

19



Octrooiraad
Nederland

11 194191

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 940062

51 Int.Cl.7
A01H4/00

22 Ingediend: 13.01.1994

43 Ter inzage gelegd:
01.08.1995 I.E. 1995/15

44 Openbaargemaakt:
01.05.2001 I.E. 2001/05

47 Dagtekening:
04.09.2001

45 Uitgegeven:
01.11.2001 I.E. 2001/11

73 Octrooihouder(s):
Jan Hendrik Fondse te Reeuwijk.

72 Uitvinder(s):
Jan Hendrik Fondse te Reeuwijk

74 Gemachtigde:
Drs. F. Barendregt c.s. te 2280 GE Rijswijk.

54 Werkwijze voor het kweken van een plant uitgaande van een plantendeel.

Werkwijze voor het kweken van een plant uitgaande van een plantendeel

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het onder geschikte omstandigheden kweken van een plant door plaatsen van een plantendeel op een voedingsmedium met daarin opgenomen plantengroei
5 bevorderende hulpstoffen, waarbij het voedingsmedium bestaat uit meerdere voedingsmediumlagen met onderscheiden concentraties aan hulpstoffen.

Een dergelijke werkwijze voor het kweken van een plant uitgaande van een plantendeel is bekend uit NL-A-6914269.

Daarin worden met elkaar verenigde meerlaagse substraatbodems voor het kiemen en kweken van
10 planten uit respectievelijk zaden of stekjes beschreven. De afzonderlijke bodemlagen, die wat betreft samenstelling kunnen variëren, staan niet op zodanige wijze met elkaar in verbinding, dat stofuitwisseling tussen de lagen wordt belemmerd. Dergelijke substraatbodems hebben dan ook het nadeel, dat de
groeistoffen uit een bepaalde laag naar een aangrenzende laag kunnen diffunderen, zodat de op dergelijke
bodems groeiende plantjes niet optimaal van de juiste hoeveelheid voedingsstoffen worden voorzien.

15 De onderhavige uitvinding beoogt bovengenoemd nadeel op te heffen, en wordt daartoe gekenmerkt, doordat men op een drager meerdere gevormende stof bevattende visceuze voedingsmediumlagen op
elkaar afzet, waarbij de voedingsmediumlagen onderling gescheiden worden door separatiefilms en de
voedingsmediumlagen en eventueel ook de separatiefilms onderling verschillen in plantencelgroei, celdeling
en/of celdifferentiatie bevorderende hulpstoffen of in hun concentratie aan deze hulpstoffen, en dat op een
20 der voedingsmediumlagen van deze combinatie een plantenweefseldeel geplaatst wordt waarna wordt
gekweekt totdat uit het plantenweefseldeel ten minste wortels en een groeipunt gevormd zijn, waarbij de
zich ontwikkelende plant achtereenvolgens in verschillende voedingsmediumlagen doordringt. In eerste
instantie isoleren de separatiefilms de verschillende voedingsmediumlagen, zodat het groeiende plantendeel
door uitbreiding achtereenvolgens de juiste stimuli verkrijgt voor de callusvorming en de benodigde
25 celdifferentiatie. Na verloop van tijd zal ofwel het plantje door uitbreiding de separatiefilms breken ofwel
zullen de separatiefilms door het plantje worden opgelost. Indien in de separatiefilm bepaalde groeistoffen
zijn opgenomen zal bij oplossing van de film een kortdurende stimulus voor bijvoorbeeld celdifferentiatie
optreden. In al deze gevallen is het doel van de separatiefilms om de verschillende groeistoffen een
bepaalde tijd van elkaar en van het plantendeel te scheiden. Uiteindelijk kunnen de wortels de buitenste
30 separatiefilm bereiken en dringen dan eventueel door in de drager die kan bestaan uit een massa die
groeistoffen bevat voor de verdere ontwikkeling van de plaat.

In US-A-4.769.945 wordt beschreven dat een plantenweefseldeel in contact met een hydrogel dat
groeistoffen bevat, tot ontwikkeling wordt gebracht, waarbij de wortels uiteindelijk de buitenwand om het
hydrogel passeren en daardoor in contact komen met teelaarde waarin de houder met het hydrogel was
35 geplaatst. Na het doordringen in de teelaarde komt de plant tot verdere ontwikkeling.

