

Etablering af virusfrie meristemkulturer af havebrugsplanter

Establishment of virus-free meristem-tip culture of horticultural plants

Niels Paludan

INDHOLDSFORTEGNELSE

I	Indledning	387
II	Udenlandske undersøgelser	390
III	Danske undersøgelser	394
a.	Indledning	394
b.	Metodik	394
c.	Resultater	394
IV	Diskussion	406
V	Konklusion	406
VI	Resumé	407
VII	Summary	408
VIII	Litteratur	409

I. Indledning

Fremskaffelsen af virusfrit plantemateriale er igennem de sidste 2 årtier blevet mere og mere aktuel inden for al planteproduktion. Specielt gælder dette, hvor der er tale om vegetativt formerede kulturer, idet denne formeringsmetode er medvirkende til at videreføre eksisterende virus-sygdomme til afkommet fra de respektive moderplanter. Dette har resulteret i, at der inden for en lang række plantearter og -sorter ikke længere findes virusfrit materiale.

Hvor det tidligere ikke var muligt at helbrede virusinficeret materiale, er der nu blevet udviklet flere metoder, ved hvilke virusfrie planter kan etableres fra totalt inficerede. *Varmebehandling*, der forårsager en inaktivering eller en hæmning af virusproduktionen, har med held været praktiseret over for adskillige virussygdomme. Imidlertid er det ikke alle vira, der kan inaktiveres ved varmebehandling, og i sådanne tilfælde er *meristemkultur* forsøgt, idet det har vist sig, at selve meri-

stemet fra systemisk inficerede planter i mange tilfælde er virusfrit.

På grund af meristemets ringe størrelse (ca. 0,1 mm), er det meget vanskeligt at få et tilfredsstillende antal af meristemerne til at vokse. En kombination af *varmebehandling* og *meristemkultur* har imidlertid gjort det muligt at skære meristemerne så store, at vækstmulighederne er blevet betydelig forbedret samtidig med, at meristemerne stadig er virusfrie.

Meristem er delingsvæv, i hvilket der foregår en celledeling og vækst af protoplasmaet. Meristem findes både i skud- og rodspidser (vækstpunkter) og optræder som et særligt lag parallelt med overfladen i nogle ældre dele af mange stængler og rødder (vækstlag, kambium) (*P. Larsen*, 1962). Skud- og rodmeristemer skal have hvert sit næringsmedium, hvor skudmeristemer kræver organisk kvælstof (kokosmælk eller glutamin) for at kunne udvikle sig.

Tabel 1. Oversigt over skæring af meristemer af forskellige havebrugskulturer 1949-70
(Survey over meristem-tip culture from different horticultural plants 1949-70)

År	Kultur	Planter befriet for virus	Behandling		Opløsning	Bemærkninger	Forfatter
			varme	meristem i mm			
1949	Tobak	TMV				uden vækst	Limasset og Cornuet
1952	Dahlia	mosaik				podning til frøplt.	Morel, G. og Martin, C.
1955	Dahlia	bronzetop				skudspidser	Holmes, F. O.
1956	Chrysanthemum	aspermi				skudspidser 4-8 mm	»
1956-57	Kartofler	Y, A, S				vævkultur	Thomson, A. D.
1957	Freesia Nellike	spætning	40°/6-8 uger	0,150		1-flere bladpar	Van Dorst Quak, F.
1959-60	Nellike	ringmosaik	30°/6 uger	0,5-1 0,2, 0,5-1		1-2 bladpar 5 pct., 70-80 pct.	Hollings, M. »
1960	Cymbidium Nellike	spætning ringmosaik		0,5-1		klonformering virus i meristemet	Morel, G. Stone, O. »
1962	Chrysanthemum	grønne blomster	38°/6 uger	0,5-1		dværgsyge + D ikke fjernet	Hollings, M.
1964	Jordbær	latent A			Morel (Kinetin + NAA)		Belkengren og Miller Hakkaart, F. A., Quak, F.
	Chrysanthemum	latent B	+				
	Pelargonie			1-5		kokos mælk	Allen, D. B. og Hildebrandt, A. C.
1963-65	Freesia	virus		0,8-1	Heller-Berthelot		Vermulen, H. og Brants, D. H.
1964	Narcis	arabis-mosaik			Stone + MS (filter)	mange plantearter	Hollings, M. + Stone, O.
1965	Cymbidium						»
	Rabarber	kålroe-mosaik					Tomlinson, J. A. og Walkey, D. G. A.
	Nellike (D.barbatus)	latent nervemosaik		0,5-1	Neergaard White, Morel → MS*		Stone, O. og Hollings, M.
1966	Iris	mosaik		0,1-0,5			»
							Baruch, E. R. og Quak, F.
1967	Tobak	TMV				efter blomster- induktion	Martin, C. m.fl.
	Chrysanthemum	mosaik	+			98 pct. virusfri	Hollings, M. og Stone, O.
	Humle	prunus ringplet	+				East Malling

År	Kultur	Planter befriet for virus	Behandling		Opløsning	Bemærkninger	Forfatter
			varme	meristem i mm			
1968	Stikkelsbær	nervebånds-klorose	35°/2 uger	0,5-1	MS → Knop	15-25°C. 16-18 timers lys. Side-mer. ÷ vækst	Jonas, O. P., Sallie J. Vine
	Rabarber	kirsebær-bladrulle, jordbær-latent-ringmos., agurk-mosaik, arabis-mosaik		0,3-2,5	Neergård Murashige-Skoog Linsmaier-Skoog	mer.-kuppel ÷ vækst, top- og sidemerst. + vækst 18°C. 16 timers lys 2-3 bladpar	Walkey, D. G. A.
	Pelargonie	tomat-ringmosaik		3	MS, White, Halperin	17,5°C. 16 timers lys filtrerpapir bedst rodudvikling	Pillai, S. K. og Hildebrandt, A. C.
	Peberrod	kålroe-mosaik blomkåls- »		0,1-0,2	Morel og Muller (1964)	belysning i 18 tim. + 1. bladpar	Hickman, A. J. og Varma, A.
	Jordbær	gulrandsyge krøllesyge latent A nerveklorose	±	0,8 0,4-0,6 0,4	MS → Knop	varme-medium oprindelse og størrelse ingen indfl.	Vine, S. J.
	Tobak (N. rustica)	kirsebær-bladrulle arabis-mosaik			Linsmaier og Skoog 1965	klonformering	Walkey, D. G. A. og Woolfitt, M.G.
	Narcis	arabis-mosaik agurk-mosaik			Neergaard + inisitol + NAA	15°	Stone, O. M.
	Freesia Tulipan, Hyacinth	stregesyge				25° 15°	
1969	Nellike	spætning ætsning	38°/9 uger	0,1-0,5	Gøsta Nilsson		Paludan, N.
1970	Salix sp. Vitis vinefera Gladiolus				MS	blåt lys vævkultur	Beauchesne, G. » Ziv, M. + Halevy, A. H.
	Freesia Chrysanthemum	Fr.-virus I aspermi dværgsyge	÷ ÷	0,2-0,5 0,2-0,5	MS MS		Paludan, N. (ikke publiceret)
	Lilje	latent	38°10-22 uger ÷	0,2-0,5 0,6-1,0	MS Gøsta Nilsson		

* MS = Murashige og Skoog.

Der findes 3 typer af skudmeristemer nemlig:

- a: Med én stor celle i spidsen (apical)
- b: Multicellulære arrangeret stjerneformet (radiært)
- c: Multicellulære arrangeret i parallelle lag.

Hastigheden af celledelingen i meristemet er afhængig af planteart og temperatur og kan foregå fra en gang hver 3. døgn til en gang hver 20. døgn. Gibberelin påvirker både deling og vækst (Clowes 1961).

Ved de aseptiske kulturer består den mest almindelig anvendte vævsenhed af meristemet (kuppen) samt det første bladpar-anlæg med en størrelse fra ca. 0,1 mm til 3,3 mm. Denne vævsenhed, der på engelsk kaldes meristemtip, benævnes på dansk meristem med angivelse af antal bladpar-anlæg samt størrelse.

II. Udenlandske undersøgelser

a. Indledning

Undersøgelser af *Limasset* og *Cornuet* (1949) viste, at viruskoncentrationen i tobak, inficeret med tobak-mosaik-virus (TMV), aftog jo nærmere bladene var ved vækstpunktet, og at viruset ikke kunne påvises i dette i halvdelen af de undersøgte prøver.

Disse resultater inspirerede *Morel* og *Martin* (1952) til at isolere meristemer af virusinficerede dahlia og dyrke disse under aseptiske forhold in vitro. Ved anvendelse af forskellige næringsmedier lykkedes det at frembringe skudvækst, og efter podning til sunde frøplanter, at etablere virusfrie dahliaplanter.

Siden disse første forsøg har mange forskere fortsat arbejdet med meristemkulturer, omfattende en lang række værtplanter, i forsøg på at befri disse for mange forskellige virussygdomme. En oversigt over denne udvikling i perioden fra 1949 til 1970 fremgår af tabel 1 specielt omfattende de første undersøgelser inden for de enkelte planteslægter og vira.

b. Forskellige faktorerers indflydelse på meristemvæksten

Som det fremgår af oversigten, har undersøgelserne først og fremmest været koncentreret om

de urteagtige pryddplanter, hvor der på grund af en voldsom vegetativ opformering har været store problemer rent virusmæssigt, samtidig med, at det relativt let er lykkedes at etablere meristemplanter fra disse kulturer. På basis af tidligere undersøgelser af bl.a. *Kassanis* (1957), *Quak* (1957) og *Neergaard* (personlig meddelelse) har *Stone* (1963) udført forsøg vedrørende forskellige faktoreres indflydelse på væksten af nellikemeristemer, hvor forsøgene viste, at meristemerne voksede bedst i et ukompliceret næringsmedium tilført via væger af askefrit filtrerpapir. Ligeledes var tilstedeværelsen af roddannende hormoner i næringsmediet, gennem den første periode af meristemkulturen, af afgørende betydning. Hos meristemer skåret mindre end 0,2 mm dannede 40 pct. rødder mod tilsvarende 70 pct., hvor størrelsen var 0,2-0,4 mm. Meristemer taget i marts-april måned slog rod med 61 pct. mod 18 pct. i december. Undersøgelser vedrørende meristemer skåret fra henholdsvis topskud og sideskud, hvor sidstnævnte udgjorde 81 pct. af samtlige skårne viste, at der ikke var nogen forskel i pct. meristemer med rod eller nævneværdig forskel i pct. planter uden virus (nellike-spætning).

Hvor meristemer blev skåret enten fra varmebehandlede eller virusinficerede nellikestiklinger, blev antallet af etablerede meristemplanter reduceret i forhold til dem skåret fra ubehandlede og sunde stiklinger.

