

LABORATORIUM VOOR BLOEMBOLLENONDERZOEK

LISSE



BIBLIOTHEEK
PPO sector Bloembollen
Postbus 85
2160 AB Lisse
0252 462121

VERSLAG van een studiereis naar Engeland
van 6 tot en met 15 november 1978; de
stand en de toepassing van het weefsel-
kweekonderzoek aan bolgewassen in dat
land.

Drs. J. van Aartrijk

P-12
15N-141158

Rapport no. 40, februari 1979.

INHOUDBlz.

Woord vooraf	1
1. Inleiding	2
2. Virussen en virusziekten in narcissen	3
3. Visuele selectie en meristeemcultuur ter verkrijging van virusvrije narcissen	5
4. Vermeerdering van virusvrije narcissen	7
a. Dubbelschubmethode	7
b. Weefselkweek	8
5. Vergelijking van virusvrije en viruszieke narcissen op tuinbouwkundige kwaliteiten	10
6. Virustoetsingen op grote schaal, certificering en kansen op herinfectie	11
7. Organisatie in nabije en verdere toekomst	13
8. Notities welke naar aanleiding van de diverse gesprekken werden gemaakt over andere zaken dan narcissen.	14
9. Literatuur	20

Woord vooraf.

In de periode van 6 t/m 15 november 1978 werd een studiereis gemaakt naar Engeland. Bezoeken werden gebracht aan het 'Glasshouse Crops Research Institute' (G.C.R.I.) en de 'Nuclear Stock Association' (N.S.A.), beide te Littlehampton, het 'National Vegetable Research Station' (N.V.R.S.) te Wellesbourne, de 'Agricultural Development and Advisory Service' (A.D.A.S.) te Cambridge, het 'John Innes Institute' te Norwich, de 'Twyford Laboratories Ltd.' te Baltonsborough en de 'School of Agriculture' van de 'University of Nottingham'.

Gesprekken werden gevoerd met:

Dr. Alderson (Nott. Sch. of Agr.)
Dr. Aynsley }
Dr. Bennett } (Twyford Labs Ltd.)
Dr. Drew (N.V.R.S.)
Dr. Hill (A.D.A.S.)
Dr. Holdgate (Twyford Labs Ltd.)
Dr. Hollings (G.C.R.I.)
Dr. Hussey (John Innes Institute)
Miss Lane (N.S.A.-O)
Mr. Moore (A.D.A.S.)
Dr. Rees (G.C.R.I.)
Dr. Stokes (Twyford Labs Ltd.)
Dr. Stone (G.C.R.I.)
Dr. Thomas (N.V.R.S.)
Dr. Walkey (N.V.R.S.)

Dit reisverslag is gebaseerd op de naar aanleiding van deze gesprekken gemaakte notities.

December 1978,

Drs. J. van Aartrijk.

1. Inleiding.

In de cultuur van veel bolgewassen vormen virusziekten een ernstig probleem gezien de veelal negatieve gevolgen van dergelijke ziekten voor de kwaliteit van het gewas. Verwijdering van zichtbaar zieke planten uit het gewas is vanouds een maatregel geweest om de verspreiding van virussen tegen te gaan en om de kwaliteit op een zo hoog mogelijk peil te handhaven.

Deze maatregel bewijst ook heden ten dage nog zijn waarde. Toch is gebleken dat desondanks een groot aantal rassen van verscheidene bloembolgewassen volledig geïnfecteerd zijn met een of meer virussen. Dit is (of was) bijvoorbeeld het geval met de hyacint, lelie, gladiool, iris en de narcis. Gecombineerde inspanningen van onderzoek (virologisch, serologisch en op het gebied van weefselkweek) en praktijk zijn noodzakelijk om deze zieke gewassen te kunnen vervangen door virusvrije. Behalve verschillende instanties in Nederland zijn met name ook enkele instituten in Engeland betrokken bij het onderzoek naar de mogelijkheden tot verkrijging en de introductie in de praktijk van hooggekwalificeerd virusvrij bolmateriaal.

Doel van deze studiereis was een zo nauwkeurig mogelijk beeld te krijgen van de vorderingen, de mogelijkheden en de moeilijkheden bij de vervanging van viruszieke narcissen door virusvrije. In de discussies kreeg echter ook het weefselkweekaspect (meristeen-cultuur ter verkrijging van virusvrije planten en snelle vegetatieve vermeerdering) van soortgelijke projecten bij andere (bol)gewassen veel aandacht.

2. Virussen en virusziekten in narcissen.

In Narcissus tazetta cv. Grand Soleil d'Or, een vrijwel uitsluitend op de Scilly-eilanden geteelde en voor de Nederlandse markt weinig interessante cultivar waaraan reeds vanaf 1963 veel onderzoek is gedaan, komen een vijftal virussen voor, nl. Tomato Black Ringspot Virus (TBRV), Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRV), Arabid Mosaic Virus (AMV), Cucumber Mosaic Virus (CMV) en Narcissus Degeneration Virus (NDV) (Stone). De eerste drie hiervan worden door nematoden verspreid; de overdracht van de laatste twee virussen vindt plaats door bladluizen. AMV en NDV komen in alle planten van deze cultivars voor (Hollings). Hiervan veroorzaakt NDV, een voor deze cultivar specifiek virus uit de Y-groep, de ernstigste symptomen (Stone; zie ook Jaarverslag GCRI 1977). Deze cultivar is ongevoelig voor Tobacco Rattle Virus (TRV) en Narcissus Yellow Stripe Virus (NYSV), virussen die voorkomen in zowel voor de Engelse als voor de Nederlandse bloembollenteelt belangrijke cultivars (Hollings). Een lijst van virussen, waarvan de aanwezigheid in een of meer cultivars beschreven werd, is hieronder weergegeven. Virussen die ook in Nederlandse narcissen kunnen worden aangetroffen, zijn met * gemerkt.

