

Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente
Vestiging Aalsmeer
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
Tel. 0297-352525, fax 0297-352270

ISSN 1385 - 3015

ZIEKTEVRIJE VERMEERDERING BLOEMISTERIJGEWASSEN

Project 1822

H.-J. van Telgen
A. van Mil
Aalsmeer, november 1999

Rapport 227
Prijs f 20,00

Rapport 227 wordt u toegestuurd na storting van f 20,00 op banknummer
300 177 976 ten name van Proefstation Aalsmeer onder vermelding van 'Rapport
227, Ziektevrije vermeerdering bloemisterijgewassen'.

ISSN: 971204 .

INHOUD

Samenvatting	5
1. Inleiding	7
2. Materiaal en methoden algemeen	9
3. Resultaten en discussie	11
3.1 Phlox paniculata	11
3.2 Hydrangea macrophylla	12
3.3 Delphinium belladonna	14
3.4 Dieffenbachia	16
3.5 Paeonia lactiflora	18
3.6 Cymbidium	21
Literatuur	25
Bijlage 1: Samenstelling gebruikte media	
Bijlage 2: Schematische voorstelling meristeempreparatie	
Bijlage 3: Gebruikte afkortingen	

SAMENVATTING

Voor *Phlox*, *Hydrangea*, *Delphinium*, *Dieffenbachia*, *Cymbidium* en *Paeonia* zijn basisprotocollen voor meristeeencultuur ontwikkeld. Bij de vroegste inzettingen werd gebruik gemaakt van specifieke media zoals vermeld in de literatuur (George *et al.*, 1987, Arditti & Ernst, 1993). Daarnaast werd een algemeen meristeeen-medium geformuleerd. Aangezien de tolerantie van meristemen voor zoutsterkte groot lijkt (George, 1993b) en de zgn. specifieke media vooral van standaard MS-medium verschilden in ionensamenstelling, is een MS-formulering met gehalveerde concentratie anorganische macrozouten op geschiktheid getest. De gewassen die op dit medium (BMM-1; *Hydrangea*, *Delphinium*) of een hiervan afgeleid medium met extra fosfaat (BMM-2; *Dieffenbachia*) geïnitieerd werden, sloegen alle goed aan. Ook tussentijds overzetten van *Phlox*-meristemen naar BMM-2 gaf een goede groei te zien, zodat vermoed wordt dat initiatie van *Phlox* op BMM-2 ook mogelijk is. Alleen bij *Paeonia* werd gebruik gemaakt van een specifieke formulering, omdat uit vermeerderingsonderzoek was gebleken dat pioen slecht op MS-zouten groeit (Albers, 1993).

Voor uitgroei en vermeerdering voldeden de basismedia minder goed en was overzetten naar media waarin de concentratie macrozouten op volle sterkte was gebracht, noodzakelijk om aftakeling te voorkomen.

Een goede vergelijking tussen basismedia en specifieke media was moeilijk te maken. De aantallen meristemen die per dag uitgerepareerd kunnen worden zijn beperkt. Daarnaast waren enkele gewassen inwendig zo sterk bacterieel verontreinigd (*Hydrangea*, *Dieffenbachia*) dat vergelijkende behandelingen volledig uitvielen door besmetting.

Het verkrijgen van een bacterievrije cultuur was vaak lastiger dan het verkrijgen van een virusvrije cultuur. Om een cultuur bacterievrij te krijgen was een lange adem en vaak en veel inzetten noodzakelijk. Bij dit onderzoek zijn geen antibiotica gebruikt, aangezien antibiotica vooral bacteriostatisch, dus tijdelijk, werken. Bij die gewassen waarin na toetsing virus was aangetroffen (*Delphinium*, *Hydrangea*, *Cymbidium* en *Paeonia*) werden na meristeeencultuur (eventueel nog een keer herhaald: *Hydrangea*) gemiddeld 60-70% virusvrije planten verkregen. Hierbij werd nooit thermotherapie toegepast, maar waren de meristemen vooral zo klein mogelijk uitgesneden. Daarbij is het voordurend een keuze tussen klein genoeg snijden om een hoge kans op virusvrij te hebben en groot genoeg om levensvatbaar te zijn. Bij *Cymbidium* liep dit niet echt parallel. Alle verkregen *in vitro*-plantjes bleken goed toetsbaar, zowel via toetsplanten, ELISA als RT-PCR. Door de afwijkende groeiomstandigheden *in vitro* kan virusrePLICATIE en verspreiding anders zijn dan *in vivo* (Van Zaayen, pers. med.), maar hiervan bleek niets bij de hier onderzochte gewassen.

1. INLEIDING

De laatste jaren is bij de bloemenveilingen een groeiende aanvoer van de productgroep 'zomerbloemen'. Naast eenjarigen gaat het hier ook om snijbloemen afkomstig van vaste planten zoals *Aconitum*, *Asclepias*, *Delphinium*, *Paeonia* en *Phlox*. Veel van de uitgangsplanten van deze gewassen zijn besmet met virus of aaltjes. Daarnaast zijn in een aantal potplanten (o.a. *Hydrangea*, *Dieffenbachia*) hardnekkige inwendige besmetting met bacteriën aanwezig die bij de stekvermeerdering en teelt voor problemen zorgen. Met weefselkweektechnieken kan geprobeerd worden om gewassen weer ziektevrij te maken. Ruim 40 jaar geleden is meristeen-cultuur voor de eerste keer succesvol toegepast om dahlia vrij te maken van dahliamozaïekvirus (Morel & Martin, 1952). Andere belangrijke siergewassen zijn gevolgd: anjer, *Cymbidium*, *Pelargonium*. De techniek voor meristeen-cultuur is dus reeds lang bekend. De specifieke protocollen met betrekking tot de in de eerste alinea genoemde gewassen ontbreken echter. De oorzaak hiervoor ligt mogelijk in het feit dat veel van de genoemde teelten buitenteelten zijn, met grote kans op herbesmetting, waarbij ziektevrij maken niet als zinvol werd beschouwd. Ziektevrij betekent immers niet ziekteresistent: zonder voorzorgsmaatregelen tegen de overbrengrers kan altijd herinfectie plaatsvinden.

Niettemin zijn er een aantal goede redenen om te werken aan het ziektevrij maken van deze gewassen, gevolgd door strikte fyto-sanitaire maatregelen tijdens de teelt. De verliezen tengevolge van schade door virus-, bacterie- of aaltjesbesmetting kunnen enorm zijn (Barnett, 1988; De Lange *et al*, 1987)). Naast direct zichtbare schadesymptomen kan besmetting met virussen of bacteriën ook de algehele groei- en ontwikkelingsprocessen beïnvloeden, resulterend in lagere productie aan bloemen of zijscheuten, slechtere beworteling van stekken of een slechtere houdbaarheid van de bloemen. Bij *Astroemeria* bleken virusvrije planten ca. 50% meer bloemproductie te geven, een betere bloemkwaliteit en verminderde bladveroudering te vertonen ten opzichte van de met virus geïnfecteerde controle (Van Zaayen *et al*, 1992). Daarnaast heeft ziektevrij uitgangsmateriaal een grotere meerwaarde voor de export. Gegarandeerd ziektevrij materiaal kan vrijelijk geëxporteerd worden omdat het geen besmettingsbron kan zijn voor andere rassen uit dezelfde familie.

Naast het ontbreken van een basisprotocol voor bovengenoemde gewassen, is het beschikbaar zijn van een betrouwbare test om materiaal te kunnen testen op aanwezigheid van pathogenen minstens zo belangrijk. Voor sommige infecties is bijvoorbeeld niet goed bekend of de gebruikelijke ELISA-toetsingen uitgevoerd kunnen worden met *in vitro*-plantjes. Reden hiervoor is dat niet bekend of niet duidelijk is of de virussynthese en verspreiding in *in vitro*-plantjes op gelijke wijze plaatsvinden als in *in vivo*-planten.

De Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor Bloemisterij en Boomkwekerijgewassen (NAKB) heeft hierbij een belangrijke bijdrage geleverd door het beschikbaar stellen van hun kennis en het toetsen van de diverse verkregen cultures op de aanwezigheid van mogelijke ziekteverwekkers.

Het project 'Productie van ziektevrij uitgangsmateriaal via meristeen-cultuur' richtte zich op drie doelen:

- ontwikkeling van een basisprotocol om via meristeen-cultuur te komen tot ziektevrije vermeerderbare plantjes.
- opbouwen van een partijtje planten om te onderzoeken of de verkregen *in vitro*-plantjes voor toetsing geschikt zijn en daadwerkelijk ziektevrij waren.
- bij nog aanwezige besmetting mogelijkheid onderzoeken van hernieuwde meristeen-cultuur vanuit *in vitro*-plantjes, gevolgd door hernieuwde toetsing.

2. MATERIAAL EN METHODEN ALGEMEEN

2.1 UITGANGSPANTEN

Met uitzondering van *Hydrangea*, werd het uitgangsmateriaal voor de meristeemculturen van *Delphinium*, *Paeonia* en *Phlox* aangeleverd via de NAKB. *Hydrangea*-planten waren afkomstig uit een proef op het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente te Aalsmeer (PBGA). Jonge *Dieffenbachia*-planten werden geleverd via de NAKB. Voor het ontwikkelen van het basisprotocol werd uitgegaan van ongeteste planten. Voor het optimaliseren van het medium werd voor *Dieffenbachia* een bestaande *vitro*-cultuur beschikbaar gesteld door de NAKB.

Voor toetsen van de diverse protocollen op bruikbaarheid werden planten gebruikt die bij screening op bedrijven als 'verdacht' waren aangemerkt of waarin ziektes waren aangetoond.

2.2 INITIATIEMEDIUM

Wanneer in de literatuur bij verwante soorten van de bovengenoemde gewassen aanwijzingen waren voor behoefte aan specifieke mediumsamenstelling, is hiervan gebruik gemaakt. Dit wordt in de betreffende paragraaf vermeld.

Indien geen medium bekend was, werd als initiatiemedium een medium gebruikt met anorganische voedingszouten op basis van de formulering volgens Murashige & Skoog (MS; verder aangeduid als BMM-1) of Miller & Murashige (MM; verder aangeduid als BMM-2) op halve sterkte (zie Bijlage 1).

Alle gebruikte media bevatten verder micro- en spore-elementen volgens MS, vitaminen volgens MS op volle sterkte, 100 mg/l myo-inositol, 0.4 mg/l thiamine-HCl, extra ijzer in de vorm van FeEDDHA 48 mg/l, 20 g/l sucrose en 6.0 g/l agar (BBL granulated). Bij initiatie werden kinetine (1.0 mg/l) en indoolboterzuur (IBA; 0.1 mg/l) als groeiregulatoren gebruikt. Afwijkende concentraties groeiregulatoren worden in de desbetreffende paragraaf vermeld. De pH voor autoclaveren werd gesteld op pH 6.0.

