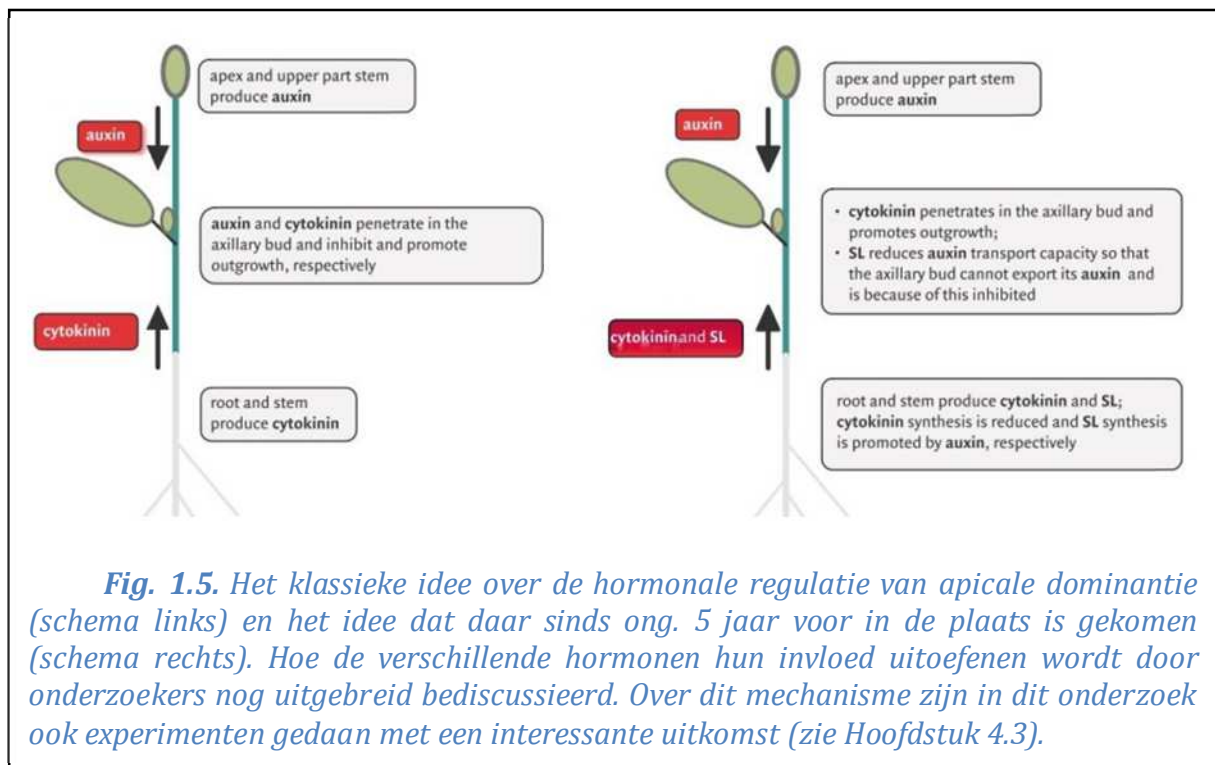
Fig. 1.4. Het deel van het vaste agar-medium waaruit een plantje de voedingsstoffen opneemt (donkergroen aangegeven). Volgens de diffusiewet van Fick is diffusie over kleine afstanden snel en over lange afstanden traag. Bij gevolg neemt een plantje tijdens weefselkweek op vast medium alleen voedingsstoffen op uit een straal van 1 à 2 cm. Het volume van het medium waaruit kan worden opgenomen bij een dikke laag is veel groter dan bij een dunne laag.

gedeeltelijk opgelost door de samenstelling van het medium aan te passen aan de hand van de samenstelling van goed-groeiende jonge plantendelen. Dit levert vaak een verbetering op (George and De Klerk 2008). Bouman (2003) testte deze benadering bij 8 gewassen en vond bij 3 significante verbetering, bij 1 verslechtering en bij de overige, waaronder *Alstroemeria*, geen effect. Er moet op gewezen worden dat er in Boumans onderzoek bij *Alstroemeria* werd uitgegaan van de samenstelling van de verticaal groeiende scheut omdat er geen andere gegevens beschikbaar waren. Wij hebben de samenstelling van de rizomen bepaald en daar het medium op gebaseerd.

1.4. Stimulering van de uitgroei van okselknoppen.

De tweede manier om de vermeerdering te verbeteren is via de stimulering van de uitgroei van okselknoppen. De uitgroei van okselknoppen wordt gereguleerd door de top van een stengel, een fenomeen dat aangeduid wordt met de term "apicale dominantie". Het conventionele idee over de hormonale regulatie van de uitgroei van okselknoppen is dat auxine, geproduceerd in de top, de uitgroei remt en dat cytokinine, geproduceerd in de wortels, de uitgroei bevordert. Dit model is gebaseerd op onderzoek bij modelplanten die een eenvoudige architectuur hebben met één duidelijk hoofdgroei punt. Een overzicht is in Shimizu-Sato and Mori (2001). De evolutionaire aanpassingswaarde van de remming van de uitgroei van zijknoppen zit hem er in dat er reserveknoppen klaarliggen om uit te groeien wanneer de eindtop verloren gaat. Als de uitgroei van deze knoppen niet goed geremd wordt, worden planten extreem bossig. De uitgroei moet dus geremd worden maar als de eindtop verloren gaat moet de zijknop snel uitlopen.

Wanneer men de oorsprong buiten beschouwing laat, heeft *Alstroemeria* in tegenstelling tot de onderzochte modelplanten niet één maar twee eindtoppen, die van de verticale scheut en die van het



horizontale rizoorn (ontogenetisch is de laatste een zijtak). De eindtoppen zijn tevens ongelijksoortig. Dit is dus een heel andere architectuur dan die van de bestudeerde modelplanten. De zijknop die bij *Alstroemeria* uitloopt vormt altijd een rizoorn en nooit een scheut. Je zou daarom bovendien verwachten dat, omdat hij de verticale scheut niet vervangt, verwijdering van het groeipunt van die scheut geen uitgroei van deze okselknoppen zou bewerkstelligen. Om deze redenen werd de regulatie van de uitgroei van de tweede okselknop onderzocht met klassieke methodes als het wegsnijden van de top en vervanging van de top door lanoline pasta met auxine (Hoofdstuk 4.3).

Recent is een nieuwe hormonale regulator van de uitgroei van okselknoppen geïdentificeerd (Rameau 2010). Deze nieuwe remmende signaalstof werd gevonden bij onderzoek aan mutanten van arabidopsis, erwten, rijst en petunia. Het is een carotenoïde die, omdat hij ook een rol speelt bij de kieming van parasitaire planten (o.a. *Striga*), de naam strigolacton (SL) heeft gekregen (Fig. 1.5). Dit biedt mogelijkheden tot manipulatie omdat in weefselweek de stof fluridon kan worden toegediend. Die heeft weliswaar als nadeel dat doordat er geen

carotenoïden zijn het chlorofyl in de weefsels weg bleekt en de plantjes geen fotosynthese meer kunnen hebben. In weefselkweek is de toxiciteit evenwel beperkt of niet-bestaand (Kim et al. 1994). In appel bevordert fluridon de uitloop van zijknoppen. Een eventuele rol van strigolacton bij de uitloop van zijknoppen in *Alstroemeria* en het werkingsmechanisme werden onderzocht.

