



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie



**EVALUATIE VAN DE WATEREFFICIËNTIE
VAN *MUSA* VARIËTEITEN BIJ DROOGTE
IN EEN LABOMODEL**

Sarah Schurgers

Promotoren:

Prof. Sebastien Carpentier

Laboratorium voor
Tropische Plantenteelt

Dr. Tony Remans

Hogeschool PXL

The logo for KU Leuven, consisting of the text 'KU LEUVEN' in white, bold, sans-serif font, centered within a dark blue rectangular box with a light blue border.



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie



EVALUATIE VAN DE WATEREFFICIËNTIE VAN *MUSA* VARIËTEITEN BIJ DROOGTE IN EEN LABOMODEL

Sarah Schurgers

Promotoren:

Prof. Sebastien Carpentier

Laboratorium voor
Tropische Plantenteelt

Dr. Tony Remans

Hogeschool PXL

The logo for KU Leuven, consisting of the text 'KU LEUVEN' in white, bold, sans-serif font, centered within a dark blue rectangular box with a light blue border.

Voorwoord

Deze thesis vormt de afsluiter van mijn bacheloropleiding Agro- en Biotechnologie aan de Hogeschool PXL. Graag zou ik mijn bedrijfspromotor Prof. Sebastien Carpentier willen bedanken voor de kans om stage te mogen lopen aan het Laboratorium voor Tropische Plantenteelt, mee te mogen meewerken aan dit boeiende project en voor zijn begeleiding doorheen dit proces. Ook wil ik bij deze mijn PXL-promotor, Dr. Tony Remans bedanken voor zijn hulp om mijn thesis tot een goed einde te brengen.

Verder zou ik graag mijn begeleidsters, Edwige Adre en Lut Ooms van het labo bedanken om me op elk vlak mogelijk bij te staan en voor de talrijke goede raad die zij mij hebben gegeven. Ook wil ik Jelle van Wesemael en Ewaut Kissel bedanken voor de begeleiding bij het uitwerken van de thesis.

Als laatste kan ik natuurlijk mijn familie en vrienden niet vergeten die mij gesteund hebben doorheen deze opleiding en natuurlijk deze thesis, ups en downs inbegrepen.

Samenvatting

Droogte is één van de grootste abiotische beperkingen bij de productie van bananen, die zeer water behoevend zijn. Door de recente klimaatsveranderingen is er in de regio's waar bananen geteeld worden minder water beschikbaar, wat de groei en de opbrengst van bananenplanten vermindert. In deze thesis wordt een evaluatie gedaan van de waterefficiëntie bij *Musa* variëteiten bij droogte in een labomodel. De variëteiten die getest zijn in deze thesis zijn: Cachaco, Fougamou, Namwa Khom, Grand Naine, Dole, Giant Cavendisch en Mbwazirume, waarvan alleen Cachaco en Dole verder worden uitgewerkt. Dit omdat Cachaco en Dole hetzelfde genotype (ABB) hebben en er wordt gekeken of deze dan ook hetzelfde fenotype hebben.

De planten worden opgekweekt in hydrocultuur met hydroponics medium en na 7 weken wordt er gestart met de transpiratieproeven. Hierbij wordt een testvariëteit samen met Cachaco, de controle variëteit op balansen gezet die elke 10s het gewicht registreren gedurende 6 dagen. Bij afloop van de transpiratieproef wordt er een afdruk gemaakt van de onderkant van het laatst en voorlaatst gevormd blad om hiervan het aantal cellen en stomata te tellen en hiermee de stomatale dichtheid te bepalen.

Uit deze resultaten werd vastgesteld dat er een significantie daling is in transpiratie bij stress Cachaco ten opzichte van controle Cachaco. Bij Dole was er geen significant verschil in transpiratie tussen stress en controle. Wel was er een significant verschil tussen de variëteiten zelf. Het aantal cellen en stomata bleef bij Cachaco gelijk voor zowel behandeling als het blad. Bij Dole was er een verschil waarneembaar tussen het laatst en voorlaatst gevormd blad voor beide behandelingen. Ook was er geen significant verschil in stomatale dichtheid tussen de variëteiten, behandeling en de bladeren.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat Cachaco en Dole niet hetzelfde fenotype hebben. Dole heeft namelijk een lagere transpiratie dan Cachaco en Dole past zijn transpiratie niet aan in de aanwezigheid van droogte, wat Cachaco wel doet.

Inhoudstafel

Voorwoord	2
Samenvatting	3
Inhoudstafel	4
Lijst met afkortingen	6
1 Inleiding.....	7
2 Literatuurstudie.....	8
2.1 Banaan.....	8
2.1.1 Belang van banaan	8
2.1.2 Morfologie.....	9
2.1.3 Variëteiten in test.....	9
2.2 Droogte	10
2.3 Transpiratie	10
2.4 Stomata	11
2.5 Methoden voor registratie transpiratie	11
3 Materialen en methoden	12
3.1 Proefopzet.....	12
3.2 Flowschema.....	13
3.3 Bereiding stockoplossingen.....	14
3.3.1 Materialen.....	14
3.3.2 Methoden.....	15
3.4 Bereiding hydroponics (HP) medium + PEG medium.....	16
3.4.1 Materialen.....	16
3.4.2 Methoden.....	18
3.5 Transpiratieproef.....	19
3.5.1 Materialen.....	20
3.5.2 Methoden.....	21
3.6 Stomatatelling	24
3.6.1 Materialen.....	24
3.6.2 Methoden.....	24
4 Resultaten	26
4.1 Resultaten transpiratieproef Cachaco en Dole	26
4.1.1 Genormaliseerde transpiratie	27
4.1.2 Overzicht transpiratie.....	28

4.1.3	Dageffect op transpiratie	29
4.1.4	Transpiratie op het einde van de dag	30
4.1.5	Lengte maximale transpiratie	31
4.2	Resultaten stomatatelling Cachaco en Dole	31
4.2.1	Resultaten aantal cellen Cachaco en Dole	32
4.2.2	Resultaten aantal stomata Cachaco en Dole	33
4.2.3	Resultaten stomatale densiteit Cachaco en Dole	34
5	Discussie	35
6	Besluit.....	36
	Literatuurlijst.....	37
	Figurenlijst.....	39
	Tabellenlijst	40
	Bijlagen	41
	Bijlage 1: staaloverzicht A15	41
	Bijlage 2: Staaloverzicht A16	43

Lijst met afkortingen

ABA	abscisinezuur
HP medium	Hydroponics medium
g	Gram
ITC	The Bioversity International Musa Germplasm Transit Centre
l	liter
min	minuten
PEG	polyethyleenglycol
s	seconde

1 Inleiding

Bananen maken een groot deel uit van de kleinschalige landbouw in (sub)tropische ontwikkelingslanden en dienen als voedzaam basisvoedsel voor de mensen in deze regio's. Klimaatsveranderingen hebben er echter voor gezorgd dat er minder water beschikbaar is voor de teelt van bananenplanten. Hierdoor daalt de groei en de uiteindelijke opbrengst van deze planten. Het gevolg hiervan is dat de boeren het meeste van hun inkomen verliezen en dat er honger ontstaat door het verlies aan basisvoedsel.

In deze thesis, die wordt uitgevoerd in het kader van de opleiding Agro- en Biotechnologie bij het Laboratorium voor Tropische Plantenteelt, wordt er een evaluatie uitgevoerd op de waterefficiëntie van bananenplanten (*Musa*) bij droogtestress in een labomodel. Hiermee wordt er geprobeerd variëteiten te vinden die beter tegen droogtestress kunnen en die dan later door de boeren gebruikt kunnen worden om zo het verlies te minimaliseren.

Bij de transpiratieproef wordt de waterefficiëntie van de bananenplanten geëvalueerd door de transpiratie van de planten te meten gedurende 6 dagen bij controle en stress (droogte) condities. Dit wordt gedaan door de planten op precisiebalansen te zetten die om de 10s het gewicht registreren. Met deze resultaten wordt dan een vergelijking gemaakt tussen de transpiratie bij controle condities en de transpiratie bij stress condities waaruit de waterefficiëntie van de variëteit bij droogte kan worden afgeleid. Ook wordt de transpiratie vergeleken met een controlevariëteit (Cachaco) om zo een idee te krijgen van de waterefficiëntie tussen variëteiten.

Op het einde van de transpiratieproef wordt er ook een afdruk gemaakt van de onderkant van het laatst en voorlaatst gevormd blad om een mogelijk verschil in aantal cellen en stomata, en stomatale dichtheid waar te nemen.

In deze thesis wordt de vergelijking gemaakt tussen Cachaco, de controle variëteit en Dole. Deze variëteiten hebben beide het genotype ABB en er wordt via bovenstaande parameters getest of deze ook hetzelfde fenotype hebben en hoe ze op droogte reageren.

2 Literatuurstudie

2.1 Banaan

Banaan is een monocotyl die behoort tot het genus *Musa* [1]. De meeste eetbare bananen behoren tot de Eumusa sectie en zijn diploïd of triploïd [2].

De domesticatie van de banaan is tot stand gekomen door hybridisatie van twee wilde diploïde species, *Musa accuminata* (AA genoomsamenstelling) en *Musa balbisiana* (BB genoomsamenstelling) [3].

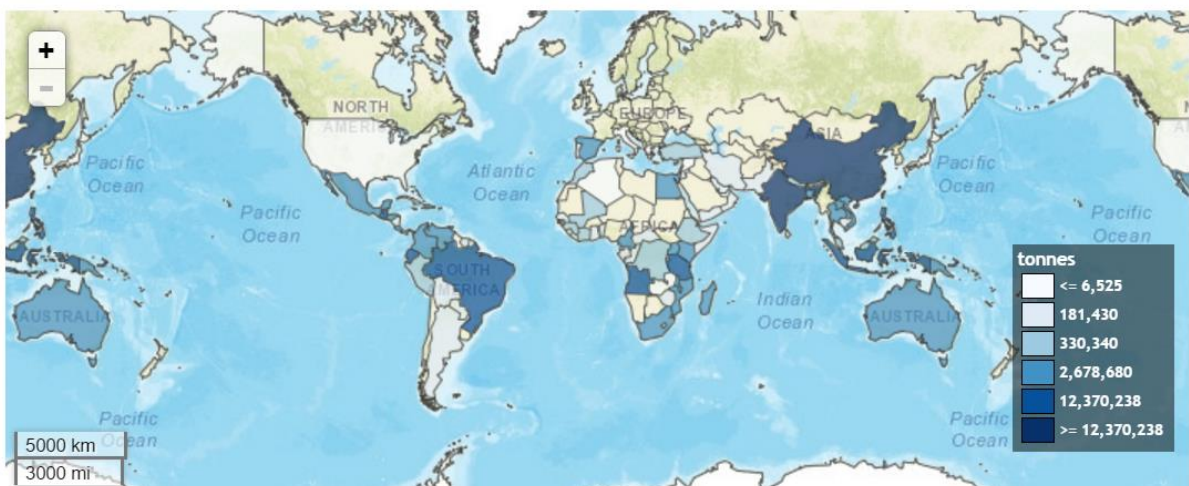
Een gevolg van deze hybriden was onregelmatige meiose, waardoor er occasioneel diploïde gameten werden gevormd. De fusie van deze diploïde gameten met haploïde gameten bracht steriele triploïde genotypes voort. Bij spontane triploïdisaties zijn bijna alle diploïde cultivars betrokken, die door vegetatieve vermeerdering geleid hebben tot de diversiteit van de moderne gekweekte triploïde bananen met een AAA, AAB of ABB genoomsamenstelling [2] [3].

De commercieel geteelde bananen variëteiten zijn triploïd met een AAA genoomsamenstelling. Deze zijn zoet van smaak en zeer geschikt voor onrijp transport [3].

2.1.1 Belang van banaan

Bananen zijn van groot belang voor kleinschalige landbouw in tropische en subtropische ontwikkelingslanden. Het gewas kan worden geteeld in een range van milieus en productiesystemen en biedt voedsaam basisvoedsel en een significante bron van inkomen het hele jaar door [4].

In 2013 is er in de wereld meer dan 100 miljoen ton bananen en bakbananen geproduceerd. Zoals te zien in figuur 1 wordt dit gewas vooral geteeld in de zuidelijke helft van de wereld [5]. Zo'n 87% van deze bananen wordt geteeld door kleinschalige boeren voor eigen consumptie en verkoop in lokale markten. De overige 13% van de bananen wordt geëxporteerd naar de rest van de wereld [6].