Bolvormige virussen:

1. Arabid Mosaic Virus (AMV)*
2. Broad Bean Wilt Virus (BBWV)
3. Raspberry Ringspot Virus (RRV)
4. Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRV)
5. Tobacco Ringspot Virus (ToRiV)*
6. Tomato Ringspot Virus (TomRiV)
7. Tomato Black Ring Virus (TBRV)
8. Narcissus Tip Necrosis Virus (NTNV)*
9. Cucumber Mosaic Virus (CMV)*

Staaft-/Draadvormige virussen:

10. Tobacco Rattle Virus (TRV)*
11. Jonquil Mosaic Virus (JMV)
12. Narcissus Degeneration Virus (NDV)
13. Narcissus Yellow Stripe Virus (NYSV)*
14. Narcissus White Streak Virus (NWSV)*
15. Narcissus Mosaic Virus (NMV)*
16. Narcissus Latent Virus (NLV)*

Van NMV en NTNV is de wijze van overdracht niet bekend. De overdracht van de overige virussen vindt plaats door nematoden (AMV, BBWV, RRV, SLRV, ToRiV, TomRiV, TBRV en TRV) of bladluizen (CMV, JMV, NDV, NYSV, NWSV en NLV). Hoewel de symptomen soms ernstig zijn, is het moeilijk om eenduidige relaties tussen virus en ziektebeeld op te stellen.

Een verklaring hiervoor moet gezocht worden in de bij verschillende cultivars verschillende symptoomexpressie en in het feit dat veelal een combinatie van twee of meer virussen verantwoordelijk is voor een ziektebeeld. Nadere gegevens kunnen worden gevonden in "Ziekten en Afwijkingen bij Bolgewassen", Deel 2: Amaryllidaceae, Iridaceae e.a.

3. Visuele selectie en meristeemcultuur ter verkrijging van virusvrije narcissen.

Visuele selectie te velde van gezond ogende planten, gevolgd door meer betrouwbare laboratoriumtoetsen op de aanwezigheid van virussen in deze planten, kon uiteraard bij cv. Grand Soleil d'Or geen succesvol resultaat hebben. Immers, alle planten waren voor 100% met AMV of NDV geïnfecteerd.

Een soortgelijke selectie van planten van ook voor Nederland interessante cultivars, gestart in 1974 door Dr. Brunt, gaf goede resultaten te zien. Hoewel met name AMV, Tobacco Rattle Virus, NMV en enkele Y-virussen (m.n. JMV, NYSV en NWSV) veelvuldig voorkwamen, bleken enkele planten van een aantal cultivars, na toetsingen in de seizoenen 1974, 1975 en 1976, vrij te zijn van de virussen vermeld onder 2. Deze toetsingen vonden plaats met behulp van EM, immunoEM, serologie en toetsplanten, terwijl de teelt van het geselecteerde materiaal plaatsvond in gekoelde kassen onder luisvrije omstandigheden (Stone). Slechts enkele oudere cultivars ("Golden Harvest", "King Alfred", "Magnificence") bleken volledig te zijn besmet (Moore). Een relatie kon worden vastgesteld tussen de ouderdom van de cultivar en de kans op volledige infectie met een (veelal Y-)virus (Stone). Dit kan een aanwijzing zijn dat de infectie van virusvrije planten met deze virussen onder normale teeltomstandigheden relatief traag verloopt (Stone).

Naast visuele selectie is door Dr. Stone van het GCRI ook meristeemcultuur toegepast om virusvrije planten te verkrijgen van ca. 20 narcissecultivars, waaronder "Grand Soleil d'Or", "Carlton", "Golden Harvest", "Actaea", "Barrett Browning", "Cragford", "Fortune", "Hollywood", "King Alfred", "Magnificence", "Paper White", "Scilly White", "Silver Chimes", "Cheerfulness" en "Golden Ducat". Daarbij werden vegetatieve meristemen van narcissebollen, die niet voorbehandeld waren met hoge temperaturen, na desinfectie geplaatst op bruggen van filtreerpapier, die op hun beurt geplaatst waren in een standaard GCRI-voedingsmedium (Stone) of in een oplossing samengesteld uit MS-zouten, LS-vitamines en 1ppm NAA (pH=5,5). Toevoeging van caseïnehydrolysaat stimuleerde de groei. De groeisnelheid van de meristemen was sterk afhankelijk van de temperatuur in de kweekruimte en van de onderzochte cultivar. Bijzonder slecht groeiden meristemen van cv. "Golden Ducat". Lage temperaturen (ca. 12°C) bevorderden de groeisnelheid en beïnvloedden bovendien de groei nadien in de grond positief. Als de temperatuur tijdens het opgroeien in de kweekbuizen hoger was geweest, was veelal vóór het opplanten in de grond een koudebehandeling (4 wk 5°C) van de plantjes noodzakelijk.

Cultivars van Narcissus tazetta en Narcissus poëticus ("Cragford", "Silver Chimes", "Paper White" e.a.) waren in het algemeen veel minder temperatuur-gevoelig dan cvs van Narcissus pseudonarcissus. Toetsing op de aanwezigheid van virussen vond, met behulp van de hierboven reeds beschreven technieken, gedurende minimaal drie jaar enkele keren per seizoen plaats (Stone). Dit bleek voldoende te zijn (Stone). De algemene ervaring was dat vanuit met Y-virus(sen) geïnfecteerde bollen relatief gemakkelijk gezonde planten konden worden verkregen (Stone). Inmiddels zijn van ca. 30 cultivars enkele virusvrije bollen beschikbaar (Moore; Stone; ADAS).

