

Doet scheiden lijden?

Een methode voor het kweken van symbiontvrije
Psychotria planten



Promotor: Prof. Dr. Erik Smets
Plant Conservation and Population Biology

Co-promotor en begeleider: Dr. Brecht Verstraete
Plant Conservation and Population Biology

Arne SINNESAEEL

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master of Science in Biologie

Academiejaar 2014-2015

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden

Dankwoord

Vooraleer jullie de thesis lezen wil ik eerst iedereen bedanken die op een of andere manier heeft meegeholpen in het verwezenlijken van deze masterproef.

Bedankt...

Ouders om mij mijn passie te laten uitbouwen en mij biologie te laten studeren. Terugkijkend op de voorbije vijf jaar heb ik nog steeds geen spijt van mijn keuze. De biodiversiteit en de achterliggende mechanismen fascineren me nog steeds of zelfs meer dan ervoor. Mijn excuses voor het teveel aan weetjes tijdens de vele prachtige uitstappen die we gemaakt hebben.

Professor Smets, om mij de kans te geven de masterproef in uw labo te maken. Bedankt om in mij te geloven en mij de kans te geven mogelijk een toekomst uit te bouwen in de onderzoekswereld.

Brecht, om eerst en vooral mijn begeleider te willen zijn en een project uit te schrijven. Een welgemeende dankjewel om mijn vele vragen te beantwoorden en mijn teksten rood op te fleuren. Bedankt om mij naast het onderzoek ook te leren netwerken over verschillende instituuetsgrenzen heen en mij steeds de kans te geven om mijn onderzoek te presenteren. Veel succes in Kopenhagen!

Laboratorium voor Tropische Plantenteelt dat ik mijn planten daar mocht opkweken. Hier wil ik vooral twee mensen bedanken namelijk Bart Panis voor de vele hulp bij het opkweken van de planten en mee te denken aan dit onderzoek, en Kevin om mij de verschillende nuttige technieken aan te leren en mij wegwijst te maken in deze labo's.

Alex, voor de hulp met de SEM en de verschillende leerrijke discussies.

Anja, voor je hulp bij de DNA-isolaties en mijn verschillende problemen te aanhoren.

Plantentuin Meise, voor het beschikbaar stellen van het plantenmateriaal. In het bijzonder wil ik hier nog drie mensen bedanken; Steven Janssens, om mee te denken, mijn tekst na te lezen en mij te ondervragen (Asteraceae?). Petra voor de nodige anatomische informatie en de vele nuttige tips bij het uitschrijven van mijn beurs. Ann van de Vyvere, voor het uitvoeren van de kiemingsexperimenten en het bewaren van de zaden.

Yannick voor de nuttige inbreng en de vele leuke gesprekken. Daarnaast wil ik ook de andere collega's van het laboratorium Plant Conservation and population Biology bedanken voor de aangename sfeer en voor de vele aangename middagpauzes.

Laatstejaarsstudenten, voor het samen stressen, klagen, debatteren, maar ook voor de ontspanning, in bijzonder ex-Kulakkers, Vienna, Kaat, Jens en nog vele anderen.

Anne-Laure, Simon, Balder en andere kazoumonitoren voor de verschillende leuke uitstapjes en aan te tonen dat biologen soms wel rare kantjes hebben...

Annie, voor de nodige ontspanning, de ondersteuning en er steeds voor mij te zijn.

Lezer, voor de interesse in dit onderzoek. Veel lees- en leergenoet! Vragen of bemerkingen zijn altijd welkom!!

INHOUD

Dankwoord	I
Inhoud.....	I
1 Inleiding	1
1.1 Endosymbiose.....	1
1.2 Endosymbiose bij planten – Bladendosymbiose.....	2
1.2.1 Potentiële voordelen van de endosymbiose	6
1.2.2 Rubiaceae	7
1.2.3 De endosymbiont.....	10
1.2.4 De nodulerende bladendosymbiose bij Psychotria.....	13
1.3 Bacterievrije planten	15
1.3.1 In vitro zaadcultuur	16
1.3.2 Embryo rescue.....	16
1.4 Doelstellingen.....	18
2 Materiaal & Methode	19
2.1 Materiaal	19
2.2 Experimentele opzet.....	19
2.3 Opkweekmethoden	20
2.3.1 Niet-gesteriliseerde opkweek (controle)	20
2.3.2 Sterilisatie.....	22
2.3.3 Aanmaak groeimedium	22
2.3.4 In vitro zaadcultuur	23
2.3.5 Embryo rescue.....	23
2.3.6 Opkweken van gekiemde pyrenes en embryo's.....	24
2.4 Moleculair onderzoek	25
2.4.1 DNA-isolatie	25
2.4.2 PCR	26
2.4.3 Gelelectroforese	26
2.4.4 Het opzuiveren van de PCR-mengsels	26
2.4.5 Blasten van sequenties	27

2.5	Morfologisch onderzoek	27
2.5.1	Observatie.....	27
2.5.2	Rasterelektronenmicroscopie (REM).....	27
2.6	Risico-analyse.....	28
3	Resultaten.....	29
3.1	Ontwikkelen van bacterievrije planten	29
3.2	Testen aanwezigheid verticale transmissie	36
3.3	Morfologische verschillen tussen bacterievrije en normale fenotype	38
4	Discussie.....	42
4.1	Ontwikkelen van bacterievrije planten	42
4.2	Verticale transmissie en de aanwezigheid van endofyten in het zaad	44
4.3	Fenotype van bacterievrije planten en functie van de interactie	46
5	Conclusie.....	49
6	Suggesties voor verder onderzoek.....	51
7	Samenvatting.....	52
8	Summary	53
	Referenties.....	54
	Literatuur	54
	Figuren	62
	Addendum	63
	PCR-gegevens	63
	Overzicht gebruikte primers	63
	Overzicht gebruikte PCR- schema's	64
	Risico-analyse (Naar BIG KU Leuven, databank gevaarlijke stoffen)	65
	Materiaal	65
	Opkweekmethoden	65

1 INLEIDING

1.1 ENDOSYMBIOSE

Symbiotische relaties tussen prokaryoten en eukaryoten komen veelvuldig voor in de natuur en worden aangetroffen in diverse groepen van organismen. In veel gevallen wordt de prokaryoot in het lichaam van de eukaryoot opgenomen en ontstaat er een endosymbiose. Hierbij kan de prokaryoot zowel inter- als intracellulair in het lichaam van de eukaryoot voorkomen (Moya *et al.*, 2008; Login *et al.*, 2011). Endosymbiotische interacties zouden verschillende keren onafhankelijk geëvolueerd zijn doorheen de tijd (Corsaro *et al.*, 1999; Hosokawa *et al.*, 2006). Onderzoek naar endosymbiose gebeurt onder meer bij insecten (Moya *et al.*, 2008; Login *et al.*, 2011), sponzen (Moya *et al.*, 2008; Wooldridge, 2014) en planten (Moya *et al.*, 2008; Oldroyd *et al.*, 2009).

In deze endosymbiotische interacties wordt de prokaryoot vaak aangeduid als endosymbiont en de eukaryoot als gastheer. In plant-bacterie interacties wordt ook de term endofyt gebruikt als een synoniem voor endosymbiont. Deze term wordt vaak gebruikt als een algemene term voor elk organisme dat binnen een plant leeft (Clay & Schardl, 2002). In dit onderzoek wordt de nauwere definitie toegepast, namelijk elk micro-organisme dat het interne weefsel van een gezonde plant koloniseert zonder zichtbare ziektesymptomen of negatieve effecten voor de gastheer (Partida-Martínez & Heil, 2011). De bacteriën die tijdens de interactie met de gastheer negatieve effecten veroorzaken, worden in dit onderzoek aangeduid als pathogenen. Het onderscheid tussen endofyt en pathogeen is niet altijd zwart-wit, maar eerder een continuüm van verschillende mogelijkheden (Partida-Martínez & Heil, 2011).

Er kunnen verschillende types van endosymbiose onderscheiden worden:

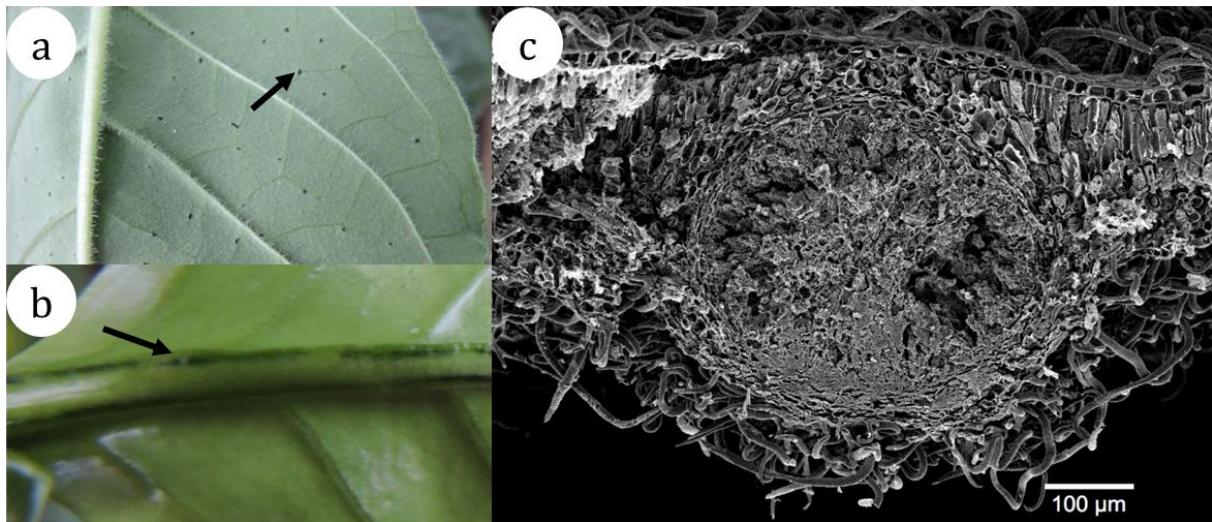
- Parasitisme, mutualisme versus commensalisme: parasitisme is een vorm van interactie waarbij de interactie voor de ene soort voordelig is en voor de andere soort nadelig. Bij mutualisme is de interactie voor beide soorten positief, terwijl bij commensalisme slechts één soort voordeel heeft, terwijl de andere soort noch voordeel noch nadeel ondervindt (Moya *et al.*, 2008).
- Gastheerspecifieke versus aspecifieke interacties: indien de endosymbionten binnen een gastheersoort behoren tot dezelfde soort dan is de interactie gastheerspecifiek. Wanneer de interactie aspecifiek is, kunnen er verschillende soorten van endosymbionten aangetroffen worden binnen dezelfde gastheersoort (Norton & Carpenter, 1998).

- Obligate versus facultatieve interacties: wanneer de soorten niet meer onafhankelijk kunnen overleven, wordt de endosymbiose obligaat genoemd. De interactie is facultatief als de soorten (nog) onafhankelijk van elkaar kunnen leven (Moya *et al.*, 2008).
- Cyclisch versus niet-cyclische interacties: wanneer de endosymbiont doorheen het hele leven van de gastheer aanwezig is, is de interactie cyclisch. Obligate interacties zijn meestal cyclisch omdat beide partners niet onafhankelijk kunnen overleven. Bij reproductie wordt de endosymbiont verticaal doorgegeven aan de nakomelingen. Bij niet-cyclische interacties wordt de endosymbiont niet in alle levensstadia van de gastheer aangetroffen en wordt de endosymbiont vaak horizontaal doorgegeven (Hosokawa *et al.*, 2006; Moya *et al.*, 2008).

Binnen de vaatplanten zijn er slechts enkele mutualistische endosymbiotische relaties goed gedocumenteerd. Eén van de belangrijkste plant-bacterie interacties, relevant voor landbouw en ecologie, is de interactie tussen vlinderbloemigen of Fabaceae en rhizobia bacteriën (Yokota & Hayashi, 2011). De rhizobia zijn een polyfyletische en heterogene groep van bacteriën waarvan de meest bestudeerde endofyten tot α -proteobacteria (α -rhizobia) behoren. Later werden bij verschillende soorten β -proteobacteria (β -rhizobia) genen gevonden die instaan voor stikstoffixatie, onder andere in het genus *Cupriavidus* en *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001; Bontemps *et al.*, 2010; Taulé *et al.*, 2012). Rhizobia kunnen zowel vrij in de bodem voorkomen alsook als symbiotische partner van een gastheerplant. De planten trekken de bacteriën aan met behulp van flavonoïden die op hun beurt de productie van specifieke bacteriële signaalmoleculen of nod-factoren activeert. Deze factoren activeren bij de plant specifieke genen die instaan voor de opname van de rhizobia langs de wortelhaartjes en het induceren van de vorming en differentiatie van wortelnodules (Oldroyd *et al.*, 2009; Taiz & Zeiger, 2010). Elke rhizobia soort heeft unieke nod-factoren die een unieke communicatie en specifieke interactie teweeg brengen met bepaalde plantengroepen (Mylona *et al.*, 1995; Cullimore & Dénarié, 2003; Taiz & Zeiger, 2010).

1.2 ENDOSYMBIOSE BIJ PLANTEN – BLADENDOSYMBIOSE

Bladnodulatie is een interactie waarbij endofytische bacteriën voorkomen in nodules in de bladeren van bepaalde plantensoorten (**Figuur 1 a, b**). Deze endosymbiose is gekend bij ongeveer 500 soorten bloemplanten binnen twee verschillende plantenfamilies, meer bepaald in de sleutelbloemfamilie of Primulaceae en de koffiefamilie of Rubiaceae. Beide families hebben een pantropisch verspreidingsgebied, maar deze interactie werd tot nu toe enkel geïdentificeerd in de (sub)tropische gebieden van Afrika en Azië (Miller, 1990).



Figuur 1: *Psychotria kirkii*: detail van de bladschijf met verspreide sferische nodules (pijl) (a); *P. umbellata*: detail van de bladschijf met langwerpige nodules langs de hoofdnerf (pijl) (b); *P. kirkii*: REM-foto van een doorsnede van een nodule (c).

In Primulaceae behoren de nodulerende soorten tot het genus *Ardisia* waarvan 30 nodulerende soorten zich in het subgenus *Crispardisia* bevinden. Daarnaast zouden er nodulerende soorten geïdentificeerd zijn in het genus *Amblyanthus* (2 soorten) en *Amblyanthopsis* (3 soorten), maar deze observaties moeten nog bevestigd worden (Miller, 1990; Lemaire *et al.*, 2011b, c). Binnen deze familie hebben de nodules een ellipsoïde vorm en bevinden ze zich aan de bladrand. De nodules werden voor het eerst beschreven als zwellingen van de bladrand, door von Höhnel (1881). De holte binnenin werd beschreven als een ruimte die geïnfecteerd kon worden door bacteriën (von Höhnel, 1881). Hij suggereerde dat de nodules ontstonden door het omvormen van marginaal geplaatste holtes gelegen onder stomata of hydathoden (Miller, 1990). De endofyten in de nodules van *Ardisia* soorten werden geïdentificeerd met behulp van een cultuuronafhankelijke moleculaire techniek (polymerasekettingreactie of PCR) en ze werden toegewezen aan het genus *Burkholderia* (Lemaire *et al.*, 2011b). Er werd eveneens aangetoond dat elke gastheersoort een specifieke interactie vertoont met één unieke endofyt (Lemaire *et al.*, 2011b).

Het overgrote deel van de nodulerende plantensoorten bevindt zich binnen de familie Rubiaceae, meer bepaald in de genera *Pavetta* (140 soorten), *Psychotria* (80 soorten) en *Sericanthe* (11-12 soorten) (Miller, 1990; Lemaire *et al.*, 2011a, b, c, 2012b, c). De verschillende morfologische kenmerken van de nodules, zoals vorm, grootte en verdeling over de bladschijf, kunnen sterk variëren tussen de verschillende gastheersoorten (**Figuur 1 a, b**). De nodules werden voor het eerst beschreven binnen de familie Rubiaceae door Trimen *et al.* (1894). In 1902 ontdekte Zimmerman bacteriën in de nodules van enkele *Pavetta* soorten. In de daaropvolgende jaren werden de nodules onderzocht met behulp van licht- en elektronenmicroscopie (**Figuur 1 c**). Uit dit soort onderzoek bleek dat nodules ontstaan uit substomatale holten die vergroot worden en omgevormd worden tot nodules (Lersten &

Horner, 1967). Deze nodules bestaan niet enkel uit bacteriën, maar bevatten eveneens mesofylcellen en worden afgebakend met afgeplatte parenchymcellen (Lersten & Horner, 1967; Miller, 1990). De identiteit van de endofyten werd pas recent achterhaald met behulp van een cultuuronafhankelijke moleculaire techniek (PCR) en ze behoren tot het genus *Burkholderia*, net zoals de endofyten in *Ardisia* (Van Oevelen *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2011a, b, 2012c). Daarnaast werd aangetoond dat elke nodulerende plantensoort slechts met één specifieke endofyt interageert (Lemaire *et al.*, 2011c).

In 1990 werd een tweede vorm van bladendosymbiose binnen Rubiaceae gevonden, meer bepaald in enkele soorten van de genera *Fadogia* en *Vangueria* (Van Wyk *et al.*, 1990). Deze soorten bevatten endofyten maar vertonen geen aanwezigheid van nodules waardoor er gespeculeerd werd dat deze vorm van endosymbiose een eerder stadium zou vertegenwoordigen in de evolutie naar bladnodulatie, zoals aanwezig in de genera *Psychotria*, *Pavetta* en *Sericanthe* (Van Wyk *et al.*, 1990). De bacteriën bevinden zich in de grote intercellulaire holten van het sponsparenchym en zijn vaak geassocieerd met de bladnerven (Van Wyk *et al.*, 1990; Verstraete *et al.*, 2011). De gastheerplanten waarin dit tweede type van bladsymbiose ontdekt is, staan bekend als soorten die ‘gousiekte’ veroorzaken (Van Wyk *et al.*, 1990; Verstraete *et al.*, 2011). Deze ziekte veroorzaakt acuut hartfalen bij herkauwers vier tot acht weken na het eten van de plant. De hypothese is dat de toxines die de ziekte veroorzaken door de endosymbionten geproduceerd worden (Van Wyk *et al.*, 1990; Verstraete *et al.*, 2011). De link tussen de ziekte en de bacterie werd gesuggereerd omdat alle plantensoorten die de ziekte veroorzaken bacteriën bevatten. Tot deze plantensoorten behoren de nodulerende soorten *Pavetta harborii* en *P. schumanniana* en de niet-nodulerende soorten *Fadogia homblei*, *Vangueria thamnus*, *V. latifolia* en *V. pygmaea* (Van Wyk *et al.*, 1990; Verstraete *et al.*, 2011, 2013). De niet-nodulerende endofyten werden eveneens geïdentificeerd met behulp van PCR-analyse en behoren tot het genus *Burkholderia*, net zoals de nodulerende endosymbionten (Verstraete *et al.*, 2011). Na het identificeren van endosymbionten in de genera *Fadogia* en *Vangueria*, werd het tribus Vanguerieae verder gescreend op de aanwezigheid van de endosymbiose. Deze endosymbionten werden slechts terug gevonden in vijf genera, meer bepaald *Fadogia*, *Fadogiella*, *Globulostylis*, *Rytigynia* en *Vangueria*. Fylogenetische analyses toonden aan dat de niet-nodulerende endosymbionten nauwer verwant zijn aan de vrijlevende bacterie *Burkholderia caledonica* dan aan de nodulerende endofyten (Verstraete *et al.*, 2011, 2013). *Burkholderia caledonica* is een bodembacterie die nauw in contact staat met de wortels van enkele economisch belangrijke planten zoals druif (*Vitis vinifera*) en suikerriet (*Saccharum officinarum*) (Compant *et al.*, 2008). Naast *B. caledonica* zijn er verschillende andere bodembacteriën verwant aan de niet-nodulerende endofyten. De nauwe verwantschap met bodembacteriën laat suggereren dat de endofyten afkomstig zijn uit de bodem en eventueel door horizontale transfer in de

gastheerplanten terechtgekomen zijn (Verstraete *et al.*, 2013). Niet alleen binnen de tribus Vanguerieae werd deze vorm van bladsymbiose aangetroffen.

Door verscheidene niet-nodulerende Afrikaanse *Psychotria* soorten te screenen, kon aangetoond worden dat meerdere soorten een niet-nodulerende bladsymbiose vertonen en de endofyten werden geïdentificeerd als *Burkholderia* en zijn nauw verwant aan de nodulerende *Burkholderia* soorten (Lemaire *et al.*, 2012b). Dit suggereert dat de niet-nodulerende endosymbiose in de Vanguerieae onafhankelijk van de nodulerende endosymbiose geëvolueerd zou zijn (Verstraete *et al.*, 2013).

Bij het vergelijken van de twee vormen van bladendosymbiose werden enkele verschillen zichtbaar. Ten eerste is er een verschil in gastheerspecificiteit. Binnen het niet-nodulerende type in het tribus Vanguerieae werd in verschillende plantensoorten dezelfde endofyt geïdentificeerd. Toch vertonen de endofyten een begin van gastheerspecificiteit doordat de endofyten per gastheersoort in de fylogenetische analyses clusteren. Deze vorm van beginnende gastheerspecificiteit toont mogelijk aan dat het een eerder stadium betreft in de evolutie naar het nodulerende type (Verstraete *et al.*, 2011, 2013). Daarnaast is het niet-nodulerende type in Vanguerieae niet obligaat voor de endofyt aangezien het opgekweekt kan worden op agar, dit in tegenstelling tot de nodulerende bacteriën die niet overleven buiten hun gastheerplant (Verstraete *et al.*, 2013). Binnen de niet-nodulerende endosymbiose kunnen ook enkele verschillen gevonden worden tussen het type gevonden in Vanguerieae en dat in *Psychotria*. Bij *Psychotria* lijken de niet-nodulerende endofyten zoals het nodulerende type, gastheerspecifiek te zijn. Tot op heden werd niet getest of de endofyten kunnen overleven zonder hun gastheer zoals bij het nodulerende type (Lemaire *et al.*, 2012b).