Figuur 1: Hoeveelheid bananen geproduceerd in de wereld in 2013 [5]

2.1.2 Morfologie

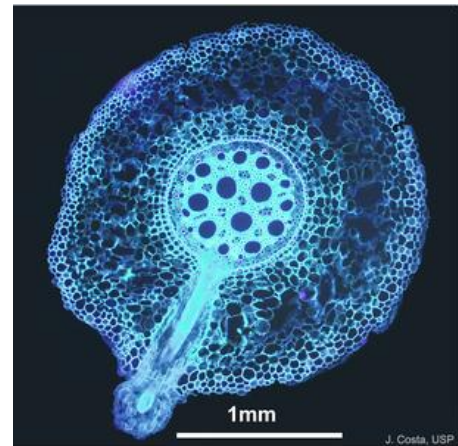
De bananenplant is een boomachtig kruid. Nadat een plant bananen heeft voortgebracht, wordt deze omgehakt tot op de grond. Hierna wordt de dode plant vervangen door een uitloper die groeit uit het rhizoom [7] [8].

Morfologisch bestaat de bananenplant uit verschillende delen.

2.1.2.1 Het wortelsysteem

De belangrijkste functie van het wortelsysteem is om water en nutriënten uit de plant op te nemen.

De wortels worden gemaakt uit een ondergrondse structuur, het rhizoom wat de echte stam van de bananenplant is. Op figuur 2 een doorsnede van een wortel te zien waaruit een zijdelingse wortel groeit [7].



Figuur 2: Doorsnede bananenwortel waaruit een zijdelingse wortel groeit [7]

2.1.2.2 Het rhizoom

Het rhizoom is de echte stam van de bananenplant. Deze wordt gekenmerkt door horizontale ondergrondse groei, de productie van wortels en klonale planten. Het apicale meristeem, waaruit de bladeren worden gevormd, is het terminale groeipunt van het rhizoom [7].

2.1.2.3 De pseudostam

Het deel van de plant dat lijkt op de stam is eigenlijk niet de echte stam maar een valse, vandaar de naam pseudostam. De pseudostam wordt gevormd door de dicht opeengepakte en overlappende bladscheden en groeit naarmate er meer bladeren gevormd worden [7].

2.1.2.4 Het blad

Een nieuw gevormd blad verschijnt in het midden van de pseudostam als een opgerolde cilinder, een sigaar genaamd zoals te zien op figuur 3.



Figuur 3: Een nieuw gevormd blad in de vorm van sigaar [7]

De bladeren zijn de voornaamste fotosynthese organen van de plant [7].

2.1.3 Variëteiten in test

Er zijn in totaal zeven variëteiten die zijn getest in de transpiratieproef, namelijk Cachaco (ABB) die als controlevariëteit wordt gebruikt, Fougamou (ABB), Namwa Khom (ABB), Grand Naine (AAA), Dole (ABB), Giant Cavendish (AAA) en Mbwazirume (AAA).

2.2 Droogte

Het gebrek aan water is een groot probleem voor de algemene landbouw. Zo beïnvloedt het 28% van de bodems in de wereld met slecht waterhoudend vermogen tot gevolg. Droogte in de landbouw wordt gedefinieerd als het gebrek aan water in de wortelzone, resulterend in een verminderde gewasopbrengst [9].

Bij banaanproductie is droogte één van de grootste abiotische beperkingen omdat bananen namelijk een grote behoefte aan water hebben. Zo hebben ze per week minstens 25 liter water per m² nodig en 2000-2500 liter water per m² per jaar. Deze voorwaarde heeft vooral betrekking op de tropische en subtropische regio's van de wereld waar de meeste banaanproductie gebeurt [1].

Wanneer er droogte optreedt, produceren de wortels signalen (het hormoon ABA) die de stomata doen sluiten om zo de plant gehydrateerd te houden. Hierdoor gaat echter ook de koolstofassimilatie en bijgevolg ook de opbrengst verminderen [10].

2.3 Transpiratie

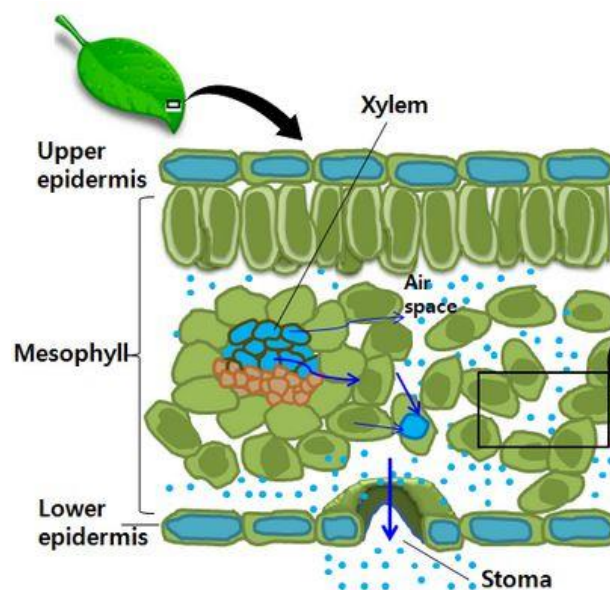
In de bladeren bevinden zich interne luchtruimtes die de mesofiele cellen in contact laten komen met koolstofdioxide die nodig is voor de fotosynthese. De lucht in deze ruimten is verzadigd met waterdamp die via de stomata in contact komt met de (meestal) drogere buitenlucht. Het water gaat dan door middel van diffusie doorheen de stomata naar buiten, zoals te zien op figuur 5 en wordt dan opnieuw aangevuld door het xyleem vanuit de wortels. Dit proces wordt transpiratie genoemd [11].

Door transpiratie koelt een plant af, kan het nutriënten uit de bodem halen en kunnen koolstofdioxide en water worden genomen via de stomata.

Het verdampen van water is een exotherm proces dat gebruik maakt van energie van de bladcel om de sterke waterstofbruggen van het vloeibaar water te verbreken. Dit resulteert in waterdamp die samen met de bijbehorende energie in de atmosfeer wordt vrijgelaten, wat zorgt voor de afkoeling van de plant [12].

Nutriënten en water worden uit de bodem gehaald door de wortels en worden via het xyleem getransporteerd naar de nerven van elk blad, waar het grootste deel van het water de plant terug verlaat door transpiratie. Dit verlies van water geeft een opwaartse druk waardoor er weer water en nutriënten door de wortels wordt opgenomen [11].

Zoals hierboven al vermeld, wordt er tijdens de transpiratie ook CO₂ opgenomen die noodzakelijk is voor de fotosynthese van de plant.

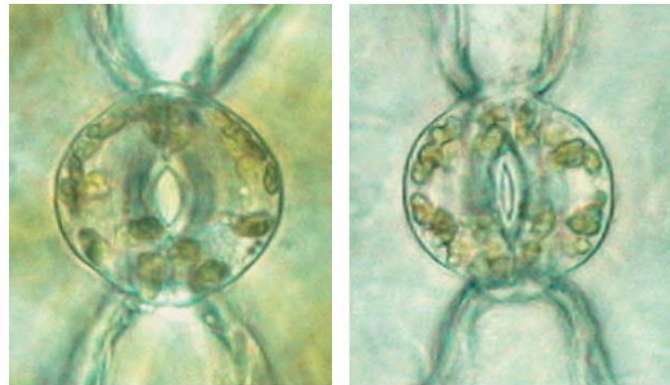


Figuur 4: Weergave transpiratie in doorsnede blad [23]

2.4 Stomata

Stomata zijn poriën in het blad die de gasuitwisseling tussen de plant en de omgeving mogelijk maken. Zo verlaat 95% van het water de plant via de stomata, alhoewel deze maar 1-2% van het bladoppervlak bezetten [11].

Stomata zijn geflankeerd door twee sluitcellen die de diameter van de stomata controleren door van vorm te veranderen. De sluitcellen gaan opzwellen wanneer deze water opnemen van naburige cellen door middel van osmose. Deze opzwellung zorgt ervoor dat de porie groter wordt. Wanneer de sluitcellen water verliezen, worden deze slap en sluit de stoma zoals te zien op figuur 6 [11].



Figuur 5: Weergave van een open (links) en gesloten (rechts) stoma [11]

Het openen van de stomata wordt getriggerd door licht, een laag CO_2 -gehalte in de luchtruimtes van de bladeren en een interne klok aanwezig in de sluitcellen [11].

Omgevingsstress zoals droogte kan ervoor zorgen dat de stomata sluiten tijdens de dag. Door een tekort aan water worden de sluitcellen slap en sluiten ze zo de stomata. Daarnaast geeft het hormoon abscisinezuur (ABA) dat geproduceerd wordt in de wortels bij een tekort aan water, een signaal aan de sluitcellen om de stomata te sluiten. Deze respons verhindert het verwelken van de plant, maar zorgt er ook voor dat er geen CO_2 meer kan worden opgenomen en dat de fotosynthese wordt vertraagd. Deze redenen verklaren waarom er een daling is in gewasopbrengst bij droogte [11].

2.5 Methoden voor registratie transpiratie

In dit experiment wordt gebruik gemaakt van precisiebalansen die om de 10s het gewicht van de plant doorgeven aan de laptop die deze resultaten dan registreert. Deze methode wordt gebruikt omdat het een dynamisch beeld geeft van het totaal systeem met een zeer nauwkeurige resolutie en omdat het een redelijk goedkope methode is.

Andere methoden die gebruikt kunnen worden om de transpiratie te meten zijn: LICOR, leaf clip, porometer en de lysimeter.

LICOR is een draagbaar fotosynthese systeem waarmee de gasuitwisseling en de fotosynthese kan worden geregistreerd [13]. Een leaf clip wordt bevestigd op een blad waarmee de waterconcentratie op dat punt gemeten kan worden met behulp van infraroodlicht. Het resultaat hiervan is een puntmeting van het blad en dus niet representatief voor de hele plant [14]. Een porometer registreert de stomatale geleidbaarheid van blad. Ook deze methode is een puntmeting [15]. Een laatste alternatieve methode is de lysimeter, dit is een meetapparaat die de evapotranspiratie registreert van een plant [16].

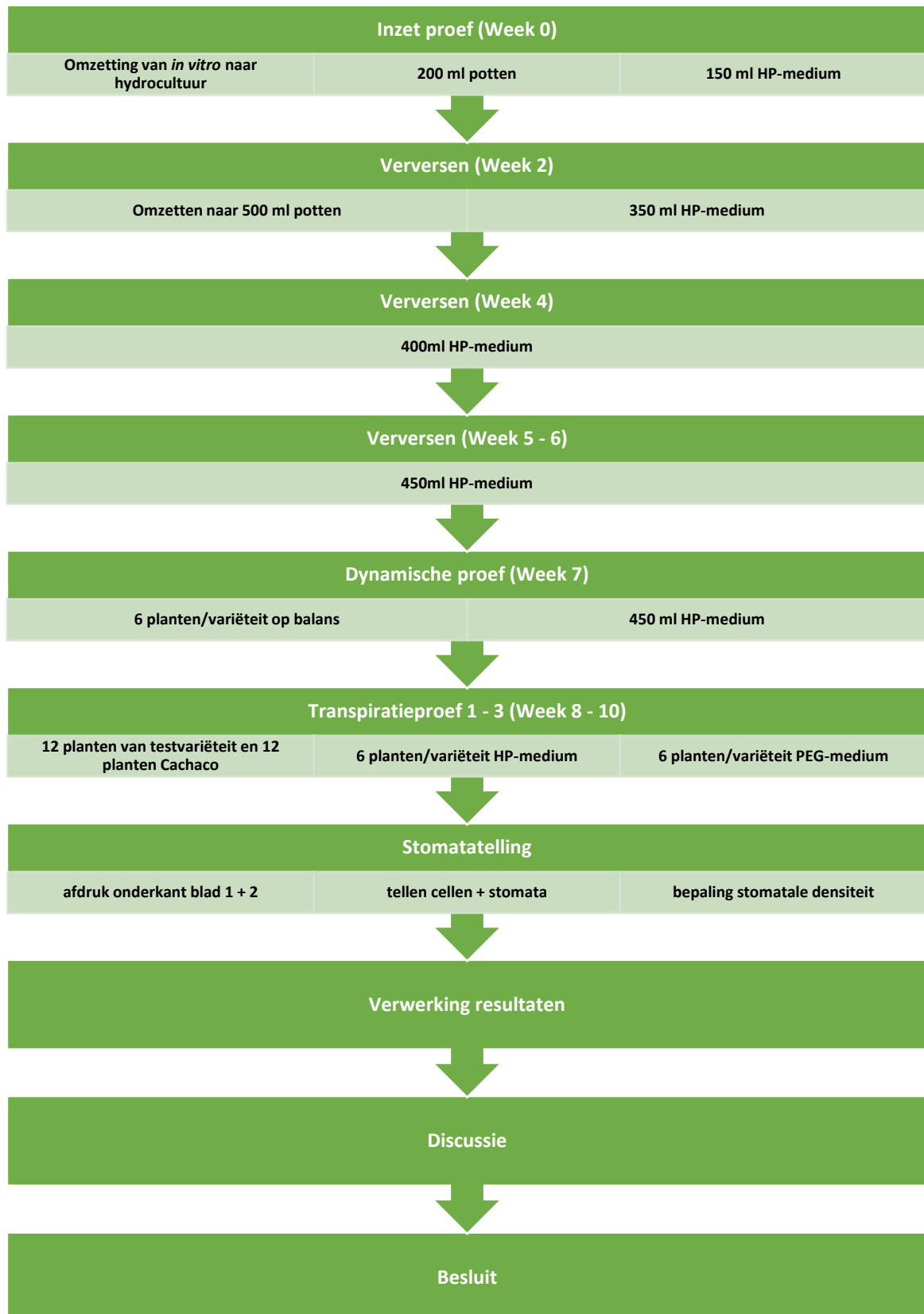
3 Materialen en methoden

3.1 Proefopzet

Tijdens de transpiratieproef wordt de transpiratie van de testvariëteit en controlevariëteit (Cachaco) gemeten gedurende 7 dagen. De helft van deze planten krijgen een controlemedium (hydroponics medium (HP) medium) en de andere helft krijgt een medium dat milde droogtestress veroorzaakt (HP-medium + 5% polyethyleenglycol (PEG)).