2.3 UITWENDIGE ONTSMETTING

Uitwendige ontsmetting vond plaats in verdund natriumhypochloriet (bleekwater; actief chloorgehalte 1 of 2%) met daaraan toegevoegd 0.05% Tween-20 als uitvloeier. Na ontsmetting werd drie keer gespoeld in steriel demi-water. De meristemen werden op dezelfde dag uitgearbeid en ingezet. Waar speciale voorbehandelingen met het materiaal werden uitgevoerd wordt dit in de betreffende paragraaf vermeld.

2.4 MERISTEEMTECHNIEK

De meristeempreparatie werd uitgevoerd zoals beschreven in George (1993a). Inzetten van de meristemen gebeurde hoofdzakelijk op schuin gestolde agarbuizen. In enkele gevallen is gebruik gemaakt van papierbruggen of cellulosepluggen in vloeibaar medium. Dit wordt bij het betreffende gewas vermeld.

2.5 CULTUURROMSTANDIGHEDEN

Afhankelijk van het gewas werden de cultures in kweekkamers van 20 of 25°C geïncubeerd. Gedurende de initiatieperiode ontvingen de meristemen van alle culturen slechts indirect licht van belendende lampen (Philips TL 33, 30 Watt; gemiddeld lichtniveau 3-5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Nadat scheutjes waren ontstaan werd gedurende zestien uur per dag 1 TL33 aangeschakeld (ca 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ op plantniveau).

2.6 TOETSING

Toetsing op virus met behulp van de ELISA-techniek en toetsing op algemene bacteriebesmetting of *Erwinia chrysanthemi* werd uitgevoerd door het laboratorium van de NAKB. Toetsing op tabaksratelvirus in pioen werd uitgevoerd met behulp van de RT-PCR-techniek, zoals ontwikkeld in Lisse op het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek bij de afdeling Plantkwaliteit en toegepast bij de NAKB. Indien na twee onafhankelijke toetsingen geen besmetting was aangetroffen, werd aangenomen dat het materiaal vrij was van ziekteverwekkers.

2.7 HERNIEUWDE MERISTEEMCULTUUR

Indien na toetsing nog ziekteverwekkers in het materiaal aanwezig waren, werd in enkele gevallen geprobeerd of vanuit dit *vitro*-materiaal een nieuwe, ziektevrije meristeen-cultuur opgezet kon worden op hetzelfde meristeenmedium. Dit wordt bij het desbetreffende gewas vermeld.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 PHLOX PANICULATA

Probleem

P. paniculata kan besmet zijn door meerdere virussen. In *Phlox* zijn o.a. aangetroffen AMV, CMV-A, TMV, ArMV, TRV en PotyVirus

Onderzochte cultivar

'Bright Eyes'

Uitgangsmateriaal en voorbehandeling uitgangsplanten

Als uitgangsmateriaal werden in de volle grond gegroeide planten gebruikt. Na oogsten van de complete planten, werden deze aan de lucht gedroogd tot aanhangend water verdampt was. Dit om verdunning van de ontsmettingsoplossing te voorkomen. De scheuttoppen (3-4 bladparen) werden geoogst, ontbladerd en ontsmet in chloor. De uitgangsplant werd teruggesnoeid tot op twee à drie bladparen, opgepot en in de kas (19/16°C dag/nachttemperatuur) onder natuurlijke dag gezet om opnieuw vegetatieve scheuten uit te laten lopen.

Ontsmetting, initiatiemedium en methoden

Vegetatieve scheuttoppen werden gedurende tien minuten uitwendig ontsmet in 1% chlooroplossing met 0.05% Tween 20. Na 3x spoelen met steriel demi-water werden de meristemen uitgeprepareerd (zie Bijlage 2).

In het eerste experiment werden de meristemen ingezet op Tuleck-medium (zie bijlage 1) met 1.0 mg/l kinetine, 0.1 mg/l IBA en 1.0 mg/l GA₃ als groeiregulatoren.

Hierbij werden drie methoden gevolgd: buizen met schuin gestolde agar, papierbruggen in vloeibaar medium en cellulose-pluggen (Sorbarods®, Baumgartner Papier S.A, Lausanne) in vloeibaar medium.

In het tweede experiment werden meristemen geprepareerd uit de drie weken oude scheuten die waren gegroeid uit de okselknoppen van de teruggeknipte uitgangsplanten en ingezet op agarmedia in polystyreen petrischalen (12x50 mm; hoogte x diameter). Medium met macrozouten volgens Tuleck werd vergeleken met medium met macrozouten volgens Nielsen (George *et al*, 1987). GA₃ werd in dit experiment weggelaten. Als kweektemperatuur werd 20°C aangehouden.

Uitgroeiresultaat

Experiment 1:

Uitval ten gevolge van inwendige besmetting door bacteriën of schimmels was, gezien de vollegrond-herkomst van de uitgangsplanten, laag te noemen (15-30%). Het eerste teken van actieve groei was het groen worden van de geïsoleerde meristemen. Na ongeveer vier weken waren er al verschillen tussen de gevolgde methoden zichtbaar: op schuin agar medium waren de meristemen duidelijk beter uitgegroeid dan op papierbruggen of cellulosepluggen. Daarom werden alle meristemen naar vers Tuleck agar-medium gezet voor verdere uitgroei. Na opnieuw vier weken was zijscheutvorming opgetreden; wel trad vergeling van de planten op.

Daar dit mogelijk een gevolg was van de hoge concentratie aan Na⁺-ionen in Tuleck-medium, werden de scheutjes vanaf twaalf weken na het begin van de meristeamcultuur verder vermeerderd op Miller & Murashige medium (George *et al*, 1987) met als doel het opbouwen van een aantal lijnen voor toetsing op aanwezigheid van een aantal virussen. De groei en vermeerdering verliep zeer langzaam op dit

medium; dit probleem valt echter buiten het doel van dit project.

Experiment 2:

Hierbij waren de meristemen afkomstig van ca. 3 cm lange scheutjes die na het terugknippen van de opgepotte uitgangsplanten uit de overgebleven okselknoppen waren gegroeid. Een goede vergelijking tussen de twee gebruikte initiatiemedia kon niet gemaakt worden, daar binnen een week na inzet alle meristemen op Tuleck-medium inwendig besmet bleken met bacteriën. De overgebleven meristemen op Nielsen-medium groeiden zeer slecht uit, zodat het experiment na enkele weken gestopt is.

Toetsing

Negen maanden na initiatie van de meristeamcultuur waren enkele honderden plantjes, verdeeld over vier lijnen verkregen. De helft van de plantjes werd op het NAKB-laboratorium met behulp van ELISA getoetst op AMV, ArMV, CMV-A, PotyVirus, TMV en TRV. In geen van de lijnen werd virus aangetroffen.

Conclusie

Meristeamcultuur van *P. paniculata* bleek goed mogelijk. Als initiatie-medium voldeed Tuleck-medium. Voor verdere uitgroei voldeed medium volgens Miller & Murashige beter dan Tuleck-medium. Aangezien de tolerantie van meristemen voor zoutsterkte groot lijkt (George, 1993b), lijkt de veronderstelling gerechtvaardigd dat initiatie van de cultuur ook kan plaatsvinden op MM-medium (eventueel macro-elementen 1x verdund). Gebruik van eenzelfde medium voor initiatie en de doorvermeerdering en beworteling zou standaardisatie van de werkwijze verhogen en de kans op fouten bij de mediumbereiding verlagen.

De uitgroei van meristeam naar vermeerderbaar plantje en de doorvermeerdering duren bij *Phlox* behoorlijk lang. Door de sterke apicale dominantie van dit gewas worden maar weinig zijscheuten gevormd. Verhoging van de cytokinine-concentratie veroorzaakte een sterke callusgroei aan de basis, maar geen verhoogde vermeerdering. Mogelijk is de langzame groei meer een gevolg van gelimiteerde opname van nutriënten uit het medium via de (dunne) stengelbasis. De oplossing van dit probleem ligt echter buiten het bestek van dit project.

3.2 *HYDRANGEA MACROPHYLLA*

Probleem

H. macrophylla kan inwendig besmet zijn met bacteriën en/of met HRSV. In beide gevallen kan dit groeivertraging en kwaliteitsverlies opleveren. Het is onbekend in hoeverre inwendige bacteriebesmetting een rol speelt in het optreden van knoprot bij de trek.

Onderzochte cultivar

'Renate Steiniger'

Uitgangsmateriaal en voorbehandeling uitgangsplanten

Voor het initiëren van de meristeamcultures werden planten gebruikt die in het voorjaar van 1994 op het PBG waren opgeplant uit weefselkweekplantjes. Na een korte kasperiode hadden deze planten gedurende de zomer op het veld gestaan. Tijdens de veldperiode kan een hoge mate van bacteriebesmetting optreden. Uit onderzoek is gebleken dat 69% van alle ingezette meristemen, afkomstig van buiten geteelde planten van verspreide locaties in Ierland en Groot-Brittanië, inwendig besmet waren met bacteriën (Cassells & Tahmatsidou, 1996). Voor een groot deel waren dit niet specifieke

plantpathogene bacteriën als *Erwinia* of *Agrobacterium*, maar *Pseudomonas*- of saprofytische *Enterobacter*-isolaten, afhankelijk van de gebruikte teeltmethode.

Bij de eerste twee inzetten van meristeeamcultures vanuit de op het PBG geteelde planten bleek, dat alle planten inwendig besmet waren met bacteriën (zie volgende paragraaf); bovendien waren de meeste eindgroeipunten reeds generatief geworden. Besloten werd een nieuwe partij planten een voorbehandeling te geven. Aangezien *Hydrangea* niet hittetolerant is, werd geen warmtebehandeling gegeven maar een etioleringsbehandeling. Deze werd uitgevoerd door de planten terug te snoeien, gesnoeide planten gedurende zes weken in het donker in een klimaatkast (dag/nacht-temperatuur: 25/20 °C) te zetten en de (vegetatieve) okselknoppen te laten uitgroeien. Gehoopt werd dat het groeipunt door de zeer snelle strekking de bacterie- en/of virusbesmetting voor zou blijven.

Ontsmetting, initiatiemedium en methoden

Bij de eerste twee pogingen waren de van onbehandelde planten geknipte en ontbladerde stengelstukjes met okselknoppen gedurende 15' in 1% chloor uitwendig ontsmet. De volgens standaardmethode (Bijlage 2) geprepareerde meristemen werden gelijkmatig verdeeld over BMM-1 (zie Bijlage 1) of BMM-1 waarin de gebruikelijke macrozouten waren vervangen door macrozouten volgens Gamborg (George *et al.*, 1987) op halve sterkte. Door inwendige besmetting werden geen schone meristemen verkregen (Tabel 1).