Een tweede verschil tussen de types van bladsymbiose betreft de levenscyclus van de endosymbiont. Het nodulerende type werd aan de hand van verschillende morfologische vaststellingen, zoals de onmogelijkheid tot vrij opgroeien van de endofyt en de ontwikkeling van misvormde gastheerfenotypes bij het ontbreken van de bacteriën, verondersteld een obligate interactie te zijn (Miller, 1990; Van Oevelen *et al.*, 2003). Als een cyclus obligaat is en de interactie gastheerspecifiek, dan wordt een gesloten cyclus verondersteld waarbij de bacteriën verticaal doorgegeven worden naar de volgende generatie van planten. Deze verticale transmissie zou deels aangevuld worden door horizontale transfer, wat aangetoond werd door het ontbreken van co-evolutie tussen gastheer en endosymbiont (Lemaire *et al.*, 2011c, 2012a). Doordat de endosymbionten van het niet-nodulerende type nauw verwant zijn aan bodembacteriën en doordat niet nauw verwante plantensoorten dezelfde endosymbiont bevatten, is de aanwezigheid van horizontale transmissie te verwachten (Verstraete *et al.*, 2013). Dit werd ondersteund door verschillende voorbeelden bij het niet-nodulerende

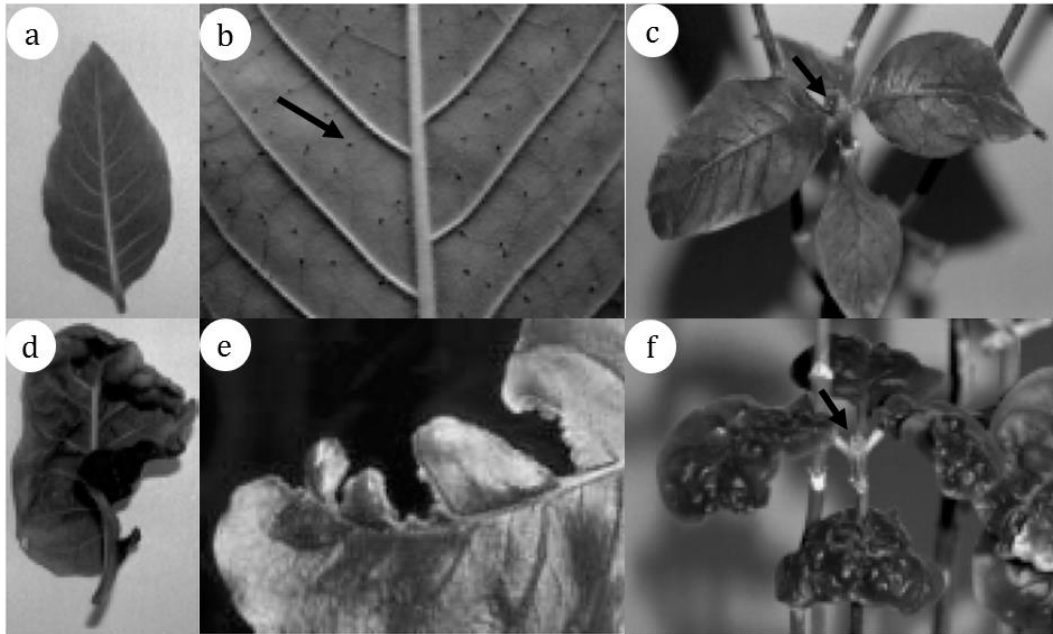
fenotype binnen het genus *Psychotria*: de endosymbionten van *P. anetoclada* en *P. sitae* behoren namelijk tot dezelfde soort. De endosymbionten van *P. taedoungii* en *P. psychotroides* behoren niet tot de clade van de niet-nodulerende *Psychotria* endosymbionten en zijn gepositioneerd tussen de nodulerende endosymbionten (Lemaire *et al.*, 2012b).

1.2.1 POTENTIËLE VOORDELEN VAN DE ENDOSYMBIOSE

De functie van de endofyten is tot op heden een mysterie. Doordat de endofyten van het nodulerende type niet opkweekbaar zijn, wordt verondersteld dat de bacteriën een bepaalde substantie nodig hebben van de gastheerplant om zich te voeden en te overleven (Lemaire *et al.*, 2011c). Daarnaast worden er morfologische veranderingen waargenomen in het fenotype van de plant wanneer er geen nodules aanwezig zijn. Dit “bacterievrije” fenotype werd beschreven als “cripple”, vanwege een gereduceerde groei, de aanwezigheid van vervormde bladeren en het apicale meristeem dat tot callus gereduceerd is (**Figuur 2**) (Van Oevelen *et al.*, 2003). Dit gastheerfenotype toont, net zoals het niet opkweekbaar zijn van de endofyt, aan dat deze interactie mogelijk obligaat is (Van Oevelen *et al.*, 2003). Aan de hand van beschrijvend morfologisch onderzoek werden verschillende hypothesen opgesteld over de mogelijke functionele wisselwerking tussen de bacterie en de plant. Mogelijke functies van de endosymbiont zijn stikstoffixatie of planthormoonproductie (bv. cytokinine of auxine) om de bladgroei te vervolledigen (Miller, 1990; Carlier & Eberl, 2012).

Deze hypothesen werden onderzocht aan de hand van het genoom van *Candidatus Burkholderia kirkii*, de endosymbiont van *Psychotria kirkii* (Carlier & Eberl, 2012). Ten eerste is het genoom van de endofyt sterk geërodeerd en ongeveer half zo groot als het genoom van een vrijlevende *Burkholderia* soort (Carlier & Eberl, 2012). Ten tweede werden de genen die instaan voor stikstoffixatie of voor de aanmaak van planthormonen niet teruggevonden, waardoor deze hypothesen minder waarschijnlijk werden (Carlier & Eberl, 2012). Er werd wel een biosyntheseweg van secundaire metabolieten ontdekt die als eindproduct een molecule produceert die behoort tot de familie van de aminocyclitolen (Carlier *et al.*, 2013). Dit zou dienst doen als antimicrobiële, insecticide of schimmelwerende stof en zou de plant dus kunnen beschermen tegen pathogenen (Mahmud, 2003; Carlier & Eberl, 2012; Carlier *et al.*, 2013). Daarnaast zou deze stof enzymen zoals α -glycosidase inhiberen, wat niet alleen bij bacteriën en fungi aanwezig is, maar eveneens bij zoogdieren en zou een deel kunnen zijn van het defensiemechanisme tegen herbivorie (Mahmud, 2003). De mogelijke voordelen voor de endofyten zijn nog niet aangetoond doordat de bacteriën zelfvoorzienend lijken te zijn in het verkrijgen van aminozuren, nucleotiden en vitaminen (Carlier & Eberl, 2012). Door de reductie van het genoom zou de bacterie zich niet meer kunnen aanpassen aan anderen omgevingen, de gastheer kan een homeostatisch milieu

vormen waardoor de interactie voordelig wordt voor de endofyt. Dit zou een eventuele verklaring zijn voor het feit dat de bacterie niet te cultiveren is (Carlier & Eberl, 2012; Carlier *et al.*, 2013).



Figuur 2: *Psychotria kirkii*. Het nodulerend fenotype met normaal gevormde bladeren (a), waarop nodules (pijl) aanwezig zijn (b) en een meristeem (pijl) dat blijft groeien (c). Het “cripple”-fenotype vertoont misvormde bladeren (d), waarop geen nodules geobserveerd worden (e) en het meristeem (pijl) gereduceerd is tot een callus (f) (naar Van Oevelen *et al.*, 2003).

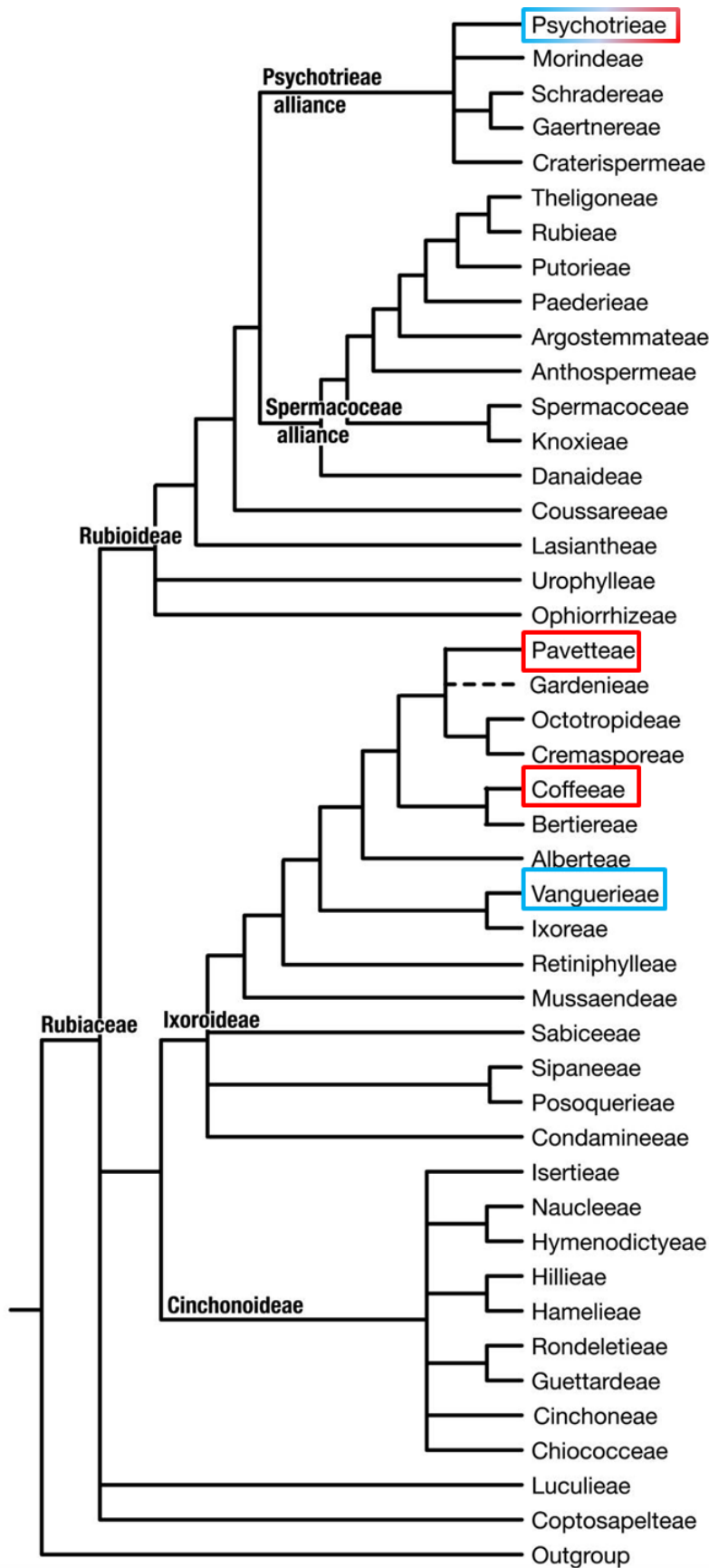
Daarnaast kan de bacterie ook een invloed hebben op het evolutionair potentieel van de gastheerplant. Het is geweten dat mutualistische interacties het evolutionair potentieel van de gastheersoort kan verhogen en zo ook de speciatiesnelheid kan versnellen. In verschillende associaties van planten met endosymbionten is deze interactie al aangetoond (Brucker & Bordenstein, 2012).

1.2.2 RUBIACEAE

Dit onderzoek spitst zich toe op de bacteriële bladsymbiose in de plantenfamilie Rubiaceae, meer bepaald in het genus *Psychotria*. De koffiefamilie behoort tot de orde van Gentianales en is de vierde meest soortenrijke bloemplantenfamilie met ongeveer 13000 soorten in ongeveer 620 genera (Davis *et al.*, 2009). De familie is pantropisch en komt voor op alle continenten, behalve Antarctica (Bremer & Eriksson, 2009; Davis *et al.*, 2009). De meeste taxa komen voor in subtropische of tropische gebieden. In de gematigde gebieden worden een aantal genera van het tribus Rubieae wijdverspreid teruggevonden (Bremer & Eriksson, 2009). In tegenstelling tot de tropen en subtropen, waar de plantenfamilie in verschillende levensvormen voorkomt zoals bomen, struiken, lianen, kruiden, zijn er vooral kruidachtige soorten aanwezig in de gematigde streken, bijvoorbeeld *Galium aparine* (kleefkruid) en

Galium odoratum (lievevrouwebedstro) (Stevens, 2001). Rubiaceae wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van interpetiolaire steunblaadjes, tegenoverstaande bladstand en enkelvoudige gave bladeren. Daarnaast hebben de meestal vier- of vijftallige bloemen een onderstandig vruchtbeginsel, vaak buisvormig vergroeide kroonbladeren en met de kroonbuis vergroeide of epipetale meeldraden (Stevens, 2001).

In deze familie zijn er enkele economisch belangrijke soorten aanwezig zoals *Ixora* en *Gardenia* die als sierplanten gekweekt worden. Andere Rubiaceae zijn gekend omwille van hun alkaloiden, zoals het anti-malariamiddel kinine, gewonnen uit de schors van *Cinchona* soorten (Gorka *et al.*, 2013). Verder is er ipecac, een braakmiddel, dat uit de rhizomen en wortels van *Carapichea ipecacuanha* gewonnen wordt (Berger *et al.*, 2011). Gambier wordt gebruikt als medicijn vanwege zijn anti-inflammatoire respons en als leerlooimiddel. Het wordt gewonnen uit *Uncaria* soorten (Heitzman *et al.*, 2005). De economisch meest belangrijke soorten zijn echter *Coffea arabica* en *Coffea canephora* waarvan de zaden voor productie van koffie gebruikt worden. Na petroleum wordt koffie gezien als de belangrijkste verhandelde grondstof ter wereld in omzet (Vega *et al.*, 2005).



Figuur 3: Fylogenetische boom van Rubiaceae. De tribus die nodulerende genera bevatten (rood omrand) zijn Psychotrieae (*Psychotria*), Pavetteae (*Pavetta*), Coffeae (*Sericanthe*). De tribus die niet nodulerende genera bevatten (blauw omrand) zijn Vanguerieae (*Fadogia*, *Fadogiella*, *Globulostylis*, *Rytigynia* en *Vangueria*) en Psychotrieae (*Psychotria*) (naar Bremer & Eriksson, 2009).

De Rubiaceae familie wordt onderverdeeld in drie subfamilies Cinchonoideae, Ixoroideae en Rubioideae (**Figuur 3**) (Bremer & Eriksson, 2009). Sommigen erkennen slechts twee subfamilies namelijk Cinchonoideae, met daarin Ixoroideae, en Rubioideae (Robbrecht & Manen, 2006). Cinchonoideae is de minst soortenrijke subfamilie met ongeveer 1500 soorten vooral bestaande uit kleine bomen en struiken voornamelijk afkomstig uit de Neotropen (Robbrecht & Manen, 2006; Bremer & Eriksson, 2009). De subfamilie Ixoroideae bevat voornamelijk bomen en struiken; een opvallend kenmerk dat voorkomt in vele tribus (Alberteae, Gardenieae, Ixoreae, Octotropideae, Pavetteae, Retinophylleae en Vanguerieae) is secundaire pollenpresentatie (Bremer & Eriksson, 2009). Het pollen wordt namelijk op andere bloemstructuren gepresenteerd dan de helmhokken waarin ze worden geproduceerd (Howell *et al.*, 1993; Yeo, 1993). Deze subfamilie bevat onder meer het tribus Pavetteae met de nodulerende *Pavetta* soorten, het tribus Coffeae, waarin het genus *Sericanthe* valt, en het tribus Vanguerieae met de niet-nodulerende soorten (**Figuur 3**). Ten laatste is er nog de subfamilie Rubioideae die vooral bestaat uit kruiden en struiken en gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van rafiden (bundels van naaldvormige calciumoxalaatkristallen) en heterostylie (Bremer & Eriksson, 2009). Deze subfamilie is de meest soortenrijke van de Rubiaceae en bestaat uit twee informele groepen, de Psychotrieae alliantie en de Spermaceae alliantie (Bremer & Manen, 2000; Bremer & Eriksson, 2009). Het type genus van Psychotrieae is *Psychotria*, een van de meest soortenrijke genera van alle angiospermen en bevat ongeveer 2000 soorten (Bremer & Eriksson, 2009). Vele soorten van het tribus Psychotrieae zijn een belangrijke component van verschillende terrestrische ecosystemen doorheen de tropen (Razafimandimbison *et al.*, 2014). Ze hebben vlezige steenvruchten die een belangrijke voedselbron zijn voor tropische vogels en zoogdieren (Snow, 1981; Herrera, 1989; Eriksson & Bremer, 1991; Razafimandimbison *et al.*, 2014). In de steenvrucht vormt het endocarp een ondoorlaatbare laag of stenige laag rondom het zaad. Het endocarp en het zaad worden samen de pyrene genoemd (Eriksson & Bremer, 1991). Daarnaast wordt het tribus ook gekenmerkt door solitaire, anatropische en basaal geplaatste ovules in elke locule en is er in elke pyrene slechts één zaad aanwezig (Razafimandimbison *et al.*, 2014).

1.2.3 DE ENDOSYMBIONT

De endosymbionten van zowel het nodulerende als het niet-nodulerende type behoren tot het genus *Burkholderia* (Van Oevelen *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2011b, c, 2012a; Verstraete *et al.*, 2011, 2013). Dit genus werd voorgesteld door Yabuuchi en hierin werden vooral soorten geïdentificeerd die toen behoorden tot de genera *Pseudomonas* en *Bacillus* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Het genus werd vernoemd naar een Amerikaanse fytopatholoog Walter Burkholder die in 1942 als eerste *Burkholderia cepacia* beschreef (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Deze soort is

het type van het genus. De eerste soorten die beschreven werden in het genus *Burkholderia* waren pathogenen zoals *B. cepacia*. Deze soort veroorzaakt bij sommige patiënten met een longinfectie snel-evoluerende necrotische pneumonia en bloedvergiftiging (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). *Burkholderia pseudomallei* veroorzaakt dan weer melioidosis, een dodelijke bloedvergiftigingsziekte (Holden *et al.*, 2004). Naast dierpathogenen bevat het genus eveneens plantpathogenen zoals *B. andropogonis*. Deze bacteriesoort kan verschillende ziekten veroorzaken in een breed spectrum van monocotylen en eudicotylen, onder meer in commercieel geteelde gewassen zoals koffie, kafferkoren en maïs (Ramundo & Claflin, 2005). Eén van de symptomen is een typisch strepenpatroon op de bladeren met purperen, rode of gele verkleuringen afhankelijk van oorspronkelijke bladkleur (Ramundo & Claflin, 2005).

Later werden verschillende bacteriën beschreven die een positieve of neutrale invloed hebben op planten. Soorten zoals *B. vietnamiensis*, *B. brasiliensis* en *B. kururienis* fixeren atmosferische stikstof en naast de gekende *Rhizobium* bacteriën werden ook *Burkholderia* soorten teruggevonden in nodules van Fabaceae (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Het positieve effect van deze bacteriën werd onderzocht met behulp van inoculatie-experimenten. *Burkholderia phytofirmans* werd bijvoorbeeld geïnoculeerd in de rhizosfeer van Italiaans raaigras (*Lolium multiflorum*) in dieselvervuilde grond (Afzal *et al.*, 2013). Dit zorgt voor een verhoging in de plantbiomassa-productie, de koolwaterstofdegradatie en de toxiciteitsvermindering. *Burkholderia phytofirmans* is een endofytische bacterie die ontdekt werd in oppervlakte-gesteriliseerde wortels van een ui (*Allium cepa*) (Afzal *et al.*, 2013). In tegenstelling tot de bladnodulerende bacteriën kan deze soort wel gecultiveerd worden (Afzal *et al.*, 2013). Naast de positieve effecten in dieselvervuilde grond heeft het inoculum van deze bacterie ook positieve effecten op de groei van druif (*Vitis vinifera*) en wordt de koudetolerantie verhoogd. Onder normale temperaturen verdubbelde de bacterie de CO₂-fixatie en O₂-productie (Ait Barka *et al.*, 2006). Naast *B. phytofirmans* kunnen er nog andere wortelnodulerende *Burkholderia* soorten gebruikt worden als inoculum. *Burkholderia vietnamiensis* werd gebruikt als rijst-inoculum en verhoogde de productie met 13 tot 22 %, inhibeerde daarnaast ook fungale pathogenen en produceert het plantenhormoon auxine en ijzerbindende transportmoleculen of sideroforen (Van Trân *et al.*, 2000).

Daarnaast werden pathogene soorten eveneens getest als inocula om hun effect op de plantengroei te bestuderen. *Burkholderia cepacia* bijvoorbeeld, beschermt het zaad van gerst tegen het herbicide 2,4-dichloorfenoxyzijanzuur en stimuleert de zaadkieming en groei van de plant (Jacobsen, 1997). Deze twee processen blijven normaal uit onder invloed van het herbicide. Deze bacteriën zijn eventueel inzetbaar als bioremediëring van xenobiotische gedegradeerde bodems (Jacobsen, 1997). Daarnaast werden de groeistimulerende effecten van *B. cepacia* onder meer bestudeerd in kafferkoren (*Sorghum bicolor*) en komkommer (*Cucumis sativus*) (Chiarini *et al.*, 1998). Naast *B. cepacia* kunnen ook andere soorten gebruikt worden voor bioremediëring van door zware metalen gedegradeerde gronden (Jiang *et al.*, 2008).