4. Vermeerdering van virusvrije narcissen.

a. Dubbelschub-methode.

Op het GCRI vindt alleen vermeerdering van virusvrije narcissebollen plaats d.m.v. adventieve regeneratie op zg. dubbelschubben. Ten aanzien van methodes van snelle vegetatieve vermeerdering m.b.v. weefselkweektechnieken worden vooralsnog grote vraagtekens geplaatst, enerzijds op grond van de kosten, anderzijds omdat nog geen, op deze wijze verkregen planten in bloei gebracht zijn en derhalve een toets op hun soortechtheid ontbreekt. Dubbelschubben is en wordt op het GCRI veel toegepast teneinde het huidige aantal virusvrije bollen van iedere cultivar (zijnde 20-100 stuks; Grand Soleil d'Or ca. 10^6 bollen), uit te breiden via ca. 1000 in 1980-1981 (uitzondering "Carlton": ca. 5000) tot ca. 10.000 in 1984. Dan zal aflevering aan het bedrijfsleven plaatsvinden (bijv. de NSA-Bulbs) indien althans de teeltomstandigheden zodanig zijn dat een handhaving van de hoge kwaliteit mag worden verwacht. Daarbij gaan de gedachten uit naar teelt in luisdichte kassen of in geïsoleerde teeltgebieden (Hollings).

Bij het dubbelschubben wordt rekening gehouden met de grootte van de schub, de plaats van de schubben in de bol en vooral met de incubatietemperaturen. Grote dubbelschubben leveren, relatief gezien, minder maar zwaardere adventieve bolletjes dan een aantal daaruit gesneden kleinere dubbelschubben (Rees). Dubbelschubben van de buitenzijde van een bol, behalve die van de buitenste twee rokken die bijzonder slechte resultaten geven, regenereren in de regel beter dan die van de meer naar binnen gelegen rokken (Rees).

E.e.a. komt overeen met de resultaten van Alkema en Van Leeuwen. De optimale incubatietemperatuur is verschillend voor verschillende cultivars maar lijkt in het algemeen te liggen tussen 15°C en 20°C (Rees). Deze temperatuur beïnvloedt niet alleen de aantallen adventieve bolletjes en de groei op de schubben, maar ook het vermogen tot doorgroei na het opplanten in de grond. Het optreden van dit (vermoedelijk een rust-)verschijnsel is sterk gerelateerd aan het tijdstip waarop de dubbelschubben gesneden worden uit de bol; juli-schubben voldoen beter dan augustus-schubben en veel beter dan november-schubben (Rees). Bovendien wordt dit rustverschijnsel sterk beïnvloed, gezien de jaarlijkse verschillen, door de omstandigheden waaronder de uitgangsbollen worden geteeld (Rees). Een en ander heeft het vermoeden doen ontstaan, dat, zelfs wanneer bedacht wordt dat virusvrije bollen veel betere schubresultaten te zien geven dan viruszieke bollen (Rees, Hollings), de dubbelschubmethode op dit moment nog niet optimaal ontwikkeld is (Hollings, Rees). In een poging daarin verbetering te brengen werd de invloed van groeistoffen op het regeneratiegebeuren nagegaan.

Toevoeging van IAA, ABA, GA of kinetine (in concentraties van 1, 10 en 100 dpm) had nooit een positief, in enkele gevallen zelfs een negatief (IAA 100 dpm; GA 10 en 100 dpm) effect op de aantallen gevormde plantjes. Wel had met name kinetine-toevoeging een duidelijke positieve invloed op het opkomstpercentage van de bolletjes na het opplanten in de grond (Rees). Verder onderzoek ter optimalisering is in volle gang (Rees), maar ook noodzakelijk (Lane). Het opbouwen van virusvrije partijen "Grand Soleil d'Or" kost namelijk zoveel tijd dat het enthousiasme van een aantal telers op de Scilly-eilanden verminderd is - hopelijk slechts voor kortere tijd.

b. Weefselkweek.

Behalve de dubbelschubmethode zijn in Engeland, met name door Dr. G. Hussey van het John Innes Institute te Norwich en de (commerciële) Twyford Laboratories te Baltonsborough, methodes uitgewerkt van snelle vegetatieve vermeerdering d.m.v. weefselkweek.

Het uitgangswefsel, dat het meest geschikt lijkt, is de enkele millimeters dikke laag meristematisch weefsel van de basale plaat, waaruit rokken, bladeren en stengel ontspringen. Als explantaat dienen dan ook afzonderlijk gedesinfecteerde rok- of bladstukjes (8-10mm x 2-3mm) met daaraan meristematisch weefsel van de bolbodem (Hussey) of ook wel sectoren van de bolbodem waarvan slechts het meest basale deel van de rokken verbonden is (Twyford). Deze explantaten - de meer uit het midden van de bol afkomstige voldoen daarin beter dan die van de buitenkant - worden op een Murashige en Skoogvoedingsmedium geplaatst waarin relatief hoge cytokinine-concentraties (BAP 4-12 ppm; Hussey; kinetine, Twyford) en vrij lage auxine-concentraties (NAA 0,5-2 ppm; Hussey, Twyford) noodzakelijk zijn voor regeneratie. Vanuit het aanvankelijk zwellende regeneratieve weefsel ontstaan na ca. 6-8 weken nieuwe plantjes bij temperaturen rond 25°C en een lichtintensiteit (TL33) van 2000-3000 lux (Hussey, Twyford). Met name de auxine-hoeveelheid in het voedingsmedium kan een cruciale rol spelen. Te hoge concentraties hiervan leiden al snel tot de vorming van callusweefsel, waaruit vele plantjes gevormd worden; de kans dat deze plantjes een aneuploïde of polyploïde karakter hebben is zeer reëel (Hussey). Een eenmaal waargenomen verschil in bloeitijdstip bij een kloon van "Grand Soleil d'Or" zou hiermee verband kunnen houden (Hollings), hoewel de eigenschappen van het uitgangsmateriaal niet met zekerheid bekend waren (Hussey, Moore).