Van de voorbehandelde planten werden de eindtoppen van de geëtiolerde scheuten gebruikt. Deze werden gedurende 10 of 20 minuten in 1% of 2% chloor ontsmet. Hieruit werden volgens de standaardmethode de meristemen geprepareerd en ingezet op schuine agarbuizen met BMM-1 bij 20° C.

Tabel 1 - Infectiepercentages bij inzet Hydrangea-meristeeamcultuur

Inzet Nr.	Voorbehandeling	Ontsmetting (min, % chloor)	N _{ingezet}	N _{over}	Infectie (%)
1	geen	15' 1%	48	0	100
2	geen	15' 1%	64	0	100
3a	etiolering	10-20' 1%	22	0	100
3b	etiolering	10-20' 2%	25	3	88
4	etiolering	20' 2%	n. b.	0	100

n.b.: niet bepaald

Twee weken na inzet werd het licht boven de meristeeamcultures ingeschakeld. Van de beide behandelingen met 1% chloor waren alle 22 geïsoleerde meristemen door bacteriële besmetting uitgevallen. Van de behandeling met 2% chloor gedurende 10 minuten was nog één meristeeam (van de oorspronkelijke 15) over; van de 20 min ontsmetting bleken nog twee (van de 10) onbesmet.

Uitgroeiresultaat

De drie 'schone' meristemen waren na achttien weken uitgroeid tot vermeerderbare plantjes. Verdere uitgroei en vermeerdering tot drie partijen toetsbare plantjes vond plaats op medium volgens Miller & Murashige (zie Bijlage 1) met 0.5 mg/l kinetine bij 25

°C en 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ licht (Philips TL33).

Toetsing en hernieuwde meristeemcultuur

Van de drie lijnen werden de topjes geoogst voor instandhouding. De basale gedeelten werden getoetst op aanwezigheid van systemische bacteriebesmetting en HRSV. Alle lijnen bleken vrij van bacteriën, maar nog wel besmet met HRSV.

Daarom werden uit de geoogste topjes opnieuw de meristemen geprepareerd en ingezet op BMM-1 of BMM met ½ sterkte Gamborg B5 macrozouten, zowel bij 20 als 25°C. In vergelijking met de oorspronkelijk inzet groeiden deze meristemen aanzienlijk sneller uit tot vermeerderbare plantjes (in 8 weken in plaats van 18 weken). Daarbij bleek ook dat de plantjes op BMM-1 medium bij 25°C duidelijk beter groeiden. Alle meristeemlijnen zijn daarom verder aangehouden op dit medium en deze temperatuur.

Uiteindelijk werden uit de oorspronkelijke drie lijnen, 36 nieuwe meristeemlijnen vermeerderd en getoetst op HRSV. Hierbij bleken 23 lijnen vrij te zijn van virus. Deze virusvrije plantjes werden opnieuw vermeerderd en na twee cycli opnieuw getoetst op virus. Alle lijnen bleken opnieuw virusvrij.

Conclusie

De meeste *Hydrangea*-planten afkomstig van een buitencultuur (en waarschijnlijk ook de stekken daarvan) zijn inwendig besmet met bacteriën. Het verkrijgen van bacterievrije culturen bleek zeer moeilijk. Voorbehandeling via een etioleringsbehandeling en middel-zware ontsmetting (2% chloor) leverde weliswaar bacterievrije lijnen op, maar vanwege het lage aantal overgebleven meristemen is het moeilijk een duidelijke uitspraak te doen of dit het gevolg was van de voorbehandeling of de ontsmettingsprocedure, of dat enkele uitgangsplanten toch bacterievrij zijn geweest. Herhaling van de voorbehandeling met gestekte planten in het voorjaar leverde niets op; door *Botrytis* vielen alle planten uit. Veel culturen opzetten uit veel verschillende planten lijkt voorlopig de enige remedie om bacterievrije culturen te verkrijgen. Ontsmetting met 2% chloor lijkt beter; de meristemen overleefden deze behandeling in ieder geval wel.

Voor toetsing op HRSV was het goed mogelijk *vitro*-plantjes te gebruiken. Blijkbaar vermeerderd en verspreid het virus zich redelijk homogeen in dit materiaal. Na hernieuwd meristemen uit groeitoppen van *vitro*-plantjes was in 64% van de verkregen lijnen geen HRSV meer aan te tonen, ook niet na herhaalde toetsing na twee groeicycli. Om HRSV-besmette *Hydrangea* virusvrij te maken, is het verstandig eerst een bacterievrije *vitro*-cultuur op te zetten (wat niet per se via meristeemcultuur hoeft) om vervolgens vanuit deze *vitro*-plantjes met behulp van meristeemcultuur het virus te elimineren.

3.3 DELPHINIUM BELLADONNA

Probleem:

De afgelopen tien jaar is *Delphinium* een belangrijke snijbloem geworden. *Delphinium* kan besmet zijn met diverse virussen. Aangetroffen zijn o.a. CMV-A en PotyVirus. Verder zijn er meldingen van ArMV en TRV. Vermoed wordt dat virusbesmetting productie- en kwaliteitsverlies kunnen veroorzaken. Daarnaast is het in verband met certificering ten behoeve van de export noodzakelijk over virusvrij uitgangsmateriaal te beschikken.

Uitgangsmateriaal en voorbehandeling uitgangsplanten

Als uitgangsmateriaal werden in de volle grond gegroeide planten gebruikt. Midden september werden de complete planten geoogst, schoongespoeld en aan de lucht gedroogd. Alle bovengrondse delen werden afgeknipt; de basis van de plant werd zo opgepot dat de wortelhals boven de grond uitstak. Gedurende zes weken werden de

planten in de gelegenheid gesteld vanuit de okselknoppen nieuwe vegetatieve scheuten te vormen, zowel in de kas (onder natuurlijke dag, dag/nachttemperatuur 19/16°C) als in een klimaatkast (daglengte 8 uur, dag/nachttemperatuur 35/30 °C). Door het aanleggen van een hogere temperatuur in de klimaatkast werd gehoopt dat, analoog aan het effect van warmtetherapie bij virusbesmettingen, versnelde groei de verspreiding van bacteriën voor zou blijven. Om besmetting van de bovengrondse delen te reduceren, werd water gegeven via de schotel.

Ontsmetting, initiatiemedium en methoden

De in zes weken nieuw gevormde scheuten werden van de plantbasis afgesneden, overtollig blad verwijderd en gedurende 10 of 20 minuten in 2% chlooroplossing gesteriliseerd. Na sterilisatie werd het merg van de uitgangsplant weggesneden en het meristeem voorzichtig uitgepeld (zie Bijlage 2). Het uiteindelijke explantaat, bestaande uit het meristeem en twee of drie bladprimordia, werd ingezet op BMM-1. De cultuuromstandigheden in de kweekruimte waren 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ licht (TL 33, gedurende 16 uur/dag) en 15°C. De uiteindelijke infectiepercentages na vier weken staan weergegeven in tabel 2.

Tabel 2 - Effect voorbehandeling en ontsmettingsduur op infectiepercentage

Voorbehandeling	10 min, 2% chloor	20 min, 2% chloor
Klimaatkast, 35/30°C	50	60
Kas, 19/16°C	33	29

Uit de infectiepercentages blijkt dat voorbehandeling bij hoge temperatuur eerder een verslechterend effect heeft (Tabel 2). Waarschijnlijk door de hogere verdamping en daarmee samenhangend de hogere watertransportstroom, kunnen inwendige bacterie-infecties zich beter door de plant verspreiden. Ook blijkt geen duidelijk voordeel van een langere ontsmetting.

Uitgroeiresultaat

Binnen één week na inzet was bij een aantal meristemen al duidelijk groei aanwezig. Wel was fenoloxidatie in het medium waar te nemen, een bekend verschijnsel bij *in vitro* kweek van *Delphinium* (Van Telgen *et al.*, 1990). Twee weken na inzet hadden zich duidelijk miniplantjes gevormd, waarbij de fenoloxidatie niet doorzette. Drie weken na inzet werden deze miniplantjes naar vers BMM-1 medium gezet. Na vier weken op dit medium was de kwaliteit van de plantjes aan het afnemen (vergelijking, bladafsterving). Daarom werden alle plantjes overgezet naar standaard *D. elatum*-medium (Van Telgen *et al.*, 1990) en opgekweekt bij 20 °C. Hieruit werden te toetsen partijtjes opgebouwd.

Toetsing

Voor toetsing was 0.5 g plantmateriaal (ca. acht vitro plantjes) voldoende. Er werden zestien meristeemlijnen getoetst, zowel acht weken oud materiaal als net doorvermeerderde vitro plantjes. Alle lijnen waren vrij van CMV-A; één van de zestien vers ingezette plantjes bleek positief te zijn voor potyvirus. In de acht weken oude uitgangsplanten was dit niet aantoonbaar. Dit suggereert dat PVY onregelmatig verdeeld is in *in vitro*-plantjes en gebiedt voorzichtigheid bij het toetsen. Door sterke

aftakeling van de cultuur zijn geen pogingen gedaan om hernieuwde meristeemcultuur uit *vitro*-materiaal uit te voeren.

Conclusie

Meristeemcultuur vanuit net uitgroeïende okselknoppen van *Delphinium* is goed mogelijk. Om de uitwendige besmettingsgraad te verlagen is het verstandig de planten na terugsnoeien hoog op te planten, zodat de wortelhals met daarop de uitlopende okselknoppen, niet in contact zijn met de grond. Om dezelfde reden dient de watergift uitsluitend via plantschotels te gebeuren.

Temperatuurbehandeling om de inwendige bacteriebesmetting te verlagen lijkt niet zinvol. Initiatie van de meristeemcultuur ging goed op BMM-1 met kinetine en IAA. Voor verdere groei is het beter de plantjes na twee cycli van drie weken bij 15° over te zetten naar *Delphinium*-medium (Van Telgen *et al*, 1990) en 20 °C.

In één van de getoetste jonge scheuten was PotyVirus aanwezig, terwijl dit niet aangetoond kon worden in het plantje waarvan deze scheut afkomstig was. Dit betekent dat mogelijk maskering kan optreden en maakt herhaalde toetsing noodzakelijk.

3.4 DIEFFENBACHIA

Probleem

Dieffenbachia kan besmet zijn met de bacterie *Erwinia chrysanthemi*. Dit geeft problemen bij de vermeerdering via stek. Besmette planten blijven achter in groei.