In dit geval is het hydrogel niet in afzonderlijke lagen aanwezig waardoor een goede regulering van de
ontwikkeling van het plantenweefseldeel niet mogelijk is.

Voorts wordt nog gewezen op US-A-3.834.072 waarin een meerlaagse groeibodem voor het kweken van
planten wordt beschreven, waarbij de verschillende lagen polyurethaan bevatten en vast zijn. Hierbij wordt
40 de plant eerst gekweekt in een eerste groeibodem met een zeer klein volume. Wanneer deze groeibodem te
klein wordt voor de groeiende wortels, wordt de eerste groeibodem geplaatst in een tweede groeibodem met
groter volume waarin zich een holte bevindt waarin de eerste groeibodem precies past. Wanneer ook deze
combinatie van groeibodems te klein wordt voor de groeiende wortels wordt deze weer overgebracht in een
precies passende holte van een derde groeibodem met nog groter volume.

45 In dit geval hebben de verschillende lagen van de groeibodem een geheel andere samenstelling en
functie als volgens de onderhavige aanvraag.

Volgens de werkwijze van deze uitvinding kan men uitgaande van een plantenweefseldeel op gemakke-
lijke wijze snel en goedkoop onder optimale omstandigheden een goed gevormde plant kweken.

Volgens de werkwijze van deze uitvinding kan men door gebruik te maken van meerdere, onderling door
50 een separatiefilm gescheiden, voedingsmediumlagen waarin onderling verschillende plantencelgroei,
celdeling en/of celdifferentiatie bevorderende hulpstoffen voorkomen of de concentraties aan deze
hulpstoffen verschillen, uitgaande van een plantenweefseldeel, gemakkelijk een plant kweken.

Het vaststellen van de optimale combinatie van voedingsmedia kan eenvoudig plaatsvinden door een
groot aantal combinaties te vormen waarin de voedingsmedia van één combinatie ten opzichte van een
55 andere combinatie verschillen vertonen in concentraties aan en/of vormen van plantencelgroei en/of
celdifferentiatie bevorderende hulpstoffen.

In de praktijk bestaat grote vraag naar een werkwijze waarbij men uitgaande van een plantenweefseldeel

gemakkelijk een plant kan kweken, ook wanneer slechts een beperkte afzetmogelijkheid voor een dergelijke plant bestaat.

Voorbeelden van dergelijke planten zijn sierteeltplanten bijvoorbeeld Clematis en Pernettya, welke planten men tot nu toe door stekken vermeerderd.

- 5 Bij de werkwijze volgens de uitvinding geschikte plantenweefseldelen kunnen verkregen worden uit blad, stengel, wortel, bloem en dergelijke van een plant. Ook kan een meristeemweefsel gebruikt worden.

Een plantenweefseldeel kan doelmatig gevormd worden door uitsnijden uit een blad van een plant, die kan behoren tot het genus Clematis, Pernettya of tot een andere sierplant.

- 10 De uitvinding zal nu worden toegelicht aan de hand van een uitvoeringsvoorbeeld met behulp van de tekening waarin:

figuur 1 een uitvoeringsvorm toont bij het begin van de werkwijze volgens de uitvinding;

figuur 2 een verticale doorsnede van een uitvoeringsvorm van de werkwijze na celdeling en celdifferentiatie van een plantenweefseldeel;

- 15 figuur 3 een installatie voor het vervaardigen van inrichtingen voor het kweken van planten volgens de uitvinding, en

figuur 4 een aanzicht van een andere installatie voor het kweken van planten volgens de uitvinding.

- In figuren 1 en 2 is een kunststofhouder 16 weergegeven, gedeeltelijk gevuld met een massa 23 van
20 minerale vezels, zoals steenwol. Deze massa 23 bevat groeistoffen voor de verdere ontwikkeling van een plant.

Boven op de massa 23 van minerale vezels is een combinatie geplaatst van de volgende concentrisch aangebrachte lagen.

- 25 Centraal gelegen is een eerste bolvormige voedingsmediumlaag 21 van agar met bijvoorbeeld Murashige-Skoog medium en eventueel plantengroeihormonen zoals auxinen, vitaminen en/of antibiotica.

In dit verband wordt verwezen naar "Biotechnology" (1993), University of Greenwich, blz. 45.