Gedurende het verloop van de transpiratieproef (6 dagen) worden de planten op balansen gezet en wordt om de 10s het gewicht opgevraagd. Na afloop van de transpiratieproef wordt er een afdruk gemaakt van de onderkant van het blad. Hiervan worden foto's gemaakt met behulp van een lichtmicroscop op vergroting 10x. Op deze foto's worden tellingen van het aantal cellen en het aantal stomata uitgevoerd, om zo de stomatale densiteit te bepalen.

3.2 Flowschema



3.3 Bereiding stockoplossingen

De stockoplossingen bevatten alle stoffen (behalve sequestreren) die nodig zijn voor het maken van het HP medium. Er wordt gewerkt met stockoplossingen om het afweegwerk te verminderen.

3.3.1 Materialen

3.3.1.1 Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Roerplaat	VWR VMS-C7	Mengen stoffen in oplossing
Ketel (13l)	/	Container stockoplossing
Balans	Mettler Toledo	Afwegen stoffen

3.3.1.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Beker (1l)	Oplossen stoffen
Roerstaafje	Oplossen stoffen
Plastieken pot (700ml)	Container stockoplossing

3.3.1.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
KNO ₃	97024104	Vast	36.107g/l	H272	P220	Essentiële macronutriënten	
K ₂ SO ₄	97030078	Vast	12.136g/l	/	/	Essentiële macronutriënten	
MgSO ₄ .7H ₂ O	97026063	Vast	17.606g/l	/	/	Essentiële macronutriënten	
MgCl ₂ .6H ₂ O	145406	Vast	18.12g/l	/	/	Essentiële macronutriënten	
H ₃ BO ₃	9939735	Vast	0.228g/l	H360	P201-P308+P313	Essentiële micronutriënten	
MnSO ₄ .H ₂ O	A552463	Vast	0.54g/l	H373	H411	Essentiële micronutriënten	
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	TA590083	Vast	0.046g/l	H302 H318 H400	P273 P280 P305+P351+P338 P309+P311	Essentiële micronutriënten	
CuSO ₄ .5H ₂ O	90064188	Vast	0.032g/l	H302 H315 H319 H410	P273 P305+P351+P338 P501	Essentiële micronutriënten	

NaMo ₄ .2 H ₂ O	A02114 21 118	Vast	0.014g/l	H272 H314	P220 P280 P305+P35 1+P338 P310	Essentiële micronutriënten	
KH ₂ PO ₄	980201 79	Vast	19.428g/l	/	/	Fosfaten	
NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O	317010 60	Vast	39.835 g/l	/	/	Fosfaten	
Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	A03447 19	Vast	46.35 g/l	H315 H319	P305+P35 1+P338	Calcium bron	
CaCl ₂ .2 H ₂ O	940400 27	Vast	10.5 g/l	H319	P305+P35 1+P338	Calcium bron	

3.3.2 Methoden

De massa's van de stoffen die afgewogen moeten worden, staan hieronder vermeld in tabel 1 tot 4 voor elke stockoplossing apart. De stockoplossingen worden in een volume van 10l aangemaakt.

Tabel 1: Massa stoffen solution A aanwezig in 1l en 10l

Solution A	1l	10l
KNO ₃	36.107g	360.07g
K ₂ SO ₄	12.136g	121.36g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	17.606g	176.06g
MgCl ₂ .6H ₂ O	18.12g	181.2g

Tabel 2: Massa stoffen solution B2 aanwezig in 1l en 10l

Solution B2	1l	10l
H ₃ BO ₃	0.228g	2.28g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.54g	05.4g
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0.046g	0.46g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.032g	0.32g

Tabel 3: Massa stoffen solution C aanwezig in 1l en 10l

Solution C	1l	10l
KH ₂ PO ₄	19.428g	194.28g
NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O	39.835 g	398.35g

Tabel 4: Massa stoffen solution D aanwezig in 1l en 10l

Solution D	1l	10l
Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	46.35 g	463.5g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	10.5 g	105g

- › Neem een ketel van 13l en vul deze met 5l demi water
- › Weeg de nodige stoffen af en los deze apart op in 1l demiwater
- › Giet al de stoffen in de ketel als ze opgelost zijn
- › Vul de ketel aan tot 10l met demi-water
- › Laat de stoffen zich evenredig in de ketel verdelen door te roeren
- › Vul de 700ml potjes af met zo'n 600 ml stockoplossing
- › Label de potjes met de naam van de stockoplossing en de datum
- › Zet de potjes in de diepvriezer tot deze gebruikt worden

3.4 Bereiding hydroponics (HP) medium + PEG medium

Het HP medium is het controlemedium dat gebruikt wordt in de transpiratieproef en het PEG medium is het stressmedium.

3.4.1 Materialen

3.4.1.1 Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Roerplaat	VWR VMS-C7	Mengen medium
Ketel (13l)	/	Container medium
pH-meter	WTW pH meter pH 526	Metten van pH
Autoclaaf		Steriliseren medium
Precisiebalans	Mettler Toledo	Afwegen solution B ₁
Pipetpeer	Brand macro pipette controller	Pipetteren vloeistof

3.4.1.2 Overzicht van gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Beker (1l)	Afvullen flessen met medium
Beker (5l)	Afmeten vloeistoffen
Maatcilinder (#ml en #ml)	Afmeten stockoplossingen
Pipet (25ml)	Afmeten vloeistof
Roerstaafje	Mengen van medium
Tissues	Schoonmaken werkplek
Trechter	Afvullen flessen met medium
Schott flessen (1l)	Container medium
Autoclaaftape	Controle sterilisatie

3.4.1.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschrift en P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
Solution A	/	VI	<ul style="list-style-type: none"> - KNO₃: 37.107 g/l - K₂SO₄: 12.136 g/l - MgSO₄ 7H₂O: 17.606 g/l - MgCl₂ 6H₂O: 18.12 g/l 	/	/	Macronutriënten	Gootsteen
Solution B2	/	VI	<ul style="list-style-type: none"> - H₃BO₃: 0.228 g/l - MnSO₄ H₂O 0.54 g/l - ZnSO₄ 7H₂O 0.046 g/l - CuSO₄ 5H₂O: 0.032 g/l - NaMoO₄ 2H₂O: 0.014 g/l 	/	/	Micronutriënten	Gootsteen
Solution C	/	VI	<ul style="list-style-type: none"> - KH₂PO₄: 19.428 g/l - NaH₂PO₄ 2H₂O: 39.835 g/l 	/	/	Fosfaten	Gootsteen
Solution D	/	VI	<ul style="list-style-type: none"> - Ca(NO₃)₂ 4H₂O: 46.35 g/l 	/	/	Calciumbron	Gootsteen

			- CaCl ₂ 2H ₂ O 10.5 g/l				
Solution B1 Sequestrant	930100 1437	V	0.06 g/l	/	/	Ijzer chelaat	
NaOH		VI	1M	H314	P280-P305+P351 +P338-P310	Correctie pH	
Polyethyleenglycol (PEG)	0263.3	V	7300-9000g/mol	/	/	Droogte stress induceren	

3.4.2 Methoden

3.4.2.1 HP medium

- > Neem de stockoplossingen uit koelkamer
- > Neem de grootste ketel (13l), zet op roerplaat en leg een roerstaafje in de ketel
- > Neem 5 liter demiwater in een grote beker (5l) en giet in de ketel
- > Meet oplossing A, C, D af in maatcilinder van (250 ml) en B2 af in maatcilinder van (100 ml) en giet in de grote beker (5l)
- > Vul de beker aan tot 5l met demiwater en voeg deze toe aan de ketel
- > Haal B1 en weeg de correcte massa af
- > Voeg deze toe aan de ketel en zet roerplaat op 1.5
- > Neem 3l demi water in de grote beker (5l) en vul de ketel tot hij vol is
- > Meet de pH en schrijf de initiële pH op (4.95 – 5.05)
- > Begin met 0.5ml NaOH toe te voegen om de pH te verhogen
- > Druppelsgewijs met NaOH naar pH +/-6
- > Vul de Schott flessen af met beker (1l)
- > Draai de stop op de Schott flessen
- > Plak autoclaaf tape over dop met HP en datum
- > Autoclaveer de flessen nat op 121°C .

3.4.2.2 PEG medium

- > Vul Schott flessen af met HP medium tot 800ml
- > Plak autoclaaf tape over dop met PEG en datum
- > Autoclaveer de flessen nat op 121°C .
- > Laat de flessen afkoelen tot handwarm
- > Voeg in een steriele entkast 50g PEG toe aan de flessen
- > Schud de flessen goed om de PEG te laten oplossen
- > Vul de flessen aan met HP medium tot 1l
- > Schud de flessen opnieuw om de PEG te laten oplossen

3.4.2.3 Eindconcentratie HP/PEG medium

De eindconcentraties van de stoffen die zich bevinden in het HP en PEG medium zijn hieronder weergegeven in tabel 5 tot 9.

Tabel 5: Eindconcentratie stoffen solution A in HP/PEG medium

Solution A	Eindconcentratie
KNO ₃	0.69 g/l
K ₂ SO ₄	0.23 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.34 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.35 g/l

Tabel 6: Eindconcentratie stoffen solution B2 in HP/PEG medium

Solution B2	Eindconcentratie
H ₃ BO ₃	0.0017g/l
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0042g/l
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.00035g/l
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.00025g/l

Tabel 7: Eindconcentratie stoffen solution C in HP/PEG medium

Solution C	Eindconcentratie
KH ₂ PO ₄	0.37g/l
NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O	0.77g/l

Tabel 8: Eindconcentratie stoffen solution D in HP/PEG medium

Solution D	Eindconcentratie
Ca(NO ₃)2.4 H ₂ O	0.89g/l
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.20g/l

Tabel 9: Eindconcentratie sequestrene in HP/PEG medium en eindconcentratie PEG in PEG medium

Stoffen	Eindconcentratie
Sequestrene	0.06g/l
PEG	50g/l

3.5 Transpiratieproef

Bij de transpiratieproef wordt de transpiratie over 7 dagen gemeten van een testvariëteit en een controlevariëteit (Cachaco) in controle als stress condities. Deze test wordt driemaal gedaan per experiment om zo drie variëteiten te testen.

De planten staan in een kweekkamer met een temperatuur van 25°C en een vochtigheidsgraad van 65%. De planten staan onder rode en blauwe LED lampen met een nacht/dag cyclus van elk 12u. De transpiratie wordt gemeten door de planten op balansen te zetten, die om de 10s de massa van de plant opvragen.

Uit deze resultaten kan dan worden vastgesteld hoe water efficiënt de planten omgaan met droogtestress.

3.5.1 Materialen

3.5.1.1 Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Precisiebalans (24)	Kern	Meten massa planten
Bevochtiger	Brune B250 electronic	Vochtigheidsgraad op peil houden
Laptop	Dell	Registreren massa's
Rode en blauwe LED lampen	Philips	Licht geven
Groekamer	Sanyo MLR-35H	Opkweek planten
Groekamer	Aralab Fitoclima s600	Opkweek planten

3.5.1.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Plastieken potten (500ml)	Container ondergrondse delen plant + medium
Beker 5l	Afvalbeker
Beker 600ml	Afmeten medium
Tissues	Schoonhouden werkoppervlak + drogen van wortels

3.5.1.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Batch nr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschrift en P-zinnen	Doel	Afvalverwijdering
HP-medium	/	VI	Zie 3.3	/	/	Voedingsmedium (controle)	Gootsteen
PEG-medium	/	VI	Zie 3.3	/	/	Voedingsmedium (stress)	Gootsteen
Ethanol	/	VI	70%	H225	P210	Steriliseren werkoppervlak	

3.5.1.4 Staaloverzicht

3.5.1.4.1 Staaloverzicht experiment A15

Totaal aantal planten 48. Zie bijlage 1.

3.5.1.4.2 Staaloverzicht experiment A16

Totaal aantal planten 66. Zie bijlage 2

3.5.2 Methoden

3.5.2.1 Inzet proef

Bij de inzet van de proef worden de planten, die *in vitro* zijn opgekweekt, overgezet naar hydrocultuur waarbij de planten verder worden opgekweekt in plasticen potten met een minerale oplossing (HP-medium).