2. Materiaal en methode

2.1. Plantmateriaal en weefselkweekcondities

Culturen van twee *Alstroemeria* cultivars, "24098 2B" en "Sara", waren verstrekt door respectievelijk *Könst Alstroemeria* (Nieuwveen, Nederland) en Koninklijke van Zanten (Rijsenhout, Nederland). De stock werd iedere 4 weken vermeerderd: het grootste deel van de verticale scheut werd verwijderd, en de zijrizomen werden van het hoofdrizoom afgesneden wanneer ze groot genoeg (>1 cm) waren. Het medium bevatte voedingszouten en vitamines volgens Murashige and Skoog (1962), 4% (w/v) sucrose, $9 \mu\text{M}$ 6-benzylaminopurine (BAP) en 0.2% (w/v) Gelrite (pH 5.8). De cultures werden gekweekt bij 19°C met koel wit TL licht met een 16 uur lichtperiode ($30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, Phillips TL 33). Tenzij anders vermeld werden vijf explantaten gekweekt in een kuipje met 25 ml medium.

In alle experimenten, werden explantaten gebruikt die bestonden uit een rizoom met twee knopen en twee verticale scheuten waarvan het grootste deel was afgesneden zodat er nog ong. 1 cm over was (Fig. 2.1).

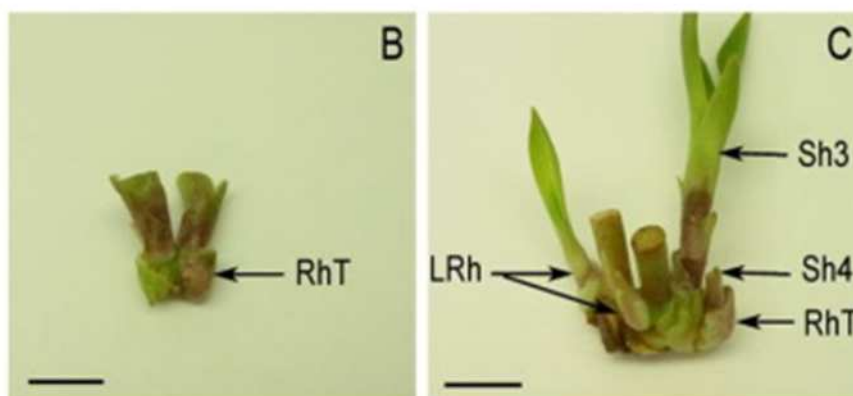


Fig. 2.1. Het standard explantaat dat gebruikt werd in de experimenten (links, B) en na 4 weken kweek in vitro (rechts, C). RhT = rizoomtop; LRh = zijrizoom (rechts is bij het oudste zijrizoom al een verticale scheut ontstaan); Sh 3 en Sh 4 zijn de nieuwgevormde scheuten. De restanten van scheut 1 en 2 zijn te zien op het rizoom.

2.2. Scoring aan het plantmateriaal

Vermeerdering

In de experimenten waarin onderzoek aan de vermeerderingsfactor werd gedaan, werden voor iedere conditie 5 kuipjes (Ø 66 mm) met 25 ml medium en 3 explantaten gebruikt. De uitloop van zijrizomen werd na vier weken gescoord als percentage uitloop per positie (d.w.z. de uitloop van de dormante okselknop op de eerste, de tweede en soms ook op de nieuw-gevormde derde verticale scheut). De resultaten werden geëvalueerd met de χ^2 -test en in sommige experimenten door bepaling van de significantie van de helling van de regressielijn. Alle experimenten werden minstens twee keer uitgevoerd.

Gewichtstoename

In de secties over nutriënten en het effect van stress werd naast de vermeerdering ook gewichtstoename bepaald. In deze experimenten werden voor iedere conditie Wavin kuipjes met 10 of 25 ml medium en vijf explantaten gebruikt. In totaal werden per conditie dus 15 explantaten gebruikt. De resultaten werden gescoord na 4 weken (tenzij anders vermeld). Zowel vers gewicht (FW, fresh weight) als droog gewicht (DW, dry weight) werden bepaald. De trends van FW en DW toename waren identiek.

De uitkomsten werden geëvalueerd met Student's *t*-toets. In alle tabellen en grafieken worden de gemiddeldes van de 15 bepalingen \pm SEs (standaardafwijkingen) getoond.

2.3. Stress behandelingen (H. 3.2)

Hitte stress

Voor de warm-water behandeling (HWT, hot water treatment), werden explantaten overgebracht naar een kuipje (Ø 66 mm) met steriel

water (5 explantaten/25 ml; water niveau ong. 7 mm) en geïncubeerd in een waterbad (Lauda Bath Circulator C12). De HWT-temperaturen bleven binnen 0.3 °C van de ingestelde temperatuur. Voor de warme-lucht behandeling (HAT, hot air treatment) werden explantaten op standaard medium (5 explantaten/25 ml) met kuipje en al in een incubator geplaatst (Labcon LTIM 10). De HAT-temperaturen bleven binnen 1.0 °C van de ingestelde temperatuur. Explantaten werden daarna op standaardmedium gekweekt. De invloed van voorbehandelingen met matige warm-water stress werd onderzocht volgens de procedure voor zaailingen Arabidopsis (De Klerk and Pumisitapon 2008). Explantaten werden eerst behandeld bij 38 °C voor 0 of 1 h. Na 4 h op standaardmedium bij kamertemperatuur kregen ze voor 0, 1, 2 en 3 h een HWT bij 45 °C. Na 4 weken cultuur werden overleving en rizoom en scheut vers- en drooggewicht bepaald.

Andere stressen

Andere abiotische stressen waren koude, anaërobie, droogte en zout. Voor koude stress werden explantaten ondergedompeld in steriel water (5 explantaten/25 ml) en 0, 4, 8 of 24 h geïncubeerd bij 0 °C in een piepschuim doos met ijs in het donker. Voor anaërobie-stress werden explantaten ondergedompeld in steriel water (5 explantaten/25 ml) en 0, 8, 24, 72 of 216 h in het donker bij 19°C geïncubeerd. Droogte-stress werd gegeven door explantaten 0, 0.5, 1 of 2 h op droog filtreerpapier in de laminaire luchtstroom van de entkast te leggen. Zout-stress werd gegeven door explantaten voor 0, 1, 2 of 4 h in een oplossing van NaCl onder te dompelen (500 mM; 5 explantaten/25 ml). Daarna werden ze gewassen met steriel water en overgebracht naar standaardmedium.

Na 4 weken cultuur onder standaardomstandigheden werden overleving en rizoom en scheut vers- en drooggewicht bepaald.

Bepaling van anorganische elementen en suiker in medium en weefsels

Na verschillende tijden kweek (0, 1, 2, 3 en 4 weken) werden in het medium sucrose, het totaal van anorganische voedingsstoffen (met een EC-meter gemeten) en individuele elementen bepaald en na 4 weken kweek in de weefsels individuele elementen.

Voor de bepalingen aan vast medium werd een zelfde volume MiliQ water toegevoegd. Tijdens krachtige schudden op een vortex (ong. 15 sec.) viel de gel uit elkaar in een suspensie van fragmenten met een diameter <2 mm. De mediumcomponenten diffundeerden vervolgens uit de gelfragmenten tijdens een periode van 48 uur bij kamertemperatuur. Tijdens deze periode zakten de Gelrite fragmenten naar de bodem zodat er een helder supernatant ontstond. Van het supernatant werd een deel genomen voor analyse. Oriënterende experimenten lieten zien dat op deze manier de betrouwbaarheid van de analyse van de gelsamenstelling dicht in de buurt van de 100% kwam. Het totaal van anorganische nutriënten werd geschat met een EC-Meter (31 5i, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Duitsland). Het medium bevat 1.99 g l^{-1} minerale elementen (N, K, P enz.) naast H, C en O en de waarden van de EC werden uitgedrukt als het gewicht minerale elementen. Het totaal carbonhydraten werd gemeten met een digitale refractometer (PAL-1; Agato, Tokyo, Japan). De details van de nauwkeurigheid van beide methodes zijn aangegeven in De Klerk and Ter Brugge (2011). De individuele mineralen werden geanalyseerd door het Chemisch Biologisch Laboratorium Bodem (Wageningen, Nederland) met sFA-CaCl₂ (NH₄⁺ en NO₃⁻) en icp-AES (andere mineralen). Anorganische elementen in weefsels werden geanalyseerd door het zelfde laboratorium. Het weefsel werd opgelost met H₂SO₄/H₂O₂/Se voor de bepaling met sFA-Nt/Pt (N en P), of met HNO₃/HF/H₂O₂ voor de bepaling met icp-AES (andere elementen).

