

## **VOORWOORD**

Graag zou ik een woordje van dank willen richten aan iedereen die op één of andere manier heeft bijgedragen tot het welslagen van dit eindwerk.

In het bijzonder wil ik mijn externe begeleider, Ir. Tom Eeckhaut, bedanken voor de goede hulp, de permanente begeleiding, de hopen informatie en voor het kritische naleeswerk van mijn teksten. Tevens ben ik Veerle Cools en de mensen van het labo op het DvP dankbaar voor de hulp en de raad bij het uitvoeren en verwerken van de proeven.

Mijn dank gaat ook uit naar mijn interne begeleider Ir. De Vos voor het leggen van het contact met mijn interessante stageplaats, en voor het nalezen van mijn werk. Maar vooral voor de onvergetelijke lessen van de voorbije jaren.

Verder wil ik ook Harry van Trier (arboretum Kalmthout) en Hydrangeum vzw (Destelbergen) bedanken voor het verschaffen van nuttige informatie..

Mijn grootste dankwoord gaat uit naar mijn ouders. Zonder hun morele en financiële steun had ik deze studies nooit kunnen voltooien. Het vertrouwen dat ik van hen kreeg, betekende veel voor mij.

Ook mijn vriendin Ellen moet ik nog bedanken voor de steun, het luisterende oor, en de talrijke aanmoedigingen.

Een speciale dankjewel gericht aan al mijn Geelse klasgenoten, maar ook aan de medehuisgenoten van het 'Damskot', voor de mooie tijd die we samen beleefden.

Bedankt iedereen,

Stijn

## **SAMENVATTING**

Vandaag de dag blijft plantenveredeling niet langer stilstaan bij de natuurlijke barrières die optreden bij genetische voortplanting. Via *in vitro*-technieken zoals embryocultuur en ovulencultuur tracht men soortkruisingsbarrières te omzeilen om de kansen op het creëren van nieuwe variëteiten en cultivars aanzienlijk te vergroten. Een soortsortiment kan worden uitgebreid door nieuwe bladvormen, bloemkleuren, geuren of andere morfologische eigenschappen te introduceren.

Het eerste deel van deze thesis, de literatuurstudie, beschrijft de theoretische benadering van de natuurlijke barrières en de *in vitro*-technieken die aangewend werden om deze op te heffen. Eerst worden embryocultuur en ovulencultuur kort gesitueerd in het gehele *in-vitro*-‘geheel’. Vervolgens wordt ook incompatibiliteit als barrière uitvoerig besproken en worden verschillende aspecten van de gebruikte technieken verder uitgediept. Daarnaast worden in een tweede deel de gebruikte materialen met bijhorende bloembiologie en de gebruikte media beschreven.

Het doel van deze studie was het creëren van interspecifieke kruisingen met het oog op het ontwikkelen van hybriden tussen verschillende soorten binnen de genera *Hydrangea* en *Ligustrum*. Indien deze hybriden levensvatbaar blijken, zullen ze gebruikt worden om nieuwe *Hydrangea*- en *Ligustrum*-cultivars te produceren. Bij *Hydrangea* was het de bedoeling het bestaande *H. paniculata*-sortiment uit te breiden door kleurgenen van *H. quercifolia* (anthocyaanproductie in de herfst), *H. macrophylla* (pH-afhankelijkheid van petaalkleuren) of andere *Hydrangea*-species in te kruisen. De kruisingen binnen *Ligustrum* waren erop gericht de wintergroene *Ligustrum* species te kruisen met de bladverliezende soorten

In een derde en laatste deel worden resultaten besproken en conclusies getrokken. AFLP-analyse werd aangewend om de veronderstelde interspecifieke hybriden te verifiëren. Voor *Ligustrum* werd tevens ook nagegaan na welke periode de vruchten van de plant geïsoleerd dienen te worden om een optimale kieming te verkrijgen. Ook werd voor dit geslacht getracht de meest gunstige mediasamenstelling voor kieming en verdere differentiatie te bepalen.

## ARTIKEL VOOR VULGARISEREND TIJDSCHRIFT

### Soortkruisingen binnen het geslacht *Hydrangea*

#### Betekenis voor de veredelingsindustrie en kwekerij

Het doel van deze studie was het creëren van interspecifieke kruisingen met het oog op het ontwikkelen van hybriden tussen verschillende soorten *Hydrangea*. Er werd getracht het bestaande *H. paniculata* sortiment uit te breiden door kleurgenen van *H. quercifolia* (anthocyaanproductie in de herfst), *H. macrophylla* (pH-afhankelijkheid van petaalkleuren) of andere *Hydrangea*-species in te kruisen. Indien deze hybriden levensvatbaar blijken, kunnen ze gebruikt worden om nieuwe *Hydrangea*-cultivars te produceren. De meeste embryo's kiemden niet, toch werden dankzij ovulencultuur 6 hybriden bekomen afkomstig van *H. paniculata* x *H. quercifolia* kruisingen. Deze veronderstelling werd door moleculaire merkers, die voor elke plant een specifiek piekenpatroon vertonen, geverifieerd. De verkregen hybriden zullen opgekweekt worden en via pollenkieming, -kleuring en kruisingen zal hun fertiliteit bepaald worden. Indien vruchtbaar, zullen de planten gebruikt worden als 'pre-breding' materiaal om via zelfbestuiving of terugkruising naar de ouder waarin men het kleinste aantal genen wil inbrengen, een nieuwe generatie te vormen.

#### Introductie

Een incompatibiliteitsmechanisme voorkomt reciproke kruisingen tussen *Hydrangea*-soorten (Kudo & Niimi, 1999; Reed, 2000a). Zaden werden enkel geproduceerd wanneer *H. macrophylla* als moederplant wordt gebruikt, maar geen enkele kiemt in vivo. Letaliteit is een belangrijke barrière die de productie van hybriden tussen ver gerelateerde soorten voorkomt (Gerstel, 1954; Oka, 1962). Sommige onderzoekers hebben deze barrières reeds omzeild bij andere geslachten en levensvatbare hybriden geproduceerd (Inoue *et al.*, 1997; Reed & Collins, 1978). De ontwikkeling van een interspecifieke hybride tussen *Hydrangea paniculata* en andere *Hydrangea*-soorten zou kunnen leiden tot het inkruisen van kleurgenen in het *H. paniculata* -sortiment. Verschillende reciproke kruisingen tussen de soorten *H. paniculata* en *H. macrophylla* werden reeds gemaakt (Reed, 2000a). Zaad werd slechts geproduceerd wanneer *H. macrophylla* als moederplant werd gebruikt; de meeste van deze zaden kiemden niet. De enkele bekomen kiemlingen stierven ofwel tijdens het cotyledonaire stadium, ofwel tijdens het ontwikkelen van de eerste echte bladeren.

Om het bekomen van interspecifieke hybriden in vele genera te vergemakkelijken, werden in vitro 'embryo rescue' procedures gebruikt (Bridgen, 1994; Sharma *et al.*, 1996), en brachten recentelijk veronderstelde hybriden tussen *H. macrophylla* x *H. arborescens* (Kudo & Niimi, 1999) en *H. macrophylla* x *H. paniculata* (Reed *et al.*, 2001) voort. Hybride embryo's hervatten vaak de groei en ontwikkelen tot normale planten wanneer ze worden verwijderd uit de ovulen en op aseptische media gebracht worden. In sommige gevallen werden gehele ovulen in cultuur gebracht om hybride planten te bekomen; deze procedure is gekend als ovulencultuur. De beperkte grootte van de zaden van de *Hydrangea* maakt het verwijderen van de embryo's onpraktisch, daarom werden gehele ovulen in cultuur gebracht.

## Materialen & methoden

### Plantenmateriaal

De volgende cultivars werden in deze studie gebruikt: *H. paniculata* ‘Praecox’, ‘Unique’; *H. quercifolia* ‘Sikes Dwarf’, ‘Snow Flake’; *H. macrophylla* spp. serrata en *H. aspera* ‘Macrophylla’.

### Gecontroleerde bestuivingen

Bij de moederplant werden de steriele bloemen verwijderd van de bloeiwijzen waarvan de geopende bloemen gebruikt zouden worden. Alle niet recent geopende en alle onvolwassen fertiele bloemen werden verwijderd. Van de overblijvende bloemen werden de antheren en de petalen (indien deze hinderden bij het emasculeren) weggenomen met behulp van een fijn pincet. De bestuiving van elke bloem werd 1 tot 3 dagen na de emasculatie uitgevoerd. Antheren die nieuw vrijgezet pollen bevatten, werden van de vaderplant verwijderd, en het pollen werd met een penseel in contact gebracht met het stigma van de geëmasculeerde bloemen van de moederplant. Niet-gebruikte bloeiwijzen op de moederplant werden verwijderd om zelfbestuiving te voorkomen.

### Interspecifiek experiment

De bestuivingen werden voor de volgende kruisingen verricht: *H. paniculata* x *H. quercifolia*; *H. quercifolia* x *H. paniculata*; *H. paniculata* x *H. macrophylla* ssp. serrata; *H. macrophylla* ssp. serrata x *H. paniculata*; *H. paniculata* x *H. aspera*; *H. aspera* x *H. paniculata*. De vruchten die niet spontaan aborteerden werden 5 weken na de bestuiving verzameld en ontsmet gedurende 15 minuten in 1 % NaOCl-oplossing. Vervolgens werden de ovulen op medium geënt in de laminar flow. Zoals aangeraden door Reed (2000b) werd als medium B-5 met 2 % sucrose gebruikt. Zoveel mogelijk ovulen werden uit de vruchten gedissecteed en in cultuur gebracht. De verdere groei gebeurde in de groeikamer, eerst 2 weken in het duister en vervolgens onder 16 h licht / 8 h donker met een lichtintensiteit van 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR (Photosynthetic Active Radiation). Na 5 weken werden de ovulen en/of de kiemplantjes telkens overgezet op vers medium. Kiemplantjes bewortelden eerst in Meli-bokalen (100 ml medium/bokaal) waarna ze geacclimatiseerd werden in de serre. Het tijdstip van acclimatisatie was hierbij afhankelijk van de ontwikkeling (voldoende rhizogenese) van de vermeende hybride kiemling.

## Resultaten en besluiten

### *H. paniculata* x *H. quercifolia*

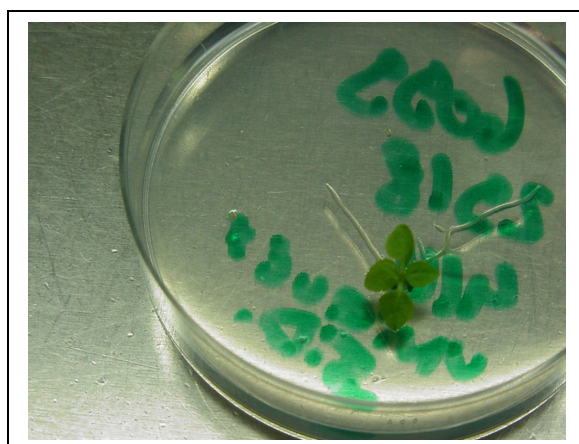
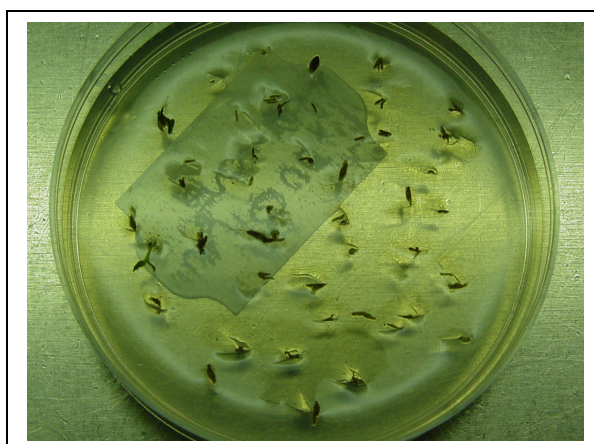
1446 Bloemen van *H. paniculata* cultivars werden bestoven met stuifmeel van *H. quercifolia* cultivars (tabel 1). Na 5 weken werden de bestoven bloemen verwijderd van de moederplant en werden de ovulen *in vitro* geïnitieerd.

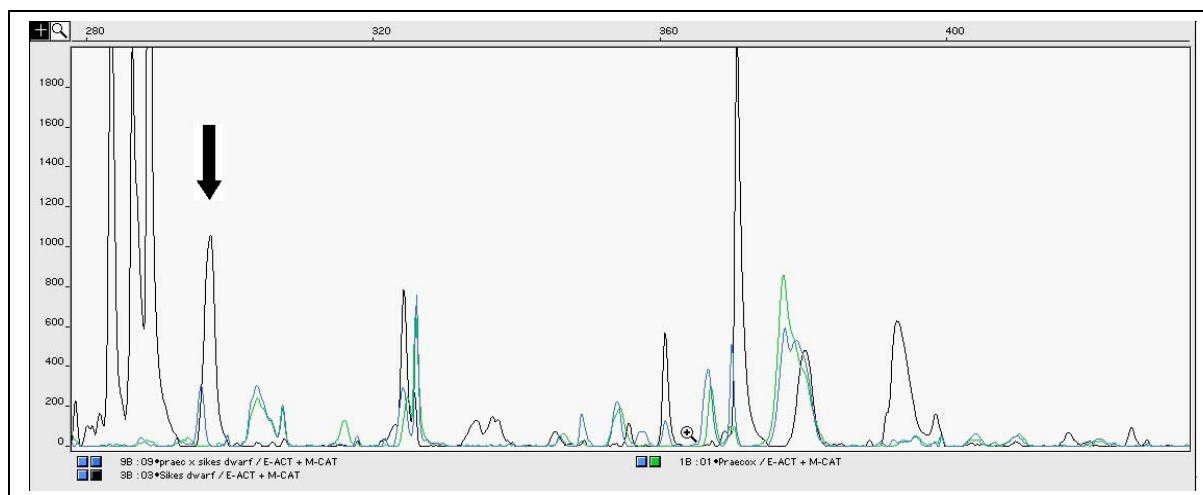


**Tabel 1** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in vitro</i>	Aantal kiemende ovulen
'Praecox' x 'Sikes Dwarf'	650	206 31,7 %	1395	9 0,6 %
'Praecox' x 'Snow Flake'	320	103 32,2 %	683	0 0,0 %
'Unique' x 'Sikes Dwarf'	294	108 36,7 %	634	10 1,5 %
'Unique' x 'Snow Flake'	182	76 41,7 %	422	10 2,3 %

Bij 'Praecox' werd een hoger percentage spontane aborties van bestoven bloemen waargenomen dan bij 'Unique'. Er werd dus een hoger aantal vruchten van 'Unique' *in vitro* geplaatst. De vruchten van 'Unique' waren meer opgezwollen dan die van 'Praecox'. Tijdens de dissectie van de vruchten bleken de ovulen een langgerekt uitzicht te hebben. De zaadhuid van 'Unique' bleef een heldere kleur behouden, terwijl deze bij 'Praecox' reeds bruin verkleurde. Na een duisterperiode van 2 weken was nog geen kieming waar te nemen. Na 8 weken licht werd er kieming opgemerkt bij alle kruisingen behalve bij 'Praecox' x 'Snow Flake' (figuur 1 en 2). In totaal kiemden 29 *H. paniculata*-ovulen. De kiemlingen die *in vivo* succesvol afgehard werden ('Praecox' x 'Sikes Dwarf': 3, 'Praecox' x 'Snow Flake': 5, 'Unique' x 'Sikes Dwarf': 3, 'Unique' x 'Snow Flake': 2), vertoonden weinig morfologische verschillen met de moederplant. AFLP-analyse moest uitsluitend geven over het al dan niet hybride karakter van de kiemlingen. Het DNA van moederplant, vaderplant en desbetreffende nakomelingen werd geïsoleerd en hun AFLP-profiel onderling vergeleken (figuur 3). Vooral de DNA-fragmenten van de vaderplant moeten vergeleken worden met die van de nakomeling. De pieken die bij de vergelijking overeenkomen en die niet aanwezig zijn bij de moederplant, wijzen op hybriditeit. In de verkregen grafiek zijn zowel bij 'Praecox' x 'Sikes Dwarf' (figuur 3) als bij 'Unique' x 'Sikes Dwarf' dergelijke pieken terug te vinden. Voor 'Unique' x 'Snow Flake' is nog geen AFLP-analyse toegepast, omdat te weinig bladmateriaal beschikbaar was. Later onderzoek zal de eventuele hybriditeit van deze kruising moeten bevestigen.

**Figuur 1** Kiemling 'Unique' x 'Sikes Dwarf'**Figuur 2** Embryo's 'Unique' x 'Snow Flake'



**Figuur 3** AFLP-patroon (elektroferogram) ‘Praecox’ x ‘Sikes Dwarf’, met nakomeling (blauw), moederplant (groen), vaderplant (zwart)

### *H. quercifolia* x *H. paniculata*

988 Bloemen van *H. quercifolia* cultivars werden bestoven met het stuifmeel van *H. paniculata* cultivars (tabel 2). De ovulen van de bestoven bloemen werden na 5 weken *in vitro* geïnitieerd.

**Tabel 2** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen		
‘Sikes Dwarf’ x ‘Praecox’	397	60	15,1 %	309	0	0,0 %
‘Sikes Dwarf’ x ‘Unique’	353	51	14,4 %	270	0	0,0 %
‘Snow Flake’ x ‘Praecox’	206	42	20,4 %	248	0	0,0 %
‘Snow Flake’ x ‘Unique’	32	9	28,1 %	34	0	0,0 %

Het percentage spontane aborties van de bestoven bloemen op de moederplant lag hoger bij het gebruik van ‘Sikes Dwarf’ dan bij ‘Snow Flake’ (tabel 2). Omdat een hoger aantal bloemen van de ‘Sikes Dwarf’ bestoven werd, werden bij deze moederplant wel meer vruchten en ovulen *in vitro* gebracht. De dissectie van de vruchten toonde aan dat de ovulen van de *H. quercifolia* kleiner, ronder en doffer van uitzicht zijn dan die van de langgerekte, meer heldere ovulen van de *H. paniculata*. De zaadhuid van de *H. quercifolia* was vrij hard en donker verkleurd. De reciproke kruising tussen *H. quercifolia* en *H. paniculata* bracht geen kiemlingen voort. Hieruit kan besloten worden dat het mogelijk is dat natuurlijke barrières een kruising tussen *H. quercifolia* en *H. paniculata* verhinderen. Mogelijk heeft de zaadhuid de kieming negatief beïnvloed. Er was geen materiaal aanwezig om een AFLP-analyse uit te voeren.

### *H. paniculata* x *H. macrophylla*

182 Bloemen van *H. paniculata* cultivars werden bestoven met stuifmeel van *H. macrophylla* ssp. *serrata* (tabel 3). Na 5 weken werden de ovulen *in vitro* geïnitieerd.

**Tabel 3** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in vitro</i>	Aantal kiemende ovulen		
'Praecox' x <i>serrata</i>	102	43	42,2 %	256	13	5,1 %
'Unique' x <i>serrata</i>	80	34	42,5 %	142	5	3,5 %

Het percentage spontane aborties van de bestoven bloemen op de moederplant lag bij beide cultivars ongeveer even hoog (tabel 3). De vruchten van de 'Unique' waren meer opgezwollen dan die van de 'Praecox', hoewel ze minder ovulen leverden. De dissectie van de ovulen toonde aan dat de ovulen een langgerekt en vrij helder wit uitzicht hadden. Na een duisterperiode van 2 weken was nog geen kieming waar te nemen. Na 8 à 9 weken licht werd er kieming opgemerkt. In totaal kiemden 18 ovulen. De *in vivo* succesvol afgeharde kiemlingen ('Praecox' x *serrata*: 2, 'Unique' x *serrata*: 1), vertoonden morfologisch weinig verschillen met de moederplant. AFLP-analyse bevestigde het niet-hybride karakter van de kiemlingen.. De knipplaatsen van de nakomeling kwamen in sterke mate overeen met die van de moederplant. Met de vaderplant werd een sterk afwijkend patroon waargenomen. De verkregen planten zijn geen hybriden. Het betreft waarschijnlijk zelfbestuiving, omdat ondanks de grote overeenkomst met de moeder, toch enkele pieken zijn weggevallen t.o.v. de moederplant.

#### *H. macrophylla* x *H. paniculata*

144 Bloemen van *H. macrophylla* ssp. *serrata* werden bestoven met stuifmeel van *H. paniculata* cultivars (tabel 4). Na 5 weken werd de helft van het totaal aantal bestoven bloemen verwijderd van de moederplant als materiaal voor het *in vitro* gedeelte. De andere helft diende als controlemateriaal.

**Tabel 4** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in vitro</i>	Aantal kiemende ovulen		
<i>serrata</i> x 'Praecox'	119	0	0,0 %	0	0	0,0 %
<i>serrata</i> x 'Unique'	25	0	0,0 %	0	0	0,0 %

Alle bloemen van de bestoven moederplant aborteerden allen spontaan op de plant (tabel 4). De bloeiwijze was uitgedroogd en leek levenloos. Er konden geen vruchten *in vitro* gebracht worden. Uit het onderzoek dat Reed (2000b) uitvoerde op interspecifieke kruisingen tussen *H. macrophylla* en *H. paniculata* bleek dat de ovulen die 3 à 4 weken na de bestuiving verzameld werden zeer klein en moeilijk uit het ovarium te verwijderen waren. In geen enkele van de 3 à 4 weken oude interspecifieke ovulen konden eventueel aanwezige embryo's gedetermineerd worden. 5 à 6 Weken na de bestuiving werden 2 typen ovulen waargenomen. Eén type was groter, met een donkere, melkwitte kleur, terwijl het andere type kleiner en doorzichtig was. Geen enkele van de kleine, doorzichtige ovulen kiemde nadat ze in cultuur gebracht werden. Vele plantjes stierven kort na de kieming af. Geen enkel plantje, verkregen uit de interspecifieke kruisingen, ontwikkelde meer dan 2 volledige sets bladeren voordat ze afstierven. De ovulen die 9 à 10 weken na bestuiving in cultuur gebracht werden, bleken het beter te doen. Er wordt verondersteld dat zij hybriden voortbrachten (Reed, 2000b)

*H. paniculata* x *H. aspera*

251 Bloemen van *H. paniculata* cultivars werden bestoven met het stuifmeel van *H. aspera* ‘Macrophylla’ (tabel 5). Na 5 weken werden de bestoven bloemen verwijderd van de moederplant en de ovulen *in vitro* gebracht.

**Tabel 5** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen
‘Praecox’ x ‘Macrophylla’	204	79 38,7 %	402	0 0,0 %
‘Unique’ x ‘Macrophylla’	47	24 51,1 %	97	0 0,0 %

Het percentage spontane aborties van de bestoven bloemen op de moederplant lag bij ‘Praecox’ beduidend hoger dan bij ‘Unique’ (tabel 5). De vruchten van ‘Unique’ waren meer opgezwollen dan die van ‘Praecox’, maar leverden minder ovulen per vrucht. Bij dissectie van de ovulen bleek dat de ovulen een langgerekt en helder wit uitzicht te hebben. Na een duisterperiode van 2 weken was nog geen kieming waar te nemen en ook na een lichtperiode bleef kieming uit. Voor een AFLP-analyse was geen materiaal aanwezig.

*H. aspera* x *H. paniculata*

712 Bloemen van *H. aspera* ‘Macrophylla’ werden bestoven met het stuifmeel van *H. paniculata* cultivars (tabel 6). Na 5 weken werden de ovulen gedissecteed uit de vruchten die vooraf van de moederplant werden geïsoleerd.

**Tabel 6** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen
‘Macrophylla’ x ‘Praecox’	465	0 0,0 %	0	0 0,0 %
‘Macrophylla’ x ‘Unique’	247	0 0,0 %	0	0 0,0 %

Alle bloemen van de bestoven moederplant aborteerden spontaan op de plant (tabel 6). De bloeiwijze was uitgedroogd en levenloos. Er konden geen vruchten *in vitro* gebracht worden. Voor AFLP-analyse was bijgevolg geen bruikbaar materiaal aanwezig.