Hierbij worden de wortels van de plant afgesneden, waarna het plantgewicht gewogen wordt. De plant wordt dan gedeeltelijk in een plasticen pot van 250ml gezet via een gat in het deksel. De plant wordt dan verstevigd door het aanbrengen van tape en het gat wordt afgesloten met silicon grease om zo contaminaties te vermijden.

Hierna wordt het deksel met de plant, tape en silicon grease gewogen om zo het gewicht van het deksel, de tape en silicon grease te bepalen. Bij de verdere stappen wordt het plantgewicht altijd gewogen met deksel, tape en silicon grease. Hierna wordt er dan 150ml HP-medium in het potje gegoten en wordt ervoor gezorgd dat de plant voldoende in het medium zit. Er wordt altijd gezorgd dat de plant en later de wortels ondergedompeld zijn in het medium, maar de potten gaan nooit volledig vol gegoten worden want anders kan de plant niet voldoende zuurstof opnemen.

Als laatste wordt er aluminiumfolie rond de pot gewikkeld, om het licht uit te sluiten en algengroei tegen te gaan en wordt het geheel opnieuw gewogen.



Figuur 6: Weergave plant in test

- > Steriliseer een entkast met ethanol
- > Neem de proefbuis met de *in vitro* plant en haal deze eruit
- > Leg de plant op steriel entpapier en snij de wortels en overtollige medium af
- > Weeg de plant met een precisiebalans (nauwkeurigheid 0.01g) en schrijf dit gewicht op
- > Brand een gat in de plasticen deksel van een 250 ml plasticen pot
- > Plaats de plant in de pot via het gat in de deksel
- > Plak de plant in de deksel vast doormiddel van 4 stukjes tape
- > Sluit het gat in de deksel helemaal af met silicon grease
- > Weeg de deksel met de plant en schrijf dit op
- > Giet 150ml HP medium in de 250ml pot
- > Controleer of de plant in het medium zit
- > Verpak de pot in aluminiumfolie
- > Weeg het geheel en schrijf dit op
- > Plaats de planten in de groeikamer

3.5.2.2 *Verversing van de planten*

Op regelmatige basis (week 2, 4, 5 en 6) wordt het HP-medium van de planten vervangen om het gehalte aan nutriënten in het medium optimaal te houden. Op deze momenten wordt ook het totaal gewicht gewogen voor de verversing en na de verversing om een idee te krijgen hoeveel water ze hebben opgenomen en verdampt.

- › Steriliseer een entkast met ethanol
- › Weeg de planten (plant + pot + medium + aluminium folie)
- › Haal de aluminiumfolie van de potten
- › Giet het oude medium weg
- › Voeg de juiste hoeveelheid HP medium toe
- › Plaats de plant in de pot
- › Verpak de pot terug in aluminiumfolie
- › Weeg het geheel
- › Zet de planten terug in de groeikamer

3.5.2.3 *Dynamische proef (week 7)*

Bij de dynamische proef worden er van de 4 variëteiten 6 homogene planten gekozen die zonder stress 6 dagen op de balansen gaan staan. Zo kan de transpiratie die gebeurt bij controle condities tussen de variëteiten vergeleken worden.

- › Weeg alle planten (plant + pot +medium + aluminium folie)
- › Ververs alle planten met 450 ml HP medium en registreer het plantgewicht (plant + deksel)
- › Weeg alle planten opnieuw (plant + pot +medium + aluminium folie)
- › Bereken van alle variëteiten de gemiddelde transpiratie
 - Gewicht na vorige verversing – gewicht nu voor verversing
 - Neem hiervan per variëteit het gemiddelde
- › Selecteer 6 planten per variëteit die het dichtst rond dit gemiddelde zitten
- › Geef deze 24 planten random een plaats op de balansen
- › Instellen programma multibalance op laptop
 - Create new file
 - Settings :
 - Frequentie : 10s – Elke 10s het gewicht opvragen
 - Error: 5000 – Bij gewicht van 5kg registeren als error
 - Errorloop: 5 – Er mag maximaal 5 keer een error voorkomen
 - Type en Tag kolommen uitzetten
 - Connecteren van de balansen (24 in totaal)
 - Testen balansen + ingeven ID plant per balans
 - Klok gelijkstellen met klok laptop
 - Start proef
- › Stop het programma multibalance op laptop de week erop
- › Weeg het plantgewicht van planten die in test zijn geweest

3.5.2.4 Transpiratieproef (week 8-11)

Bij de transpiratieproef wordt elke week één van de drie testvariëteiten ten opzichte van de controlevariëteit getest. Twaalf planten van iedere variëteit worden geselecteerd en onderverdeeld in een controle groep, deze krijgen HP-medium en een stress groep die PEG-medium krijgen. Deze planten worden dan gedurende 6 dagen op balansen gezet die om de 10s het gewicht van de planten opvragen. Hierdoor kan het effect van stress op de transpiratie van de variëteit bestudeerd worden en kunnen de variëteiten onderling vergeleken worden.

Dag 1 (voorbereiding)

- > Weeg alle Cachaco en testvariëteit planten
- > Selecteer van beide variëteiten 12 planten met de hoogste transpiratie
- > Deel deze 24 planten in de stress en controle groep (6 PEG en 6 controle per variëteit)
- > Bepaal het plantgewicht van deze planten
- > Plaats de planten random naast de balansen
- > Weeg de overige planten
- > Ververs de planten met HP medium
- > Weeg de planten opnieuw

Dag 2 (start proef)

- > Ververs de planten die in test gaan met het juiste medium (HP of PEG)
- > Plaats de planten op de balansen en controleer of de planten niets raken
- > Instellen programma multibalance op laptop
 - Create new file
 - Settings :
 - Frequentie: 10s
 - Error: 5000
 - Errorloop: 5
 - Type en Tag kolommen uitzetten
 - Connecteren van de balansen (24 in totaal)
 - Testen balansen + ingeven ID plant per balans
 - Klok gelijkstellen met klok laptop
 - Start proef

Dag 8 (einde proef)

- > Stop het programma multibalance op laptop
- > Weeg het plantgewicht van de planten die in test zijn geweest

3.6 Stomatatelling

Na de transpiratieproef wordt er met behulp van nagellak een afdruk genomen aan de onderkant van het laatst en voorlaatst gevormd blad van de planten die in test zijn geweest. Deze afdruk wordt dan zo plat mogelijk op een objectglasje gelegd en afgedekt met een dekglasje. Hiervan worden via een lichtmicroscopie foto's van gemaakt op vergroting 10x, waarvan de cellen en stomata geteld worden en de stomatadensiteit berekend wordt.

3.6.1 Materialen

3.6.1.1 Overzicht gebruikte apparatuur

Hardware	Merk en type	Doel
Pincetten	Hammacher Solingen	Verwijderen nagellak van blad
Lichtmicroscopie	EVOS	Lichtmicroscopie

3.6.1.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Hardware	Doel
Objectglasjes	Lichtmicroscopie
Dekglasje	Lichtmicroscopie
Nagellak	Maken bladafdruk

3.6.1.3 Staaloverzicht

Zie bijlage 2

3.6.2 Methoden

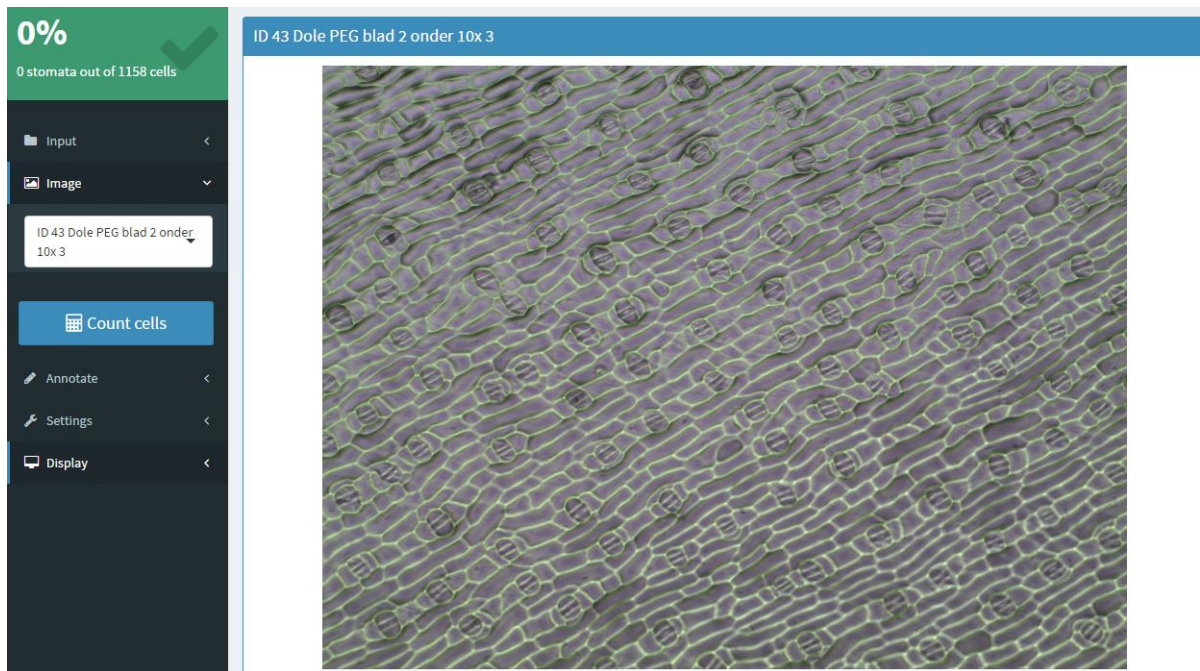
3.6.2.1 Afdruk van onderkant blad maken

- › Lak een vierhoek aan de onderkant van het blad met nagellak en zorg ervoor dat de nagellak er niet te dun op zit
- › Laat de nagellak drogen
- › Verwijder de nagellak met een pincet (probeer om grote stukken nagellak te verkrijgen) en leg deze op een objectglasje (zorg ervoor dat er geen chlorofyl meekomt)
- › Probeer de nagellak zo plat mogelijk te krijgen
- › Leg een dekglasje op het staal
- › Bekijk het staal onder de microscoop met een vergroting 10x
- › Neem per staal 3 PNG foto's (probeer nerven te vermijden)

3.6.2.2 Tellen van stomata en cellen

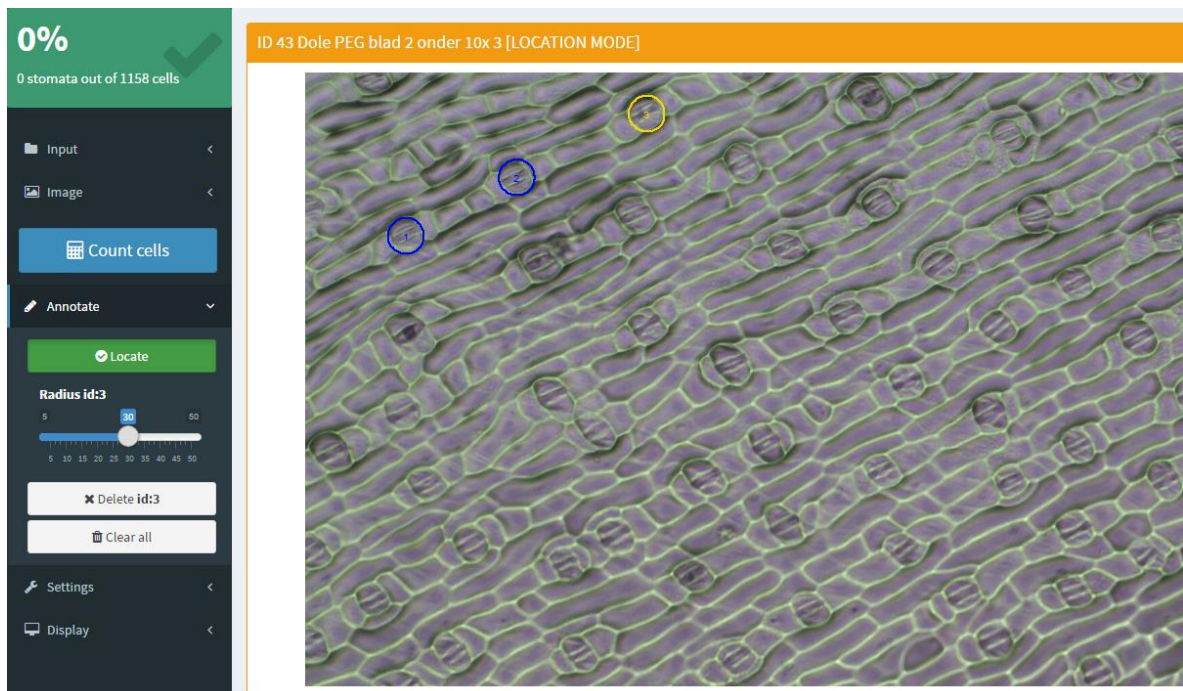
- › Open het R-project Stomata
- › Klik op Run App
- › Klik op input en selecteer de map met de gemaakte PNG's
- › Klik op Image en selecteer een foto om te tellen