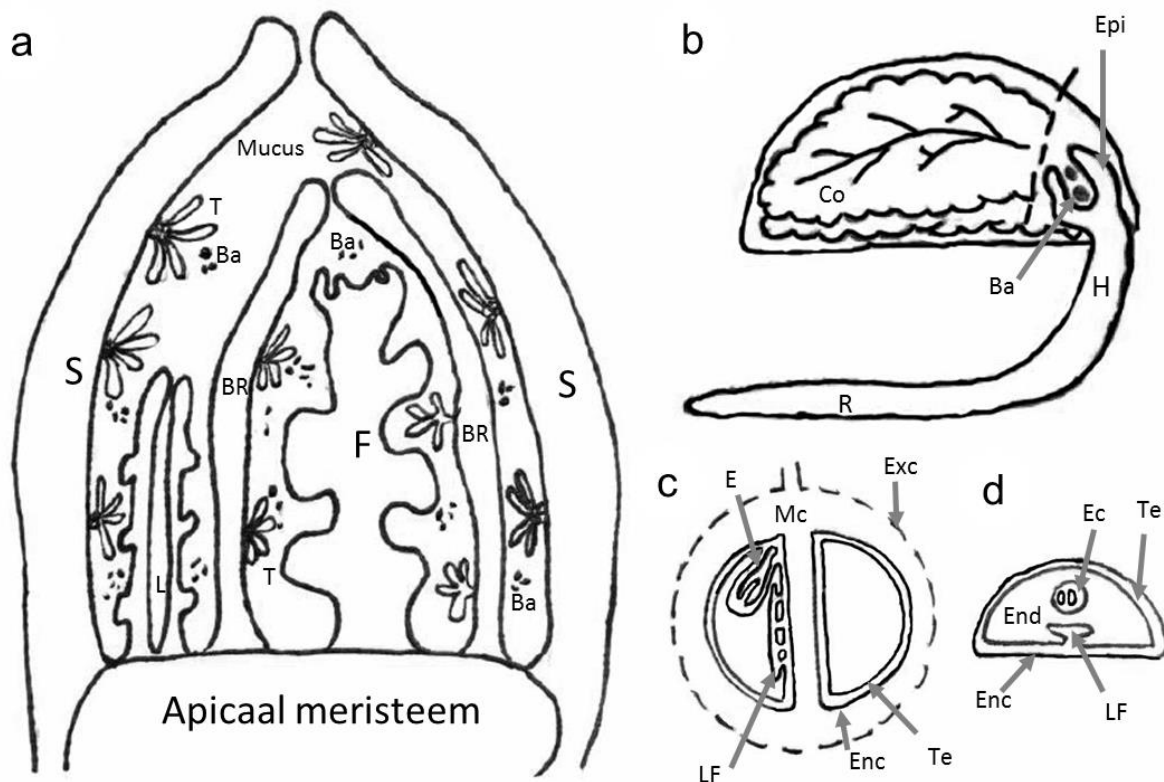
De recentste fylogenetische analyses van het genus *Burkholderia* tonen aan dat het genus bestaat uit twee grote clades, meer bepaald het *B. cepacia* complex (BCC) en de “plant associated beneficial and environmental” cluster (PBE) (**Figuur 4**) (Verstraete *et al.*, 2013). BCC werd aanzien als een clade van pathogene soorten maar, zoals hierboven aangetoond, bevat deze clade verschillende species die een ecologisch of economisch nut kunnen hebben voor de mens en zijn omgeving (Jacobsen, 1997; Chiarini *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2008). De PBE-cluster bevat nauw verwante soorten die een neutrale of positieve interactie aangaan met planten en/of de omgeving (Gyaneshwar *et al.*, 2011; Suárez-Moreno *et al.*, 2012; Verstraete *et al.*, 2013). De endosymbionten van Rubiaceae en Primulaceae vallen allemaal in deze PBE-cluster. De groep met endosymbionten van Primulaceae en nodulerende Rubiaceae zijn nauw verwant aan de bodembacterie *B. glathei* (Lemaire *et al.*, 2012b). De niet-nodulerende endofyten kunnen verdeeld worden in twee groepen, de niet-nodulerende *Psychotria* endofyten die nauw verwant zijn met de nodulerende endofyten (Lemaire *et al.*, 2012b) en de endofyten van niet-nodulerende Vanguerieae die zich fylogenetisch tussen verschillende bodembacteriën bevinden zoals *B. caledonica* en *B. xenovorans* (Verstraete *et al.*, 2013).

1.2.4 DE NODULERENDE BLADENDOSYMBIOSE BIJ *PSYCHOTRIA*

In dit onderzoek wordt er enkel op de endosymbiose binnen het genus *Psychotria* gefocust. Von Faber was de eerste onderzoeker die bladnodulatie beschreef in het genus *Psychotria* (von Faber, 1912). De eerste onderzoekers veronderstelden dat de endosymbiont het blad infecteert via stomata tijdens een jong stadium in de bladontwikkeling (Miller, 1990). Voor de ontwikkeling van bladeren in de Rubiaceae worden twee paar gefuseerde steunbladeren of stipulen ontwikkeld die een gesloten kamer over het bladprimordium vormen. Deze stipulen produceren met behulp van waaiervormige colleters op de adaxiale kant van de bladeren een mucusachtige substantie die essentieel zou zijn als voedingsmiddel en transportmiddel van de endosymbiont (Miller, 1990). De bacteriën bevinden zich in dit slijm dat onder meer ook de abaxiale zijde van de zich ontwikkelende bladeren bedekt. Zeer vroeg in de ontwikkeling zou

een deel van de bacterie-bevattende mucus enkele willekeurig over het blad verspreide stomatale poriën infecteren. Daarna nestelen de bacteriën zich in de substomatale holte en initiëren ze de vorming van nodules. Tijdens de verdere bladontwikkeling blijft de bacteriële kolonie groeien en oefent deze druk uit op de omsluitende, afgeplatte mesofylcellen waardoor verschillende mesofylcellen losscheuren en terecht komen in de bacteriële massa. De verdere bladgroei zou sterk afhankelijk zijn van de bacterie die de gastheergenen zou kunnen activeren. Dit werd gesuggereerd vanuit fysiologisch onderzoek waarbij hoge concentraties mRNA werden waargenomen in de nodule in het vroege ontwikkelingsstadium (Lersten & Horner, 1967; Miller, 1990). Deze hypothese werd minder plausibel nadat er geen bekende substraten of genen met deze functie gevonden werden bij het onderzoeken van het genoom of proteoom van Candidatus *B. kirkii* (Carlier & Eberl, 2012; Carlier *et al.*, 2013).

Vanuit morfologisch en fylogenetisch onderzoek werd verticale transmissie gesuggereerd (Miller, 1990; Lemaire *et al.*, 2011c, 2012a). Voor het ontwikkelen van de bloem worden, net zoals bij bladeren, twee steunbladeren of bracteeën gevormd die een gesloten kamer vormen die mucus met bacteriën bevat (**Figuur 5 a**). Bij het differentiëren van de kelk worden borstelachtige colleters gevormd die essentieel zouden zijn bij het transport van bacteriën in de ontwikkelende bloem. Na de kelk worden ook de meeldraden en carpellen gevormd. Bij het sluiten van de carpellen zou ook een kleine hoeveelheid mucus ingesloten worden. Er is echter geen bewijs voor de aanwezigheid van mucus in de ovule (Miller, 1990). Mogelijke hypothesen zijn dat de pollenbuis bij de doortocht naar de ovule geïnfecteerd wordt door bacteriën (von Faber, 1912), dat het embryo, net zoals bij *Ardisia*, apomictisch gevormd wordt en geïnfecteerd wordt door een mucusstroom van de secreterende placenta (Miller, 1990). Miller suggereert daarnaast ook dat de bacteriën aanwezig zouden zijn in de embryonale holte, meer bepaald in een kleine kamer aan de basis van de cotylen, ter hoogte van het epicotyl zodat het apicale meristeem bij kieming wordt geïnfecteerd (Miller, 1990) (**Figuur 5 b**). Om de levenscyclus te vervolledigen moet verticale transmissie aangetoond worden en werd de vrucht van *Psychotria kirkii* morfologisch onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën (Miller, 1990). Deze vrucht is een bijna ronde steenvrucht van ongeveer 10 mm doorsnede en deze bevat één of twee halfbolvormige pyrenes met een bolvormige dorsale zijde en een afgeplatte ventrale zijde van 4-5 mm in doorsnede en 3-4 mm dik. Het embryo is 2-2,5 mm en is in de lengte gelegen van het zaad, ongeveer in de dorsale periferie van de T-vormige intrusie aan de ventrale kant van het zaad (Piesschaert *et al.*, 2001). Het is gelegen in een kleine embryonale holte en gescheiden van het hoornige endosperm door mucus. Verschillende embryonale holtes zijn al onderzocht op bacteriële aanwezigheid, maar deze zijn nooit gevonden. De bacteriën zouden mogelijk in andere delen van het zaad aanwezig kunnen zijn zoals in de T-vormige intrusie aan de ventrale kant van het zaad (Miller, 1990) (**Figuur 5 c**).



Figuur 5: Schematische voorstelling van verticale transmissie bij *Psychotria kirkii*. Het apicale meristeem wordt omgeven door twee stipulen (S), die aan de adaxiale zijde trichomen (T) bevatten die mucus produceren. De endofyten (Ba) bevinden zich in deze mucus. Op het apicale meristeem kunnen zich bladeren (L) of bloemprimordia (F) ontwikkelen. De laatste wordt beschermd door bracteeën (BR), met trichomen aan de adaxiale zijde (a).

Schematische voorstelling van het embryo bestaande uit de wortel (R), hypocotyl (H) en cotylen (C). Er wordt gesuggereerd dat de endofyten (Ba) zich in de bladknop van de eerste echte bladeren bevinden, deel van de epicotyl (Epi) (b).

Schematische voorstelling van een longitudinale sectie door een steenvrucht van *Psychotria* waarin twee halfbolvormige pyrenes zich bevinden. De steenvrucht bestaat uit verschillende lagen namelijk exocarp (Exc), mesocarp (Mc), endocarp (Enc). De pyrene bestaat uit endocarp (Enc), testa (Te) en endosperm (End). Aan de ventrale zijde van het zaad is er longitudinale fissuur (LF) waarboven de embryonale holte (Ec) gelegen is. Deze holte, gelegen in het endosperm (End), is gevuld met mucus en herbergt het embryo (E) (c). Schematische voorstelling van een transverse sectie door de pyrene. De bacteriën zouden zich bevinden in de embryonale holte (Ec) (d). (naar Miller, 1990).

1.3 BACTERIEVRIJE PLANTEN

Bacterievrije *Psychotria* planten werden tweemaal eerder beschreven in de literatuur. In een eerste onderzoek werden schijnbaar bacterievrije planten verkregen door nodulerende *Psychotria* soorten op te groeien bij een verhoogde temperatuur (28 °C) en lage luchtvochtigheid (58 %) (Van Oevelen *et al.*, 2003). Bacterievrije planten werden geïnduceerd als gevolg van de dehydratatie van de bacterie-houdende mucus in het apicale meristeem. Dehydratatie van deze mucus inhibeerde de groei van de bacteriën en verhinderde de inoculatie van de bladeren. De bacterievrije status was echter omkeerbaar aangezien de nodules opnieuw verschenen en de bladeren opnieuw normaal groeiden vanuit dormante knoppen nadat de planten opnieuw onder optimale groeiomstandigheden geplaatst werden (21 °C en

een luchtvochtigheid van 70-90 %). Doordat horizontale transmissie uitgesloten was, werd er geconcludeerd dat steeds een kleine hoeveelheid bacteriën aanwezig is in dormante knoppen (Van Oevelen *et al.*, 2003). Dit onderzoek geeft dus geen sluitend bewijs voor het verkrijgen van bacterievrije planten.

In een tweede onderzoek werden een aantal bacterievrije planten verkregen door honderd zaden van *P. kirkii* te laten kiemen. Dit suggereert dat de endofyten niet altijd in het zaad terecht komen en dat de verticale transmissie soms niet effectief verloopt (Lemaire *et al.*, 2012a). Deze van nature bacterievrije planten groeien normaal tot het vierde paar bladeren, waarna de groei stopt en het apicaal meristeem degenereert naar callus. In tegenstelling tot de experimentele bacterievrije planten (Van Oevelen *et al.*, 2003), sterven deze dwergplantjes af na deze statische conditie (Lemaire *et al.*, 2012a). Deze kiemingsmethode zorgt ervoor dat er slechts een klein percentage van de planten bacterievrij is. Beide methodes zijn niet sluitend en werden niet zorgvuldig getest. Een betrouwbare methode voor het ontwikkelen van bacterievrije planten bestaat dus nog niet en vormt een probleem bij het verder onderzoek naar de voordelen en de obligatoire aard van de interactie.

1.3.1 IN VITRO ZAADCULTUUR

In vitro cultuur wordt gedefinieerd als het opgroeien en ontwikkelen van planten, zaden, embryo's, weefsels, cellen en protoplasten van hogere planten of andere organismen op nutriëntenmedia onder steriele condities (Pierik, 1997). Dit gebeurt steriel om mogelijke infecties met micro-organismen (insecten, nematoden) of pestsoorten (insecten, nematoden) te vermijden (Pierik, 1997). De verschillende inoculatie-experimenten van *Burkholderia* werden voornamelijk uitgevoerd met behulp van in vitro technieken om zo het effect van mogelijke infecties van andere micro-organismen te minimaliseren (zie 1.2.2) (Govindarajan *et al.*, 2008; Vidal-Quist *et al.*, 2014). In dit onderzoek wordt een methode gezocht om 'echte' bacterievrije planten te kweken. Doordat de exacte voordelen van de interactie niet gekend zijn, is deze methode een belangrijk hulpmiddel om de planten op te groeien in een gecontroleerde en steriele omgeving, waar de effecten van potentiële parasieten of herbivoren geminimaliseerd worden.

1.3.2 EMBRYO RESCUE

Embryocultuur is een speciale techniek van in vitro cultuur en is een brede term die slaat op het onderzoek naar de methode en de applicaties ervan (Sharma *et al.*, 1996). Embryo rescue is een vorm van embryocultuur waarbij de techniek essentieel is voor de soort om te overleven (Sharma *et al.*, 1996). Het embryo wordt hierbij in steriele omstandigheden uit het

zaad verwijderd en wordt op een nutriëntenrijk medium geplaatst (Pierik, 1997). Om de kans op kieming te vergroten is het belangrijk om het embryo te voorzien van nutriënten, zuurstof, en de juiste licht- en temperatuurcondities omdat het embryo niet over reserves of bescherming beschikt (Pierik, 1997). Het succes van de methode hangt daarnaast af van het levensstadium waarin het embryo zich bevindt. Hoe minder ontwikkeld het embryo is, hoe moeilijker de cultivatie en hoe complexer het groeimedium moet zijn om het embryo te laten opgroeien (Sharma *et al.*, 1996; Pierik, 1997).

Embryocultuur wordt gebruikt voor verschillende doeleinden zoals het doorbreken van zaaddormantie (Bridgen, 1994). Een andere toepassing van embryocultuur is het opgroeien van epifyten in afwezigheid van de gastheer (Pierik, 1997). In de sierteelt wordt deze methode bijvoorbeeld gebruikt om orchideeënzaden op te kweken zonder gebruik te maken van mycorrhizale fungi (Sarasan, 2010). Embryocultuur wordt eveneens gebruikt om de kweekcyclus te verkorten. De zaadhuid kan namelijk de opname van zuurstof en/of water belemmeren en zo de kieming van het zaad vertragen. Door het embryo te verwijderen uit het zaad kan deze belemmering vermeden worden en zal de plant sneller kiemen (Pierik, 1997). Embryocultuur kan ook gebruikt worden voor de bewaring van recalcitrante zaden. In tegenstelling tot soorten met orthodoxe zaden zijn soorten met recalcitrante zaden of soorten zonder zaad moeilijk te bewaren (Sarasan, 2010). Deze techniek werd reeds toegepast binnen Rubiaceae meer bepaald op zaden van *Coffea arabica*. De zaden zijn bestand tegen relatieve uitdroging en relatief lage temperaturen. Met behulp van embryo rescue kan cryopreservatie toegepast worden om de zaden te bewaren (Colonna, 1972; Bertrand-Desbrunais & Charrier, 1989; Dussert *et al.*, 2001).

Bij bepaalde soorten kan embryo rescue gebruikt worden om kiemplanten te ontwikkelen en de populatie te laten groeien indien er geen kiemkrachtige zaden meer gevormd worden (Sarasan, 2010). Een voorbeeld hiervan zijn de gecultiveerde bananensoorten. *Musa* is één van de weinige gewassen waarbij al de gecultiveerde variëteiten een gevolg zijn van menselijke selectie (Uma *et al.*, 2011). Niet alleen bij natuurlijke soorten kan embryo rescue nuttig zijn, ook bij hybriden omdat er vaak sterfte optreedt in de laatste of middelste stadia van de embryogenese door verhongering van het embryo of afsterven van de ontwikkelende vrucht (Stewart, 1981).

Doordat de mogelijkheid bestaat dat er bacteriën aanwezig zijn in het zaad en mogelijk niet in het embryo (Miller, 1990), is het gebruik van embryo rescue essentieel om mogelijke infectie vanuit de pyrene te voorkomen. Omwille van de steriele behandeling en steriele opgroei van de kiemplanten, is het mogelijk om de effecten van de afwezigheid van bacteriën op het

plantfenotype te onderzoeken en weinig rekening te moeten houden met andere omgevingsfactoren.

1.4 DOELSTELLINGEN

In dit onderzoek wordt het ontstaan van de nodulerende bladendosymbiose bij *Psychotria* verder onderzocht en wordt er op drie verschillende aspecten van de interactie gefocust.

- 1 **Ontwikkelen van een betrouwbare methode om bacterievrije planten op te kweken en te cultiveren.** Voorgaand onderzoek suggereert dat de endosymbionten aanwezig zijn in de pyrene, maar hoogst waarschijnlijk niet in of rond het embryo (Miller, 1990). Hier willen we nagaan of embryo rescue en in vitro zaadcultuur betrouwbare methodes zijn om bacterievrije planten te verkrijgen.
- 2 **Testen van de aanwezigheid van verticale transmissie.** Door steriele zaden en embryo's op te kweken wordt onderzocht of er verticale transmissie optreedt in deze endosymbiose, en waar de bacteriën zich bevinden, meer bepaald op het zaad, in het zaad of in het embryo. Dit willen we achterhalen met behulp van embryo rescue, in vitro zaadcultuur en kieming op aarde.
- 3 **Vergelijken van de morfologie van het bacterievrije fenotype met het normale fenotype van de plant.** Na het verkrijgen van bacterievrije planten zullen de fenotypes van de bacterievrije planten beschreven worden en vergeleken worden met het normale fenotype van de plant.

2 MATERIAAL & METHODE

2.1 MATERIAAL

Bladeren en vruchten van drie nodulerende plantensoorten, *Psychotria kirkii*, *P. punctata* en *P. umbellata* en één *Burkholderia*-vrije soort, *P. nervosa*, werden ingezameld in de levende collectie van de Plantentuin Meise (**Tabel 1**). De bladeren werden onmiddellijk bewaard op silica om denaturatie van DNA tegen te gaan. De ingezamelde bladeren werden later gebruikt als positieve controle bij de moleculaire analyse voor de aanwezigheid van endofyten. De vruchten werden ontdaan van het vruchtweefsel om mogelijke externe contaminatie te vermijden. Vervolgens werden de pyrenes gedurende 24 u op silicagel geplaatst om te drogen. De gedroogde pyrenes werden bewaard op een droge, koele plaats in afwezigheid van licht en werden later gebruikt in het kiemingsexperiment.

Tabel 1: De ingezamelde soorten en hun accessie-nummers

Soort	Accessie-nummer
<i>Psychotria kirkii</i> Hiern	BR-1995127322
<i>Psychotria kirkii</i> Hiern	BR-2001051392
<i>Psychotria kirkii</i> Hiern	BR-1998182519
<i>Psychotria kirkii</i> Hiern	BR-19536779
<i>Psychotria nervosa</i> Sw.	BR-2007032959
<i>Psychotria punctata</i> Vatke	BR-2002152647
<i>Psychotria umbellata</i> Thonn.	BR-19620512
<i>Psychotria umbellata</i> Thonn.	BR-2009044600

2.2 EXPERIMENTELE OPZET

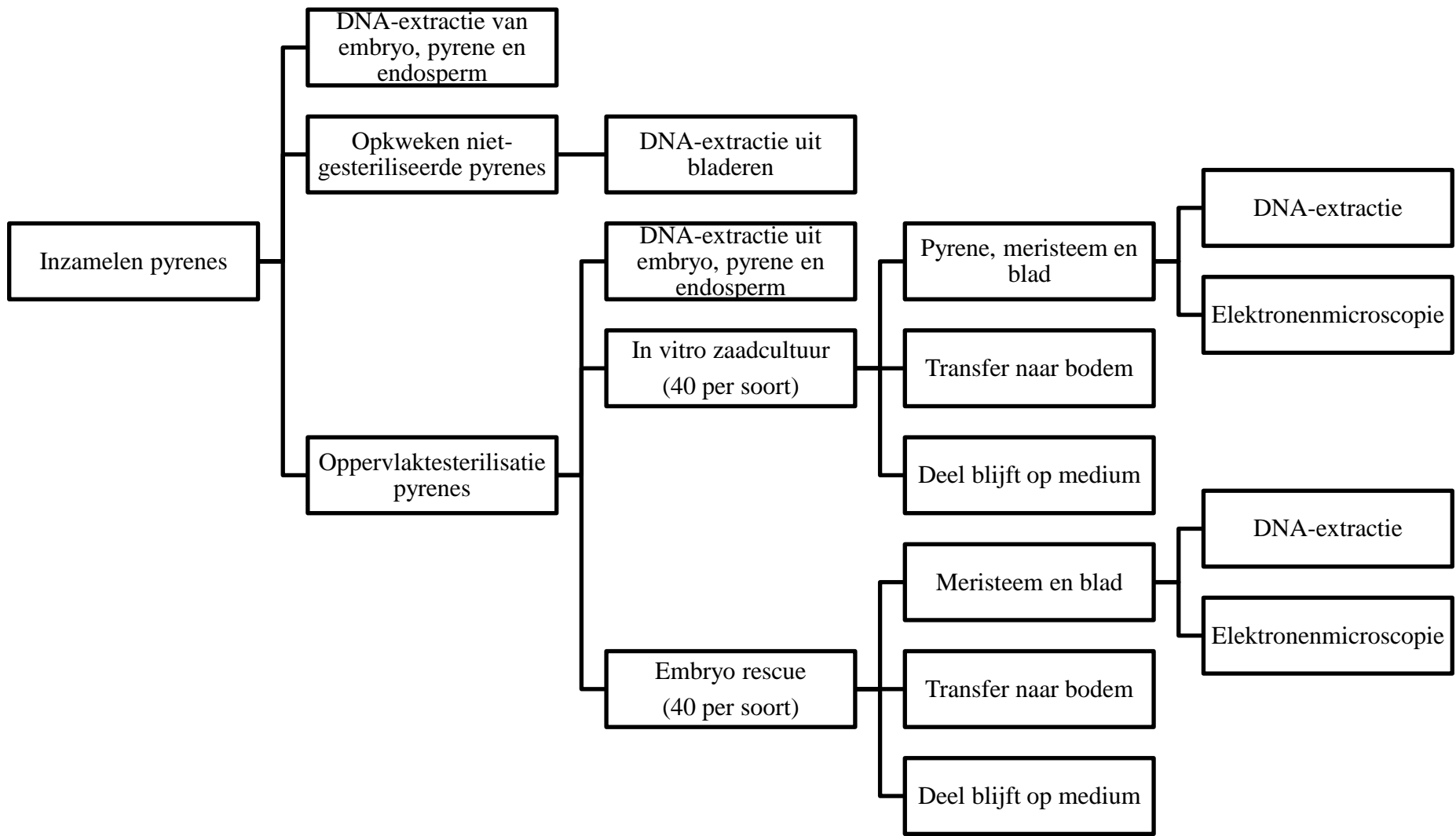
De ingezamelde pyrenes werden gebruikt voor verschillende doeleinden (**Figuur 6**). Vijftien pyrenes werden gebruikt om DNA te extraheren en een tiental pyrenes werd opgekweekt op gesteriliseerde aarde zonder oppervlaktesterilisatie als controle. Het merendeel van de pyrenes (120) werd echter gesteriliseerd. Vijftien pyrenes werden eveneens gebruikt om DNA te extraheren. Deze DNA-isolaties werden vergeleken met het DNA geïsoleerd uit de niet-gesteriliseerde pyrenes om een mogelijk effect na te gaan van de oppervlaktesterilisatie en om de verticale transmissie te testen. De overige pyrenes werden gebruikt voor de beide

opkweekmethodes, in vitro zaadcultuur en embryo rescue. Per methode en per soort werden steeds veertig zaden/embryo's opgekweekt op groeimedium in afgesloten glazen proefbuizen, behalve voor de *Burkholderia*-vrije *P. nervosa*. Deze laatste soort diende als negatieve controle. Er werden in totaal zeven pyrenes (bij in vitro zaadcultuur) en acht embryo's (bij embryo rescue) opgekweekt. Wanneer de kiemplantjes vijf maanden oud waren, werden bladeren, bladknoppen en de resten van de pyrene ingezameld en via moleculaire en morfologische technieken werd nagegaan of bacteriële endofyten aanwezig waren. Na acht maanden werden de planten overgezet naar een steriele bodem.