- 30 Concentrisch daaromheen aangebracht bevindt zich een bolvormige tweede voedingsmediumlaag 20 bestaande uit een vaste agarbodem waarin eveneens een medium is opgenomen met eventueel andere groeibevorderende hulpstoffen, zoals in het bijzonder orgaanvorming bevorderende hulpstoffen. In het tweede vaste voedingsmediumlaag 20 zijn in het bijzonder wortelvorming bevorderende hulpstoffen opgenomen.

De eerste 21 en tweede 20 voedingsmediumlaag zijn van elkaar gescheiden door een separatiefilm 29 gevormd uit een gomhars, vet en een was, in welke separatiefilm 29 eveneens plantengroeihormonen kunnen zijn opgenomen.

- 35 Volgend op het tweede voedingsmediumlaag 20 ziet men een bolvormige derde voedingsmediumlaag 19 bestaande uit eveneens een vaste agarbodem waarin andere orgaanvorming bevorderende hulpstoffen, in het bijzonder groeipuntenvorming bevorderende hulpstoffen, zijn opgenomen. Deze zijn aan de deskundigen algemeen bekend.

- 40 De tweede vaste voedingsmediumlaag en de derde vaste voedingsmediumlaag zijn ook weer gescheiden door een separatiefilm 28 gevormd uit gomhars, vet en was waarin plantengroeihormonen zijn opgenomen.

De derde voedingsmediumlaag 19 is eveneens van de steenwolmassa 23 gescheiden door een separatiefilm 31.

- 45 De verschillende voedingsmediumlagen 19, 20 en 21 zijn opgebouwd uit agaroplossingen van verschillende viscositeit. Bij gebruik van oplossingen van verschillende viscositeit verkrijgt men bijzonder goede resultaten wat betreft de ontwikkeling van een plant uitgaande van een plantweefseldeel.

Het spreekt vanzelf dat men in plaats van drie voedingsmediumlagen ook nog meer voedingsmediumlagen kan gebruiken die concentrisch aansluiten op de weergegeven drie voedingsmediumlagen 19, 20 en 21.

- 50 Na plaatsen van een plantenweefseldeel 22, bijvoorbeeld een klein stukje blad van Pernettya op de eerste vloeibare voedingsmediumlaag 21, waarbij de houder 16 vervolgens wordt geplaatst in een ruimte met een gunstige temperatuur en vochtigheid, treedt callusvorming 27 op onder opname en verbruik van voedingsstoffen waarbij door celdeling bladgedeelte zich verder uitbreidt naar de tweede voedingsmediumlaag 20, waar zich aan het uitbreidende weefsel wortels 24 gaan vormen.

- 55 Vervolgens breidt het groeiende plantendeel zich uit over en in de derde voedingsmediumlaag 19, welke derde voedingsmediumlaag de ontwikkeling van groeipunten bevordert. Deze groeipunten zijn in figuur 2 schematisch weergegeven met verwijzingscijfer 26.

Vervolgens treedt bij verdere celdeling de omtrek 25 van het groeiende plantendeel buiten de derde

voedingsmediumlaag en komt terecht op en in de massa 23 van steenwol, die groeistoffen bevat voor de ontwikkeling van het plantje. Het dan ontstane door celdeling uitgezette plantendeel is weergegeven als 22' in figuur 2.

Het is vanzelfsprekend ook mogelijk om te werken met een eerste 21 en slechts één tweede voedingsmediumlaag 20 die dan orgaanvorming bevorderende hulpstoffen voor de vorming van wortels en groeipunten bevat.

Figuur 3 toont een installatie voor het vervaardigen van inrichtingen voor het kweken van een plant. Deze installatie omvat een ondersteuning 18 en een ruimte met geregelde temperatuur en vochtigheid 15. Op ondersteuning 18 is een tray geplaatst met meerdere houders 16 elk gevuld met steenwol 23, die groeistoffen bevat voor de ontwikkeling van het plantje. Ter vereenvoudiging is slechts een houder 16 weergegeven.

De inrichting kan eveneens een snijorgaan 12 omvatten voor het uitsnijden van een weefseldeel uit een blad van een plant, zoals Clematis of Pernettya.

