

HET KWEKEN VAN TOMATEWORTELS BESMET MET TABAKSMOZAIEKVIRUS¹⁾

With a summary: The cultivation of tomato roots infected by tobacco mosaic virus

DOOR

W. GRAAFLAND, T. W. J. GADELLA en D. H. BRANTS

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten”, Baarn

INLEIDING

Er bestaat in de literatuur geen eenstemmigheid over de vraag, of een topmeristeem van een viruszieke plant vrij van virus is of niet. Dit kan geweten worden aan het feit, dat onderzoekers, die zich met dit probleem bezig hielden, met verschillende waardplanten en virussen werkten. Zo slaagden MOREL & MARTIN (1955) erin, gezonde aardappels te verkrijgen door het in reincultuur brengen van topmeristemen van spruiten, afkomstig van knollen van enkele rassen besmet met A-, X- of Y-virus. Ditzelfde lukte echter niet bij het aardappelras Eersteling, dat carrier is voor X- en S-virus (GRAAFLAND; QUAK, ongepubliceerd). Hoewel LIMASSET & CORNUET (1949 en 1950) in het topmeristeem van een tabaksplant besmet met TMV geen virus konden aantonen, is het niet bekend, of dit weefsel in andere gevallen mogelijk wel virusdeeltjes kan bevatten. Over het voorkomen van virusdeeltjes in meristemen van een carrier is in het geheel niets bekend.

DOEL VAN HET ONDERZOEK

Het was wenselijk de virusverdeling nog eens op andere wijze na te gaan, b.v. bij wortels, waar het meristeem gemakkelijker te bereiken is dan bij een stengel. De keuze viel op tomatewortels besmet met TMV, die volgens WHITE (1934 en 1943) in vitro kunnen worden gekweekt en waarin het virus zich kan vermenigvuldigen. Onderzocht werd op welke wijze besmette tomatewortels het beste in vitro kunnen worden verkregen en hoe zij in een steriel milieu kunnen worden gehouden.

HET ONDERZOEK

Hier volgt een korte mededeling over een eenvoudige methode, waarop besmette wortels in vitro kunnen worden verkregen en voortgekweekt. Daartoe kan men het beste uitgaan van zaden, die steriel met hun gelatineus omhulsel uit een gave, rijpe vrucht worden genomen en daarna uitgelegd op water-agar (WHITE, 1943). Na enkele dagen ontkiemen ze. De gevormde worteltjes worden afgeknipt en in WHITE-cultuurvloei-stof gebracht. Men kan niet van handelszaad uitgaan, daar de desinfectie hiervan te veel moeilijkheden oplevert. Het kweken van plantaardige weefsels stelt hoge eisen aan de zuiverheid van de chemicaliën en van het water, dat dubbel gedestilleerd moet zijn. Het glaswerk moet van het merk Pyrex zijn. Bij gebruik van andere glassoorten bleken de tomatewortels wel enkele dagen te groeien, maar daarna te verbruinen en te sterven.

¹⁾ Aangenomen voor publikatie 20-5-1957.

Dit proces verliep des te sneller, naarmate ze dichter bij de glaswand van het cultuurvaatje kwamen.

De inoculatie van de wortels kan plaats vinden als de zaden op de water-agar kiemen. Een glasspatel wordt in een suspensie van steriel TMV en carborundumpoeder gedompeld en daarna over de oppervlakte van de wortel gestreken. Deze wijze van inoculeren geeft alleen goed resultaat als de groeizone van de wortel wordt geraakt.¹⁾ Na de inoculatie worden de wortels afgeknipt, gespoeld in steriel dubbel gedestilleerd water en in de cultuurvloeistof gebracht. Deze inoculatiemethode heeft als nadelen de onbetrouwbaarheid van het slagen van de inoculatie en de mogelijkheid van een onregelmatige verdeling van het virus in de wortel. Juist voor het onderzoek naar verschillen in virusconcentratie in de verschillende delen van de wortel is een natuurlijke verdeling van het virus gewenst. Daartoe werd gezocht naar een methode, om met TMV besmette wortels te verkrijgen, die dit virus van de groene delen van de plant uit hadden ontvangen. WHITE (1934) verkreeg dergelijke wortels door de stengels van met TMV-besmette tomatplanten in stukjes te snijden en deze stukjes in een vochtige omgeving adventiefwortels te laten vormen. Deze wortels werden dan afgeknipt en in de cultuurvloeistof gebracht. Ondanks vele infecties met bacteriën en schimmels slaagde hij erin, enkele wortels steriel verder te kweken.