Voorzichtigheid is dus geboden. Een duidelijke kritische grens kon door Dr. Hussey niet worden gegeven. Het vermijden van callus en daaruit mogelijkerwijze voortvloeiende abnormaliteiten wordt door de Twyford-laboratoria zorgvuldig nagestreefd.

De vermeerdering daar werd dan ook zonder callustussenfase uitgevoerd. Verdere exponentiële vermeerdering is mogelijk door het opdelen van de eerder gevormde plantjes en plaatsing ervan op soortgelijke voedingsmedia met iets lagere cytokinine-concentraties. Op deze wijze is vermeerdering in 1 jaar tot ca. 1000-5000 plantjes haalbaar gebleken (Hussey; Twyford). De gevormde bolletjes spruiten gemakkelijk indien voor het opplanten een koudebehandeling van 6-8 weken 5°C wordt gegeven. Hoewel er duidelijke verschillen bestaan tussen cultivars in hun vermogen om callus en plantjes te vormen, is een groot aantal cultivars inmiddels op deze wijze vermeerderd. Vermeerdering op grote schaal van virusvrij materiaal vindt plaats of zal op korte termijn gaan plaatsvinden in Brogdale Farm EHS (Kent), door een drietal, speciaal daartoe door Dr. Hussey opgeleide mensen en in Schotland, eveneens via de methode Hussey, op een van de colleges (Hussey; Moore), Dr. Hussey zelf heeft tot dusver virusvrije pollen vermeerderd van de cvs Carlton, Fortune, Scarlett O'Hara, Pink Smiles en Brabazon ("Carlton" en "Fortune" afkomstig van meristeemcultuur; de andere verkregen door veldselectie). De Twyford-laboratoria hadden alleen de cvs Carlton en Fortune in bewerking.

Het vermeerderingsprogramma zal bestaan uit een vermeerdering tot 1000-10.000 plantjes volgens weefselweekmethoden, vervolgens teelt onder luisvrije omstandigheden (in een oude kas) te Stockbridge House EHS, waarbij selectie en toetsing op soortechtheid kunnen plaatsvinden (met deskundig advies van Kirton EHS en Harpenden) en tenslotte verdere vermeerdering door dubbelschubben (Hussey; Moore). Op deze wijze kunnen ook de geschatte kosten van vermeerdering op een relatief laag niveau gehouden worden (<20 pence; Hussey).

De eerste plantingen van weefselweekplantjes te Stockbridge House zullen vermoedelijk reeds februari 1979 plaatsvinden (Moore). Om in Stockbridge House dat buiten het traditionele teeltgebied van narcissen ligt (bewust zo gekozen in verband met de kansen op herinfecties) enige ervaring te kunnen opdoen, heeft men daar vanaf 1976 ca. 1000 virusvrije planten van ca. 20 cvs (afkomstig van het GCRI) geteeld (Moore, Hollings, Hill). De teelt vond plaats onder niet-luisvrije omstandigheden in grond, die ontsmet was met DD, méthylbromide en Basamid.

5. Vergelijking van virusvrije en viruszieke narcissen op tuinbouwkundige kwaliteiten.

Betrouwbare vergelijkingen tussen de tuinbouwkundige waarde van virusvrije en viruszieke bollen zijn tot op heden alleen uitgevoerd met de cultivar Grand Soleil d'Or, omdat alleen hiervan voldoende bloeibare bollen voorhanden zijn. De resultaten van deze vergelijkingen waren spectaculair; het aantal bloemen per bol en de afmeting van die bloemen (van virusvrije bollen) waren groter en de natuurlijke vermeerderingssnelheid beduidend hoger. Nadere details zullen verschijnen in het Jaarverslag over 1977 van het GCRI. Van de andere, voor Nederland belangrijkere, cultivars zijn slechts eerste indrukken bekend, die slechts met het grootste voorbehoud mogen worden bekeken, mede gezien het feit dat er duidelijke variaties bestaan tussen verschillende planten, afkomstig van meristeemcultuur (Hollings, Stone). Deze eerste indrukken doen veronderstellen, dat soortgelijke doch wellicht minder spectaculaire verschillen mogen worden verwacht. Meer betrouwbare vergelijkingsexperimenten zullen worden opgezet te Kirton EHS en Rosewarne EHS met een deel van het eerst beschikbaar komende plantmateriaal (Hill, Moore).

6. Virustoetsingen op grote schaal, certificering en kansen op herinfectie.

Op het GCRI werden de toetsingen van het gemeristeede en geselecteerde materiaal uitgevoerd door Dr. Stone en Dr. Brunt, die daarbij gebruik maakten van EM, serologie, immunoEM en toetsplanten. Hoewel Dr. Brunt op kleine schaal werkt aan "ELISA"-toetsen voor enkele narcissevirusen (Hollings), zijn specifieke onderzoeksgegevens schaars en de prognose en strategie voor de toekomst vaag.