**Besluit**

Er werd enkel kieming vastgesteld bij *H. paniculata* x *H. quercifolia* en *H. paniculata* x *H. macrophylla* ssp. *serrata*. *H. paniculata* als moederplant gaf de beste resultaten. Alleen de kruisingen waarbij *H. paniculata* en *H. quercifolia* ‘Sikes Dwarf’ als respectievelijk moederplant en vaderplant werden aangewend, gaf hybride nakomelingen als resultaat. De nakomeling met *H. quercifolia* ‘Snow flake’ als mogelijke vader is momenteel te jong om voldoende bladmateriaal te leveren voor AFLP-analyse. De kiemlingen verkregen uit de vermeende kruising met *H. macrophylla* ssp. *serrata* als vaderplant waren hoogstwaarschijnlijk het gevolg van zelfbestuiving. Bij ‘dubbele’ bevruchting (met zowel vreemd als soortegen pollen zal de zaadouder wellicht een snellere kieming van het soortegen pollen

toelaten, wat de kansen op bevruchting door het vreemd pollen sterk reduceert. Dit kan in de toekomst vermeden worden door de pluimen van de moederplant na de bestuiving van de omgeving af te sluiten door er een plastic zakje omheen te brengen. Zo kan er geen planteigen pollen op de stijlen terechtkomen. Hiermee gaan wel risico's zoals condensatie, te hoge temperaturen en schimmelinfecties gepaard. Accidentele 'normale' bestuiving wordt op deze manier wel voorkomen.

Waarschijnlijk treden er meer of substantiëler soortkruisingsbarrières op wanneer *H. macrophylla* met *H. paniculata* gekruist wordt dan wanneer geprobeerd wordt introgressie van *H. quercifolia* - genen in *H. paniculata* te verwezenlijken. Morfologisch is geen verschil waarneembaar tussen de hybriden en de moederplanten. Enerzijds worden bladkarakteristieken waarschijnlijk grotendeels matернаal bepaald, anderzijds zijn de *H. paniculata* - genen mogelijk dominant zodat de expressie van *H. quercifolia* - genen (anthocyaanvorming) pas in een latere generatie (F2) tot uiting komt.

Uiteindelijk werden vrij weinig planten afgehard, die nog niet allemaal getest konden worden. Daarom is enig voorbehoud met betrekking tot de vooropgestelde conclusies op zijn plaats. Nochtans werden heel interessante resultaten bekomen en werden interspecifieke hybriden *in vitro* opgegroeid. De efficiëntie van de *in vitro* stap kan waarschijnlijk aanzienlijk verhoogd worden door een latere initiatie.

De resultaten van deze studie vormen een interessant uitgangspunt voor verdere studie. De creatie van interspecifieke hybriden is immers mogelijk gebleken. Nochtans is de efficiëntie vrij laag en kunnen de gebruikte technieken nog verder op punt gesteld worden. De hybriden zullen de volgende jaren betrokken worden in een kruisingsprogramma dat hun volledig potentieel zal ophelderen. Bovendien kan het onderzoek uitgebreid worden naar andere soorten. Het gebruik van 'embryo rescue' lijkt aangewezen om de efficiëntie van interspecifieke kruisingen binnen het geslacht te verhogen.

## Referenties

- BRIDGEN M (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29:1243-1245.
- KUDO K, NIIMI Y (1999). Production of interspecific hybrids between *Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd. And *H. arborescens* L. *Journal of Japanese Society of Horticultural Scientists*, 68:428-439.
- GERSTEL D (1954). A new lethal combination in interspecific cotton hybrids. *Genetics*, 39:628-639.
- OKA H (1962). Phylogenetic differentiation of cultivated rice. XX. Analysis of the genetic basis of hybrid breakdown in rice. *Japanese Journal of Genetics*, 37:24-35.
- INOUE E, MARUBASHI W, NIWA M (1997). Improvement of the method for overcoming the hybrid lethality between *Nicotiana suaveolens* and *N. tabacum* by culture of F<sub>1</sub> seeds in liquid media containing cytokinins. *Breeding Science*, 47:211-216.
- REED S (2000a). Compatibility studies in *Hydrangea*. *Journal of Environmental Horticulture* 18:29-33.
- REED S (2000b). Development of an *in vitro* embryo culture procedure for *Hydrangea*. *Journal of Environmental Horticulture*, 18:34-39.
- REED S, RIEDEL G, POOLER M (2001). Verification and establishment of *Hydrangea macrophylla* 'Kardinal' x *H. paniculata* 'Brussels Lace' interspecific hybrids. *Journal of Environmental Horticulture*, 19:85-88.
- SHARMA D, KAUR R, KUMAR K (1996). Embryo rescue in plants – a review. *Euphatica*, 89: 325-337.
- REED S, COLLINS G (1978). Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules. *Journal of Heredity*. 69:311-315.

## **INHOUDSTAFEL**

<b>1. LITERATUURSTUDIE.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. In Vitro.....</b>	<b>14</b>
1.1.1. Embryocultuur.....	14
1.1.2. Ovarium- en ovulencultuur.....	15
1.1.3. Andere in vitro toepassingen.....	16
<b>1.2. Incompatibiliteit.....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Incompatibiliteit.....	17
1.2.2. Incongruentie.....	18
1.2.2.1. Prezygotische incongruentie.....	19
1.2.2.2. Postzygotische incongruentie.....	21
<b>1.3. ‘Embryo rescue’.....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Belang van het emasculeren.....	23
1.3.2. Cultuurtechnieken.....	24
1.3.2.1. In vitro.....	24
1.3.2.2. In vivo/in vitro cultuur.....	25
1.3.3. Beïnvloedende factoren.....	25
1.3.3.1. Genotype.....	25
1.3.3.2. Culturomstandigheden.....	25
1.3.3.3. Belang van het medium.....	27
1.3.4. Praktische toepassingen.....	27
<b>2. MATERIALEN EN METHODEN.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Hydrangea.....</b>	<b>29</b>
2.1.1. Plantenmateriaal.....	29
2.1.2. Bloembioogie.....	29
2.1.2.1. <i>H. aspera</i> .....	30
2.1.2.2. <i>H. macrophylla</i> .....	31
2.1.2.3. <i>H. paniculata</i> .....	32
2.1.2.4. <i>H. quercifolia</i> .....	33
2.1.3. Bestuivingen.....	34
2.1.4. Media.....	34
<b>2.2. Ligustrum.....</b>	<b>35</b>
2.2.1. Plantenmateriaal.....	35
2.2.2. Bloembioogie.....	35
2.2.2.1. <i>Ligustrum</i> sp. ‘Berry Boom’.....	36
2.2.2.2. <i>Ligustrum japonicum</i> .....	36
2.2.2.3. <i>Ligustrum lucidum</i> .....	37
2.2.2.4. <i>Ligustrum obtusifolium</i> .....	37
2.2.2.5. <i>Ligustrum ovalifolium</i> .....	37
2.2.2.6. <i>Ligustrum quihoui</i> .....	37
2.2.2.7. <i>Ligustrum tschonoskii</i> .....	37
2.2.2.8. <i>Ligustrum</i> sp. ‘Vicaryi’.....	38
2.2.3. Bestuivingen.....	39
2.2.4. Media.....	39
<b>2.3. Flowcytometrische ploëdiebepaling.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4. Prezygotisch onderzoek.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5. DNA -isolatie.....</b>	<b>43</b>
<b>2.6. AFLP – analyse.....</b>	<b>44</b>
<b>3. RESULTATEN EN BESPREKINGEN.....</b>	<b>46</b>

<b>3.1. Hydrangea.....</b>	<b>46</b>
3.1.1. H. paniculata x H. quercifolia.....	46
3.1.1.1. Doel.....	46
3.1.1.2. Materialen en methoden.....	46
3.1.1.3. Resultaten en bespreking.....	46
3.1.2. H. quercifolia x H. paniculata.....	48
3.1.2.1. Doel.....	48
3.1.2.2. Materialen en methoden.....	48
3.1.2.3. Resultaten en bespreking.....	48
3.1.3. H. paniculata x H. macrophylla.....	49
3.1.3.1. Doel.....	49
3.1.3.2. Materialen en methoden.....	49
3.1.3.3. Resultaten en bespreking.....	49
3.1.4. H. macrophylla x H. paniculata.....	50
3.1.4.1. Doel.....	50
3.1.4.2. Materialen en methoden.....	50
3.1.4.3. Resultaten en bespreking.....	50
3.1.5. H. paniculata x H. aspera.....	51
3.1.5.1. Doel.....	51
3.1.5.2. Materialen en methoden.....	51
3.1.5.3. Resultaten en bespreking.....	51
3.1.6. H. aspera x H. paniculata.....	52
3.1.6.1. Doel.....	52
3.1.6.2. Materialen en methoden.....	52
3.1.6.3. Resultaten en bespreking.....	52
<b>3.2. Ligustrum.....</b>	<b>53</b>
3.2.1. Wintergroen x wintergroen.....	53
3.2.1.1. Doel.....	53
3.2.1.2. Materialen en methoden.....	53
3.2.1.3. Resultaten en bespreking.....	54
3.2.2. Bladverliezend x wintergroen.....	55
3.2.2.1. Doel.....	55
3.2.2.2. Materialen en methoden.....	55
3.2.2.3. Resultaten en bespreking.....	55
3.2.3. Wintergroen x bladverliezend.....	56
3.2.3.1. Doel.....	56
3.2.3.2. Materialen en methoden.....	56
3.2.3.3. Resultaten en bespreking.....	57

## GEBRUIKTE SYMBOLEN EN AFKORTINGEN

ABA	abscisic acid
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BMH	basaal medium <i>Hydrangea</i>
BML	basaal medium <i>Ligustrum</i>
BSA	bovine serum albumine
CO <sub>2</sub>	koolstofdioxide
CLO	centrum voor landbouwkundig onderzoek
CTAB	alkyltrimethylammoniumbromide
cv	cultivar
cvs	cultivars
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribo Nucleic Acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetaat
EtOH	ethylalcohol
ML	medium voor <i>Ligustrum</i>
MS	Murashige & Skoog medium
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PAR	photosynthetic active radiation
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethyleen glycol
PVP	polyvinylpyrolidone
PPM	plant preservative medium
SDS	sodium dodecyl sulfaat
sp	species
ssp	subspecies
TRI	trifluraline
WPM	Woody Plant Medium



## INLEIDING

De vraag van telers en consumenten naar nieuwe of aangepaste sierplanten neemt steeds toe. Plantenveredeling, gesteund op genetische variatie, selectie en recombinatie is daarom een niet te onderschatten stap naar toekomstgerichte, duurzame land- en tuinbouw.

*In vitro* embryo rescue en ovarium/ovulencultuur leveren in een aantal genera interspecifieke hybriden op die, wegens de lage kiemkracht van het embryo of wegens spontane abortie van de bevruchte bloem, op natuurlijke wijze nooit tot stand hadden kunnen komen. ‘Embryo rescue’ en ovarium/ovulecultuur zijn technieken waarmee men tracht natuurlijke barrières die optreden na de bevruchting te omzeilen en zo de kansen op het creëren van nieuwe variëteiten of cultivars vergroot. Ze bevorderen dus natuurlijke hybridisatie en vormen zo een alternatief voor genetische modificatie. Dankzij deze technieken kunnen (grotere aantallen) interspecifieke hybriden opgeteeld worden, waardoor de kansen op een gunstige recombinatie van ouderlijke genen en het daarmee gepaard gaande gewenste fenotype stijgen.

Het doel van deze studie was het evalueren van interspecifieke kruisingen met het oog op het ontwikkelen van hybriden tussen verschillende soorten van de genera *Hydrangea* en *Ligustrum*. Indien deze hybriden levensvatbaar blijken, zullen ze gebruikt worden om nieuwe types *Hydrangea* en *Ligustrum* te produceren. Bij *Hydrangea* is het de bedoeling het bestaande *H. paniculata* sortiment uit te breiden door kleurgenen van *H. quercifolia* (anthocyaanproductie in de herfst), *H. macrophylla* (pH-afhankelijkheid van petaalkleuren) of andere *Hydrangea*-species in te kruisen. De kruisingen binnen *Ligustrum* waren erop gericht de wintergroene *Ligustrum* species te kruisen met de bladverliezende soorten.

Het Departement voor Plantengenetica (DvP) is één van de zeven departementen van het Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek (CLO) in Gent. Het onderzoek op het Departement voor plantengenetica is verdeeld over 3 afdelingen:

- Toegepaste biotechnologie van planten, wat ook onderzoek naar het gebruik van moleculaire merkers inhoudt
- Veredelen van vollegrondsgroenten met selectie van voedergrassen, groenbemesters, rode en witte klaver, voederbieten, inuline chicorei en enkele vollegrondsgroenten en zaadproductie
- Veredelen van sierplanten: azalea, roos, gazongrassen, boomkwekerijplanten en kamerplanten.

Het onderzoek wordt uitgevoerd door meer dan honderd mensen. Er is een nauwe samenwerking met overheidsinstellingen, universiteiten en privé-ondernemingen via wetenschappelijk onderzoek en contracten.

Het DvP heeft een totaal van 15000 m<sup>2</sup> serre en meer dan 100 ha bewerkt landgoed voor vermeerdering, teeltrotatie en veldproeven.

# 1. LITERATUURSTUDIE

## 1.1. In Vitro

Onder *in vitro* cultuur of plantenweefselteelt verstaat men het telen van plantendelen zoals geïsoleerde organen, weefsels, embryo's, zaden, vruchtbeginsels, meeldraden, cellen en zelfs protoplasten, op een kunstmatig samengestelde voedingsbodem en dit onder gecontroleerde en steriele omstandigheden (Pierik, 1985). Het gaat steeds om kleine delen van planten of heel kleine plantjes, die in glazen of plastic proefbuizen of bokalen worden gekweekt. Dat gebeurt op microschaal, in grote aantallen en onder steriele omstandigheden. De voedingsbodem van de 'plantjes' kunnen we bijna ideaal noemen.

De eerste succesvol geteelde plantcultuur met een geschiedenis in vele subculturen, werd in de tuinbouw bereikt. In 1934 bracht White een lopende *in vitro* cultuur van tomatenwortels in een vloeibaar medium tot stand, en in 1939 startte Gautheret met een eerste calluscultuur van wortelxplantaten op lange termijn. Beide cultuurtypes vertoonden een onbeperkte celdeling en groei, en overleefden verschillende subculturen op specifieke voedingsmedia (Altman & Ziv, 1997).

Een geslaagde *in vitro*-cultuur voldoet o.a. aan de volgende voorwaarden (De Vos, 2001):

- De culturen brengen planten voort onder volledig gedefinieerde omstandigheden;
- De plantjes kunnen worden uitgeplant in een kas of in open lucht en daarbij stellen zich weinig acclimatisatieproblemen;
- Na herhaalde subculturen kunnen er nog steeds plantjes worden gevormd;
- Het systeem kan voor verschillende cultivars worden toegepast, zonder grote wijzigingen aan te brengen;
- De productiviteit van de *in vitro* - cultuur is te vergelijken met, of beter dan, die van de gangbare technieken;
- Na vermenigvuldiging zijn de bekomen planten identiek aan de moederplant.

### 1.1.1. Embryocultuur

Een embryo ontstaat in natuurlijke omstandigheden bij het uitgroeien van een bevruchte eicel (zygote). In het jonge stadium zijn alle embryocellen totipotent: ze hebben een onbegrensde mogelijkheid om elk type cel te produceren. Totipotente cellen komen voor in weefsel dat het ontwikkelende embryo omgeeft en in het embryo zelf. Het embryo doorloopt een aantal stadia vooraleer de volledige maturiteit te bekomen (figuur 1.1).

Bij embryocultuur ontstaat het embryo onder normale *in vivo*-omstandigheden. Alleen de uitgroei van het embryo vindt *in vitro* plaats. Deze techniek mag niet verward worden met embryogenese, waarbij somatische cellen *in vitro* een embryo vormen.

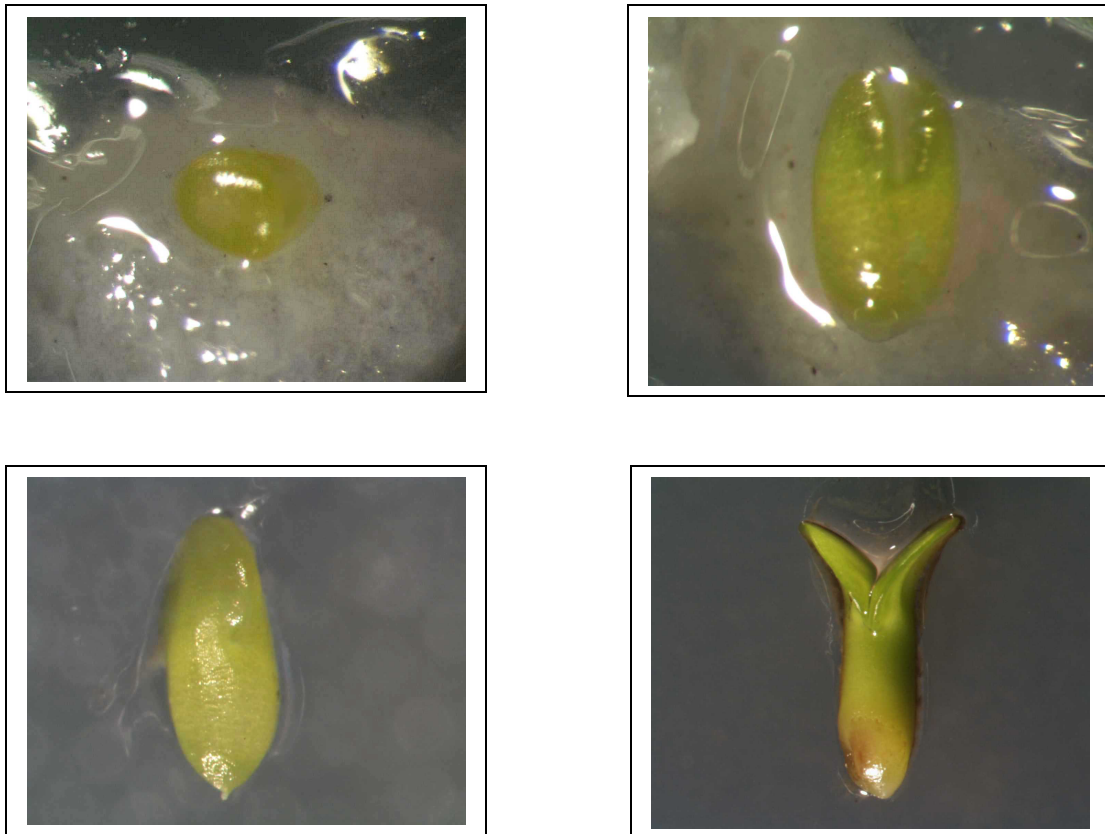
Embryocultuur kan worden aangewend om de teeltcyclus te verkorten, de werking van remstoffen in de zaadhuid of in het reserveweefsel uit te schakelen en embryo-abortie te voorkomen.

- Cultuur van onrijpe embryo's afkomstig uit onrijpe zaden

Dit type van embryocultuur wordt meestal toegepast om abortie te vermijden en zo een levensvatbare plant te bekomen. De delicate microscopische dissectie en de complexiteit van het voedingsmedium zijn hierbij een belangrijk gegeven. Toch hangt de kans op slagen vooral af van het ontwikkelingsstadium van het embryo op het moment van dissectie.

- Cultuur van rijpe embryo's verkregen uit rijpe zaden

Dit relatief eenvoudige type wordt gebruikt om een eventuele inhibitie van de zaadkieming op te heffen. Hiervoor worden de remstoffen in de zaadhuid uitgeschakeld.



**Figuur 1.1** De verschillende ontwikkelingsstadia van een embryo: globulair (linksboven), hartvorming (rechtsboven), torpedovormig (linksonder), cotyledonair (rechtsonder)

### 1.1.2. Ovarium- en ovulencultuur

Dat de leeftijd van het hybride embryo een belangrijke factor is bij het dissecteren en overenten werd al vermeld. De embryo's die in een vroeg en onrijp stadium verwijderd worden uit het zaad of de ovulen, lopen grote kans op blijvende beschadiging. Ovarium- of ovulencultuur, zoals beschreven door Rangan (1984) kan hierbij een oplossing bieden.

Bij een ovariumcultuur worden de bestoven bloemen gedissecteed. Het verwijderde ovarium met placenta wordt oppervlakkig gesteriliseerd en op het medium geënt. Zo kan een normale vrucht met zaden bekomen worden. Indien ovulencultuur aangewezen is, wordt het gesteriliseerde ovarium eerst gedissecteed, waarna de ovulen op het medium geënt worden. De eisen aan de voedingswaarde van het medium zijn groter voor jongere embryo's. Naast de basisbestanddelen kunnen groeihormonen, kokosmelk, yeast extract en caseïne hydrosylaat een gunstige invloed hebben op de groei van deze jonge embryo's.

Het maternale weefsel biedt de ingesloten embryo's een extra bescherming. De levenskans van het embryo stijgt doordat de kans op beschadiging aanzienlijk afneemt. Het nucellusweefsel, het centrale, somatische deel van de ovule dat de vrouwelijke gametofyt omringt, biedt soms extra nutriënten voor de groei van het embryo. Ook is het embryo beter in staat bepaalde nutriënten op te nemen langs de ovule of het ovarium i.p.v. deze rechtstreeks uit het complexe medium te halen. Verder bieden de integumenten, die zich rond de ovule bevinden, een extra bescherming tegen eventuele osmotische schokken.

Bij interspecifieke kruisingen tussen *Hydrangea*-soorten is het aangeraden ovulencultuur toe te passen. De zaden zijn heel klein wat het verwijderen van het embryo uit de ovule onmogelijk maakt (Reed, 2000b).

### 1.1.3. Andere *in vitro* toepassingen

- **Caulogenese**, organogenese waarbij initiatie en ontwikkeling van scheuttoppen plaatsvindt.
- **Rhizogenese**, organogenese waarbij initiatie en ontwikkeling van worteltoppen gebeurt.
- **Protoplastcultuur**, het in cultuur brengen van levend celmateriaal, na het verwijderen van de celwand.
- **Embryogenese**, weefsels of organen *in vitro* induceren om een embryo te vormen.
- **Antherencultuur**, de teelt van helmknoppen het *in vitro* benutten van de teelt van helmknoppen om haploïde planten te induceren.
- **Pollencultuur**, zie antherencultuur, met het bijkomend voordeel dat hier de diploïde wand van de helmknop zich niet kan ontwikkelen.
- **Meristeemcultuur**, gebruikt wanneer een plant inwendig besmet is met schimmels, bacteriën of een virus. De ongedifferentieerde meristeemcellen zijn meestal vrij van ziektekiemen.
- **Calluscultuur**, differentiatie van wondweefsel wat leidt tot vorming van organen of weefsel (scheuten, wortels, nieuw wondweefsel, ...)

## 1.2. Incompatibiliteit

Incompatibiliteit tussen soorten kan gecontroleerd worden door één van twee hoofdmechanismen, incompatibiliteit of incongruentie (Hogenboom, 1975). Incompatibiliteit is betrokken bij kruisingen tussen gerelateerde soorten die tenminste enkele elementen van een door een S-gen gecontroleerde zelf-incompatibiliteitssysteem bezitten. Incongruentie komt kenmerkend voor bij kruisingen waar een aparte evolutie van de partners leidde tot een falen in de controle van het gedrag van de pollenbuis in de stamper. Naast deze barrières van incompatibiliteit en incongruentie moet ook rekening gehouden worden met omgevingsomstandigheden, zoals temperatuur (Kho & Bear, 1972), ouderdom van de bloem (Werbrouck, 1987) en verschillen in lengte van de stijl tussen beide ouders (Williams & Rouse, 1988) bij *Rhododendron*.

Reed (2000a) onderzocht de mogelijkheid op het creëren van hybriden tussen *Hydrangea macrophylla* en andere *Hydrangea* species. De zelf-incompatibiliteit van elk van de soorten werd geëvalueerd om zo het belang van emasculatie als voorbereiding op gecontroleerde bestuivingen vast te stellen. Een zelfbestuiving werd uitgevoerd bij *H. arborescens*, *H. quercifolia*, *H. paniculata* en *H. macrophylla*. Enkel bij *H. arborescens* werden geen levensvatbare zaden verkregen.