Onderzochte cultivars: 'Camilla', 'Carina' en 'Compacta'

Uitgangsmateriaal en voorbehandeling uitgangsplanten

Jonge *Dieffenbachia*-planten werden geleverd via de NAKB. Voor het ontwikkelen van het basisprotocol werd uitgegaan van ongeteste planten, die op een eb/vloed systeem geteeld waren. In de twee weken voorafgaande aan de inzetten werden de planten bij 20 °C in de kas gezet om de potkluif goed te laten indrogen.

Voor het optimaliseren van het uitgroeiemedium werden door de NAKB voor alle drie *Dieffenbachia*-cultivars schone *in vitro* scheutculturen beschikbaar gesteld. Deze werden gebruikt om het vermeerderingsmedium te optimaliseren.

Ontsmetting, initiatiemedium en methoden

Voor inzet werden de planten uit de pot gehaald, de potgrond afgeschud en onder de grond gegroeide scheuten afgesneden. De jonge bladeren zijn als het ware rond het meristeem gerold (zie Bijlage 2). De scheutjes werden schoongespoeld met stromend leidingwater. Voor de uitwendige ontsmetting werden de scheuten getrimd tot 3-6 cm door overtollig blad en merg af te snijden.

Als initiatiemedium werd BMM-2 gebruikt waaraan 80 mg/l adeninesulfaat was toegevoegd. De meristemen werden zowel bij 20 als 25°C gekweekt.

Bij de inzet van 'Carina' en 'Compacta' werd eenmalig gesteriliseerd in 2% chlooroplossing gedurende 30 minuten. Dit bleek onvoldoende, want na één week bleek 95% van de meristemen bacterieel besmet (Tabel 3).

Bij de cultivar 'Camilla' werd de ontsmettingsprocedure uitgebreid. Na de uitwendige ontsmetting (20 minuten, 2% chloor) werd ook tussendoor na het verwijderen van enkele opgerolde bladeren, gedurende twee of drie keer gedurende 1-2 minuten ontsmet in 1% chloor.

Tabel 3- Infectie percentages *Dieffenbachia* meristeemcultuur

Cultivar	Ontsmetting (min, % chloor)	N _{ingezet}	N _{over}	Infectie (%)
Carina	30', 2%	22	1	95.4
Compacta	30', 2%	21	1	95.2
Camilla	20', 2% + 3x1', 1%	39	15	61.5

Als het meristeem bereikt was, werd dit klein uitgesneden, gedurende 15 seconden ontsmet in een grote druppel 1% chloor. Daarna werd het meristeem ingezet op initiatiemedium. Na vier weken was nog bijna 40% van de ingezette meristemen vrij van besmetting.

Uitgroeiresultaat

Alle gebruikte *Dieffenbachia*-cultivars bleken *in vitro* langzame groeiers. Binnen twee weken was duidelijk dat bij 25°C de meristemen beter uitgroeiden; daarom werden alle overgebleven meristemen van 20°C naar 25°C gezet voor verdere uitgroei. Vijf weken na inzet hadden vijf van de in totaal achttien overgebleven meristemen een blad gevormd. Tien weken later was dit ook bij de overige meristemen het geval en werden de plantjes overgezet naar vermeerderingsmedium met 16 mg/l 2-iP en 2 mg/l IAA (Voyiatzi & Voyiatzis, 1992); dit medium bleek echter niet voor de hier gebruikte omstandigheden te voldoen. Aan de basis van de scheuten ontstonden grote proppen hard callusweefsel met wortels.

In parallelexperimenten met bestaande scheutcultures werd daarom dit medium verder geoptimaliseerd. Na verwijdering van de callusprop werden de scheuten verdeeld over vermeerderingsmedium met verschillende combinaties van kinetine en IAA. Hierbij was bij 2 mg/l kinetine de kwaliteit van de plantjes het beste vergeleken bij de overige behandelingen (geen bladvergeling, geen callus). Alle van meristeem afkomstige scheuten werden doorvermeerderd op dit medium in een zesweekse cyclus bij 25°C bij een TL-lichtsterkte van 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ondanks de aanwezigheid van kinetine vond sterke wortelvorming in de buis plaats. De vermeerderingsfactor varieerde van 1.8 tot 2.3 per zes weken en werd niet hoger door toediening van vloeibaar medium of verwijderen van overtollig blad. Tijdens de *in vitro*-fase ging de bladtekening van alle cultivars verloren; binnen enkele weken na *ex vitro*-beworteling in steenwolplugjes en afharding, vertoonden alle nieuw ontwikkelende bladeren echter weer de normale bladtekening. De reden van het patroonverlies zou de relatief lage lichtintensiteit onder *in vitro*-omstandigheden kunnen zijn.

Toetsing

Alle via meristeem verkregen lijnen zijn met ELISA getoetst op aanwezigheid van *Erwinia chrysanthemi*. In geen van de bemonsterde plantjes werd deze bacterie aangetroffen. Op het vermeerderingsmedium werden wel een gele en witte uitscheiding in de agar waargenomen. Na stempelen op een algemene bacteriebodem groeiden inderdaad gele en witte kolonies uit. Bij de witte uitscheiding vond in een deel van de gevallen geen uitgroei plaats. Bij onderzoek van de uitscheiding onder de microscoop werden geen bacteriën waargenomen; waarschijnlijk betrof het hier een plantaardige uitscheiding. De beide systemische bacteriekolonies zijn niet verder getypeerd. Door consequent de via stempelen vastgestelde besmettingen uit de cultuur te verwijderen kon uiteindelijk schone cultures verkregen worden.

Conclusie

Vrijwel alle *Dieffenbachia*-planten blijken uitwendig besmet met bacteriën. Standaardontsmetting met 2% chloor bleek onvoldoende; blijkbaar bevindt veel van de besmetting zich tussen de opgerolde ontwikkelende bladeren. Voor afdoende uitwendige ont-smetting is herhaalde sterilisatie in 1% chloor tijdens het uitprepareren van het groei-punt noodzakelijk. Overigens blijft dan nog wel de kans op inwendige bacterie-infecties aanwezig. Door meristemen op te zetten konden bacterievrije cultures verkregen worden. Echter, lange tijd na inzet vielen nog regelmatig plantjes uit door hardnekkige, sys-temische bacterie-infecties. Het is dus wel noodzakelijk om de opgezette cultures gedu-rende langere tijd na initiatie te toetsen op sluimerende infecties. Uitgroei en doorver-meerding gaan langzaam. Het verdwijnen van bladtekening *in vitro* herstelt zich weer in de kas.

3.5 PAEONIA LACTIFLORA

Probleem

Pioenroos is de laatste jaren sterk in opkomst als snijbloem. Het meest optredende virus bij pioenrozen is een stam van tabaksratelvirus (TRV). Dit RNA-virus wordt overge-bracht via aaltjes en is moeilijk aan te tonen in een vroeg stadium van infectie. Het is mogelijk dat dit virus onvoldoende manteleiwit maakt om via serologische methoden als ELISA aan te kunnen worden aangetoond. Bij zware infecties ontstaan wel symptomen. Het vermoeden bestaat dat opbrengstderving en kwaliteitsverlies optreden. Ook voor certificering ten behoeve van export is virusvrij materiaal vereist.

Onderzochte cultivars

Sarah Bernhardt, Shirley Temple, Karl Rosenfeld, Red Champion

Uitgangsmateriaal en voorbehandeling uitgangsplanten

Voor het ontwikkelen van de methode werden in oktober gerooide planten van de culti-vars Sarah Bernhardt (2 planten), Shirley Temple (3 planten) en Karl Rosenfeld (1 plant) gebruikt, die geen zichtbare symptomen van TRV-besmetting hadden.

Voor toetsing van de procedure werd twee planten van cultivar Red Champion gebruikt: in plant 1 was op grond van waargenomen symptomen TRV-besmetting vastgesteld; plant 2 werd verdacht van TRV-besmetting, maar in de planten was geen virus aangetoond.

Aangezien knollen vaak sterk verontreinigd zijn met schimmels en bacteriën werd een voorbehandeling uitgevoerd. Na aanhangende grond met leidingwater te hebben afge-spoeld, ondergingen de knollen gedurende 30 minuten een warmwaterbehandeling (wwb) bij 45 °C in 0.1% chloor. Na drogen aan de lucht werden de knollen met steriele messen in kleinere stukken met vijf tot zeven neuzen gesneden, in niet-afgesloten plastic bakken op 2-3 cm vochtig perliet gelegd (neuzen niet in aanraking met perliet) en bij 20°C in het donker geïncubeerd. Tussentijds werden de knollen afwisselend behandeld met Rovral (0.5 g/l) of Eupareen (0.5 g/l) om schimmelbesmetting te voorkomen. Door de wwb wordt de rust doorbroken en beginnen de neuzen uit te groeien. Voor meristeemisolatie werden knolstukken geoogst en de uitgegroeide neuzen afgesneden. Vanwege de grootte werd één plant van Shirley Temple in twee delen verdeeld die apart, op verschillende tijdstippen werden opgezet.

Ontsmetting, initiatiemedium en methoden:

De geïsoleerde neuzen werden uitwendig ontsmet door ze gedurende één minuut in 3% Dettol te dompelen, kort te spoelen met steriel water en vervolgens gedurende tien

minuten nogmaals te ontsmetten in 1 of 2% chloor. Na uitvoerig spoelen met steriel water, werden de meristemen onder het binoculair uitgerepareerd (Bijlage 2). Hierbij bleek dat het hoofdmeristeem vaak al generatief was, zodat voor isolatie van meristemen ook de (vegetatieve) okselknoppen zijn gebruikt (voor methode zie bijlage). De meristemen werden zo klein mogelijk gesneden en ingezet op gemodificeerd Quoirin & Lepoivre medium (zie Bijlage 1) met 0.5 mg/l BAP als groeiregulator bij 15°C en indirect licht. De besmettingspercentages waren redelijk tot zeer laag (Tabel 4), zodat geconcludeerd mag worden dat de voorbehandeling en uitwendige ontsmetting redelijk effectief zijn.

Tabel 4- Gemiddelde infectie percentages meristeemcultuur pioenroos vier weken na inzet.

Cultivar	Ontsmetting	N _{ingezet}	N _{over}	Infectie (%)
Sarah Bernhardt, plant 1	10' 1%	25	22	12
Sarah Bernhardt, plant 2	10' 2%	11	10	9
Shirley Temple, plant 1a	10' 1%	24	1	58.3
Shirley Temple, plant 1b	10' 2%	24	17	29.2
Shirley Temple, plant 2	10' 1%	16	14	12.5
Shirley Temple, plant 3	10' 2%	54	35	35.2
Karl Rosenfeld	10' 1%	24	22	8.3
Red Champion, plant 1	10' 2%	43	28	34.9
Red Champion, plant 2	10' 2%	28	26	7.1

De waargenomen infecties waren vooral uit het materiaal zelf afkomstig. Er bestonden behoorlijke verschillen in inwendige infectiegraad tussen cultivars, maar ook tussen delen van planten van één cultivar (Shirley Temple, plant deel 1a. resp. 1b). Dit kan betekenen dat inwendige besmetting niet gelijk in de plant verdeeld is.