- Om de cellen in te kleuren klik op display en kies hoeveel mask overlay en druk op apply

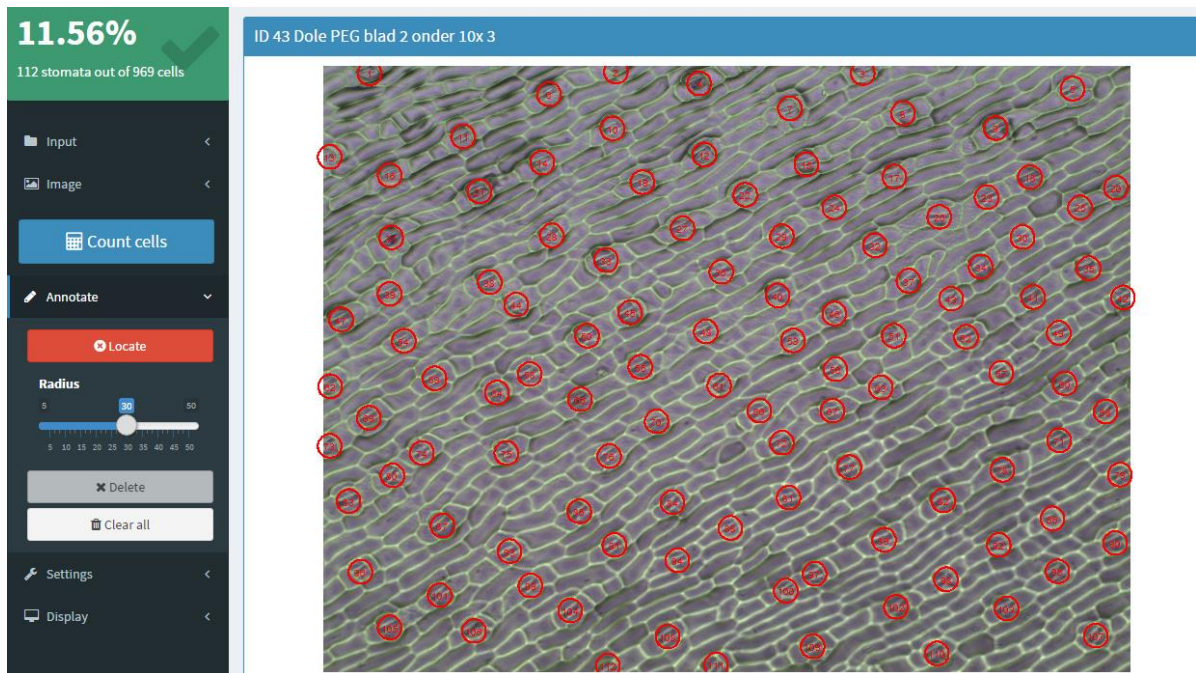


Figuur 7: Weergave programma voor telling stomata

- › Druk op annotate om de radius van de stomata in te stellen (25-35)
- › Zoom in op de foto door een gebied te selecteren (zoom uit door dubbel te klikken)
- › Druk op locate om de stomata te tellen
- › Duid alle stomata aan door in het midden van de stomata te klikken



Figuur 8: Weergave aanduiding stomata



Figuur 9: Weergave aanduiding stomata op hele foto

- > Als alle stomata zijn aangeduid, klik terug op locate
- > Klik op Count Cells
- > Linksboven verschijnt het juiste aantal stomata en cellen en de stomatadensiteit

4 Resultaten

De transpiratieproeven zijn uitgevoerd op alle variëteiten die vernoemd zijn in 2.1.3 Variëteiten in test, maar hiervan wordt alleen een vergelijking uitgevoerd tussen de controlevariëteit Cachaco en testvariëteit Dole. Deze planten hebben hetzelfde genotype (ABB) en hiermee wordt er nagegaan of deze variëteiten ook hetzelfde fenotype hebben.

4.1 Resultaten transpiratieproef Cachaco en Dole

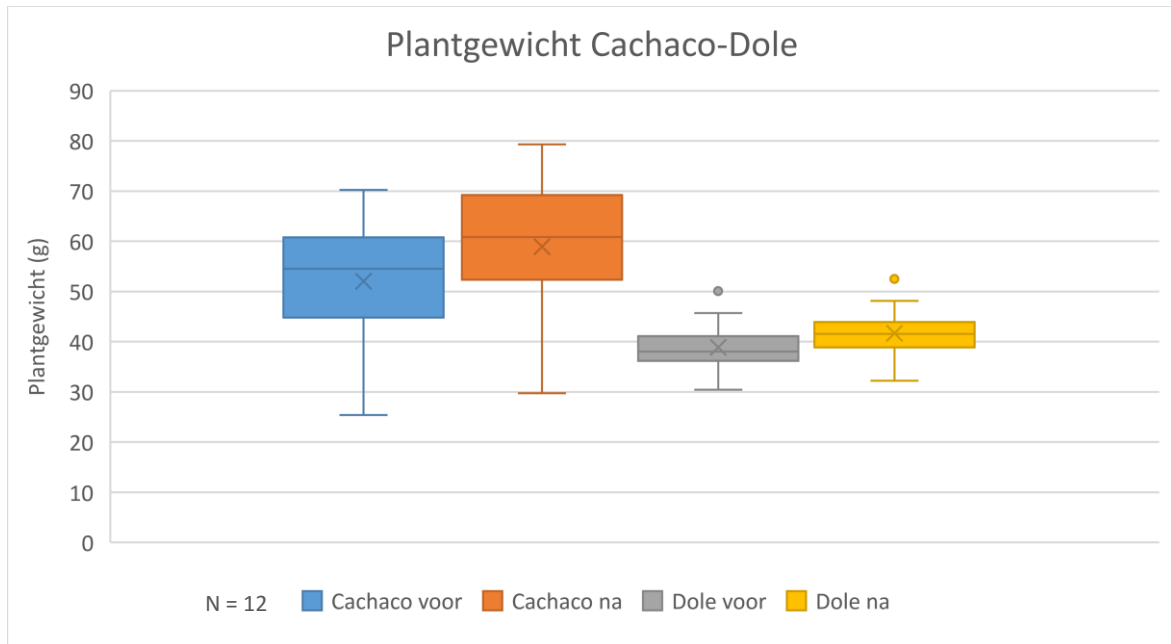
Er zijn 6 nulhypothesen die getest worden bij de transpiratieproef.

1. H₀: er is geen verschil in genormaliseerde transpiratie tussen variëteit Cachaco en Dole op het einde van de dag
2. H₀: er is geen verschil in genormaliseerde transpiratie tussen controle en stress bij Cachaco
3. H₀: er is geen verschil in genormaliseerde transpiratie tussen controle en stress bij Dole
4. H₀: er is geen verschil in tijd bij de maximale genormaliseerde transpiratie tussen Cachaco en Dole
5. H₀: er is geen verschil in tijd bij de maximale genormaliseerde transpiratie tussen stress en controle Cachaco
6. H₀: er is geen verschil in tijd bij de maximale genormaliseerde transpiratie tussen stress en controle Dole

4.1.1 Genormaliseerde transpiratie

Bij de verwerking van de resultaten wordt niet de absolute transpiratie gebruikt, maar de genormaliseerde transpiratie. Dit is de absolute transpiratie gedeeld door het plantgewicht bij het begin van de proef (ml transpiratie/g plantgewicht). Er wordt hiervoor gekozen omdat het plantgewicht verschilt tussen Cachaco en Dole en het gebruik van de absolute transpiratie kan dan een vertekend beeld geven.

In figuur 10 wordt het plantgewicht van Cachaco en Dole in gram weergegeven voor het begin en na het einde van de proef door middel van een boxplot.



Figuur 10: Boxplot plantgewicht voor en na de proef

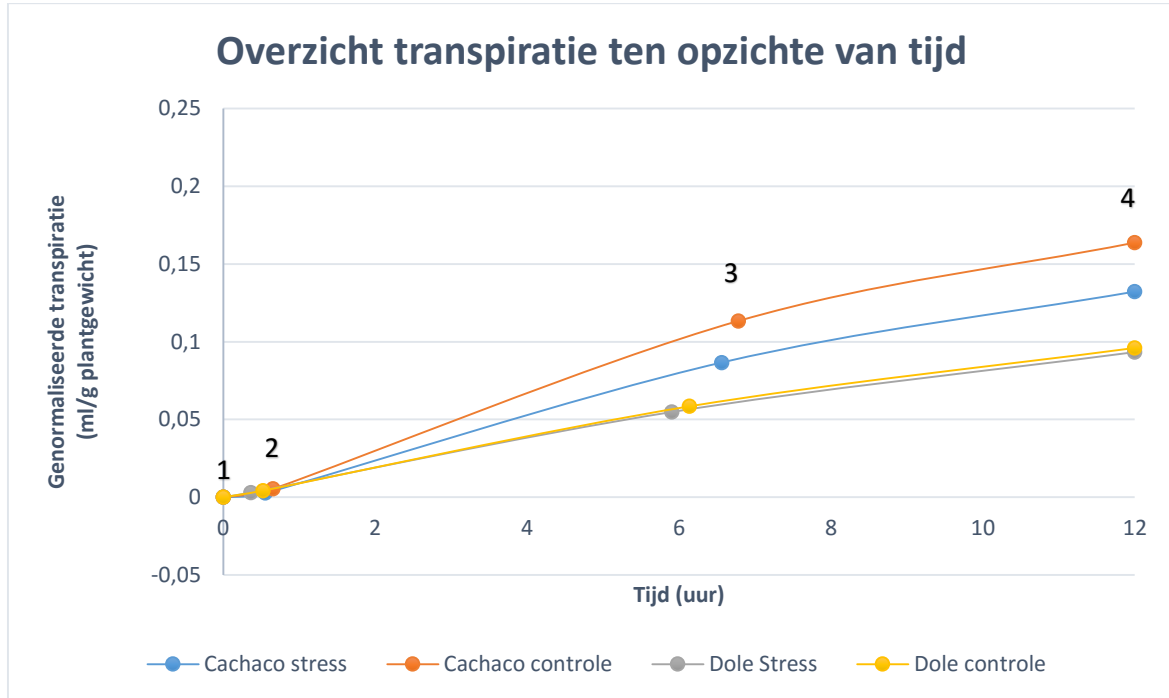
Een boxplot geeft de verdeling van de resultaten weer en is ingedeeld in 4 kwartielen. Elk kwartiel geeft 25% van de plantgewichten weer. In totaal bestaat elk boxplot uit 12 plantengewichten dus in elk kwartiel bevinden zich 3 plantengewichten. Het eerste kwartiel geeft de 3 laagste plantengewichten weer, het tweede kwartiel de laagste 3 van de overige 9 plantengewichten, en hetzelfde voor kwartiel 3 en 4. De streep die zich bevindt tussen kwartiel 2 en 3 is de mediaan en het kruisje geeft het gemiddelde aan. Hoe groter het boxplot is, hoe meer spreiding er is in de resultaten.

Uit de boxplots in figuur 10 blijkt dat de controlevariëteit Cachaco een hoger plantgewicht heeft zowel voor als na de proef dan de testvariëteit Dole. Wel zit er minder spreiding op de resultaten bij Dole dan bij Cachaco.

Het gebruik van de absolute transpiratie zou hier een vertekend beeld geven want wanneer een plant groter is, kan deze meer transpireren dan een kleinere plant.

4.1.2 Overzicht transpiratie

In figuur 10 wordt een overzicht gegeven van de gemiddelde genormaliseerde transpiratie doorheen de dag van Cachaco en Dole voor controle als stress condities van de 6 gemeten dagen. Dit geeft een eerste beeld van hoe de genormaliseerde transpiratie verschilt tussen de variëteiten en of de stress condities een invloed hierop hebben gehad.



Figuur 11: Overzicht genormaliseerde transpiratie gedurende de dag

In figuur 11 zijn 4 punten weergegeven, namelijk het punt waarop de lichten aanspringen (1), het moment waarop de transpiratie maximaal begint te worden (2), het moment waarop er een vermindering zichtbaar is in transpiratie (3) en het moment waarop de lichten uitgaan (4). Er wordt vanuit gegaan dat de transpiratie lineair is tussen het begin en einde van maximale transpiratie. Dit wil zeggen dat er op elk moment tussen deze 2 punten dezelfde transpiratie plaatsvindt.