Tilsvarende er der inden for chrysanthemum blevet iagttaget en reduktion i antal meristemplanter ved forlænget varmebehandling af moder materialet (*Hakkaart & Quak* 1964) og tillige observeret udvikling af mange blomsterdeformiteter (*Holling & Stone* 1967).

Meristemer skåret om efteråret fra frilandsjordbær groede bedre end tilsvarende skåret om sommeren ved højere temperaturer (*Ghena* 1970). Ved jordbær-meristemer skåret større end 0,2 mm, var roddannelsen uafhængig af størrelsen, men påvirket af næringsmediet og forudgående varmebehandling (*East Malling*, 1965).

En lang række næringsmedier er blevet anvendt til de forskellige kulturer (*Morel og Martin*: dahlia, *Morel*: iris, *Kassanis*: kartofler, *Quak*, *Neergaard*, *Stone*, *Nilsson*: nelliker), men mange

Tabel 2. Næringsopløsninger for væv-meristem-kulturer i mg/liter
(Nutrient solutions for tissue and meristem-tip cultures in mg/liter)

Næringsstoffer	Murashige og Skoog (1962) modi- ficeret 1970	Buys (Mura- shige og Morel)	Morel	G. Nilsson	Neergaard (O. Stone)
<i>Makro:</i>					
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	170				
NH ₄ NO ₃	1650	1650			
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	440	440			
+Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O.....			500	500	1000
+KNO ₃	1900	1900	125	125	250
+MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	370	370	125	125	250
+KH ₂ PO ₄	170	170	125	125	250
FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	27,8	27,8			
·Fe ₂ (SO ₄) ₃			25		25
Na ₂ Fe-EDTA.....	37,3	37,3		50	
<i>Mikro:</i>					
·H ₃ BO ₃	6,2	6,2	0,025	0,025	0,025
·MnSO ₄ ·4H ₂ O.....	22,3	22,3	0,8	0,8	0,8
·ZnSO ₄ ·4H ₂ O.....	8,6	8,6	0,04	0,04	0,04
·KJ.....	0,83	0,83	0,25	0,25	0,25
·NiCl ₂ ·6H ₂ O.....			0,025	0,025	0,025
·COCl ₂ ·6H ₂ O.....	0,025	0,025	0,025		0,025
·CuSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
·TiSO ₄ ·5H ₂ O.....			0,1		0,1
·BeSO ₄ ·4H ₂ O.....			0,025		0,025
·H ₂ SO ₄ (konc.).....			0,001°		0,001°
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O.....	0,25	0,25			
<i>Organiske:</i>					
Glukose.....			40000		40000
Sucrose.....	30000	20000		20000	
Agar.....	10000	8000	12000	10000	10000
Adeninsulfat.....	80	5		5	
Biotin.....			0,001		
Ca-panthothenat.....		1	0,001		
Cystein.....		1	0,01		
Casein hydrolysat.....	1000	1000		200	
Gibberelinsyre.....	1				
Glycine.....	2	2			
Indol-3-eddikesyre.....	2				
Inositol-meso.....	100	100	0,001		(0,1)
Kinetin.....	2				
Kokos mælk.....				1°	
1-Naphthalen-eddike- syre.....		1	0,001	1	1
Nikotinsyre.....	0,5	1			
Pyridoxin-HCL.....	0,5	1			
Thiamin-HCL.....	0,4	1	0,001	1	1

+ = Knop's opløsning · = Berthelots opløsning ° = ml

af disse næringsmedier ligger meget nær ved hinanden, og kan betragtes som modifikationer af Morels næringsmedium fra 1952, baseret på Knops (makronæringsstoffer) og Berthelots (mikronæringsstoffer) opløsninger med tilsætning af sukker, agar, roddannende hormon samt organiske stoffer (vækststoffer).

I de senere år er dog anvendelsen af meget kraftige næringsmedier, der oprindeligt var beregnet til væv- og kalluskulturer (*Murashige* og *Skoog*, 1962), blevet mere og mere almindelig, idet disse næringsmedier har vist sig også at være velegnede til mange meristemkulturer (*Linsmaier* og *Skoog*: rabarber, *Murashige* og *Skoog*: pelargonie, *free-sia* og *chrysanthemum*, *Buys* (*Murashige* + *Morrel*): nelliker).

Sammensætningen af nogle af disse næringsmedier fremgår af tabel 2.

Overflytning af meristemer fra et næringsmedium til et andet er blevet anvendt bl.a. ved kulturer af nelliker, gladiolus og træagtige planter. Nellikemeristemer, der blev startet i næringsmedium tilsat 1-naphthalenediksyre (NAA), blev, efter den første rodudvikling, overflyttet til samme medium, men uden NAA for at undgå hormonets hæmmende virkning på den videre rodudvikling (*Stone* 1963).

Gladiolus-meristemer, der først udviklede skud og blade på *Murashige* og *Skoogs* medium (MS) tilsat 0,5 ppm kinetin og 0,5 ppm NAA, dannede, ved overflytning til samme medium uden kinetin og NAA og kun med halv sucrosekoncentration, 3-6 knolde i løbet af 5-6 måneder (*Ziv* 1970).

Dyrkning af meristemer fra træagtige planter (frugtbuske) er blevet forsøgt på MS's næringsmedium tilsat kokosmælk og NAA og med flytning af meristemerne hver 3. uge til et svagere medium baseret på Knops næringsopløsning tilsat glukose og mikronæringsstoffer efter MS (*Jones* 1968). Ved denne fremgangsmåde er det lykkedes at etablere enkelte virusfrie stikkelsbærplanter.

Forsøg vedrørende indflydelsen af næringsmediets pH-værdi på roddannelsen er ikke blevet udført, men iagttagelser (*Stone* 1963) tyder på, at en pH-værdi på 5,5 er betydeligt bedre end 6,0.

Indflydelsen af temperaturen i dyrkningsrum-

met på meristemernes udvikling er heller ikke undersøgt forsøgmæssigt. I de fleste tilfælde holdes en temperatur på 22,5°C, men lavere temperaturer omkring 15-18°C er dog også blevet anvendt ved enkelte kulturer, hvoraf kan nævnes stikkelsbær (*Jones* 1968), rabarber (*Walkey* 1968), pelargonie (*Pillai* & *Hildebrandt* 1968) samt løgplanterne narcis og tulipan (*Stone* 1968).

Belysningstidens indflydelse på dyrkning af plantevæv er først blevet nærmere undersøgt af T. *Murashige*, der på den 18. internationale havebrugskongres i Israel (1970) gjorde rede for disse forsøg. Den optimale belysningstid for tobak, belyst med 1000 lux, viste sig at være 16 timer i døgn, og denne belysningstid var langt bedre end konstant belysning.

c. Forskellige faktors indflydelse på virusindholdet i meristemerne

Forskellige faktors indflydelse på meristemplanternes virusindhold er blevet beskrevet af flere forskere. *Van Os* (1964) konstaterede således, at samtlige nellikemeristemplanter, der blev skåret i juni måned, var virusfri. Meristemets størrelse (jordbær) havde derimod ikke nogen indflydelse på virusindholdet (*Ghena* 1970).

Varmebehandling alene har ikke kunnet eliminere virus i nelliker (*Quak* 1957) og arabis-mosaik-virus i narcisser (*Stone* & *Hollings* 1964), mens dette lykkedes ved en kombination af varmebehandling og meristemkultur.

Ligeledes har denne kombination vist sig at være den mest effektive ved elimination af stavformede (trådformede) vira hos *chrysanthemum* (*Hollings* & *Stone* 1967).

I samme kultur opnåedes ved en konstant varmebehandling et stigende antal virusfrie meristemplanter (virus B), hvor der efter 30-40 døgn varmebehandling var 70-90 pct. virusfrie meristemer (*Hakkaart* & *Quak* 1964).

Undersøgelser vedrørende tilstedeværelsen af virus i selve meristemet er blevet udført med forskellige vira i forskellige planter. *Hollings* og *Stone* (1964) kunne således påvise spætning-virus i selve nellikemeristemet, men trods dette lykkedes det ved meristemkultur at frembringe virusfrie planter, hvor balancen mellem virusproduk-

tion og viruseliminering tilsyneladende var blevet ændret.

Kirsebær-bladrulle-virus (KBV), agurk-mosaik-virus (AMV) og jordbær-latentringmosaik-virus er ved saftinokulation eller ved elektronmikroskopiske undersøgelser blevet påvist i selve meristemet af *Nicotiana rustica* L., *N. clevelandii* Gray., *Cucumis sativus* L. og *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. Ved dyrkning af tilsvarende meristemer fra *Nicotiana rustica* på Linsmaier og Skoogs næringsmedium lykkedes det efter 135 døgn at eliminere KBV i 78 pct. og

AMV i 69 pct. af meristemerne. Hastigheden af denne inaktivering er også blevet belyst. Allerede efter 16 døgn dyrkning var 50 pct. af de oprindelige KBV-inficerede meristemer virusfrie, og efter 15 uger var der kun få meristemer, der stadig var inficerede (*Walkey & Woolfitt* 1968).

En oversigt over de vira samt værtplanter, i hvilke det er lykkedes at eliminere det pågældende virus enten ved meristemkultur eller ved en kombination af varmebehandling og meristemkultur, fremgår af tabel 3.

Tabel 3. Eliminering af vira ved hjælp af meristemkultur eller ved varmebehandling + meristemkultur
(Elimination of viruses by meristem-tip culture or by heat treatment and meristem-tip culture (the viruses in italics have been eliminated at danish experiments))

Værtplanter	Vira
<i>Prydplanter:</i>	
Chrysanthemum	<i>asperm</i> , virus B (+varme), <i>dværgsyge</i> (+varme), grønne blomster (+varme), mosaik (+varme)
Cymbidium	mosaik
Dahlia	<i>mosaik</i>
Freesia	<i>bønne-gulmosaik</i> , <i>freesia virus I</i> , <i>stregesyge</i>
Iris	<i>mosaik</i>
Lilje	<i>latent</i>
Narcis	agurk-mosaik, arabis-mosaik
Nellike	latent, <i>nervemosaik</i> , ringmosaik (+varme), <i>spætning</i> (+varme), <i>stregesyge</i> , <i>ætsning</i> (+varme)
Pelargonie	krøllemosaik, tomat-ringmosaik
Studenternellike	latent, <i>nervemosaik</i> , ringmosaik, <i>spætning</i> , <i>ætsning</i>
<i>Køkkenurter:</i>	
Humle	prunus ringplet (+varme)
Jordbær	gulrandsyge (+varme), krøllesyge, latent A, nerveklorose
Peberrød	blomkål-mosaik, <i>kålroe-mosaik</i>
Rabarber	agurk-mosaik, arabis-mosaik, jordbær-latentringmosaik, kirsebær-bladrullesyge, <i>kålroe-mosaik</i>
<i>Træagtige:</i>	
Stikkelsbær	nervebåndklorose (+varme)
<i>Landbrugsplanter:</i>	
Kartofler	<i>bladrullesyge</i> , <i>kartoffel virus A, M, S, X, Y</i> .
Tobak	arabis-mosaik, kirsebær-bladrullesyge, tobak-mosaik

De kursiverede vira er elimineret ved danske forsøg.