Meting van het auxin-transport

Het protocol was een enigszins aangepast protocol zoals dat door dr. Kees Boot (Leiden Universiteit, Boot et al. 2012) is ontwikkeld. Wij gebruikten 10-mm segmenten van rizomen en stengels waarvan de bladeren waren afgesneden. Eerst werden Petri schalen met een 5 mm dikke laag gesmolten paraffine-was gemaakt. Wanneer de was net gestold was, werden kanalen gesneden: één apicaal kanaal, vijf basale kanaaltjes, en vijf verbindende kanalen tussen het apicale kanaal en de vijf basale kanaaltjes (Fig. 2.2). Vijf 10 mm segmenten werden in de verbindende kanalen geplaatst met de apicale zijde bij het apicale kanaal en de basale zijde bij het basale kanaal tenzij anders aangegeven. Een mengsel van lanoline en petroleum olie (3:1) werd gebruikt om de segmenten in te bedden om lekkage tussen de kanalen te verhinderen. Daarna werd vloeibaar medium met 1 μM IAA toegevoegd aan het apicale kanaal (4 ml) en de basale kanalen (elk 0.6 ml). In het apicale kanaal werd 5 μl [^3H] IAA (185 kBq, American Radiolabeled Chemicals, specifieke activiteit 20 Ci mmol^{-1} , 1 mCi ml^{-1}) toegevoegd. Na 8 h bij kamertemperatuur in het donker (om foto-oxidatie van IAA te verhinderen) werd uit elk basaal kanaal 500 μl mediumgenomen en 4 ml Ultima Gold scintillatie vloeistof (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences) toegevoegd. De hoeveelheid ^3H werd gemeten in een scintillation teller. In de grafieken worden gemiddeldes van 5 bepalingen \pm SE getoond. De verschillen werden statistische geëvalueerd met de Student t -toets. Het experiment werd tweemaal herhaald. Om eventuele lekkage op te sporen werd na het experiment alle vloeistof verwijderd uit de apicale en basiskanalen en in het apicale kanaal werd een 0.05% (w/v) oplossing van zure fuchsine gepipetteerd. De Petri schalen werden na 1 h geïnspecteerd. Als kleurstofoplossing in een basiskanaal was doorgedrongen, duidde dit op lekkage en werd de betreffende meting weggelaten. Lekkage gebeurde in minder dan 5% van de verbindingskanalen.

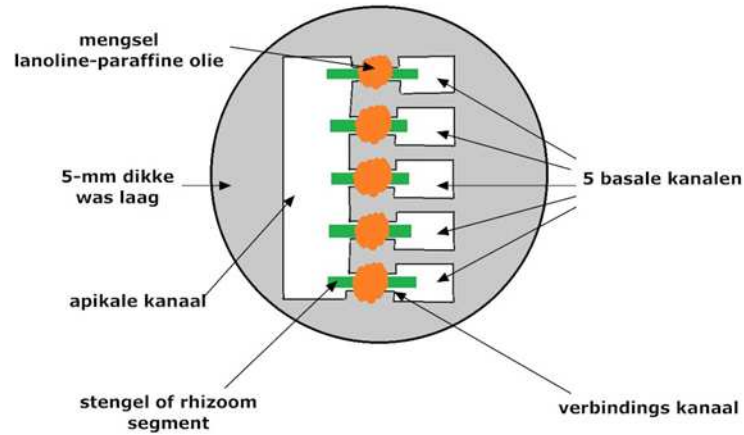
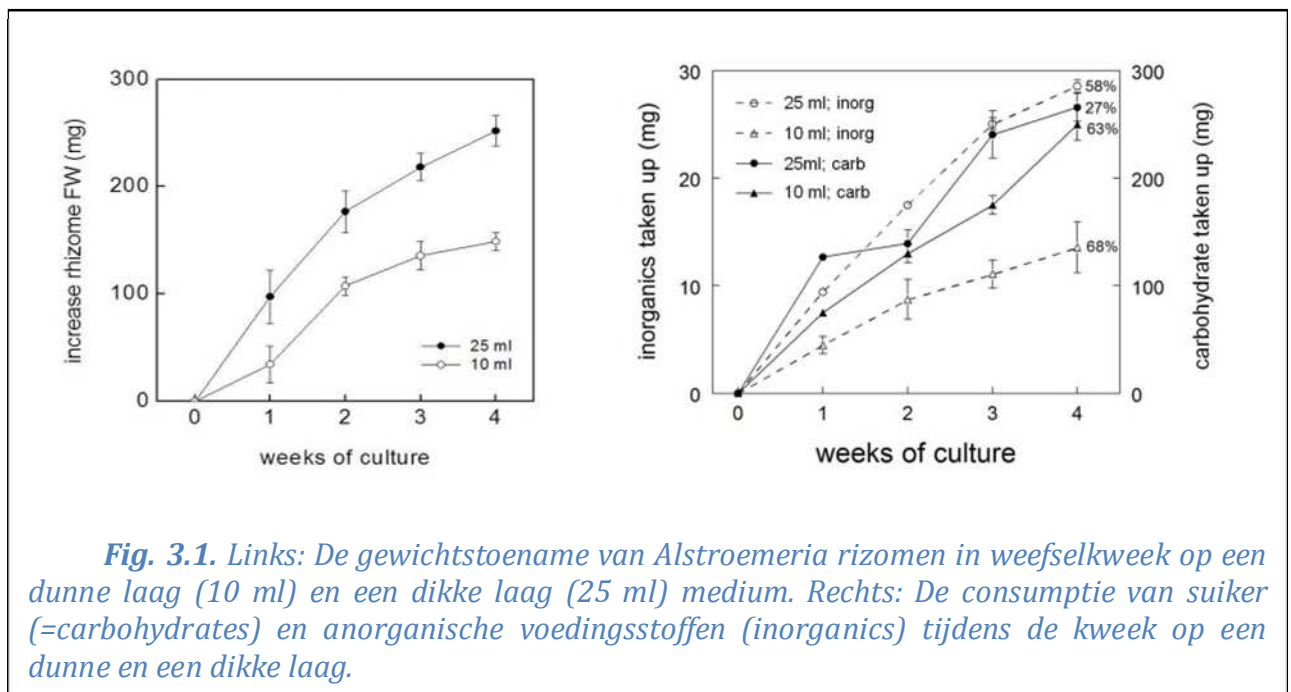


Fig. 2.2. *Bepaling van de intensiteit van het polaire auxine transport in een stengel of rizoom segment. In een Petri schaal met een diameter van 9 cm werd een 5 mm dikke was laag gegoten. Hierin werden kanalen gesneden zoals aangegeven. De segmenten werden in het verbindingskanaal gelegd en dit werd verder afgesloten door een mengsel van lanoline en paraffine olie. In het apicale kanaal werd een oplossing van radioactief IAA gebracht en na 8 uur werd gemeten hoeveel van dit IAA naar het basale kanaal was getransporteerd.*

