

Najaarssymposium NVPW

9 NOVEMBER 2001

Gorlaeus lab.

EINSTEINWEG 55, LEIDEN

- 9:30-10:00 Ontvangst met koffie
- 10:00-10:10 Opening door de voorzitter van de NVPW, Prof.Dr. Andre Schram
- 10:10-10:45 Prof.Dr. Dorothea Bartels (VU, Amsterdam): A novel aldehydedehydrogenase gene contributes to abiotic stress tolerance
- 10:45-11:20 Dr. Jan Snel (PRI, Wageningen): Chlorophyll fluorescence: point measurements and imaging techniques for rapid and non-destructive assessment of plant performance and quality
- 11:20-11:55 Dr.Ir. Johan van Huylenbroeck (CLO, Gent): Afharden van weefselteeltplanten: een stressvolle periode?
- 11:55-12:30 Dr. Kees Boot (UL, Leiden): De rol van ethyleen bij adventief beworteling
- 12:30-13:30 Lunch
- 13:30-14:15 Prof.Dr. Alan Cassells (University College, Cork, Ireland): Fundamental and applied aspects of stress in *in vitro* culture
- 14:15-14:45 Dr. Folkert Hoekstra (WAU, Wageningen): Induction of desiccation tolerance in plant embryos: How exclusive is the protective role of sugars?
- 14:45-15:15 Dr. Simone de Faria Maraschin (TNO, Leiden): Cell death and 14-3-3 proteins during the induction of barley androgenesis
- 15:15-15:45 Dr. Geert-Jan de Klerk (PPO, Lisse): Stress bij de overgang van weefselkweek naar kas
- 15:45 Koffie en Thee

Chlorophyll fluorescence point measurements and imaging techniques for rapid and non-destructive assessment of plant performance.

Jan F.H. Snel, Henk Jalink and Wilco Jordi

Plant Research International, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, Netherlands,

e-mail: j.f.h.snel@plant.wag-ur.nl

Chlorophyll fluorescence is a well-known phenomenon. Chlorophyll is the pigment involved in harvesting the light energy for photosynthesis. This process is the basis of the plant's ability to accumulate carbohydrates. Photosynthesis starts with the absorption of light by chlorophyll molecules in the two photosystems. The energy of the resulting excited state of chlorophyll molecule is transferred to a nearby reaction center where electron flow is initiated. In these processes a fraction of the excitation energy is lost, partly as fluorescence and partly as heat. These losses decrease the efficiency of photosynthesis. The relation between fluorescence, heat and photosynthesis is the basis of the use of chlorophyll fluorescence as a tool to analyze the photosynthetic process and measure the efficiency of photosynthesis.

For studies where spatial information is important, fluorescence imaging techniques are to be preferred over single point techniques. The principles of the methods, some applications and new developments in the field of Multiple Imaging of Plant Stress will be presented.

Topics to be covered are:

Basic fluorescence measurements

- Quantification of seed quality
- Diffusion of pesticides into the plant
- Leaf responses upon pathogen infection

Advanced analysis of chlorophyll fluorescence for photosynthesis measurements

- High throughput assessment of Arabidopsis ecotypes
- Use of fluorescence in optimizing greenhouse control
- Assessment of effects of pesticide spray drift into ditches on aquatic plants

Multiple Imaging of Plant Stress

Suggested reading:

Maxwell K. and Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* (51), pp. 659-668.

Chaerle, L. and Van der Straeten, D. (2000) Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Sciences* 5 (11), pp. 495-501.

Afharden van weefselteeltplanten: een stressvolle periode?

Johan Van Huylenbroeck

Departement voor Plantengenetica en –veredeling, CLO-Gent, Caritasstraat 21, 9090 Melle, België

De overgang van in vitro naar serreomstandigheden vormt de laatste maar tevens erg belangrijke stap in elk micropropagatiesysteem. De artificiële culturomstandigheden in vitro

(gekenmerkt door hoge relatieve vochtigheid, lage lichtintensiteit, gelimiteerde gas-uitwisseling) samen met de aanwezigheid van een koolstofbron en hormonen in het cultuurmedium leiden vaak tot een verstoorde of afwijkende fysiologie van de weefselteeltplant. In de serre dient de plant zich aan te passen aan de nieuwe groeiomstandigheden en een normale fysiologie en een functioneel wortelgestel te ontwikkelen.