III. Danske undersøgelser

a. Indledning

Forsøg på fremskaffelse af virusfrit plantemateriale ved skæring af meristemer eller ved en kombination af varmebehandling og meristemkultur blev startet i 1961. Forsøgene har omfattet forskellige planteslægter, arter og sorter, hvor det dog først og fremmest har været pryddplanterne, arbejdet har været koncentreret om.

Ved dyrkning af meristemerne har der udelukkende været anvendt næringsmedier anbefalet eller beskrevet af andre forskere som velegnede til de enkelte kulturer. På grund af divergerende resultater har det imidlertid været nødvendigt at undersøge og sammenligne flere mediers velegnethed, ligesom forskellige andre faktors indflydelse på meristemernes vækst så som temperatur, næringsmediets pH-værdi og anvendelsen af flydende medium (filtrerpapir) i modsætning til fast medium (agar) har været undersøgt.

b. Metodik

Plantematerialet, der blev anvendt, var enten ubehandlet eller varmebehandlet. I sidstnævnte tilfælde foregik varmebehandlingen i termostatum ved en temperatur mellem 35 og 38°C med 24 timers belysning og en lysstyrke på 2500-5000 lux. Behandlingstiden har som regel strakt sig over længere tid, hvor plantemateriale blev udtaget med månedlige intervaller begyndende efter 30 eller 60 døgn varmebehandling. Planternes følsomhed over for varmebehandlingen har til tider bevirket, at forsøget måtte afbrydes tidligere end planlagt, men i andre tilfælde har behandlingen kunnet gennemføres i helt op til 300 døgn.

Materialet blev herefter afbladet (skud), dissekeret (løg) eller grundig rensset (rabarber) inden en evt. desinfektion blev foretaget. Denne har vist sig at være overflødig for enkelte kulturer (nelliker og chrysanthemum) men meget nødvendig for andre (hortensie, rabarber, freesia, liljer m.m.) for at undgå forurening i form af bakterie- og svampeinfektioner. Desinfektionen blev foretaget ved en hurtig neddykning i 96 pct. ethanol efterfulgt af 15-30 minutters behandling i henholdsvis 1 pct. kalciumhypoklorit-opløsning og

0,5 pct. 8-hydroxyquinulinsulfat-opløsning (alm.). I vanskelige forureningstilfælde har koncentrationen af førstnævnte opløsning været anvendt i op til 5 pct.s styrke (kraftig). Efter endt behandling blev plantematerialet skyllet grundigt i rindende vand og herefter aftørret. En direkte flambning af løg og knolde har også været forsøgt. Skæring af meristemerne blev udført under stereomikroskop ved en forstørrelse på 10-20 gange i et aflukket rum, der først var steriliseret i et par timer ved hjælp af ultraviolet lys med en bølglængde på 2537 Å. De anvendte skalpeller blev ligeledes steriliseret ved bestråling med ultraviolet lys i 15 min. for at forhindre overføring af virus. Efter skæring af meristemerne, der som regel bestod af det meristemale væv samt det første bladparanlæg med en størrelse på ca. $0,250 \times 0,250$ mm, blev meristemerne placeret enten på filtrerpapir eller på agar i de med næringsmedium (ca. 7 ml) autoklaverede (15 min. ved 1,5 kg/cm²) præparatglas (150 × 19 mm), der derefter blev lukket med metalhætter og forseglet med parafilm.

De anvendte næringsmedier har været følgende: Neergaards, Kassanis', Stones, Nilssons, Murashige og Skoogs samt Buys'. Sammensætningen af de enkelte medier fremgår af tabel 2 undtagen for mediet beskrevet af Kassanis. Dette adskiller sig fra Morel's medium ved udeladelse af NAA, thiamin og glukose og ved tilsætning af sucrose (20 gr/liter), adenin (5 mg/liter), nikotinsyre (1 mg/liter), pyridoxin (1 mg/liter) samt Edamin (casein-hydrolysat) (1 mg/liter).

Meristemerne blev herefter placeret i dyrkningsrum ved en temperatur på enten 17 eller 22,5°C og en belysning på 16 eller 24 timer i døgnet, hvor lysstyrken var mellem 1200-3000 lux.

Efter top- og roddannelse blev meristemerne pottet i en blanding af lige dele sphagnum og peralite eller ren sphagnum og placeret under sluttet luft indtil nyvækst var blevet etableret.

c. Resultater

De forskellige mediers egnethed ved meristemkultur af havebrugsplanter er blevet undersøgt. Resultaterne fremgår af tabel 4.

Tabel 4. Meristemplanter fra havebrugskulturer etableret ved dyrkning i forskellige næringsmedier
(Meristem plants from horticultural crops established by use of different nutrient media)

Kultur	Antal skåret	pct. meristemplanter i vækst				
		Nils- son	Kassa- nis	Neer- gaard	Stone	Murashige- Skoog
<i>Prydplanter (urteagtige)</i>						
Chrysanthemum.....	25	44*	15*	8*	40*	—
» »	10	50	—	—	—	60
Dahlia	20	—	—	—	22	—
Nellike.....	50	10*	0*	11*	17*	30
Pelargonie.....	20	0	0	0	0	25
Phlox.....	30	—	—	—	—	17
Saintpaulia	10	0	—	—	—	40
<i>Knold- og løgvækster:</i>						
Freesia.....	10	10	50	—	0	60
Gladiolus.....	10	—	—	—	—	50
Lilje.....	10	70*	—	—	—	10
Iris	10	20	10	—	70	40
Narcis	40	—	—	—	—	18
<i>Køkkenurter:</i>						
Peberrod.....	50	—	—	—	—	38
Rabarber.....	10	—	—	—	—	10
<i>Træagtige planter:</i>						
Buddleia	10	—	—	—	—	10
Hortensie.....	50	—	—	—	—	2
Ribs.....	10	0	0	—	0	+
Solbær	10	0	0	—	0	+
Stikkelsbær	10	0	0	—	0	+

* filterpapir (øvrige med agar)
+ begyndende vækst (bladudvikling)
— ikke undersøgt

* filtrerpapir (øvrige med agar)

+ begyndende vækst (bladudvikling)

— ikke undersøgt

Chrysanthemum (Chrysanthemum × morifolium Ramat)

Meristemer er blevet skåret fra top- og sideskud af chrysanthemum i en størrelse af 0,2 til 0,5 mm medregnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret (fig. 1, 2a) ved dyrkning på næringsmedier af Neergaard (N), Nilsson (GN) og Stone (S) (alle med filtrerpapir) samt Murashige og Skoog (MS) (agar). Procent etablerede planter ved nævnte næringsmedier, med forskellige pH-værdier, fremgår af tabel 5.

Meristemerne kunne pottes efter ca. 8 måneder, hvor GN-mediet blev anvendt og efter 3-4 måneder ved MS-mediet, i begge tilfælde hvor temperaturen i dyrkningsrummet var 22,5°C ved konstant belysning.

Tabel 5. Næringsmediets og pH-værdiens indflydelse på chrysanthemummeristernes vækst

(The influence of the medium and the pH-value on the growth of chrysanthemum meristem-tips)

Næringsmedier	pct. meristemplanter i vækst (antal skårne) ved pH		
	5-5,4	6-6,3	7
Neergaard.....	8 (25)	8 (25)	
Nilsson.....	48 (25)	67 (25)	
Nilsson*).....	17 (48)	25 (48)	20 (46)
Stone.....	40 (25)	8 (25)	
Murashige og Skoog	30 (10)	—	

* Plantematerialet først varmebehandlet i 160 døgn ved 38°C.

Tabel 7. Kallus-, blad- og rodudvikling i antal meristemer af 10 opgjort 35-70 dogn efter skæring i følgende næringsmedier med 16 timers belysning/døgn
(Callus, leaf and root development in number of 10 meristem-tips 35 to 70 days after cutting in the following media with 16 hours illumination)

Kultur	Udvik- ling af	Murashige og Skoog				Buys			
		17 °C		22 °C		17 °C		22 °C	
		agar	filter	agar	filter	agar	filter	agar	filter
<i>Prydplanter:</i>									
Chrysanthemum	kallus	5	0	8	5	10*	8*	10*	6*
	blade	8	8	7	9	0	4	0	4
	rødder	2	3	2	4	0	1	0	1
	pottet	1	5	2	4	0	2	0	1
Hortensie	kallus	—	0	0	0	—	0	—	0
	blade	—	0	3	1	—	0	—	1
	rødder	—	0	0	2	—	0	—	0
Nellike	kallus	2	0	5	2	6	2	5	8
	blade	9	10	6	10	8	7	7	10
	rødder	2	9	4	10	6	8	6	9
	pottet	1	8	3	7	2	6	4	9
Pelargonie	kallus	10	0	9	1	8*	10*	10*	9*
	blade	7	8	5	8	0	0	0	0
	rødder	6	1	2	0	0	0	0	0
Phlox	kallus	0	0	0	0	0	0	0	8
	blade	7	9	5	9	0	0	(1)	(1)
	rødder	1	0	2	2	0	0	0	0
<i>Løg- og knoldvækster:</i>									
Freesia	kallus	0	7*	0	0	8*	10*	8*	10*
	blade	4	3	9	0	0	0	0	0
	rødder	2	5	5	1	0	1	1	3
Lilje	kallus	0	10			0	0		
	blade	4	8			6	6		
	rødder	0	0			6	7		
Narcis	kallus	0	10			10*	10*		
	blade	3	0			6	6		
	rødder	1	0			8	8		
Tulipan	kallus	0	0			0	0		
	blade	6	8			3	6		
	rødder	1	4			1	0		

* = klorofylløse

— = alle forurenede

() = grønne

Undersøgelser vedrørende varmebehandlings indflydelse på meristemernes vækst er blevet udført. Resultaterne fremgår af tabel 6.