In derde agarmediumvoorraadhouder 3 is een vloeibaar agarmedium aanwezig dat door middel van afsluiter 39 in een, via lijn 7, door een computer 17 gestuurde hoeveelheid in een houder met een van fijne openingen voorziene bodem 30 wordt afgegeven. De openingen zijn van een dusdanige afmeting dat het medium er niet doorheen stroomt. De met de computer verbonden lijnen zijn als stippellijnen weergegeven.

Uit een derde hulpstofvoorraadhouder 6 wordt een groeipuntvorming bevorderende hulpstof aan de vloeibare agar massa op bodem 30 toegevoegd met behulp van een spuit 32, welke spuit analoog aan een inktjetorgaan kan zijn uitgevoerd. De via spuit 32 toegevoegde hoeveelheid hulpstoffen wordt geregeld door computer 17 via lijn 35.

Een agarmedium op bodem 30 wordt hierop gelijkmatig gemengd met behulp van een rakel.

Voor het vormen van een derde separatiefilm is een derde separatiefilmstofvoorraadhouder 14 aanwezig waarin hulpstoffen kunnen worden opgenomen. Een separatiefilmspuitorgaan 13 zorgt voor de afzetting van separatiefilm 31 op de wand van een in de steenwol 23 aanwezige uitholling 10.

Na werking van filmspuitorgaan 13 treedt een drukorgaan 38 in werking om het derde voedingsmedium 19, gevormd uit de agar massa uit derde voorraadhouder 3 en hulpstoffen aangevoerd via spuit 32, voor de fijne openingen van bodem 30 te persen waardoor voedingsmediumlaag 19 op separatiefilm 31 wordt afgezet. Vervolgens wordt boven de houder 16 een tweede agarmediumvoorraadhouder 2 geplaatst, en tevens een tweede hulpstofvoorraadhouder 5, die andere hulpstoffen bevat dan hulpstofvoorraadhouder 6, in het bijzonder wortelvorming bevorderende hulpstoffen. De agar massa uit voorraadhouder 2 en wortelvorming bevorderende stoffen uit tweede voorraadhouder 5 worden eveneens op een van openingen voorziene bodem 30' aangebracht en gemengd door een rakel.

Dosering van agar massa uit tweede voorraadhouder 2 wordt geregeld via een door computer 17 en lijn 8 gestuurde afsluiter 39' en hulpstoffen uit tweede hulpstof voorraadhouder 5 toegevoerd via het via lijn 36 computergestuurde inktjetorgaan 33.

Een tweede separatiefilmspuitorgaan 13' brengt een tweede separatiefilmstofvoorraadhouder 14' op een derde voedingsmediumlaag 19 een tweede separatiefilm 28 aan waarin hulpstoffen zijn opgenomen. Vervolgens wordt door middel van een drukorgaan 38' een tweede voedingsmediumlaag 20 op genoemde tweede separatiefilm 28 geparst.

Vervolgens wordt eerste agarvoorraadhouder 1 en separatiefilmspuitorgaan 13" verbonden met eerste separatiefilmstofvoorraadhouder 14" boven houder 16 geplaatst.

Via een door computer 17 en lijn 9 gestuurde afsluiter 39" wordt vloeibaar agarmedium op een bodem 30" aangebracht, evenals hulpstoffen uit eerste hulpstofvoorraadhouder 4 met behulp van een spuit 34 die via lijn 37 gestuurd wordt door computer 17.

Uit een eerste separatiefilmstofvoorraadhouder 14" wordt separatiefilmstof voor het vormen van eerste separatiefilm 29 op tweede voedingsmediumlaag 20 aangebracht met behulp van separatiefilmspuitorgaan 13". Vervolgens wordt door middel van een drukorgaan 38" een eerste voedingsmediumlaag 21 op genoemde eerste separatiefilm 20 geparst.

Na vorming van de concentrisch op elkaar aangebrachte drie voedingslagen 19, 20 en 21, begrensd en gescheiden door separatiefilms 31, 28 en 29 wordt door middel van een snijorgaan 12 uit een blad van een Pernettya een weefseldeel 22 gesneden.

Bij de houder 16 met daarin aanwezig de combinatie van de concentrisch op elkaar gelegen eerste, tweede en derde voedingsmediumlagen 21, 20 en 19 in de toestand weergegeven met verwijzingscijfer 16' wordt het weefseldeel uit het blad van Pernettya van bijvoorbeeld 1 mm² bovenop het eerste voedingsmedium laag 21 aangebracht.