2.3 OPKWEKMETHODEN

2.3.1 NIET-GESTERILISEERDE OPKWEK (CONTROLE)

Na het verdelen van de zaden over de verschillende kiemingsopstellingen werden de resterende zaden op water bewaard om kieming te induceren (vijf individuen van *P. kirkii* en negentien zaden van *P. umbellata*). Elk zaad werd na kieming overgezet in een pot (EX 7x7x8, IPP, Bytom, Polen) met een steriel bodemmengsel, meer bepaald een geautoclaveerd mengsel van 100 ml perliet, 100 ml rijnzand en 100 ml water en enkele korrels meststof (Osmocote 14-13-13, Everris International BV, 6422 PD Heerlen, Nederland). De potten werden per twintig in een met 70 % ethanol gesteriliseerde kweekbak (Mini-kamerkas H, ACD nv, 8800 Roeselare, België) geplaatst, waarna de kweekbakken afgesloten werden met plakband om een steriele omgeving te creëren. Een bijkomend voordeel van het afsluiten van de kweekbakken is dat de vochtigheidsgraad stabiel bleef. Deze opstelling diende als negatieve controle van de sterilisatie en om planten op te kweken met nodules om deze te kunnen vergelijken met de gesteriliseerde kiemplanten.



Figuur 6: Experimentele opzet.

2.3.2 STERILISATIE

De oppervlaktes van de pyrenes, die gebruikt werden in de kiemingsmethoden in vitro zaadcultuur en embryo rescue, werden gesteriliseerd om externe contaminatie van epifytische bacteriën te vermijden en te bewijzen dat de mogelijk aanwezige endofyten verticaal worden doorgegeven via het zaad. De sterilisatie bestond uit twee stappen namelijk drie minuten behandelen met 96 % ethanol en daarna twintig minuten met 1,6 % natriumhypochlorietoplossing waarin enkele druppels zeep waren toegevoegd.

De toegevoegde zeep is nodig om de oppervlaktespanning van water te verminderen en de oppervlaktesterilisatie grondiger uit te voeren. Daarna werden de zaden nog drie maal gespoeld met gesteriliseerd water om de sterilisatievloeistoffen van het zaad te halen.

2.3.3 AANMAAK GROEIMEDIUM

In beide opkweekmethodes, in vitro zaadcultuur en embryo rescue, werd gebruik gemaakt van ½ Murashige and Skoog groeimedium om de pyrenes en de embryo's op te laten groeien (Murashige & Skoog, 1962). Het medium werd aangemaakt door 2,166 g/l MS mod 1A, 0,103 g/l MS vitamine mix, 20 g/l sucrose en 3,0 g/l gelrite aan 1 l water toe te voegen. Het mengsel werd kort aan de kook gebracht om alle stoffen op te lossen en daarna werd het afgekoeld tot 65 °C. De pH van het mengsel werd bijgesteld naar 6,3 met behulp van chloorzuur en natriumhydroxide. Elke glazen proefbuis werd gevuld met 15 à 20 ml groeimedium en werd onmiddellijk afgesloten met een dop. Alle proefbuizen werden geautoclaveerd om het groeimedium te steriliseren en zodoende schimmelinfecties of ongewenste bacteriën te vermijden. Na het autoclaveren zakte de pH naar 5,8 door waterverlies, maar dit is een optimale pH om het groeimedium te verharden.

Om de twee maanden werden de kiemplanten overgeplaatst naar vers groeimedium om de concentraties aan mineralen en andere voedingsstoffen op peil te houden. Bij de eerste en de tweede transfer werd 2 mg/l 6-benzyladenine (cytokinine) aan het groeimedium toegevoegd om de ontwikkeling van scheuten en bladeren te bevorderen. Bij de derde en laatste transfer werden er drie variaties aan media gemaakt: een groeimedium zonder hormonen, een groeimedium met 2 mg/l Indool-3-azijnzuur (auxine) en een groeimedium met 0,5 g/l actieve kool. Deze laatste twee groeimedia werden gebruikt om de wortelgroei te stimuleren bij de kiemplanten om zo de transfer naar bodem mogelijk te maken.

2.3.4 IN VITRO ZAADCULTUUR

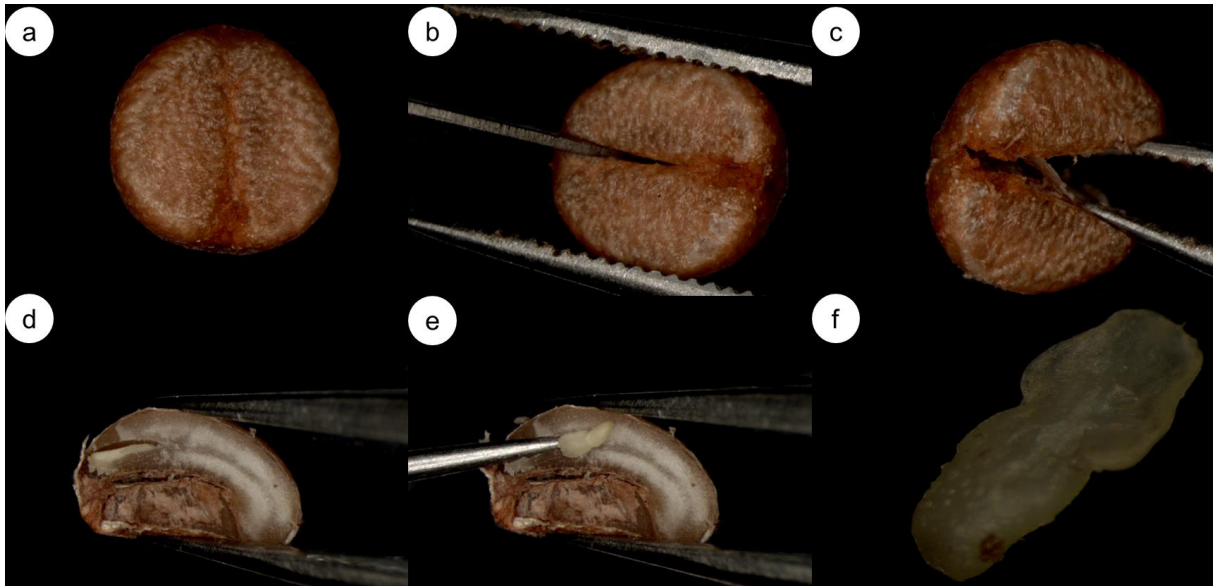
Bij in vitro zaadcultuur werd de kans op mogelijke contaminatie geminimaliseerd door in de laminaire luchtstroomkast te werken, de gebruikte pincetten met behulp van een glass bead sterilizer te steriliseren en steeds de bovenzijde van de proefbuis met behulp van een vlam te steriliseren. Na het afvlammen van de proefbuis, werd één enkele pyrene per proefbuis centraal bovenop het nutriëntrijke MS medium geplaatst met behulp van een pincet en werd de proefbuis afgesloten met een dop (**Figuur 7**).



Figuur 7: Proefbuis opstelling in vitro zaadcultuur.

2.3.5 EMBRYO RESCUE

Net zoals bij de voorgaande methode, werd externe contaminatie vermeden door de embryo rescue methode uit te voeren in de laminaire luchtstroomkast, de stereomicroscop te steriliseren met 75 % ethanol en alle gebruikte instrumenten zoals scalpel, naalden en pincetten te steriliseren met een glass bead sterilizer. Elke handeling werd uitgevoerd op geautoclaveerd papier om steeds op een steriel oppervlak te kunnen werken en horizontale overdracht van contaminanten te voorkomen. Het embryo werd uit de pyrene verwijderd door eerst de ventrale zijde van de pyrene opwaarts te richten met behulp van een pincet (**Figuur 8 a**). Daarna werd in het midden van de pyrene een incisie gemaakt langs de longitudinale as weg van de micropyle om het embryo te beschermen (**Figuur 8 b**). Met behulp van een scalpel of pincetten werd de pyrene verder opengebrouwen en kwam het embryo vrij te liggen (**Figuren 8 c, d**). Het embryo werd uit de pyrene geïsoleerd met behulp van een scalpel of naald (**Figuren 8 e, f**). Vooraleer het embryo in een proefbuis werd gebracht, werd de bovenzijde van elke proefbuis afgevlamd om mogelijke contaminatie te vermijden. Telkens werd één embryo centraal bovenop het groeimedium geplaatst per proefbuis. Daarna werd de proefbuis afgesloten met een dop om de plant af te scheiden en een optimaal milieu te creëren voor de kiemplant.



Figuur 8: Embryo rescue bij *Psychotria punctata*. Het halfronde zaad met de micropyle naar beneden gericht (a), eerste incisie langs de longitudinale as startend in het midden wegsnijdend van de funiculus (b). Open wrikken van het zaad met behulp van een pincet (c). Het embryo is zichtbaar (d). Isolatie van het embryo met behulp van een naald (e). Het geïsoleerde embryo (f).

2.3.6 OPKWEKEN VAN GEKIEMDE PYRENES EN EMBRYO'S

De pyrenes en embryo's werden twee weken in het donker geplaatst om te snelle kieming te vermijden (Sharma *et al.*, 1996), daarna werden de pyrenes en gekiemde embryo's van beide methodes opgegroeid in een kweekkamer waarbij de temperatuur constant gehouden werd op 27 °C en de dag/nachtlengte gereguleerd werd, namelijk 16 u licht en 8 u donker. Tijdens het opgroeien werden de planten nauwkeurig opgevolgd en werd het fenotype van de planten gemiddeld één keer per week opgevolgd door middel van observaties. Om de twee maanden werden de planten overgebracht naar vers groeimedium om ze van nieuwe nutriënten te voorzien. Bij de eerste overzet werden de wortels verwijderd van de kiemplanten om de transfer naar nieuw medium en de opname van nutriënten in vitro efficiënt te laten verlopen (Barry-Etienne *et al.*, 2002). Na zes maanden op groeimedium, werd een derde van de kiemplanten overgezet op auxine-bevattend medium en een derde op actieve kool bevattend medium gedurende een maand om wortelgroei te induceren. Daarna werden de kiemplanten overgezet naar potten met steriele bodem en opgekweekt in een kweekbak zoals beschreven in 2.1.3.1.

2.4 MOLECULAIR ONDERZOEK

2.4.1 DNA-ISOLATIE

DNA werd geëxtraheerd uit gesteriliseerd en niet-gesteriliseerd endosperm, endocarp, testa en uit embryo's. Door zowel niet-gesteriliseerde als gesteriliseerde monsters te gebruiken, kan het effect van de sterilisatie onderzocht worden. Na vijf maanden werden verschillende stalen verzameld van alle overlevende kiemplanten: afhankelijk van de grootte van de kiemplanten werden bladeren, bladprimordia en overgebleven resten van de pyrenes (waaruit de kiemplanten gegroeid zijn) verzameld om de aanwezigheid van bacteriën te testen. Alle stalen werden ingezameld op vloeibare stikstof en bewaard bij een temperatuur van $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vooraleer DNA geïsoleerd werd, werden de weefsels mechanisch gebroken met behulp van stalen kogels in een weefselhomogenisator. Om de weefsels zo broos mogelijk te houden, werden de stalen afwisselend in vloeibaar stikstof gedompeld en daarna gehomogeniseerd.

Na homogenisatie werd 2 % polyvinylpyrrolidone-40 oplossing (PVP-40) toegevoegd en werd het mengsel 1 u op $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ geplaatst met behulp van de thermomixer comfort (Eppendorf nv, Hamburg, Duitsland) om zoveel mogelijk DNA te extraheren uit het weefsel en zoveel mogelijk polyfenolen te absorberen. Na vijf minuten te centrifugeren aan 13 000 tpm (toeren per minuut), werd het vrijgekomen DNA gescheiden van andere celcomponenten met behulp van SEVAG (24:1 chloroform/isoamylalcohol). Na het mengsel twintig minuten te schudden op de schudtafel (VWR standard analog shaker, VWR International, Radnor, USA), werd het mengsel twintig minuten gecentrifugeerd aan 11 000 tpm. Na centrifugatie ontstonden er twee vloeistoffasen in het mengsel, namelijk de polaire, waterige fase waarin DNA zich bevindt en een apolaire, organische fase waarin de overige resten van de cel zich in bevinden. Vervolgens werd de waterige fase of supernatans afgepipetteerd om het DNA te scheiden van organische resten en deze verder op te kunnen zuiveren. Indien de waterige fase nog apolaire celcomponenten bevatte, werd SEVAG een tweede keer toegevoegd. Na de scheiding werd het DNA opgeconcentreerd en opgezuiverd met behulp van isopropanolprecipitatie. Hierbij werden koude isopropanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) en natriumacetaat toegevoegd aan het mengsel. Natriumacetaat zorgt voor positieve ionen, terwijl isopropanol de ladingen en stabiele ionenbindingen tussen de positieve ionen en de fosfaatketen van DNA versterkt om het DNA neer te slaan. De concentratie van natriumacetaat is zeer belangrijk voor de verdere opzuivering van DNA. Indien er te weinig positieve ionen aanwezig zijn in de oplossing, kan een deel van DNA wegspoelen tijdens de precipitatie, te veel positieve ionen kunnen zorgen voor een neerslag van zouten naast de neerslag van DNA. Vervolgens werd het mengsel minimaal 12 u geïncubeerd bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na tien minuten te centrifugeren aan 10 000 tpm, werd het supernatans verwijderd en werden de aanwezige zouten verwijderd door de pellet enkele

keren te wassen met 70 % ethanol. Daarna werd de pellet opgelost in 50 µl gezuiverd water (Milli-Q). De DNA-samples werden bewaard bij -20 °C.

2.4.2 PCR

Met behulp van PCR werd specifiek gezocht naar drie DNA-sequenties. Allereerst werd het gen *actine* vermeerderd om te controleren of er genetisch materiaal van de planten aanwezig was en dus de DNA-isolatie succesvol was en daarna werden er twee DNA-regio's specifiek voor Burkholderiales bacteriën geamplificeerd, meer bepaald ribosomaal 16S rDNA en nucleair *recA* (**Tabel S1**). PCR bestaat uit verschillende cycli van opwarming en afkoeling om DNA te dupliceren en miljoenen kopieën te verkrijgen van de gewenste DNA-sequenties. Deze cycli starten met de denaturatiefase waarin het dimeer opsplijst in twee monomeren bij een temperatuur van 92 °C. Daarna daalt de temperatuur om de specifieke primers (RV-actine en FW-actine, 16SB en 16S2, en *recA*-F en *recA*-R) te laten binden aan het DNA-monomeer. Dit wordt de hybridisatiefase genoemd. Elke primer heeft zijn eigen specifieke temperatuur om te hybridiseren met de DNA-monomeren. Voor *actine* is dit 55 °C, voor 16S rDNA is dit 62 °C en voor *recA* is dit 58 °C. Daarna stijgt de temperatuur tot 72 °C, de optimale temperatuur voor het Taq-polymerase om het DNA te dupliceren. De polymerase bindt aan de primer en zal met behulp van dNTP's voor de vorming van een DNA dimeer zorgen. Dit wordt de extensiefase genoemd. Dit proces wordt minstens 30x herhaald (**Tabel S2**). De PCR werd uitgevoerd in een GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

2.4.3 GELELECTROFORESE

Na de PCR werden de resultaten gecontroleerd met behulp van gelelectroforese. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een 1 % agarose gel waarbij 0,01 % ethidiumbromide wordt toegevoegd. Deze stof maakt visualisatie mogelijk doordat deze interageert met dubbelstrengig DNA en zorgt voor de fluorescentie van DNA bij ultraviolet licht. Na het laden van de gel met 4 µl staal en 4 µl van een '1 kb range ladder', werd over de gel voor achttien minuten een potentiaalverschil aangelegd van 120 V. Vervolgens werden alle resultaten gevisualiseerd onder UV-licht.

2.4.4 HET OPZUIVEREN VAN DE PCR-MENGSELS

Vooraleer de DNA-isolaties die positief testten naar Macrogen (Macrogen Europe, Nederland) opgestuurd werden voor sequencing, werden de PCR sequenties opgezuiverd. Hiervoor werd gebruik gemaakt van twee hydrolytische enzymen, namelijk Exonuclease I

(EXO) en Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). EXO verwijdert enkelstrengig DNA, terwijl SAP de 5' fosfaatgroep van de amplicons afknipt waardoor zelfligatie van de DNA strengen verhinderd wordt.

2.4.5 BLASTEN VAN SEQUENTIES

Alle sequenties werden daarna geblast om zo verbanden te vinden met de reeds gekende soorten. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de nucleotide database van GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5 MORFOLOGISCH ONDERZOEK

2.5.1 OBSERVATIE

Gedurende de eerste drie maanden van dit onderzoek werden de kiemplanten elke week zorgvuldig gecontroleerd op de aanwezigheid van bacteriële bladnodules. Na drie en zes maanden werden enkel kenmerken genoteerd van de verschillende planten, zoals de lengte van de stengel, de aanwezigheid van wondweefsel of callus en de aanwezigheid van nodules.

2.5.2 RASTERELEKTRONENMICROSCOPIE (REM)

Bladeren, pyrenes, embryo's en meristemen werden geobserveerd met behulp van een rasterelektronenmicroscop met als doel het observeren van de aan- of afwezigheid van endofytische bacteriën. Alle stalen werden onmiddellijk na het inzamelen gefixeerd met 70 % ethanol. 24 u later werden ze overgebracht in roestvrij stalen kokertjes en gedurende vijf minuten ondergedompeld in een 1:1 mengsel van 70 % ethanol en dimethoxymethaan (DMM). In een volgende stap werden ze gedurende twintig minuten ondergedompeld in 100 % DMM. Deze laatste stap ging onmiddellijk vooraf aan het kritisch-puntdrogen in 100 % DMM met behulp van een kritisch-puntdroger (Leica EM CPD030, BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein). Bij het kritisch-puntdrogen werd vloeibare CO₂ toegevoegd aan het materiaal bij een druk van $50 \cdot 10^5$ Pa en een temperatuur van ± 7 °C. Het DMM werd progressief vervangen door vloeibaar CO₂ in tenminste acht opeenvolgende spoelbeurten. Nadien werden de temperatuur en de druk opgedreven tot respectievelijk 43 °C en $110 \cdot 10^5$ Pa tot het CO₂ zijn sublimatiepunt bereikte. Langzaam werd het ontstane gas geëvacueerd tot de druk gelijk was aan de atmosferische druk.

Na het kritisch-puntdrogen werden de stalen geprepareerd en op REM-draagtafeltjes (stubs) bevestigd. Vervolgens werden de stalen met een dun goudlaagje bedekt met behulp van een

sputtertoestel (Sputter Coater, SPI Supplies, West Chester, Pennsylvania, USA). Deze machine vormt een plasma van argonionen door een groot potentiaalverschil te creëren tussen een negatief geladen goudplaat en een positieve draagtafel in vacuüm-omstandigheden. Door het grote potentiaalverschil verlaten elektronen de goudplaat en botsen deze met de argonatomen waardoor positieve ionen gevormd. Deze positieve ionen migreren naar de negatieve elektrode en worden geneutraliseerd, maar door hun inslag maken ze enkele goudatomen vrij. De goudatomen slaan neer en vormen een dun goudlaagje op de stalen. Na het sputteren werden de observaties van het plantenmateriaal uitgevoerd met behulp van een rasterelektronenmicroscop (JSM 6360, Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

2.6 RISICO-ANALYSE

Zie addendum.

3 RESULTATEN

3.1 ONTWIKKELEN VAN BACTERIEVRIJE PLANTEN

Twee maanden na de start van het experiment was 68 % van alle pyrenes gekiemd: bij in vitro zaadcultuur bedroeg het kiemingspercentage 44,8 % en bij embryo rescue 90,6 % (**Tabel 2**). Bij in vitro zaadcultuur werd het hoogste kiemingspercentage waargenomen bij *P. nervosa* (100 %), terwijl bij *P. umbellata* het laagste kiemingspercentage waargenomen werd (12,5 %) (**Tabel 2**). Het kiemingspercentage van *P. punctata* lag eveneens zeer laag doordat het kweekmedium vloeibaar geworden was en de pyrenes ondergedompeld werden. Een deel van de gezonken pyrenes werd vervolgens op nieuw medium geplaatst, terwijl een ander deel, samen met het vloeibare medium, op bactomedium geënt werd om de aanwezigheid van pathogenen na te gaan. Slechts enkele pyrenes bleken besmet te zijn met schimmels en bacteriën; de meesten vertoonden echter geen aanwezigheid van een bacteriële of schimmelinfectie. Bij de embryo rescue methode werd het hoogste kiemingspercentage waargenomen bij de soorten *P. kirkii* (100 %) en *P. nervosa* (100 %) en het laagste kiemingspercentage bij *P. punctata* (80 %) (**Tabel 2**).

Na vijf maanden was 82,9 % van alle kiemplantjes nog in leven, respectievelijk 93,2 % bij in vitro zaadcultuur en 77,6 % bij embryo rescue. De overleving bij in vitro zaadcultuur was 100 % voor *P. kirkii*, *P. nervosa* en *P. umbellata*, terwijl slechts 63,2 % van de *P. punctata* kiemplantjes overleefde. Bij embryo rescue overleefden alle kiemplanten van *P. nervosa*, terwijl *P. umbellata* kiemplanten de laagste overleving hadden (58,3 %) (**Tabel 2**).