Tabel 6. Varmebehandlings indflydelse på chrysanthemummeristemernes vækst (2 medier og 2 pH-værdier)

(The influence of the heat treatment on the growth of chrysanthemum meristem-tips)

Varmebehandling i døgn ved 33-38°C	pct. meristemplanter i vækst (antal skårne) i næringsmediene	
	GN (filter) pH 6,0	MS (agar) - pH 5,4
0	64 (25)	33 (9)
30-45	23 (26)	33 (15)
60-65	17 (30)	38 (34)
90-120	0 (30)	31 (86)
150-160	25 (48)	35 (20)

GN = Nilsson MS = Murashige og Skoog

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (se tabel 7). Temperaturen har ikke haft nogen større indflydelse på meristemernes udvikling. Blad- og rodudvikling har været bedst i Murashige og Skoogs næringsmedium, og rodudviklingen bedst på filterpapir (fig. 3).

Desinfektion har ikke været nødvendig, hvor meristemer blev skåret fra ubehandlede chrysanthemumskud. Af 911 meristemer blev kun 3 pct. forurenede.

Alm. desinfektion blev udført, hvor plantematerialet var varmebehandlet inden skæringen. Trods dette blev 33 pct. af 265 meristemer forurenede.

Aspermi-virus er blevet elimineret i 15 af i alt 19 tiltrukne meristemplanter (79 pct.) uden forudgående varmebehandling. 18 af meristemplanterne stammede fra sideskud.

Dværgsyge-virus er blevet elimineret ved meristemkultur både med og uden forudgående varmebehandling. Meristemerne blev skåret fra sorten 'Mistletoe', der viste kraftige dværgsygesymptomer. Resultaterne fremgår af tabel 8.

De virusfrie 'Mistletoe'-planter (uden dværgsyge-virus) er senere blevet opformeret og nogle af planterne podet med skud inficeret med dværgsyge-virus. Samtlige inokulerede planter udvik-

Tabel 8. Eliminering af dværgsyge-virus i chrysanthemum

(Elimination of stunt virus in chrysanthemum)

Varmebehandling, Antal meristemplanter*		pct.	
antal døgn ved		uden	planter
30-33 °C	i alt	virus-symptomer	uden virus-symptomer
0	73	8	11
60-90	26	6	23
120-150	12	5	42

* Murashige og Skoogs medium (agar).

lede typiske dværgsygesymptomer efter 1-2 måneders forløb, mens kontrolplanterne forblev symptomløse.

Dahlia (D. pinnata Cav.)

Meristemer er blevet skåret fra top- og sideskud af dahlia i en størrelse af 0,250 mm iberegnet det første bladparanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning på Murashige og Skoogs medium (agar) med 22 pct. (4/18) planter i vækst. Meristemplanterne kunne pottes ca. 6 måneder efter skæring, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var 22,5°C ved konstant belysning.

Alm. desinfektion er blevet udført. Forureningsprocenten blev senere opgjort til 10.

Dahlia-mosaik-virus bedømt på symptombasis er blevet elimineret i 3 af 4 meristemplanter.

Nellike (Dianthus caryophyllus L.)

Meristemer er blevet skåret fra top- og sideskud af nellike i en størrelse fra 0,1 til 0,250 mm iberegnet det første bladparanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret (fig. 4) ved dyrkning på næringsmedier af Neergaard (N), Nilsson (GN), Stone (S) (alle med filterpapir) samt Murashige og Skoog (MS) (agar). Procent etablerede meristemplanter af 50 skårne var henholdsvis 11 (N), 10 (GN), 17 (S) og 30 (MS).

Meristemerne kunne pottes efter 3 til 6 måneders forløb ved anvendelse af medierne N, GN og S og efter 1 til 3 måneder ved brug af MS-mediet, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var 22,5°C ved konstant belysning.

Tabel 9. Sorternes og varmebehandlingens indflydelse på nellikemeristemernes vækst
(The influence of the varieties and the heat treatment on the growth of carnation meristem-tips)

Sort	pct. (antal skårne) meristemer i vækst efter varmebehandling i antal døgn ved 38 °C			
	0	30	60	100
CC Pink Sim	4 (23)	19 (26)		5 (19)
CC Red Sim	17 (23)		32 (25)	11 (18)
CC White Sim	21 (48)	15 (39)	16 (25)	11 (19)
Joker	16 (89)	8 (66)	7 (58)	
Laddie Sim	22 (49)	5 (19)		5 (19)
New Pink Sim	25 (24)	25 (24)		5 (19)
Pink Mamie Sim	11 (37)	11 (19)	8 (24)	20 (20)
William Sim	18 (22)	5 (19)	11 (19)	26 (19)
Sidney Littlefield		8 (25)	11 (19)	
Shocking Sim	28 (18)	11 (19)	20 (25)	25 (20)
I alt	18 (333)	12 (256)	14 (195)	14 (153)

Forskellige pH-værdiers indflydelse på meristemernes vækst er blevet undersøgt, hvor Nilssons næringsmedium var blevet justeret til henholdsvis pH 5,4 og 6,0. Ved pH 5,4 voksede 17 pct. og ved pH 6,0 voksede 11 pct. af henholdsvis 342 og 269 skårne meristemer.

Undersøgelser vedrørende sorternes og varmebehandlingens indflydelse på meristemernes vækst er blevet udført i september-december 1967, hvor Nilssons medium blev anvendt (pH 6,0). Resultaterne fremgår af tabel 9.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (se tabel 7). Temperaturen har ikke haft nogen større indflydelse på meristemernes udvikling (fig. 5). Blad- og rodudvikling har været lige god i begge opløsninger, men rodudviklingen bedst, hvor filtrerpapir blev anvendt. Fast medium (agar) resulterede i udvikling af unormalt mange, vanddrukne skud og svage rødder, hvilket medførte at mange af meristemplanterne døde inden potningen (tabel 7, fig. 6).

Desinfektion er ikke blevet udført ved skæring af nellikemeristemer. Af i alt 1637 meristemer blev 7 pct. forurennet.

Spætning-virus er blevet elimineret ved meristemkultur med og uden forudgående varmebehandling. Viruset er blevet elimineret både fra *Dianthus barbatus* L. og *D. caryophyllus*. Varme-

behandlingens indflydelse på eliminering af spætning-virus i meristemplanter fremgår af tabel 10.

Tabel 10. Eliminering af nellike-spætning-virus
(Elimination of carnation mottle virus)

Varmebehandling, antal døgn ved 38 °C	Antal meristemplanter		pct. planter
	i alt	uden virus	uden virus
0	19	16	84
40	10	8	80
60-65.	85	68	80

Nervemosaik-virus er blevet elimineret i samtlige etablerede meristemplanter (6 planter) både med og uden forudgående varmebehandling.

Stregsyge-virus er ligeledes blevet elimineret i samtlige etablerede meristemplanter (20 planter) både med og uden forudgående varmebehandling (fig. 7). Spætning-virus og ætsning-virus, der også var blevet påvist i det oprindelige materiale, blev elimineret i henholdsvis 100 og 76 pct. af meristemplanterne.

Ætsning-virus er blevet elimineret ved meristemkultur med og uden forudgående varmebehandling. Resultaterne fremgår af tabel 11.

Ætsning-virus er desuden elimineret i planter af krydsningen *Dianthus barbatus* L. × *D. carthusianorum* L. (Paludan 1970), mens dette ikke

Tabel 11. Eliminering af nellike-ætsning-virus
(Eliminating of carnation etched ring virus)

Varmebehandling, antal døgn ved 38°C	Antal meristem- planter		pct. planter
	i alt	uden virus- symptomer	uden virus- symptomer
0	55	51	93
30	22	20	91
60	39	36	93
100	44	40	91

er lykkedes i frøplanter af *D. caryophyllus* uden forudgående varmebehandling. Samtlige 8 etablerede meristemplanter viste efter 5 til 10 måneders forløb kraftige ætsning-symptomer.

Pelargonie (Pelargonium × hortorum L. H. Bail)
Meristemer er blevet skåret fra top- og sideskud af pelargonie i en størrelse af 0,2 til 0,5 mm medregnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning på Murashige og Skoogs medium (agar) med 25 pct. (5/20) planter i vækst, af hvilke 4 planter stammede fra sideskud. 4 andre medier gav negativt resultat (tabel 4). Meristemplanterne kunne pottes 3-5 måneder efter skæring, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var 22,5°C ved konstant belysning.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Temperaturen har ikke haft nogen større indflydelse på meristemernes udvikling. Blad- og rodudvikling er kun forekommet i Murashige og Skoogs medium med bedst rodudvikling på agar (fig. 8). Kraftig klorofylløs kallus udvikledes i Buys medium.

Alm. desinfektion er blevet foretaget af plantematerialet; forureningsprocenten blev senere opgjort til 19.

Saintpaulia (S. ionantha H. Wendl.)

Meristemer er blevet skåret fra sideskud (blad-hjørner) af saintpaulia i en størrelse af 0,2 til 0,4 mm iberegnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrk-

ning i Murashige og Skoogs medium (agar) med 40 pct. (4/10) planter i vækst.

Fra det enkelte meristem udvikledes adskillige småplanter, og ved pottingen, der blev foretaget ca. 6 måneder efter skæringen, etableredes fra et af meristemerne 21 meristemplanter. Temperaturen i dyrkningsrummet blev holdt på 22,5°C med konstant belysning.

Kraftig desinfektion blev foretaget, men trods dette blev 86 pct. af meristemerne forurenede.

Phlox (P. paniculata L. 'Spitfire')

Meristemer er blevet skåret af side- og top-skud af phlox i en størrelse af 0,5 mm medregnet det første bladpar-anlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning på Murashige og Skoogs medium med 17 pct. (5/30) planter i vækst.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Temperaturen har ikke haft nogen større indflydelse på meristemernes udvikling. En kraftig bladudvikling er udelukkende forekommet i Murashige og Skoogs medium samtidig med en begyndende rodudvikling (fig. 9). Agar og filtrerpapir var tilsyneladende lige velegnede.

Alm. desinfektion er blevet udført, men 33 pct. af meristemerne blev alligevel forurenede.

Freesia (Freesia × Tuberg'enii hort.)

Meristemer er blevet skåret fra spirende knolde henholdsvis fra top- og sidespirer. Størrelsen har varieret mellem 0,3 til 2 mm, men de fleste meristemer har været på 0,5 mm iberegnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning på næringsmedier (tilsat agar) af Nilsson, Kassanis samt Murashige og Skoog med henholdsvis 10 (1/10), 50 (5/10) og 60 (6/10) pct. planter i vækst. Af i alt 24 etablerede meristemplanter stammede de 21 fra knoldenes topspirer. Meristemplanterne kunne pottes efter henholdsvis 5-9, 5 og 3-5 måneders forløb, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var 22,5°C ved konstant belysning.