Vervolgens wordt de houder getransporteerd naar de ruimte 15 met geregelde temperatuur en vochtigheid waar het weefseldeel onder invloed van de geprogrammeerde media celdeling en/of celdifferentiatie

ondergaat.

Na het bereiken van de toestand als weergegeven in figuur 2 kan men het geheel nog in de ruimte 15 houden doch dit is niet meer noodzakelijk. Afvoer uit de ruimte 15 kan plaatsvinden door een transportband.

Om de agarmediavoorraadhouders 3, 2 en 1 achtereenvolgens boven een houder 16 te plaatsen zijn 5 deze voorraadhouders met bijbehorende apparatuur bevestigd op een rijdbaar portaal en staat de houder 16 op een vaste plaats.

Het is natuurlijk ook mogelijk de houder 16 te verplaatsen en de mediavoorraadhouders 3, 2 en 1 met bijbehorende apparatuur in een vaste stand te houden.

10 Via de inktjetorganen kunnen gedoseerde hoeveelheden hulpstoffen zoals auxinen, gibberellinen, cytokininen of synthetische groeiregulerende stoffen aan een agarmedium uit een voorraadhouder 1, 2 of 3 worden toegevoegd. Ook kunnen genoemde stoffen worden toegevoegd aan de separatiefilms.

In een separatiefilm bevinden zich hulpstoffen van hetzelfde type als die welke aanwezig zijn in het daaronder liggende medium.

15 Het is ook mogelijk om de hulpstoffen op te nemen tussen twee dunne laagjes agar die direct op een separatiefilm aansluiten, zonder opname van hulpstoffen in een separatiefilm.

In figuur 4 wordt schematisch aangegeven dat meerdere eenheden 41 zoals weergegeven in figuur 3 elk met voorraadhouders 1, 2 en 3 en bijbehorende inrichtingen opgehangen zijn aan een rijdend portaal 42 dat zich in een richting, die in de figuur loodrecht op het papier is, over een tray 40 kan bewegen.

20 De tray 40 is geheel gevuld met kunststofhouders 16 die gevuld zijn met een massa 23 van steenwol dat groeistoffen bevat, en die een uitholling bezitten voor het aanbrengen van separatiefilms en voedingsmediumlagen. Deze kunststofhouders bevinden zich ook op de tray in de richting loodrecht op het papier van figuur 4.

Elke eenheid 41 verschilt van de andere eenheden 41 in de samenstelling en/of volume van de voedingsmediumlagen en/of de samenstelling van de separatiefilms die de houders 16 worden aangebracht.

25 Bij de beweging met het portaal 42 kunnen in de eenheden 41 ook wijzigingen worden aangebracht. Op deze manier kunnen een groot aantal houders 16' met uiteenlopende voedingsmediumlagen en/of separatiefilms verkregen, waardoor de duur van het bepalen de optimale combinatie van voedingsmediumlagen voor het kweken van een bepaalde plant kan worden verkort.

30

Conclusies

1. Werkwijze voor het onder geschikte omstandigheden kweken van een plant door plaatsen van een plantendeel op een voedingsmedium met daarin opgenomen plantengroei bevorderende hulpstoffen, waarbij 35 het voedingsmedium bestaat uit meerdere voedingsmediumlagen met onderscheiden concentraties aan hulpstoffen, met het kenmerk, dat men op een drager meerdere gelvormende stof bevattende visceuze voedingsmediumlagen op elkaar afzet, waarbij de voedingsmediumlagen onderling gescheiden worden door separatiefilms en de voedingsmediumlagen en eventueel ook de separatiefilms onderling verschillen in plantencelgroei, celdeling en/of celdifferentiatie bevorderende hulpstoffen of in hun concentratie aan deze 40 hulpstoffen, en dat op een der voedingsmediumlagen van deze combinatie een plantenweefseldeel geplaatst wordt waarna wordt gekweekt totdat uit het plantenweefseldeel ten minste wortels en een groeipunt gevormd zijn, waarbij de zich ontwikkelende plant achtereenvolgens in verschillende voedingsmediumlagen doordringt.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de voedingsmediumlagen in hun eindtoestand 45 onderling in viscositeit verschillen.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het plantenweefseldeel verkregen is door uitsnijden uit een blad van een plant.