3. Resultaten en Discussie

3.1. Voeding

In het weefselweekonderzoek wordt er geen of nauwelijks aandacht besteed aan de diffusiewet van Fick (De Klerk and Askari 2012). Voor plantenfysiologen is het belangrijk te weten dat verplaatsing van opgeloste stoffen middels diffusie over kleine afstanden (tot 0.1 mm) snel gaat maar over langere afstanden traag. Verplaatsing via diffusie over 1 m duurt 32 jaar (<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=9&id=26>)! Zoals in de Inleiding is aangegeven verwacht je op basis van Fick's wet dat er een grote invloed is van de dikte van de laag medium al meteen vanaf het begin van de cultuur. Wanneer het medium in hetzelfde type container is gegoten, bevatten containers met een dunne laag medium uiteraard minder voedingsstoffen dan die met een dikke laag. Maar als al de in het medium aanwezige voeding beschikbaar is (als er geen beperkingen zijn door trage diffusie) zou dat na 1 week cultuur niet uit mogen maken omdat het medium dan nog lang niet uitgeput is. Wij hebben volumes van 25 en 10 ml genomen met in de gebruikte containers lagen van resp. 1.4



en 3.6 mm dik. Na 1 week is van de carbonhydraten in 25 en 10 ml resp. 15% en 20% geconsumeerd (Fig. 3.1) en van de anorganische nutriënten liggen de percentages ongeveer hetzelfde. Er is dus bij 10 ml ong. 80 % over in het medium en er is dus nog lang geen uitputting. Desalniettemin is de groei ong. de helft van de groei in 25 ml medium. De mindere groei in 10 ml komt doordat er in feite minder voeding beschikbaar is (zie Fig. 1.4). Hiermee is het belang van Fick's diffusiewet voor voedingsmedium in vitro aangetoond. Dit heeft verschillende implicaties voor de weefselkweekpraktijk. Men moet bijv. bedenken dat het geen zin heeft dikke media te gebruiken (meer dan 1 cm dik) omdat door de trage diffusie componenten uit de onderste laag de explantaten nauwelijks bereiken.

Een tweede vraag in dit deel van het onderzoek is of de rizoombegroei verbeterd kan worden door de mediumsamenstelling aan te passen. Vanwege het grote aantal componenten en hun interacties is het niet doenlijk om voor ieder element een dosis-response curve te maken. Een eerste alternatieve aanpak is om te onderzoeken of er nog uitschieters zijn bij de opname uit het medium. Daartoe werd de elementsamenstelling van het medium op verschillende tijden

Medium volume	'24098 2B'	'Sara'
Cationic macronutrient uptake		
10 ml	NH ₄ ⁺ > K ⁺ > Mg ²⁺ > Ca ²⁺ (97%) (82%) (73%) (65%)	NH ₄ ⁺ > K ⁺ > Mg ²⁺ > Ca ²⁺ (97%) (72%) (60%) (56%)
25 ml	NH ₄ ⁺ > K ⁺ > Mg ²⁺ > Ca ²⁺ (82%) (61%) (48%) (34%)	NH ₄ ⁺ > K ⁺ > Mg ²⁺ > Ca ²⁺ (84%) (54%) (41%) (35%)
Anionic macronutrient uptake		
10 ml	H ₂ PO ₄ ⁻ > SO ₄ ²⁻ > NO ₃ ⁻ (97%) (91%) (88%)	H ₂ PO ₄ ⁻ > SO ₄ ²⁻ > NO ₃ ⁻ (96%) (86%) (83%)
25 ml	H ₂ PO ₄ ⁻ > SO ₄ ²⁻ > NO ₃ ⁻ (86%) (72%) (67%)	H ₂ PO ₄ ⁻ > SO ₄ ²⁻ > NO ₃ ⁻ (84%) (67%) (66%)
Cationic micronutrient uptake		
10 ml	Fe ²⁺ > Zn ²⁺ > Mn ²⁺ > Na ²⁺ (93%) (83%) (66%) (62%)	Fe ²⁺ > Zn ²⁺ > Mn ²⁺ > Na ²⁺ (88%) (77%) (58%) (51%)
25 ml	Fe ²⁺ > Zn ²⁺ > Mn ²⁺ > Na ²⁺ (89%) (61%) (39%) (34%)	Fe ²⁺ > Zn ²⁺ > Mn ²⁺ > Na ²⁺ (88%) (58%) (38%) (36%)

Tabel 3.1. De consumptie van verschillende anorganische mediumcomponenten tijdens 4 weken kweek op een dunne en een dikke laag medium. Tussen haakjes staat het percentage aangegeven dat is geconsumeerd.

onderzocht (Tabel 3.1). Er waren grote verschillen in opname. Verschillen in diffusiesnelheid in het voedingsmedium spelen een kleine rol: (i) in vloeibaar medium waarin diffusie-snelheid geen rol speelt vanwege de continue kleine turbulenties in het water (De Klerk 2010) is de rangorde van consumptie van de verschillende elementen hetzelfde (De Klerk and Ter Brugge 2010) en (ii) de gemeten snelheid van consumptie komt niet overeen met de diffusiecoëfficiënt; een duidelijk voorbeeld is H_2PO_4^- dat snel geconsumeerd wordt en een lage diffusiecoëfficiënt (0.96) heeft en K^+ dat langzamer geconsumeerd wordt maar twee maal zo hoge diffusiecoëfficiënt (1.96) heeft. De opnameverschillen zijn dus het gevolg van verschillen in opnamecapaciteit van het explantaat. Opname van de verschillende componenten is maar incidenteel gemeten bij andere soorten. Ook in snelgroeïende cultures van andere gewassen wordt een zelfde rangorde van consumptie/uitputting gevonden. Bij *Alstroemeria* waren er geen 'uitschieters' en het lijkt daarom onwaarschijnlijk dat de trage groei veroorzaakt wordt door uitputting van specifieke componenten.

Een tweede methode om de elementsamenstelling van weefselkweekmedia te verbeteren is door die aan te passen aan de samenstelling in goed-groeïende planten. Omdat wij meer rizoomgroei beogen hebben we de mediumsamenstelling aangepast aan de samenstelling van de rizomen. Chemische analyse liet verschillen in de niveaus van Mg, P en Ca zien tussen rizoom en de verticaal groeiende scheuten. Omdat Mg en P relatief laag waren in de rizomen, en Ca relatief hoog, verwachtten wij dat laag Mg en P, en hoog Ca in het voedingsmedium de rizoomgroei zouden kunnen verbeteren. Het verminderen van Mg^{2+} tot de helft van de standaardconcentratie verhoogde rizoomgroei met ca. 30% (alhoewel niet significant; $P = 0.31$). De lagere concentraties (0 en $\frac{1}{4}$) verminderden de rizoomgroei. In tegenstelling tot Mg^{2+} , leidde soortgelijke aanpassing van P en Ca niet tot verbeterde rizoom groei.

Wij deden dergelijke onderzoeken ook in de cultivar „Sara “ en kregen identieke resultaten (gegevens niet getoond).