Undersøgelser med forskellige pH-værdier (Nilssons næringsmedium (filtrerpapir)) tyder på,

at pH 5,4 var bedre end 6,0, idet der af 2×30 skårne meristemer blev etableret henholdsvis 6 og 1 plante.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Temperaturen har ikke haft nogen større indflydelse på meristemernes udvikling. Blad- og rodudvikling var bedst i Murashige og Skoogs næringsmedium og bedst med agar (Buys ingen bladudvikling).

Desinfektion har vist sig at være nødvendig. Ved alm. desinfektion og ved flambering af knoldene i sprit har forureningsprocenten været henholdsvis 14 og 13.

Bønne-gulmosaik-virus (BGMV) er blevet elimineret i 10 af 14 meristemplanter og freesia virus 1 i 6 af 8 planter.

I planter, hvor BGMV er blevet elimineret, er væksten betydelig kraftigere og blomsterformen normal i modsætning til de inficerede med svagere vækst og tydelig rynkede og deforme blomster.

Planter befriet for freesia-virus 1 har udviklet helt ensfarvede blomster i modsætning til inficerede med kraftig spættede kronblade (fig. 10).

Gladiolus (Gladiolus × colvillei Sweet.)

Meristemer er blevet skåret fra knolde af gladiolus i en størrelse mellem 0,5 og 0,8 mm iberegnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning i Murashige og Skoogs næringsmedium med 50 pct. (5/10) planter i vækst. Meristemplanterne kunne pottes efter 2-3 måneder, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var $22,5^{\circ}\text{C}$ ved konstant belysning.

Kraftig desinfektion af knoldene er blevet udført inden skæringen, men 40 pct. af meristemerne blev alligevel forurenede.

Iris (Iris × hollandica Bergm. 'Wedgwood')

Meristemer er blevet skåret af iris i vækst, hvor det har været muligt at tage 1 til 2 meristemer fra knopper placeret ved bunden af blomsterstilkene inde i løget.

Størrelsen har varieret fra 0,4 til 0,75 mm, men de fleste meristemer har været omkring 0,5 mm store medregnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret (fig. 2b) ved dyrkning på næringsmedier (tilsat agar) af Nilsson, Kassanis, Stone samt Murashige og Skoog med henholdsvis 23 (9/40), 10 (1/10), 70 (7/10) og 37 (11/30) pct. planter i vækst. Meristemplanterne kunne pottes fra 5 til 14 måneder efter skæring, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var $22,5^{\circ}\text{C}$ ved konstant belysning.

Alm. desinfektion har været udført af de dissekerede løg. Forureningsprocenten af 90 skårne meristemer blev opgjort til 31.

Iris-mosaik-virus er blevet elimineret i 9 af 10 testede (elektronmikroskopi) meristemplanter. Mosaiksymptomer har ikke kunnet iagttages i bladene af 18 tiltrukne planter, men blomstringskontrol har endnu ikke kunnet udføres.

Lilje (Lilium L. hybr. 'Enchantment')

Meristemer er blevet skåret fra liljeløg i vækst, hvor det har været muligt at tage 1-2 meristemer fra knopper placeret ved bunden af blomsterstilkene inde i løget.

Størrelsen har varieret fra 0,3 til 1 mm, men de fleste meristemer har været på 0,5 mm medregnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret (fig. 11b) ved dyrkning på næringsmedier af Nilsson (filtrerpapir) samt Murashige og Skoog (agar) med henholdsvis 70 (7/10) og 11 (2/19) pct. planter i vækst. Meristemplanterne kunne pottes efter 4-6 måneders forløb, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var $22,5^{\circ}\text{C}$ ved konstant belysning.

Kallus-, blad- og rodudvikling ved 17°C er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Blad- og rodudvikling har været bedst i Buys næringsmedium og lige god på agar som med filtrerpapir.

Lilje-latent-virus er blevet elimineret i 8 af 9 meristemplanter.

Alm. desinfektion har været udført, men trods dette har forureningsprocenten været 60-87. Efter desinfektion ved flambering af knoldene i sprit var forureningsprocenten 40.

Narcis (Narcissus pseudonarcissus L.)

Meristemer er blevet skåret fra narcisløg i vækst, hvor det har været muligt at tage 1-2 meristemer

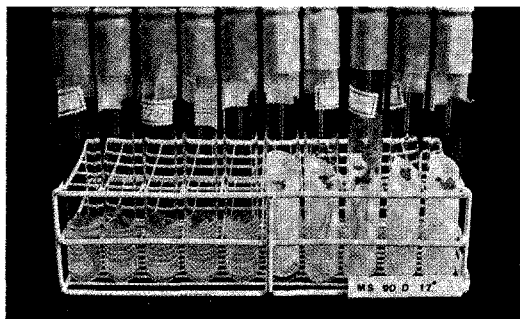


Fig. 3. Chrysanthemum-meristemer 90 døgn gamle på henholdsvis flydende (filtrerpapir-væge, t.h.) og fast (agar, t.v.) næringsmedium af Murashige og Skoog. Rumtemperatur 17°C. Chrysanthemum meristem plants 90 days old on liquid (filter paper, right) and solid (agar, left) medium of Murashige and Skoog. Room temperature 17°C.

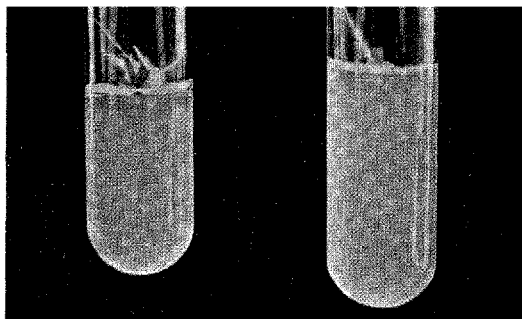


Fig. 5. Nellike-meristemer 40 døgn gamle, dyrket ved en rumtemperatur på henholdsvis 22 (t.v.) og 17°C (t.h.) på Buys næringsmedium. Carnation meristem plants 40 days old grown by a room temperature at 22°C (left) and 17°C (right) on Buys medium.

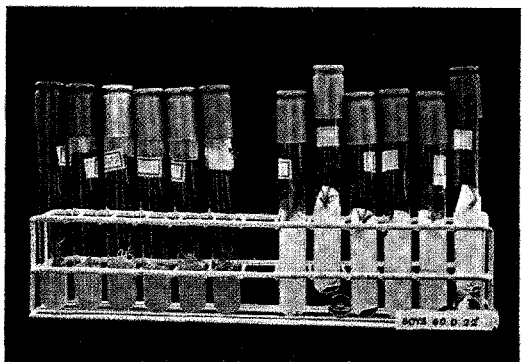


Fig. 6. Nellike-meristemer 60 døgn gamle på henholdsvis flydende (filtrerpapirvæge, t.h.) og fast (agar, t.v.) næringsmedium af Buys. Rumtemperatur 22°C. Carnation meristem plants 60 days old on liquid (filter paper, right) and solid (agar, left) medium of Buys. Room temperature 22°C.

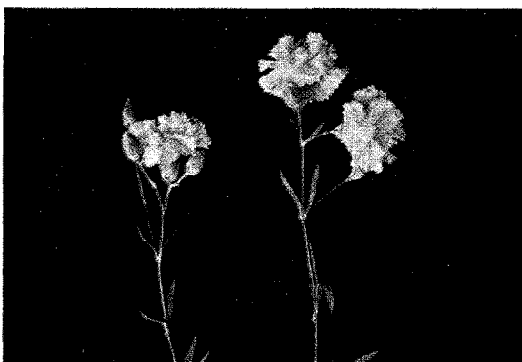


Fig. 7. Nellikeblomster af sorten 'Monica' fra henholdsvis sund meristemplante (t.h.) og plante inficeret med nellike-stregsyge-virus (t.v.). Flowers of the carnation variety 'Monica' from healthy meristem plant (right) and plant infected with carnation streak virus (left).

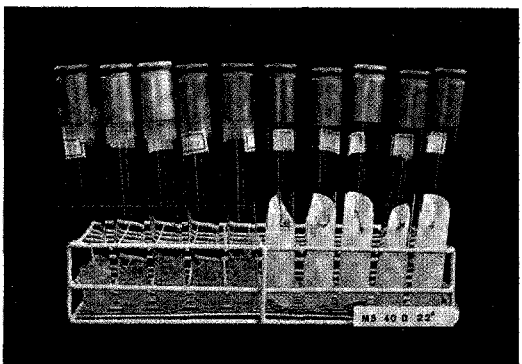


Fig. 8. Pelargonie-meristemer 40 døgn gamle på henholdsvis flydende (filtrerpapir-væge, t.h.) og fast (agar, t.v.) næringsmedium af Murashige og Skoog. Rumtemperatur 22°C. Pelargonium meristem plants 40 days old on liquid (filter paper, right) and solid (agar, left) medium of Murashige and Skoog. Room temperature 22°C.



Fig. 10. Freesiablomster af sorten 'Princess Marijke' fra henholdsvis sund meristemplante (t.v.) og plante inficeret med freesia-virus 1 (t.h.). Flowers of the freesia variety 'Princess Marijke' from healthy meristem plant (left) and plant infected with freesia virus 1 (right).

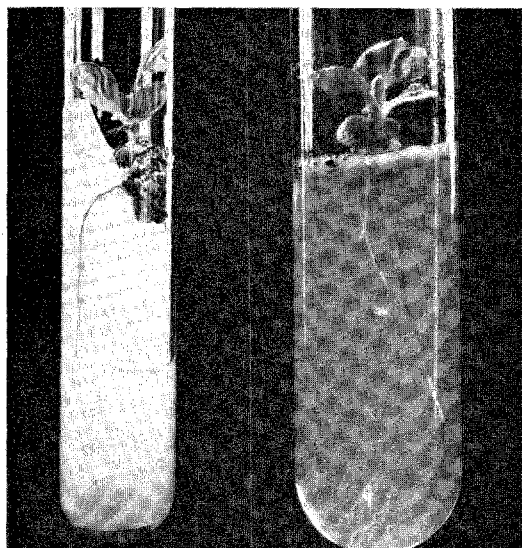


Fig. 1. Chrysanthemum-meristemer 170 døgn gamle på henholdsvis flydende (filtrerpapir-væge, t.v.) og fast (agar, t.h.) næringsmedium af Murashige og Skoog. Rumtemperatur 22°C.

Chrysanthemum meristem plants 170 days old on liquid (filter paper, left) and solid (agar, right) medium of Murashige and Skoog. Room temperature 22°C.