Dr. Hill, viroloog van de Agricultural Development and Advisory Service (ADAS) te Cambridge en o.a. verantwoordelijk voor de toetsingen van het virusvrije narcisse-materiaal dat vanaf 1976 te Stockbridge House werd geteeld en (vooralsnog) van toekomstig materiaal, heeft de beschikking over een electronenmicroscop (voor directe EM en voor immunoEM-waarnemingen) en toetsplanten (Chenopodium quinoa) en past serologische "Latex"-tests toe, welke qua gevoeligheid overigens niet beter zijn dan diffusietoetsen (Hill). Met name voor de toekomst ziet hij mogelijkheden in een immunoEM-toets voor de NEPO-virusen en wellicht in een ELISA-toets op het NTNV; dit virus is moeilijk onder het microscoop waar te nemen en geeft ook geen duidelijke symptomen op Chenopodium quinoa, terwijl Dr. Mowat (SHRI) reeds een ELISA-toets hiervoor ontwikkeld heeft (Hill). Een gecombineerde ELISA-toets tegen alle narcissevirusen ziet Dr. Hill, daarin gesteund door Dr. Hollings, voorlopig niet tot de mogelijkheden behoren. De grote aantallen virusen, de moeilijke zuiveringsprocedures hiervoor en de mogelijkheid dat verschillende virusstammen in dit type toets een verschillende reactie kunnen geven zijn daarvan de oorzaak. Voor de toelevering van sera is Dr. Hill afhankelijk van andere instellingen. Bij de toetsingen van het virusvrije materiaal te Stockbridge House (ca. 1000 bollen van ca. 20 cultivars; de monsters werden verspreid over het gehele seizoen genomen) bleken gedurende de seizoenen 1977 en 1978 ca. 3% van de planten geïnfecteerd te zijn met een virus. Gevonden werden NYSV, NMV, NTNV en AMV (Hill, Moore). Niet duidelijk is of het hier latent aanwezige infecties betrof dan wel herinfecties. Zowel in het uitgangsmateriaal voor de vermeerdering via weefselkweek als in de hieruit geproduceerde plantjes konden (nog) geen virusen worden aangetoond. De plannen om te komen tot een schema van objectieve beoordelingen van de kwaliteit van de partijen via bv. certificeringen zijn nog niet duidelijk omlijnd. Gedacht wordt aan een beoordeling van basismateriaal (door NSA(Bulbs); Hollings, Moore, Hill) en 1 of 2 toetsen later in de teelt, zonder dat duidelijke meningen bestaan omtrent te hanteren normen, invoering van teelteisen e.d.

Een aantal argumenten doet vermoeden dat de snelheid van herinfecties, m.n. met door luizen overgebrachte virussen, wellicht traag is. De relatie tussen de ouderdom van een cultivar en de kans op infectie ervan werd al vermeld als een aanwijzing hiervoor (Stone). Experimenten m.b.t. verspreiding van NYSV, uitgevoerd door het SHRI in verschillende delen van Groot-Brittannië ondersteunen dit idee. Bovendien werd door Dr. Hollings gevonden dat planten van "Grand Soleil d'Or" (virusvrij) moeilijk te infecteren waren met CMV.

7. Organisatie in nabije en verdere toekomst.

Hoge prioriteit krijgen, behalve een verdere vermeerdering van het virusvrije materiaal, de vergelijkende onderzoeken tussen viruszieke en virusvrije planten enerzijds, en onderzoek betreffende de invloed van in-vitro-vermeerdering op de soortechtheid anderzijds (Moore, Hill, Hussey). Dit laatste onderzoek zal plaatsvinden te Kirton EHS met viruszieke planten, die in 1978 werden vermeerderd op Brogdale Farm EHS. Eveneens te Kirton, maar ook te Rosewarne EHS zal het onderzoek naar de tuinbouwkundige meerwaarde van virusvrij materiaal ter hand worden genomen (Hill, Moore). Nochtans zal de vermeerdering van virusvrije planten, zowel via dubbelschubben als via weefselkweek, t.b.v. de NSA (B), voortgaan. De in de NSA (B) verenigde telers nemen daarmee een duidelijk risico. De NSA (B), formeel opgericht, is een instelling waarbij iedere geïnteresseerde narcissteller (en in de toekomst ook tulpenteler) zich kan aansluiten tegen een entreebedrag van £ 1000,-. O.a. lid daarvan is de coöperatie "Lingarden". In april 1979 zal een eerste inschrijvingsperiode worden afgesloten. Inschrijvingen zijn daarna nog wel mogelijk maar evt. afleveringen van virusvrije planten zullen op z'n vroegst een jaar later plaatsvinden (Moore). Investerings in luisvrije (gaas) kassen, ter vervanging van oude kassen te Stockbridge House, worden overwogen.

8. Notities welke n.a.v. de diverse gesprekken werden gemaakt over andere zaken dan narcissen.
- a. Dr. Hollings (GCRI): Behalve bolgewassen staan op het GCRI ook andere siergewassen, groenten en champignons in de belangstelling. Het virologische onderzoek aan Chrysanth, Pelargonium en anjer krijgt nog slechts een klein deel van de beschikbare tijd en aandacht. Het onderzoek aan bolgewassen betreft o.a. iris, nerine en lachenalia en is met name gericht op karakterisering, symptomatologie en serologie van virussen. Een start is gemaakt met de veldselectie van tulpen teneinde ook van dit gewas virusvrije partijen te kunnen opbouwen.
- b. Dr. Stone (GCRI): De meristeemcultuur van irissen verloopt voorspoedig; zowel het Iris-mozaïekvirus (mild mosaic), het Iris-grijsvirus (severe mosaic) als het Iris-bontvirus (welke gedacht wordt identiek te zijn aan het narcisselatentvirus (Brunt) kunnen relatief eenvoudig worden verwijderd. Virusvrije planten zijn inmiddels beschikbaar van "Prof. Blaauw", "Wedgwood" en "Golden Harvest", terwijl "Blue Giant", "Imperator" en "Ideal" nog in bewerking zijn.
- Meristeemcultuur van Lilium testaceum, een soort die volledig met TBV is geïnfecteerd, verloopt moeizaam. Het slagingspercentage is bij gebruik van vloeibare voedingsmedia zeer laag.
- Het opgroeien van geïsoleerde meristemen op media waarin "virazole" was verwerkt, had t.o.v. de normale media geen merkbare invloed op het percentage achteraf virusvrij gebleken planten.
- c. Miss Lane (NSA(O)): Zij is leidster van het twee personen sterke team, dat zich bezighoudt met warmtebehandeling, meristeemcultuur, gezondheidstoetsingen en vermeerdering van geselecteerd hoogwaardig plantmateriaal ten behoeve van de Nuclear Stock Association (Ornamentals). Zij heeft daarbij, naast de bereidwillige en deskundige hulp van het GCRI, 600 m² luisvrije kas tot haar beschikking. De belangrijkste gewassen zijn chrysanth, Pelargonium en anjer. Ook lelies en narcissen ("Grand Soleil d'Or") behoren tot het pakket. Van lelies zijn naast "Enchantment", "Destiny" en andere belangrijke cvs ook vele nieuwe kruisingen van Dr. North (SHRI), genoemd naar mythologische personen, aanwezig.
- Lid van de NSA(O) zijn (veelal vermeerderings-) bedrijven die bij hun inschrijving een bepaald bedrag (aanvankelijk £ 1000,-; momenteel £ 1500,-) verschuldigd zijn. De dagelijkse kosten worden op non-profitbasis gedekt door o.a. de verkoop van stekken.