3.2. De invloed van milde stress op rizoombegroei

Een van de favoriete thema's van de huidige plantenbiologie is dat een van de grote verschillen tussen dieren en planten, nl. dat planten niet weg kunnen lopen bij bedreigende situaties, tot gevolg heeft dat planten allerlei verdedigingstechnieken tegen biotische en abiotische stress hebben ontwikkeld, veel meer dan dieren. Hierna wordt een voorbeeld gegeven dat het bestaan van die verdedigingstechnieken laat zien en dat tegelijk toepassingsmogelijkheden biedt in de praktijk. Als je arabidopsis kiemplantjes een milde stress geeft, gaan ze zich op biochemisch niveau wapenen. Het betreft onder andere de aanmaak van stoffen met een laag molecuulgewicht (bijv. het aminozuur proline) en stoffen met een hoog molecuulgewicht (chaperone-eiwitten) die allebei kwetsbare macromoleculen (bijv. in membranen) beschermen. Door de aanwezigheid van deze beschermende stoffen zijn planten die behandeld zijn met een milde stress in staat zware stress te overleven terwijl de controle groep die geen milde stress heeft gekregen dood gaat (De Klerk and

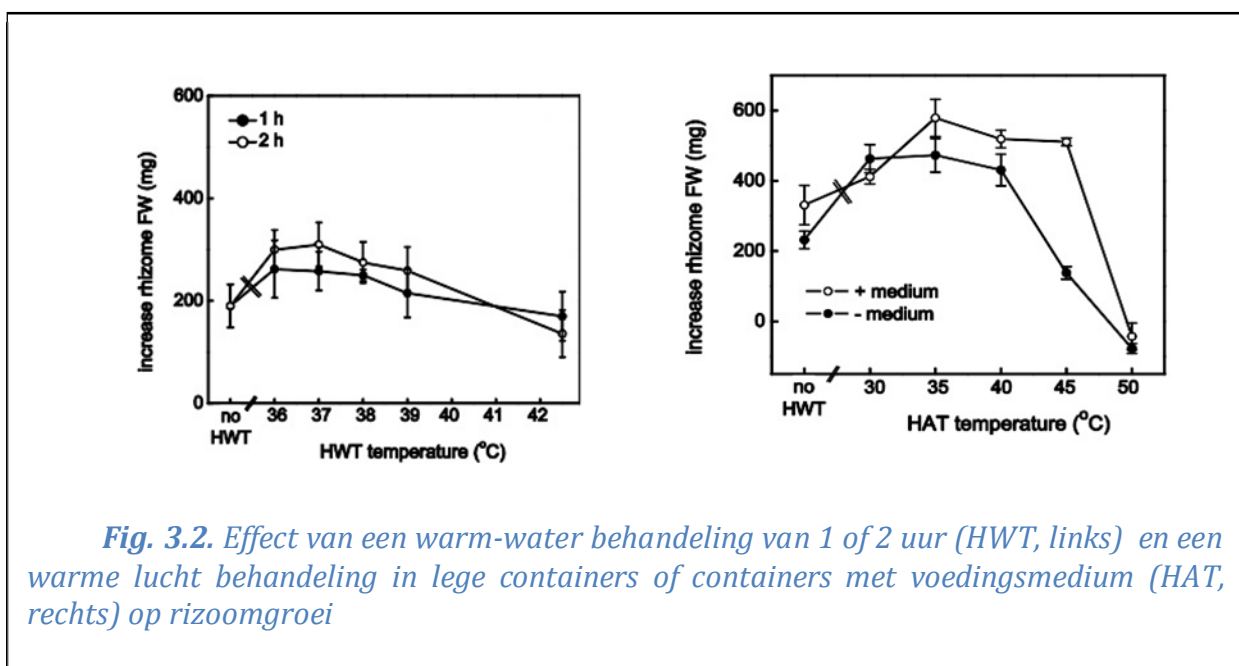
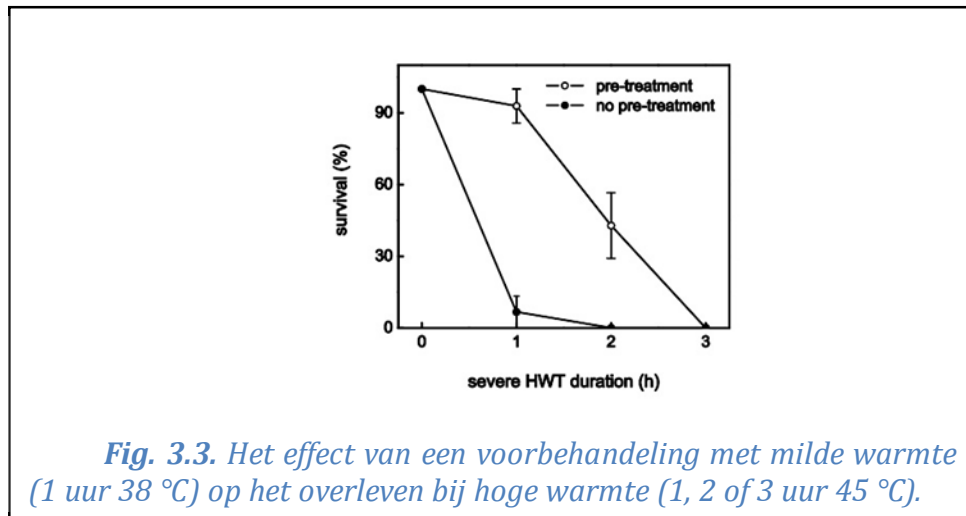
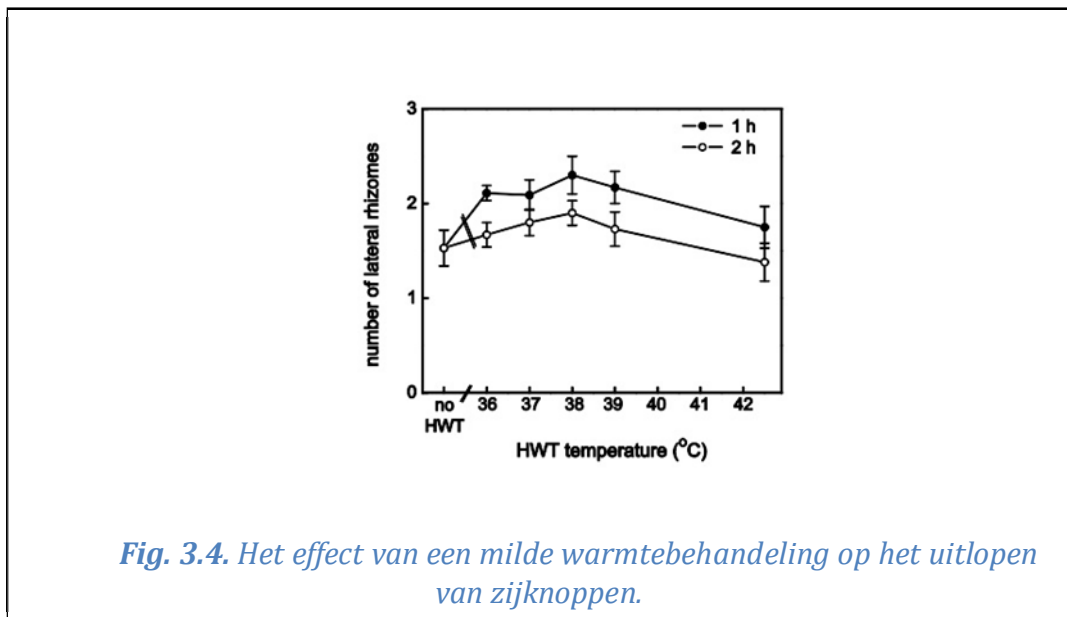


Fig. 3.2. Effect van een warm-water behandeling van 1 of 2 uur (HWT, links) en een warme lucht behandeling in lege containers of containers met voedingsmedium (HAT, rechts) op rizoombegroei



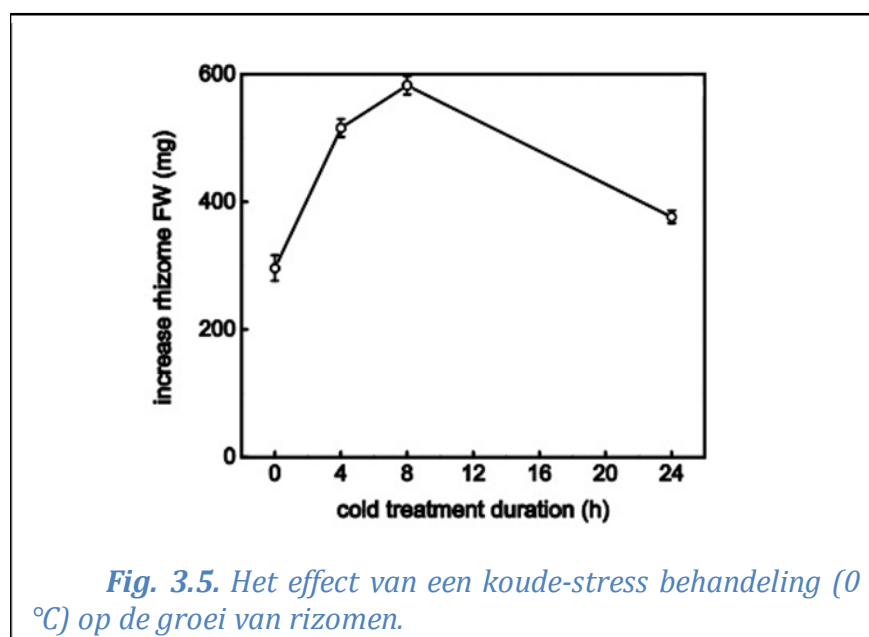
Pumisutapon 2008).