De fotosynthesecapaciteit bij in vitro planten kan sterk verschillen. Het verschil in koolstofmetabolisme op het moment van uitplanten heeft daarbij duidelijke gevolgen tijdens de eerste 2 weken van het afhardingsproces. Twee grote groepen worden onderscheiden: autotrofe en mixotrofe planten. Bij autotrofe culturen is de netto fotosynthese van bij de start voldoende om in de energiebehoeften van de plant te voorzien, terwijl een mixotrofe plant in de eerste fase de aangelegde koolstofreserves verbruikt. De in vitro bladeren dienen dan als opslagtank voor reservestoffen om de stressperiode te overleven. De uitbouw van een volwaardig functioneel fotosyntheseapparaat loopt parallel met de vorming van nieuwe bladeren.

Tijdens het afharderen speelt licht een belangrijke rol. Bij een abrupte overgang in lichtintensiteit voor en na het uitplanten neemt de stress en kans op foto-inhibitie sterk toe. Voornamelijk tijdens de eerste dagen na uitplanten kan foto-inhibitie en zelfs fotodestructie optreden bij lichtintensiteiten die onder normale condities geen schade berokkenen. Uit proeven blijkt tevens dat bij weefselteeltplanten het natuurlijke enzymatische afweersysteem niet noodzakelijk volledig ontwikkeld of functioneel is. Activatie van het systeem gebeurt ook hier geleidelijk in de eerste weken na uitplant.

ADVENTITIOUS ROOT FORMATION IN STEM SEGMENTS OF TOBACCO PLANTS

Kees J. M. Boot.

Institute of Molecular Plant Sciences, Clusius Laboratory, Leiden University,
Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands

As part of an STW project in which we study the stimulation of plant regeneration by novel signal molecules, we used *Nicotiana tabacum* SR1 plants as a model system. Stem segments cultured on a solidified medium were used to induce adventitious root formation. First, we studied the role of auxin (IAA) and ethylene during this process. We found that during the so-called phase 1, the first two days of culturing, IAA was strongly required for root formation. In addition, an important role for ethylene production and ethylene perception was established. After two days, the stem segments were transferred to fresh medium and cultured for another ten days. We found that during this so-called phase 2 IAA and, more precisely, IAA transport were the most important factors for stimulation of adventitious root formation. Blocking of auxin transport with the auxin transport inhibitor NPA nearly completely inhibited root formation.

Measurements of ethylene produced by cultured stem segments at different points in time indicated a role for ethylene in sensitizing cells for IAA during phase 1.

Sectioning and microscopical analysis showed that only a limited number of cells responded to IAA to eventually form a root primordium. Treatment of stem segments with NPA during phase 2 resulted in an increase in the number of dividing cells but did not lead to root primordia formation.

Tobacco plants transformed with the mutant *etr1-1* gene from *Arabidopsis*, conferring dominant ethylene insensitivity, did not show adventitious root formation after the usual incubation period of two weeks, but after culturing for 5 weeks the segments produced roots although to a much lesser extent than did control plants. Ethylene measurements showed that these plants produced a large amount of ethylene. Auxin transport in *etr1-1* plants was not

different from that in control plants. Anatomical analysis indicated that in *etr1-1* stem segments there was a strong increase in the number of cells that divided but no root primordia formation was seen.

Through a better understanding of the factors that are important for (the timing of) adventitious root formation we can use this system for testing novel signal molecules to improve adventitious root formation.

Fundamental and Applied Aspects of Stress in Tissue Culture

Alan C Cassells,

Department of Plant Science, National University of Ireland Cork, Ireland

a.cassells@ucc.ie

Criteria for assessing the quality of microplants have tended to be based on percentage establishment and subjective assessment of the established microplants. The micropropagator's objective being to optimise productivity, compatible with the latter criteria without in most cases knowledge of the subsequently greenhouse or field performance of the plants. Poor field performance of microplant-derived crops can result in loss of repeat orders or legal action for consequential losses and has undermined the confidence of the certification authorities in allowing full commercial exploitation of micropropagation in the multiplication of certified planting material.