In 1912 vermeldde Foucard een hybride tussen *Hydrangea macrophylla* var. *rosea* en *H. paniculata*. De plant zou geen pluimvormige bloeiwijze hebben vertoond en droeg slechts steriele bloemen (Haworth-Booth, 1950). Cayeux zou een hybride tussen *Hydrangea macrophylla* var. *rosea* en *H. petolaris*, de H X *hortentiolaris* genaamd, hebben gecreëerd. Volgens Haworth-Booth, raakten beide hybriden verloren nog voor ze op de markt konden gebracht worden.

### 1.2.1. Incompatibiliteit

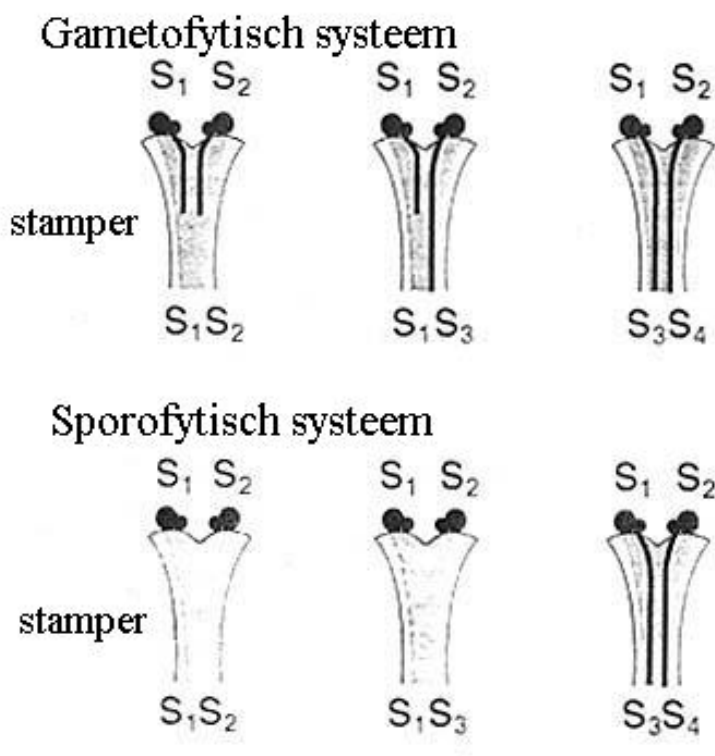
De evolutie van bloeiende planten wordt gekenmerkt door het streven naar genetische variabiliteit. De evolutietheorie is voornamelijk gebaseerd op sexuele reproductie tussen genetisch verschillende ouders. Planten bezitten een methode om inteelt te vermijden: zelf-incompatibiliteit. Deze methode houdt in dat het pollen van een plant niet in staat is door het stigma van dezelfde plant te groeien, terwijl pollen van een andere plant van dezelfde soort dat wel kan. Het is een barrière tegen inteelt en komt meestal tot uiting voor de bevruchting plaatsvindt, zodat bevruchting van de eicel door 'verwant' pollen verhinderd wordt.

Zelf-incompatibiliteit vermijdt de aanwezigheid van negatieve, homozygote recessieve allelen in een populatie. Zelf-incompatibiliteit omvat meestal de interactie tussen de pollenkorrel, de pollenbuis, en de stigma. (Dickinson & Roberts, 1986; Dzelzkalns, Nasrallah & Nasrallah, 1992; Haring, *et al.*, 1990; McClure, 1990).

Onderscheid dient gemaakt te worden tussen gametofytische en sporofytische incompatibiliteit (figuur 1.2). De eerste vorm is het resultaat van interacties tussen pollenbuis en stijl, bepaald door het genotype van het pollen zelf (1 allel ipv 2). Hier wordt de groei van de pollenbuis in de stijl geremd. Incompatibiliteit wordt veroorzaakt door een gen(S)I met een aanzienlijk aantal allelen:  $SI_1, SI_2, SI_3, SI_4, \dots, SI_n$ . Het S-allel wordt pas na de voltooiing van de meiose geproduceerd (Newbigin *et al.*, 1993; Kao and McCubbin, 1996). Omdat

pollen haploïd is, is slechts één van de SI allelen tot uiting gekomen, terwijl de diploïde stigma het produkt van 2 allelen draagt. Deze vorm van incompatibiliteit komt voor telkens wanneer twee te kruisen planten dezelfde allelen dragen. Het voorkomen van incompatibele combinaties daalt aanzienlijk, wanneer het aantal loci toeneemt (Mulcahy & Bergamini-Mulcahy, 1983).

Sporofytische incompatibiliteit daarentegen is het resultaat van de interacties tussen pollenbuis en stijl bepaald door het genotype van de diploïde ouderplant. De groei van de pollenbuis wordt hier geremd aan de oppervlakte van het stigma. De S-allelen worden geproduceerd voordat de meïose voltooid wordt (Newbigin *et al.*, 1993; Kao and McCubbin, 1996). De aanwezigheid van 1 zelfde allel bij pollen en stigma is al voldoende om bevruchting te voorkomen.



**Figuur 1.2** Onderscheid tussen gametofytische en sporofytische incompatibiliteit (Newbigin *et al.*, 1993)

### 1.2.2. Incongruentie

Na bestuiving en kieming van het pollen wordt de oriëntatie van de directe groei van het pollen doorheen de stigma en de stijl gecontroleerd in elk stadium van het proces. De volgorde van reacties van pollenbuis en stijl moeten worden gecoördineerd. Deze coördinatie is onmogelijk met pollen van vreemde soorten. Omdat het pollenmateriaal niet als soorteigen wordt herkend, treedt er te weinig interactie op tussen kiembuis en stijl. De eiwitten van het pollen worden niet herkend door receptoren van de cellen van de moederplant (Hogenboom, 1975). Normaal veroorzaakt het tekort aan één of meerdere stappen de incongruente reactie. Deze stappen maken deel uit van een ketting van acties die beginnen met het contact van pollen en stijl. Een zogenaamde incongruente 'afwijzing' treedt op.

(Zelf)-incompatibiliteit is dus een verdedigingsmechanisme tegen inteelt en treedt op wanneer de ouders te verwant zijn. Incongruentie daarentegen treedt pas op wanneer de ouders niet verwant genoeg zijn. Incongruentie komt in een later stadium tot uiting. Er ontbreken bepaalde stappen in de enzymcascade-reactie na de bestuiving. Verdere ontwikkeling van het hybride genoom kan belemmerd of zelfs gestopt worden door veelsoortige barrières (tabel 1.1).

**Tabel 1.1** Verschillende uitingen van incongruentie na interspecifieke bestuiving (Eeckhaut, 2002)

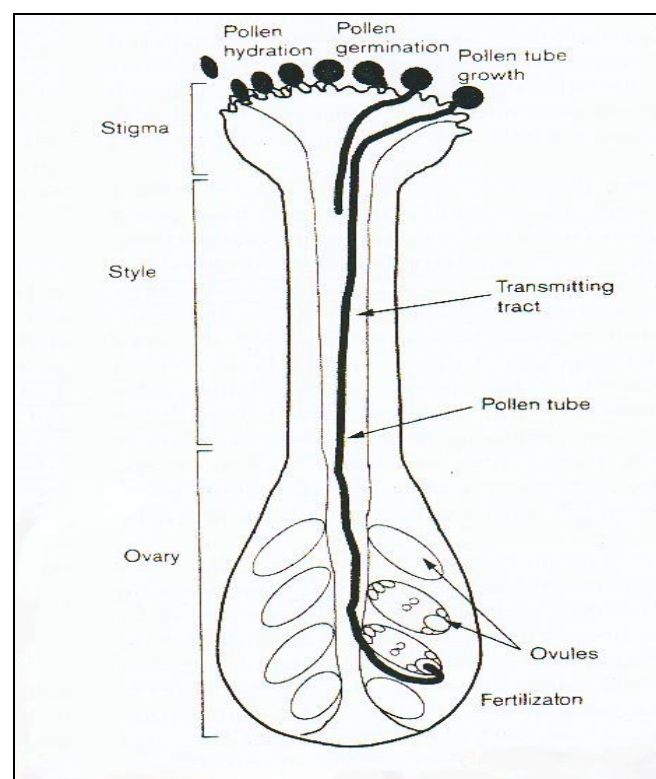
	<b>Incongruentie type</b>	<b>Mogelijke oplossing</b>
prezygotisch	onderdrukking van groei pollenbuis of versmelting spermakern met eicel	prefertilisatie behandelingen
postzygotisch	afwezigheid van endosperm, geen zaadkieming	embryo rescue
	albinisme	bilaterale kruisingen; ‘bridge’ planten
	tekort aan groeikracht (‘hybrid vigor’)	andere kruisingen
	‘hybrid breakdown’	andere kruisingen
	steriliteit	allopolyploidisatie

#### 1.2.2.1. Prezygotische incongruentie

De groei van de pollenbuis is één van de belangrijkste processen voor de bevruchting van hogere planten. Wanneer een pollenkorrel op een stigma terechtkomt, neemt hij water op, waarna hij kiemt om een pollenbuis te produceren. De pollenbuis komt de stamper binnen tussen de wanden van de stigmaticellen, groeit daarna verder door een extracellulaire matrix in het geleidend weefsel van de stijl, en komt uiteindelijk aan de ovulen (Mascarenhas, 1989). De pollenbuisstrekking treedt op door de toevoeging van celwandcomponenten (bv. pectine), die door vesikels naar de tip worden getransporteerd (Franklin-Tong, 1999; Stepka *et al.*, 2000). De groeiende pollenbuis bezit een karakteristieke polarisatie van cytoplasma en componenten van het cytoskelet, gelijkaardig aan andere ‘tip-growing’ cellen zoals bij wortelharen (Schiefelbien *et al.*, 1993) en dergelijke. De pollenbuis wordt naar het filiform apparaat geleid. De kiembuis komt aan in een kleine opening in de ovule-integumenten, de micropyle genaamd, waardoor de pollenbuis de embryonale zak penetreert (Higashiyama *et al.*, 1998; Wilhelmi and Preuss, 1996). Higashiyama *et al.* (2000) toonden aan dat hierop de pollenbuis openbreekt en zijn inhoud loost doorheen de top. Binnenin de pollenwand bevinden zich 2 soorten kernen: de weinig gecondenseerde vegetatieve kern die van belang is voor de pollenkiembuisgroei en de sterk gecondenseerde generatieve kern, die splitst in 2 spermakernen. Deze spermakernen zijn uiteindelijk verantwoordelijk voor de dubbele bevruchting van de eicel en de beide poolkernen in de gepenetreerde ovule. De vegetatieve kern bevat veel meer cytoplasma dan de generatieve kern.

Het mechanisme waardoor de immobiele spermacellen getransporteerd worden om dubbele bevruchting te vervullen is niet gekend (Higashiyama *et al.*, 2000), hoewel het transport door myosine langs actinefilamenten een mogelijkheid is (Zhang & Russell, 1999).

Eén spermacel versmelt met de eicel. Dit proces wordt syngamie genoemd (vereniging van gameten) of bevruchting. De zygote is het product van deze syngamie, en zal delen en groeien. Er treedt een polarisatie tussen apicaal en wortelmeristeem op waardoor een embryo gevormd wordt. Indien dit kiemt treedt differentiatie tot een nieuwe plant met wortel, stam en blad op. Uiteindelijk wordt een volwassen plant bekomen. De andere spermacel wordt één met de centrale cel. Dit is de tweede syngamie en vervolledigt de dubbele bevruchting (Russel, 1993). Het is een 3-voudige fusie tussen de 2 polaire nucleï van de centrale cel en de spermacel. Het resultaat is het endosperm, dat uitgroeit tot een voedzaam reserveweefsel voor het ontwikkelende embryo binnenin het zaad door accumulatie van nutriënten van de moederplant. De benodigde tijd vanaf de opname van water door de pollenkorrel tot de aflevering van de spermakernen in de embryonale zak hangt af van de soort, gaande van enkele uren tot een aantal maanden. Een overzicht van de verschillende stadia wordt getoond in figuur 1.3.



**Figuur 1.3** Veralgemeend diagram van de bevruchting (Franklin-Tong, 1999)

Hoewel reeds interessante resultaten bekomen werden, is de invloed van fytohormonen op signaaltransductie nog niet opgehelderd (Baker *et al.*, 1997; Katsukawa *et al.*, 2000). ABA-concentraties nemen snel toe in oncompatibele bestoven bloemen. Ze nemen traag toe in onbestoven bloemen, terwijl ze opmerkelijk toenemen na compatibele bestuiving. De auxine concentraties namen toe na compatibele bestuiving. Het ethyleenniveau blijft relatief onaangetaast na compatibele bestuiving maar stijgt na oncompatibele bestuiving of niet-bestuiving. ABA en ethyleen veroorzaken bloemval van incompatibele of niet-bestoven bloemen. Een praktische toepassing kan het gebruik van antagonisten van ethyleen ( $\text{CO}_2$ , Ag,...) inhouden om incompatibele/incongruente kruisingen te realiseren (tenminste als de toename van het ethyleen niveau één van de oorzaken van incongruentie is - en niet één van de gevolgen). Nochtans blijkt in *Nicotiana* een correlatie te bestaan tussen ethyleenproductie na bestuiving van volwassen stampers en groei van het pollen. De productie van ethyleen verschilt afhankelijk van het gebruikte pollen. In sommige gevallen kan ethephon bij



incongruente bestuivingen het tegenhouden van de groei van de pollenbuis in de stijl milderer (Sanchez & Mariani, 2002). Uitgaande van deze data zou ethyleen een tweevoudig effect hebben: een bevordering van de groei van ongelijksoortig pollen, maar eveneens abscissie na incongruente bestuiving. Dit laatste betekent dus een begrenzing van de mogelijkheid om de ovulen te bereiken door de spermakernen.

Pollenkieming en -groei doorheen de stijl zijn duidelijk heel complex en worden geregeld door een uiteenlopend gamma aan signaalmoleculen. Verschillende soorten ontwikkelden verschillende systemen om het groeien van de pollenbuis doorheen de stijl te leiden, wat interspecifieke kruisingen inhijbeert. Bevruchting kan geremd worden tijdens verschillende stadia die elkaar na de bestuiving opvolgen (figuur 1.4). Deze ‘incompatibiliteit’ kan veroorzaakt worden door een verschil in bloemmorfolgie (Williams & Rouse, 1988; Williams & Rouse, 1990). In sommige gevallen, bij prezygotische incongruentie die interspecifieke hybridisatie in het geheel inhijbeert, kan de pollengroei in sterke mate vertraagd worden. Hier kunnen de embryonale zakken reeds gedegeneerd zijn wanneer de spermacellen de micropyle bereiken (Williams & Rouse, 1990).

pollen komt neer op de stempel	▼ → korrel kiemt niet
stuifmeelkorrel kiemt en produceert pollenbuis	▼ → buis sterft af op stempeloppervlak
buis groeit doorheen stempeloppervlak en komt stijl binnen	▼ → pollenbuis sterft af in kanaal van de stijl
pollenbuis groeit doorheen kanaal van de stijl	▼ → buis dringt vruchtbeginsel niet binnen
pollenbuis dringt vruchtbeginsel binnen	▼ → buis dringt micropyle van ovule niet binnen
pollenbuis komt micropyle van ovule binnen	▼ → buis komt embryonale zak niet binnen
pollenbuis komt embryonale zak binnen	▼ → buis brengt geen sperma vrij in embryonale zak
pollenbuis loost spermacellen in embryonale zak	

**Figuur 1.4** Inhibitie van de bevruchting na incompatibele kruisingen op verschillende stadia (Williams *et al.*, 1982)

### 1.2.2.2. Postzygotische incongruentie

- Ontbreken van zaadvorming

Het verschil in ploëdieniveau tussen ouderplanten zou volgens Badger (1988) een van de grootste incongruentiebarrières kunnen zijn, door het veroorzaken van een ‘triploëid block’. Dit resulteert in misvorming van het endosperm en de inhibitie van de kieming. Het gebruik van *in vitro* media, dat het endosperm vervangt en de volgroeïing van het hybride embryo toelaat, kan het laatstgenoemde probleem oplossen. De methode zou niet alleen het redden van kiemplanten afkomstig van meerdere kruisingen mogelijk maken, maar ook het redden van meer kiemplanten per kruising toelaten. Het aantal overlevende kiemplanten zou toenemen, waardoor de kans om een gewenst genotype op te telen stijgt.

- Albinisme van de hybriden

Het beletten van de ontwikkeling van de chloroplast in hybriden is te wijten aan plastoom-genoom incompatibiliteit. Volgens Yao & Cohen (2000) ontwikkelen

albino's in het donker geen prolamellaire lichamen in hun etioplast en vormen ze in licht geen grana, wat aangeeft dat het blok tegen chloroplastontwikkeling voor of tijdens de ontwikkeling van de etioplast optreedt. Het voorkomen van albinisme wordt vaak gekoppeld aan de overerving van plastid DNA en daarom aan het gebruik van elke ouder, als pollendonator of als –receptor. *Zantedeschia* is een modelgewas voor het onderzoek naar plastid DNA overerving na interspecifieke kruisingen. Yao *et al.* (1994 ; 1995) ondervonden dat het gebruik van brugplanten een hulp zou kunnen zijn voor het bekomen van levensvatbare hybriden tussen 2 secties van het genus. Yao & Cohen (2000) stelden een multigene controle van plastoom-genoom incompatibiliteit en plastid DNA overerving voor. Het blijkt immers dat meer groene planten bekomen werden naargelang het belang van de ouder die het maternaal DNA leverde steeg. Zwarte chlorosis kan het niet levensvatbaar zijn van hybride kiemplanten veroorzaken (Przywara *et al.*, 1989; 1996; Badami *et al.*, 1997; Ha *et al.*, 1998).

- Tekort aan groeikracht

Een tekort aan groeikracht wordt vaak veroorzaakt door lage synthese van chloroplasten. Daarenboven kunnen ook incompatibiliteit tussen beide ouderlijke genomen en de vorming van 'hybride' proteïnen groeiinhiberend zijn. Een tekort aan groeikracht kan niet zomaar opgelost worden en moet daarom in de mate van het mogelijke verhinderd worden door het gebruik van andere combinaties van ouderplanten.

- 'Hybrid breakdown'

Bestuiving met pollen van een andere soort, vaak wild en nauw verwant, kan de ontwikkeling van een embryo induceren. Tevens veroorzaakt het een eliminatie van de chromosomen van de wilde soort, wat ervoor zorgt dat de ontwikkelende kiemling haploïd is (Kasha & Kao, 1970; Rowe, 1974).

- Steriliteit van de hybride

Het kan nodig zijn 'embryo rescue' te combineren met allopoloïdisatie om vruchtbare nakomelingen te bekomen (Chen *et al.*, 2002). Niet-homologe chromosomen kunnen de synthese van functionele gameten immers verhinderen, wat opgelost kan worden door chromosoomverdubbeling. Allopolyploïden brengen homogene gameten voort, wat de voorspelbaarheid van de F<sub>2</sub> vergroot. Anderzijds beperken ze de expressie van recessieve genen die enkel aanwezig zijn in de chromosomen van één van beide ouderlijke soorten.

### 1.3. 'Embryo rescue'

Een groot aantal verre kruisingen zijn moeilijk te verwezenlijken met het gebruik van conventionele methoden. Dit kan een gevolg zijn van pre- of postfertilisatiebarrières. Na de meeste kruisingen waarin de bevruchting wel plaats vindt, sterft het hybride embryo af voor verdere groei optreedt. Zelfs indien zaad gevormd wordt, ontkiemt dit niet of worden alleen zwakke zaailingen geproduceerd die niet in staat zijn te overleven. Dit is vooral te wijten aan het verschil tussen de ouderlijke genomen wat resulteert in het afsterven van het embryo, het onvoldoende aanmaken van endosperm, onleefbaarheid van zaad, albinisme, lage groeikracht en steriliteit van de hybride (Agnihotri, 1993). Door de jaren heen zijn reeds vele interspecifieke en intergenerische hybriden gekweekt door middel van embryocultuur.

Op de natuurlijke generatieve manier reproduceert een plant zich door de ontwikkeling van het embryo. De term 'embryo' wordt pas gebruikt vanaf het moment dat een deling heeft plaatsgevonden van de bevruchte eitjes of van de zygote binnen de embryonale zak van de ovule. Door een welgeordende reeks delingen, kan het embryo differentiëren, volgroeien en ontwikkelen tot een nieuwe volwaardige plant. Het embryo kan dus omschreven worden als een multicellulaire structuur die zich samen met het endosperm in het zaad bevindt, en eigenlijk een minuscule, jonge versie van de plant is. Het embryo bezit alle nodige eigenschappen om, in gunstige omstandigheden, uit te groeien tot een volwassen plant. Wanneer men probeert om een mogelijk waardevolle kruising uit te voeren waarbij verwacht wordt dat abortie optreedt, kan het embryo gered worden door het te verwijderen uit de zaadknop (ovule) en het vervolgens op een aangepast medium over te brengen.

'Embryo rescue' kan ook de efficiëntie van de kruisingen aanzienlijk verbeteren in vergelijking met traditionele kruisingen (Faure *et al.*, 2002). Hybridisatie met behulp van 'embryo rescue' is mogelijk bij *Capsella* (Monnier, 1988), *Tulipa* (Van Creij, 1997), *Lilium* (Asano & Myodo, 1977; Arzate-Fernandez *et al.*, 1998; Van Tuyl *et al.*, 1996), *Arachis* (Feng *et al.*, 1996), *Alstroemeria* (De Jeu & Jacobsen, 1995; Burchi *et al.*, 1997), *Camellia* (Hwang *et al.*, 1992), *Nicotiana* (Reed & Collins, 1978; Nikova & Zagorska, 1990), *Phaseolus* (Mok *et al.*, 1978), *Cajanus* (Mallikarjuna & Moss, 1995) en binnen de Brassicaceae (Inomata, 1978; Quazi, 1988; Gundimeda *et al.*, 1992; Thierfelder *et al.*, 1992; Lelivelt, 1993; Li *et al.*, 1995; Momotaz *et al.*, 1998); reviews zijn gepubliceerd door Sharma *et al.* (1996) and De Jeu (2000).

*In vitro* embryo procedures werden reeds gebruikt om het verkrijgen van interspecifieke hybriden in verscheidene genera te vergemakkelijken (Bridgen, 1994; Sharma *et al.*, 1996). Recentelijk zijn de technieken gebruikt om veronderstelde *H. macrophylla* x *H. arborescens* hybriden te bekomen (Kudo & Niimi, 1999), en om hybriden te creëren tussen *H. macrophylla* en andere *Hydrangea*-species zoals *H. paniculata* en *H. quercifolia* (Reed, 2000b).

#### 1.3.1. **Belang van het emasculeren**

Bepaalde karakteristieke kenmerken van de bloeiwijze en fysiologische reproductie van plantenfamilies moeten bekend zijn voor de emasculatie. Het aantal antheren (mannelijke organen) is gebaseerd op het basisgetal dat constant is voor elke bloem van een bepaalde familie. Desondanks kunnen antheren van soorten, behorende tot dezelfde familie

morfologisch verschillen. Wanneer men kruisbestuivingen wil uitvoeren, moeten deze voorafgegaan worden door emasculatie om zelfbestuiving te voorkomen. De antheren worden verwijderd in het knopstadium, voordat er stuifmeel losgelaten wordt (anthese). Eventueel kan ook geteld worden hoeveel antheren al uit de knop gehaald zijn, zodat onnauwkeurigheden uitgesloten zijn. Bij sommige soorten komen de mannelijke organen individueel voor, maar bij andere zijn ze vergroeid zodat ze in hun geheel kunnen verwijderd worden. (Watts, 1980)

Bij *Hydrangea*-bloemen die gebruikt worden in gecontroleerde bestuivingen wordt emasculatie aanbevolen (Reed, 2000a).

### 1.3.2. Cultuurtechnieken

#### 1.3.2.1. *In vitro*

De basisvereiste om ‘embryo rescue’ uit te voeren bij verre kruisingen, is dat de integriteit van het hybride genoom in het embryo behouden blijft. Ook is het een vereiste dat dit embryo de normale verdere groei kan hervatten, bijgestaan door essentiële nutriënten. Daarom is de *in vitro* techniek de meest gebruikte methode voor ‘embryo-rescue’. De techniek laat immers toe met onrijpe embryo’s of embryo’s met onvolgroeid endosperm te werken. Zelfs bij globulaire embryo’s werden al gunstige resultaten behaald. Het succes van deze methode hangt grotendeels af van het rijpheidsstadium van het embryo en de samenstelling van het medium. Tijdens de groei past het embryo zijn behoefte aan, daarom dient het embryo op andere media geënt te worden indien nodig.