In de kas was waargenomen dat *Alstroemeria* na een milde stress zwaardere rizomen gaan maken (Ron Veenhof, pers. mededeling). Deze respons ligt in dezelfde richting als die in de vorige paragraaf wordt beschreven: rizomen zijn ondergrondse opslagorganen die o.a. ten doel hebben de plant bij stressvolle omstandigheden te laten overleven en zijn dus een beschermingsmechanisme voor de individuele plant. Wij onderzochten of deze respons ook in weefselkweek gebeurde. Wij gaven eerst warmte stress (warme lucht of warm water). Bij beiden was er een flinke toename van de rizoom groei waarbij de optimale temperatuur bij 36 à 37 °C lag (Fig. 3.2). Behalve meer rizoomgroei, wat een bescherming voor een lange periode biedt, was er ook bescherming op de korte termijn. Als er kort na de milde warmte hoge warmte werd gegeven, was afsterven veel minder dan bij de controle die deze voorbehandeling niet had gehad (Fig. 3.3). Behalve een positief effect op de rizoomgroei was er ook een positief effect op de uitgroei van de rizomen (Fig. 3.4.) Dit kan eveneens het gevolg zijn van een grotere allocatie van voedingsstoffen naar het (zij)rizoom, maar ook een doorbreken door warmte van de rusttoestand in de zijknop (Rantanen et al. 2010).



Wat betreft de groei van de rizomen hebben we alle normaal voorkomende abiotische stressen getest en ieder van deze stressen bevorderde de rizoombegroei (zie koude stress in Fig. 3.5).

Het is opmerkelijk dat in de literatuur geen soortgelijke waarnemingen in weefselkweek zijn gedaan. Wat het meest dicht in de buurt komt is het effect van een koude behandeling op de sink-activiteit van meristemen van bolgewassen als tulp en lelie. In de ecofysiologische literatuur is het bekend dat planten die in een stresserende habitat groeien, meer massa-allocatie hebben in de opslagorganen (Chapin III et



al. 1990; Puijalon et al. 2008). Recent is na milde warmte-stress eenzelfde groei toename gevonden in leliebolletjes in weefselkweek.

3.3. De hormonale regulering van de uitgroei van zijrizoom-knoppen

Om vermeerdering te verkrijgen experimenteren weefselkweek-onderzoekers vooral met plantenhormonen. De uitgroei van okselknoppen wordt gestimuleerd met hormonen van het cytokinine type. Dit is gebaseerd op het klassieke schema van de regulatie van okselknop uitgroei (zie Inleiding). Door de sympodiale groeiwijze en door de aanwezigheid van een rizoom heeft *Alstroemeria* een heel andere architectuur dan de modelplanten waaraan het mechanisme van apicale dominantie is onderzocht. Daarom zijn de rol van de beide toppen (de rizoomtop en de top van de opgaande scheut) en die van auxines en cytokinines onderzocht.

Figuur 3.6. laat zien dat verwijdering van zowel de scheuttop als van de rizoomtop de uitgroei van de rizoom zijknoppen bevordert. De verwijdering van beide knoppen heeft een additief effect en verwijdering van de rizoomtop heeft een groter effect dan verwijdering van de toppen

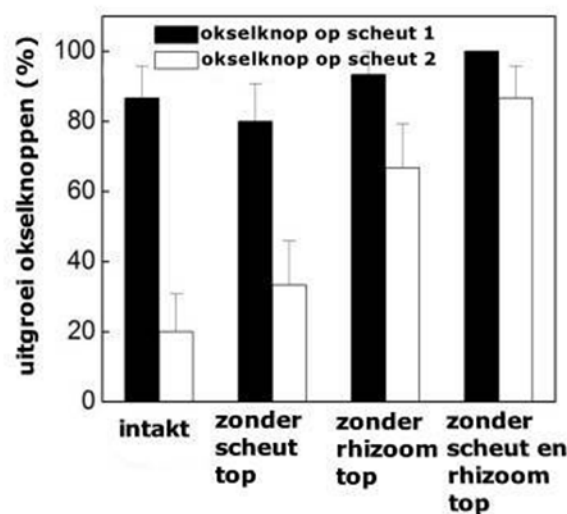


Fig. 3.6. Effect van verwijdering van de scheuttop en de rizoomtop de uitgroei van de rizoomzijknoppen

van de opgaande scheuten. Dit lijkt sterk op de resultaten bij modelplanten. Ook het effect van cytokinines, auxines en auxine transport remmers (trijoodbenzoëzuur - TIBA en naftylftaalzuur - NPA) was zoals verwacht. Opgemerkt dient te worden dat thidiazuron dat vaak goede resultaten geeft bij 'moeilijke' gewassen eerder slechtere dan betere resultaten gaf dan het standaard gebruikte benzylaminopurine.

Sinds 1995-2000 is er bij onderzoekers weer volop belangstelling voor apicale dominantie. Bij analyse van mutanten heeft men een tweede remmend hormoon ontdekt, strigolacton (SL). Deze stof is een carotenoïde en je zou verwachten dat als SL een rol speelt in *Alstroemeria*, fluridon de uitgroei van okselknoppen bevordert. Dit bleek inderdaad het geval (Fig. 3.7). Op gemerkt moet worden dat de plantjes wit worden maar dat is een voorbijgaand effect. De meer specifieke SL synthese remmer D2 bevorderde uitloop eveneens maar veel minder (NB