Here, it will be demonstrated that manipulation of the culture vessel atmosphere under conditions of mixo- and auto-trophic culture results in plants with improved resistance to hyperhydricity and weaning stresses. Further, it will be shown that treatment with elicitors of pathogenesis-related proteins and inoculation *in vitro* and *in vivo* with PGPR and AMF, singly and in combination can improve both the weaning and field performance of microplants against biotic and abiotic stress, offering the prospect for an added-value product.

Plants *in vitro* may be subjected to many stresses from water logging to drought, from salt stress to photoinhibition. A common element in all these stresses is oxidative damage. It will be argued that oxidative stress may underlie somaclonal variation, but more relevant to micropropagation, may underlie tissue culture reinvigoration ('rejuvenation'). The ability to influence developmental processes by *in vitro* and *post vitrum* manipulations will be demonstrated and predictive parameters of microplant quality will be presented.

Inductie van uitdroogtolerantie bij somatische embryo's: Hoe speciaal is de beschermende rol van suikers?

Folkert A. Hoekstra, Elena A. Golovina, Frans A.A. Tetteroo and Willem F. Wolkers

Somatic embryo's zijn in het algemeen niet uitdroogtolerant. Ze kunnen echter tolerant gemaakt worden door hen vooraf te cultiveren in medium dat abscisinezuur (ABA) bevat, gevolgd door langzaam drogen. Snel gedroogde (binnen enkele uren) somatische embryo's zijn niet uitdroogtolerant. ABA leidt tot verlies van chlorofyll. Verder remt het de groei en verlaagt het de ademhalingsnelheid. In aanwezigheid van ABA blijven de met embryogenese samenhangende hoge suikergehalten gehandhaafd. Langzaam drogen leidt tot een gedeeltelijke omzetting van saccharose in oligosacchariden en tot de expressie van dehydrin transcripts. Langzaam gedroogde, uitdroogtolerante somatische embryo's bezitten stabiele membranen; de secundaire structuur van hun eiwitten blijft gehandhaafd, en hun cytoplasma is veranderd in een dicht gepakte, glasachtige matrix. Daarentegen verliezen snel gedroogde, uitdrooggevoelige embryo's een gedeelte van hun fosfolipiden, en het gehalte aan vrije vetzuren stijgt. Hun eiwitten

ondergaan enige denaturatie en aggregatie, en de glasmatrix wordt gekarakteriseerd door verminderde waterstofbinding. De geringe omzetting van saccharose in oligosacchariden lijkt de uitdroogschade niet te veroorzaken. In het geval dat ABA niet wordt toegepast, maar langzaam drogen wel, zijn er tekenen van eiwitdenaturatie, hetgeen kan worden toegeschreven aan lage suikergehalten.

We concluderen dat ABA hoge suikergehalten kan handhaven door het cellulaire metabolisme af te remmen. De suikers dragen bij aan de stabilisering van membranen en eiwitten, en maken deel uit van de glasmatrix. De daaropvolgende langzame droging verfijnt deze stabilisering.

Tijdens drogen verplaatsen amfifiele metabolieten zich vanuit het cytoplasma naar de membranen en kunnen daar leiden tot problemen zoals lekkage van ionen en instorting van de pH en elektrische gradienten. Wanneer het amfifiele antioxidanten betreft kan zo'n partitie gunstig zijn voor de bescherming van membranen. De onrust in de membranen lijkt effectief te worden gecontroleerd in uitdroogtolerante systemen, maar niet in uitdrooggevoelige systemen, waarvoor we denken dat dehydrins verantwoordelijk zijn. In deze context zal worden bediscussieerd hoe het mogelijk is dat in aanwezigheid van grote hoeveelheden suikers toch uitdrooggevoeligheid kan voorkomen.