‘Embryo rescue’ wordt uitgevoerd in 1 (embryo cultuur) of 2 stappen (*in ovulo* cultuur + embryo cultuur). Indien mogelijk zal de ovule uit het vruchtbeginsel geïsoleerd worden en *in vitro* tot zaad rijpen, waarna het zaad wordt getransfereerd naar een kiemingsmedium. Een alternatief hiervoor is directe kieming van de ovule op hiertoe aangerijkte media. Meestal wordt gibberelline toegevoegd om de kiemrust te doorbreken, vooral bij houtige gewassen. Indien de ovulen te klein of te fragiel zijn, zal in een eerste fase het volledige ovarium of een deel hiervan (de zgn ‘ovary slice’ cultuur) in cultuur gebracht worden. In zeldzame gevallen kan het embryo zelf uit de ovule verwijderd worden en rechtstreeks op kiemingsmedium geënt worden. De meest toegepaste cultuurmethoden zijn ‘ovary slice’ cultuur, cultuur van ovule met placenta, ovulecultuur en cultuur van de embryonale zak (Chi, 2002).

Een geschikt medium om de embryonale groei te bevorderen of de kieming te stimuleren dient bereid te worden. Monnier (1988) toonde aan dat het succes van een ‘embryo rescue’ medium gedeeltelijk afhangt van suiker, Fe- en Ca-concentratie. Voordat, het embryo op een aseptische manier uit de ovulen of zaden kan gedissecteed worden, dienen deze eerst ontsmet te worden. Hiervoor werd 1 % NaOCl gebruikt. Het eigenlijke dissecteren van de zaden of ovulen en het vervolgens overbrengen op medium is geen complex werk maar wel vrij arbeidsintensief. Aandacht dient vooral geboden bij het werken met kleinere embryo’s. Hierbij is het gebruik van een binoculair aangeraden. Wanneer de embryo’s *in vitro* uitgegroeid zijn tot bewortelde plantjes, worden ze gedurende een periode afgehard onder plastic of in een fytotron, onder belichting en bij hoge luchtvochtigheid. Zo kunnen de planten zich geleidelijk aanpassen aan *in vivo* omstandigheden. In bepaalde gevallen zal het onmogelijk blijken het embryo onbeschadigd uit ovulen of zaad te verwijderen. Daarom wordt het embryo in zulke gevallen niet of pas later gedissecteed

### 1.3.2.2. In vivo/in vitro cultuur

Het endosperm is doorslaggevend voor de ontwikkeling van het embryo. Degeneratie van het endosperm kan een onvoldoende voeding van het embryo met zich meebrengen met een inhibitie van de groei als gevolg. De transplantatie van het hybride embryo in gezond endosperm, gecultiveerd op synthetische media, kan een oplossing bieden en de ontwikkeling in positieve zin beïnvloeden. Het embryo beschikt hier dan over zijn natuurlijke componenten, geleverd door het endosperm van een normaal bevruchte ovule, die nodig zijn om tot een volwaardige plant uit te groeien. Hierdoor worden selectieproblemen voor het kiezen van een geschikt medium vermeden.

Kruse (1973, 1974a, 1974b) was één van de eerste die erin slaagde hybride planten te verkrijgen uit verre kruisingen zoals *Hordeum x Triticum*, *Hordeum x Secale* en *Hordeum x Agropyron* met behulp van *in vivo/ in vitro* cultuur. Het endosperm werd gewonnen uit gerstovulen met een ouderdom van 14 tot 18 dagen waaruit de embryo's werden verwijderd. Onder *in vitro* omstandigheden werden de hybride embryo's verder opgekweekt op het endosperm van deze gerstovulen. Het endosperm van de gerstovulen, in contact met de vreemde embryo's werd op zijn beurt geënt op een artificieel medium. Zelfs het plaatsen van meerdere jonge hybride embryo's op eenzelfde endosperm gaf een positief resultaat. Omdat een eenvoudiger medium gebruikt wordt dan bij het rechtstreeks enten van een embryo, kan deze techniek een oplossing bieden bij embryo's die moeilijk of niet groeien op een artificieel medium.

Uit onderzoek op *Trifolium*, *Lotus* en *Ornithopus* werd afgeleid dat hybride embryo's, verwijderd in het hartvormige stadium, niet verder ontwikkelden wanneer ze contact hadden met een voedingsmedium dat essentiële ingrediënten (zoals zouten en vitaminen) bevatte (Williams & Delatour, 1980). De groei en differentiatie van dezelfde embryo's gebeurde beter op zusterendosperm. Zowel endosperm afkomstig van de moederplant, vaderplant, andere planten van dezelfde soort, of zelfs van andere soorten, bewezen allen hun efficiëntie bij het opgroeien van hybride embryo's.

## 1.3.3. **Beïnvloedende factoren**

### 1.3.3.1. Genotype

Zowel op soort- als cultivarniveau kan het genotype bepalend zijn voor de kans op slagen (Kruse, 1973; 1974a; 1974b; Burchi *et al.*, 1997; Gundimeda *et al.*, 1992; Kudo & Niimi, 1999; Li *et al.*, 1995; Mallikarjuna *et al.*, 1995; Momotaz *et al.*, 1998; Reed & Collins, 1978).

### 1.3.3.2. Culturomstandigheden

- Ontwikkelingsstadium van het embryo bij de isolering

Hoe ontwikkelder het embryo *in vivo* is, hoe gemakkelijker het *in vitro* te cultiveren is. Toch is het mogelijk om hele kleine embryo's te kweken via speciale technieken, zoals transplantaties in het endosperm (Williams & De Latour, 1980) (zie 1.3.2.2).

- Groeicondities van de moederplant

Het telen van de moederplant onder gecontroleerde omstandigheden resulteert in een betere endospermvorming, en daardoor in een betere groei van de geïsoleerde embryo's. Goed gedifferentieerde embryo's met voldoende endosperm zullen eenvoudiger te cultiveren zijn (Yeung *et al.*, 1981). De moederplant moet vrij zijn van pathogenen en worden opgegroeid onder hygiënische omstandigheden om latere problemen met contaminanten te vermijden. De voorbereidingsfase kan afhankelijk van de soort tot 3 maanden duren. Gedurende die tijd groeit de plant onder optimale omstandigheden. Indien men de embryonale groei wil stimuleren, kunnen de bloemen behandeld worden met gibberellinen.

- Samenstelling van het medium

Voor een optimale groei dient het medium afgestemd te zijn op de noden van de plant. Een voedingsmedium is opgebouwd uit een aantal essentiële factoren: anorganische zouten, sporenelementen, een koolstofbron als energiebron en vitamines. Deze worden al dan niet aangevuld met bijkomende bestanddelen zoals plantengroeieregulatoren, organische stikstof, organische zuren en complexe substanties. Voor veel species voldoen MS (Murashige & Skoog, 1962) mineralen, soms is het echter nodig om op een andere samenstelling zoals WPM-medium (Woody Plant Medium) (Lloyd & McKown, 1981) over te schakelen. Meestal wordt gebruik gemaakt van vaste media. Hierbij moet aandacht besteed worden aan de gebruikte agar. De kwaliteit van de agar kan een effect hebben op regeneratieprocessen. Hierbij is regeneratie van wortels en scheuten het meest gevoelig. Elke plantensoort heeft specifieke eisen (Scholten & Pierik, 1998). Bovendien is de kwaliteit van de agar geen constant gegeven. Voor onrijpe embryo's is het aangewezen de suikerconcentratie te verhogen. Door het verlagen van de osmotische potentiaal wordt het barsten van ovulen of embryo verhanderd.

- O<sub>2</sub>

Zuurstofbehoefte bij embryoculturen blijkt soms hoger te liggen dan het normaal zuurstofgehalte in de lucht (Monnier, 1988). Hier worden normaal geen speciale voorzieningen getroffen om dit te verhelpen.

- Licht

Om voortijdige kieming te vermijden, worden geïsoleerde embryo's indien nodig 1 tot 2 weken in een donkere omgeving geplaatst. In de meeste gevallen is licht noodzakelijk voor *in vitro*-vermeerdering. De fotoperiode, de intensiteit en het spectrum zijn belangrijke karakteristieken. Een veel gebruikt lichtregime is 16 h licht / 8 h donker met een lichtintensiteit van 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR (Photosynthetic Active Radiation). Om te verhinderen dat de temperatuur te hoog zou oplopen moet de lucht continu gekoeld en homogeen over de groeikamer verdeeld worden.

- Temperatuur

Elke plantensoort heeft een specifieke, optimale temperatuur. Zo is de optimale groeitemperatuur voor embryo's geïsoleerd uit winterplanten lager dan die voor embryo's uit zomerplanten (Narayanawami & Norstog, 1964). In de meeste gevallen is een relatief hoge temperatuur (22-28°C) geschikt voor snellere groei. Sommige soorten verlangen een lagere temperatuur (17°C). Soms is een koudebehandeling (+/- 4°C) nodig om de kiemrust te doorbreken.

### 1.3.3.3. Belang van het medium

Het medium moet een energiebron bevatten om de groei en het metabolisme van het embryo te kunnen onderhouden. Sucrose, dat eveneens de osmotische spanning van het milieu beïnvloedt is hiervoor de meest frequent gebruikte C-bron. Algemeen gesteld, vereisen jonge embryo's een lage osmotisch potentiaal in het milieu. Naarmate het embryo zich verder ontwikkelt, dient de suikerconcentratie verlaagd te worden, zodat celstrekking mogelijk wordt en tenslotte kieming kan plaats vinden (Raghavan, 1976). Dat deze adaptie aan de noden van het embryo ook onder natuurlijke omstandigheden geldt, kan besloten worden uit de waarneming van de osmotische potentiaal van het endosperm van boon, die na de eerste fase van de embryonale ontwikkeling duidelijk stijgt (Monnier, 1978). Als gevolg van een afname van de suikerconcentratie wordt de opname van water door het embryo bevorderd.

Als stikstofbron werd in het verleden o.m. asparagine en glutamine aangehaald. Raghavan (1976) introduceerde het gebruik van anorganische stikstof bij embryocultuur.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en  $\text{KNO}_3$  zijn de meest frequent gebruikte anorganische stikstofbronnen. Het verbruik van stikstof hangt af van de soort, maturiteit van de embryo's en teeltomstandigheden.

Het endosperm bevat hormonen die de embryonale groei en ontwikkeling kunnen beïnvloeden. Indien de ontwikkeling van endosperm niet plaatsvindt, moet het kunstmatige medium de nodige hormonen voorzien (Norstog, 1979; Raghavan 1976, 1980) Het toedienen van exogene hormonen kan de hormonale balans van de embryo's in gunstige zin beïnvloeden. Gibberellinen, auxinen en cytokininen, hebben een effect op de celpermeabiliteit en dus op de opname van ionen. In het algemeen heeft een lage concentratie aan auxines een positieve invloed op de groei terwijl hoge concentraties ofwel een inhibitie van de groei ofwel ongewenste callusgroei van de embryo's veroorzaken (Raghavan & Srivastava, 1982).

Hoewel het precieze nut van vitaminen in embryoculturen niet bekend is, worden vaak biotine, thiamine, nicotinezuur, ascorbinezuur, inositol, en/of pyroxidine toegevoegd. Deze zijn meestal standaard aanwezig in de basismedia. Verder werden in het verleden andere organische stoffen toegevoegd aan het medium, wat zowel positieve als negatieve resultaten opleverde. Kokosmelk, een vloeibaar endosperm, is een natuurlijke bron van nutriënten. Naast kokosmelk kan ook caseïne hydrolysaat of moutextract toegevoegd worden. Het moutextract dient als bron van zeatine, terwijl caseïne hydrolysaat aminozuren levert als bron van organische N.

### 1.3.4. **Praktische toepassingen**

'Embryo rescue' heeft een waaier van toepassingen binnen de teelt en veredeling van een aanzienlijk aantal plantensoorten. De belangrijkste zijn:

- Verkorten van de teeltcyclus

Bij veel soorten vertoont het zaad kiemrust, meestal gelokaliseerd in de zaadhuid en/of in het endosperm. Door deze te verwijderen kunnen de zaden onmiddellijk kiemen. Wanneer zaden traag of geen water en zuurstof opnemen, wordt hierdoor ook de kieming geremd of gestopt. Bepaalde soorten kiemen niet of moeilijk *in vivo* door inwendige inhibitoren, specifieke lichtvereisten, lage temperaturen en droge opslag vereisten (Raghavan, 1977). In deze gevallen, kan embryocultuur de kieming versnellen, waardoor de teeltcyclus ingekort wordt.

- Preventie van embryo abortie bij vroeg rijpende steenvruchten

Bij vroeg rijpende steenvruchten (perzik, kers, abrikoos, pruim) wordt het transport van water en nutriënten naar immature embryo's soms te vroeg afgebroken, wat resulteert in een abortie van het embryo. In de praktijk belet dit kruisingen met een vroeg afrijpende moederplant. Het gebruik van embryocultuur is de enige oplossing om abortie te vermijden (Tukey, 1933).

- Preventie van embryo abortie door incompatibiliteit

Bij interspecifieke kruisingen, intergenerische kruisingen en interploidiekruisingen kan het endosperm zich slecht ontwikkelen of zelfs volledig niet. Dit resulteert in embryo abortie *in vivo*, wat slechts vermeden kan worden via embryocultuur.

- Vegetatieve vermeerdering

Onder meer bij *Poaceae* en coniferen, worden embryo's gevormd via apomixis soms gebruikt als startmateriaal voor verdere vegetatieve vermeerdering. Bij *Poaceae* treedt organogenese relatief gemakkelijk op vanaf juveniel callusweefsel; bij coniferen verloopt het klonen via callusweefsel afkomstig van immature embryo's en de axillaire scheutvorming eenvoudig (Hu & Wang, 1986).

- Productie van haploïden

Embryocultuur kan ook gebruikt worden bij de productie van haploïden. Kasha & Kao (1970) ontwikkelden een techniek om bij gerst haploïden te induceren. Interspecifieke kruisingen werden gemaakt met *Hordeum bulbosum* als pollenouder. De resulterende hybride embryo's werden gecultiveerd. Door chromosoom eliminatie van *H. bulbosum* werden haploïde embryo's verkregen die aborteren tijdens vruchtvorming (karyopsis). Deze werden via 'embryo rescue' *in vitro* gebracht om verder te groeien tot haploïden van de moederplant.



## 2. MATERIALEN EN METHODEN

### 2.1. Hydrangea

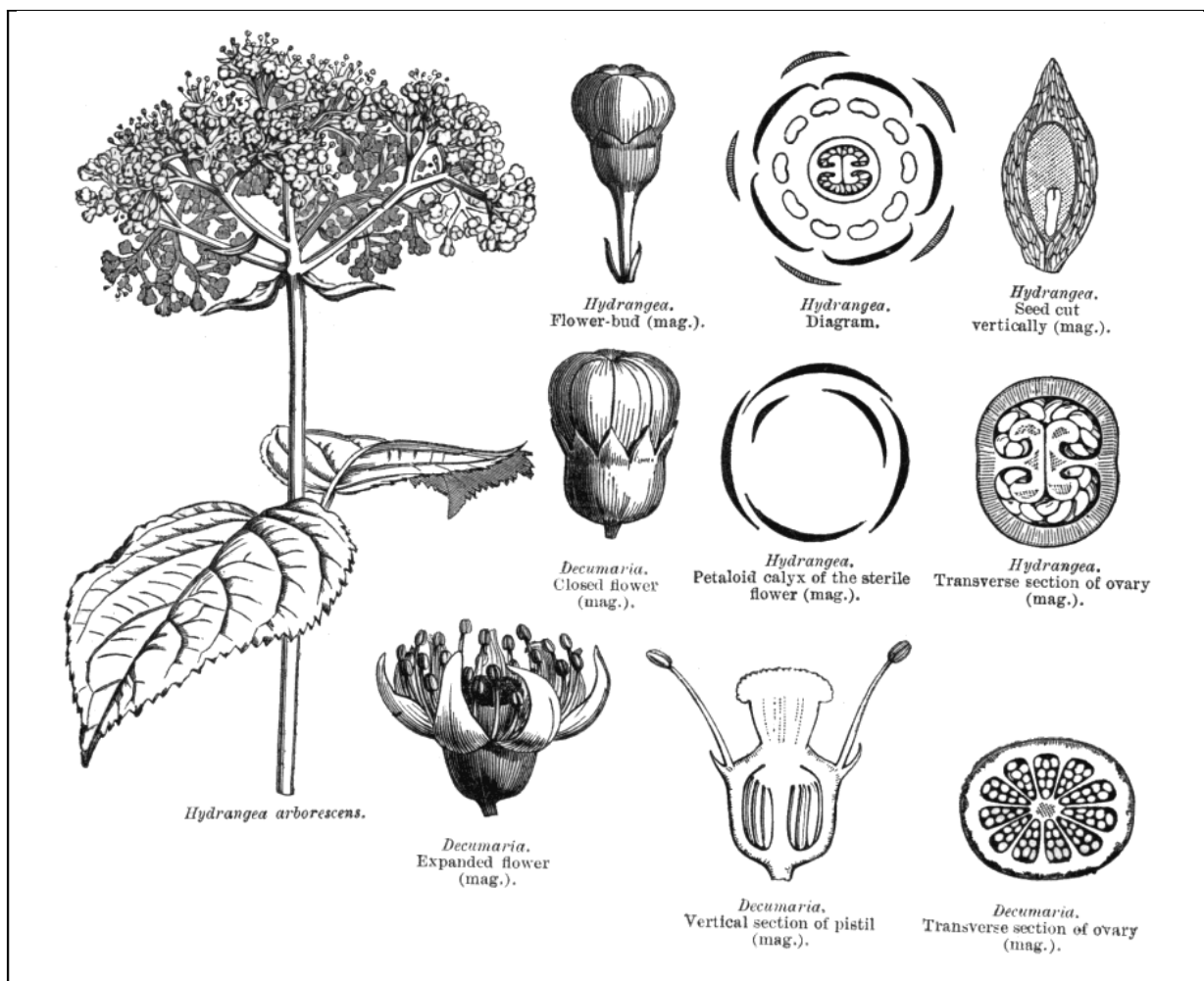
#### 2.1.1. Plantenmateriaal

Het genus *Hydrangea*, waaronder de bekendste soort *H. macrophylla* beter bekend als de Hortensia, behoort evenals de geslachten *Philadelphus* tot de familie van de Hydrangeaceae. De bladeren zijn tegenoverstaand, gesteeld, meestal rond tot langwerpig, vaak heel groot en slap. Alleen in enkele warmere oorden komen groenblijvende, klimmende soorten voor. De bekendste soorten zijn *Hydrangea macrophylla* Thunberg, *H. paniculata* Siebold, *H. quercifolia* Bartram, *H. arborescens* Linnaeus, en *H. anomala* D. Don.

In het kader van deze thesis werden volgende cultivars en soorten gebruikt: *H. paniculata* ‘Unique’ en *H. paniculata* ‘Praecox’, *H. quercifolia* ‘Sikes Dwarf’ en *H. quercifolia* ‘Snow Flake’, *H. macrophylla* Thunberg ssp. *serrata*, *H. aspera* D. Don ‘Macrophylla’.

#### 2.1.2. Bloembiologie

De bloeiwijze van *Hydrangea* kan in grote lijnen beschreven worden als een sterk vertakte, meestal veelbloemige en eindstandige tros, die een ronde of piramidale vorm heeft (figuur 2.1). De ronde vorm is de meest voorkomende en wordt teruggevonden in alle soorten, met, *H. quercifolia* en *H. paniculata*, die beiden piramidale clusters vertonen, als uitzonderingen. Bij deze ‘pluimvormige’ soorten gaat de bloei geleidelijk aan van de bodem naar de top van de bloeiwijze.. Zowel bij de ronde als bij de piramidale bloeiwijzen is de vertakking zo georiënteerd dat de bloemen rechtop staan en zich min of meer in hetzelfde vlak bevinden. De sepalen zijn deltavormig, relatief klein (normaal korter dan 1 mm) en nauwelijks zichtbaar. Hun aantal en dat van de petalen bedraagt 4 of 5. De petalen zijn klein (normaal ongeveer 2 mm) en min of meer eivormig. In *H. anomala* zijn de petalen samenhangend . In alle gevallen (behalve bij *H. anomala* ssp. *petiolaris*) zijn er 2 maal zoveel meeldraden als sepalen of petalen (8 of 10). Variatie bij de stamper uit zich in het aantal delen en in zijn positie tov het hypanthium. Het aantal loculi in het vruchtbeginsel en het aantal stijlen varieert van 2 tot 5, vaak met een verschil van soort tot soort of zelfs van plant tot plant. De zaden zijn talrijk, klein (1mm) en de vorm is elliptisch tot ovaal. In sommige soorten hebben de zaden staartvormige uiteinden. Steriele bloemen worden gevormd door een vergroting van de sepalen in petaal-achtige structuren. Ze zijn groter en opvallender dan de fertiele bloemen, en komen aan de buitenrand van de bloeiwijzen voor. Slechts in enkele soorten komen uitsluitend fertiele bloemen voor (McClintock, 1957).



Figuur 2.1 Technische gegevens *Hydrangea* (Watson & Dallwitz, 1992)

### 2.1.2.1. *H. aspera*

De *H. aspera* of fluweelhortensia is een vrij grof groeiende struik, 1- 4 meter hoog. Hij groeit bij voorkeur in enige schaduw van bomen. Veelal heeft de *aspera* grote, grijze, behaarde bladeren en behaarde stengels met afschilferende bast. De blad is gezaagd of dubbel gezaagd en de vorm varieert van lancetvormig tot ovaal, of deltavormig (McClintock, 1957). De altijd randbloeiende, platte bloemschermen in wit of roze (met een wit, roze of violet centrum van fertiele bloemen) bloeien in juli-augustus. Hij is inheems in een aantal Aziatische landen met heel verschillende groeiomstandigheden, vandaar de grote variatie binnen de soortgroep.

- *H. aspera* 'Macrophylla'

Deze *hydrangea* (figuur 2.2). heeft ovaal tot eironde bladeren, donkergroen, tot 25 cm lang die aan de onderzijde viltachtig zijn behaard. Hij bloeit in juli-augustus met tot 25 cm brede, platronde grote bloeischermen. De bloem bestaat in het midden uit bleeklila tot dieplila vruchtbare binnenbloemen met steriele witte tot wit-lila randbloemen.

### 2.1.2.2. H. macrophylla

Bij deze soort kunnen twee bloevormen onderscheiden worden, namelijk de soort met de gewone bolvormige bloemen en de randbloevende soorten met hun specifieke platte schermen. Deze groep kan als het kleurrijkst worden beschouwd binnen het *Hydrangea* geslacht.

De bolvormige hortensia is de meest voorkomende en bekendste bloemvorm in West-Europa. Alle individuele bloemen zijn even groot, maar ook steriel. Dit type is het resultaat van een genetische afwijking en wordt bekomen via veredeling en selectie. De kleuren rood, roze, wit en blauw kunnen worden waargenomen. De randbloevende hortensia's, ook wel 'Lace caps' genoemd, kenmerken zich door hun betrekkelijk platte en nagenoeg schijfvormige bloemscherm. Rond het middengebied van kleine fertiele bloemetjes bevindt zich aan de rand van het bloemscherm een krans van grote steriele lokbloemen. Evolutionair gezien zijn de randbloeiers het oorspronkelijke type *H. macrophylla*. In tegenstelling tot de bolvormige bloeiwijze, worden op een schermvormige bloeiwijze immers zaden gevormd. Deze hortensia's komen voor in de kleuren rood, roze, blauw en wit.

Het karmijnpigment kan in zure grond en bij aanwezigheid van voldoende vrij opneembare Al 3+ ionen een kleuromslag veroorzaken van roze naar blauw. Er zijn dus 2 voorwaarden: zure grond en aanwezigheid van Al 3+ ionen. Zelfs bij voldoende aluminiumionen zal de omslag in neutrale of alkalische grond niet lukken. Ook de aanwezigheid van ijzerionen (i.p.v. aluminium) kan voor een kleuromslag zorgen (bij zure grond) vermits ijzer een mengeling is van 2+ en 3+ (zie tabellen van Mendeljev). Het is niet alleen de petaalkleur die wijzigt maar ook die van de sepalen. De sepalen bepalen de schoonheid van de randbloem (Van Trier, 2003).