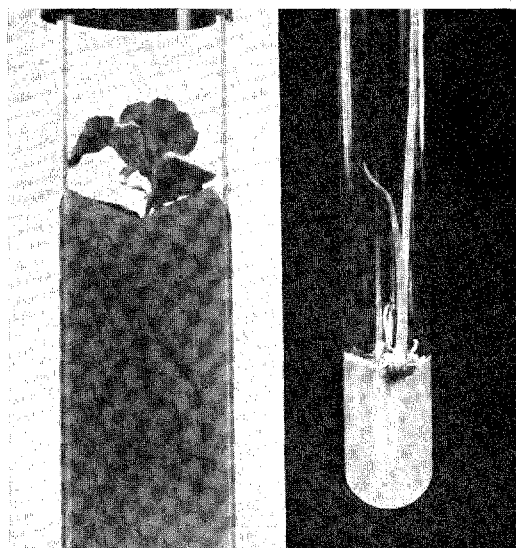


Fig. 2. Meristemer af chrysanthemum (a) og iris (b) på henholdsvis flydende (filtrerpapir-væge, t.v.) og fast (agar, t.h.) næringsmedium af Nilsson. A 80 døgn og b 200 døgn gamle. Rumtemperatur 22°C.

Meristem plants of chrysanthemum (a) and iris (b) on liquid (filter paper, left) and solid (agar, right) medium of Nilsson. A 80 days and b 200 days old. Room temperature 22°C.

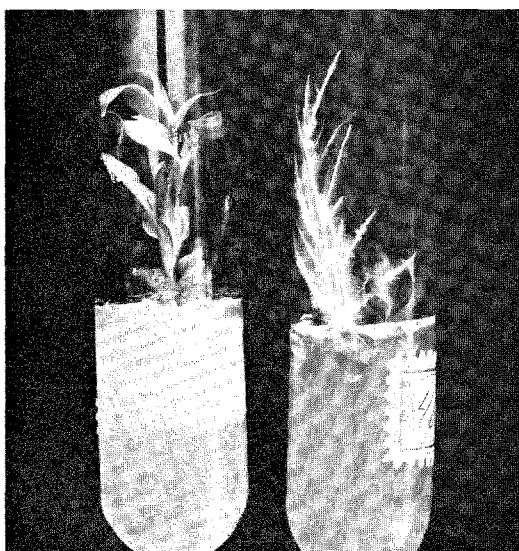


Fig. 4. Nellike-meristemer 30 døgn gamle på fast (agar) næringsmedium af Murashige og Skoog. Rumtemperatur 22°C.

Carnation meristem plants 30 days old on solid (agar) medium of Murashige and Skoog. Room temperature 22°C.

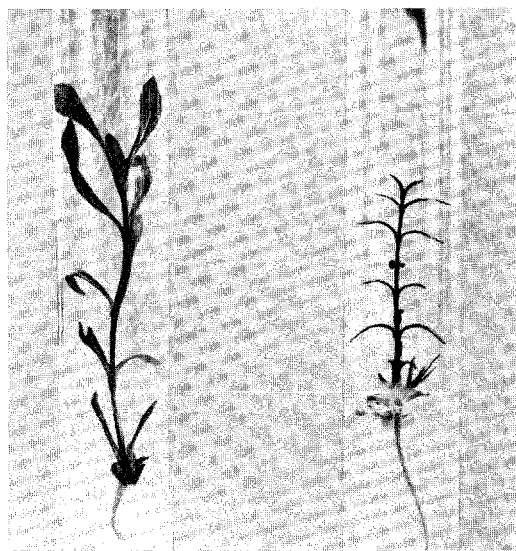


Fig. 9. Phlox-meristemer 130 døgn gamle på henholdsvis flydende (filtrerpapirvæge, t.v.) og fast (agar, t.h.) næringsmedium af Murashige og Skoog. Rumtemperatur 17°C.

Phlox meristem plants 130 days old on liquid (filter paper, left) and solid (agar, right) medium of Murashige and Skoog. Room temperature 17°C.

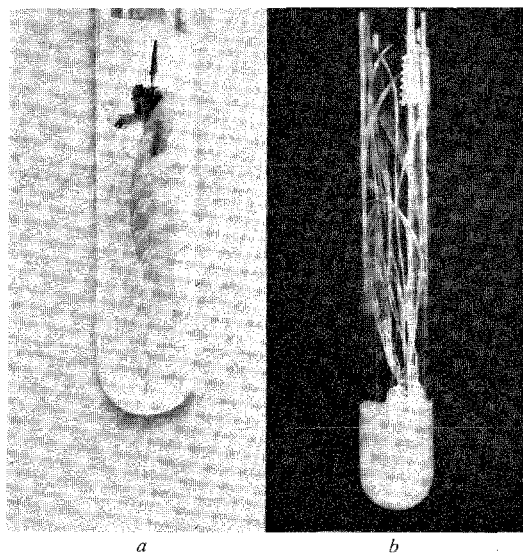


Fig. 11. Meristemer af narcis (a) og lilje (b) 130 døgn gamle, oprindeligt etableret på Buys næringsmedium i fast form.

A overflyttet efter 70 døgn til flydende (filtrerpapir-væge) næringsmedium af Murashige og Skoog. Rumtemperatur 17°C.

Meristem plants of narciss (a) and lily (b) 130 days old originally established on solid medium of Buys. A transferred after 70 days to liquid (filter paper) medium of Murashige and Skoog. Room temperature 17°C.

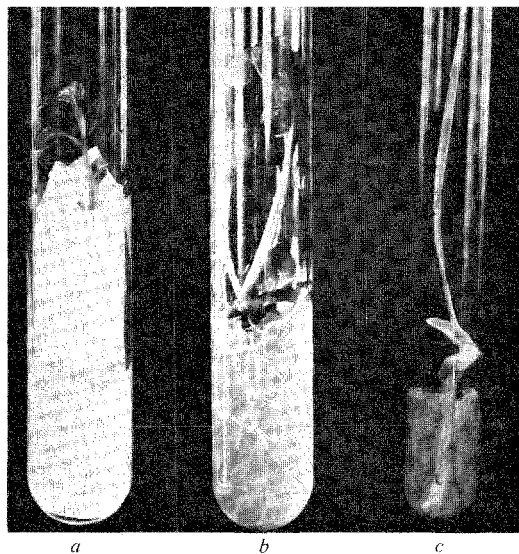


Fig. 12. Meristemer af buddleia (a), peberrod (b) og tulipan (c) oprindeligt etableret på fast medium af Murashige og Skoog. A overflyttet efter 50 døgn til et flydende (filtrerpapir-væge) medium baseret på Knops opløsning. B 30 døgn, a og c 130 døgn gamle. Rumtemperatur 22°C for b, 17°C for a og c.

Meristem plants of buddleia (a), horseradish (b) and tulip (c) originally established on solid medium of Murashige and Skoog. A transferred after 50 days to liquid (filter paper) medium based on Knops solution. B 30 days, a and c 130 days old. Room temperature 22°C for b, 17°C for a and c.

Tabel 12. Kallus-, blad og rodudvikling i antal meristemer af 10 opgjort 35-70 dogn efter skæring i følgende næringsmedier med 16 timers belysning/døgn

(Callus, leaf and root development in number of 10 meristem-tips 35 to 70 days after cutting in the following media with 16 hours illumination)

Kultur	Udvik- ling af	Murashige og Skoog				Buys			
		17 °C		22 °C		17 °C		22 °C	
		agar	filter	agar	filter	agar	filter	agar	filter
<i>Køkkenurter:</i>									
Rabarber	kallus	—	0	0	0	—	0	0	3
	blade	—	6	1	3	—	1	2	0
	rødder	—	0	1	1	—	1	1	0
<i>Træagtige planter:</i>									
Buddleia	kallus	0		0					
	blade	7		8					
	rødder	0		2					
Ribs	kallus	0	0	0	0	0	0	3	0
	blade	(1)	0	(2)	(5)	0	0	(6)	(7)
	rødder	0	0	0	0	0	0	0	0
Solbær	kallus	0	0	0	0	0	0	0	0
	blade	2	4	(4)	3	1	0	(2)	(1)
	rødder	0	0	0	0	0	0	0	0
Stikkelsbær	kallus	0	0	0	0	0	0	0	0
	blade	5	6	7	6	0	2	0	(1)
	rødder	0	0	0	0	0	0	0	0

— = alle forurenede, () = grønne

fra knopper placeret ved bunden af blomsterstilkene inde i løget. Meristemerne blev skåret med et eller flere bladanlæg med en størrelse varierende fra 0,8 til 3 mm.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning på Buys næringsmedium med 18 pct (7/40) planter i vækst.

Kallus-, blad- og rodudvikling ved 17°C er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Rod- og bladudvikling har været bedst i Buys medium uafhængig af anvendelsen af agar eller filtrerpapir (fig. 11a).

Alm. desinfektion af plantematerialet er blevet udført, men alligevel blev 50 pct. af meristemerne forurenede.

Tulipan (Tulipa × gesneriana L.)

Meristemer er blevet skåret fra tulipanløg i hvile, hvor det var muligt at tage 1-2 meristemer fra

knopper i bladhjørnerne. Meristemer blev skåret med et eller flere bladanlæg med en størrelse, der varierede fra 0,7 til 3 mm.

Kallus-, blad- og rodudvikling ved 17°C er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Bladudvikling har fundet sted både i Murashige - Skoog og i Buys næringsmedier tilsyneladende uafhængig af anvendelsen af agar eller filtrerpapir. Begyndende rodudvikling er ligeledes blevet registreret i begge medier (fig. 12c).

Alm. desinfektion er blevet udført. 20 pct. af de skårne meristemer blev forurenede.

Peberrod (Armoracia lapathifolia Gilib)

Meristemer er blevet skåret fra rodspirer i en størrelse mellem 0,25 og 0,5 mm medregnet det første bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret (fig. 12b) ved dyrkning på Murashige og Skoogs nærings-

medium (agar) med 38 pct. (18/38) planter i vækst. Meristemplanterne kunne pottes efter 1 til 2 måneders forløb, hvor temperaturen i dyrkningsrummet var 22,5°C ved konstant belysning.

Alm. desinfektion har været udført af de ren-sede rødder. 38 pct. af de skårne meristemer blev forurenede.

Kålroe-mosaik-virus er blevet elimineret i samtlige 18 tiltrukne meristemplanter.

Orienterende udbyttmålinger baseret på det oprindelig inficerede plantemateriale samt virus-frie meristemplanter (15 planter af hver kategori) resulterede i et gennemsnitligt rodudbytte pr. plante på henholdsvis 187 og 307 gr. (61 pct. vægtforøgelse).

Rabarber (Rheum Rhaponticum L.)

Meristemer er blevet skåret fra topskud af rabarber i en størrelse af 0,8 til 3 mm iberegnet et eller flere bladanlæg.