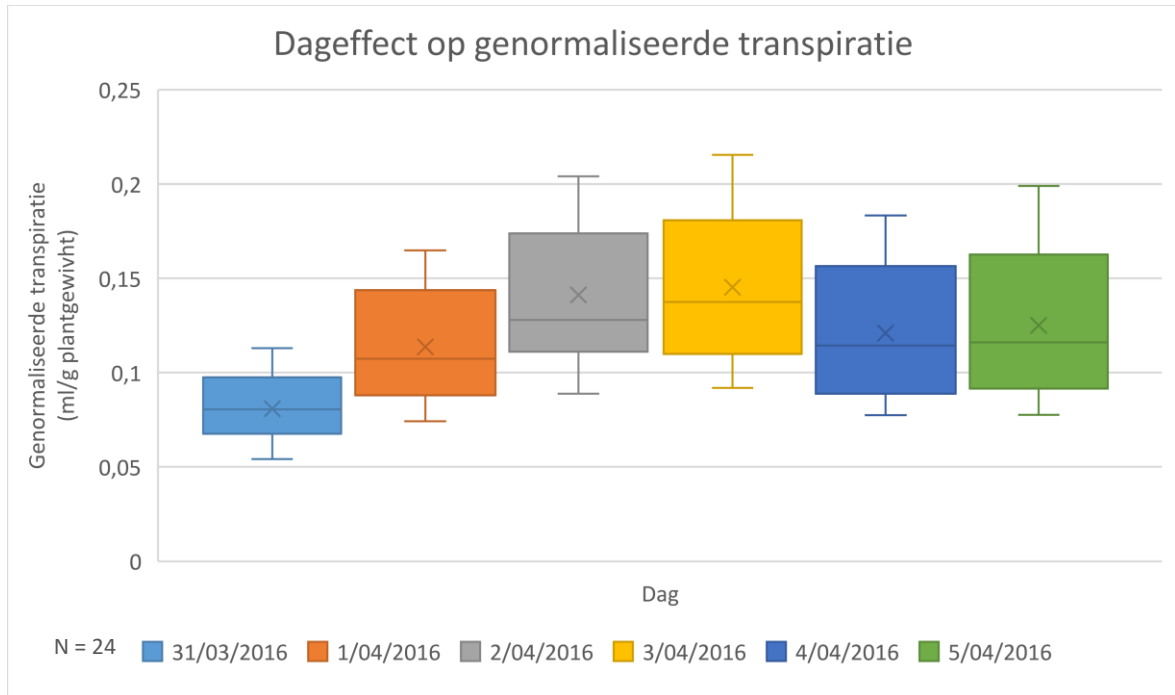
De figuur is opgesteld uitgaande van de gemiddelde genormaliseerde transpiratie van 6 planten voor bovenstaande 4 punten voor Cachaco en Dole bij controle en stress condities.

In het algemeen heeft Cachaco een grotere transpiratie dan Dole en binnen Cachaco is er een hogere transpiratie bij controle condities dan bij stress condities. Bij Dole is er echter bijna geen verschil in transpiratie tussen controle en stress condities.

Ook is er een verschil zichtbaar in de tijd waarop de maximale transpiratieperiode begint en eindigt. Zo eindigt de maximale transpiratie bij Cachaco later dan bij Dole.

4.1.3 Dageffect op transpiratie

Als eerste wordt er gecontroleerd of er een verschil is in transpiratie over de dagen van het experiment. Dit wordt weergegeven in figuur 12 door middel van een boxplot van de gemiddelde genormaliseerde transpiratie van alle planten in test op het einde van de dag. Deze controle wordt uitgevoerd omdat er verwacht wordt dat de stresscondities een groter effect gaan hebben op de genormaliseerde transpiratie op dag 5 ten opzichte van dag 1.



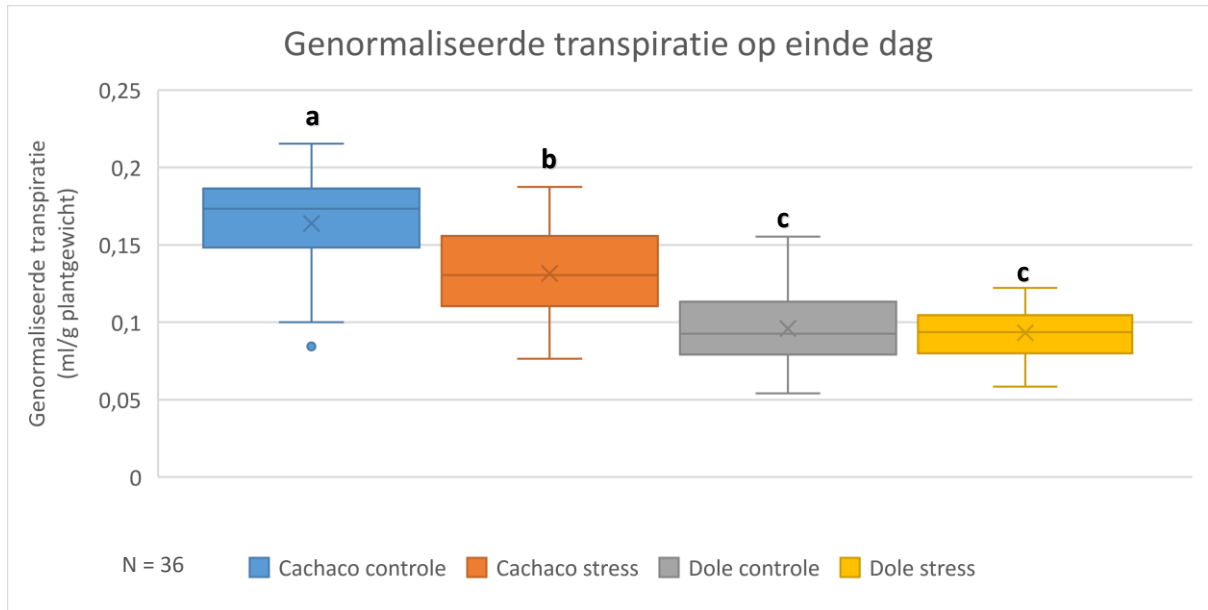
Figuur 12: Weergave van het dageffect op de gemiddelde transpiratie

In bovenstaande figuur is te zien dat de genormaliseerde transpiratie verschilt op het einde van elke dag. De genormaliseerde transpiratie is het laagst op dag 1 en stijgt daarna tot dag 4, waarna deze terug daalt op dag 5 en 6.

Op deze data is ook een variantie-analyse uitgevoerd met $\alpha=0.05$ om het dageffect te testen op de genormaliseerde transpiratie. Het resultaat hiervan was kleiner dan 0.05, wat wilt zeggen dat er een significant verschil is in transpiratie per dag.

4.1.4 Transpiratie op het einde van de dag

In figuur 13 wordt de genormaliseerde transpiratie weergegeven op het einde van de dag voor Cachaco en Dole bij controle en stress condities door middel van boxplots.



Figuur 13: Weergave genormaliseerde transpiratie op het einde van de dag van Cachaco en Dole bij controle en stress condities

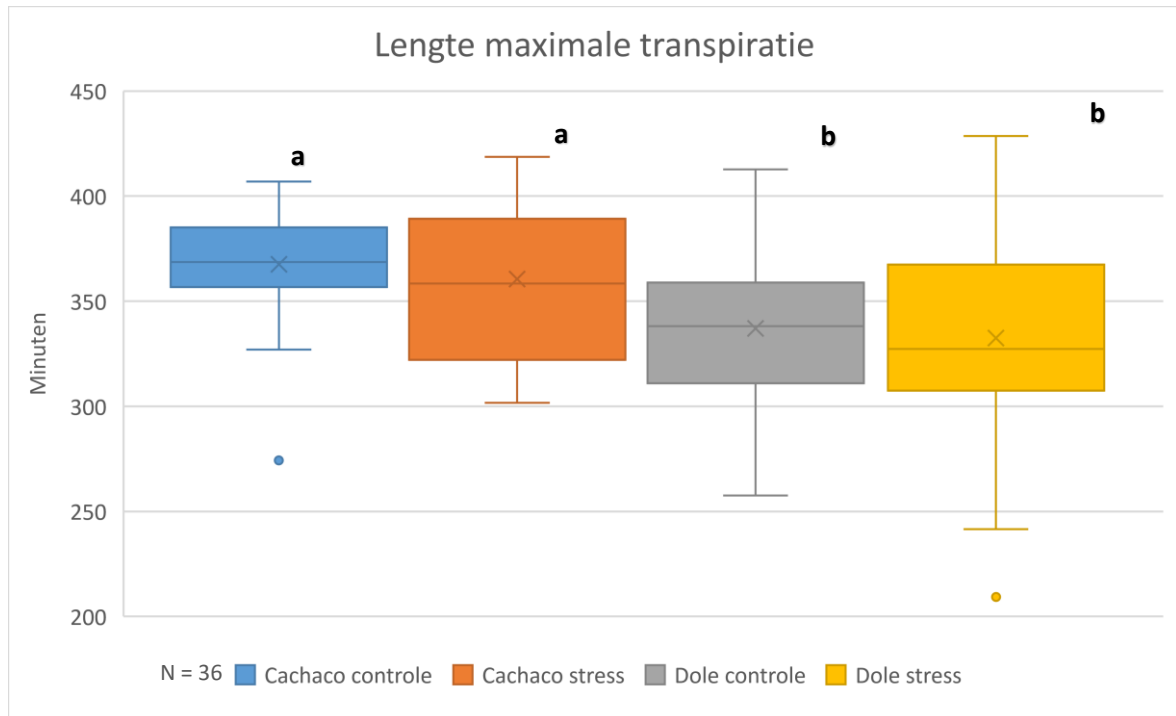
Bovenstaande figuur laat zien dat de genormaliseerde transpiratie van controle Cachaco hoger ligt dan stress Cachaco. De genormaliseerde transpiratie van Dole daarentegen is bijna gelijk bij stress en controle, alleen is er een grotere spreiding bij controle Dole. Als de variëteiten onderling worden vergeleken met elkaar, is het duidelijk dat Cachaco een hogere genormaliseerde transpiratie heeft dan Dole.

Op de resultaten is een Tukey test uitgevoerd met $\alpha=0.05$ om het significantie niveau tussen deze groepen te testen. Zo is er een significant verschil tussen controle Cachaco en stress Cachaco, controle Dole en controle Cachaco en stress Dole en stress Cachaco, wat ook te zien is in bovenstaande boxplot. Tussen stress en controle Dole was er echter geen significant verschil.

Met deze resultaten worden de hypothesen dat er geen verschil is in genormaliseerde transpiratie tussen Cachaco en Dole en controle en stress condities bij Cachaco verworpen.

4.1.5 Lengte maximale transpiratie

Er wordt niet alleen gekeken naar de genormaliseerde transpiratie, maar ook naar de lengte van de maximale transpiratie. Zo wordt dit in figuur 14 weergegeven voor Cachaco en Dole in controle en stress condities.



Figuur 14: Weergave lengte maximale transpiratie in minuten met behulp van een boxplot

Uit bovenstaand boxplot is af te lezen dat er niet veel verschil zit tussen de geteste condities bij zowel Cachaco als Dole. Wel is te zien dat de maximale transpiratie langer duurt bij Cachaco dan bij Dole.

Ook op deze resultaten is een Tukey test uitgevoerd met $\alpha=0.05$ om het significantie niveau tussen deze groepen te testen. Hieruit blijkt dat er geen significant verschil is tussen controle en stress Cachaco en controle en stress Dole. Wel was er een significant verschil tussen Cachaco en Dole, wat de hypothese dat er geen verschil is tussen Cachaco en Dole verwerpt.