Uitgroeiresultaat

De meristemen groeiden maar langzaam uit op het initiatiemedium. Van de zeer klein uitgesneden meristemen (apex met max. twee bladprimordia) vielen regelmatig exemplaren af; deze vertoonden geen groei of vormden misvormde scheutjes. Het lijkt er dus op dat er een kritische grootte is waaronder geen of slechte groei plaatsvindt. Groter uitsnijden verkleint echter wel de kans op viruseliminatie. Drie maanden na inzet werden de wel uitgroeide meristemen overgezet naar vers initiatiemedium. Dit stimuleerde de groei en zijscheutvorming. Vervolgens werd in een achtweekse cyclus doorvermeerderd op standaard pioenmedium (Albers, 1993) om voldoende materiaal voor toetsing te verkrijgen.

Toetsing

Toetsing op TRV in pioen is moeilijk door de lage virusgehalten. Daarnaast is het mogelijk dat er een ongelijke verdeling is van het virus in *in vitro*-plantjes (Van Zaayen, pers. med.). In samenwerking met T. Derks (LBO) zijn met behulp RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) oriënterende toetsingen uitgevoerd met uit meristeem verkregen plantjes afkomstig van de TRV-geïnfecteerde cultivar Red Champion. Ten-

einde het best te toetsen plantendeel te vinden, werden de *vitro*-plantjes verdeeld in blad, stengel en bodem. In alle delen kon via RT-PCR virus aangetoond worden; het beste beeld werd verkregen met bladmateriaal (Figuur 1).

Naar aanleiding van dit resultaat is ook bladmateriaal van de andere verkregen meristeemlijnen op het NAKB-laboratorium getoetst op TRV. Vier van de in totaal 49 verschillende monsters reageerden positief in de RT-PCR. Het betrof hier de al eerder positief bevonden plant van Red Champion en de tweede, TRV-verdachte, Red Champion plant. Hoewel met gangbare methoden geen virus in deze plant was aangetroffen, bleek de PCR-toets gevoelig genoeg om duidelijk uitsluitsel te geven. Twee meristeemlijnen afkomstig van okselknoppen uit neuzen van onverdachte Sarah Bernhardt-planten bleken ook positief te reageren.

Figuur 1: Resultaat RT-PCR op agarose gel. Laan 2,3,4: RNA-extract uit resp. blad, steel en bodem van meristeemlijn Red Champion 1-11-1; laan 5,6,7 : idem, meristeemlijn 1-5-1; laan 9, 10,11: idem, meristeemlijn 1-15-1. Laan 1, 8 en 15: DNA-markers; 12, 13, 14: controle PCR uit gezuiverd TRV-RNA.

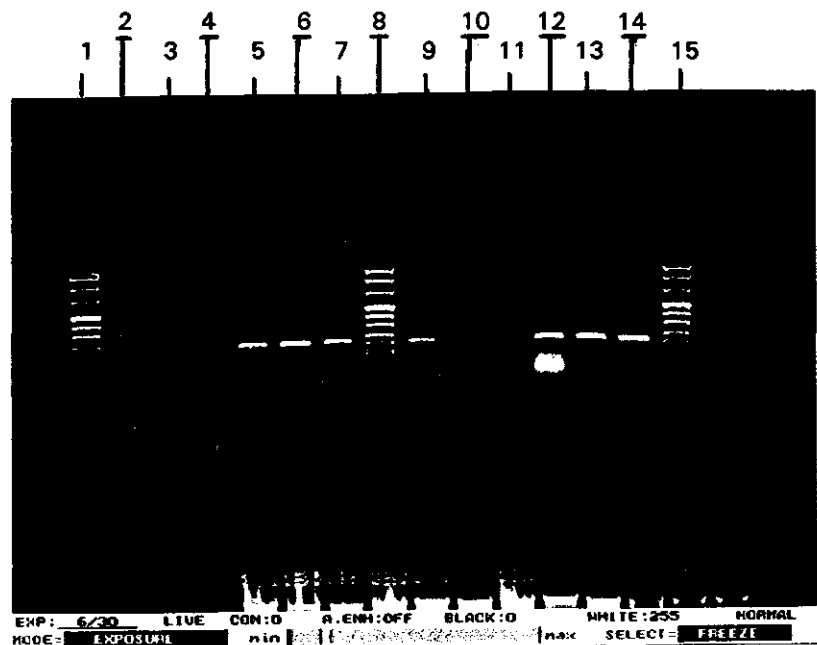
Opvallend was dat deze beide TRV-geïnfecteerde meristeemlijnen van Sarah Bernhardt afkomstig waren van de oudste okselknop in de neus. In lijnen gegroeid uit meristemen uit jongere okselknoppen van dezelfde neus werd geen virus aangetoond. Dit suggereert dat het virus zich langzaam verspreidt en een goede kans bestaat om in een vroeg stadium van de infectie virusvrije meristemen te isoleren uit rustende okselknoppen. Dit in tegenstelling tot de bevindingen bij iris, waarbij uit het hoofdgroei punt meer virusvrije meristemen konden worden geïsoleerd dan uit okselknoppen (90% resp. 30%; M. van Schadewijk, pers.med.).

In het geval van Red Champion plant 1 waarin duidelijke symptomen aanwezig waren, bleek het niet mogelijk om virusvrij materiaal te verkrijgen. In alle lijnen uit deze plant die PCR-getoetst zijn, werd virus aangetoond. Blijkbaar is bij zichtbaar zijn van symptomen de infectie al zover verspreid in de plant dat er geen virusvrije okselknoppen meer zijn. Hernieuwde meristeemcultuur uit deze *vitro*-plantjes is niet uitgevoerd, vanwege de slechte kwaliteit van deze plantjes mogelijk als gevolg van de virusbesmetting.

Eindopbrengsten zijn moeilijk te bepalen. Bij de ontwikkeling van bovengenoemde methode was ook van belang of en hoe de plantjes op virus getest moeten worden. Gepoogd is de opbrengst te bepalen uitgaande van het oorspronkelijke aantal ingezette meristemen. Gedurende zestien maanden zijn deze in cultuur gehouden en bij iedere

einde het best te toetsen plantendeel te vinden, werden de *vitro*-plantjes verdeeld in blad, stengel en bodem. In alle delen kon via RT-PCR virus aangetoond worden; het beste beeld werd verkregen met bladmateriaal (Figuur 1).

Naar aanleiding van dit resultaat is ook bladmateriaal van de andere verkregen meristeemlijnen op het NAKB-laboratorium getoetst op TRV. Vier van de in totaal 49 verschillende monsters reageerden positief in de RT-PCR. Het betrof hier de al eerder positief bevonden plant van Red Champion en de tweede, TRV-verdachte, Red Champion plant. Hoewel met gangbare methoden geen virus in deze plant was aangetroffen, bleek de PCR-toets gevoelig genoeg om duidelijk uitsluitsel te geven. Twee meristeemlijnen afkomstig van okselknoppen uit neuzen van onverdachte Sarah Bernhardt-planten bleken ook positief te reageren.



Figuur 1: Resultaat RT-PCR op agarose gel. Laan 2,3,4: RNA-extract uit resp. blad, steel en bodem van meristeemlijn Red Champion 1-11-1; laan 5,6,7 : idem, meristeemlijn 1-5-1; laan 9, 10,11: idem, meristeemlijn 1-15-1. Laan 1, 8 en 15: DNA-markers; 12, 13, 14: controle PCR uit gezuiverd TRV-RNA.

Opvallend was dat deze beide TRV-geïnfecteerde meristeemlijnen van Sarah Bernhardt afkomstig waren van de oudste okselknop in de neus. In lijnen gegroeid uit meristemen uit jongere okselknoppen van dezelfde neus werd geen virus aangetoond. Dit suggereert dat het virus zich langzaam verspreidt en een goede kans bestaat om in een vroeg stadium van de infectie virusvrije meristemen te isoleren uit rustende okselknoppen. Dit in tegenstelling tot de bevindingen bij iris, waarbij uit het hoofdgroei punt meer virusvrije meristemen konden worden geïsoleerd dan uit okselknoppen (90% resp. 30%; M. van Schadewijk, pers.med.).

In het geval van Red Champion plant 1 waarin duidelijke symptomen aanwezig waren, bleek het niet mogelijk om virusvrij materiaal te verkrijgen. In alle lijnen uit deze plant die PCR-getoetst zijn, werd virus aangetoond. Blijkbaar is bij zichtbaar zijn van symptomen de infectie al zover verspreid in de plant dat er geen virusvrije okselknoppen meer zijn. Hernieuwde meristeemcultuur uit deze *vitro*-plantjes is niet uitgevoerd, vanwege de slechte kwaliteit van deze plantjes mogelijk als gevolg van de virusbesmetting.

Eindopbrengsten zijn moeilijk te bepalen. Bij de ontwikkeling van bovengenoemde methode was ook van belang of en hoe de plantjes op virus getest moeten worden. Gepoogd is de opbrengst te bepalen uitgaande van het oorspronkelijke aantal ingezette

tussentijdse vermeerdering (elke 6-8 weken) is steeds het aantal overgebleven plantjes gescoord.

De opbrengst aan virusvrije plantjes na zestien maanden is dus opgebouwd uit:

$$Y_{\text{virusvrij}} = n_{\text{in gezet}} + n_{\text{vermeerderd}} - (n_{\text{infected}} + n_{\text{uitval}}), \quad (I)$$

waarbij uitval zowel uitval door bacterie- of schimmelinfectie als uitval door slechte of geen groei betreft. 'Infected' in deze formule betekent een positieve PCR-uitslag. Dit geeft ook aan hoe moeilijk of makkelijk een partijtje is op te bouwen (zie ook de bijgevoegde tabel voor verloop aantallen in deze zestien maanden).

Tabel 5 - Opbrengst (%) aan virusvrije plantjes na 16 maanden berekend volgens formule I

Cultivar	Inzet	Y na 16 maanden	t.o.v. inzet	t.o.v. theorie*
Sarah Bernhard	36	114	316	124
Shirley Temple, inzet 1	48	22	45.8	0.18
idem, inzet 2	16	6	37.5	0.15
idem, inzet 3	54	19	35.8	0.13
Karl Rosenfield	24	11	45.8	0.18

* Theoretische opbrengst na 16 maanden berekend door aan te nemen dat ieder meristeem meteen uitgroeit tot een vermeerderbaar, virusvrij plantje en geen verdere uitval optreedt. Verdere aannames: cyclusduur 8 weken, vermeerderingsfactor 2; $Y_{\text{theoretisch}} = 256$.