Van de kiemplanten werden bladmateriaal en bladprimordia verzameld om moleculaire analyses uit te voeren. Van de 168 DNA-isolaties waren er 151 geslaagd en deze werden gebruikt om na te gaan of bacterieel DNA aanwezig was. Deze stalen testten allemaal negatief op de aanwezigheid van bacterieel 16S rDNA. Drie stalen testten echter positief voor de aanwezigheid van *recA*, meer bepaald bij in vitro zaadcultuur. Twee van de drie stalen waren van *P. umbellata*, meer bepaald resten van een gekiemde pyrene. Monsters van bladeren van dezelfde planten testten allebei negatief voor *recA*. Het derde staal was een monster van cotylen en de resten van de gekiemde pyrene van *P. kirkii*. Deze testte positief, maar een staal van een bladknop en bladeren van dezelfde kiemplant testte negatief voor de aanwezigheid van *recA*. De positieve DNA-samples werden na het sequencen geïdentificeerd als bacteriën behorend tot het genus *Burkholderia*. Apart van de twee kiemingsexperimenten, werden de kiemplanten van niet-gesteriliseerde pyrenes van *P. umbellata* en *P. kirkii* eveneens moleculair geanalyseerd op de aanwezigheid van endofytische bacteriën. Van 24 kiemplanten werden verschillende plantendelen ingezameld en 42 van de 43 stalen testten positief op de aanwezigheid van plantaardig DNA. Bij *P. umbellata* werden er in de bladeren van vijf van

de negentien kiemplanten *Burkholderia*-specifiek *recA* aangetroffen; er werd geen 16S rDNA teruggevonden. Bij *P. kirkii* testten bladeren van twee van de vijftien planten positief voor *recA*.

Tabel 1: Kiemingspercentage na twee maanden en overlevingspercentage na vijf maanden van de soorten *Psychotria kirkii*, *P. nervosa*, *P. punctata* en *P. umbellata* opgekweekt met behulp van in vitro zaadcultuur en embryo rescue. Het percentage “nodules”, chlorosis en callus werd zowel na twee als vijf maanden geanalyseerd.

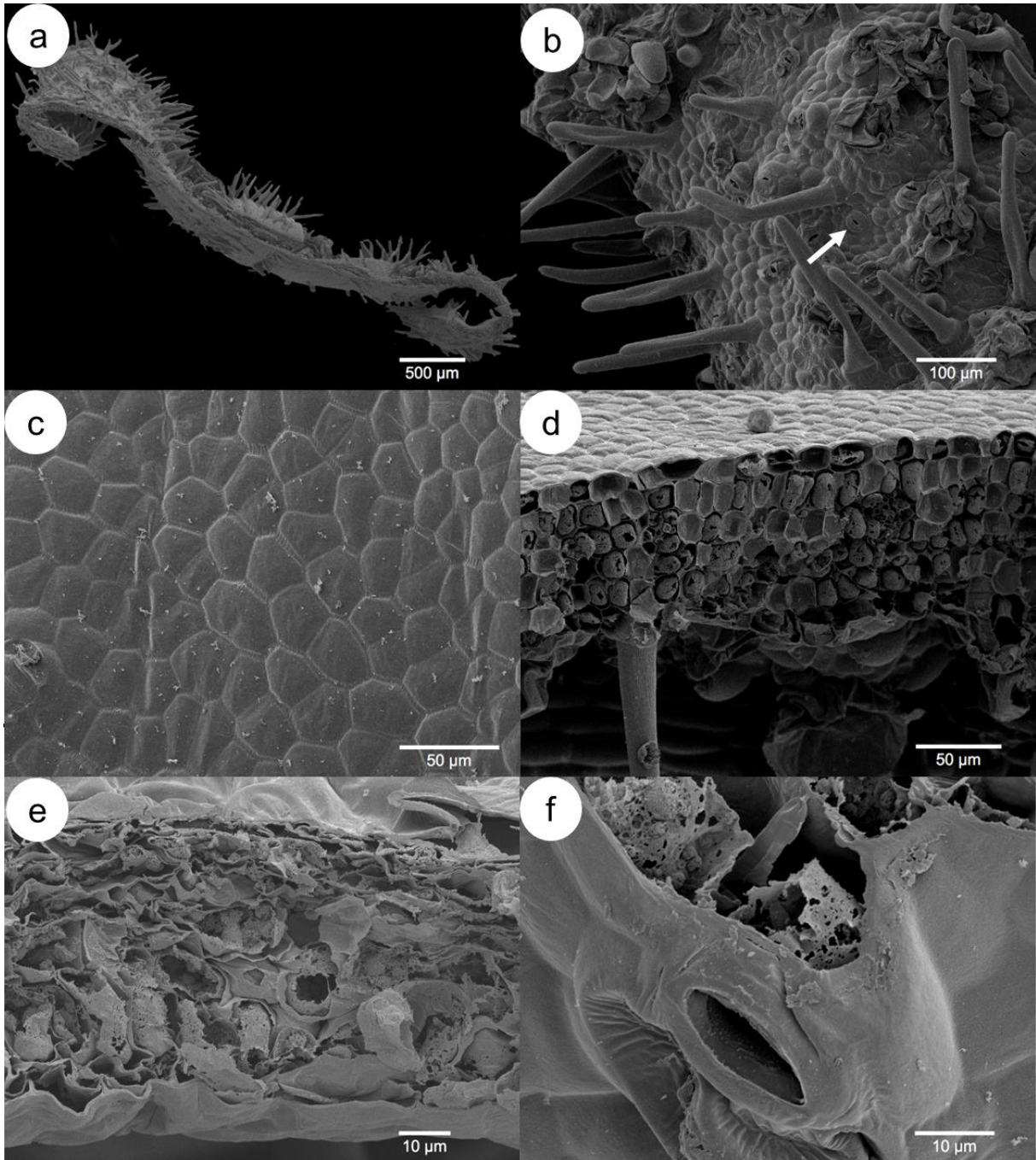
Methode	Soort	% Kieming na 2 maanden	% “nodules” na 2 maanden	% chlorosis na 2 maanden	% callus na 2 maanden	% overleving na 5 maanden	% “nodules” na 5 maanden	% chlorosis na 5 maanden	% callus na 5 maanden
In vitro zaadcultuur	<i>P. kirkii</i>	95,0	0,0	0,0	2,6	100,0	2,6	0	60,0
	<i>P. nervosa</i>	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	40,0
	<i>P. punctata</i>	20,0	0,0	0,0	0,0	63,6	0,0	0,0	0,0
	<i>P. umbellata</i>	12,5	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	Gemiddeld	44,8	0,0	0,0	1,7	93,2	1,8	0,0	45,5
Embryo rescue	<i>P. kirkii</i>	100,0	20,0	2,5	40,0	82,5	6,3	3,1	43,8
	<i>P. nervosa</i>	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	50,0
	<i>P. punctata</i>	80,0	0,0	31,3	12,5	87,5	14,8	39,2	25,9
	<i>P. umbellata</i>	90,0	0,0	0,0	0,0	58,3	0,0	0,0	27,3
	Gemiddeld	90,6	6,9	9,6	17,4	77,6	6,7	13,3	34,8
Gemiddeld		68,0	4,6	6,3	12,1	82,9	4,9	8,3	38,9

Naast de moleculaire studie werden de planten van de twee methodes en de controle ook morfologisch onderzocht.

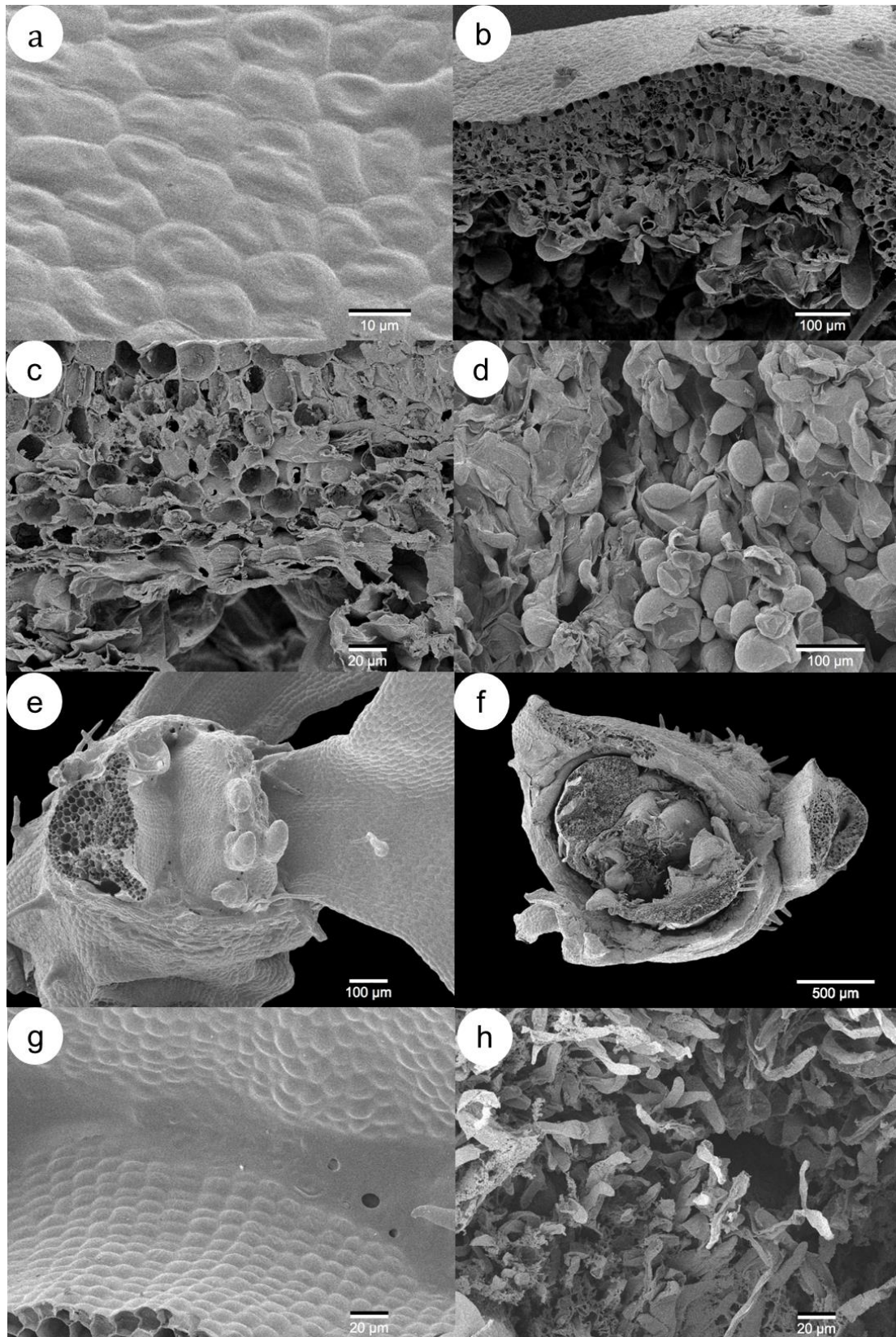
Ten eerste werd de steriliteit van de kiemplanten getest door bladeren en pyrenes te observeren met behulp van REM. Er werden geen bacteriële cellen aangetroffen (**Figuren 9 a-c; 10 a**) Bij embryo rescue werd uitgroei van de abaxiale zijde van het blad waargenomen, maar ook hier werden geen bacteriën gevonden (**Figuur 10 d**).

Ten tweede werden de bladeren van de kiemplanten gescreend op de aanwezigheid van nodules. Op 4,9 % van alle gekiemde planten, of acht kiemplanten, werden donkere vlekken, “nodules” waargenomen op de bladeren, voornamelijk bij kiemplanten verkregen door embryo rescue (6,7 %) (**Figuur 11**). Alle planten testten echter negatief voor de aanwezigheid van bacteriën tijdens de moleculaire analyses, zelfs de bladeren waarop er vlekken werden waargenomen. Bij de controle werd aangetoond dat de bladeren die positief testten, nodules vertoonden terwijl op de bladeren die negatief testten geen nodules aangetroffen werden. De planten met nodules groeiden sneller op en kregen mooie bladeren waarop nodules aanwezig waren. Bij de planten die negatief testten, werden op sommige bladeren nodules waargenomen, maar in een zeer lage densiteit (**Figuur 12**). Daarnaast vertoonden deze planten een gereduceerde groei of vervormde bladeren, en bij sommige planten was het meristeem gereduceerd of was de bladknop vervormd.

Ten derde werden per soort en per methode enkele bladeren, overblijfselen van pyrene en bladprimordia geobserveerd met behulp van REM. In de onderzochte stalen werden geen nodules noch substomatale of parenchymatische holtes met bacteriën gedetecteerd (**Figuren 9 d, e; 10 b, c**). In de bladknop werd er veel mucus teruggevonden, maar ook hier werden geen bacteriën teruggevonden (**Figuren 10e-h**). Daarnaast werden de overblijfselen van de pyrene en de cotylen onderzocht met behulp van REM. Hierbij werden zowel de oppervlakte van de cotylen gescreend op de aanwezigheid van bacteriën als de holtes tussen de testa en het endocarp, en de holtes tussen het endosperm en het embryo. Hier werden verschillende substanties teruggevonden met onregelmatige vormen, voornamelijk cellulaire resten, maar geen bacteriën (**Figuur 13 g, h**).



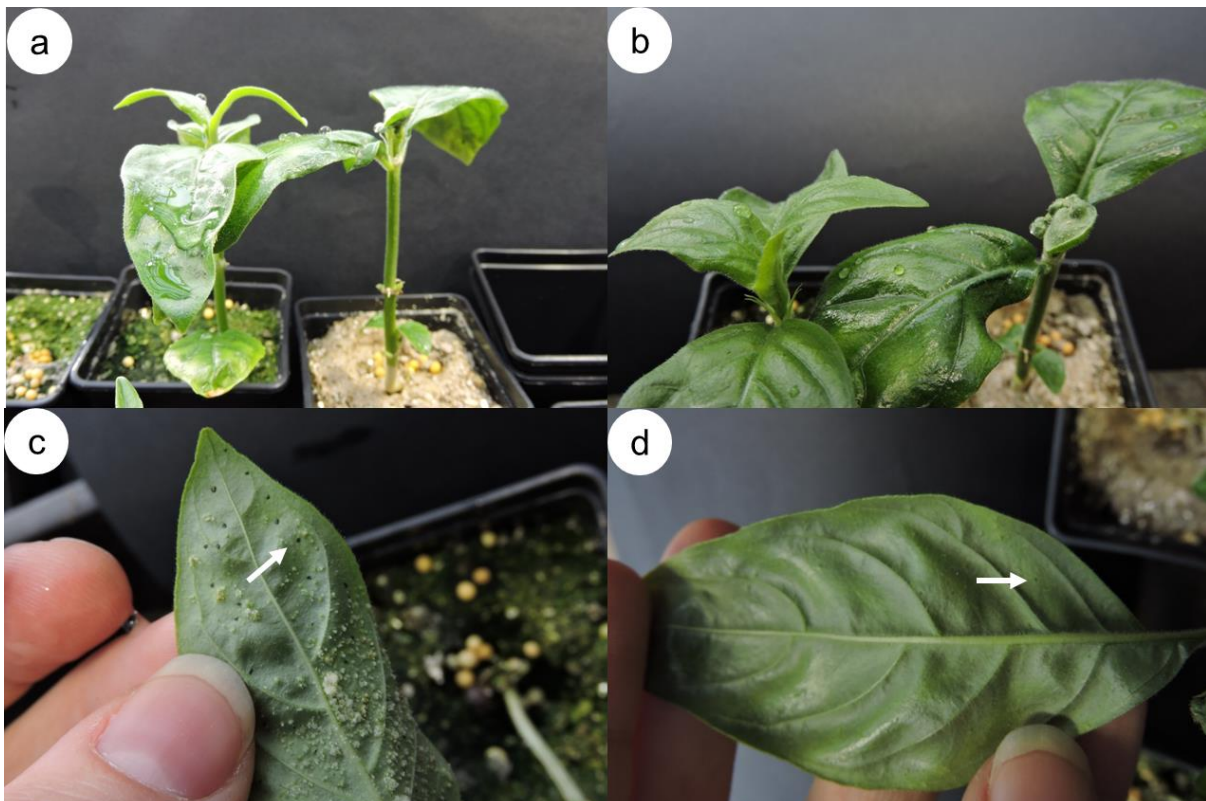
Figuur 9: REM foto's van doorsnedes doorheen een blad van via in vitro zaadcultuur opgekweekte *Psychotria kirkii*. Dwarse doorsnede door het blad van *P. kirkii* (a). De abaxiale kant van het blad is sterk behaard en bevat stomata (pijl) (b). Detail van de adaxiale zijde van het blad om mogelijke contaminatie waar te nemen (c). Detail van de dwarse doorsnede van het blad, er kunnen geen holtes, nodules of endofyten waargenomen worden (d, e). Detail van een stoma, maar er werd geen substomatale holte waargenomen; in deze holtes zou de kans groot zijn om bacteriën terug te vinden (f).



Figuur 10: REM foto's van doorsnedes doorheen de bladeren van via embryo rescue opgekweekte *Psychotria kirkii* (a-d) en van *P. punctata* (e-h). Detail van de adaxiale zijde om mogelijke contaminatie te kunnen waarnemen (a). Dwarse doorsnede doorheen het blad, er zijn geen holtes waar te nemen (b). Detail van de doorsnede waarop er geen bacteriën waar te nemen zijn (c). Detail van abaxiale uitgroei op het blad, ook hier worden geen bacteriën terug gevonden (d). Overzicht van een bladprimordium (e). Overzicht van een meristeem (f). Detail van het primordium, de oksel van de bladeren/stipulen wordt bedekt met mucus (g). Detail van de colleters in het primordium (i). Ook hier werden geen bacteriën waargenomen.



Figuur 11: Embryo rescue bij *Psychotria kirkii*. Detail van blad waarop donkere punten (pijlen) waar te nemen zijn.



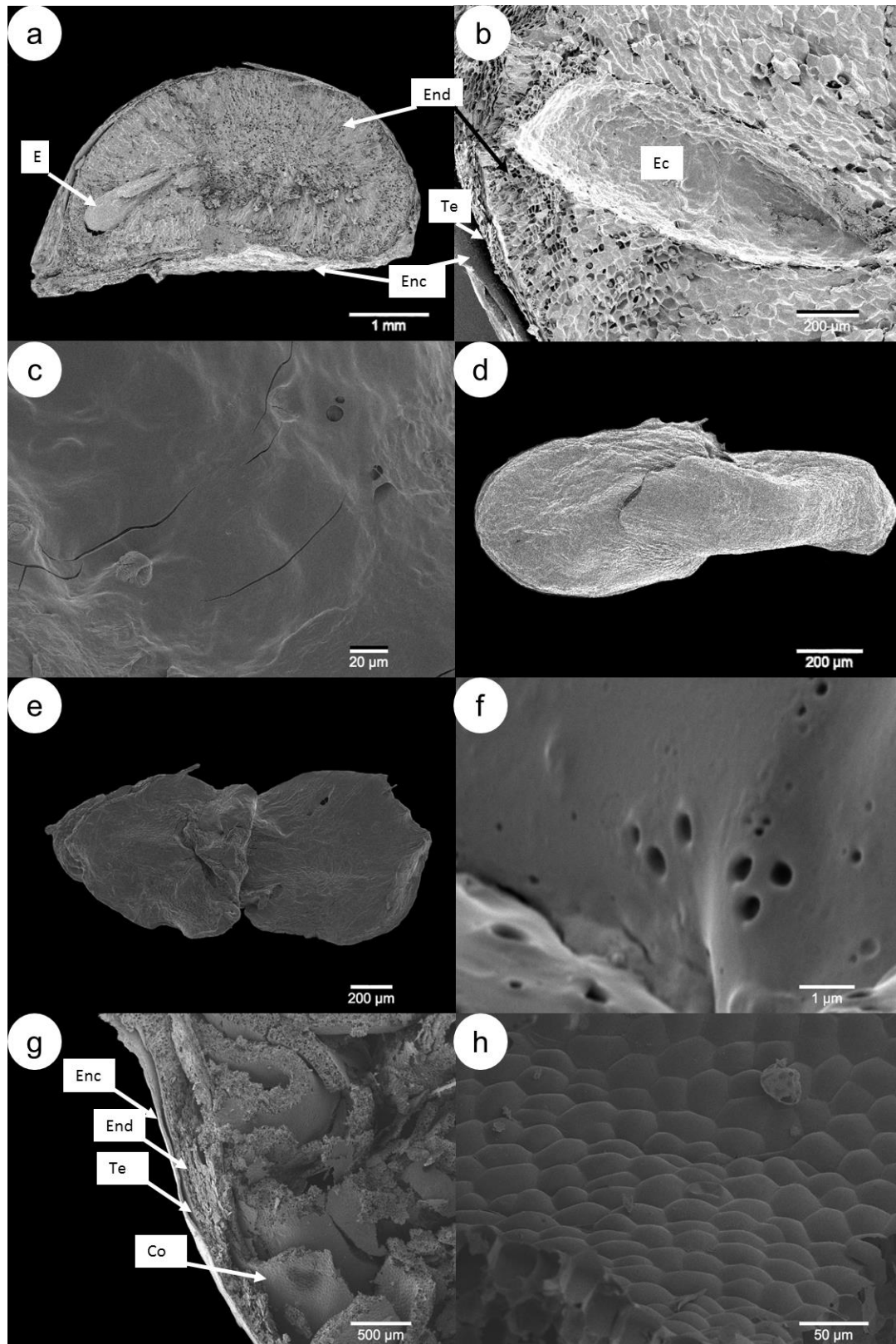
Figuur 12: Foto's van de niet-gesteriliseerde kieming (=controle) van *Psychotria kirkii*. De linkerplant vertoont een normaal fenotype, terwijl de rechterplant het "cripple"-fenotype vertoont (a). Detail van beide apicale meristemen. Bij het "cripple"-fenotype zijn vervormde bladeren en een vervormde bladknop waar te nemen, terwijl bij het nodulerende fenotype zijn de bladeren volledig gevormd en blijft de plant normaal groeien (b). Detail van een blad van het nodulerende fenotype waarop nodules (pijl) waar te nemen zijn (c). Detail van het blad van het "cripple"-fenotype, hier is het aantal nodules (pijl) beduidend lager dan bij het nodulerende fenotype.

3.2 TESTEN AANWEZIGHEID VERTICALE TRANSMISSIE

De kiemplanten verkregen via in vitro zaadcultuur en embryo rescue bevatten geen bacterieel DNA. Toch werden er enkele pyrenes geanalyseerd die positief testten op de aanwezigheid van bacterieel DNA. Deze endofyten werden geïdentificeerd als *Burkholderia* sp., wat aantoont dat er verticale transmissie aanwezig is. Bij de niet-gesteriliseerde kieming groeiden verschillende planten op die wel bacteriën bevatten. Deze bacteriën worden eveneens verticaal doorgegeven (zie hierboven).

Naast het opkweken van de kiemplanten werden steriele en niet-gesteriliseerde zaden zowel moleculair als morfologisch onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën. DNA werd geëxtraheerd uit het endocarp, het endosperm en het embryo van alle soorten. De DNA-isolatie van het endocarp en endosperm was vaak niet succesvol. Daarnaast testte slechts één van deze stalen positief voor de aanwezigheid van bacterieel DNA (zowel 16S rDNA als *recA*), meer bepaald de niet-gesteriliseerde embryo's van *P. kirkii*. Na het sequencen, werd de endofyt geïdentificeerd als een *Burkholderia* soort.