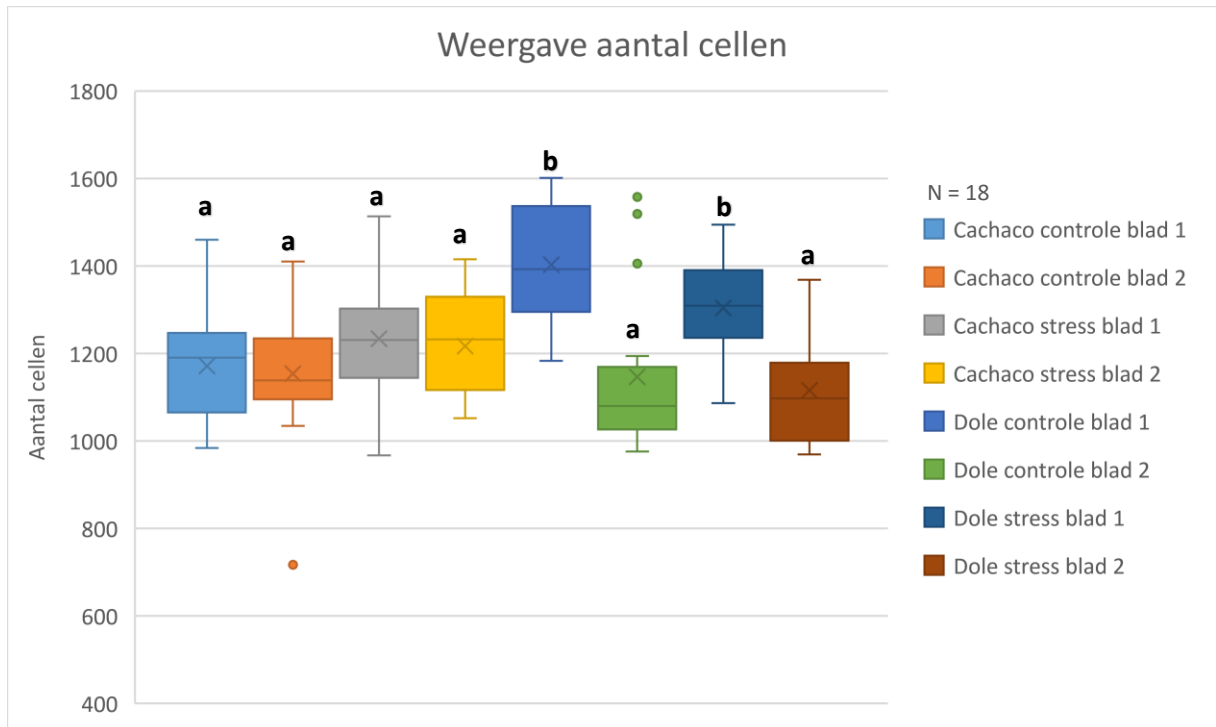
4.2 Resultaten stomatatelling Cachaco en Dole

Na de transpiratieproef werd er een afdruk genomen van de onderkant van het laatst (blad 1) en voorlaatst (blad 2) gevormd blad, waarop in drievoud het aantal cellen en stomata zijn geteld. Hieruit is dan de stomatale densiteit bepaald, wat de ratio is van het aantal stomata op het aantal cellen.

Met deze data wordt gekeken of er een verschil is in het aantal cellen, aantal stomata en de stomatale densiteit tussen Cachaco en Dole en de behandeling.

4.2.1 Resultaten aantal cellen Cachaco en Dole

In figuur 15 wordt het aantal cellen weergegeven van Cachaco en Dole. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen de behandeling die de planten gekregen hebben (controle en stress medium) en het laatst (blad 1) en voorlaatst (blad 2) gevormd blad.



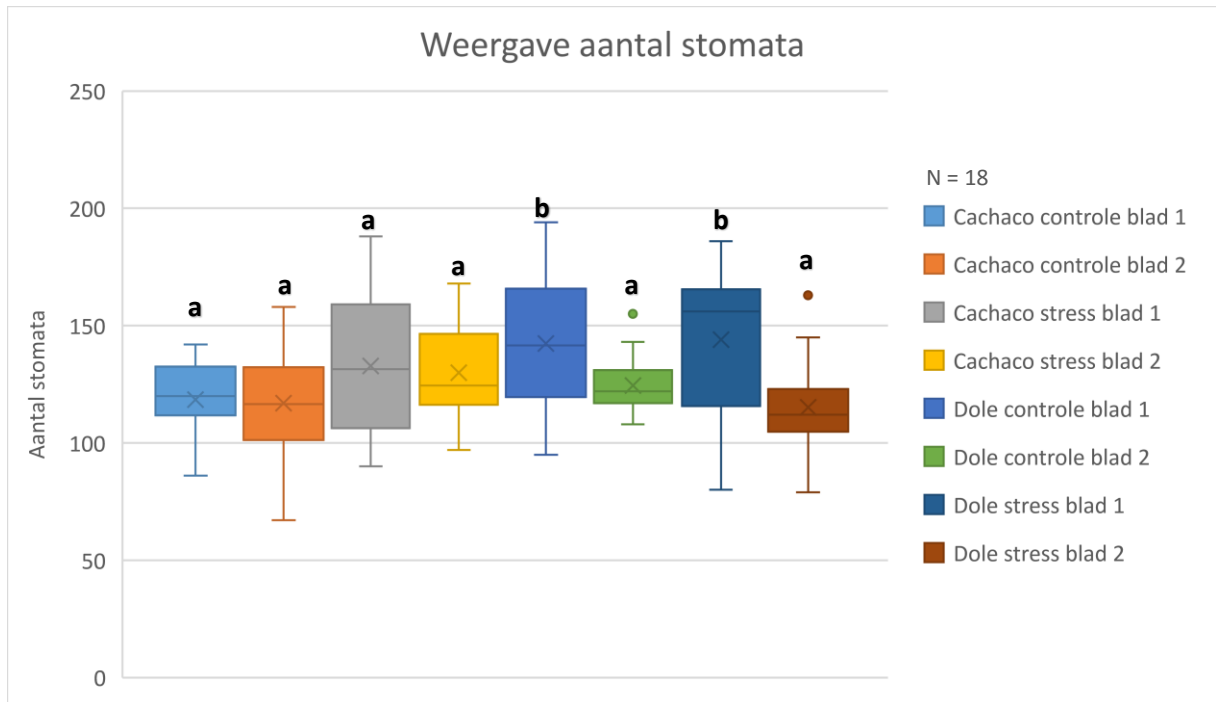
Figuur 15: Weergave aantal cellen Cachaco en Dole van blad 1 en 2 bij controle en stress

Op de resultaten is een Tukey test uitgevoerd met $\alpha=0.05$ om het significantie niveau tussen deze groepen te testen. Hieruit blijkt dat er een significant verschil is tussen Cachaco en Dole en dat de behandeling geen effect heeft. Wel is er een significant verschil tussen blad 1 en blad 2.

In figuur 15 zijn ook de verschillen tussen de groepen aangegeven. Zo zijn er geen significante verschillen tussen het blad en behandeling bij Cachaco. Bij Dole heeft blad 1 bij beide behandelingen een significant hoger aantal cellen.

4.2.2 Resultaten aantal stomata Cachaco en Dole

In figuur 16 wordt het aantal stomata weergegeven van Cachaco en Dole. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen de behandeling die de planten gekregen hebben (controle en stress medium) en het laatst (blad 1) en voorlaatst (blad 2) gevormd blad.



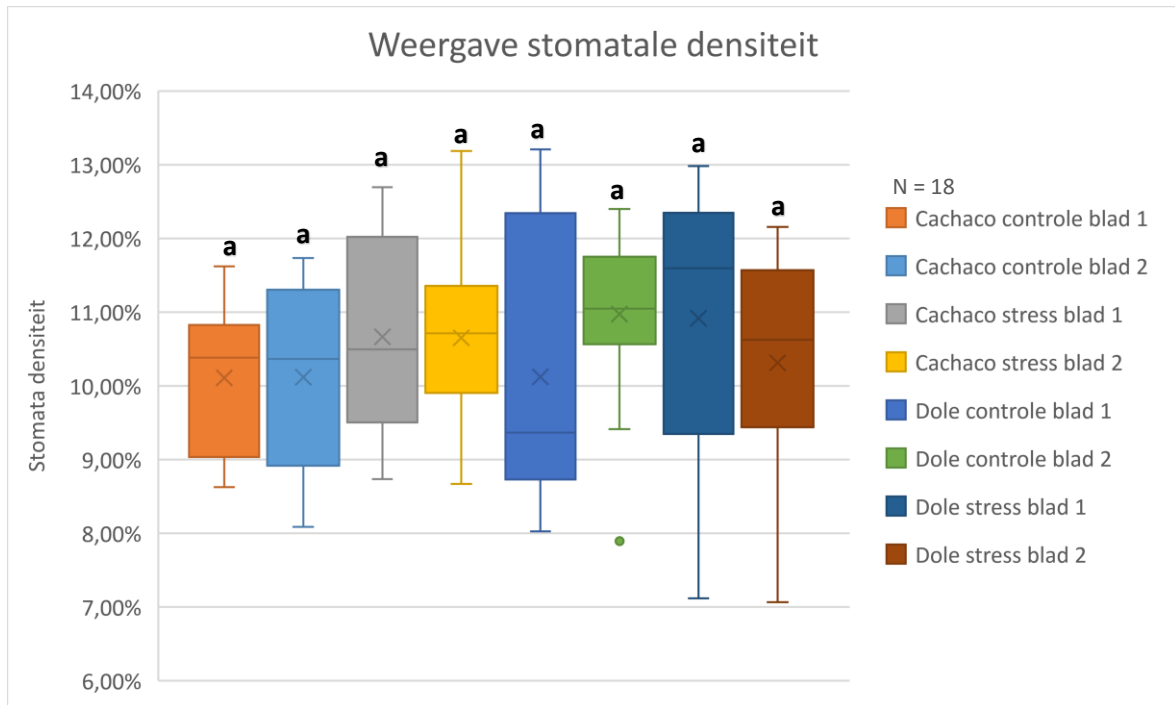
Figuur 16: Weergave aantal stomata Cachaco en Dole van blad 1 en 2 bij stress en controle

Op de resultaten is een Tukey test uitgevoerd met $\alpha=0.05$ om het significantie niveau tussen deze groepen te testen. Hieruit blijkt dat er geen significant verschil is in het aantal stomata tussen Cachaco en Dole en controle en stress behandeling. Wel is er een verschil tussen blad 1 en blad 2.

In figuur 16 zijn ook de verschillen tussen de groepen aangegeven door het verschil in letters. Zo is te zien dat er geen verschil bij Cachaco is bij behandeling en blad. Bij Dole is het aantal stomata significant hoger bij blad 1 van controle als stress.

4.2.3 Resultaten stomatale densiteit Cachaco en Dole

In figuur 17 wordt de stomatale densiteit (aantal stomata / aantal cellen) weergegeven van Cachaco en Dole. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen de behandeling die de planten gekregen hebben (controle en stress medium) en het laatst (blad 1) en voorlaatst (blad 2) gevormd blad.



Figuur 17: Weergave stomatale densiteit Cachaco en Dole van blad 1 en 2 bij controle en stress

Op deze resultaten is Tukey test uitgevoerd waaruit blijkt dat er geen significant verschil is tussen Cachaco en Dole, tussen blad 1 en blad 2 en de behandeling zoals ook te zien op figuur 17. Wel is te zien uit bovenstaand boxplot dat er een grote spreiding is op de resultaten.

5 Discussie

Er is een vergelijking gemaakt tussen Cachaco en Dole, die hetzelfde genotype hebben, om zo mogelijke verschillen in fenotype te ontdekken bij droogtestress. De parameters waarmee er een vergelijking is gemaakt, zijn de genormaliseerde transpiratie, de lengte van de maximale transpiratie, het aantal cellen en stomata, en de stomatale densiteit.

Als eerste is het effect van de dag op de genormaliseerde transpiratie gecontroleerd. Hieruit volgde dat er een significant verschil is tussen de dagen van het experiment. Zo transpireren de planten minder in het begin van het experiment en stijgt en stabiliseert deze rond dag 4 van het experiment. Een mogelijke reden hiervoor is dat op dag 1 de planten net nieuw medium gekregen hebben en ze hier de eerste dag aan moeten wennen.

Als tweede is de genormaliseerde transpiratie op het einde van de dag vergeleken tussen Cachaco en Dole en controle en stress condities. Hierbij transpireerde controle Cachaco significant meer dan stress Cachaco, wat wilt zeggen dat Cachaco zijn transpiratie aanpast in aanwezigheid van droogte condities. De PEG in het medium zorgt ervoor dat er minder water kan worden opgenomen door de wortels, die op hun beurt het hormoon abscisinezuur (ABA) produceren. Dit hormoon zorgt er dan voor dat de stomatale openingen gaan verkleinen en waardoor de het verlies van water door transpiratie wordt verminderd [17]. Bij Dole er is geen significant verschil waargenomen in genormaliseerde transpiratie tussen controle en stress condities. Dit wil zeggen dat Dole zijn transpiratie niet aanpast in aanwezigheid van droogte. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat deze variëteit pas na langere blootstelling aan droogte zich gaat aanpassen hieraan. Een andere verklaring hiervoor is dat Dole zijn stomatale openingen verkleint in de namiddag om zo water te “besparen” in de warme uren. Hierdoor kan dan verwacht worden dat Dole korte periodes van droogte kan tolereren in tegenstelling tot de variëteiten die hun stomata open houden de hele namiddag [17]. Als de genormaliseerde transpiratie van Cachaco met die van Dole wordt vergeleken, dan is hier ook een significant verschil zichtbaar, namelijk Cachaco heeft een hogere transpiratie dan Dole. Een mogelijke verklaring hiervoor is de lengte van de maximale transpiratie. Deze was significant langer bij Cachaco dan bij Dole. Als Cachaco een langere periode heeft waarbij maximale transpiratie plaatsvindt, zal de uiteindelijke transpiratie ook hoger liggen dan bij Dole, die een kortere maximale transpiratie heeft.

Bij de lengte van de maximale transpiratie is er ook gekeken naar verschillen tussen de controle en stress condities. Hieruit volgde dat de behandeling geen significant verschil heeft in de lengte van de maximale transpiratie bij zowel Cachaco als Dole. Droogte heeft dus geen invloed op de lengte van de maximale transpiratie.