- *H. macrophylla* ssp. *serrata*

Deze hydrangea wordt soms niet als ondersoort van *H. macrophylla* vermeld (wel: *H. serrata*). *H. m.* ssp. *serrata* produceert over het algemeen meer en dunnere takjes en bloemschermen en minder zware en opvallende bloemen dan de andere *macrophylla* types. De bladeren zijn smal, elliptisch tot lancetvormig en opvallend getand. Meestal is de *H. m.* ssp. *serrata* goed bestand tegen een late nachtvorst in het voorjaar en tegen de zon. Enkele cultivars krijgen in de zomerperiode een rood tot paarsachtige gloed over het blad. De meeste cultivars zijn randbloevend (McClintock, 1957). (figuur 2.3).



**Figuur 2.2** *Hydrangea aspera* 'Macrophylla'



**Figuur 2.3** *Hydrangea macrophylla* ssp. *serrata*

### 2.1.2.3. H. paniculata

De *H. paniculata* is een sterk vertakte struik, met een grootte van 0,5-7 m. De tegenoverstaande of drietallige bladeren zijn ovaal met een lengte van 7-15 cm en een breedte van 3-10 cm. Het bladoppervlak vertoont een beharing, verspreid langs de nerven en de bladsteel variëert van 1-2,4 cm in lengte. De bloeiwijze is een samengestelde, sterk vertakte piramidale cluster, 7-25 cm groot, waarvan de bloempjes van de onderste takjes eerst openen (McCLintock, 1957). Deze soort wordt ook wel de ‘schapenkophortensia’ genoemd. De diverse cultivars hebben allen (room)witte bloemen in een pluimvormige bloeiwijze, die omstreeks juli/augustus bloeien. In de herfst verkleuren ze paars-rood terwijl het blad geler wordt. De bloemtrossen variëren van nagenoeg ongevuld met steriele bloemen (*H. p.* ‘Kyushu’) tot heel gevuld (*H. p.* ‘Grandiflora’) waardoor het aanzien erg verschilt. Wanneer niet gesnoeid wordt, zullen er meer, doch kleinere pluimen gevormd worden.

- *H. paniculata* ‘Praecox’

De pluimen van deze cultivar halen een lengte van 30 cm en een breedte van 10 cm. De ivoorkleurige bloemtrossen kunnen zwaar doorwegen, waardoor de dragende stengels soms doorbuigen. De plant begint in juni al te bloeien. (figuur 2.4).

- *H. paniculata* ‘Unique’

Hier kan de bloemkleur als zuiver wit worden omschreven en maken de grotere steriele bloemen samen met de kleinere, fertiele bloemen een voller geheel van de pluimvorm die tot 40 cm lang en wel 25 cm breed kan worden. (figuur 2.5).



**Figuur 2.4** *Hydrangea paniculata* 'Praecox'



**Figuur 2.5** *Hydrangea paniculata* 'Unique'



#### 2.1.2.4. *H. quercifolia*

Kenmerkend voor deze groep zijn de in de herfst rood-bruine bladeren die tot ver in de winter aan de plant blijven, in de vorm en kleuren van een eikenblad, waaraan zij hun naam 'Eikenbladhortensia' danken. De bladeren zijn meestal 5-lobbig en de lobben zijn grof gezaagd. De bladsteel is 1/8 tot 1/3 zo lang als het blad. De bloeiwijze is een samengestelde, sterk vertakte cluster, piramidaal van vorm, 15-25 cm lang. Alle cultivars uit deze groep hebben talrijke (room)witte bloemen in een pluimvorm en ze mogen in de volle zon staan. De bloemtrossen variëren van nagenoeg ongevuld met steriele bloemen (*Hydrangea quercifolia* als soort) tot heel gevuld (*H. q.* 'Harmony'). De *H. quercifolia* haalt een hoogte van 1,2 tot 2,5 meter (McClintock, 1957).

- *H. quercifolia* 'Sikes Dwarf'

'Sikes Dwarf' bezit alle kenmerken van de *quercifolia*, maar groeit in een meer compactere vorm met kleinere bladeren en kleinere bloemclusters. Deze dwergvorm (tot 1,20 m) heeft een fraaie herfstkleur.(figuur 2.6)

- *H. quercifolia* 'Snow Flake'

'Snow Flake' is dubbelbloemig van open wit naar donkerrode sepalen. Hij heeft eveneens een fraaie herfstkleur.(figuur 2.7).



**Figuur 2.6** *Hydrangea quercifolia* 'Sikes Dwarf'



**Figuur 2.7** *Hydrangea quercifolia* 'Snow Flake'

### 2.1.3. Bestuivingen

De moederplanten bevonden zich in de isolatieserre. Voor de anthese werden met scalpel en pincet de meeldraden verwijderd om zelfbestuiving uit te sluiten. Na ten laatste 3 dagen werden de geëmasculeerde bloemen bevrucht door via een penseel stuifmeel op de stempel aan te brengen. Dit stuifmeel, afkomstig van de gewenste vaderplant, werd eerst losgeschud op een schaalpje. Na 5-6 weken werden de vruchtjes afgesneden, ontsmet gedurende 15 minuten in 1 % NaOCl-oplossing en werden de ovulen op medium geënt in de laminar flow. De verdere groei gebeurde in de groeikamer, eerst 2 weken in het duister en vervolgens onder 16 h licht / 8 h donker met een lichtintensiteit van  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR (Photosynthetic Active Radiation). Na 5 weken werden de ovulen en/of de kiemplantjes telkens overgezet op vers medium. Kiemplantjes werden eerst beworteld in Meli-bokalen (100 ml medium/bokaal) waarna ze geacclimatiseerd werden in de serre. Het tijdstip van acclimatisatie was hierbij afhankelijk van de ontwikkeling (voldoende rhizogenese) van de vermeende hybride kiemling.

### 2.1.4. Media

Om het gewenste medium te bereiden (tabel 2.1), werden ingrediënten gemengd in een recipiënt. Na instelling van de pH en toevoeging van agar werden de media in een glazen fles geautoclaveerd. Voor *Hydrangea* werd Gamborg B5 (macro- en micro-elementen plus vitamines) gebruikt, zoals beschreven in Reed (2000b). Reed raadde ook aan PPM (Plant Preservative Medium) toe te voegen bij initiatie om de kans op snel verspreidende microbiële contaminatie te minimaliseren. Aan de subculturen werd het niet meer toegevoegd. Na autoclaveren werd onder de laminar flow het medium gegoten in petrischalen van 5 cm diameter.

**Tabel 2.1** Samenstelling basismedium voor *Hydrangea* (BMH)

Water	1000	ml
Gamborg B5	3164*	mg
Sucrose	20	g
PPM	1	ml
Agar MC29	7	g
pH	5,8	

\*Afhankelijk van de concentratie van het poeder, bijgevolg ook van de fabrikant, in dit geval Duchefa.

## 2.2. Ligustrum

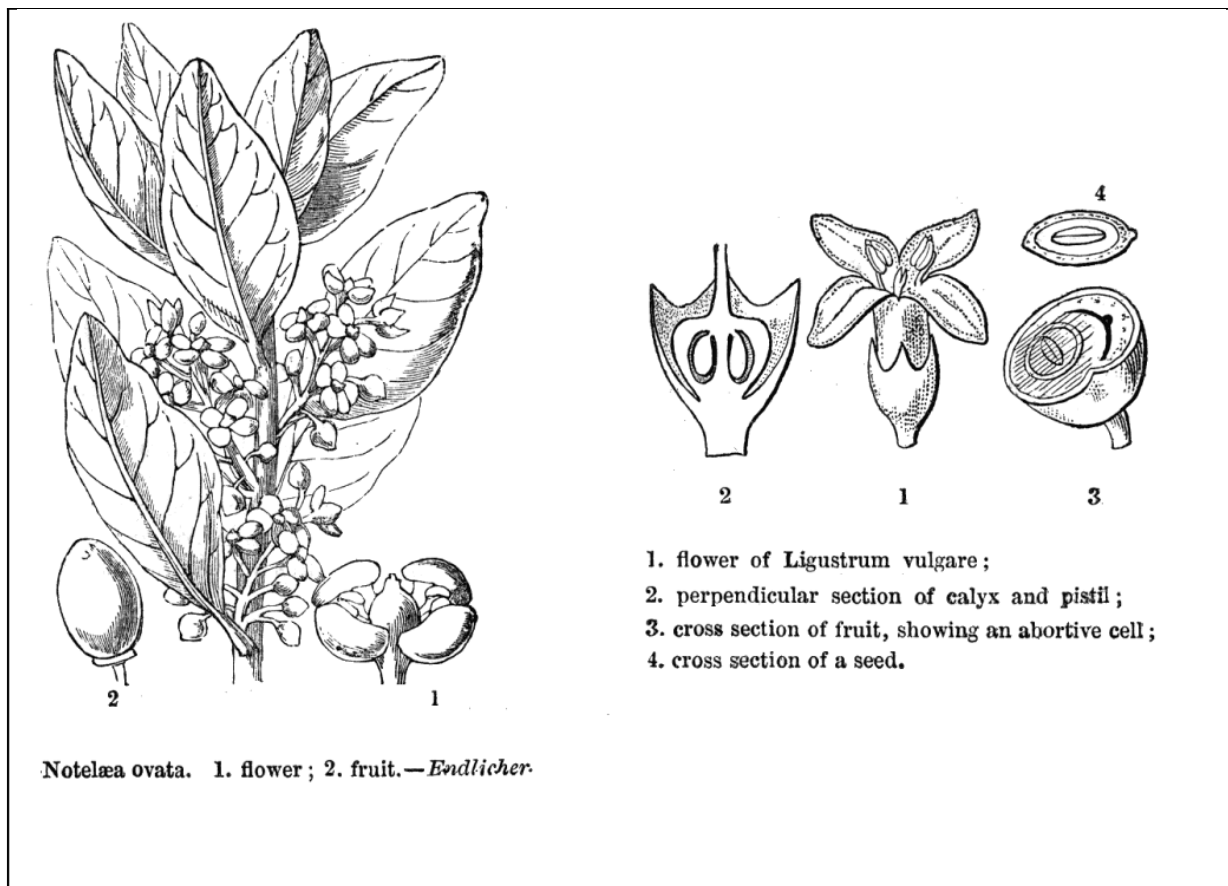
### 2.2.1. Plantenmateriaal

*Ligustrum* behoort tot de Olijfachtigen (*Oleaceae*), waartoe ook de geslachten *Olea* en *Syringa* behoren. Taxonomisch gezien is *Ligustrum* een complex geslacht, waarbij de soortgrenzen tussen een aantal soorten erg vaag zijn. Een oorzaak hiervan is, dat veel soorten erg polymorf zijn in habitus, beharing en bladvorm en -grootte. Daarbij is de bloembouw tussen de soorten, op de kroonbuislengte (de vergroeide kroonbladeren) na, heel weinig verschillend. Bovendien komt hybridisatie tussen soorten regelmatig voor. De soortgrenzen zijn onscherp tussen *Ligustrum amurense*, *L. acutissimum*, *L. obtusifolium*, *L. ibota*, *L. tschonoskii* en *L. ovalifolium*. Ligusters zijn bladverliezende of bladhoudende struiken, zelden bomen. De jonge scheuten zijn kaal of behaard en kunnen worden onderverdeeld in korte loten (met bloeiwijzen) en lange loten (vegetatief). De bladeren hebben geen steunblaadjes en zijn tegenoverstaand, enkelvoudig, gaafrandig, veernervig, variabel in vorm en afmeting (2-25 cm lang), al dan niet leerachtig, kaal tot aan weerszijden behaard en kort gesteeld.

Voor dit onderzoek werden volgende cultivars en variëteiten gebruikt: *L. sp.* 'Berry Boom', *L. japonicum* Thunb., *L. japonicum* 'Rotundifolium', *L. lucidum* W.T. Aiton, *L. obtusifolium* Siebold & Zucc. var. *regelianum*, *L. ovalifolium* Hassk. 'Winter Pleasure', *L. quihoui* Carrière, *L. tschonoskii* Decne. en *L. sp.* 'Vicaryi'.

### 2.2.2. Bloembioologie

De bloeiwijze is een pluim die zich ontwikkelt aan het eind van een jong bebladerd kortlot, dat ontstaat uit de eindknop en/of okselknoppen van de lange loten of uit de okselknoppen van de korte loten van het vorige seizoen (figuur 2.8). De schutbladen vallen gewoonlijk, op de één of twee onderste paren na, voortijdig af. De bloemen zijn klein, tweeslachtig en regelmatig viertallig. Ze zijn kort gesteeld en hebben een sterke weezoete geur, die door velen als vrij onaangenaam wordt ervaren. De kelk is klokvormig, onregelmatig en/of onduidelijk viertandig en blijft tot na de vruchtval aanwezig. De kroon is wit of geelachtig en heeft een 2-8 mm lange buis, die duidelijk langer of korter is dan de vier ovale tot lancetvormige, kale, schuin afstaande tot teruggeslagen lobben. Er zijn twee meeldraden, die aan de basis zijn vergroeid met de kroonbuis en niet of duidelijk uit de kroonbuis steken. De helmknoppen zijn gewoonlijk geelachtig, zelden paars. Het vruchtbeginsel is bovenstandig en tweehokkig, waarbij per hok twee zaadbeginsels aanwezig zijn. De stijl is ingesloten of steekt uit de kroonbuis en heeft een korte, tweedelige stempel. De vrucht is een 1-2(-4)-zadige bes of steenvrucht, is ovaal, rondachtig of langwerpig, 3-15 mm in diameter en verkleurt gewoonlijk via groen en paars naar blauw- tot paarszwart, al dan niet met een meer of minder sterke grijze waas (berijpt). Bij de meeste soorten ontwikkelt of ontwikkelen de zaadbeginsel(s) in één hok zich wel en in het andere hok niet, waardoor de vrucht iets krom trekt. Alleen bij *Ligustrum vulgare* ontwikkelen de zaadbeginsels zich gewoonlijk in beide hokken (Fortgens & Hoffman, 1993). De bespreking van de hieropvolgende soorten en cultivars is gebaseerd op het werk van Fortgens en Hoffman (1993).



Figuur 2.8 Technische gegevens *ligustrum vulgare* (Watson & Dallwitz, 1992)

#### 2.2.2.1. *Ligustrum* sp. 'Berry Boom'

*L. sp.* 'Berry Boom' lijkt sterk op (de waarschijnlijke moederplant) *L. ovalifolium*, maar wijkt af door de zwakke beharing van jonge scheuten, wintertwijgen, bladnerven en assen van de bloeiwijze. Daarnaast zijn de bessen iets vroeger (ca. 2 weken) rijp dan bij *L. ovalifolium*. Vanwege de rijke besdracht, sterke groeikracht, aantrekkelijke bloei en goede winterhardheid is deze selectie heel geschikt voor gebruik zowel in mengbeplanting of solitairstruik, als middelhoge haagplant.

#### 2.2.2.2. *Ligustrum japonicum*

*L. japonicum* lijkt enigszins op *L. lucidum*. De eerste is meer struikvormig en heeft een iets kleiner en dikker blad met minder zijnerf. Daarnaast heeft *L. japonicum* een langere kroonbuis en in tegenstelling tot *L. lucidum* fijn behaarde jonge scheuten en assen van de bloeiwijze. De soort is aantrekkelijk vanwege de in de winter blijvende, glimmende en leerachtige bladeren. Ook door de vrij late en rijke bloei, de besdracht en bij sommige selecties de habitus of het bonte blad is de soort interessant.

- *L. japonicum* 'Rotundifolium'

Deze is uit Japan afkomstig en valt op door zijn heel gedrongen groeiwijze (0,5-0,75m) met opgaande korte, heel stijve takken. De bladeren zitten heel dicht open en zijn afgerond aan de basis, dik en leerachtig, gedraaid, donkergroen en glanzend. De compacte bloeiwijze is rechtopstaand met zittende bloemen. De winterhardheid is minder dan die van de soort.



### 2.2.2.3. Ligustrum lucidum

Het meest opvallend aan *L. lucidum* is de altijdgroene, krachtig opgaande (boomvormige) habitus en de sterke groei-kracht. Ook de grote leerachtige bladeren zijn karakteristiek en aantrekkelijk. Onder meer vanwege de vrij korte kroonbuis is *L. lucidum* te onderscheiden van *L. japonicum*. In echt strenge winters, met name meer landinwaarts, is de soort niet betrouwbaar winterhard. In warmere gebieden bloeit en fructificeert *L. lucidum* heel rijk, dit in tegenstelling met minder warme gebieden waar de eventuele vruchten vaak niet volledig tot rijping komen en de soort niet of heel weinig aan bloeien toekomt.

### 2.2.2.4. Ligustrum obtusifolium

Typische morfologische kenmerken van deze bladverliezende liguster zijn de beharing van de diverse delen, de overwegend stompe bladeren (tenminste van het blad aan de generatieve zijtakjes), de kleine, gedrongen en relatief armbloemige bloeiwijzen en de lange kroonbuis. In tegenstelling met *L. ovalifolium* is *L. obtusifolium* volledig bladverliezend in de winter. Van *L. tschonoskii* verschilt *L. obtusifolium* door de meestal stompere bladtop, de behaarde kelk, de afstaande tot schuinopgaande in plaats van teruggeslagen kroonlobben, de latere rijping van de vruchten en bladval en minder door de kleinere en minder opvallende bloeiwijzen met iets minder bloemen. Dichte vertakking en rijke bloei maken de soort in vele aspecten aantrekkelijk.

- *L. obtusifolium* var. *regelianum*

Deze variëteit wordt binnen de soort onderscheiden door de compacte habitus, de horizontaal afstaande tot sterk overhangende takken, de sterkere beharing en de korte generatieve zijtakjes. De bladeren en zijtakken zijn in het algemeen in een plat vlak gerangschikt.

### 2.2.2.5. Ligustrum ovalifolium

Kenmerkend voor *Ligustrum ovalifolium* zijn de halfwintergroene struik, de (vrijwel) kaalheid van alle delen, de matig grote en tamelijk veelbloemige bloempluimen en de vrij lange kroonbuis. Deze liguster bezit een krachtig opgaande habitus, sterke groei-kracht, late bladval en rijke vruchtdracht.

- *L. ovalifolium* ‘Winter Pleasure’

Het meest opvallend aan deze cultivar zijn de enorm rijke vruchtdracht, de grote bes- en bloempluimen en de vrij sterk glimmende, relatief langwerpige en aan de top toegespitste bessen. Ook de relatief grote bladeren en de matige vertakking vallen op.

### 2.2.2.6. Ligustrum quihoui

*Ligustrum quihoui* is een van de mooist bloeiende Ligusters en vooral aantrekkelijk vanwege de rijke en late bloei. De heel grote, typisch vertakte bloeiwijzen, de korte kroonbuis, de ver uitstekende meeldraden en stamper en de brede, ijle habitus zijn ook kenmerkend voor deze halfwintergroene soort. Vanwege deze typische kenmerken is er geen enkele andere Ligustersoort die met *L. quihoui* kan worden verward.

### 2.2.2.7. Ligustrum tschonoskii

De meest typische kenmerken van deze bladverliezende soort, die als eerste van alle Ligusters in de herfst het blad laat vallen, zijn de beharing van de diverse delen, de dunne, spitse tot toegespitste bladeren, de kale kelk, de teruggeslagen kroonlobben, de vroege bladval en de vroege vruchtrijping.

### 2.2.2.8. *Ligustrum* sp. 'Vicaryi'

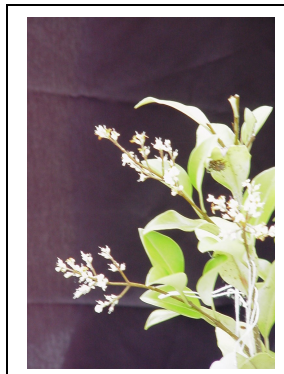
In koudere streken is deze cultivar uitstekend winterhard. Voor het verkrijgen van een mooie gele bladkleur moet deze Liguster op een vrij zonnige standplaats worden geplant. *L.* 'Vicaryi' valt op door de breed-uitstaande, veelal iets overhangende takken, de late bladval en de groengele bladeren. Ook zijn de vrij lange kroonbuis, de schaarse beharing van de diverse delen en de rijke bloei en vruchtdracht karakteristiek.



**Figuur 2.9** *Ligustrum* sp. 'Berry Boom'



**Figuur 2.10** *Ligustrum japonicum*



**Figuur 2.11** *Ligustrum japonicum*



**Figuur 2.12** *L. japonicum* 'Rotundifolium'



**Figuur 2.13** *Ligustrum lucidum*



**Figuur 2.14** *L. oval.* 'Winter Pleasure'



**Figuur 2.15** *L. ovalifolium* 'Winter Pleasure'



**Figuur 2.16** *Ligustrum* sp. 'Vicaryi'



**Figuur 2.17** *Ligustrum obtusifolium* var. *regelianum*



**Figuur 2.18** *Ligustrum quihoui*



**Figuur 2.19** *Ligustrum quihoui*

### 2.2.3. Bestuivingen

De moederplanten werden in de isolatieserre geëmasculeerd en bestoven. Het verwijderen van de meeldraden is bij *Ligustrum* geen sinecure, desalniettemin een noodzakelijkheid. De stempel van de geëmasculeerde bloem werd bestoven met het pollen van de uitgezochte vaderplant. Bij een eerste poging werden na 5-6 weken de vruchten verwijderd en ontsmet gedurende 15 minuten in een 1% NaOCl oplossing, waarna de ovulen uit de vrucht gedissecteerde werden en op medium overgebracht. 12 Ovulen werden nog gevoed met endosperm dat werd geïsoleerd uit zaden verkregen na compatibele kruisingen door dit onder en in contact met de ovule in het medium te inoculeren. De tweede poging vond 11 à 12 weken na bestuiving plaats. Hier waren de vruchten meer opgezwollen en hieruit konden na ontsmetting rechtsreeks de embryo's gedissecteerde worden.

### 2.2.4. Media

Om het gewenste medium te bereiden (tabel 2.2), werden ingrediënten gemengd in een recipiënt. Na instelling van de pH en toevoeging van agar werden de media in een glazen fles geautoclaveerd. Voor *Ligustrum* werd MS (macro- en micro-elementen plus vitaminen) gebruikt. PPM (Plant Preservative Medium) werd enkel toegevoegd bij initiatie om de kans op snel verspreidende microbiële contaminatie te minimaliseren. Aan de hieropvolgende subculturen werd het niet meer toegevoegd. Na autoclaveren werd onder de laminar flow het medium gegoten in petrischalen van 5 cm diameter.

**Tabel 2.2** Samenstelling basismedium voor *Ligustrum* (BML)

Water	1000	ml
MS	4405,2* zie hierboven	mg
Sucrose	30	g
PPM	1	ml
Agar MC29	7	g
pH	5,6	

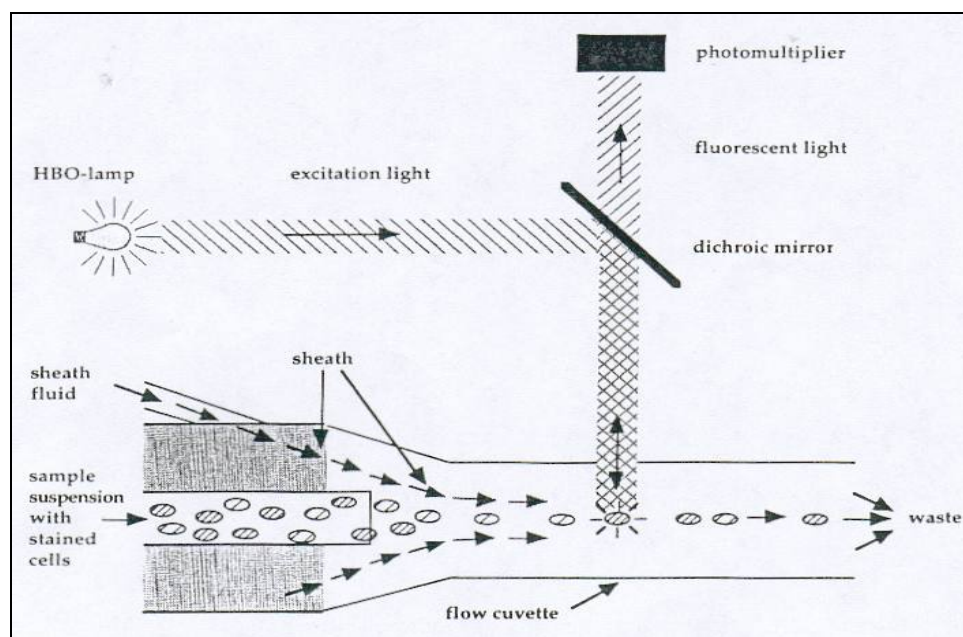
Verder werden verschillende media uitgetest om de ideale groeiomstandigheden voor *Ligustrum* te achterhalen. Vertrekkend van BML werden extra media aangemaakt, verschillend in één ingrediënt (tabel 2.3).