4. Werkwijze volgens één of meer der voorafgaande conclusies, met het kenmerk, dat een eerste voedingsmediumlaag waarop een explantaat geplaatst wordt, met callusvorming samenhangende, celdeling 50 bevorderende hulpstoffen bevat;

dat een hierop aansluitend tweede voedingsmediumlaag, die is gescheiden van de eerste voedingsmediumlaag door een separatiefilm, al dan niet met hulpstoffen, wortelvorming bevorderende hulpstoffen bevat;

55 dat een hierop aansluitend derde voedingsmediumlaag, die is gescheiden van de tweede voedingsmediumlaag door een separatiefilm al dan niet met hulpstoffen, uit een gelvormig medium bestaat dat groeipuntvorming bevorderende hulpstoffen bevat.

5. Werkwijze volgens één of meer der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de voedingsmedium-

lagen zich bolsectorvormig concentrisch om elkaar uitstrekken.

6. Werkwijze volgens één of meer der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat men de combinatie van voedingsmediumlagen aanbrengt op een drager van vast poreus groeimedium, in het bijzonder bestaande uit minerale vezels, dat plantontwikkelingsgroeistoffen en/of vitaminen bevat.
- 5 7. Werkwijze volgens één of meer der voorgaande conclusies, waarbij men meerdere voedingsmedia vervaardigt, met het kenmerk, dat men ten minste de concentratie van één of meer hulpstoffen en/of de viscositeit van één of meer voedingsmediumlagen varieert, teneinde een optimaal voedingsmedium voor het kweken van de plant uit het plantendeel te selecteren.
8. Werkwijze voor het vervaardigen van een voedingsmedium voor het kweken van een plant uit een
- 10 plantendeel, volgens een van de conclusies 1-6, met het kenmerk, dat telkens afwisselend een separatiefilm in vloeibare vorm op de houder respectievelijk op een zich daarin bevindende voedingsmediumlaag wordt gesproeid en een voedingsmedium vanuit een houder in vloeibare vorm als een laag op een van fijne openingen voorziene plaat wordt gebracht, waarna de laag door een drukorgaan door de openingen van de plaat wordt gedrukt en daardoor als een voedingsmediumlaag op een zich in de houder bevindende
- 15 separatiefilm wordt gebracht.
9. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat men de hulpstoffen aan de voedingsmediumlaag op de plaat toevoegt, voordat de laag door de plaat wordt gedrukt en daardoor op de houder wordt gebracht.

Hierbij 3 bladen tekening

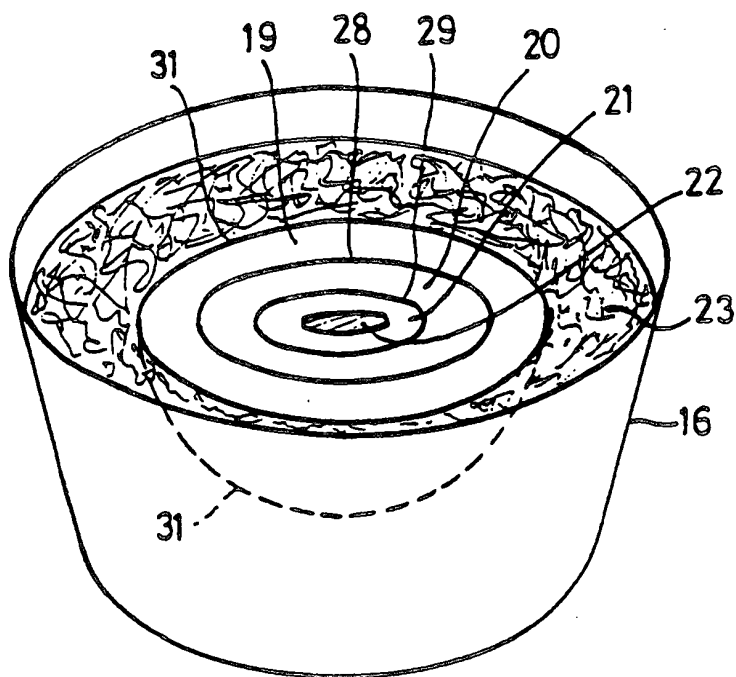


FIG. 1.