Programmed Cell Death and 14-3-3 proteins in barley androgenesis

S.de Faria Maaraschin, S.B. de Pater, H. A.A.J. Korthout and M.Wang,
Center for Phytotechnology UL/TNO, Department of Applied Plant Sciences,
Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands, Tel: 31-715274914; Fax: 31-715274863; e-mail: Wang@voeding.tno.nl

As example of PCD in plant development, we studied cell fate in anther wall cells and microspores upon induction of embryogenesis. Intra-nucleosomal cleavage of DNA into fragments of about 200 bp was demonstrated to occur in developing anthers, in which microspores had developed into the mid-late to late uni-nucleate stage *in situ*, i.e. at the verge of mitosis. The same was observed, but to a much larger extent, if these anthers were pretreated by a hyper-osmotic shock. Pretreatment of anthers before the actual culture of microspores was required for optimal embryogenesis of microspores. The use of the TUNEL reaction revealed that DNA fragmentation mainly occurred in the loculus wall cells, tapetum cells and filament cells. Electron microscopy studies showed condensed chromatin in nuclei of loculus wall cells in the developing anthers. These observations at the chromatin and DNA level are known characteristics of programmed cell death (PCD). Moreover decrease of isoforme specific 14-3-3 protein was correlated with the death of anther wall cells. The 14-3-3 protein family is a family of regulatory proteins involved in diverse cellular processes. By binding their targets, 14-3-3 proteins are involved in signaling cascades and compartmentalization of proteins as well as regulation of enzymes of the primary metabolism. Expression of different 14-3-3 proteins during the induction of androgenesis may elucidate developmental switches of microspores. We demonstrated that there were different expressions and post-transcriptional modification of 14-3-3 proteins in embryogenic and non-embryogenic microspore.

Stress bij de overgang van weefselweek naar kas

Geert-Jan de Klerk

Weefselweek en Biotechnologie

Praktijkonderzoek Plant en Omgeving

Postbus 85, 2160 AB Lisse
tel: 0252-462130; e-mail: g.j.de.klerk@ppo.dlo.nl

Plantjes die in vitro groeien zijn aangepast aan de weefselkweekomstandigheden. Als ze uitgeplant worden, moeten ze zich aan de kasomstandigheden aanpassen. Toediening van beschermende stoffen (putrescine, proline of betaine) tijdens de weefselkweek helpt de plantjes om de stress bij uitplanten het hoofd te bieden. Omdat de omschakeling van heterotrofe naar autotrofe groei enkele dagen duurt, is het ook gunstig de plantjes voor het uitplanten extra suikers te laten opnemen.

Het grootste probleem bij veel gewassen is dat blaadjes die in weefselkweek gevormd zijn zeer slecht functionerende huidmondjes hebben. Dit leidt tot snel waterverlies. Om dit verlies te compenseren kan men de plantjes in vitro een wortelstelsel laten vormen en ze dan met wortel en al uit te planten. De in-vitro bewortelingsbehandeling veroorzaakt evenwel zelf stress. (1) Door de toediening van een hoge concentratie auxine wordt de synthese van ethyleen gestimuleerd waardoor dit gas accumuleert in weefselkweekcontainers. Dit probleem kan opgelost worden door zakjes met *Power Pellets* in de containers te plaatsen. *Power Pellets* zijn poreuze, met KMnO_4 gecoate zeoliet korrels die ethyleen oxideren. STS (zilverthiosulfaat, een stof die de werking van ethyleen tegengaat) is niet geschikt vanwege negatieve bijwerkingen. (2) De lange blootstelling aan een hoge concentratie auxine behelst stress. Om dit probleem te minimaliseren kan een relatief instabiel auxine gebruikt worden. (3) Een derde vorm van stress bij de bewortelingsbehandeling is de verwonding bij het afsnijden van het weefselkweekscheutje. De wondreactie houdt dedifferentiatie van cellen in die noodzakelijk is om adventieve wortelvorming te verkrijgen. Een te heftige wondreactie die veroorzaakt wordt door een relatief groot wondoppervlak en blootstelling aan zuurstof, kan tegengegaan worden door antioxidantia, bijv de fenolachtige verbinding ferulazuur