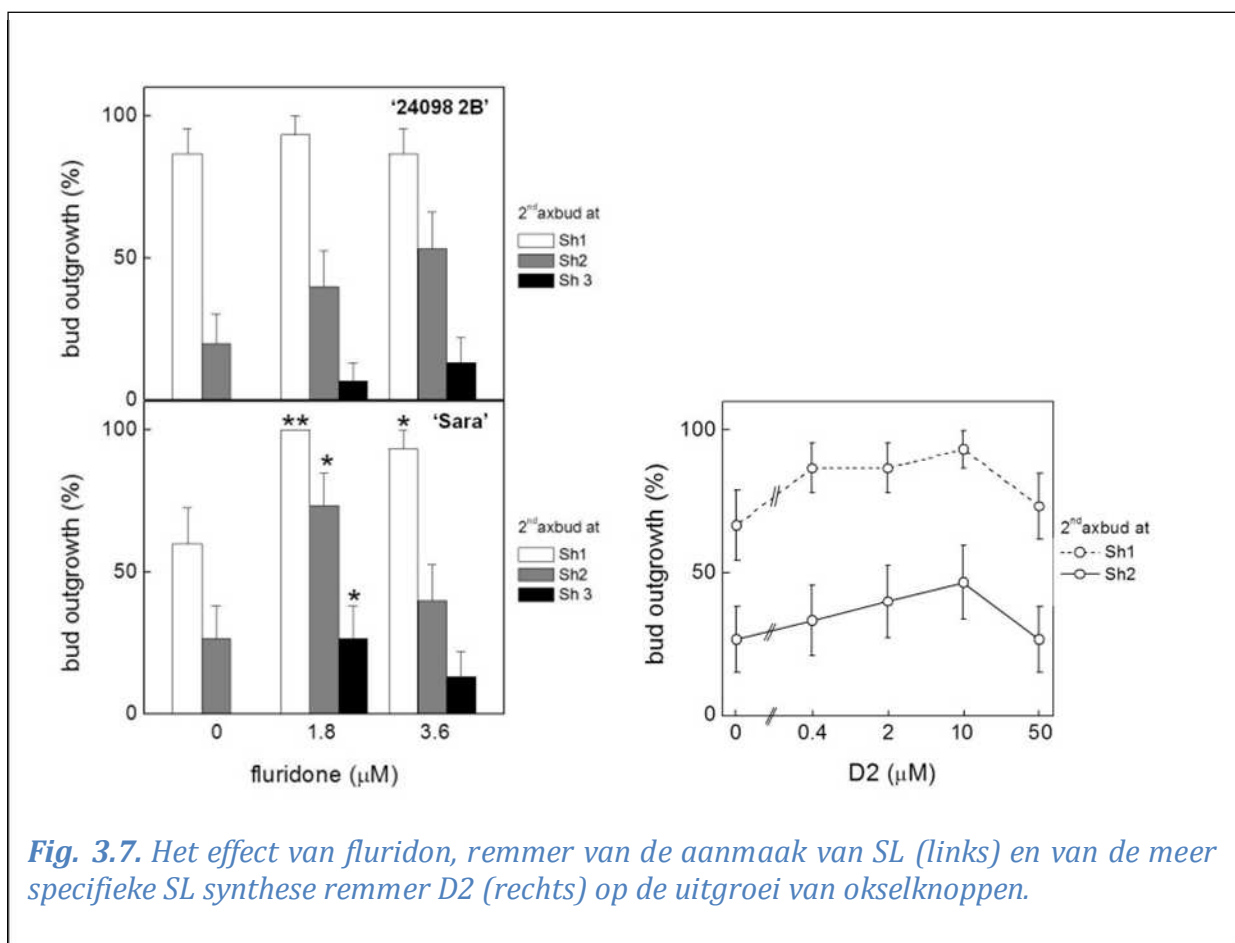
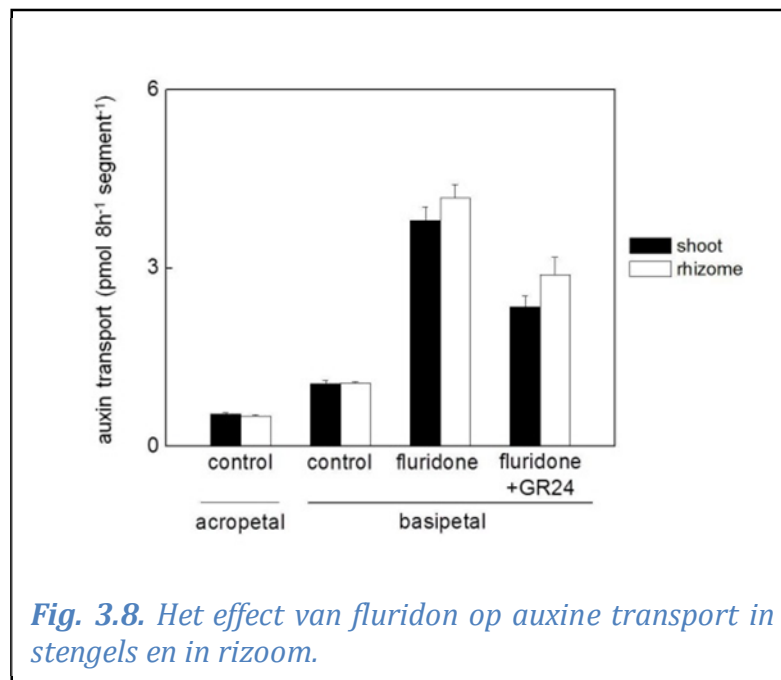


Fig. 3.7. Het effect van fluridon, remmer van de aanmaak van SL (links) en van de meer specifieke SL synthese remmer D2 (rechts) op de uitgroei van okselknoppen.



de helling van de dosis-response curve van 0 t/m 10 μM verschilt significant van 0).

In de wetenschappelijke literatuur is er veel discussie over het werkingsmechanisme van SL. Een groep onderzoekers is van mening dat SL in de okselknoppen doordringt en dan remt (Dun et al. 2012) terwijl een andere groep aangeeft dat SL werkt door het basipetale transport (van top naar beneden) van auxine in de stengel te remmen (Domagalska and Leyser 2011). Wij hebben bij *Alstroemeria* het effect van fluridon op het auxine transport gemeten. Omdat SL het auxine transport remt, zou je volgens de hypothese van Leyser verwachten dat (omdat fluridon de synthese van SL remt) fluridon het auxine transport bevordert. Dit werd inderdaad gevonden (Fig. 3.8). Als SL werkt door het auxine transport te remmen en fluridon door het weer te bevorderen, zouden auxine transportremmers de verhoogde uitgroei van als gevolg van fluridon weer teniet moeten doen. Fig. 3.9 laat het effect van de auxine transportremmer NPA zien onder normale condities waarbij het de uitloop bevordert en in aanwezigheid van fluridon waarbij het de uitloop juist remt.