Meristemplanter er blevet etableret ved dyrkning på Murashige og Skoogs medium med 10 pct. (1/10) planter i vækst.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 12). Begyndende blad- og rodudvikling er forekommet både i Murashige - Skoogs og Buys medier og væksten er blevet stimuleret efter flytning til et svagere medium baseret på Knop's opløsning (Jones-Vine 1968).

Kraftig desinfektion er blevet udført. Af i alt 80 skårne meristemer er imidlertid 63 pct. blevet forurenede.

Buddleia (B. Davidii Franck.)

Meristemer er blevet skåret fra top- og sideskud af buddleia i en størrelse af 0,3 til 0,5 mm iberegnet det første bladpar-anlæg.

En enkelt meristemplante (1/10) er blevet etableret ved dyrkning på Murashige og Skoogs næringsmedium.

Bladudvikling er forekommet i Murashige og Skoogs næringsmedium (tabel 12) uafhængig af temperaturen (fig. 12a). Rodudvikling er endnu kun forekommet i få tilfælde, men ved flytning af meristemerne til et svagere medium baseret på

Knop's opløsning (Jones-Vine 1968) er væksten blevet stimuleret.

Alm. desinfektion er blevet udført. Af 100 skårne meristemer er 44 pct. blevet forurenede.

Hortensie (Hydrangea × macrophylla Ser.)

Meristemer er flere gange blevet skåret af hortensie, men på grund af meget kraftige forureninger ofte op til 100 pct., er det endnu kun lykkedes at etablere enkelte meristemplanter af denne kultur.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 7). Begyndende bladudvikling har vist sig i Murashige og Skoogs medium både på agar og filtrerpapir samt i Buys medium (filtrerpapir).

Alm. og kraftig desinfektion har været anvendt uden held. Undersøgelser vedrørende behandling med oxysprit (Hellmers 1960) i forskellig tid og med forskellig koncentration har givet følgende resultat (tabel 13).

Tabel 13. Hortensie-skud desinficeret med oxysprit (Desinfection of hydrangea shoots with oxysprit)

Oxysprit-* koncentration	Behandlings- tid i min.	Antal meristemer af 10 skårne	
		forurenede (bakterier)	i vækst
½ pct.	15	7	5
1 »	15	8	5
½ »	30	10	5
1 »	30	2	1
½ »	60	1	1
1 »	60	0	0

* blanding af 70 pct. ethanol og ½ eller 1 pct. 8-hydroxyquinolinsulfat.

Ribes (Ribes rubrum L.)

Alle resultater som for stikkelsbær.

Solbær (Ribes nigrum L.)

Alle resultater som for stikkelsbær.

Stikkelsbær (Ribes grossularia L.)

Meristemer er blevet skåret fra top- og sideskud af stikkelsbær i en størrelse af 0,5-1,2 mm medregnet det første bladanlæg.

Det er ikke lykkedes at etablere meristemplanter i 6 forskellige næringsmedier, men blad- og

skududvikling er opnået i Murashige og Skoogs medium ved en temperatur på 22,5°C i dyrkningsrummet og med konstant belysning.

Kallus-, blad- og rodudvikling er blevet undersøgt ved forskellige kulturforhold (tabel 12). Temperaturen har ikke haft nogen større indflydelse på meristemernes udvikling. Bladudvikling har været bedst i Murashige og Skoogs medium, hvorimod rodudvikling ikke har forekommet 70 døgn efter skæring. Der var ingen forskel ved anvendelse af agar contra filtrerpapir.

Meristemerne har opnået en vis størrelse og udvikling i nævnte medium, men gik siden til grunde, idet de farvedes brune og efterhånden tørrede ind. Forsøg på overflytning til et svagere medium baseret på Knop's opløsning, beskrevet af Jones-Vine 1968, har hidtil ikke resulteret i nyvækst.

Alm. desinfektion er blevet foretaget. Af 151 skårne meristemer blev 10 pct. forurenede.

IV. Diskussion

Sammenligning af forskellige næringsmediers egnetthed til dyrkning af meristemer fra forskellige kulturer har vist, at Murashige og Skoogs (MS) medium gennemgående har været det bedste (tabel 4), hvilket stemmer overens med en lang række udenlandske undersøgelser (tabel 1).

Ændringer i næringsmediernes indhold af vækststoffer har for visse kulturer haft stor indflydelse på meristemernes vækst. Således har bl.a. pelargoniemeristemer udviklet sig normalt i MS-mediet (gibberelinsyre, indol-3-eddikesyre og kinetin), mens der i Buys medium (1-naphthalen-eddikesyre, kalciumpanthothenat og cystein) kun udvikledes en klorofylløs kallusvækst (tabel 2, 7).

Anvendelse af flydende medium (filtrerpapir) i stedet for fast medium (agar) har resulteret i en langt mere harmonisk udvikling af skud og rødder hos visse meristemplanter (chrysanthemum, nelliker og pelargonier), mens denne forskel i udvikling ikke har gjort sig gældende for andre kulturer (phlox, løg- og knoldvækster) (tabel 7). Dette stemmer overens med Quak's udtalelser på kongressen i Israel (1970), hvor koncentrationen af næringsmediet tilsyneladende skal sænkes ved anvendelse af agar.

Temperaturen har ikke haft nogen væsentlig indflydelse på meristemernes udvikling (17 og 22°C), ligesom konstant belysning såvel som 16 timers belysning begge har været anvendelige. Ved sidstnævnte har en belysning på 1200 lux dog forårsaget lysmangel hos freesia, nelliker og pelargonier. Murashige's undersøgelser vedrørende optimal belysning af tobak (side 6) har således ikke direkte kunnet overføres til andre kulturer.

Resultaterne vedrørende pH-værdiens indflydelse på meristemernes vækst (side 9 og 12) harmonerer til dels med dem beskrevet af Stone i 1963, men viser yderligere, at pH-værdiens indflydelse varierer med næringsmediet (tabel 5).

Varmebehandlingsens indflydelse på meristemernes vækst har ligeledes været afhængig af næringsmediet (tabel 6). Chrysanthemum dyrket på MS næringsmedium var således upåvirket af varmebehandlingen, hvilket ikke stemmer overens med Hakkaart og Quak's undersøgelser i 1964.

Samtlige tolv vira, der har været undersøgt, er alle blevet elimineret ved meristemkultur uden forudgående varmebehandling. Fem af disse vira er desuden elimineret ved kombinationen varmebehandling og meristemkultur. Af tre nærmere undersøgte vira er kun et (chrysanthemumdværgsyge-virus) blevet elimineret i stigende grad med den forlængede varmebehandling (tabel 8, 10, 11).

Sidstnævnte resultater tyder på, at der uafhængig af plantematerialets behandling sker en direkte inaktivering af virus i meristemet, enten ved den direkte kontakt med næringsmediets kemikalier (Walkey og Woolfitt 1968) eller ved en forstyrrelse af balanceforholdet mellem virusproduktion og viruseliminering (Holling og Stone 1964).

V. Konklusion

Anvendelsen af Murashige og Skoogs næringsmedium har i disse undersøgelser vist sig som det bedste medium ved etablering af meristemplanter fra samtlige undersøgte, urteagtige kulturer og samtidig vist lovende resultater vedrørende de træagtige (tabel 4).

En stimulering af væksten har samtidig i væsentlig grad reduceret tiden fra skæringstidspunktet til meristemerne kunne pottes.

Hvor næringsmediet blev tilført via filtrerpapir opnåedes den mest harmoniske vækst i form af normal skud- og rodudvikling hos chrysanthemum, nelliker og pelargonier. Anvendelsen af agar forårsagede i samme kulturer dels en kraftig kallusvækst med dannelse af mange skud og dels en hæmning af rodvæksten, hvilket resulterede i de fleste planters død (tabel 7).

VI. Resumé

Ved anvendelse af forskellige næringsmedier (tabel 2) er det lykkedes at etablere meristemplanter af følgende havebrugsplanter: Buddleia, chrysanthemum, dahlia, hortensie, nellike, pelargonie, phlox, saintpaulia, freesia, gladiolus, lilje, iris, narcis, peberrod samt rabarber (tabel 4). Desuden er det lykkedes at frembringe skud- og rodvækst hos tulipan samt begyndende bladudvikling hos ribs, solbær og stikkelsbær (tabel 7 og 12).

Næringsmedier baseret på Berthelots og Knops opløsninger (Nilssons, Kassanis', Neergaards og Stones) har vist sig egnede til forskellige urteagtige pryddplanter, mens næringsmedier, oprindelig beregnet til væv- og kalluskulturer (Murashige og Skoogs m.fl.), har kunnet anvendes til en lang række kulturplanter (urteagtige pryddplanter, løg- og knoldvækster, køkkenurter samt træagtige planter) (tabel 4).

Temperaturer på 17 og 22°C var lige velegnede for udvikling af meristemer skåret fra chrysanthemum, nellike, pelargonie, phlox, freesia og tilsyneladende for solbær og stikkelsbær (tabel 7 og 12). Den højeste temperatur resulterede i den hurtigste udvikling (fig. 5).

Konstant belysning (1200-3000 lux) har været velegnet til de nævnte etablerede meristemplanter. 16 timers belysning (1200 lux) har ligeledes været anvendelig til omtalte kulturer (tabel 7 og 12), men symptomer på lysmangel har dog vist sig hos nellike og freesia.

Anvendelsen af Murashige og Skoogs næringsmedium som opløsning (filtrerpapir) i stedet for som fast medium (agar) har i væsentlig grad mindsket kallusdannelsen hos meristemplanter

fra chrysanthemum, nellike og pelargonie, men øget denne hos flere løg- og knoldvækster.

Hvor fast medium blev anvendt dannedes der, hos meristemplanter fra chrysanthemum, nellike og pelargonie, en kraftig kallusvækst, der resulterede i udvikling af unormalt mange vanddrukne skud og svage rødder, hvilket medførte, at mange af meristemplanterne døde inden potningen (tabel 7) (fig. 3, 6, 8).

Anvendelse af næringsmediet enten som opløsning eller som fast medium har ikke haft nogen nævneværdig indflydelse på blad- og rodudviklingen hos meristemplanter fra løg- og knoldvækster (tabel 7).

Indflydelsen af næringsmediernes pH-værdi på meristemplanternes vækst har dels varieret med det anvendte medium (tabel 5) og dels med kulturen. For chrysanthemum- og nellikemeristemer, dyrket på Nilssons næringsmedium, har den optimale pH-værdi således været henholdsvis 6 og 5,4 (se tabel 5 samt side 12).

Varmebehandlingens indflydelse på meristemplanternes vækst har varieret med næringsmediet. Antallet af etablerede chrysanthemummeristemer var således upåvirket ved dyrkning på Murashige og Skoogs medium, mens antallet blev reduceret, hvor Nilssons medium blev anvendt (tabel 6).