Conclusie

Door uit te gaan van rustende okselknoppen, konden uit verschillende cultivars van pioen meristeemcultures opgezet worden. Als initiatiemedium voldeed het algemene vermeerderingsmedium voor pioen (Albers, 1993) op halve sterkte. De geprepareerde meristemen mogen niet te klein worden gesneden, omdat anders de uitgroei niet of slecht verloopt. Mogelijk kunnen hierdoor ook misvormingen optreden. Het verloop van uitgroei en doorvermeerdering gaat langzaam.

Toetsing van *vitro*-plantjes op TRV met behulp van PCR is mogelijk. Het meest consistente beeld gaf bladmateriaal. Ook in planten waaraan uitwendig geen symptoomontwikkeling was te zien, kon hiermee virus aangetoond worden. Uit de jonge okselknoppen van TRV-positieve planten konden wel virusvrije meristemen geïsoleerd worden. Dit lukte niet bij zichtbaar zwaar geïnfecteerde planten en uit de oudste okselknop(pen) van licht geïnfecteerde planten. Het lijkt dus zaak in een vroeg stadium van infectie meristeemcultures op te zetten en deze aan te houden als kernstock om altijd te kunnen beschikken over virusvrij materiaal voor vermeerdering.

3.6 CYMBIDIUM

Probleem:

In planten van een nieuwe Cymbidium hybride werd bij keuring door de NAKB virus aangetroffen. Het ging hierbij om verschillende virussen: het odontoglossum kringvlekken virus (OdrV), een rhabdovirus en cymbidiummozaïekvirus (CyMV). Doel was om rhabdovirus, CyMV en OdrV uit Cymbidium te elimineren via meristeemcultuur.

Onderzochte cultivar

Hybride, naam onbekend.

Uitgangsmateriaal en voorbehandeling

Besloten werd de OdRV-besmette plant voorafgaand aan de meristeemcultuur in de kassen van de NAKB een thermobehandeling te geven van minimaal zes weken bij 36°C. Al snel bleek de plant hier niet tegen te kunnen en stierf af. Bij de overige viruszieke planten werd geen voorbehandeling toegepast.

Ontsmettingsprocedure

Van de ouderplant werden zowel jonge als oude scheuten met bulb afgesneden. Blad en wortels werden verwijderd en aanhangende gronddeeltjes werden met kraanwater afgespoeld. De zo verkregen knollen (zie bijlage) werden gedurende 20 minuten in 1.5% chloor gesteriliseerd (grote knollen halveren). Na 2 x 5 minuten spoelen met steriel demiwater (in entkast) werden de resterende bladdelen verwijderd waardoor de okselknoppen bereikbaar werden. Deze okselknoppen werden met een stuk van het knolweefsel uitgesneden en afhankelijk van de grootte hernieuwd 5-10 minuten gesteriliseerd in 1% chloor.

Meristeempreparatie en initiatiemedium

Met twee planten waarin geen virus was aangetoond (dummy's) werd een basisprotocol ontwikkeld. Deze basisprocedure werd vervolgens toegepast bij de virusbesmette planten.

Na spoelen met steriel demiwater werden okselknoppen onder een binoculair "uitgepeld" tot een meristeem met drie à vier bladprimordia (grootte circa 3.0-5.0 mm) vrij lag. Met behulp van de schuine punt van een 0.8 x 40 mm intraveneuze injectienaald werd tenslotte het meristeem met één of twee bladprimordia (grootte ca. 1.0 mm) uitgesneden. Dit uitgepelde meristeem werd op het meest gebruikelijke medium voor cymbidium (Knudson C medium, Morel modificatie, zie bijlage 1) in een schuin gestolde buis geplaatst (Arditti & Ernst, 1993).

Cultuuromstandigheden.

De buizen met meristemen werden gedurende twee weken gekweekt bij 25°C onder diffuus licht (fotoperiode 16 uur). Gedurende de eerste vier weken na inzetten werd iedere week gecontroleerd op bacterie- of schimmelgroei. Indien de meristemen vrij bleken van bacteriën of schimmels én duidelijk zichtbare groei was opgetreden, werden zij naar vers medium gezet voor verdere uitgroei.

Uitgroeiresultaten en waarnemingen.

Experiment 1: Basismethode

Bij de dummy's varieerden de infectiepercentages van 14.3% bij plant 1 tot 58% bij plant 2. Gezien het lage percentage bij plant 1 lijkt de uitwendige ontsmetting effectief genoeg te zijn en is het hogere percentage bij plant 2 vooral een gevolg van inwendige verontreiniging die niet met een chloorbehandeling teniet kan worden gedaan. Dit werd ook min of meer bevestigd bij de inzetten met meristemen van viruszieke planten. De overgebleven meristemen groeiden op het standaardmedium in vijf weken uit tot protocormen, waarop zich acht weken na inzet de eerste scheuten hadden gevormd. Deze groeiden verder zeer langzaam uit. Voor toetsing op toetsplanten is minimaal 0.5 gram plantmateriaal nodig (versgewicht scheut ca. 250 mg); voor ELISA is ca. 0.2 gram voldoende. Om deze hoeveelheid sneller te bereiken werden na tien weken de grotere protocormen in tweeën gedeeld. De helft werd teruggeplaatst op vast medium, 25°C,

medium (= initiatiemedium zonder hormoon en agar), zoals in de praktijk gebruikelijk bij vermeerdering van protocormen. Daar geen orchideeënrads aanwezig was, werden de protocormen in 50 ml erlenmeyers onder diffuus licht bij 25 °C op een rondschudder bij 50 rpm verder gekweekt. De protocormen groeiden in vloeibaar medium aanzienlijk sneller (verdubbeling versgewicht per 3-4 weken) en vormden clusters van protocormen. Elke vier weken werd medium ververscht, waarbij eventueel ook werd vermeerderd door protocormen op te delen. Daarbij werd op het natuurlijke breukvlak of bij insnoeringen gesneden. Protocormen kleiner dan 3 mm groeiden of vermeerderden nauwelijks na afsnijden. Voor een goede vermeerdering of uitgroei tot plantje moesten de protocormen minimaal ca. 5 mm groot zijn. Na lossnijden werden grote protocormen apart verder vermeerderd in vloeibaar medium of op vast medium zonder hormoon gezet, waar zij verder konden uitgroeien tot plantjes. Op deze manier kon van iedere meristeemlijn voldoende materiaal voor toetsing verkregen worden. Tevens werden sneller dan op vast medium enkele tientallen nakomelingen per meristeem verkregen.

Experiment 2: *Cymbidium* besmet met rhabdovirus.

Deze plant bestond uit acht grote en acht kleine scheuten/bulben. Hieruit konden in totaal 39 meristemen opgezet worden. Tien weken na inzet waren hiervan nog 27 meristeemlijnen over (69%). Deze werden overgebracht naar vloeibaar medium voor vermeerdering. Bij acht protocormenkweken trad vertroebeling van het medium op, wat duidt op de mogelijkheid van inwendige verontreiniging. Vijf kweken groeiden te langzaam ten opzichte van de overige kweken, mogelijk doordat ze te klein gesneden waren. Al deze 'verdachte' kweken werden verwijderd zodat veertien "schone" meristeemlijnen overbleven (36% ten opzichte van oorspronkelijke inzet). Negen maanden na inzet waren uiteindelijk uit deze overgebleven lijnen naast protocormcultures in vloeibaar medium ook 84 plantjes verkregen die voor toetsing op rhabdovirus gebruikt zijn.

Experiment 3: *Cymbidium* besmet met *Cymbidium*mozaïekvirus.

Uit oude (grote) en jonge (kleine) knollen van een bloeiende *cymbidium*plant werden meristemen geprepareerd. In totaal werden 35 meristemen ingezet die reeds twee weken na inzetten werden doorgezet naar vloeibaar medium. Eén meristeem bleek besmet, elf groeiden niet uit (te klein), zodat na twaalf weken nog 23 lijnen (66%) over waren. Opvallend was dat meristemen uit jonge knollen zichtbaar beter uitgroeiden dan uit oude knollen. Tussentijds viel nog één lijn af, zodat de opbrengst aan schone lijnen (22) uiteindelijk 63% van het aantal oorspronkelijk ingezette lijnen bedroeg. Vierentwintig weken na inzet waren in totaal 141 plantjes verkregen. Van iedere lijn werden vier plantjes gebruikt voor ELISA-toetsing op CyMV.

Toetsing

Experiment 2: de toetsing op rhabdovirus gebeurde via toetsplanten waarop plantensap was geïnoculeerd. In totaal is drie keer getoetst (twee plantjes per lijn per toets) met tussenpozen van 3 maanden, zodat geen plantjes uit dezelfde vermeerderingscyclus werden getoetst. Bij de eerste toetsing werden geen positieve uitslagen waargenomen; bij de tweede toetsing reageerden vier van de veertien lijnen positief. Deze zijn verder aangehouden als positieve controle. Met de elf overgebleven lijnen werd een derde toetsing uitgevoerd. Uiteindelijk bleek nog één lijn besmet met virus. Daarbij werd elektronenmicroscopisch vastgesteld dat het niet ging om rhabdovirus, maar om een ander virus dat waarschijnlijk langs andere weg in de toetsplanten was geraakt (A. van Zaayen, pers. mededeling). De eindopbrengst aan virusvrije lijnen in dit experiment kwam hiermee op 28%.

Experiment 3: de toetsing op *cymbidium* mozaïekvirus vond plaats via ELISA. In totaal

is twee keer getoetst met plantjes uit verschillende vermeerderingscycli. Van de 22 lijnen reageerden zowel bij de eerste als tweede toetsingen dezelfde twee lijnen positief. De overige lijnen mogen dan als virusvrij worden beschouwd (opbrengst 57%).

Conclusie

Door verlies van de OdRV-besmette plant tijdens de voorbehandeling kunnen hierover geen conclusies getrokken worden. Van de met rhabdovirus of CyMV besmette planten konden zonder voorbehandeling virusvrije planten verkregen worden via meristeemcultuur op Knudson C-medium zonder toevoeging van hormonen.

Wel lijkt er een kritische grootte voor het meristeem te bestaan. Door na inzetten de meristemen te sorteren in klassen (< 0.5 mm, $0.5-1.0$ mm, > 1.0 mm) werd de indruk verkregen dat klein (< 1 mm) gesneden meristemen minder goed aansloegen en sneller uitvielen. Door de beperkte aantallen die per experiment per dag ingezet konden worden (ca. 40 meristemen), kunnen hierover geen kwantitatieve uitspraken gedaan worden. Bij groot ingezette meristemen mag overigens verwacht worden dat de kans op virusvrije meristemen lager wordt.