De pyrenes werden onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën met behulp van REM. Hiervoor werden de pyrenes longitudinaal doorgesneden, waarna de oppervlakte van de embryo's, de adaxiale zijde van de cotylen, en de ruimte tussen de testa en endocarp werd gescreend, maar nergens werden bacteriën waargenomen (**Figuur 13**).

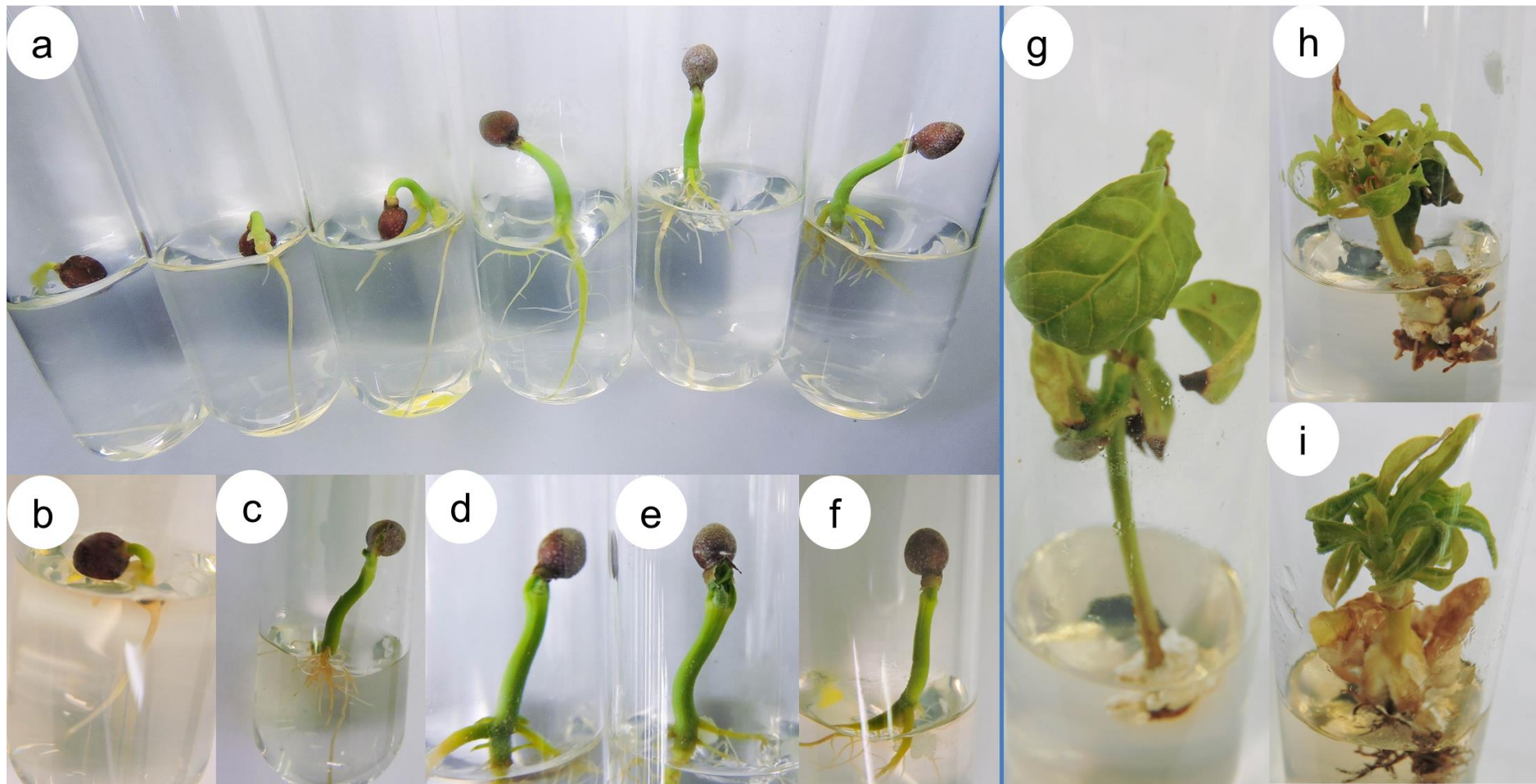


Figuur 13: REM foto's van doorsnedes doorheen de pyrene van *Psychotria umbellata* (a-c), *P. punctata* (d-f) en *P. kirkii* (g, h). Longitudinale sectie doorheen de pyrene waarbij het endocarp (Enc), testa (T), endosperm (End) en embryo (E) waarneembaar zijn (a). Detail van de pyrene met de embryonale holte (Ec) (b). Detail van de wand van de embryonale holte (c). Overzicht van een embryo (d). Overzicht van de adaxiale zijde van de twee cotylen (e). Detail van de cotylen, meer bepaald de locatie van de epicotyl en de vasthechtingsplaats aan de hypocotyl (f). Detail van een gekiemde pyrene uit in vitro zaadcultuur waarbij de cotylen (C) het merendeel van de ruimte die voordien gevuld was met endosperm (End) ingepalmd hebben (g). Detail van de cotylen waarop geen bacteriën teruggevonden werden (h).

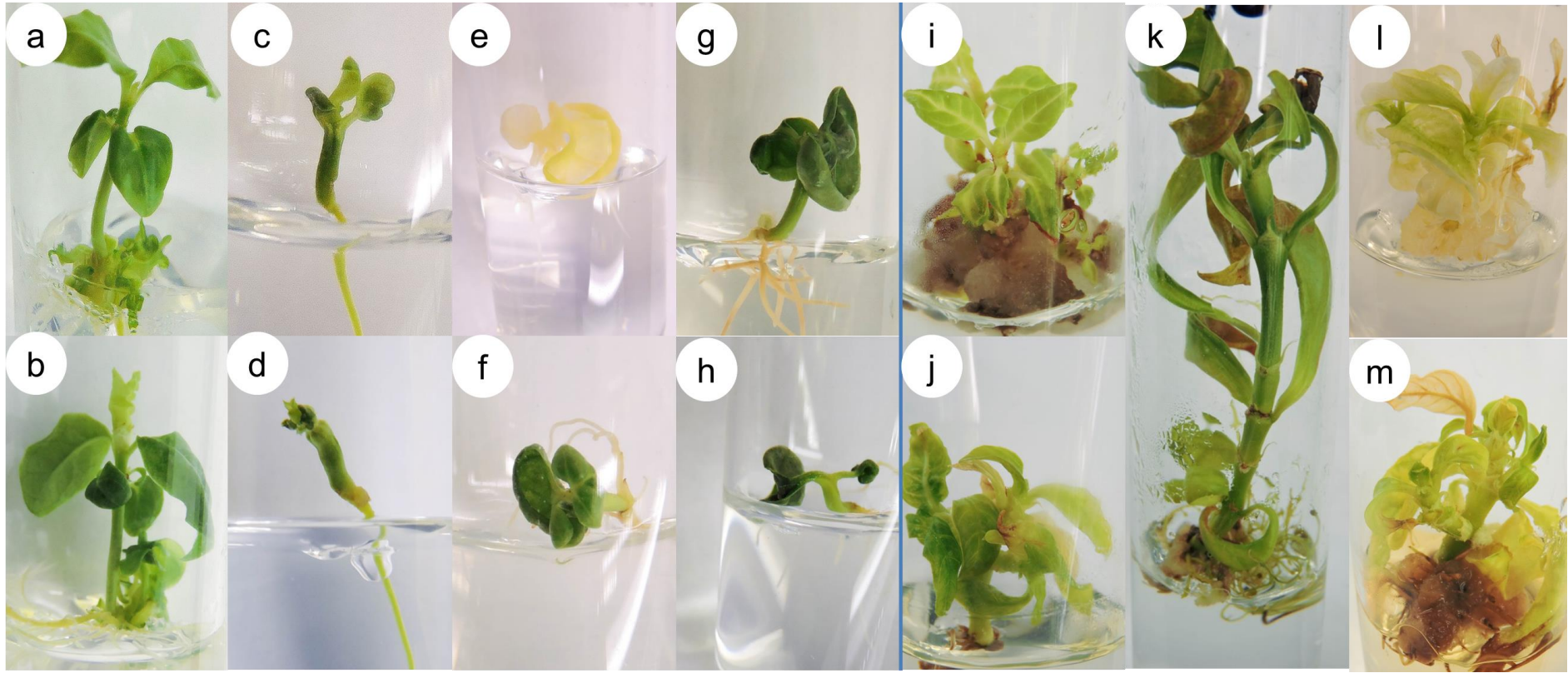
3.3 MORFOLOGISCHE VERSCHILLEN TUSSEN BACTERIEVRIJE EN NORMALE FENOTYPE

De fenotypes verschillen bij de verschillende methodes. De algemene morfologie van de kiemplanten verkregen via in vitro zaadcultuur en de nodulerende kiemplanten verkregen via de niet-gesteriliseerde methode verschillen weinig van elkaar (**Figuren 12, 15**). In tegenstelling tot de niet-gesteriliseerde planten, is er een sterke stijging in callus of wondweefsel in de periode tussen de twee verschillende meetpunten, namelijk van 1,7 % van alle planten naar 45,5 %. Bij *P. kirkii* kwam de grootste stijging voor; van 2,6 % van de kiemplanten bij het eerste meetpunt naar 60 % bij het tweede meetpunt (**Tabel 2**).

Bij de embryo rescue methode hebben de kiemplanten een relatief kortere stengel dan de planten uit in vitro zaadcultuur. Net zoals bij in vitro zaadcultuur, werd een sterke stijging van de aanwezigheid van wondweefsel opgemerkt. In tegenstelling tot de eerste techniek was er na twee maanden groei wondweefsel aanwezig bij 17,4 % van de kiemplanten, na vijf maanden is de aanwezigheid van dit weefsel gestegen tot 34,8 %. De productie van het wondweefsel kan zo snel verlopen dat de planten er volledig mee bedekt worden. In de eerste drie maanden werd een verschil opgemerkt tussen het fenotype van *P. nervosa* (de controlesoort) en het fenotype van de drie nodulerende soorten. Bij een groot deel van de nodulerende kiemplanten (**Figuur 15 c-h**) werd een vervormd fenotype waargenomen waarbij de bladeren niet tot ontwikkeling kwamen of vervormd waren (**Figuur 15 c, d**), er chlorosis optrad (**Figuur 15 e**), de bladeren omkrulden of de bladknop afwezig was (**Figuur 15 f-h**). Chlorosis is een afwijking in het fenotype van de plant waarbij inactieve chloroplasten gevormd worden en het blad een wit-gele kleur vertoont. In 13,3 % van alle (na vijf maanden) overlevende kiemplanten bij embryo rescue werd deze afwijking vastgesteld, voornamelijk bij *P. punctata* (39,2 %). Bij de kiemplanten van in vitro zaadcultuur werd er geen chlorosis vastgesteld. Na vijf maanden daalde het aantal afwijkende morfotypes en begonnen de meeste planten zich normaal te ontwikkelen en enkele planten verloren hun chlorosis (**Figuur 15 i-m**). Aan de abaxiale zijde van de bladeren werden uitstulpingen waargenomen met behulp van REM, maar ook hier werden geen endofyten gedetecteerd (**Figuur 10 d**).



Figuur 14: In vitro zaadcultuur van *P. kirkii* (42d) (a); *P. kirkii* (49d)(b-f); *P. nervosa* (6m) (g); *P. punctata* (6m) (h); *P. kirkii* (6m) (i).



Figuur 15: Embryo rescue van *Psychotria nervosa* (49d)(a); *P. nervosa* (61d) (b); *P. umbellata* (49d) (c, d); *P. punctata* (42d) (e, f); *P. kirkii* (35d) (g, h); *P. nervosa* (6m) (i); *P. punctata* (6m) (j); *P. umbellata* (6m) (k); *P. punctata* (6m) waarbij chlorosis verdwijnt (l); *P. kirkii* (6m) (m).

Bij beide methoden werd geobserveerd dat de bladeren veel kleiner waren *in vitro* dan in de niet-gesteriliseerde methode. Daarnaast waren de bladeren van beide *in vitro* methodes minder groen (**Figuren 12, 14, 15**).

Daarnaast werden de planten van beide methodes morfologisch onderzocht op de aanwezigheid van nodules (**figuur 14, 15**). Slechts enkele kiemplanten van *P. kirkii* vertoonden bij *in vitro* zaadcultuur donkere punten, hetgeen op nodules kan wijzen (**Figuur 11**), maar er werd geen bacterieel DNA waargenomen tijdens de moleculaire analyses (**Tabel 2**). Bij embryo rescue werden er bij verschillende soorten donkere punten vastgesteld, maar via moleculaire analyses werd aangetoond dat er geen bacteriën aanwezig waren.

4 DISCUSSIE

4.1 ONTWIKKELEN VAN BACTERIEVRIJE PLANTEN

Er is reeds verschillende malen onderzoek gevoerd naar het ontwikkelen van een bacterievrij fenotype. Bij deze pogingen werden er steeds nodules waargenomen waardoor de techniek nooit echt betrouwbaar was (Van Oevelen *et al.*, 2003; Lemaire *et al.*, 2012a). De methoden in vitro zaadcultuur of embryo rescue zouden meer betrouwbaar en succesvol kunnen zijn om dit bacterievrije fenotype te ontwikkelen en op te kweken. Het ontwikkelen van bacterievrije planten kan het onderzoek naar de functies en mogelijke voordelen voor de plant verder ontwikkelen.

Het cultiveren van de *Psychotria* soorten kan onderzocht worden met behulp van de kiemings- en overlevingskansen van de soorten. Het gemiddelde kiemingspercentage verschilt sterk tussen de twee kiemingsmethodes in vitro zaadcultuur en embryo rescue doordat de kieming bij *Psychotria punctata* en *P. umbellata* minder succesvol is bij in vitro zaadcultuur dan bij embryo rescue. Wanneer in vitro zaadcultuur vergeleken wordt met de standaard kiemingsexperimenten van de Plantentuin Meise (= het kiemen van zaden op een agarbodem) blijken de kiemingspercentages sterk vergelijkbaar voor *P. kirkii*. Voor *P. punctata* en voor *P. umbellata* is er wel een verschil waarneembaar ten gevolge van de lagere resultaten van bij in vitro zaadcultuur (Van de Vyver, A., persoonlijke communicatie). Voor beide soorten kan het lage kiemingspercentage bij in vitro zaadcultuur het gevolg zijn van interne factoren zoals een onderontwikkeld embryo of inhiberende effecten van de pyrene (Bridgen, 1994; Pierik, 1997). De kieming zou sterk geïnhibeerd kunnen worden door het endocarp, zoals bij *C. arabica* gebeurt (Eira *et al.*, 2006), maar kan ook sterk beïnvloed worden door het endosperm (Bridgen, 1994). Naast interne factoren kunnen er eveneens externe factoren meespelen. De kieming kan onder meer beïnvloed worden door de sterilisatieprocedure. Van ethanol en natriumhypochloriet is bijvoorbeeld geweten dat deze een invloed kunnen hebben op de kieming (Taylorson & Hendricks, 1979; Hsiao *et al.*, 1981; Cuero *et al.*, 1986). Een andere factor die kan meespelen, is het groeimedium waarop het zaad werd aangebracht. Bij pyrenes van *Coffea arabica* werd er een verschil in kiemingspercentage waargenomen tussen verschillende media (Ebrahim *et al.*, 2007). Bij *P. punctata* zou de lage kieming eveneens door een onvolledige sterilisatie van de pyrenes verklaard kunnen worden; door contaminatie verzuurt het medium en wordt het vloeibaar waardoor de pyrenes zinken. Het gemiddelde kiemingspercentage bij embryo rescue is hoger dan bij in vitro zaadcultuur. Er was quasi geen externe contaminatie, wat deze methode meer betrouwbaar maakt om de planten steriel op te kweken.

De overleving van de kiemplanten is na vijf maanden hoger bij in vitro zaadcultuur dan bij embryo rescue door de aanwezigheid van de intacte pyrene bij in vitro zaadcultuur. Deze zorgt voor extra reservestoffen, essentiële micronutriënten en extra bescherming, terwijl deze bescherming afwezig is bij embryo rescue (Pierik, 1997). De excisie van het embryo kan zorgen voor een eventuele beschadiging met vorming van wondweefsel tot gevolg. De aanwezigheid van wondweefsel kan door de hoge concentratie het kiemplantje volledig overwoekeren waardoor deze onmogelijk verder kan opgroeien. Wondweefsel werd eveneens aangetroffen bij de kiemplanten van in vitro zaadcultuur, maar de aanwezigheid ervan interfereerde nooit met de groei.

Om aan te tonen dat de overlevende kiemplanten bacterievrij zijn, werd gebruik gemaakt van twee verschillende analyses namelijk de moleculaire en de morfologische methode. Moleculaire analyse toonde aan dat de zowel in de bladeren als bladprimordia geen endofyten aanwezig waren. De afwezigheid van bacterieel DNA impliceert dat alle kiemplanten bacterievrij zijn. In tegenstelling tot de vorige technieken is de gebruikte experimentele methode dus betrouwbaar en werd het bacterievrije fenotype voor het eerst ondersteund met moleculaire analyses. Slechts drie resten van pyrenes bij in vitro zaadcultuur vertoonden sporen van bacteriële aanwezigheid wat mogelijk het gevolg is van een onvolledige sterilisatie. Dit wordt bevestigd door de moleculaire identificatie van *Burkholderia* als de endofyt.

De tweede methode die gebruikt wordt om de bacterievrije aard van de kiemplanten te bevestigen, is REM. De steriele omgeving van de beide methoden en de afwezigheid van fyllosfere bacteriën werd aangetoond via REM-observaties van bladoppervlakten (**Figuren 9 a-c, 10 a, d**). Aan de hand van de moleculaire analyses werd reeds aangetoond dat deze methodes bacterievrije planten voortbrachten. Om dit extra te bevestigen, werden doorsneden van bladeren en bladprimordia geobserveerd op de aanwezigheid van endofyten. Deze werden niet waargenomen (**Figuren 9 d, e; 10 b, c, e-h**). De morfologische resultaten bevestigen de moleculaire resultaten en tonen aan dat de kiemplanten bacterievrij zijn. Dit zou de eerste keer zijn dat er echt bacterievrije planten ontwikkeld werden binnen de bladsymbiose.

De verkregen planten zouden dus volledig bacterievrij zijn en de gebruikte methodes kunnen vergeleken worden met de methodes uit de literatuur (Van Oevelen *et al.*, 2003; Lemaire *et al.*, 2012a). In tegenstelling tot deze methodes zouden de kiemingsmethoden in vitro zaadcultuur en embryo rescue 100 % bacterievrije planten voortbrengen, wat zowel moleculair als morfologisch wordt ondersteund. De methode van Van Oevelen *et al.* (2003) bleek niet 100 % waterdicht aangezien er opnieuw nodules verschenen op de bladeren afkomstig uit dormante knoppen (Van Oevelen *et al.*, 2003). Wanneer de beide kiemingsmethoden onderling vergeleken worden, hebben beide methoden verschillende voor- en nadelen. De

voordelen van in vitro zaadcultuur ten opzichte van embryo rescue zijn de hogere overlevingskansen van de kiemplanten door de extra reserves en bescherming van de pyrene en de lagere arbeidsintensiviteit doordat het embryo bij in vitro zaadcultuur niet uitgesneden moet worden. De voordelen van embryo rescue ten opzichte van in vitro zaadcultuur zijn de snellere kieming en de lagere kans op onvolledige sterilisatie of externe contaminatie.

Het opkweken van niet-gesteriliseerde pyrenes in gesteriliseerde grond was een controle. Deze controle had als doel normale nodulerende kiemplanten te kweken en mogelijk enkele van nature bacterievrije planten of cripples te verkrijgen. Het resultaat was dat er verschillende nodulerende fenotypes ontwikkeld werden, maar ook enkele planten die verschillende eigenschappen vertoonden van het “cripple fenotype (**Figuren 2, 12**). Deze kiemplanten vertoonden namelijk vervormde bladeren en een gereduceerd apicaal meristeem zoals het “cripple” fenotype. Toch waren er nog steeds nodules aanwezig, weliswaar in een veel lager aantal dan bij het nodulerende fenotype. De vervormingen van het blad zijn eveneens minder sterk dan deze beschreven door Van Oevelen *et al.* (2003).

4.2 VERTICALE TRANSMISSIE EN DE AANWEZIGHEID VAN ENDOFYTEN IN HET ZAAD

Verticale transmissie werd vanuit fylogenetisch en morfologisch onderzoek gesuggereerd omwille van de gastheerspecificiteit en obligatoire aard van de interactie (Miller, 1990; Lemaire *et al.*, 2011c). Verticale transmissie houdt in dat de endofyten rechtstreeks doorgegeven worden van de moederplant naar de nakomelingen (Afkhami & Rudgers, 2008). Toegepast op *Psychotria* zouden de bacteriën dus in de pyrene of embryo aanwezig zijn. In de literatuur werd gesuggereerd dat de endofyt aanwezig zou zijn in de holte tussen de cotylen ter hoogte van het epicotyl (Miller, 1990). Met behulp van REM werd deze plaats onderzocht, maar er werden geen bacteriën teruggevonden (**Figuur 13 d-f**). Daarnaast werden de endofyten noch in de embryonale holte noch in het endosperm van niet-gesteriliseerde pyrenes aangetroffen (**Figuur 13**). De kiemplanten die werden verkregen met behulp van embryo rescue bevatten eveneens geen endofyten, net zoals de kiemplanten verkregen met behulp van in vitro zaadcultuur. Het niet detecteren van bacteriën bij de kiemplanten en morfologische analyses sluit verticale transmissie echter niet uit. Drie stalen van resten van gesteriliseerde pyrene testten positief voor de aanwezigheid van DNA van *Burkholderia* soorten. Door de steriele methode en de moleculaire identificatie van de bacteriën als *Burkholderia* soort, kan de aanwezigheid van deze bacteriën niet het gevolg zijn van externe contaminatie en is de aanwezigheid van deze endofyten het bewijs van verticale transmissie. De aanwezigheid van verticale transmissie werd reeds gepostuleerd door de gastheerspecificiteit van de bacterie, maar werd nog nooit experimenteel aangetoond. In

tegenstelling tot de dierlijke symbioses, waar de levenscyclus vaak verweven is met die van de gastheer, zijn symbiosevormen met verticale transmissie extreem zeldzaam in hogere planten (Leigh, 2010). Het bewijzen van verticale transmissie is belangrijk omdat deze vorm van transmissie in een endosymbiose uniek zou zijn binnen de bloemplanten. Binnen de vaatplanten, werd slechts één andere symbiose teruggevonden met verticale transmissie namelijk de symbiose tussen een kroosvaren *Azolla* en de cyanobacterie *Anabaena* (Lemaire *et al.*, 2011c).