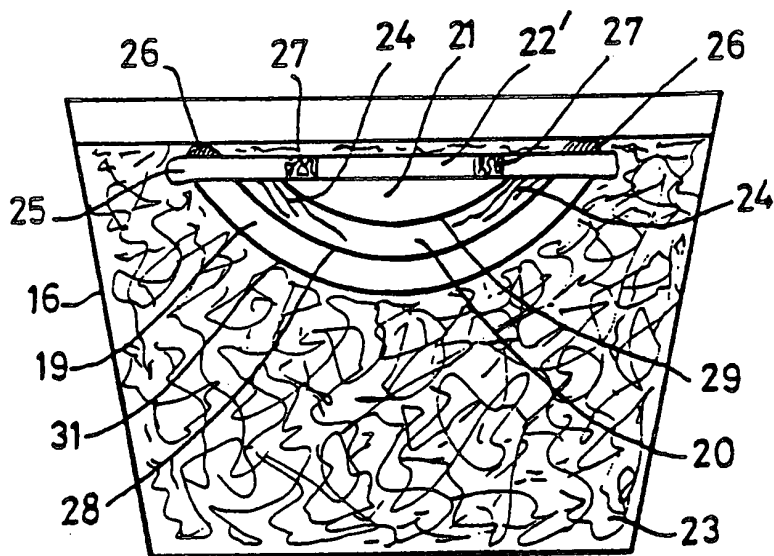
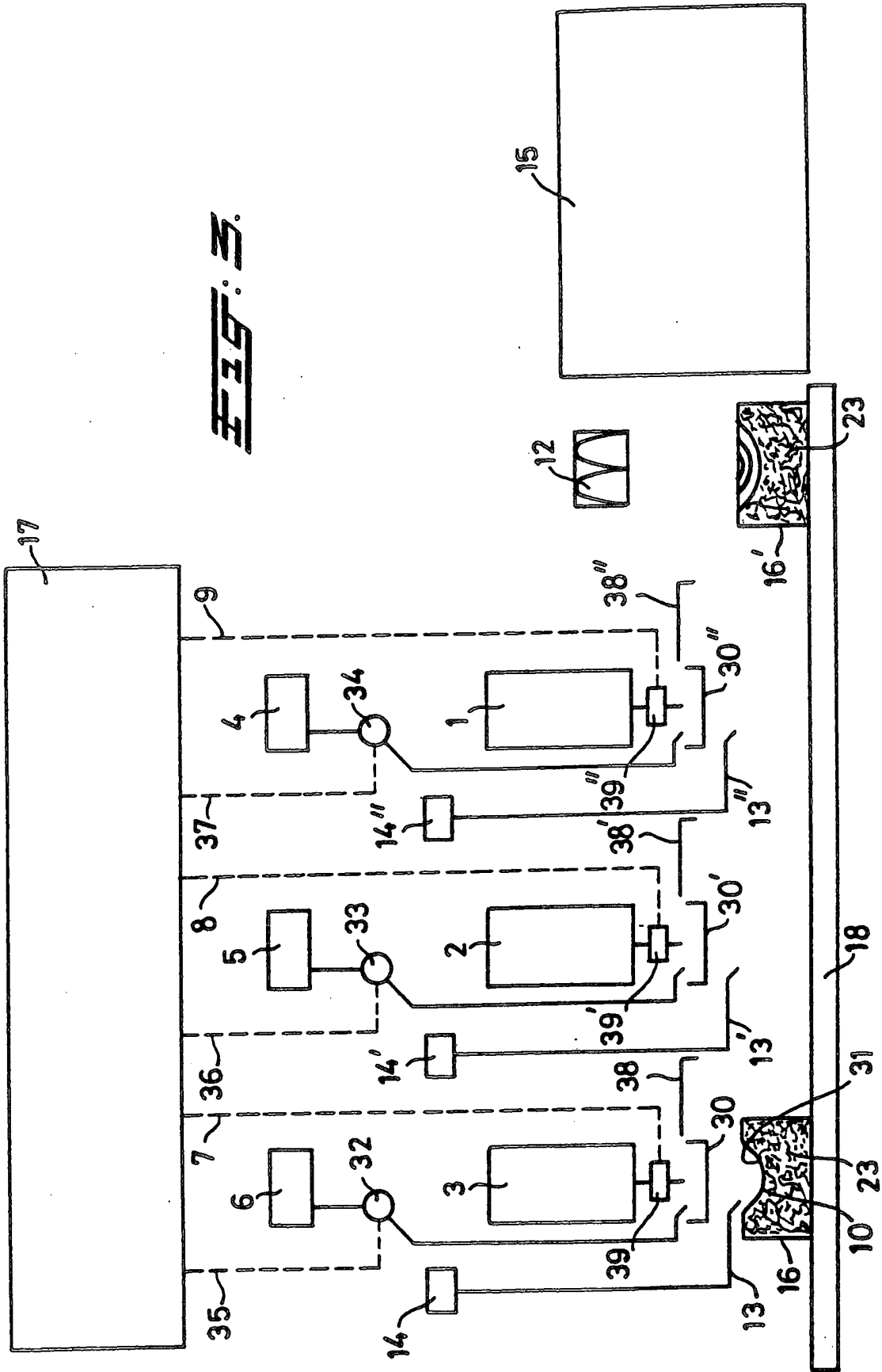