De groei en plantvorming vanuit meristemen verliep langzaam. Snellere groei werd waargenomen bij meristemen uit jonge bulben en in langzaam bewegend, vloeibaar medium. Verdere optimalisering van deze stappen in het proces is waarschijnlijk mogelijk, maar viel buiten het bestek van dit onderzoek.

Van een kritische plantgrootte of -leeftijd voor toetsing is niets gebleken. Bij de toetsingen met plantjes van verschillende grootte werden zowel viruszieke als virusvrije planten gevonden. In de hertoetsingen met plantjes van een andere leeftijd werden de virusen in dezelfde meristeemlijnen aangetroffen. Dit duidt er op dat het virus in voldoende mate in *in vitro*-plantjes aanwezig is voor detectie. Wel blijft minimaal 1x hertoetsen noodzakelijk voor bevestiging van de resultaten.

LITERATUUR

- Albers MRJ (1993): Vermeerdering van Paeonia via weefselkweek. Rapport 22/93, Proefstation voor de Boomkwekerij, Boskoop.
- Arditti J & R. Ernst (1993): Micropropagation of orchids. J. Wiley & Sons, New York.
- Barnett OW (1988): Virus damage evaluation. Acta Hortic. 234, 489-496.
- Cassells AC & V. Tahmatsidou (1996): The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured *in vitro*. Plant, Cell, Tissue and Organ Cult. 47, 15-26.
- De Lange JH, P. Willers & M. Nel (1987): Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. J. of Hort. Science 62 (2), 249-252.
- George EF, D.J.M. Puttock & HJ George (1987): Plant Culture Media Vol. 1: Formulations and Uses. Exegetics Ltd, UK.
- George EF (1993a): Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The Technology. Exegetics Ltd, UK
- George EF (1993b): Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2: In Practice. Exegetics Ltd, UK
- Morel GM (1965): Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Soc. News, 20, 3-11.
- Morel GJ & C. Martin (1952): Guérison de dahlia atteints d'une maladie à virus. Compt. Rend. 235, 324-325.
- Van Telgen HJ, T. Duineveld & S. Kostak (1990): Nu ook Delphinium *in vitro*. Vakblad Bloemisterij 25, 48-49.
- Van Zaayen A, C. van Eijk & J.M.A. Versluijs (1992): Production of high quality, healthy ornamental crops through meristem culture. Acta Botanica Neerlandica 41(4), 425-433.
- Voyiatzi C & D.G. Voyiatzis, (1989): *In vitro* shoot proliferation of *Dieffenbachia exotica* cultivar 'Marianna' as affected by cytokinins, the number of recultures and the temperature. Scientia Hortic. 40, 163-169.

BIJLAGE 1. Samenstelling media voor meristeem cultuur

Voor samenstelling standaardmedia zie George *et al* (1987)

Basis Meristeem Medium 1 (BMM-1; naar Murashige & Skoog (MS) medium)

bevat per liter:

MS anorganische elementen op halve sterkte

MS vitaminen op volle sterkte

myo-inositol	100.0	mg	
thiamine.HCl	0.4	mg	
sucrose	20.0	g	
BBL gran. agar	6.0	g	
FeEDDHA	48.0	mg	pH 5.8
Kinetine	1.0	mg	
IBA	0.1	mg	

Basis Meristeem Medium 2 (BMM-2; naar Miller & Murashige):

Samenstelling als BMM-1 echter met:

NaH ₂ PO ₄	170	mg/l
sucrose	25	g/l

In gevallen waarbij speciale macrozoutensamenstellingen zijn gebruikt, worden hieronder de samenstellingen per gewas vermeld (per liter medium). Voor samenstelling van standaardmedia wordt verwezen naar George *et al.*, 1987.

Phlox paniculata

Tuleck-medium:

NaNO ₃	1800	mg	
KCl	900	mg	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	280	mg	
(NH ₄) ₂ SO ₄	320	mg	
MgSO ₄ .7H ₂ O	760	mg	
NaH ₂ PO ₄	300	mg	pH 6.0

Paeonia lactiflora

Gemodificeerd Quoirin & Lepoivre-medium

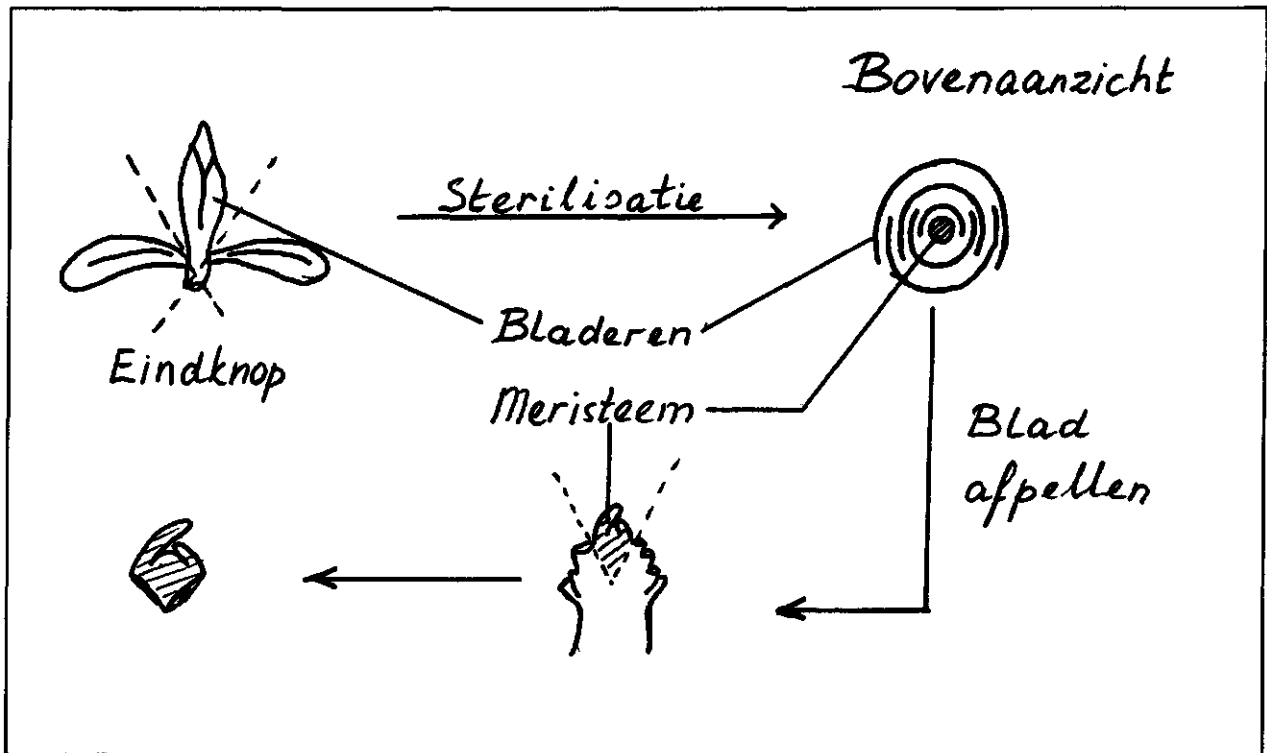
NH ₄ NO ₃	200	mg	
KNO ₃	950	mg	
MgSO ₄ .7H ₂ O	90.4	mg	
KH ₂ PO ₄	135	mg	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	600	mg	
NaFeEDTA	40	mg	
Micro/spore	MS		
Vitaminen	MS		
myo-inositol	100	mg	
caseinehydrolysaat	500	mg	
sucrose	20	g	
agar	6.0	g	pH 5.5
BAP	0.5	mg	

Cymbidium-hybride

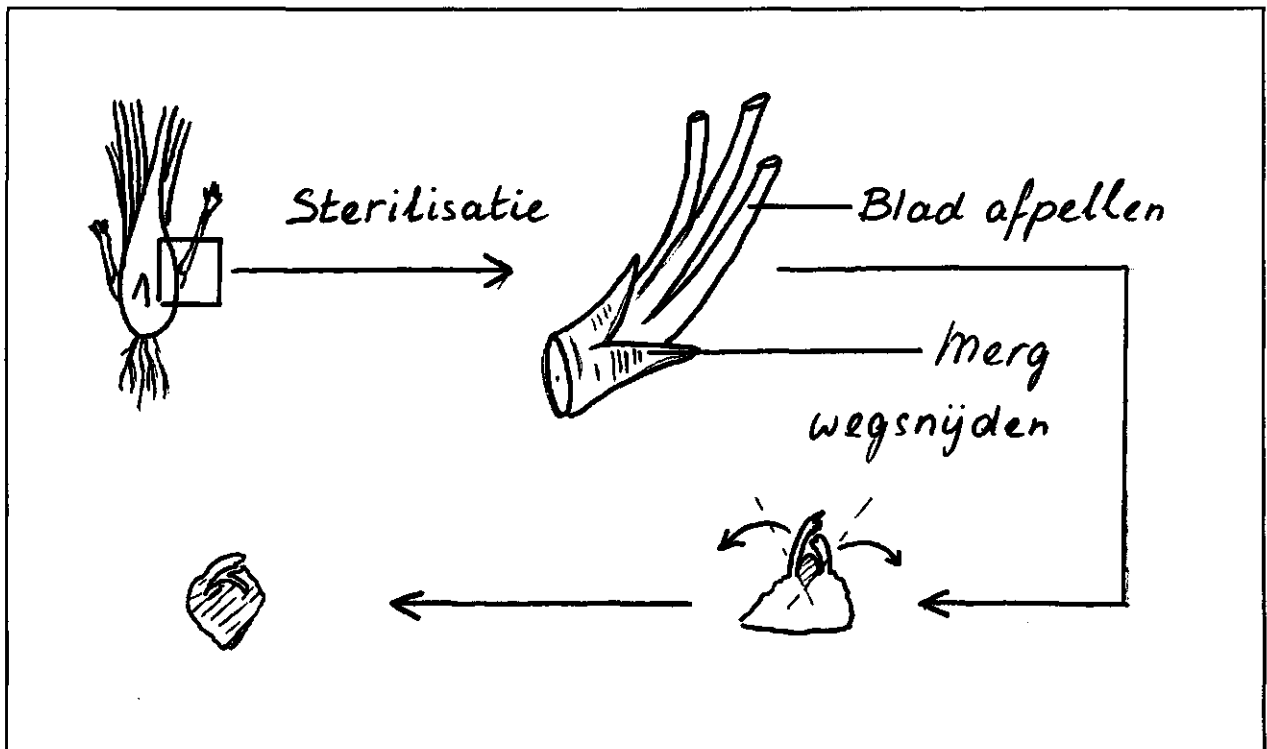
Knudson C orchidee-medium, Morel modificatie (Morel, 1965)