Bij het volgen van deze methode verkregen wij dezelfde resultaten; bovendien stierven de wortels na enkele dagen af. Daarom werd een nieuwe methode ontwikkeld.

Zaden, die op steriele wijze uit een gave, rijpe tomatenvrucht waren genomen, werden in cultuurbuizen (160 mm lengte en 20 mm inwendige diameter) gebracht, waarin zich 10 ml WHITE-agar bevond (WHITE's cultuurvloeistof met 0,8 % agar). Uit de zaden ontwikkelden zich kleine planten van normaal uiterlijk. Toen de eerste normale bladeren waren gevormd, werden deze geïnoculeerd met TMV door met behulp van een glasspatel of een pincet een suspensie van steriel TMV en carborundumpoeder over het blad te strijken. Na 6 dagen was het TMV in de wortels aan te tonen door middel van de „local lesion“-toets op *Nicotiana glutinosa*.

De gehele plant werd daarna uit de buis genomen, de wortels werden eraf geknipt en in vloeistofcultures gebracht. Overenten geschiedde op de gebruikelijke wijze door toppen van ongeveer 1 cm lengte van goed groeiende hoofd- en zijwortels af te knippen en in vers medium te brengen. Op deze wijze werden verscheidene cultures verkregen van wortels, geïnfecteerd met TMV.

De methode zal worden gebruikt om na te gaan hoe de virusconcentratie in de verschillende delen van de wortel varieert en of het meristeem virusvrij is.

SUMMARY

A method was developed to culture tomato roots infected by tobacco mosaic virus (TMV).

First we tried to cultivate tomato roots in vitro, starting from seeds aseptically taken from a sound, ripe tomato fruit. The seeds placed on water agar in Petri dishes germinated after some days. The roots were inoculated with TMV while the seeds were germinating on the agar. Then the roots were cut off and

¹⁾ Op deze voorwaarde werden wij opmerkzaam gemaakt door een persoonlijke mededeling van Dr. B. KASSANIS, waarvoor wij hier graag onze dank uitspreken.

transferred to a liquid medium of WHITE's nutrient. By this method infection with TMV was sometimes doubtful; moreover a more natural distribution of the virus in the root was desired. To that purpose, seeds were aseptically taken from a sound, ripe tomato fruit and placed in tubes of 160 mm length and 20 mm width filled with 10 ml of WHITE's nutrient solidified with 0.8% agar.

The seeds germinated and developed into seedlings which could be inoculated when the first normal leaves were formed. Inoculation of these leaves was done by means of a glass spatula or by forceps dipped in a sterile suspension of TMV and carborundumpowder. After six days TMV could be detected in the roots by the local lesion test on *Nicotiana glutinosa*. The whole plant was taken out of the tube, the roots were cut off and transferred to the liquid medium. Subcultures could be made by cutting off the tips of well grown main and side roots. This method gave satisfactory results and will be used in further investigations on virus concentrations in different parts of the root and on the relationship between virus and meristem of the host.

LITERATUUR

- LIMASSET, P. & P. CORNUET, - 1949. Recherche du virus de la mosaïque du tabac (*Marmor tabaci* Holmes) dans les méristèmes des plantes infectées. C. R. Acad. Sci. 228: 1971-1972.
- LIMASSET, P. & P. CORNUET, - 1950. Etude de la corrélation entre l'âge des organes aériens et la quantité de virus contenue dans ces derniers chez le tabac infecté par le virus de la mosaïque du tabac (*Marmor tabaci* (Orton) Holmes). Ann. Epiph. sér. C 1: 274-285.
- MOREL, G. & C. MARTIN, - 1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. C. R. Acad. d'Agric. France 41: 472-475.
- WHITE, P., - 1934. Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. Phytopath. 24: 1003-1011.
- WHITE, P., - 1943. A Handbook of Plant Tissue Culture. New York.