**Tabel 2.3** Bijkomende ingrediënten voor extra media voor *Ligustrum* (ML)

Extra ingrediënt	/250	ml	Aangepast medium
Blanco			ML1
Lloyd & McCown vit	26	mg	ML2
Yeast extract	125	mg	ML3
Caseïne hydrolysaat	125	mg	ML4
GA3	25	µg	ML5
GA3	150	µg	ML6
GA3	900	µg	ML7
GA3	5400	µg	ML8

### 2.3. Flowcytometrische ploëdiebepaling

Ploëdiëmeting bepaald door het conventionele tellen van chromosomen is een tijdrovende en arbeidsintensieve bezigheid (Martens & Reisch, 1988; Owen & Miller, 1993). Flow cytometrie biedt een waardevol, snel, eenvoudig, accuraat en vrij goedkoop alternatief, gebaseerd op de analyse van de fluorescentie en licht-verspreidende eigenschappen van deeltjes tijdens het passeren door een smalle, nauwkeurig gedefinieerde, vloeibare stroom (Galbraith *et al.*, 1983; Dolezel *et al.*, 1989; Dolezel, 1991) (figuur 2.20). Heller (1973) was de eerste die deze techniek voor DNA analyse in plantencellen gebruikte; later werd flow cytometrie gebruikt bij verschillende plantensoorten (Arumuganathan & Earle, 1991; Galbraith, 1990; Bennet & Leitch, 1995).



**Figuur 2.20** De chromosomen suspensie wordt in een flowkamer gebracht, gevuld met gedeïoniseerd water. Het water beweegt met een grotere snelheid en brengt het staal in een zeer nauwe (10µm) laminaire stroom, zonder beide stromen te mengen. (PARTEC, 1999).

Een Partec PAS III werd gebruikt, zoals beschreven door De Schepper *et al.* (2001). Jonge bladstalen werden genomen van één plant met een op voorhand gekend ploëdieniveau en van de planten met het ongekende ploëdieniveau. Schijfjes met een diameter van 5 mm werden geponst uit het jongste bladmateriaal. Het staal werd met een scherp scheermesje fijngehakt, in een 250 µl bufferoplossing die bestaat uit 0,1 M citroenzuur en 0,5 % Tween 20 (pH ± 2,5) voor de isolatie van de nucleï. Het fijngehakte staal werd door een nylon filter met een grootte van 100 mesh gezogen. Nadien werd 500 µl van de tweede buffer, die bestaat uit 0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 2 mg/l DAPI (pH ± 8,5), door de filter opgezogen om fixatie en kleuring te verzekeren. De combinatie van de 2 buffers geeft een pH ± 7 wat de optimale pH is voor de kleuring met DAPI (Otto, 1990).

Na filtratie werden de kernsuspensies doorheen de flowkamer, gevuld met gedeïoniseerd water (sheath fluid), gebracht. De nucleï kruisen het brandpunt van een intense lichtstraal. De lichtbundel wordt geproduceerd door een hoge-druk 'vapor damp' kwiklamp. Bij een golflengte van 365 nm fluoresceren de met DAPI gekleurde kernen. De fluorescentie wordt

opgevangen door een lens en geconverteerd in pulsen van elektrische stroom door een photomultiplier. De elektronische signalen worden daarna gedigitaliseerd en de binaire data worden bijgehouden als één-dimensionele histogrammen. De intensiteit van de fluorescentie is lineair gecorreleerd met de DNA hoeveelheid gekleurd door DAPI.

Het eerste staal dat gemeten werd in de flow cytometer, is de uitwendige standaard, geleverd door de controleplant. Het gebruik van flow cytometrie is een relatieve meting; het eerste staal ijkt het apparaat, zodat de andere planten aan de hand hiervan gemeten worden. De elektrische spanning van de photomultiplier, die de DAPI-fluorescentie (afhankelijk van de DNA inhoud) omzet in een elektrische stroom, is zo afgesteld dat een diploïde piek (standaard) gefixeerd is op positie 100. Een haploïde piek zal op deze manier voorkomen op positie 50, een tetraploïde piek op positie 200. De meting van de standaard, wordt na elke 10 metingen herhaald om, indien nodig, de elektrische spanning van de photomultiplier te corrigeren.

## 2.4. Prezygotisch onderzoek

Dit werd uitgevoerd zoals beschreven in Cuevas *et al.* (1994), Ureshino *et al.* (2000) en Vervaeke (2001). 96 Uur na bestuiving werden van de interspecifieke *Ligustrum* - kruisingen *L. quihoui* x *L. lucidum*, *L. quihoui* x *L. japonicum*, *L. japonicum* x *L. quihoui* , en *L. japonicum* x *L. ovalifolium* 'Winter Pleasure' telkens 4 stampers (met vruchtbeginsel) verzameld. Ze werden gedurende 24 h gefixeerd in FAA (formaline: 70 % ethanol: azijnzuur = 1 : 18 : 1), waarna 3 maal nagespoeld met gedestilleerd water. Vervolgens werden de stampers ondergedompeld in een 8 N NaOH-oplossing, om het weefsel van de stijl te verzachten, bij een temperatuur van 5° C gedurende 24 h. De verzachte stampers werden na het verstrijken van de wachttijd 3 maal gewassen met gedestilleerd water om alle NaOH te verwijderen en werden gekleurd met een 0,1 % oplossing van anilineblauw in 0,1 N K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gedurende 3 h bij kamertemperatuur. Het gekleurde materiaal werd vervolgens geplet op een draagglasje en geobserveerd met een fluorescentiemicroscop (LEICA DM IRB/MPS 52). FAA fixeert de pollenbuizen. Callose, een suiker dat zich in de pollenwand bevindt, bindt met anilineblauw, dat fluoresceert onder UV-licht. Op die manier kon de groei van de pollenbuis in de stijl van de stamper gevisualiseerd worden.

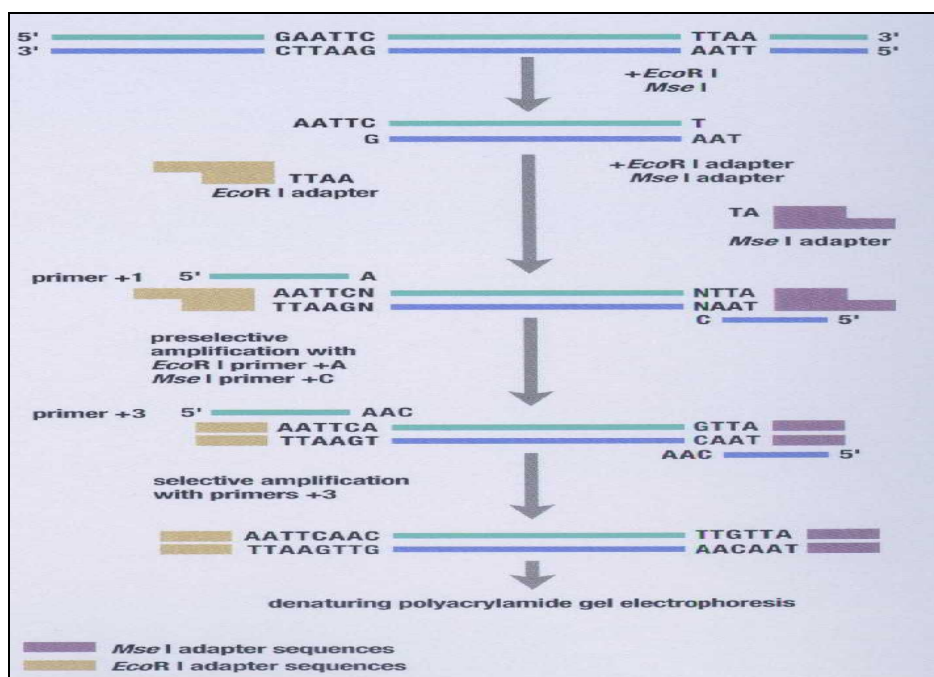


## 2.5. DNA -isolatie

Jong bladmateriaal van geacclimatiseerde planten werd verzameld en in vloeibare N<sub>2</sub> tot poeder gegrind. Aan 25-75 mg werd 10 ml van een 50 mM Tris-HCL buffer (pH 8) toegevoegd. Deze buffer bevat 5 mM EDTA, 350 mM sorbitol, 0,1 % β - mercaptoethanol, 10 % PEG (MW 8000) en 0,001 % BSA. De mengeling werd gehomogeniseerd gedurende 60 seconden door de proefbuizen om te keren en dan werd ze gefilterd door Miracloth (Calbiochem). Het kernmateriaal werd verzameld door centrifugeren (2500 g, 5 min, 4° C). Hieraan werd 1 ml CTAB extractie buffer (100 mM Tris-HCL pH 8; die 2 % CTAB, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,4 % β - mercaptoethanol en 1 % PVP MW 40000 bevat) en RNase (10 U) toegevoegd. De monsters werden gedurende 40 minuten en bij 65° C geïncubeerd. Vervolgens werden de stalen gehomogeniseerd met 1 ml chloroform/ isoamylalcohol (24/1) en gecentrifugeerd gedurende 15 minuten. Na overbrengen in een nieuwe proefbuis, werd met 1 ml ijskoud (-20° C) isopropanol het DNA neergeslagen. Na centrifugeren (5000 g; 15 min), werd het overblijfsel gewassen met EtOH (76%)-0,2 M NaOAc, gedroogd en opgelost in water. De DNA-concentratie en -kwaliteit werden vergeleken met een standaard serie van lambda-DNA na electroforese op een 1,5 % TAE gebufferde agarose gel.

## 2.6. AFLP – analyse

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) is een DNA-merkertechniek, gebaseerd op de detectie van DNA restrictie fragmenten door PCR amplificatie (Vos *et al.*, 1995; Zabeau & Vos, 1993). De restrictie fragmenten, geamplificeerd door één primercombinatie, brengen vaak verschillende DNA polymorfismen voort (figuur 2.21). AFLP wordt meer en meer gebruikt als vlugge en betrouwbare moleculaire merkertechniek om genetische conformiteit te beoordelen voor zowel de studie als het behoud van natuurlijke diversiteit; maar ook voor de karakterisatie van ‘gene pools’ in teelten, bv. in sojaboon (Maughan *et al.*, 1996), sla (Hill *et al.*, 1996), thee (Paul *et al.*, 1997), zonnebloem (Hongtrakul *et al.*, 1997), maïs (Ajmone Marsan *et al.*, 1998) en azalea (De Riek *et al.*, 1999).



**Figuur 2.21** AFLP: restrictie, adaptor ligase, preamplificatie en amplificatie

AFLP werd uitgevoerd met gebruik van de commerciële kit van Perkin-Elmer biosystems voor detectie van fluorescerende fragmenten (Perkin-Elmer, 1995; Roldan-Ruiz *et al.*, 1997). EcoRI (hexacutter) en MseI (tetracutter) werden gebruikt om het DNA te ‘knippen’. Door het gebruik van deze enzymen werden ‘sticky ends’ verkregen waarop adaptoren geligeerd kunnen worden m.b.v. T<sub>4</sub>-DNA-ligase. Adaptor ligase, preselectieve en selectieve amplificatie werden uitgevoerd zoals beschreven in het protocol van de fabrikant. Voor de selectieve amplificatie werd gebruik gemaakt van fluorescent-gelabelde EcoRI-MseI primer combinaties met 6 selectieve basen. Voor de PCR amplificatie werd een Perkin-Elmer 9600 gebruikt. De AFLP fragmenten werden gescheiden door PAGE op een ABI Prism 377 DNA Sequencer op 36-cm gels, gebruik makende van 4,25 % denaturerend polycrylamide (4,25 % acrylamide/bisacrylamide 19/1, 6 M urea in 1xTBE). GS-500 ROX (Perkin-Elmer) werd als standaard meegeladen in elke strook om zo de automatische analyse van de gel en het meten van de fragmenten te vergemakkelijken.

Tijdens het lopen op de ABI 377, wordt constant het fluorescerend signaal in elke baan opgenomen. Voor elke fluorescerende tint worden elektroferogrammen uitgetrokken die te vergelijken zijn met de densitometrische curven verkregen na scanning van een



autoradiogram. GENESCAN 2.1 werd gebruikt om voor elk fragment de detectie tijd, de hoogte van de signaalpiek en de oppervlakte te schatten. De AFLP data werden geanalyseerd door de Genescan software. De software identificeerde alle DNA banden, vergeleek de mobiliteit van elk fragment met de GS-500-ROX-gelabelde grootte standaard, en mat dan de fragmenten, dienovereenkomstig in baseparen. In de analyse werden enkel de fragmenten tussen 75 bp en 500 bp behandeld.

De gebruikte primercombinaties werden random gekozen:

Voor *Hydrangea* (3 primercombinaties):

- E-ACT<sub>fam</sub> + M-CAT
- E-AGG<sub>joe</sub> + M-CTT
- E-ACG<sub>joe</sub> + M-CAA

Voor *Ligustrum* (3 primercombinaties):

- E-ACT<sub>fam</sub> + M-CAT
- E-AAG<sub>joe</sub> + M-CTA
- E-ACG<sub>joe</sub> + M-CAA

### 3. RESULTATEN EN BESPREKINGEN

#### 3.1. Hydrangea

Door flowcytometrisch ploëdie-onderzoek werd vastgesteld dat alle *Hydrangea*-ouderplanten diploëid waren. De kwaliteit van de metingen was matig.

##### 3.1.1. *H. paniculata* x *H. quercifolia*

###### 3.1.1.1. Doel

De proef werd opgezet om anthocyaanbiosynthesegenen van *H. quercifolia* (die verantwoordelijk zijn voor de herfstverkleuring) in te kruisen in *H. paniculata*.

###### 3.1.1.2. Materialen en methoden

1446 Bloemen van *H. paniculata* cultivars werden bestoven met stuifmeel van *H. quercifolia* cultivars (tabel 3.1). Na 5 weken werden de bestoven bloemen verwijderd van de moederplant en werden de ovulen *in vitro* geëinitieerd.

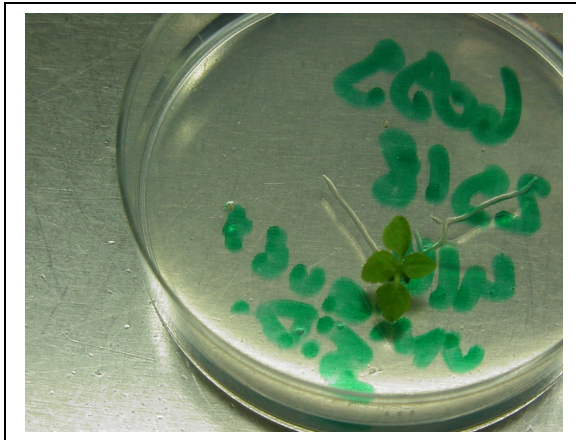
**Tabel 3.1** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen		
'Praecox' x 'Sikes Dwarf'	650	206	31,7 %	1395	9	0,6 %
'Praecox' x 'Snow Flake'	320	103	32,2 %	683	0	0,0 %
'Unique' x 'Sikes Dwarf'	294	108	36,7 %	634	10	1,5 %
'Unique' x 'Snow Flake'	182	76	41,7 %	422	10	2,3 %

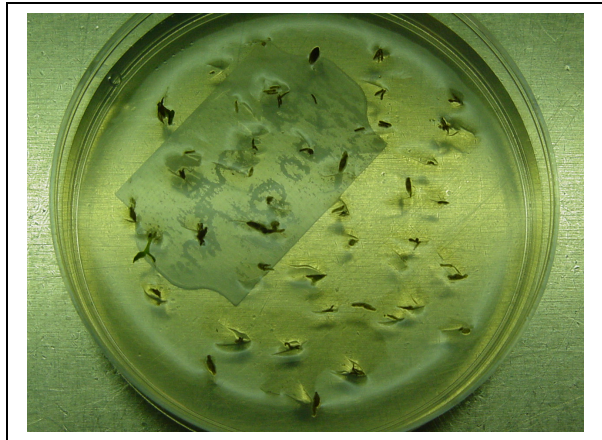
###### 3.1.1.3. Resultaten en bespreking

Bij 'Praecox' werd een hoger percentage spontane aborties van bestoven bloemen waargenomen dan bij 'Unique'. Er werd dus een hoger aantal vruchten van 'Unique' *in vitro* geplaatst. De vruchten van 'Unique' waren meer opgezwollen dan die van 'Praecox'. Tijdens de dissectie van de vruchten bleken de ovulen een langgerekt uitzicht te hebben. De zaadhuid van 'Unique' bleef een heldere kleur behouden, terwijl deze bij 'Praecox' reeds bruin verkleurde. Na een duisterperiode van 2 weken was nog geen kieming waar te nemen. Na 8 weken licht werd er kieming opgemerkt bij alle kruisingen behalve bij 'Praecox' x 'Snow Flake' (figuur 3.1 en 3.2). In totaal kiemden 29 *H. paniculata*-ovulen. De kiemlingen die *in vivo* succesvol afgehard werden ('Praecox' x 'Sikes Dwarf': 3, 'Praecox' x 'Snow Flake': 5, 'Unique' x 'Sikes Dwarf': 3, 'Unique' x 'Snow Flake': 2), vertoonden weinig morfologische verschillen met de moederplant. AFLP-analyse (zie 2.6) moest uitsluitsel geven over het al dan niet hybride karakter van de kiemlingen. Het DNA van moederplant, vaderplant en desbetreffende nakomelingen werd geïsoleerd en hun AFLP-profiel onderling vergeleken (figuur 3.3 en 3.4). Vooral de DNA-fragmenten van de vaderplant moeten vergeleken worden met die van de nakomeling. De pieken die bij de vergelijking overeenkomen en die niet aanwezig zijn bij de moederplant, wijzen op hybriditeit. In de verkregen grafiek zijn zowel bij

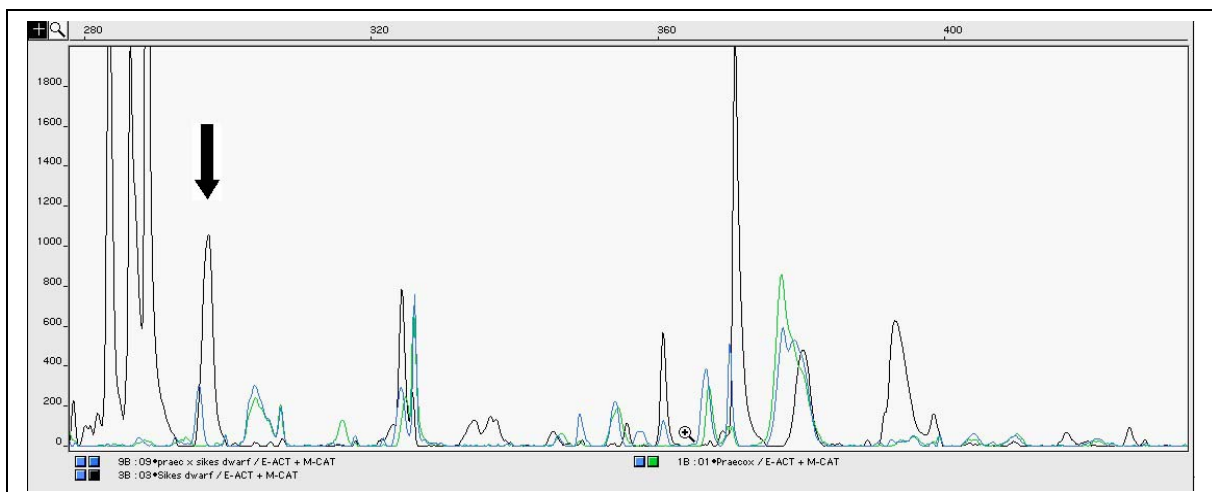
‘Praecox’ x ‘Sikes Dwarf’ (figuur 3.1) als bij ‘Unique’ x ‘Sikes Dwarf’ (figuur 3.2) dergelijke pieken terug te vinden. Voor ‘Unique’ x ‘Snow Flake’ is nog geen AFLP-analyse toegepast, omdat te weinig bladmateriaal beschikbaar was. Later onderzoek zal de eventuele hybriditeit van deze kruising moeten bevestigen.



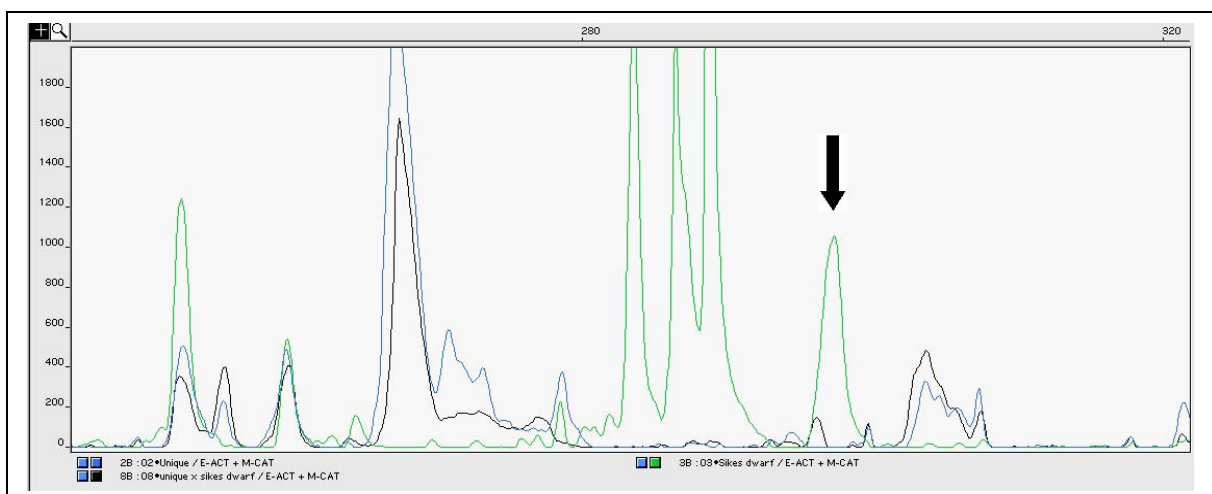
**Figuur 3.1** Kiemling ‘Unique’ x ‘Sikes Dwarf’



**Figuur 3.2** Embryo's ‘Unique’ x ‘Snow Flake’



**Figuur 3.3** AFLP-patroon (elektroferogram) ‘Praecox’ x ‘Sikes Dwarf’, met nakomeling (blauw), moederplant (groen), vaderplant (zwart)



**Figuur 3.4** AFLP-patroon (elektroferogram) ‘Unique’ x ‘Sikes Dwarf’, met nakomeling (zwart), moederplant (blauw) en vaderplant (groen)

### 3.1.2. *H. quercifolia* x *H. paniculata*

#### 3.1.2.1. Doel

Deze reciproke kruising heeft hetzelfde doel als de *H. paniculata* x *H. quercifolia* kruising, maar hier kunnen andere problemen optreden (groei pollen, endospermvorming,...).

#### 3.1.2.2. Materialen en methoden

988 Bloemen van *H. quercifolia* cultivars werden bestoven met het stuifmeel van *H. paniculata* cultivars (tabel 3.2). De ovulen van de bestoven bloemen werden na 5 weken *in vitro* geïnitieerd.