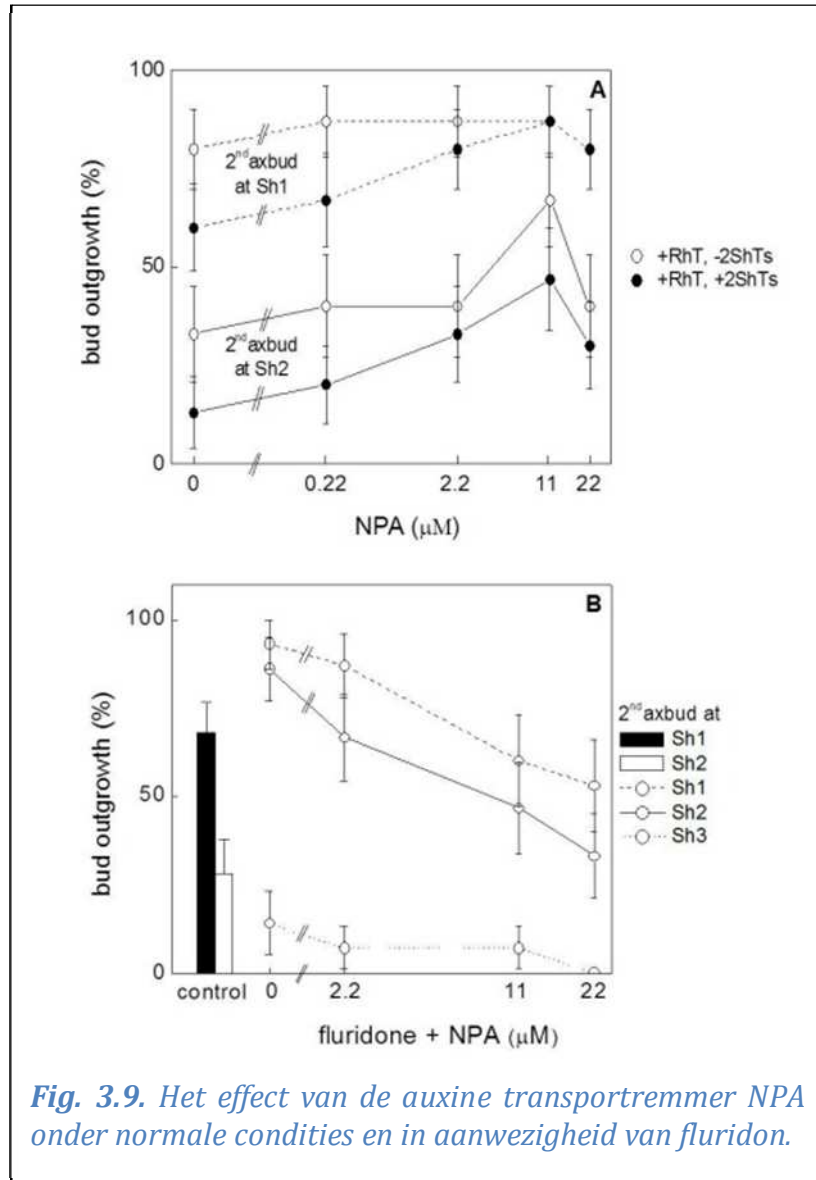


Fig. 3.9. Het effect van de auxine transportremmer NPA onder normale condities en in aanwezigheid van fluridon.

4. Conclusies en samenvatting

Alstroemeria is een van de gewassen waarbij een weefselkweek-vermeerderingsprotocol wel haast een conditio sine qua non. *Alstroemeria* wordt dan ook op grote schaal in weefselkweek vermeerderd ook al is de vermeerderingsfactor niet geweldig (1.2 tot 1.8 per cyclus van 4 weken). De problemen zitten in de trage rizoombegroei en de slechte uitloop van zijknoppen.

De slechte rizoombegroei kon niet opgelost worden door de samenstelling van het voedingsmedium te veranderen. Er werd een flink snellere rizoombegroei (bijna twee keer zo snel) verkregen door milde stress. De uitloop van okselknoppen kon aanzienlijk verbeterd worden door de SL-remmer fluridon toe te voegen.

Voor de weefselkweekwetenschap heeft dit onderzoek eveneens het nodige opgeleverd. De invloed van diffusie van mediumcomponenten over "grote" afstanden (> 1 cm) werd voor het eerst in weefselkweek aangetoond, en verhoogde groei van een reserveorgaan als het rizoom na milde stress werd voor het eerst in weefselkweek gevonden. Wat betreft het fenomeen apicale dominantie werd aangetoond dat de regulering in een gewas met een zeer afwijkende architectuur als *Alstroemeria* hetzelfde was als bij modelgewassen. Het nieuwe plantenhormoon SL speelt een significante rol in apicale dominantie in *Alstroemeria*. Het werkingsmechanisme in *Alstroemeria* komt overeen met het werkingsmechanisme zoals verondersteld door Leyser, waarin het basipetale auxine transport een centrale rol heeft.

5. Literatuur

- Aker S, Healy W** (1990) The phylogeography of the genus *Alstroemeria*. *Herbertia* 46: 76-87
- Bond S** (1991) Control of rhizome growth in *Alstroemeria*. . PhD thesis, University of Nottingham: <http://etheses.nottingham.ac.uk/1099/1091/292618.pdf>
- Boot KJM, Libbenga KR, Hille SC, Offringa R, Van Duijn B** (2012) Polar auxin transport: an early invention. *Journal of Experimental Botany* 63: 4213-4218
- Bridgen MP** (1993) *Alstroemeria*. *The Physiology of Flower Bulbs*: 201-209
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF** (1985) The families of the Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. . Springer-Verlag, Berlin
- De Klerk GJ** (2010) Why plants grow in tissue culture. Questions, answers and exciting prospects. *Prophyta Annual 2010*: 42-44
- De Klerk GJ, Askari N** (2012) A Century of Plant Tissue Culture; Basal features ignored for too long. *Prophyta Annual 2012*: 46 - 49
- De Klerk GJ, Pumisitapon P** (2008) Protection of in-vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 149-154
- De Klerk GJ, Ter Brugge J** (2010) Micropropagation of *Alstroemeria* in liquid medium using slow release of medium components. *Prop. Orn. Plants* 10: 246-252
- De Klerk GJ, Ter Brugge J** (2011) Micropropagation of dahlia in static liquid medium using slow-release tools of medium ingredients. *Scientia Horticulturae* 127: 542-547
- Domagalska MA, Leyser O** (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 211-221
- Dun EA, Germain AS, Rameau C, Beveridge CA** (2012) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology* 158: 487-498
- George EF, De Klerk GJ** (2008) The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Ed. Volume 1. The Background*. Springer: pp. 65-113.
- Kim KS, Davelaar E, De Klerk GJ** (1994) Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated in vitro. *Physiologia Plantarum* 90: 59-64
- Lin HS, De Jeu MJ, Jacobsen E** (1998) Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: The effect of the position on the stem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 165-169
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Pedersen C, Hansen CW, Brandt K, Kristiansen K** (1996) *Alstroemeria* plantlets can be induced to flowering by cold treatment during in vitro culture. *Scientia Horticulturae* 66: 217-228
- Rameau C** (2010) Strigolactones, a novel class of plant hormone controlling shoot branching. *Comptes Rendus - Biologies* 333: 344-349
- Rantanen M, Palonen P** : (2010) Hot water treatment released endodormancy but reduced number of flowers in potted red raspberry plants. *HortScience* 45: 894-898
- Shimizu-Sato S, Mori H** (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology* 127: 1405-1413
- Tsuchiya T, Hang A** (1987) Chromosome studies in the genus *Alstroemeria*. . *Acta Horticulturae* 205: 281-287
- Van Zaayen A** (1995) *Alstroemeria*. Virus and virus-like diseases of bulbs and flower crops: 237-249
- Verboom H** (1979) *Alstroemerias* and some other flower crops for the future. *Scientific Horticulture* 31: 33-42

Zimmermann MH, Ziegler H (1975) List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. *Transport in Plants: Phloem Transport* 1: 480-503

6. Publicaties, lezingen en presentaties

Publicaties

- De Klerk G-J, Pumisitapon P. 2008. Protection of in-vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95: 149-154.
- De Klerk G-J, Pumisitapon P. 2009. Apical dominance: Newly discovered hormone inhibits branching. *Prophyta – The Annual*: 36-39.
- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2009. Apical dominance in *Alstroemeria* cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae* 829: 145-148.
- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2011. Hormonal control of the outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured *in vitro*. *Biologia Plantarum* 55: 664-668.
- Pumisitapon P. 2012. Verbeterde weefselkweekvermeerdering van het siergewas *Alstroemeria*. Proefschrift WUR
- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2012. Moderate abiotic stresses increase rhizome-growth and propagation of *Alstroemeria in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 110: 395-400.

Symposia

- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2008. Apical dominance in *Alstroemeria* cultured *in vitro*. *Proceedings of the 6th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, 24-28 August 2008, Queensland, Australia. pp. 53.
- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2008. Apical dominance in *Alstroemeria*. *The Autumn Symposium of the Netherlands Society for Plant Biotechnology and Tissue Culture (NVPW)*, 24 October 2008, Leiden, The Netherlands.
- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2010. Stimulation and inhibition of axillary bud outgrowth in *Alstroemeria* cultured *in vitro*: evidence for a role of strigolactone. *Proceedings of the 12th International Association for Plant Biotechnology Congress*, 6-11 June 2010, Missouri, USA. pp. 128.
- Pumisitapon P, Visser RGF, De Klerk G-J. 2010. Heat increases rhizome growth and propagation in *Alstroemeria* cultured *in vitro*: evidence for a role of strigolactone. *Proceedings of the 12th International Association for Plant Biotechnology Congress*, 6-11 June 2010, Missouri, USA. pp. 129.