Verticale transmissie veronderstelt dat de endofyten doorgegeven worden via het zaad. Vanuit de experimentele resultaten kunnen twee verschillende hypothesen geformuleerd worden. De endofyten zouden ofwel in de buitenste weefsels van de pyrene of in de embryonale holte aanwezig zijn.

De eerste hypothese stelt dat de bacteriën zich bevinden in de buitenste weefsels van de pyrene. Doordat de endofyten niet gevonden werden in de embryonale holte werd vanuit de literatuur gesuggereerd dat de endofyt zich in de buitenste weefsels van de pyrene zou bevinden (Miller, 1990). De detectie van een *Burkholderia* soort in resten van een gekiemde gesteriliseerde pyrene in deze studie zou dit kunnen aantonen. Indien de bacteriën zich in de buitenste weefsels van de pyrene bevinden, zouden deze bij moleculaire analyse van niet-gesteriliseerd endosperm of endocarp gedetecteerd moeten worden, maar deze werden noch morfologisch noch moleculair gedetecteerd. Dit kan enerzijds verklaard worden door de methode van DNA-isolatie; het mechanisch verbreken van het harde endosperm is weinig succesvol, net zoals het opzuiveren van het DNA met behulp van de SEVAG-methode door de hoge concentraties aan reservestoffen aanwezig in de pyrene. Vanuit de literatuur wordt anderzijds gesuggereerd dat er slechts enkele bacteriën verticaal doorgegeven worden (Carlier & Eberl, 2012). De veel lagere concentratie aan bacterieel DNA zou verklaren waarom er geen bacterieel DNA gedetecteerd werd in de grote hoeveelheid aan plantaardig DNA. Hoewel de endofyten zich in de buitenste weefsels van de pyrene zouden bevinden, werden endofyten toch gedetecteerd in niet-gesteriliseerde embryo's. Een mogelijkheid tot methodologische contaminatie is miniem door de mogelijk zeer lage concentratie aan bacteriën in de pyrene. De endofyten bevinden zich dus niet alleen in de buitenste lagen van de pyrene.

De tweede hypothese stelt dat de endofyten zich in de met mucus gevulde, embryonale holte bevinden. Deze hypothese wordt vermeld in de literatuur, maar werd nooit bevestigd met behulp van morfologische observaties (Miller, 1990) en ook in deze studie werden er bij het observeren van de embryonale holte en het embryo via REM geen bacteriën waargenomen (**Figuur 13**). De kans om endofyten te detecteren in de embryonale holte of op het embryo is laag door de onvolledige observatie van de embryonale holte en door de hoge concentratie aan mucus. De endofyten zouden zich immers voornamelijk in deze mucus bevinden (Miller,

1990), terwijl REM-observaties enkel de oppervlaktes onderzoeken, wat de kans op detectie verlaagt. Onze moleculaire analyses detecteerden eveneens geen bacterieel DNA in de gesteriliseerde embryo's. Bij de niet-gesteriliseerde embryo's werd er echter wel bacterieel DNA aangetroffen en geïdentificeerd als een *Burkholderia* soort. Deze detectie toont mogelijk aan dat de endofyten zich in de embryonale holte kunnen bevinden en dat de embryonale holte en het embryo tijdens de sterilisatie van de pyrenes gesteriliseerd werden.

4.3 FENOTYPE VAN BACTERIEVRIJE PLANTEN EN FUNCTIE VAN DE INTERACTIE

Vanuit de moleculaire en morfologische analyse blijkt dat de kiemplanten die verkregen zijn met in vitro zaadcultuur en embryo rescue, bacterievrij zijn. Door de afwezigheid van de endofyten zouden specifieke kenmerken kunnen verschijnen die verschillen van het normale fenotype. De algemene morfologie van de kiemplanten bij in vitro zaadcultuur vertoont weinig verschil met het nodulerende fenotype, opgegroeid op steriele bodem, met uitzondering van de afwezigheid van nodules. Daarnaast kunnen deze kiemplanten vergeleken worden met het bacterievrije of cripple fenotype beschreven in de literatuur. Dit cripple fenotype vertoonde een gereduceerde groei, een vervormd meristeem en vervormde bladeren (**Figuur 2**) (Van Oevelen *et al.*, 2003; Lemaire *et al.*, 2012a). In onze kiemplanten werden geen vervormd meristeem of vervormde bladeren waargenomen, maar er was wel een gereduceerde groei waar te nemen. Deze gereduceerde groei zou het gevolg kunnen zijn van het groeimedium, het kleine volume van de proefbuis of het verwijderen van de wortels (**Figuur 14**) (Thomas & Ravindra, 1997). De gereduceerde groei zal waarschijnlijk verdwijnen na de transfer op bodem en zal dus vermoedelijk niet het gevolg zijn van de afwezigheid van bacteriën, maar van de methode. Wondweefsel komt weinig voor bij in vitro zaadcultuur, maar de aanwezigheid ervan is voornamelijk het gevolg van het verwijderen van de wortels en het toevoegen van cytokinine (**Figuur 14 g-i**) (Ebrahim *et al.*, 2007). De aanwezigheid van wondweefsel zou dus ook het gevolg zijn van de methode en niet van de bacteriële afwezigheid. Een mogelijk bijkomend effect van cytokinine is de inhibitie van apicale dominantie waardoor laterale bladknoppen openen en er meer zijtakken gevormd worden (**Figuur 14 h, i**) (Phillips, 1975; Cline, 1997). Bij sommige kiemplanten werd een verhoogd aantal scheuten en zijtakken waargenomen, maar dit zou eveneens het gevolg zijn van de methode. Bij in vitro zaadcultuur worden dus enkele verschillen waargenomen met het normale nodulerende fenotype, maar deze effecten kunnen steeds herleid worden naar de methode en niet naar de afwezigheid van endofyten.

In tegenstelling tot de kiemplanten van in vitro zaadcultuur, werden er meer afwijkingen waargenomen bij embryo rescue. Net zoals bij in vitro zaadcultuur zou de groei gereduceerd zijn als gevolg van de methode. Het percentage wondweefsel is veel hoger dan bij de in vitro

zaadcultuur en de productie was bij bepaalde planten zo hoog dat de gehele plant overgroeid was met dit weefsel (**Figuur 15 i, m**). De productie en de aanwezigheid van wondweefsel werd beïnvloed door de methode, meer bepaald de aanwezigheid van cytokinine, net zoals bij *in vitro* zaadcultuur (Ebrahim *et al.*, 2007). Bij embryo rescue zou mogelijke beschadiging van het embryo tijdens de methode de aanwezigheid van wondweefsel kunnen verhogen. Daarnaast werd net zoals bij *in vitro* zaadcultuur door een toevoeging van cytokinine een verhoogd aantal scheuten waargenomen (**Figuur 15 i, j, l, m**).

Voor beide methoden geldt dat er door de kiemplanten weinig actief aan fotosynthese gedaan wordt als gevolg van de lage lichtcondities en de hoge concentraties aan suiker in het groeimedium (Hazarika, 2006). Vaak is het fotosyntheseapparaat niet volledig ontwikkeld en is de concentratie chlorofyl of nodige enzymen laag of afwezig (Hazarika, 2006). De bladeren van de kiemplanten zijn lichter groen dan bij het nodulerende fenotype, wat te verklaren is door een lagere concentratie aan actieve chloroplasten. Daarnaast vertonen verschillende kiemplanten een extreme vorm waarbij er geen actieve chloroplasten aangetroffen worden en waar de groene kleur volledig ontbreekt (**Figuur 15 e**). Chlorosis wordt vaak veroorzaakt door een tekort aan micronutriënten zoals ijzer, zwavel, magnesium, stikstof en mangaan (Taiz & Zeiger, 2010). Een mogelijke verklaring voor dit nutritioneel tekort bij embryo rescue is het ontwikkelingsstadium van het embryo bij excisie of het verschil in voedingsnutriënten vanuit de pyrene. Deze afwijking werd niet waargenomen bij *in vitro* zaadcultuur doordat de kiemplant door de pyrene van de essentiële micronutriënten en extra reservestoffen voorzien wordt en zo de verschillende voedingstekorten voorkomen worden (Bodruzzaman *et al.*, 2004). De kiemplanten van embryo rescue kunnen in tegenstelling tot *in vitro* zaadcultuur geen aanspraak maken op reserves (Pierik, 1997). Bij enkele kiemplanten verdwenen deze afwijkingen tijdens de groei en ontwikkelde de plant opnieuw groene bladeren wat mogelijk het gevolg is van de transfer naar een nieuw medium (**Figuur 15 m**). Deze afwijkingen zijn dus allemaal te relateren aan de methode en kunnen opgelost worden door de methode aan te passen en te verfijnen. Deze afwijkingen zouden dus geen gevolg zijn van de bacterievrije aard van de kiemplanten.

Een opmerkelijk morfologische verschijnsel is het verschijnen van donkere punten op bladeren van de kiemplanten bij beide technieken (**Figuur 11**). Het aantal punten is echter veel lager dan het aantal nodules bij het nodulerende fenotype. Om te testen of deze punten nodules waren, werden deze moleculair geanalyseerd op de aanwezigheid van endofyten, maar er werd geen bacterieel DNA gedetecteerd. De aanwezigheid van deze verkleuringen is eventueel het gevolg van *in vitro* effecten, zoals een hogere dichtheid aan cellen op die plaatsen of een hogere fotosynthetische activiteit dan in de rest van het blad. Daarnaast werden geen intercellulaire of substomatale holtes opgemerkt in de dwarsdoorsneden van de bladeren en werd er geen differentiatie aangetroffen tussen palissade- en sponsparenchym

(Figuren 9 d, e; 10 b, c). Hierdoor is de ontwikkeling van echte nodules onmogelijk (Lersten & Horner, 1967; Miller, 1990). Een ander belangrijk kenmerk van deze donkere punten is dat deze na een bepaalde periode niet meer werden waargenomen en dus eveneens een effect zouden zijn van de methode.

Alle afwijkingen die waargenomen worden in beide kiemingsmethodes zouden het gevolg zijn van de methode en niet van de afwezigheid van endofyten. Over het mogelijke bacterievrije fenotype van de *Burkholderia*-vrije planten en het effect van de endofyten op de gastheerplant kunnen nog geen uitspraken geformuleerd worden omdat de kiemplanten nog steeds op groeimedium staan (Hazarika, 2006). Het fenotype van de plant zou pas beschreven kunnen worden na het verpotten van de kiemplanten naar aarde. Pas na een acclimatisatie aan de nieuwe omgeving kan het fenotype van de bacterievrije plant vergeleken worden met het nodulerende fenotype. Hoewel er geen bacteriën gedetecteerd werden, kunnen we nog niet helemaal uitsluiten dat er endofyten in de kiemplanten aanwezig zijn. Door de weinig ontwikkelde bladeren, zou de concentratie van bacteriën dan wel zeer laag zijn en zullen nodules pas verschijnen bij de verdere uitgroei van de bladeren na het verpotten van de kiemplanten naar gesteriliseerde bodem. Er bestaat dus een kans dat planten niet ‘echt’ bacterievrij zijn, maar door een te lage concentratie van endofyten zou de endosymbiose geen invloed hebben op het plantfenotype waardoor de plant gezien kan worden als functioneel bacterievrij.

Over de functie van de interactie waren verschillende hypothesen opgesteld zoals planthormoonproductie of stikstoffixatie (Miller, 1990). Alhoewel de kiemplanten op groeimedium staan, kunnen verschillende hypothesen gezien worden als minder waarschijnlijk. De planten kunnen namelijk kiemen en bladeren vormen bij beide kiemingsmethoden zonder de aanwezigheid van endofyten. Dit sluit mogelijk aan met de hypothese van Carlier & Eberl (2012). Bij het sequencen van het genoom werden de gekende genen voor planthormoonproductie en stikstoffixatie niet teruggevonden, maar wel een biosyntheseweg voor een stof met mogelijk schimmel-, insecten- en herbivoren-werende eigenschappen (Mahmud, 2003; Carlier & Eberl, 2012; Carlier *et al.*, 2013). Indien dit de enige functie is van de interactie moeten de bacterievrije planten perfect kunnen overleven in een steriel milieu en zou het cripple-fenotype beschreven door Van Oevelen *et al.* (2003) een gevolg zijn van externe factoren zoals een te hoge temperatuur of tekorten aan nutriënten.

5 CONCLUSIE

Sinds de ontdekking van de bladsymbiose in 1892 is er nog steeds weinig geweten over de mogelijke functies en mechanismes van bladendosymbiose. In de literatuur zijn er verschillende hypothesen opgesteld, maar de uiteindelijke functie is nog steeds niet bewezen. Van Oevelen *et al.* (2003) deden een poging om de functie te achterhalen door bacterievrije planten te ontwikkelen. Deze planten vertoonden een “cripple” fenotype, maar bleken niet volledig bacterievrij te zijn. De ontwikkeling van “echte” bacterievrije planten zou mogelijk een diepere kennis verschaffen over deze endosymbiose.

De eerste doelstelling van dit onderzoek was het ontwikkelen van bacterievrije planten aan de hand van de kiemingsmethoden in vitro zaadcultuur en embryo rescue. Beide methoden bleken zeer betrouwbaar en succesvol te zijn voor het ontwikkelen van bacterievrije planten. De bacterievrije aard van de kiemplanten werd door zowel morfologische als moleculaire analyses van de bladeren en bladprimordia ondersteund. Er werd bij geen van deze stalen bacterieel DNA gedetecteerd. Dit zou de eerste keer zijn dat er ‘echte’ bacterievrije planten ontwikkeld werden en dat dit ondersteund werd door REM-observaties en DNA-analyses. Wanneer beide kiemingsmethoden vergeleken worden, is embryo rescue net iets betrouwbaarder dan in vitro zaadcultuur door de lagere kans op zowel onvolledige sterilisatie als externe contaminatie.

De tweede doelstelling was het experimenteel bewijzen van de verticale transmissie. Door de gastheerspecificiteit en de obligatoire aard van de interactie werd verticale transmissie gesuggereerd. In gesteriliseerde resten van gekiemde pyrenes van in vitro zaadcultuur werden *Burkholderia* endosymbionten geïdentificeerd. De aanwezigheid van endosymbionten in gesteriliseerde pyrenes toonde aan dat de endofyten verticaal doorgegeven werden. Verticale transmissie is een unieke eigenschap van een endosymbiose binnen bloemplanten waardoor bladendosymbiose de enige vorm van cyclische endosymbiose is binnen angiospermen. Daarnaast werd onderzocht waar de endofyten zich zouden bevinden in de pyrene. Hier voor werden twee mogelijke plaatsen gesuggereerd, namelijk de buitenste weefsels van de pyrenes of de embryonale holte. Door de identificatie van *Burkholderia* soorten op niet-gesteriliseerde embryo's werd de embryonale holte geopperd. Door de hoge concentratie aan mucus in deze holte werden deze bacteriën echter nog nooit geobserveerd met behulp van REM.

De derde doelstelling was het beschrijven van het bacterievrije fenotype en de mogelijke functie van de interactie nagaan. De kiemplanten van beide methoden vertoonden verschillende afwijkingen die door de methode veroorzaakt zouden zijn zoals gereduceerde groei, de aanwezigheid van wondweefsel, lichtere groene kleur door lagere fotosynthese

activiteit en chlorosis specifiek bij embryo rescue door een nutriëntentekort. Er werden geen specifieke afwijkingen waargenomen ten gevolge van de bacterievrije aard van de planten. Een opvallende morfologische afwijking is de aanwezigheid van donkere punten waar geen bacterieel DNA werd aangetroffen. De vorming ervan zou echter het gevolg zijn van *in vitro* methodes.

Hoewel er geen endofyten gedetecteerd werden bij de kiemplanten, zou er nog steeds een kleine concentratie bacteriën aanwezig kunnen zijn. Ten gevolge van hun lage concentratie en daardoor ook hun minimale effect op de gastheer kunnen de kiemplanten toch beschouwd worden als functioneel bacterievrij in plaats van echt bacterievrij.

Doordat de kiemplanten nog op groeimedium staan, kunnen er nog weinig uitspraken gedaan worden over mogelijke functies van de interacties. Op het groeimedium kunnen de bacterievrije planten kiemen zonder de aanwezigheid van bacteriën. Hieruit kan men afleiden dat de bacteriën niet echt essentieel zijn voor de kieming en groei van de plant en eerder deel zouden kunnen uitmaken van het verdedigingsmechanisme tegen herbivoren, insecten en andere pathogenen.

6 SUGGESTIES VOOR VERDER ONDERZOEK

Vanuit dit onderzoek kunnen verschillende suggesties gedaan worden om het onderzoek naar bacterievrije planten verder uit te breiden.

Indien de planten na overbrenging op de aarde bacterievrij blijven, kan de techniek verder verfijnd en toegepast worden op soorten met de niet-nodulerende vorm van de endosymbiose. Door beide bacterievrije planten te vergelijken, kunnen verschillende aspecten tussen de endosymbioses vergeleken worden, zoals de obligatoire aard van de interactie, de functie, enzovoort.

Indien de planten na verplanting in de bodem toch nodules zouden vormen, kunnen andere methodes aangewend worden om het bacterievrije fenotype te ontwikkelen. Ten eerste kunnen andere kiemingsmethodes uitgetest worden zoals meristeemcultuur en somatische embryogenese. Meristeemcultuur is een techniek waarbij het apicale meristeem of de groepspunt van de plant geïsoleerd en verder opgegroeid wordt op groeimedium. Doordat de bacteriën zich niet in het apicaal meristeem zelf bevinden maar in de met mucus gevulde bladknop, zou deze techniek zeker bacterievrij moeten zijn. Bij somatische embryogenese ontwikkelen vanuit somatische weefsels, zoals bijvoorbeeld bladeren, nieuwe kiemplanten. Met behulp van deze techniek kan eveneens experimenteel bewezen worden of er endofyten aanwezig zijn in de verschillende nodules. Een andere methode die toegepast kan worden om bacterievrije planten te ontwikkelen is het toevoegen van antibiotica. Dit werd reeds toegepast bij *Ardisia* (Yamada, 1955).

De ontwikkelde bacterievrije planten kunnen gebruikt worden in verschillende experimenten die de functionaliteit en de gastheerspecificiteit van de endosymbiose onderzoeken. Inoculatie-experimenten waarbij verschillende *Burkholderia* soorten gebruikt worden, kunnen het effect van deze endofyten nagaan op de aan- of afwezigheid van nodules en het verschil in functies in hun gastheer. Naast inoculaties van één bacterie kunnen ook mengsels van verschillende *Burkholderia* aan de plant toegevoegd worden om te onderzoeken of er daadwerkelijk gastheerspecificiteit bestaat. Deze experimenten zullen mogelijk meer inzicht verschaffen over de interactie en deze verder doorgronden.

7 SAMENVATTING

Bij bepaalde *Psychotria* soorten (Rubiaceae) zijn endofytische bacteriën van het genus *Burkholderia* aanwezig in de bladeren. Deze endofyten zijn gehuisvest in specifieke nodules en zijn gastheerspecifiek. Omwille van gastheerspecificiteit werd verticale transmissie van de endosymbiont naar de volgende plantengeneratie gesuggereerd. In de literatuur werden reeds bacterievrije planten beschreven met vervormde bladeren en een gereduceerde plantengroei. De ontwikkeling van bacterievrije planten is een belangrijk hulpmiddel in het onderzoek naar de mogelijke functies van de interactie.

Onze eerste doelstelling was het ontwikkelen van een methode om bacterievrije planten te kweken. Hiervoor werden twee technieken aangewend: *in vitro* zaadcultuur, waarbij gesteriliseerde zaden gekiemd worden, en embryo rescue waarbij embryo's uit gesteriliseerde zaden geïsoleerd en *in vitro* opgekweekt worden. De kiemplanten van beide methodes werden morfologische en moleculair geanalyseerd. Deze waren bacterievrij, waardoor deze methoden betrouwbaar zijn om bacterievrije planten te kweken.

De tweede doelstelling was het experimenteel nagaan van verticale transmissie en het lokaliseren van endofyten in de pyrene. Verticale transmissie werd bewezen door moleculaire detectie van endofyten in gesteriliseerde, gekiemde pyrene. Deze endosymbiose is hierdoor uniek binnen de angiospermen. De embryonale holte werd voorgesteld als locatie voor de endofyten.

De laatste doelstelling was het beschrijven van het bacterievrije fenotype. Het verkregen fenotype was sterk vergelijkbaar met het normale nodulerende fenotype. De geobserveerde morfologische afwijkingen waren herleidbaar tot effecten van de methoden en niet tot de bacterievrije aard. De functies van de interactie konden niet getest worden door verschillende *in vitro* effecten. Hiervoor moeten de kiemplanten nog overgeplaatst worden naar bodem.

8 SUMMARY

Certain *Psychotria* species (Rubiaceae) harbour endophytic *Burkholderia* bacteria in their leaves. These endophytes are found in specialized nodules and are host specific. Due to this specificity, vertical transmission of the bacteria to the next plant generation is hypothesized. In previous research, bacteria-free plants are described with leaf distortion and stunted plant growth. Bacteria-free plants are helpful to investigate the possible functions of the interaction.

Our first objective was to develop a method to cultivate bacteria-free plants. For this, two techniques were applied: *in vitro* seed culture, a method of culturing sterilized seeds, and embryo rescue, a method of extracting embryos from mature seeds and culturing them *in vitro*. The plantlets of both methods were morphologically and molecularly analysed. All the plantlets were bacteria-free, which makes both methods trustworthy to cultivate bacteria-free plants.

The second objective was to assess vertical transmission experimentally and to locate the endophytes in the pyrene. Vertical transmission was observed by molecular detection of endophytes in sterilised, germinated pyrene. This transmission makes the endosymbiosis unique within angiosperms. As location for the endophytes, the embryonic cavity was hypothesised.

The final objective was to assess the bacteria-free phenotype. The observed phenotype is similar to the normal nodulating phenotype; most of the observed abnormalities are derived from the applied methods and not from the bacteria-free phenotype. Functions of the interaction could not be tested due to *in vitro* effects. The plantlets have to be transferred to soil to assess the benefits of the interaction.

REFERENTIES

LITERATUUR

Afkhami, M. E. & Rudgers, J. A. (2008). Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *The American Naturalist*, 172, 405-416.

Afzal, M., Khan, S., Iqbal, S., Mirza, M. S. & Khan, Q. M. (2013). Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 331-336.

Ait Barka, E., Nowak, J. & Clément, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7246–7252.

Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Vasquez, N. & Etienne, H. (2002). Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany*, 90, 77–85.

Berger, A., Fasshuber, H., Schinnerl, J., Robien, W., Brecker, L. & Valant-Vetschera, K. (2011). Iridoids as chemical markers of false ipecac (*Ronabea emetica*), a previously confused medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 756–761.