In de regel bestaat het plantenbestand uit planten die naar het gezamenlijke oordeel van de deelnemende bedrijven (!) de hoogste tuinbouwkundige waarde bezitten. Het individueel inbrengen van planten is, tegen hogere kosten, mogelijk. Als regel geldt, dat alleen planten worden toegelaten welke direct afkomstig zijn van meristeemcultuur. Gezondheidstoetsingen vinden regelmatig plaats. Bij het aan vermeerderingsbedrijven te leveren plantmateriaal wordt een certificaat verstrekt, waarop de datum van de laatste toetsing en het resultaat hiervan, zijn vermeld. De interesse van het bedrijfsleven is, met name voor anjers en chrysanthen, groot. Redenen hiervoor zijn:

- dat algemeen het belang van hoogwaardig uitgangsmateriaal wordt erkend,
- dat de coöperatieve opzet en de hulp van het GCRI (apparatuur, kennis) een duidelijk financieel voordeel bieden boven het opzetten van soortgelijke individuele laboratoria.

d. Dr. Thomas (NVR): Dr. Thomas houdt zich bezig met groeistoffenonderzoek, o.a. bij de ui (Allium cepa).

Besputtingen met BAP stimuleerde de, vermoedelijk adventieve, vorming van bolletjes aan de basis van de bloemsteeltjes na het wegknippen van de bloemen. Afhankelijk van de onderzochte variëteit was deze extra vermeerdering (belangrijk voor het aanhouden van mannelijke steriele lijnen) het gevolg van hogere percentages planten met bolletjes en hogere aantallen bolletjes per plant.

In het recente verleden is ook onderzoek verricht naar de hormonale achtergronden van het rustverschijnsel. Resultaten van experimenten, waarbij de endogene gehalten van auxinen, GA en remstoffen werden vergeleken gedurende de rust en de spruiting zijn eerder gepubliceerd (Thomas, 1969). Het is gebleken dat de stikstofgift en ook de bolmaat van invloed zijn op de rustduur. Meer stikstof en grotere bolmaten hebben daarbij een kortere rust tot gevolg, enerzijds doordat de bollen later in rust gaan, anderzijds doordat ze eerder spruiten. Deze verschillen in dormancy konden niet worden herleid tot een ander verloop van de auxine/inhibitor-verhouding in de bol. Kleine bolletjes hebben een over het algemeen langere rustduur. Echter, een klein maar in verschillende experimenten consistent percentage van deze bolletjes had juist een zeer geringe dormancy. De oorzaak hiervan is niet bekend. De aard van de inhibitor, die gedacht wordt de uitgroei van het meristeem te beletten, is niet bekend. Het is zeker niet ABA, aangezien de Rf-waarde van deze inhibitor niet samenvalt met die van ABA.

De toevoeging van GA₃ en andere GA's had nooit invloed op de rust. Het vermoeden bestaat dat de toegevoegde gibberellinen direct worden gebonden, gezien de afwezigheid van afbraakprodukten en gezien de zeer lage activiteit van GA-afbrekende enzymssystemen.

Gebleken is dat BAP de spruiting bevordert. De huidige gedachte is dan ook dat het rustverschijnsel wellicht op een cytokinine-inhibitor-interactie is gebaseerd.

Bespuitingen en (blad)injecties van uieplanten onder niet bol-inducerende lichtcondities (nl. korte dag) met verschillende groeistoffen (NAA, IAA, Ethrel, ABA, GA, TIBA, ancymidol, ALAR, e.d.) hadden, met uitzondering van Ethrel, geen bolvorming tot gevolg. Ethrel veroorzaakte een patroon van bolvorming dat afweek van het normale.