**Tabel 3.2** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen		
'Sikes Dwarf' x 'Praecox'	397	60	15,1 %	309	0	0,0 %
'Sikes Dwarf' x 'Unique'	353	51	14,4 %	270	0	0,0 %
'Snow Flake' x 'Praecox'	206	42	20,4 %	248	0	0,0 %
'Snow Flake' x 'Unique'	32	9	28,1 %	34	0	0,0 %

#### 3.1.2.3. Resultaten en bespreking

Het percentage spontane aborties van de bestoven bloemen op de moederplant lag hoger bij het gebruik van 'Sikes Dwarf' dan bij 'Snow Flake' (tabel 3.2). Omdat een hoger aantal bloemen van de 'Sikes Dwarf' bestoven werd, werden bij deze moederplant wel meer vruchten en ovulen *in vitro* gebracht. De dissectie van de vruchten toonde aan dat de ovulen van de *H. quercifolia* kleiner, ronder en doffer van uitzicht zijn dan die van de langgerekte, meer heldere ovulen van de *H. paniculata*. De zaadhuid van de *H. quercifolia* was vrij hard en donker verkleurd. De reciproke kruising tussen *H. quercifolia* en *H. paniculata* bracht geen kiemlingen voort. Hieruit kan besloten worden dat het mogelijk is dat natuurlijke barrières een kruising tussen *H. quercifolia* en *H. paniculata* verhinderen. Mogelijk heeft de zaadhuid de kieming negatief beïnvloed. Er was geen materiaal aanwezig om een AFLP-analyse uit te voeren.

### 3.1.3. *H. paniculata* x *H. macrophylla*

#### 3.1.3.1. Doel

De proef werd opgezet met het doel het bestaande *H. paniculata* sortiment uit te breiden door kleurgenen van *H. macrophylla* spp. *serrata* (fellere intensiteit) in te kruisen.

#### 3.1.3.2. Materialen en methoden

182 Bloemen van *H. paniculata* cultivars werden bestoven met stuifmeel van *H. macrophylla* ssp. *serrata* (tabel 3.3). Na 5 weken werden de ovulen *in vitro* geïnitieerd.

**Tabel 3.3** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

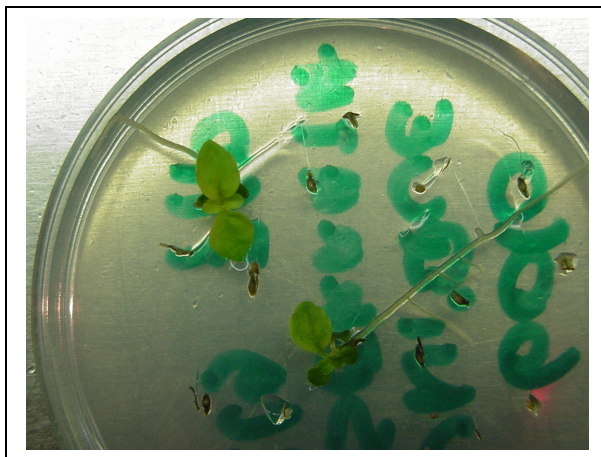
	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen
'Praecox' x <i>serrata</i>	102	43 42,2 %	256	13 5,1 %
'Unique' x <i>serrata</i>	80	34 42,5 %	142	5 3,5 %

#### 3.1.3.3. Resultaten en bespreking

Het percentage spontane aborties van de bestoven bloemen op de moederplant lag bij beide cultivars ongeveer even hoog (tabel 3.3). De vruchten van de 'Unique' waren meer opgezwollen dan die van de 'Praecox', hoewel ze minder ovulen leverden. De dissectie van de ovulen toonde aan dat de ovulen een langgerekt en vrij helder wit uitzicht hadden. Na een duisterperiode van 2 weken was nog geen kieming waar te nemen. Na 8 à 9 weken licht werd er kieming opgemerkt (figuur 3.5 en 3.6). In totaal kiemden 18 ovulen. De *in vivo* succesvol afgeharde kiemlingen ('Praecox' x *serrata*: 2, 'Unique' x *serrata*: 1), vertoonden morfologisch weinig verschillen met de moederplant. AFLP-analyse bevestigde het niet-hybride karakter van de kiemlingen. De knipplaatsen van de nakomeling kwamen in sterke mate overeen met die van de moederplant. Met de vaderplant werd een sterk afwijkend patroon waargenomen. De verkregen planten zijn geen hybriden. Het betreft waarschijnlijk zelfbestuiving, omdat ondanks de grote overeenkomst met de moeder, toch enkele pieken zijn weggevallen t.o.v. de moederplant.



**Figuur 3.5** Kiemlingen 'Praecox' x *serrata*



**Figuur 3.6** Kiemlingen 'Unique' x *serrata*

### 3.1.4. *H. macrophylla* x *H. paniculata*

#### 3.1.4.1. Doel

Deze reciproke kruising heeft hetzelfde doel als de *H. paniculata* x *H. macrophylla* kruising, maar hier kunnen andere problemen optreden (groei pollen, endospermvorming,...).

#### 3.1.4.2. Materialen en methoden

144 Bloemen van *H. macrophylla* ssp. *serrata* werden bestoven met stuifmeel van *H. paniculata* cultivars (tabel 3.4). Na 5 weken werd de helft van het totaal aantal bestoven bloemen verwijderd van de moederplant als materiaal voor het *in vitro* gedeelte. De andere helft diende als controlemateriaal.

**Tabel 3.4** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen
<i>serrata</i> x 'Praecox'	119	0	0,0 %	0
<i>serrata</i> x 'Unique'	25	0	0,0 %	0

#### 3.1.4.3. Resultaten en bespreking

Alle bloemen van de bestoven moederplant aborteerden allen spontaan op de plant (tabel 3.4). De bloeiwijze was uitgedroogd en leek levenloos. Er konden geen vruchten *in vitro* gebracht worden. Uit het onderzoek dat Reed (2000b) uitvoerde op interspecifieke kruisingen tussen *H. macrophylla* en *H. paniculata* bleek dat de ovulen die 3 à 4 weken na de bestuiving verzameld werden zeer klein en moeilijk uit het ovarium te verwijderen waren. In geen enkele van de 3 à 4 weken oude interspecifieke ovulen konden eventueel aanwezige embryo's gedetermineerd worden. 5 à 6 Weken na de bestuiving werden 2 typen ovulen waargenomen. Één type was groter, met een donkere, melkwitte kleur, terwijl het andere type kleiner en doorzichtig was. Geen enkele van de kleine, doorzichtige ovulen kiemde nadat ze in cultuur gebracht werden. Vele plantjes stierven kort na de kieming af. Geen enkel plantje, verkregen uit de interspecifieke kruisingen, ontwikkelde meer dan 2 volledige sets bladeren voordat ze afstierven. De ovulen die 9 à 10 weken na bestuiving in cultuur gebracht werden, bleken het beter te doen. Er wordt verondersteld dat zij hybriden voortbrachten (Reed, 2000b).

### 3.1.5. *H. paniculata* x *H. aspera*

#### 3.1.5.1. Doel

De proef werd opgezet met het doel het bestaande *H. paniculata* sortiment uit te breiden door pH-afhankelijkheid van petaalkleuren (zoals bij *H. macrophylla*) in te kruisen bij *H. paniculata* cultivars

#### 3.1.5.2. Materialen en methoden

251 Bloemen van *H. paniculata* cultivars werden bestoven met het stuifmeel van *H. aspera* 'Macrophylla' (tabel 3.5). Na 5 weken werden de bestoven bloemen verwijderd van de moederplant en de ovulen *in vitro* gebracht.

**Tabel 3.5** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen
'Praecox' x 'Macrophylla'	204	79	38,7 %	402
'Unique' x 'Macrophylla'	47	24	51,1 %	97

#### 3.1.5.3. Resultaten en bespreking

Het percentage spontane aborties van de bestoven bloemen op de moederplant lag bij 'Praecox' beduidend hoger dan bij 'Unique' (tabel 3.5). De vruchten van 'Unique' waren meer opgezwollen dan die van 'Praecox', maar leverden minder ovulen per vrucht. Bij dissectie van de ovulen bleek dat de ovulen een langgerekt en helder wit uitzicht te hebben. Na een duisterperiode van 2 weken was nog geen kieming waar te nemen en ook na een lichtperiode bleef kieming uit. Voor een AFLP-analyse was geen materiaal aanwezig.

### 3.1.6. *H. aspera* x *H. paniculata*

#### 3.1.6.1. Doel

Deze reciproke kruising heeft hetzelfde doel als de *H. paniculata* x *H. aspera* kruising, maar hier kunnen andere problemen optreden (groeï pollen, endospermvorming,...).

#### 3.1.6.2. Materialen en methoden

712 Bloemen van *H. aspera* 'Macrophylla' werden bestoven met het stuifmeel van *H. paniculata* cultivars (tabel 3.6). Na 5 weken werden de ovulen gedissecteed uit de vruchten die vooraf van de moederplant werden geïsoleerd.

**Tabel 3.6** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en ovulen *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in</i> <i>vitro</i>	Aantal kiemende ovulen	
'Macrophylla' x 'Praecox'	465	0	0,0 %	0	0,0 %
'Macrophylla' x 'Unique'	247	0	0,0 %	0	0,0 %

#### 3.1.6.3. Resultaten en bespreking

Alle bloemen van de bestoven moederplant aborteerden spontaan op de plant (tabel 3.6). De bloeiwijze was uitgedroogd en leek levenloos. Er konden geen vruchten *in vitro* gebracht worden. Voor AFLP-analyse was bijgevolg geen bruikbaar materiaal aanwezig.



### 3.2. Ligustrum

Alle gebruikte planten bleken diploïd te zijn. Er werd een prezygotisch onderzoek gedaan naar het gedrag en groei van de pollenbuis in de stamper zoals beschreven in 2.4. In alle stampers die naar aanleiding van het onderzoek geïsoleerd werden, werd een bundel van pollenbuizen waargenomen. Sommige buizen stopten plots, anderen (meestal 1 per stamper) gingen door tot aan de bloembodem. Ook de pollenkorrels waren zichtbaar.

#### 3.2.1. Wintergroen x wintergroen

##### 3.2.1.1. Doel

Deze kruisingen werden ter controle uitgevoerd, omdat hier geen problemen verwacht werden.

##### 3.2.1.2. Materialen en methoden

Na 5 weken werden de helft van het totaal aantal bestoven bloemen verwijderd van de moederplant. De ovulen werden uit de vruchten gedissecteed en *in vitro* gebracht. Na 11 weken werden 15 extra vruchten van kruising WW1 en 14 extra vruchten van kruising WW2 gedissecteed. De overige vruchten aborteerden spontaan. Ditmaal werden de embryo's *in vitro* op medium geënt (tabel 3.7). De 18 vruchten van WW2, die 5 weken na de bestuiving gedissecteed werden, werden gebruikt om de verschillende media uit te testen zoals besproken in 2.2.4. (tabel 3.8).

WW1= *L. japonicum* x *L. lucidum*

WW2 = *L. lucidum* x *L. japonicum*

**Tabel 3.7** Aantal bestuivingen, vruchten en ovulen/embryo's *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

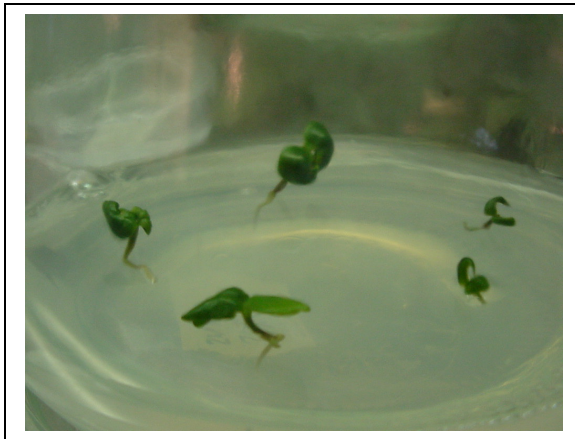
	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>		Aantal ovulen/ embryo's <i>in vitro</i>		Aantal kiemende ovulen/embryo's	
		5	11	5	11	5	11
		weken	weken	weken	weken	weken	weken
WW1	144	39	15	77	15	0	11
WW2	154	18	14	42	14	0	8

**Tabel 3.8** Aantal vruchten en aantal ovulen *in vitro* en aantal gekiemde ovulen VOOR WW2

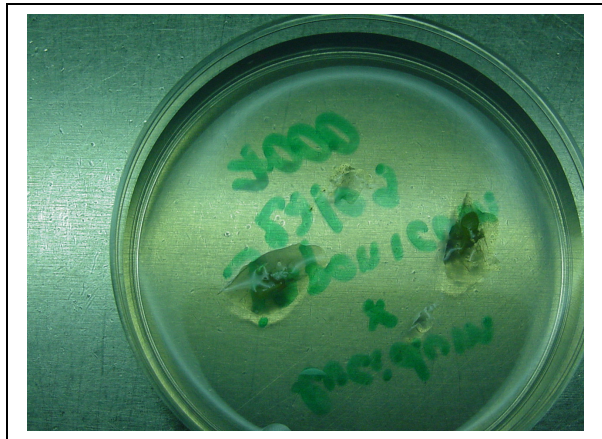
Medium	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in vitro</i>	Aantal gekiemde ovulen
ML1	2	6	0
ML2	2	4	0
ML3	3	7	0
ML4	3	6	0
ML5	2	5	0
ML6	2	5	0
ML7	2	6	0
ML8	2	3	0

### 3.2.1.3. Resultaten en bespreking

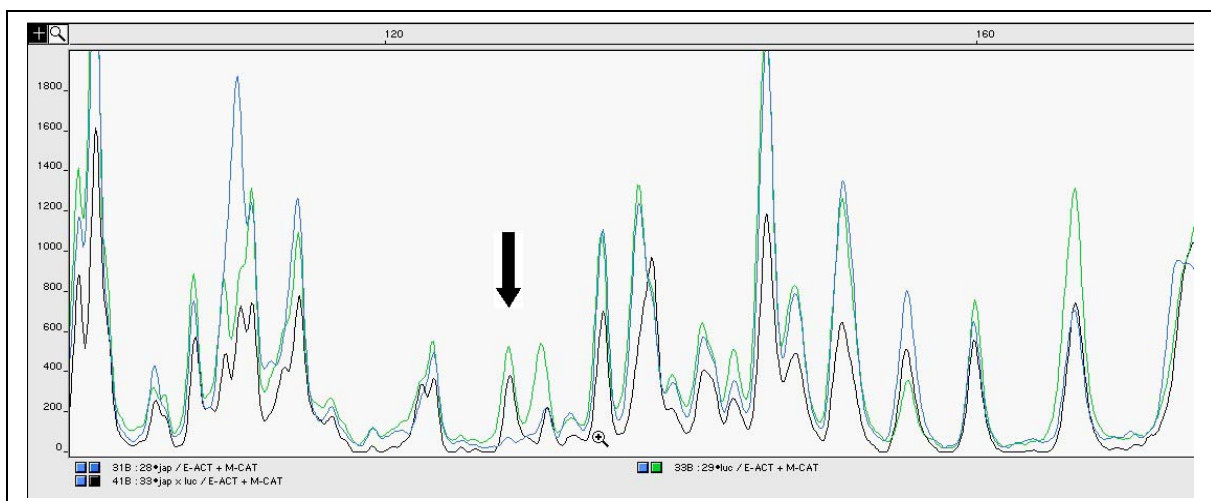
De opgezwollen ovulen waren makkelijk te verwijderen uit de knoppen. Kruising WW2 leverde in verhouding minder ovulen dan WW1. Gemiddeld werden ongeveer 2 ovulen per vrucht gedissecteerd. Bij geen enkele ovule die na 5 weken geïsoleerd werd, werd kieming waargenomen. Ook bij de geteste media werd geen kieming waargenomen. Na 11 weken was het embryo reeds voldoende uitgegroeid om in zonder ovule op medium gebracht te worden. Ook deze dissectie en enting konden vlot uitgevoerd worden. Bij de embryo's die na 11 weken *in vitro* gebracht werden, werd snel kieming waargenomen (figuur 3.7 en 3.8). AFLP-analyse moest uitsluitsel geven over het al dan niet hybride karakter van de *in vivo* afgeharde kiemlingen (WW1: 4, WW2: 1). Het DNA van moederplant, vaderplant en desbetreffende nakomeling werd geïsoleerd en hun AFLP-patroon onderling vergeleken (figuur 3.9). Vooral de knipplaatsen van de vaderplant dienen vergeleken te worden met die van de nakomeling. De pieken die bij de vergelijking overeenkomen en die niet aanwezig zijn bij de moederplant, wijzen op een interspecifiek karakter. In de verkregen grafieken zijn voor *L. japonicum* x *L. lucidum* (figuur 3.3 en 3.5) en voor *L. lucidum* x *L. japonicum* dergelijke pieken terug te vinden. In beide toegepaste kruisingen werden hybride nakomelingen bekomen.



**Figuur 3.7** Kiemling in Meli-pot *L. japonicum* x *L. lucidum*



**Figuur 3.8** Embryo's *L. lucidum* x *L. japonicum*



**Figuur 3.9** AFLP-patroon (elektroferogram) *L. japonicum* x *L. lucidum*, met nakomeling (zwart), moederplant (blauw) en vaderplant (groen)

### 3.2.2. Bladverliezend x wintergroen

#### 3.2.2.1. Doel

De kruisingen binnen *Ligustrum* waren erop gericht de wintergroene *Ligustrum*-species te kruisen met de bladverliezende soorten.

#### 3.2.2.2. Materialen en methoden

Na 5 weken werden de bestoven bloemen verwijderd van de moederplant (tabel 3.9). De ovulen werden uit de vruchten gedissecteed en *in vitro* gebracht.

BW1 =	<i>L. 'Vicaryi' x L. japonicum</i>
BW2 =	<i>L. obtusifolium</i> var. <i>regelianum</i> x <i>L. japonicum</i> 'Rotundifolium'
BW3 =	<i>L. obtusifolium</i> var. <i>regelianum</i> x <i>L. lucidum</i>
BW4 =	<i>L. obtusifolium</i> var. <i>regelianum</i> x <i>L. japonicum</i>
BW5 =	<i>L. quihoui</i> x <i>L. japonicum</i>
BW6 =	<i>L. quihoui</i> x <i>L. lucidum</i>

**Tabel 3.9** Aantal bestuivingen, vruchten en ovulen/embryo's *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>		Aantal ovulen/ embryo's <i>in vitro</i>		Aantal gekiemde ovulen/embryo's	
		5	11	5	11	5	11
		weken	weken	weken	weken	weken	weken
BW1	118	7	0	17	0	0	0
BW2	85	2	0	5	0	0	0
BW3	144	3	0	10	0	0	0
BW4	81	0	0	0	0	0	0
BW5	228	16	0	51	0	0	0
BW6	65	0	0	0	0	0	0

#### 3.2.2.3. Resultaten en bespreking

De bestoven bloemen van kruisingen BW4 en BW6 aborteerden spontaan op de moederplant. Bij de andere kruisingen werden enkele vruchten gevormd die elk gemiddeld ongeveer 3 ovulen leverden. In geen enkel geval werd kieming waargenomen. Na 11 weken waren alle vruchten op de moederplant afgestorven, en was er onvoldoende materiaal om *in vitro* te brengen.

### 3.2.3. Wintergroen x bladverliezend

#### 3.2.3.1. Doel

De kruisingen waren erop gericht de bladhoudendheid van *japonicum/lucidum* in te kruisen in alle andere soorten. (die hun andere eigenschappen overdragen). Er werd niet specifiek naar een bepaald kenmerk binnenin de bladverliezende groep gezocht.

#### 3.2.3.2. Materialen en methoden

5 Weken na de bestuiving werden de bestoven bloemen verwijderd van de moederplant (tabel 3.10). De ovulen werden uit de vruchten gedissecteed en *in vitro* gebracht. 11 Weken na de bestuiving werden extra vruchten van de moederplant verwijderd en gedissecteed. Dit gebeurde voor WB6, WB7, WB8, WB9, WB10, WB11, WB12. De embryo's werden *in vitro* op medium geënt. Na 5 weken werden voor WB12, naast de 6 vruchten die ovulen leverden om op BML te enten, nog 24 vruchten gedissecteed die ovulen leverden om andere media uit te testen (tabel 3.11) zoals besproken in 2.2.4.

WB1 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L. ovalifolium</i> 'Winter pleasure'
WB2 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L.</i> 'Vicaryi'
WB3 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L.</i> 'Berry Boom'
WB4 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L. ovalifolium</i> 'Dart's Abundance'
WB5 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L. tschonoskii</i>
WB6 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L. obtusifolium</i> var. <i>regelianum</i>
WB7 =	<i>L. japonicum</i> x <i>L. quihoui</i>
WB8 =	<i>L. japonicum</i> 'Rotundifolium' x <i>L. obtusifolium</i> var. <i>regelianum</i>
WB9 =	<i>L. japonicum</i> 'Rotundifolium' x <i>L. Vicaryi</i>
WB10 =	<i>L. lucidum</i> x <i>L.</i> 'Vicaryi'
WB11 =	<i>L. lucidum</i> x <i>L. ovalifolium</i> 'Winter Pleasure'
WB12 =	<i>L. lucidum</i> x <i>L. obtusifolium</i> var. <i>regelianum</i>

**Tabel 3.10** Aantal bestuivingen, aantal vruchten en aantal ovulen/embryo's *in vitro*, en aantal gekiemde ovulen per kruising

	Aantal bestoven bloemen	Aantal vruchten <i>in vitro</i>		Aantal ovules/ embryo's <i>in vitro</i>		Aantal kiemnde ovulus/embryo's	
		5	11	5	11	5	11
		weken	weken	weken	weken	weken	weken
WB1	199	3	0	10	0	0	0
WB2	462	6	0	16	0	0	0
WB3	133	4	0	14	0	0	0
WB4	83	0	0	0	0	0	0
WB5	67	2	0	5	0	0	0
WB6	129	2	1	4	1	0	1
WB7	300	12	7	38	7	0	0
WB8	155	7	1	19	1	0	1
WB9	162	3	3	11	3	0	3
WB10	82	6	6	15	6	0	5
WB11	120	7	6	18	6	0	6
WB12	338	6	7	16	7	0	3

**Tabel 3.11** Aantal vruchten en ovulen *in vitro* en aantal gekiemde ovulen VOOR WB12

Medium	Aantal vruchten <i>in vitro</i>	Aantal ovulen <i>in vitro</i>	Aantal gekiemde ovulen
ML1	3	8	0
ML2	3	5	0
ML3	3	7	0
ML4	3	6	0
ML5	3	9	0
ML6	3	4	0
ML7	3	7	0
ML8	3	5	0

### 3.2.3.3. Resultaten en bespreking

WB4 leverde geen ovulen. De andere kruisingen leverden gemiddeld 2 ovulen per vrucht. Na de donkerperiode was geen kieming waar te nemen. Ook later bleef de kieming uit. De embryo's die na 11 weken gemakkelijk gedissecteerde konden worden, gaven een hoger kiemingspercentage dan de embryo's die na 5 weken van de moederplant geïsoleerd werden. De embryo's verkregen uit de kruisingen WB8 en WB9 kiemden, maar de kiemlingen stierven na enkele weken af. De embryo's verkregen uit kruising WB7 kiemden niet. AFLP-analyse (zie 2.6) werd aangewend om het al dan niet hybride karakter van de *in vivo* succesvol afgeharde kiemlingen (WB6: 1, WB10: 2, WB11: 2) vast te stellen. In de verkregen grafieken werden voor *L. japonicum* x *L. obtusifolium* var. *regelianum* knipplaatsen overeenkomstig met die van de vaderplant teruggevonden. Voor deze kruising werd 1 hybride nakomeling bekomen. Voor kruising WB10 kon aan de hand van de grafiek vastgesteld worden dat de planten het gevolg van een zelfbestuiving waren. Er was te weinig plantenmateriaal van WB11 en WB12 om AFLP toe te passen. Later onderzoek zal de eventuele hybriditeit van deze kruisingen al dan niet bevestigen. Bij de embryo's verkregen na 11 weken, zijn de statistische gegevens niet relevant omdat het aantal gebruikte vruchten te laag was.