Ca(NO ₃) ₂	241.3	mg/l	
NH ₄ NO ₃	500.0	mg/l	
KH ₂ PO ₄	250.0	mg/l	
KCl	250.0	mg/l	
(NH ₄) ₂ SO ₄	500.0	mg/l	
MgSO ₄	122.15	mg/l	
FeSO ₄ .7H ₂ O	25.0	mg/l	
MnSO ₄ .H ₂ O	5.7	mg/l	
sucrose	20	g/l	pH 5.8
agar	8	g/l	

BIJLAGE 2. Schematische voorstelling meristeempreparatie

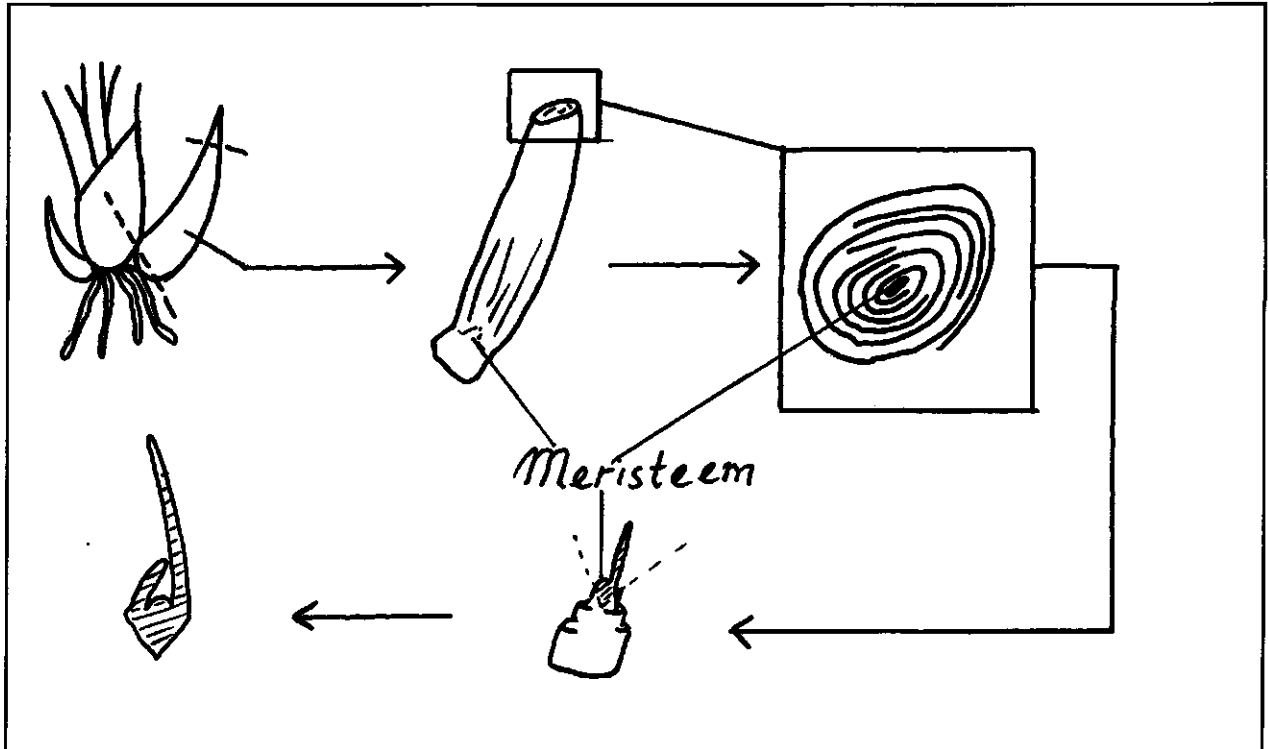


Phlox, Hydrangea

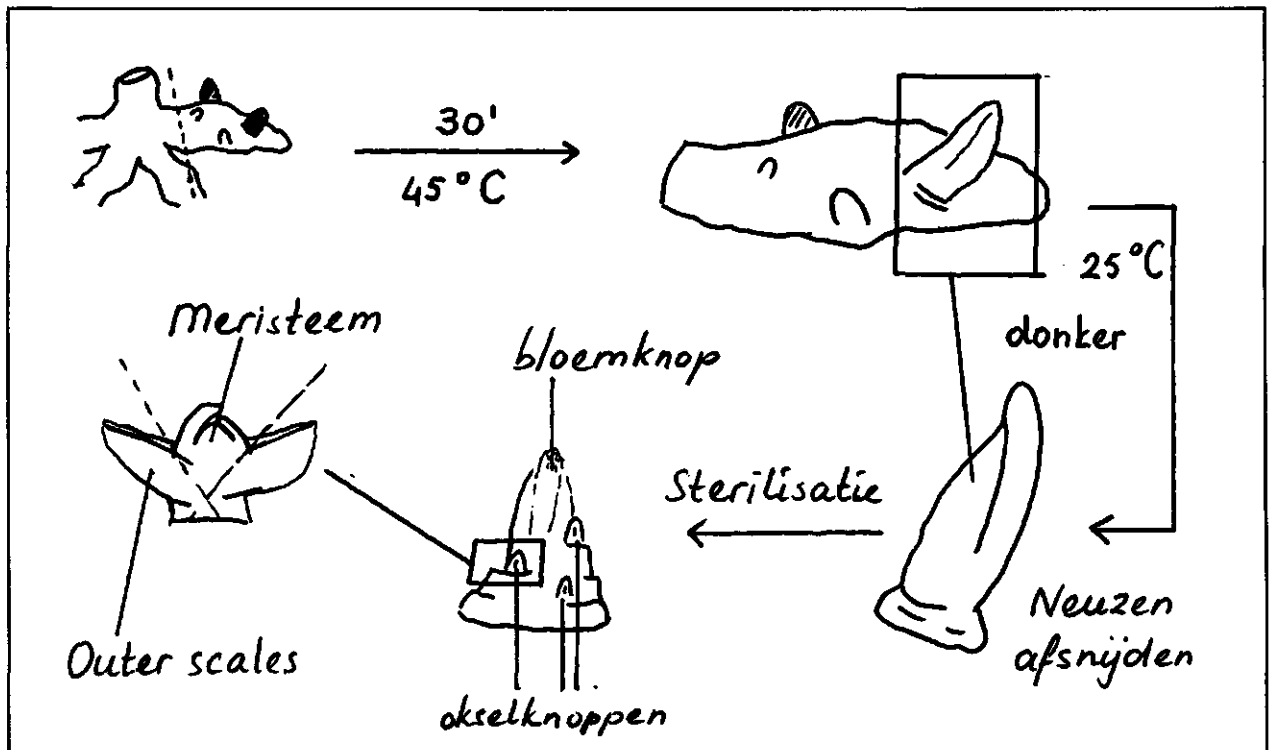


Delphinium

BIJLAGE 2. Schematische voorstelling meristeempreparatie

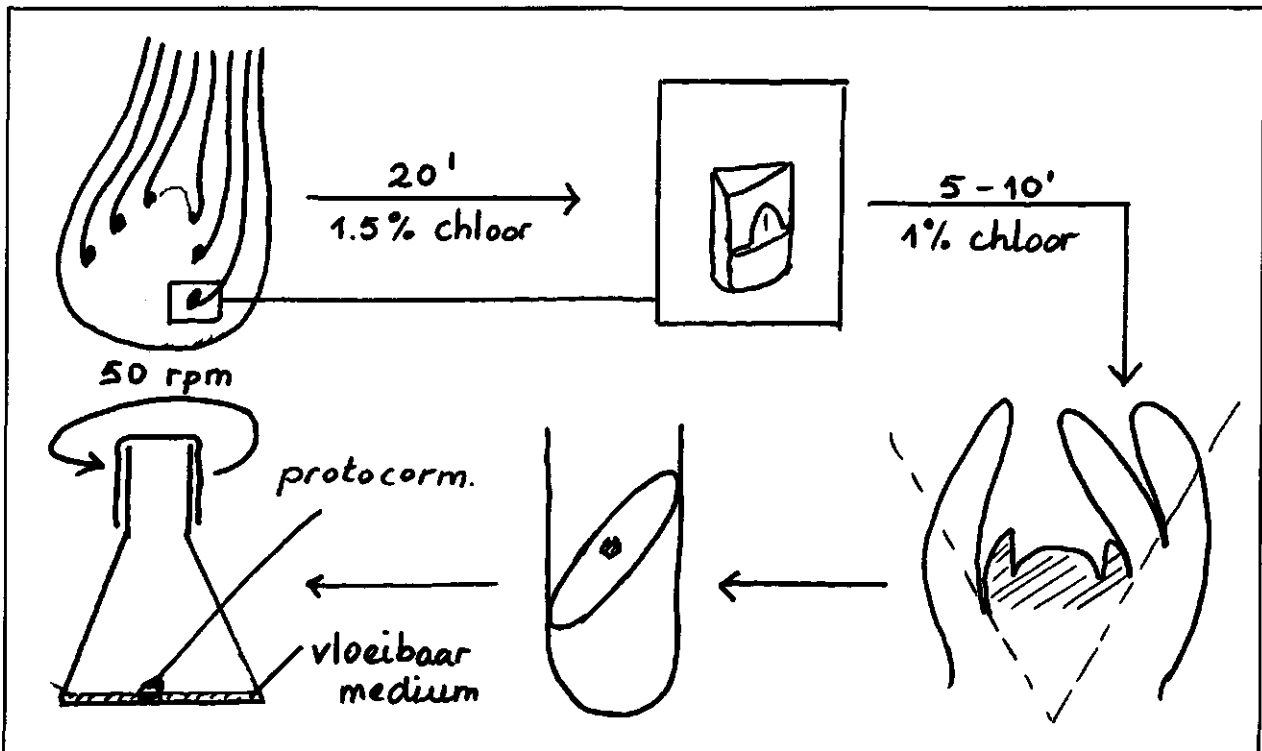


Dieffenbachia



Paeonia

BIJLAGE 2. Schematische voorstelling meristeempreparatie



Cymbidium

BIJLAGE 3. Gebruikte afkortingen

AMV	- luzerne mozaïekvirus
ArMV	- arabis mozaïekvirus
BMM	- Basis Meristeem Medium
CMV-A	- komkommermozaïekvirus Alstroemeria-stam
CyMV	- cymbidium mozaïekvirus
GA ₃	- gibberellinezuur 3
HRSV	- hydrangea kringvlekken virus
IBA	- indoolboterzuur
KIN of Kin	- kinetine
min of '	- minuten
OdRV	- odontoglossum kringvlekken virus
PotyVirus	- aardappel Y virus
RT-PCR	- Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
TMV	- tabaksmozaïekvirus
TRV	- tabaksratelvirus
wwb	- warmwaterbehandeling