- e. Dr. Drew (NVRs): Dr. Drew werkt aan weefselkweek van Daucus carota. Doel is de zaadvermeerdering te vervangen door een vegetatieve vermeerderingswijze. Het basisprincipe is om uit callus binnen enkele maanden enige malen $\times 10^6$ somatische embryoïden te kweken om deze dan vervolgens uit te "zaaien" in de grond. Behalve het feit dat het callus niet voor alle onderzochte variëteiten even stabiel was, kwam als probleem naar voren dat groei zonder glucose voor deze embryoïden vooralsnog niet mogelijk was. Gedacht werd, in navolging van Dr. Murashige met sla, een inkapseling van de embryoïden met een te metaboliseren C-bron te beproeven.
- f. Dr. Walkey (NVRs): Dr. Walkey houdt zich sedert 1965 bezig met meristeemcultuur en warmtebehandelingen ter verkrijging van virusvrije planten van o.a. rabarber (Rheum rhaponticum), Nicotiana rustica, waterkers (Nasturtium officinale). Combinaties van warmtebehandeling en weefselkweek zijn gebleken gunstig te zijn voor de verwijdering van vele virussen. De warmtebehandeling wordt uitsluitend gegeven aan het plantmateriaal in de kweekbuizen of -kolven. De noodzakelijke temperatuur en behandelduur zijn voor iedere virus-gastheer-relatie anders. Alternering van dag- en nachttemperaturen kan soms voordelen bieden. In het Nicotiana rustica - CMV-systeem heeft het onderzoek geleid tot een relatie tussen het aantal uren boven een bepaalde basistemperatuur en de virusconcentratie (gemeten door bepaling van het aantal laesies op Chenopodium quinoa na inoculatie). Een voortijdige terugkeer van de hoge temperatuur naar de uitgangswaarde heeft vaak veel hogere virusconcentraties tot gevolg dan gevonden worden bij constante groei onder die uitgangstemperatuur. Ter verklaring hiervoor wordt aangenomen dat de temperatuurbehandeling, behalve op de virusafbraak, ook invloed heeft op een weerstandsmechanisme van de plant.

De ervaring is dat virussen van de poty-groep niet of slechts zeer moeilijk met behulp van hoge temperaturen kunnen worden verwijderd.

De aard en de concentraties van de in het voedingsmedium aanwezige groeistoffen hebben wel enige invloed op de in de resulterende planten aanwezige virushoeveelheden, maar de virusconcentratie bereikt nooit de waarde nul.

De introductie van virusvrije planten verloopt in het algemeen zeer moeilijk. Goede ervaringen zijn eigenlijk alleen opgedaan met aardbeien en appels. Als een van de oorzaken, naast de niet altijd uitblinkende organisatiestructuur, noemde Dr. Walkey het feit dat het kwaliteitsvoordeel van virusvrije planten veelal gepaard gaat met een grotere gewasomvang en derhalve resulteert in een kleinere plantdichtheid. Bij enige gewassen (rabarber, aardbeien) werd gevonden dat virusvrije planten een andere, langere koudebehoefte hadden dan viruszieke planten.

- g. Dr. Hill (ADAS): Dr. Hill noemde als een van de belangrijkste doeleinden van de ADAS het verbeteren van de relatie tussen de research en de praktijk. De virologie is een recente specialisatie binnen de fytopathologie-afdeling van de ADAS en telt momenteel twee virologen.

Een van de virologen legt zich volledig toe op fruitgewassen, terwijl Dr. Hill andere gewassen (aardappels, siergewassen, champignons) onder zijn hoede heeft. Het virologische werk is vrijwel uitsluitend diagnostisch van aard. Tijd voor het bereiden van antisera en voor het ontwikkelen van grootschalige toetsmethodieken ontbreekt.

- h. Dr. Hussey (John Innes Institute): Dr. Hussey werkt aan de weefselkweek van zeer vele dicotyle en monocotyle gewassen. Hij hoopt dat door het vergelijkende werk op de duur algemene uitspraken mogelijk worden.

Een gevolg van deze brede aanpak is, dat noodgedwongen de hoeveelheid werk per gewas beperkt moet blijven. Direct geschikt voor praktische toepassing zijn de door hem beschreven procedures dan ook veelal niet. Behalve aan narcis is oriënterend onderzoek m.b.t. vermeerdering verricht aan o.a. hyacint, lelie, iris, gladiool, Hippeastrum, Muscari, Freesia en Sparaxis. Pogingen werden in het werk gesteld ook voor tulp een snelle wijze van vegetatieve vermeerdering te ontwikkelen. Toevoeging van zeer hoge cytokinineconcentraties aan okselknoppen in de hoop deze tot uitgroei te brengen (gevolgd door uitgroei van okselknoppen hiervan) had nog geen bevredigende culturen opgeleverd. De hoge cytokinineconcentraties hebben zowel vergroeiingen als een gedrongen structuur tot gevolg. Hoewel met name deze gedrongen structuur een veelvuldig verschijnsel was van cultures van diverse gewassen, kon dit, naar zijn zeggen, geen kwaad voor bolgewassen. Doordat verscheidene jaren teelt nodig zijn voordat de planten bloeibaar zijn, worden rest-verschijnselen bij bolgewassen niet gevonden.

- i. Twyford Laboratories Ltd.: Weefselkweekwerk wordt verricht aan een groot aantal bol-, fruit- en andere gewassen. Bolgewassen, fruitgewassen, Anthurium en Gerbera beslaan ongeveer 80% van de in 1978 te produceren ca. $2,5 \times 10^6$ plantjes. Het aandeel van bolgewassen in de produktie bedraagt ca. 10%.

Cultures van appels geven vaak problemen bij de beworteling. Het gebruiken van zeer jonge scheutjes en voedingsmedia met lage suiker- en zoutconcentraties voldoet echter goed. Phloroglucine heeft met IBA een synergistische werking op de wortelvorming, maar is ook bevorderlijk voor de vermeerdering. Bovendien werd een invloed gevonden van de plastic (polystyreen) containers, welke voor de kweek gebruikt werden.