## ALGEMEEN BESLUIT

Het doel van deze studie was binnen de genera *Hydrangea* en *Ligustrum* hybride planten te verkrijgen, afkomstig uit interspecifieke kruisingen. AFLP-analyse werd aangewend om de veronderstelde interspecifieke hybriden te verifiëren. Voor *Ligustrum* werd tevens ook nagegaan na welke periode de vruchten van de plant geïsoleerd dienen te worden om een optimale kieming te verkrijgen. Ook werd voor dit geslacht getracht de optimale mediasamenstelling voor kieming en verdere differentiatie te bepalen.

Van de kruisingen die binnen *Hydrangea* werden uitgevoerd, werd er enkel kieming vastgesteld bij *H. paniculata* x *H. quercifolia* en *H. paniculata* x *H. macrophylla* ssp. *serrata*. *H. paniculata* als moederplant gaf de beste resultaten. Alleen de kruisingen waarbij *H. paniculata* en *H. quercifolia* ‘Sikes Dwarf’ als respectievelijk moederplant en vaderplant werden aangewend, gaf hybride nakomelingen als resultaat. De nakomeling met *H. quercifolia* ‘Snow flake’ als mogelijke vader is momenteel te jong om voldoende bladmateriaal te leveren voor AFLP-analyse. De kiemlingen verkregen uit de vermeende kruising met *H. macrophylla* ssp. *serrata* als vaderplant waren hoogstwaarschijnlijk het gevolg van zelfbestuiving. Bij ‘dubbele’ bevruchting (met zowel vreemd als soorteigen pollen) zal de zaadouder wellicht een snellere kieming van het soorteigen pollen toelaten, wat de kansen op bevruchting door het vreemd pollen sterk reduceert. Dit kan in de toekomst vermeden worden door de pluimen van de moederplant na de bestuiving van de omgeving af te sluiten door er een plastic zakje omheen te brengen. Zo kan er geen planteigen pollen op de stijlen terecht komen. Hiermee gaan wel risico’s zoals condensatie, te hoge temperaturen en schimmelinfecties gepaard. Accidentele ‘normale’ bestuiving wordt op deze manier wel voorkomen.

Waarschijnlijk treden er meer of substantiële soortkruisingsbarrières op wanneer *H. macrophylla* met *H. paniculata* gekruist wordt dan wanneer geprobeerd wordt introgressie van *H. quercifolia* – genen in *H. paniculata* te verwezenlijken. Morfologisch is geen verschil waarneembaar tussen de hybriden en de moederplanten. Enerzijds worden bladkarakteristieken waarschijnlijk grotendeels maternaal bepaald, anderzijds zijn de *H. paniculata* genen mogelijk dominant zodat de expressie van *H. quercifolia* – genen (anthocyaanvorming) pas in een latere generatie (F2) tot uiting komt.

Voor het geslacht *Ligustrum* werden na 5 en na 11 weken vruchten geïsoleerd van de moederplant. Enkel de vruchten waarvan de embryo’s na 11 weken *in vitro* werden geïnitieerd leverden kiemlingen op. Na AFLP-analyse bleek dat de kruisingen *L. japonicum* x *L. obtusifolium* var. *regelianum*, *L. japonicum* x *L. lucidum*, en *L. lucidum* x *L. japonicum* interspecifieke hybriden opgeleverd hadden. Waarschijnlijk was de veronderstelde hybride, bekomen uit *L. lucidum* x *L. sp.* ‘Vicaryi’ het gevolg van een zelfbestuiving. Er was onvoldoende bladmateriaal van de kiemlingen, bekomen uit *L. lucidum* x *L. obtusifolium* var. *regelianum* en uit *L. lucidum* x *L. ovalifolium* ‘Winter pleasure’, om DNA-isolatie mogelijk te maken. Op de verschillende uitgeteste media werd te weinig kieming waargenomen om ze onderling te kunnen vergelijken.

Omdat enkel kieming waargenomen werd bij de vruchten die na 11 weken geïsoleerd werden en niet bij de vruchten geïsoleerd na 5 weken, is het waarschijnlijk dat 5 weken te vroeg is om *Ligustrum*-vruchten *in vitro* te initiëren. Ook bij *Hydrangea* lijkt het interessanter om de vruchten in een later stadium van de moederplant te isoleren.

Het kan nuttig zijn het verzamelde pollen afkomstig van de vaderplant in de frigo in silicagel te bewaren, indien het bestuiven later plaatsvindt dan het oogsten van het pollen. Onder droge en koele omstandigheden kan pollen van de meeste plantenspecies vrij makkelijk beperkt bewaard blijven.

Hoewel ploëdiemetingen binnen *Hydrangea* door de hoge viscositeit van het materiaal na kernbereiding nogal problematisch bleken, was het toch duidelijk dat er geen ploëdieverschillen waarneembaar waren, die een mogelijke verklaring zouden vormen voor het gebrek aan gevormde hybriden tussen *H. paniculata* en *H. macrophylla*. De AFLP-fingerprints tonen binnen *Ligustrum* meer verwantschap dan binnen *Hydrangea*: pieken waren meer geconserveerd en polymorfismen waren moeilijker terug te vinden..

Ondanks het grote aantal bestoven bloemen, werden uiteindelijk vrij weinig planten afgehard, die nog niet allemaal getest konden worden. Daarom is enig voorbehoud met betrekking tot de vooropgestelde conclusies op zijn plaats. Nochtans werden heel interessante resultaten bekomen en werden binnen beide genera interspecifieke hybriden *in vitro* opgegroeid. De efficiëntie van de *in vitro* stap kan bij beide genera waarschijnlijk aanzienlijk verhoogd worden door een latere initiatie.

Een interspecifieke kruising is pas geslaagd wanneer de bekomen hybriden fertiel zijn en dus kunnen gebruikt worden als ‘pre-breeding’ materiaal om via zelfbestuiving of terugkruising naar de ouder waarin men het kleinste aantal genen wil inbrengen, een nieuwe generatie te vormen. Daarom zullen de verkregen hybriden opgekweekt worden en zal via pollenkieming, -kleuring en kruisingen hun fertiliteit bepaald worden.

De resultaten van deze studie vormen een interessant uitgangspunt voor verdere studie. De creatie van interspecifieke hybriden is immers bij beide genera mogelijk gebleken. Nochtans is de efficiëntie vrij laag en kunnen de gebruikte technieken nog verder op punt gesteld worden. De hybriden zullen de volgende jaren betrokken worden in een kruisingsprogramma dat hun volledig potentieel zal ophelderden. Bovendien kan het onderzoek uitgebreid worden naar andere soorten. Vooral binnen *Hydrangea* lijkt het gebruik van ‘embryo rescue’ aangewezen om de efficiëntie van interspecifieke kruisingen te verhogen.

## **LITERATUURLIJST**

AGNIHOTRI A (1993). Hybrid embryo rescue. In: Lindsey K (ed) Plant Tissue Culture manual; fundamentals and applications, Dordrecht, Kluwer Academic publishers: 1-8. <http://www.teriin.org/division/bbdiv/pmb/docs/abs29.htm> (23 sept. 2002).

AJMONE MARSAN P, CASTIGLIONI P, FUSARI F, KUIPER M, MOTTO M (1998). Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 219-227.

ALTMAN A, ZIV M (1997). Introduction: horticultural biotechnology: a historical perspective and future prospect. *Acta Horticulturae*, 447: 31-35.

ARUMUGANATHAN K, EARLE ED (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reports*, 9: 229-233.

ARZATE-FERNANDEZ A, NAKAZAKI T, TANISAKA T (1998). Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium concolor* and *L. longiflorum* by *in vitro* ovary slice culture. *Plant Breeding*, 117: 479-484.

ASANO Y, MYODO H (1977). Studies on crosses between distantly related species of lilies: the culture of immature hybrid embryos. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 46: 267-273.

BADGER B (1988). In search of a yellow evergreen azalea (how to hybridize for a yellow evergreen azalea). *Journal of the American Rhododendron Society*, 42: 74-79.

BAKER R, HASENSTEIN K, ZAVADA M (1997). Hormonal changes after compatible and incompatible pollination in *Theobroma cacao* L. *HortScience*, 32: 1231-1234.

BADAMI P, NALINI MALLIKARJUNA, MOSS J (1997). Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *Cicer pinnatifidum*. *Plant Breeding*, 116: 393-395.

BENNETT M, LEITCH I (1995). Nuclear DNA amount in angiosperms. *Annals of Botany*, 76: 113-176.

BRIDGEN M (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience* 29: 1243-1245.

BURCHI G, MERCURI A, BIANCHINI C, BREGLIANO R, SCHIVA T (1997). New interspecific hybrids of *Alstroemeria* obtained through *in vitro* embryo-rescue. *Acta Horticulturae*, 508: 233-235.

CHEN J, STAUB J, ADELBERG J, LEWIS S, KUNKLE B (2002). Synthesis and preliminary characterization of a new species (amphidiploid) in *Cucumis*. *Euphytica*, 123: 315-322.

CHI H (2002). The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica Taipei*, 43: 139-146.



CUEVAS J, RALLO L, RAPOPORT HF, LAVEE S, KLEIN I (1994). Staining procedure for the observation of foliv pollen tube behaviour. *Acta Horticulturae*, 356: 264-267.

DE JEU M (2000). *In vitro* techniques for ornamental breeding. *Acta Horticulturae*, 508: 55-60.

DE JEU M, JACOBSEN E (1995). Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria L.* and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica*, 86: 15-23.

DE SCHEPPER S, LEUS L, EECKHAUT T, VAN BOCKSTAELE E, DEBERGH P, DE LOOSE M (2002). Somatic polyploid picotee flowers: new roads to tetraploidy for Belgian pot azaleas. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, submitted.

DE VOS L (2001). Cursus "In vitro", KHK, Departement biowetenschappen, Geel: 26 pp.

DE RIEK J, DENDAUW J, MERTENS M, DE LOOSE M, HEURSEL J, VAN BOCKSTAELE E (1999). Validation of criteria for the selection of AFLP markers to assess the genetic variation of a breeders' collection of evergreen azaleas. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 1155-1165.

DICKINSON HG, ROBERTS IN (1996). Cell-surface receptors in the pollen-stigma interaction of *Brassica oleracea*. In: Chadwick C, Garrod D, Cinader B. (eds), *Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*, Cambridge University Press, Cambridge: 225-280.

DOLEZEL J, BINAROVA P, LUCRETTI S (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31: 113-120.

DOLEZEL J (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical analysis*, 2: 143-154.

DZELZKALNS V, NASRALLAH J, NASRALLAH M (1992). Cell-cell communication in plants: Self incompatibility in flower development. *Developmental Biology*, 153: 70-82.

EECKHOUT T (2002). Research assistant, CLO DVP Melle. Mondelinge mededeling, 16 december 2002.

FAURE N, SERIEYS H, KAAAN F, BERVILLE A (2002). Partial hybridization in crosses between cultivated sunflower and the perennial *Helianthus mollis*: Effect of *in vitro* culture compared to natural crosses. *Plant Cell Reports*, 20: 943-947.

FENG Q, STALKER H, PATTEE H (1996). Plant recovery of selfs and interspecific hybrids of *Arachis* by *in vitro* culture of peg tips. *Crop Science*, 36: 1660-1666.

FORTGENS H, HOFFMAN M (1993). *Ligustrum*: sortiments- en gebruikswaardeonderzoek. In: Van De Laar H (ed) *Dendroflora*. Nederlandse Dendrologische Vereniging, Boskoop, 30: 5-25.

FRANKLIN-TONG V (1999). Signaling and modulation of pollen tube growth. *The Plant Cell*, 11: 727-738.

GALBRAITH D, HARKINS K, MADDOX J, AYRES N, SHARMA D, FIROOZABADY E (1983). Rapid flow cytometrical analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.

GALBRAITH D (1990). Flow cytometric analysis of plant genomes. *Methods in Cell Biology*, 33: 549-561.

GAUTHERET R (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercule de carotte. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 208: 118-120.

GUNDIMEDA H, PRAKASH S, SHIVANNA K (1992). Intergeneric hybrids between *Enarthrocarpus lyratus*, a wild species, and crop brassicas. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 655-662.

HA S, MAEKAWA M, KITA F, KINOSHITA T (1998). Cytological relationships among *Eumelilotus* species analysed using cytological observations of interspecific hybrids obtained by *in vitro* culture. *Euphytica*, 101: 17-22.

HARING V, GRAY J, MCCLURE B, ANDERSON M, CLARKE A (1990). Self-incompatibility: A self-recognition system in plants. *Science*, 250: 937-941.

HAWARTH-BOOTH M (1950). *The Hydrangeas*. Constable & Co. Ltd., London. 185 pp.

HELLER F (1973). DNA-Bestimmungen an Keimwurzellen von *Vicia faba* mit Hilfe der Impulszytometrie. *Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86: 437-441.

HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KAWANO S, KUROIWA T (1998). Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*. *The Plant Cell*, 10: 2019-2031.

HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KAWANO S, KUROIWA T (2000). Explosive discharge of pollen tubes contents in *Torenia fournieri*. *Plant Physiology*, 122: 11-13.

HILL M, WITSENBOER H, ZABEAU M, VOS P, KESSELI R, MICHELMORE R (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1202-1210.

HOGENBOOM N (1975). Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. *Proceedings of the Royal Society London*, 188: 361-375.

HONGTRAKUL V, HUESTIS G, KNAPP S (1997). Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting of sunflower germplasm: genetic diversity among inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 400-407.

HU C, WANG P (1986). Embryo culture: technique and applications. In : Evans D, Sharp W, Ammirato P (eds). *Handbook of Plant Cell Culture, Techniques and Applications*. Macmillan Publishing Co., New York: 43-96.

HWANG Y, OKUBO H, FUJIEDA K (1992). Pollen tube growth, fertilization and embryo development of *Camellia japonica* L. x *C. chrysantha* (Hu) Tuyama. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 60: 955-961.

INOMATA N (1978). Production of interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *Brassica oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. Part 2. Effects of coconut-milk and casein hydrolysate on the development of excised ovaries. Japanese Journal of Genetics, 53: 1-12.

KAO T, McCUBBUN A (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA-biological Sciences, 93: 12059-12065.

KASHA K, KAO K (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature, 225: 874-876.

KATSUKAWA K, MORI G, IMANISHI H (2000). Effect of applying naphthaleneacetic acid (NAA) onto stigma on fruit set and seed formation in interspecific hybrids between *Lycoris* species. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 69: 224-226.

KHO Y, BAER J (1973). Improving the cross *Rhododendron impeditum* x *Rhododendron* 'Elizabeth' by temperature treatment. Euphytica, 22: 234-238.

KRUSE A (1973). *Hordeum* x *Triticum* crosses. Hereditas, 73: 157-161.

KRUSE A (1974a). An *in vivo/in vitro* embryo culture technique. Hereditas, 77: 219-224

KRUSE A (1974b). *Hordeum* x *Agropyron* hybrids. Hereditas, 78: 291-294.

KUDO N, NIIMI Y (1999). Production of interspecific hybrids between *Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd. And *H. arborescens* L. Journal of Japanese Society of Horticultural Science, 68: 428-439.

LELIVELT C (1993). Studies of pollen grain germination, pollen tube growth, micropylar penetration and seed set in intraspecific and intrageneric crosses within three Cruciferae species. Euphytica, 67: 185-197.

LI Z, LIU H, LUO P (1995). Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*. Theoretical and Applied Genetics, 91: 131-136.

LLOYD G, MCCOWN BH (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot top culture. International Plant Propagators Society Proceedings, 30: 421-427.

MALLIKARJUNA N, MOSS J (1995). Production of hybrids between *Cajanus platycarpus* and *Cajanus cajan*. Euphytica, 83: 43-46.

MARTENS M, REISCH B (1988). An improved technique for counting chromosomes in grapes. HortScience 23: 896-899.

- MASCARENHAS J (1989). The male gametophyte of flowering plants. *The Plant Cell*, 1: 657-664.
- MAUGHAN P, SAGHAI MAROOF M, BUSS G, HUESTIS G (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 400-407.
- MCCLINTOCK E (1957). A monograph of the genus *Hydrangea*. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 19: 147-256.
- MCCLURE B, GRAY J, ANDERSON M, CLARKE A (1990). Self-incompatibility in *Nicotinia alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347: 757-760.
- MOK D, MOK M, RABAKOARIHANTA A (1978). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* hybrid parent with *Phaseolus lunatus* hybrid parent and *Phaseolus acutifolius* hybrid parent. *Theoretical and Applied Genetics*, 52: 209-215.
- MOMOTAZ A, KATO M, KAKIHARA F (1998). Production of intergeneric hybrids between *Brassica* and *Sinapis* species by means of embryo rescue techniques. *Euphytica*, 103: 123-130.
- MONNIER M (1978). Culture of zygotic embryos. In: Thorpe T (ed). *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Congress on Plant Tissue Cell Culture*. Calgary: 79-98.
- MONNIER M (1988). Culture d'embryons et d'ovules / embryogénèse zygotique et somatique. In: Zrýd J (ed.) *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Presses polytechniques romandes, Lausanne: 105-134.
- MULCAHY D, BERGAMI-MULCAHA G (1983). Gametophytic self-incompatibility re-examined. *Science* 230: 1247-1251.
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum*, 15: 473-497.
- NARAYANASWAMI S, NORSTOG K (1964). Plant embryo culture. *Botanical Review*, 30: 587-628.
- NEWBIGIN E, ANDERSON M, CLARKE A (1993). Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*, 5: 1315-1324.
- NIKOVA V, ZAGORSKA N (1990). Overcoming hybrid incompatibility between *Nicotiana africana* Merxm. and *Nicotiana tabacum* and development of cytoplasmically male sterile tobacco forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23: 71-75.
- NORSTOG K (1979). 13. Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology. In: Evans D, Sharp W, Ammirato P (eds). *Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications*. Ohio State University Press, Columbus, 179 pp.

OTTO F (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z, Crissman H (eds). *Methods in Cell Biology* .Academic Press, New York, vol 33: 105-110.

OWEN H, MILLER A (1993). A comparison of staining techniques for somatic chromosomes of strawberry. *HortScience*, 28: 155-156.

PARTEC (1999). PAS III (Particle analyzing system) manual.

PAUL S, WACHIRA F, POWELL W, WAUGH R (1997). Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 255-263.

PERKIN-ELMER (1995). AFLP™ Plant Mapping Kit: Protocol.

PIERIK R (1985). *Plantenteelt in kweekbuizen*. Ponsen en Looijen, Wageningen, 202pp.

PRZYWARA L, WHITE D, SANDERS P, MAHER D (1989). Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *Trifolium hybridum* using in ovulo embryo and embryo culture. *Annals of Botany*, 64: 613-624.

PRZYWARA L, PIROG H, KONIECZNY R, JACH M (1996). The use of tissue culture methods in interspecific hybridization within the genus *Trifolium* L. *Acta Biologica Cracoviensia*, 38: 53-65.

QUAZI M (1988). Interspecific hybrids between *Brassica napus* L and *B. oleracea* L. developed by embryo culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 309-318.

RAGHAVAN V (1976). *Experimental Embryogenesis in vascular Plants*. Academic Press, London, 603 pp.

RAGHAVAN V (1977). Applied aspects of embryo culture. In: 'Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, tissue and Organculture' ,Reinert J, Bajaj YPS (eds). Springer-Verslag, Berlin: 375-397.

RAGHAVAN V (1980). Embryo culture. *International Review of Cytology*, 11B: 209-240.

RAGHAVAN V, SRIVATASVA P (1982).Embryo culture. In : Johri B (ed). *Experimental Embryology of Vascular plants*. Springer Verslag, Berlin: 195-230.

RANGAN T (1984). Culture of ovaries. In Moore J, Janick J (eds)*Methods in Fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana: 136-144.

REED S, COLLINS G (1978). Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules. *Journal of Heredity*, 69: 311-315.

REED S (2000a). Compatibility studies in *Hydrangea*. *Journal of Environmental Horticulture*, 18: 29-33.

- REED S (2000b). Development of an in ovulo embryo culture procedure for *Hydrangea*. *Journal of Environmental Horticulture*, 18: 34-39.
- ROLDAN-RUIZ I, DE RIEK J, DENDAUW J, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M (1997). Fluorescent detection of AFLP fragments. EMBO-course 1997, Protocol book.
- ROWE P (1974). Methods of producing haploids; parthenogenesis following interspecific hybridization. In: Kasha K (ed) *Haploids in higher plants*. University of Guelph: 43-52.
- RUSSEL S (1993). The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *The Plant Cell*, 5: 1349-1359.
- SANCHEZ A, MARIANI C (2002). Expression of the ACC synthase and ACC oxidase coding genes after self-pollination and incongruous pollination of *tobacco* pistils. *Plant Molecular Biology*, 48: 351-359.
- SCHIEFELBEIN J, GALWAY M, MASUCCI J, FORD S (1993). Pollen tube and root-hair growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 103: 979-985.
- SCHOLTEN H, PIERIK R (1998). Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports*, 17: 230-235.
- SHARMA D, KAUR R, KUMAR K (1996). Embryo rescue in plants - a review. *Euphytica*, 89: 325-337.
- STEPKA M, CIAMPOLINI F, CHARZYNSKA M, CRESTI M (2000). Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta*, 210: 630-635.
- THIERFELDER A, LUHS W, FRIEDT W (1992). Breeding of industrial oil crops with the aid of biotechnology: a review. *Industrial crops and products*, 1: 261-271.
- TUKEY H (1933). Artificial culture of sweet cherry embryos. *Journal of Heredity*, 24: 7-12.
- URESHINO K, KAWAI M, MIYAJIMA I (2000). Factors of unilateral cross incompatibility between several evergreen azalea species and *Rhododendron japonicum flavum*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 69: 261-265.
- VAN CREIJ M (1997). Interspecific hybridization in the genus *Tulipa*. Thesis Wageningen, Landbouwfaculteit, Nederland, 163 pp.
- VAN TRIER H (2003). Voormalig directeur arboretum Kalmthout, e-mail betreffende systematiek en morfologie binnen het *Hydrangea*-geslacht, 14 maart 2003.
- VAN TUYL J, VAN HOLSTEYN H (1996). Lily breeding research in the Netherlands. *Acta Horticulturae*, 414: 35-45.
- VERVAEKE I, PARTON E, MAENE L, DEROOSE R, DE PROFT MP (2001). Prefertilization barriers between different Bromeliaceae. *Euphytica*, 118: 91-97.

VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LEE T, HORNES M, FIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M (1995). AFLP™: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 21: 4407-4414.

WATSON L, DALLWITZ M (1992). *The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval*. Version: 14th December 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta/> (30 maart 2003)

WATTS L (1980). *Flower and Vegetable Plant Breeding*. London, Grower Books: 179 pp.

WERBROUCK S (1987). Bestuiving en zaadsetting bij *Rhododendron simsii* Planch. Werk einde studiën, Rijksuniversiteit Gent, Faculteit van de Landbouwwetenschappen: 95 pp.

WHITE PR (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9: 585-600.

WILHELMI L, PREUSS D (1996). Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance. *Science*, 274: 1535-1537.

WILLIAMS E, DELAUTOUR G (1980). The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. *Botanical Gazette*, 141: 252-257.

WILLIAMS E, KNOX R, ROUSE J (1982). Pollination sub-systems distinguished by pollen tube arrest after incompatible interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *Journal of Cellular Science*, 53: 255-277.

WILLIAMS E, ROUSE J (1988). Disparate style lengths contribute to isolation of species in *Rhododendron*. *Australian Journal of Botany*, 36: 183-191.

WILLIAMS E, ROUSE J (1990). Relationships of pollen size, pistil length and pollen tube growth rates in *Rhododendron* and their influence on hybridization. *Sexual Plant Reproduction*, 3: 7-17.

YAO J, COHEN D, ROWLAND R (1994). Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (Araceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 255-260.

YAO J, COHEN D, ROWLAND R (1995). Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia*. *Plant Science*, 109: 199-206.

YAO J, COHEN D (2000). Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 400-406.

YEUNG E, THORPE T, JENSEN C (1981). In vitro fertilisation and embryo culture. In Thorpe T (ed), *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* Academic Press, New York, 253 pp.

ZHANG Z, RUSSEL S (1999). Sperm cell surface characteristics of *Plumbago zeylanica* L. in relation to transport in the embryo sac. *Planta*, 208: 539-544.

ZABEAU M, VOS P (1993). Selective Restriction Fragment Amplification : A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, EP 0534858.