FIG. 2.

FIG. 3.



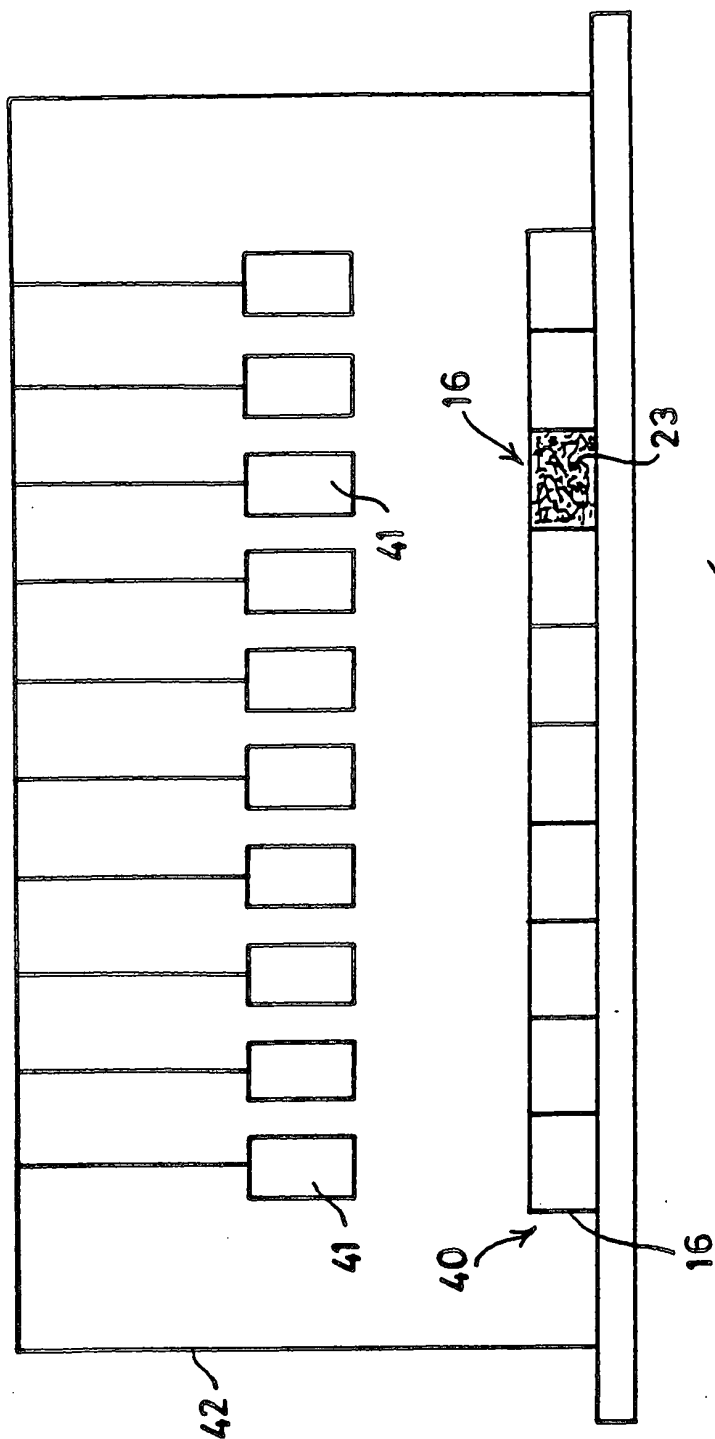


FIG. 4.