Cultures werden bekeken en bediscussieerd van narcissen, lelies, gladiolen, irissen, hyacinten en tulpen. Het uitgangsweefsel voor de cultures van bolgewassen was in het algemeen weefsel van de bolbodem of van de rokken. Nadrukkelijk werd getracht de vorming van en de regeneratie uit callus-weefsel te voorkomen. Een en ander kan consequenties hebben voor de keuze van de aard en de concentratie van de groeistoffen in het medium. Lelies nemen binnen het bollenpakket nog een belangrijke plaats in, zowel voor de meristeemcultuur als voor de snelle vermeerdering. Wat dit laatste betreft leert de ervaring dat *L. speciosum* 'Rubrum' minder snel te vermeerderen is dan andere lelies, zoals b.v. de midcentury-hybriden. Over de vraag of ingestuurde bollen voor meristeemcultuur als regel worden getoetst op de aanwezigheid van virussen werden tegengestelde verklaringen afgelegd (Bennett, Holdgate). Indien wel toetsing plaatsvindt dan wordt dat met behulp van de electronenmicroscop gedaan. Dit betekent dat i.h.a. de eventuele aanwezigheid van andere virussen dan LSV moeilijk of niet met zekerheid kan worden aangetoond, hetgeen consequenties kan hebben voor de kans om uit deze bol virusvrije planten te verkrijgen. Planten, verkregen uit meristeemcultuur, worden op kleine schaal vermeerderd en geplant in een oude luisvrije kas. Toetsingen op de eventuele aanwezigheid van virussen hierin vinden plaats aan het eind van de buisfase en in daaropvolgende groeiseizoenen, eveneens met het EM en soms met toetsplanten. Toepassing van serologische methoden vindt niet plaats. De resultaten van deze toetsingen worden aan de belanghebbende kweker meegedeeld, waarna deze de beslissing neemt: direct vermeerderen of verdere teelt onder luisvrije omstandigheden, gevolgd door weer een toets etc. Hoewel bekend is dat de plantjes voor een absolute zekerheid omtrent het al of niet virusvrij zijn minimaal twee teeltjaren na de buisfase moeten worden getoetst, blijkt tot dusverre slechts een zeer gering aantal kwekers dat te hebben verlangd.

Gediscussieerd werd over het bestaande certificeringssysteem voor lelies en over de mogelijke eisen die in de toekomst aan weefselkweekmateriaal zouden kunnen worden gesteld.

- j. Dr. Alderson (Nottingham School of Agriculture): Dr. Alderson is sinds twee jaar werkzaam als lector op de afdeling 'Agriculture and Horticulture'. Hij heeft niet alleen een docerende taak maar werkt ook aan de opbouw van een weefselkweekonderzoekprogramma; hij heeft daarbij momenteel de steun van een medewerker. Bolgewassen hebben daarbij zijn grootste belangstelling. Hoewel momenteel een versnelling van de vegetatieve vermeerdering van een aantal gewassen (lelie, gladiool, tulp) voorop staat, wordt meristeemcultuur ter verkrijging van virusvrije planten nadrukkelijk niet uitgesloten. Door zijn medewerker is tot dusverre een jaar gewerkt aan weefselkweek van de tulp (cvs "Apeldoorn", "Lustige Witwe"). Hoewel allerlei typen weefsels werden onderzocht (basale plaat, rokken, okselknoppen, stengel, bladeren, bloemen, etc.) op verschillende media (varianties in zouten en groeistoffen) werden tot dusverre geen reproduceerbare positieve resultaten behaald. Weefsel van de basale plaat gaf veelal callusvorming te zien, waaruit nooit spruiten, maar soms wel wortels regeneerden. Dit laatste gebeurde alleen indien nog restanten van het oorspronkelijke tulpeweefsel aanwezig waren, hetgeen doet vermoeden dat tulp-specifieke stoffen van belang kunnen zijn. Weefsel van stengel en bloem gaven soms enige callusvorming te zien, maar zelden een niet reproduceerbare adventieve spruitvorming. Dit onderzoek aan de tulp zal de komende jaren worden voortgezet.

9. Literatuur:

1. Hanks G.R. and Rees A.R. (1977) *Scientia hort.* 6: 237-240
2. Hollings M. (1965) *Ann. Rev. Phytopath.* 3: 367-396
3. Hollings M. and Stone O.M. (1968) *Scientia hort.* 20: 57-72
4. Hollings M. (1974) *The Grower* 81: 722-724
5. Hussey G. (1975) *J. exp. Bot.* 26: 253-262
6. Hussey G. and Hilton J. (1977) *Ann. Rep. John Innes Inst.* 1977 p.45
7. Mowat W.P., Asjes C.J. en Brunt A.A. (1977) *Ann.appl.Biol.* 86: 189-198
8. Stone O.M. (1973) *Ann. appl. Biol.* 73: 45-52
9. Thomas T.H. (1969) *J. exp. Bot.* 20: 124-137
10. Walkey D.G.A. and Webb M.J.W. (1968) *J. gen. Vir.* 3: 311-313
11. Walkey D.G.A. and Woolfitt J.M.G. (1970) *J. hort. Science* 45: 205-206
12. Walkey D.G.A. and Cooper V.C. (1972) *Phys. Plant Path.* 2: 259-264
13. Walkey D.G.A., Cooper V.C. and Crisp P. (1974) *J.hort.Science* 49:273-275
14. Walkey D.G.A. and Cooper J. (1976) *Ann. appl. Biol.* 84: 425-428
15. Walkey D.G.A. (1976) *Ann. appl. Biol.* 84: 183-192
16. Walkey D.G.A. and Cooper J. (1976) *Pl. Science Lett.* 7: 179-186
17. Walkey D.G.A. and Freeman G.H. (1977) *Ann. appl. Biol.* 87: 375-382
18. Walkey D.G.A. (1978) in "Proceedings of 4th congress of plant, tissue and cell culture", Calgary 1978
19. Ziekten en afwijkingen bij bolgewassen, deel 2 (Amaryllidaceae, Iridaceae e.a.)