Nellikesorterne har ikke haft nogen sikker indflydelse på pct. meristemplanter i vækst, og ingen af de undersøgte sorter har været specielt følsomme over for varmebehandling (tabel 9).

Følgende vira er blevet elimineret enten ved meristemkultur alene (M) eller ved kombination af varmebehandling og meristemkultur (VM):

Bønne-gulmosaik (M), chrysanthemum-aspermia (M), chrysanthemum-dværgsyge (M+VM), dahlia-mosaik (M), freesia-virus 1 (M), iris-mosaik (M), kålroe-mosaik (M), lilje-latent (M), nellike-nervemosaik (M+VM), nellike-spætning (M+VM), nellike-stregsyge (M+VM) samt nellike-ætsning (M+VM).

Chrysanthemum-dværgsyge-virus er blevet elimineret i stigende grad med den øgede forlængelse af varmebehandlingen (tabel 8), mens eliminering af nellike-spætning- og -ætsning-virus har været uafhængig af varmebehandlingens længde (tabel 10 og 11).

VII. Summary

Establishment of virusfree meristem-tip culture of horticultural plants

By use of different nutrient media (table 2) the following horticultural plants have been established by meristem-tip culture: Buddleia, carnation, chrysanthemum, dahlia, hydrangea, pelargonium, phlox, saintpaulia, freesia, gladiolus, lily, iris, narcissus, horseradish and rhubarb (table 4). Shoot and root growth have been achieved at tulip, while development of leaves was obtained in culture of black and red currant and gooseberry (table 7 and 12).

Nutrient media based on Berthelots and Knops solutions (Nilssons, Kassanis', Neergaards and Stones) have proved satisfactory to different herbaceous ornamentals, while nutrient media, originally prepared for tissue and callus culture (Murashige and Skoogs etc.) have been successfully used for several cultivated plants as herbaceous ornamentals, bulbs, corms, vegetables and woody plants (table 4).

Temperatures at 17 and 22°C were both suitable for the development of meristem-tips from carnation, chrysanthemum, pelargonium, phlox, freesia and apparently also for black currant and gooseberry (table 7 and 12), where the highest temperature resulted in the most rapid development (fig. 5).

Constant illumination (1200-3000 lux) has been suitable for establishment of the meristem plants mentioned. 16 hours illumination have also been usable for the same meristem plants, but symptoms caused by light deficiency have been observed in carnation and freesia.

Murashige and Skoogs medium used in soluble state (filterpaper) instead of solid medium (agar) has clearly diminished the development of callus at meristem plants from carnation, chrysanthemum and pelargonium but stimulated the callus growth of several bulbs and corms.

Heavy growth of callus occurred where solid medium was used for growing meristem plants of carnation, chrysanthemum and pelargonium. This procedure resulted in development of abnormal watersoaked shoots and weak roots causing the death of several meristem plants before they were ready for potting (table 7) (fig. 3,6,8).

The development of leaves and roots of meristem plants from bulbs and corms were independent of the condition of the medium (table 7).

The influence of the pH-value of the medium on the growth of the meristem plants has varied both with the used medium (table 5) as well as with the

culture. For carnation and chrysanthemum meristem plants, grown at Nilssons medium, the optimal pH-value has been respectively 6 and 5,4 (table 5 and page 12).

The influence of the heat treatment on the growth of the meristem plants has varied with the medium used. The number of established meristem plants from heat treated chrysanthemum was unaffected when growing on Murashige and Skoogs' medium, but reduced by growing on the medium of Nilsson (table 6).

In establishment of carnation meristem plants the varieties did not have any special influence, and none of the examined varieties were extremely heat sensitive.

The following viruses have been eliminated either by meristem-tip culture alone (M) or by heat treatment followed by meristem-tip culture (HM): Bean yellow mosaic virus (M), cabbage black ringspot virus (M), carnation etched ring virus (M+HM), carnation mottle virus (M+HM), carnation streak virus (M+HM), carnation vein mottle virus (M+HM), chrysanthemum aspermy virus (M), chrysanthemum stunt virus (M+HM), dahlia mosaic virus (M), freesia virus 1 (M), iris mosaic virus (M) and lily latent virus (M).

The chrysanthemum stunt virus has been eliminated dependent on the prolonged heat treatment (table 8), while the elimination of carnation etched ring virus and carnation mottle virus have been unaffected of the heat period (table 10 and 11).

Dictionary:

antal - number
befriet - eliminated
behandling - treatment
bemærkning - remark
blade - leaves
døgn - days
forurenet - contaminated
kallus - callus
kultur - culture
løg- og knoldvækster - bulbs and corms
opløsning - solution
prydplanter - ornamental plants
rødder - roots
skåret - cutted
uden - without
varme - heat
vækst - growth

VIII. Litteratur

- Boettcher, Allen D. and A. C. Hildebrandt (1964). Growth and differentiation of geranium apical meristems in vitro. *Phytopathology* 54:8:889.
- Christensen, Mogens (1968). Eliminering af kartoffel virus X i kartoffelsorten Dianella. *Tidsskrift for Planteavl* 72: 241-244.
- Clowes, F. A. L. (1961). Apical meristems. Scientific Publications, Oxford.
- East Malling (1966). Annual Report 1965: 47.
- East Malling (1968). Annual Report 1967: 42-44.
- East Malling (1968). Annual Report 1967: 41.
- Ghena, N. (1970). Studying the possibilities of obtaining virus-free Strawberry plants by meristem culture. Proceedings XVIII th International Horticultural Congress, Tel Aviv 211.
- Hakkaart, F. A. and F. Quak (1964). Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysanthemums from virus B by means of meristem culture. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 70: 5:154-157.
- Hickman, Anthea J. and Anupam Varma (1968). Viruses in Horseradish. *Plant Pathology* 17:1:26-30.
- Hollings, M. (1959). Carnation. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 65-67.
- Hollings, M., Olwen M. Stone and Margaret E. Norrish (1960). Carnation Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report: 73-75.
- Hollings, M. (1960). Chrysanthemum. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 75.
- Hollings, M. (1962). Carnation viruses. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 87-89.
- Hollings, M. (1962). Chrysanthemum viruses. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 90.
- Hollings, M. and O. M. Stone (1964). Investigation of carnation viruses. *Ann. appl. Biol.* 53: 103-118.
- Hollings, M. and O. M. Stone (1967). Heat-treatment, meristem-tip culture and the production of virus-tested carnation and chrysanthemum. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 106-107.
- Hollings, M. (1968). Heat-treatment, meristem-tip culture, and the production of virus-free clones. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 109-111.
- Holmes, F. O. (1955). Elimination of spotted wilt from Dahlias by propagation of tip cuttings. *Phytopathology* 45: 224-226.
- Holmes, F. O. (1956). Elimination of aspermy virus from the Nightingale Chrysanthemum. *Phytopathology* 46: 559-600.
- Jones, O. P. and Sallie J. Vine (1968). The culture of Gooseberry shoot tips for eliminating virus. *J. hort. Sci.* 43: 289-92.
- Kassanis, B. (1957). The use of tissue cultures to produce virus free clones from infected potato varieties. *Ann. appl. Biol.* 45: 422-427.
- Larsen, P. (1962). Planternes vækststoffer. Berlingske Forlag.
- Limasset, P. and P. Cornuet (1949). Recherche du virus de la masoique du tabac (Marmor tabaci Holmes) dans les méristemes des plantes infectées. *C. R. Acad. Sci., Paris* 228: 1971-1972.
- Martin, C., H. Dulieu and Monique Carré (1967). On the possibility of freeing virus-infected plants from virus by culture of incipient inflorescence meristems and floral meristems. *Rev. app. Mycol.* 46:11:600.
- Morel, G. and C. Martin (1952). Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci., Paris* 235: 1324-1325.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Pl.* 15: 473-497.
- Nilsson, G. J. Phiolophora wilt of carnation *Dianthus caryophyllus* L. the behaviour of the pathogene *Phiolophora cenrescens* (WR) van Beyna in the host and in the soil. Thesis Cornell University for the degree of Doctor of Philosophy (not published).
- Os, van H. (1964). Production of virus-free carnations by means of meristem culture. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 70:1:18-26.
- Paludan, N. (1970). Nellike-ætsning-virus, kortlægning, infektionsforsøg, termoterapi og meristemkultur. *Tidsskrift for Planteavl* 74:1:75-86.
- Philips, D. J. (1962). Control of carnation streak virus by shoot tip culture. *Phytopath.* 52: 747.
- Pillai, S. K. and A. C. Hildebrandt (1968). Geranium plants differentiated in vitro from stem tip and callus cultures. *Plant Disease Reporter* 52: 8.
- Quak, F. (1957). Meristeeencultuur, Gecombineerd met Warmtebehandeling voor het Verkrijgen van Virusvrije Anjerplanten. *Tijdschr. over Plantenziekten*, 63:1:13-14.
- Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur 899. Meddelelse (1969). Eliminering af kartoffel virus X, S og A i forskellige kartoffelsorter.
- Stone, O. M. (1961). Production of virus free plants. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report*: 76-77.
- Stone, M. (1963). Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices. *Ann. appl. Biol.* 52: 199-209.
- Stone, M. and M. Hollings (1965). Meristem-tip cul-

- ture and the production of virus-free clones. Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report 1964: 95.
- Stone, M. and M. Hollings (1965). Meristem-tip culture and the production of virus free plants. Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report: 102.
- Tomlinson, J. A. and D. G. A. Walkey (1965). Rhubarb virus diseases. Wellesbourne Warwick. Nat. Veg. Res. Sta. Sixteenth Annual Report: 73.
- Vine, Sallie J. (1968). Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. The Journal of Hortic. Sci. 43:3: 293-297.
- Walkey, D. G. A. (1966). Production of virus-free rhubarb. Wellesbourne Warwick. Nat. Veg. Res. Sta. Seventeenth Annual Report: 69.
- Walkey, D. G. A. and J. Mitchell (1968). Production of virus-free rhubarb. Wellesbourne Warwick. Nat. Veg. Res. Sta.: 77-78.
- Walkey, D. G. A. and M. J. W. Webb (1968). Virus in plant apical meristems. J. gen. Virol. 3:2: 311-313.
- Walkey, D. G. A. and Judith M. G. Woolfitt (1968). Virus elimination by apical tip culture. Wellesbourne Warwick. Nat. Veg. Res. Sta. Annual Report: 90-91.
- Ziv, M. and A. H. Halevy (1970). Organs and plantlets regeneration of Gladiolus through tissue culture. Proceedings XVIIIth International Horticultural Congress Tel Aviv 211.

Manuskript modtaget i redaktionen den 19. oktober 1970.