Naast de transpiratie is er ook gekeken naar het effect van droogte op de bladeren van de variëteiten. Zo is het aantal cellen en stomata geteld, waaruit de stomatale densiteit kan worden berekend.

Er is een afdruk gemaakt van het laatste en voorlaatste blad om een mogelijk effect te zien van de behandeling want het laatste blad is gevormd onder de stress condities, terwijl het voorlaatste blad nog gevormd is onder controle condities.

Bij Cachaco verandert het aantal cellen niet significant in stress condities ten opzichte van controle condities. Dit wil zeggen dat de bladeren van Cachaco gehydrateerd blijven bij blootstelling aan droogte stress [17]. Bij Dole is er echter een significant verschil in het aantal cellen tussen het laatst en voorlaatst gevormd blad bij zowel controle als stress. Zo heeft het laatst gevormd blad meer, en

dus kleinere cellen dan het voorlaatste. Een mogelijke reden hiervoor is dat de bladeren nog niet volledig volgroeit waren en dat de cellen nog verder moeten elongeren.

De resultaten van het aantal stomata zijn gelijkend op die van het aantal cellen. Ook hier is er enkel een significant verschil tussen het laatst en voorlaatst gevormd blad bij Dole. Dezelfde mogelijke reden geldt als hierboven, door de jonge leeftijd van de bladeren zijn de stomata nog niet volgroeit en worden er meer geteld.

Hierop volgt de vergelijking van de stomatale densiteit (aantal stomata/aantal cellen). Deze geeft over heel de parameters heen geen significant verschil. Dus de behandeling heeft geen invloed op de stomatale densiteit en er is geen verschil waarneembaar tussen Cachaco en Dole. Een mogelijke reden waarom de behandeling geen effect heeft gehad op de stomatale densiteit, is dat deze verhouding van cellen en stomata al vast lag voor de introductie van droogte.

6 Besluit

In deze thesis is vergelijking gemaakt tussen Cachaco en Dole die allebei het genotype ABB hebben, om een mogelijk verschil te ontdekken in het fenotype in de aanwezigheid van droogte. Cachaco verlaagt zijn transpiratie in aanwezigheid van droogte, terwijl de transpiratie onveranderd blijft bij Dole. Ook heeft Cachaco een langere periode van maximale transpiratie dan Dole, wat kan verklaren waarom Cachaco in het algemeen een hogere transpiratie heeft dan Dole.

Droogte heeft geen effect gehad op het aantal cellen, stomata en de stomatale densiteit van beide variëteiten. Hier kan echter wel op verder gebouwd worden door de grote van de stomata te meten en hoeveel van deze stomata open en toe zijn. Dit geeft dan meer inzicht op hoe de stomata zich gedragen in aanwezigheid van droogte.

Uit deze resultaten kan besloten worden dat er een verschil is in fenotype tussen de twee variëteiten Cachaco en Dole, hoewel ze hetzelfde genotype hebben.

Literatuurlijst

- [1] Australian Government, „The biology of Musa L. (banana),” Office of the Gene Technology Regulator, 2008.
- [2] X. Perrier, E. De Langhe, M. Donohue, C. Lentfer, L. Vrydaghs, F. Bakry, F. Carreel, I. Hippolyte, J.-P. Horry, C. Jenny, V. Lebot, A.-M. Risterucci, K. Tomekpe, H. Doutrelepont, T. Ball, J. Manwaring, P. de Maret en T. Denham, „Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication,” *PNAS*, vol. 108, nr. 28, pp. 11311-11318, 2011.
- [3] A.-C. Vanhove, W. Vermaelen, B. Panis, R. Swennen en S. C. Carpentier, „Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model en proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 3, pp. 1-10, 2012.
- [4] Frison, E.A., J. Escalant en S. Sharrock, „The global Musa genomic consortium: A boost for banana improvement,” [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/007/ae216e/ae216e0u.htm>. [Geopend 20 maart 2016].
- [5] „Production/Crops - Banana,” FAOSTAT, 2015. [Online]. Available: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. [Geopend 23 februari 2016].
- [6] R. Ortiz en R. Swennen, „From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain,” *Biotechnology Advances*, nr. 21, pp. 158-169, 2014.
- [7] A. Vézina, I. Van den Bergh en M. Rouard, „Morphology of the banana plant,” ProMusa, 17 maart 2016. [Online]. Available: <http://www.promusa.org/Morphology+of+banana+plant>. [Geopend 26 maart 2016].
- [8] „Banana,” Encyclopaedia Britannica, 17 juli 2015. [Online]. Available: <http://www.britannica.com/plant/banana-plant>. [Geopend 2 juni 2016].
- [9] I. Ravi, S. Uma, M. M. Vaganan en M. M. Mustaffa, „Phenotyping bananas for drought resistance,” *Frontiers in physiology*, vol. 4, pp. 1-15, 2013.
- [10] P. van Asten, A. Fermont en G. Taulya, „Drought is a major yeild loss factor for rainfed East African highland banana,” *Agricultural watermanagment*, vol. 98, pp. 541-552, 2011.
- [11] Reece, Urry, Cain, Wasserman, Minorsky, Jackson en Campbell, *Biology*, Pearson, 2011.
- [12] „Transpiration - Factors Affecting Rates of Transpiration,” Plant & Soil Sciences eLibrary, [Online]. Available: <http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1092853841&to picorder=6>. [Geopend 13 april 2016].
- [13] „LI-6400XT Portable Photosynthesis System,” LI-COR, [Online]. Available: <https://www.licor.com/env/products/photosynthesis/LI-6400XT/>. [Geopend 15 mei 2016].

- [14 „Plant Probe,” ASDi, [Online]. Available: <http://www.asdi.com/products-and-services/accessories/plant-probe>. [Geopend 15 mei 2016].
- [15 „SC-1 LEAF POROMETER FOR STOMATAL CONDUCTANCE MEASUREMENTS,” Decagon Devices, [Online]. Available: SC-1 LEAF POROMETER FOR STOMATAL CONDUCTANCE MEASUREMENTS. [Geopend 15 mei 2016].
- [16 „Lysimeter,” Wikipedia, 3 mei 2016. [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lysimeter>. [Geopend 15 mei 2016].
- [17 D. W. Turner, J. A. Fortescue en D. S. Thomas, „Environmental physiology of the bananas (musa spp.),” *Braz. J. Plant Physiol.*, vol. 19, nr. 4, pp. 463-484, 2007.
- [18 „Hydroponics,” Wikipedia, 11 april 2016 . [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroponics>. [Geopend 15 april 2016].
- [19 „Pisang Awak,” Wikipedia, 6 maart 2016. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Pisang_Awak. [Geopend 20 maart 2016].
- [20 „Grand Nain,” Wikipedia, 19 september 2014. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Grand_Nain. [Geopend 20 maart 2016].
- [21 A. Vézina, „Mbwazirume,” ProMusa, 29 september 2014. [Online]. Available: <http://www.promusa.org/Mbwazirume>. [Geopend 21 maart 2016].
- [22 „Namwa Khom,” Musa Germplasm Information System, [Online]. Available: <http://www.crop-diversity.org/mgis/content/01bel084659-namwa-khom-0>. [Geopend 13 april 2016].
- [23 „Basic physics of transpiration at plant leaves,” Postech BBRC, 21 juni 2014. [Online]. Available: <http://efcl.postech.ac.kr/rb/?r=home&m=bbs&bid=research01&uid=999>. [Geopend 13 april 2016].
- [24 Z. A. Tatrai, R. Sanoubar, Z. Pluhar, S. Mancarella, F. Orsini en G. Gianquinto, „Morphological and Physiological Plant Responses to Drought Stress in *Thymus citriodorus*,” *International Journal of Agronomy*, pp. 1-8, 2016.

Figurenlijst

FIGUUR 1: HOEVEELHEID BANANEN GEPRODUCEERD IN DE WERELD IN 2013 [5]	8
FIGUUR 2: DOORSNEDE BANANENWORTEL WAARUIT EEN ZIJDELINGSE WORTEL GROEIT [7].....	9
FIGUUR 3: EEN NIEUWGEVORMD BLAD IN DE VORM VAN SIGAAR [7]	9
FIGUUR 4: WEERGAVE TRANSPIRATIE IN DOORSNEDE BLAD [23].....	10
FIGUUR 5: WEERGAVE VAN EEN OPEN (LINKS) EN GESLOTEN (RECHTS) STOMA [11]	11
FIGUUR 6: WEERGAVE PLANT IN TEST	21
FIGUUR 7: WEERGAVE PROGRAMMA VOOR TELLING STOMATA.....	25
FIGUUR 8: WEERGAVE AANDUIDING STOMATA	25
FIGUUR 9: WEERGAVE AANDUIDING STOMATA OP HELE FOTO	26
FIGUUR 10: BOXPLOT PLANTGEWICHT VOOR EN NA DE PROEF.....	27
FIGUUR 11: OVERZICHT GENORMALISEERDE TRANSPIRATIE GEDURENDE DE DAG	28
FIGUUR 12: WEERGAVE VAN HET DAGEFFECT OP DE GEMIDDELDE TRANSPIRATIE	29
FIGUUR 13: WEERGAVE GENORMALISEERDE TRANSPIRATIE OP HET EINDE VAN DE DAG VAN CACHACO EN DOLE BIJ CONTROLE EN STRESS CONDITIES	30
FIGUUR 14: WEERGAVE LENGTE MAXIMALE TRANSPIRATIE IN MINUTEN MET BEHULP VAN EEN BOXPLOT	31
FIGUUR 15: WEERGAVE AANTAL CELLEN CACHACO EN DOLE VAN BLAD 1 EN 2 BIJ CONTROLE EN STRESS	32
FIGUUR 16: WEERGAVE AANTAL STOMATA CACHACO EN DOLE VAN BLAD 1 EN 2 BIJ STRESS EN CONTROLE.....	33
FIGUUR 17: WEERGAVE STOMATALE DENSITEIT CACHACO EN DOLE VAN BLAD 1 EN 2 BIJ CONTROLE EN STRESS	34

Tabellenlijst

TABEL 1: MASSA STOFFEN SOLUTION A AANWEZIG IN 1L EN 10L	15
TABEL 2: MASSA STOFFEN SOLUTION B2 AANWEZIG IN 1L EN 10L	15
TABEL 3: MASSA STOFFEN SOLUTION C AANWEZIG IN 1L EN 10L	15
TABEL 4: MASSA STOFFEN SOLUTION D AANWEZIG IN 1L EN 10L	15
TABEL 5: EINDCONCENTRATIE STOFFEN SOLUTION A IN HP/PEG MEDIUM	19
TABEL 6: EINDCONCENTRATIE STOFFEN SOLUTION B2 IN HP/PEG MEDIUM	19
TABEL 7: EINDCONCENTRATIE STOFFEN SOLUTION C IN HP/PEG MEDIUM	19
TABEL 8: EINDCONCENTRATIE STOFFEN SOLUTION D IN HP/PEG MEDIUM	19
TABEL 9: EINDCONCENTRATIE SEQUESTRENE IN HP/PEG MEDIUM EN EINDCONCENTRATIE PEG IN PEG MEDIUM	19

Bijlagen

Bijlage 1: staaloverzicht A15

Staalcode	Variëteit	Oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	Afvalverwijdering
1	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
5	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
6	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
7	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
9	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
10	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
11	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
12	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
14	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
16	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
17	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
20	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
22	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
23	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
25	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
27	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
28	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
32	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
37	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
39	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
40	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
41	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
46	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
50	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
51	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval

54	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
57	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
60	Namwa Khom-2012-2	ITC 0659	/	Restafval
61	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
62	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
67	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
68	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
73	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
75	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
77	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
81	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
82	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
83	Grand Naine-2012-1	ITC 0180	/	Restafval
91	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
92	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
95	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
96	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
97	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
98	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
103	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
104	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
106	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval
111	Fougamou-2012-2	ITC 0101	/	Restafval

Bijlage 2: Staaloverzicht A16

Staalcode	Variëteit	Oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	Afvalverwijdering
1	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
2	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
5	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
6	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
12	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
20	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
23	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
24	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
25	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
26	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
27	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
28	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
29	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
30	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
31	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
32	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
33	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
34	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
35	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
36	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
37	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
38	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
39	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
40	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
41	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
42	Cachaco-2015	ITC 0643	/	Restafval
43	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval

44	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
47	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
50	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
52	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
58	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
62	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
66	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
67	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
68	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
69	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
70	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
71	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
72	Dole-2012(2)	ITC 0767	/	Restafval
74	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
84	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
86	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
88	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
90	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
92	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
95	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
96	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
97	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
98	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
99	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
100	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
101	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
102	Giant Cavendish-2012	ITC 0345	/	Restafval
112	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
114	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
115	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval

116	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
124	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
125	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
127	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
128	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
129	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
130	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
131	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval
132	Mbwazirume-2014	ITC 1356	/	Restafval