Bertrand-Desbrunais, A. & Charrier, A. (1989). Conservation des ressources génétiques caféières en vitrothèque. *Proceedings on the 13th ASIC.*, 438–447.

Bodruzzaman, M., Lauren, J. G., Duxbury, J. M., Sadat, M. A., Welch, R. M., E-Elahi, N. & Meisner, C. A. (2004). Increasing wheat and rice productivity in the sub-tropics using micronutrient Enriched Seed. *Micronutrients in South and South East Asia. Proceedings of an international Workshop*, 187–198.

Bontemps, C., Elliott, G. N., Simon, M. F., Dos Reis Júnior, F. B., Gross, E., Lawton, R. C., Neto, N. E., de Fátima Loureiro, M., De Faria, S. M., Sprent, J. I., James, E. K. & Young, J. P. W. (2010). *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, 19, 44–52.

Bremer, B. & Eriksson, T. (2009). Time Tree of Rubiaceae: Phylogeny and Dating the Family, Subfamilies, and Tribes. *International Journal of Plant Sciences.*, 170, 766–793.

Bremer, B. & Manen, J. F. (2000). Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 225, 43–72.

Bridgen, M. (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29, 1243–1246.

Carrier, A. L. & Eberl, L. (2012). The eroded genome of a *Psychotria* leaf symbiont: hypotheses about lifestyle and interactions with its plant host. *Environmental Microbiology*, 14, 2757–2769.

Carrier, A. L., Omasits, U., Ahrens, C. H. & Eberl, L. (2013). Proteomics analysis of *Psychotria* leaf nodule symbiosis: improved genome annotation and metabolic predictions. *Molecular plant-microbe interactions*, 26, 1325–1333.

Chiarini, L., Bevivino, A., Tabacchioni, S. & Dalmastrì, C. (1998). Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 81–87.

Clay, K. & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160, S99–S127.

Cline, M. G. (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, 84, 1064–1069.

Colonna, J. P. (1972). Contribution à l'étude de la culture in vitro d'embryons de caféiers. Action de la caféine. *Café Cacao Thé*, 16, 193–203.

Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C. & Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 607–626.

Corsaro, D., Venditti, D., Padula, M. & Valassina, M. (1999). Intracellular life. *Critical Reviews Microbiology*, 25, 39–79.

Cox, E. A., Stotzky, G. & Goos, R. D. (1960). *In vitro* culture of *Musa balbisiana* Colla embryos. *Nature*, 185, 403–404.

Cuero, R. G., Smith, J. E. & Lacey, J. (1986). The influence of gamma irradiation and sodium hypochlorite sterilization on maize seed microflora and germination. *Food Microbiology*, 3, 107–113.

Cullimore, J. & Dénarié, J. (2003). How legumes select their sweet talking symbionts. *Science*, 302, 575–578.

- Davis, A., Govaerts, R., Bridson, D., Ruhsam, M., Moat, J. & Brummit, N. (2009). A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96, 68–78.
- Dussert, S., Chabrillange, N., Rocquelin, G., Engelmann, F., Lopez, M. & Hamon, S. (2001). Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. *Physiology Plantarum*, 112, 495–504.
- Ebrahim, N., Shibli, R., Makhadmeh, I., Shatnawi, M. & Abu-Ein, A. (2007). *In vitro* propagation and *in vivo* acclimatization of three coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) from Yemen. *World Applied Sciences Journal*, 2, 142–150.
- Eira, M. T. S., Silva, E. A. A., de Castro, R. D., Dussert, S., Walters, C., Bewley, D. & Hilhorst, H. W. M. (2006). Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 149–163.
- Eriksson, O. & Bremer, B. (1991). Fruit characteristics, life forms, and species richness in the plant family Rubiaceae. *The American Naturalist*, 138, 751–761.
- Gorka, A. P., Sherlach, K. S., de Dios, A. C. & Roepe, P. D. (2013). Relative to quinine and quinidine, their 9-epimers exhibit decreased cytostatic activity and altered heme binding but similar cytotoxic activity versus *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 365–374.
- Govindarajan, M., Balandreau, J., Kwon, S. - W., Weon, H. - Y. & Lakshminarasimhan, C. (2008). Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, 55, 21–37.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. - M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. W. & James, E. K. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, 24, 1276–1288.
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108, 105–120.
- Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J. & Hammond, G. B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66, 5–29.
- Herrera, C. M. (1989). Seed dispersal by animals: a role in angiosperm diversification? *The American Naturalist*, 133, 309–322.

Holden, M. T. G., Titball, R. W., Peacock, S. J., Cerdeño-Tárraga, A. M., Atkins, T., Crossman, L. C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S. D., Sebaihia, M., Thomson, N. R., Bason, N., Beacham, I. R., Brooks, K., Brown, K. A., Brown, N. F., Challis, G. L., Cherevach, I., Chillingworth, T., Cronin, A., Crossett, B., Davis, P., DeShazer, D., Feltwell, T., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Keith, K. E., Maddison, M., Moule, S., Price, C., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Simmonds, M., Songvilai, S., Stevens, K., Tumapa, S., Vesaratchavest, M., Whitehead, S., Yeats, C., Barrell, B. G., Oyston, P. C. F. & Parkhill, J. (2004). Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14240–14245.

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M. & Fukatsu, T. (2006). Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biology*, 4, 1841-1851.

Howell, G., Slater, A. & Knox, R. (1993). Secondary pollen presentation in angiosperms and Its biological significance. *Australian Journal of Botany*, 41, 417–438.

Hsiao, A. I., Worsham, A. D. & Moreland, D. E. (1981). Effects of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witchweed (*Striga asiatica*) Seeds. *Weed Science*, 29, 98–100.

Jacobsen, C. S. (1997). Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO1001) in 2, 4-D contaminated soil. *Plant and Soil*, 189, 139–144.

Jiang, C., Sheng, X., Qian, M. & Wang, Q. (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72, 157–164.

Leigh, E. G. (2010). The evolution of mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 2507–2528.

Lemaire, B., Janssens, S., Smets, E. & Dessein, S. (2012a). Endosymbiont transmission mode in bacterial leaf nodulation as revealed by a population genetic study of *Psychotria leptophylla*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 284–287.

Lemaire, B., Lachenaud, O., Persson, C., Smets, E. & Dessein, S. (2012b). Screening for leaf-associated endophytes in the genus *Psychotria* (Rubiaceae). *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 364–372.

- Lemaire, B., Robbrecht, E., van Wyk, B., Van Oevelen, S., Verstraete, B., Prinsen, E., Smets, E. & Dessein, S. (2011a). Identification, origin, and evolution of leaf nodulating symbionts of *Sericanthe* (Rubiaceae). *Journal of Microbiology*, 49, 935–941.
- Lemaire, B., Smets, E. & Dessein, S. (2011b). Bacterial leaf symbiosis in *Ardisia* (Myrsinoideae, Primulaceae): Molecular evidence for host specificity. *Research in Microbiology*, 162, 528–534.
- Lemaire, B., Vandamme, P., Merckx, V., Smets, E. & Dessein, S. (2011c). Bacterial leaf symbiosis in angiosperms: Host specificity without Co-Speciation. *PLoS One*, 6, e24430.
- Lemaire, B., Van Oevelen, S., de Block, P., Verstraete, B., Smets, E., Prinsen, E. & Dessein, S. (2012c). Identification of the bacterial endosymbionts in leaf nodules of *Pavetta* (Rubiaceae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 202–209.
- Lersten, N. R. & Horner, H. T. (1967). Development and structure of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *Journal of Bacteriology*, 94, 2027–2036.
- Login, F. H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., Rochat, D., Heddi, A. (2011). Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science*, 334, 362–365.
- Mahmud, T. (2003). The C₇N aminocyclitol family of natural products. *Natural Product Reports*, 20, 137–166.
- Miller, I. M. (1990). Bacterial leaf nodule symbiosis. *Advances in Botanical Research*, 17, 163–234.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411, 948–950.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R. & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature reviews. Genetics*, 9, 218–229.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473 – 479.
- Mylona, P., Pawlowski, K. & Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 7, 869–885.
- Norton, D. A. & Carpenter, M. A. (1998). Mistletoes as parasites: Host specificity and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 13, 101–104.

- Oldroyd, G. E. D., Harrison, M. J. & Paszkowski, U. (2009). Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science*, 324, 753–754.
- Partida-Martínez, L. P. & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2, 1-16.
- Phillips, I. D. J. (1975). Apical Dominance. *Annual Review of Plant Physiology*, 26, 341–367.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In Vitro Culture of Higher Plants*. 3rd ed., Springer, Netherlands, Dordrecht, 348p.
- Piesschaert, F., Robbrecht, E. & Smets, E. (2001). Patterns in pyrenes: the systematic significance of pyrene morphology in *Chassalia* (Rubiaceae-Psychotrieae) and related genera. *Flora*, 196, 121–131.
- Ramundo, B. A. & Claflin, L. E. (2005). Identification of *Burkholderia andropogonis* with a repetitive sequence BOX element and PCR. *Current Microbiology*, 50, 52–56.
- Razafimandimbison, S. G., Taylor, C. M., Wikström, N., Paillet, T., Khodabandeh, A. & Bremer, B. (2014). Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureeae (Rubiaceae): Evolution of schizocarps in *Psychotria* and origins of bacterial leaf nodules of the Malagasy species. *American Journal of Botany*, 101, 1102–1126.
- Robbrecht, E. & Manen, J. (2006). The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchinonoideae and Rubioideae. *Systematics and Geography of Plants*, 76, 85–145.
- Sarasan, V. (2010). Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide. *Kew Bulletin*, 65, 549–554.
- Sharma, D. R., Kaur, R. & Kumar, K. (1996). Embryo rescue in plants - a review. *Euphytica*, 89, 325–337.
- Snow, D. (1981). Tropical frugivorous birds and their food plants: a world survey. *Biotropica*, 13, 1–14.
- Stevens, P.F. (2001). Angiosperm phylogeny. Version 12, July 2012. URL <http://www.mobot.org/research/APweb/>.

- Stewart, J. M. (1981). *in vitro* fertilization and embryo rescue. *Environmental and Experimental Botany*, 21, 301–315.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K. & Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbiolal Ecology*, 63, 249–266.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. 5th ed., Sinauer Associates, Sunderland (MA), 782p.
- Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Battistoni, F. & Fabiano, E. (2012). New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1692–1700.
- Taylorson, R. B. & Hendricks, S. B. (1979). Overcoming dormancy in seeds with ethanol and other anesthetics. *Planta*, 145, 507-510.
- Thomas, P. & Ravindra, M. B. (1997). Effect of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* root regeneration and growth in micropropagated grapes. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 51, 177–180.
- Trimen, H., Alston, A. H. G. & Hooker, J. D. (1894). *Handbook of the Flora of Ceylon*. 2nd ed., Dulau, London, 244p.
- Uma, S., Lakshmi, S., Saraswathi, M. S., Akbar, A. & Mustaffa, M. M. (2011). Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 105, 105–111.
- Van Oevelen, S., De Wachter, R., Robbrecht, E. & Prinsen, E. (2003). Induction of a crippled phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial endophyte. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 242–247.
- Van Oevelen, S., De Wachter, R., Vandamme, P., Robbrecht, E. & Prinsen, E. (2004). “Candidatus *Burkholderia calva*” and “Candidatus *Burkholderia nigropunctata*” as leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2237–2239.
- Van Trân, V., Berge, O., Kê Ngô, S., Balandreau, J. & Heulin, T. (2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant and Soil*, 218, 273–284.

- Van Wyk, A. E., Kok, P. D. F., Van Bers, N. L. & Van Der Merwe, C. F. (1990). Non - Pathological bacterial symbiosis in *Pachystigma* and *Fadogia* (Rubiaceae): its evolutionary significance and possible involvement in the aetiology of gousiekte in domestic ruminants. *South African Journal of Science*, 86, 93–96.
- Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F. & Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 371–380.
- Verstraete, B., Van Elst, D., Steyn, H., Van Wyk, B., Lemaire, B., Smets, E. & Dessein, S. (2011). Endophytic bacteria in toxic South African plants: identification, phylogeny and possible involvement in gousiekte. *PLoS One*, 6, e19265.
- Verstraete, B., Janssens, S., Smets, E. & Dessein, S. (2013). Symbiotic β -proteobacteria beyond legumes: *Burkholderia* in Rubiaceae. *PLoS One*, 8, e55260.
- Vidal-Quist, J. C., O’Sullivan, L. A., Desert, A., Fivian-Hughes, A. S., Millet, C., Jones, T. H., Weightman, A. J., Rogers, H. J., Berry, C. & Mahenthiralingam, E. (2014). *Arabidopsis thaliana* and *Pisum sativum* models demonstrate that root colonization is an intrinsic trait of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Microbiology*, 160, 373–384.
- Von Faber, F. C. (1912). Das erbliche Zusammenleben von Bakterien und tropischen Pflanzen. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik. Berlin*, 51, 285–375.
- Von Höhnel, F. R. (1881). Anatomische Untersuchungen über einige Secretionsorgane der Pflanzen. *Sitzungsberichte Mathematisch Naturwissenschaftlicher Classe, Kaiserlich Akademie der Wissenschaften in Wien*, 84, 565–603.
- Wooldridge, S. A. (2014). Assessing coral health and resilience in a warming ocean: Why looks can be deceptive. *Bioessays*, 36, 1041–1049.
- Yamada, T. (1955). Studies on the leaf nodules V the formation of knobs by the effect of antibiotics on the *Ardisia crispa* and *A. punctata*. *The Botanical Magazine*, 68, 267–273.
- Yeo, P. F. (1993). Secondary pollen presentation. Form, function and evolution. 1st ed., Springer – Verlag, Vienna, vii+268p.
- Yokota, K. & Hayashi, M. (2011). Function and evolution of nodulation genes in legumes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1341–1351.
- Zimmerman, A. (1902). Über Bakterienknoten in den Blättern einiger Rubiaceen. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik. Berlin*, 37, 1–11.

FIGUREN

Figuur 1: A, B: Arne Sinnesael

C: Brecht Verstraete

Figuur 2: Van Oevelen, S., De Wachter, R., Robbrecht, E. & Prinsen, E. (2003). Induction of a crippled phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial endophyte. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 242–247.

Figuur 3: Bremer, B. & Eriksson, T. (2009). Time Tree of Rubiaceae: Phylogeny and Dating the Family, Subfamilies, and Tribes. *International Journal of Plant Sciences*, 170, 766–793.

Figuur 4: naar Verstraete, B., Janssens, S., Smets, E. & Dessein, S. (2013). Symbiotic β -proteobacteria beyond legumes: Burkholderia in Rubiaceae. *PLoS One*, 8, e55260.

Figuur 5: naar Miller, I.M. (1990). Bacterial leaf nodule symbiosis. *Advances in Botanical Research*, 17, 163–234.

Figuur 6: Arne Sinnesael

Figuur 7: Arne Sinnesael

Figuur 8: Arne Sinnesael

Figuur 9: Arne Sinnesael

Figuur 10: Arne Sinnesael

Figuur 11: Arne Sinnesael

Figuur 12: Arne Sinnesael

Figuur 13: Arne Sinnesael

Figuur 14: Arne Sinnesael

Figuur 15: Arne Sinnesael

ADDENDUM

PCR-gegevens

OVERZICHT GEBRUIKTE PRIMERS

Tabel S1: Overzicht van de gebruikte primers en hun sequenties voor de amplificatie van bacterieel DNA (16S rDNA en *recA*) (Lemaire *et al.*, 2011c) en plantaardig DNA (*actine*).

Regio	Primer	Primer sequentie (5'-3')
16S rDNA	16SB ('forward')	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	16S2 ('reverse')	CAGACTGCGATCCGGACTACTACGATC
<u>recA</u>	recA-F ('forward')	AGGACGATTCATGGAAGAWAGC
	recA-R ('reverse')	GACGCACYGAYGMRTAGAACTT
<i>actine</i>	FW-actine ('forward')	GATGGATCCTCCATCCAGACACTGTA
	RV-actine ('reverse')	GTATTGTGTTGGACTCTGGTGATGGTGT

OVERZICHT GEBRUIKTE PCR- SCHEMA'S

Tabel S2: Overzicht van de gebruikte PCR-schema's voor de amplificatie van bacterieel DNA (16S rDNA en *recA*) en plantaardig DNA (*actine*).

Primer (‘forward’/ ‘reverse’)	Starttemperatuur	Cyclus	Aantal herhalingen	Eindtemperatuur
			cyclus	
16S rDNA (16SB/16S2)	94°C (2')	1) 94 °C (20") 2) 62 °C (30") 3) 72 °C (45")	30x	72°C (3')
<i>recA</i> (<i>recA-F/recA-R</i>)	94°C (2')	1) 94 °C (45") 2) 58 °C (45") 3) 72 °C (1' 30")	30x	72°C (4')
<i>actine</i>	94°C (2')	1) 94 °C (30") 2) 55 °C (30") 3) 72 °C (30")	35x	72°C (5')

Deze PCR-schema's van 16S rDNA en *recA* hebben een hogere hybridisatietemperatuur om de kans op aspecifieke hybridisatie tussen de primer en andere DNA-regio's te beperken.

Risico-analyse (Naar BIG KU Leuven, databank gevaarlijke stoffen)

MATERIAAL

- 1) Inzamelen in serres
 - Opletten voor mogelijke schaafwonden of snijwonden.
 - Persoonlijke maatregelen: inenting tegen tetanus.
- 2) Silicagel:
 - Licht irriterend voor ademhalingswegen en ogen.
 - Persoonlijke maatregelen: handschoenen en beschermende kledij gebruiken.

De overige handelingen en gebruikte materialen worden niet als risicovol beschouwd.

OPKWEEMETHODEN

STERILISATIE

- 1) Ethanol 70%; 100%
 - H-zinnen:
 - H225: licht ontvlambare vloeistof.
 - P-zinnen:
 - P210: verwijderd houden van warmte, vonken en open vuur of hete oppervlakken. Niet roken.
 - P233: in goed gesloten verpakking bewaren.
 - P241: explosie veilige elektrische, ventilatie- en verlichtingsapparatuur gebruiken.
 - P242: uitsluitend vonkvrij gereedschap gebruiken.
 - P243: voorzorgsmaatregelen treffen tegen ontladingen van statische elektriciteit.
 - P280: beschermende handschoenen en oog- en gelaatsbescherming.
 - P303 + 361 + 353: bij contact met de huid (of met haar): verontreinigde kleding onmiddellijk uit trekken, huid met water afspoelen of afdouchen.
 - P370 + 378: in geval van brand: blussen met geschikt blusmiddel.
 - P403 + P235: op een goed geventileerde plaats bewaren. Koel bewaren.
 - P501: inhoud/verpakking afvoeren naar producent/bevoegde dienst.
- 2) natriumhypochloriet 1,6%
 - geen gevaarlijke stof.

AANMAAK GROEIMEDIUM

1) waterstofchloride

- H-zinnen:
 - H314: veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.
 - H335: kan irritatie aan de luchtwegen veroorzaken.
- P-zinnen:
 - P280: zie hierboven.
 - P260: stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel niet inademen.
 - P261: inademing vermijden.
 - P271: alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.
 - P264: na het werken met dit product de handen grondig wassen.
 - P310: onmiddellijk een **antigifcentrum** of een arts raadplegen.
 - P312: bij onwel voelen een **antigifcentrum** of een arts raadplegen.
 - P321: specifieke behandeling vereist (zie informatie op dit etiket).
 - P304 + P340: **na inademing**: het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt.
 - P363: verontreinigde kleding wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken.
 - P305 + P351 + P338: **bij contact met de ogen**: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen.
 - P301 + P330 + P331: **na inslikken**: de mond spoelen — **geen** braken opwekken.
 - P403 + P233: op een goed geventileerde plaats bewaren. In goed gesloten verpakking bewaren.
 - P405: achter slot bewaren.
 - P303 + 361 + 353; P501: zie hierboven.

2) Natriumhydroxide

- H-zinnen:
 - H290: kan bijtend zijn voor metalen.
 - H314: zie hierboven.
- P-zinnen:
 - P280: zie hierboven.
 - P234: uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren.
 - P390: gelekte/gemorste stof opnemen om materiële schade te vermijden.
 - P406: in corrosiebestendige houder of in houder met corrosiebestendige binnenbekleding bewaren.

- P260; P264; P310; P321; P304 + P340; P303 + P361 + P353; P363; P305 + P351 + P338; P301 + P330 + P331; P405; P501: zie hierboven.
- 3) 6-benzylaminopurine:
- H-zinnen:
 - H315: veroorzaakt huidirritatie.
 - H319: veroorzaakt ernstige oogirritatie.
 - H335: zie hierboven.
 - P-zinnen:
 - P261; P305 + P351 + P338: zie hierboven
- 4) Indool-3-azijnzuur
- H-zinnen:
 - H315; H319; H335: zie hierboven.
 - P-zinnen:
 - P302 + P352: **bij contact met de huid**: met veel water en zeep wassen.
 - P264; P271; P280; P312; P321; P304 + P340; P305 + P351 + P338: zie hierboven.
 - P332 + P313: bij huidirritatie: een arts raadplegen.
 - P337 + P313: bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen.
 - P403+P233; P405; P501: zie hierboven.

KIEMINGSMETHODEN

- 1) Afvlammen proefbuis:
 - Mogelijkheid tot brandwonden.
 - Persoonlijke veiligheid: voldoende afstand houden met de vlam, na sterilisatie van de handen met 70% ethanol voldoende wachten om deze opnieuw te gebruiken.
- 2) Glass bead sterilizer
 - Mogelijkheid tot brandwonden.
 - Persoonlijke veiligheid: instrumenten laten afkoelen voor het gebruik ervan.
- 3) Scalpel
 - Mogelijkheid tot snijwonden.
 - Persoonlijke veiligheid: voorzichtig omspringen met het lemmet.

DNA-ISOLATIE

- 1) Stikstof, vloeibaar, diep gekoeld
 - H-zinnen
 - H281: bevat sterk gekoeld gas; kan cryogene brandwonden of letsels veroorzaken.

- P-zinnen
 - P282: koude-isolerende handschoenen/gelaatsbescherming/oogbescherming dragen.
 - P315: onmiddellijk een arts raadplegen.
 - P336: bevroren lichaamsdelen met lauw water ontdooien. Niet wrijven op de betrokken plaatsen.
 - P403: op een goed geventileerde plaats bewaren.

2) Chloroform

- H-zinnen:
 - H351: verdacht van het veroorzaken van kanker.
 - H302: schadelijk bij inslikken.
 - H373: kan schade aan organen veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling bij inademing. Kan schade aan organen veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling bij inslikken.
 - H315: zie hierboven.
- P-zinnen:
 - P201: alvorens te gebruiken de speciale aanwijzingen raadplegen.
 - P202: pas gebruiken nadat u alle veiligheidsvoorschriften gelezen en begrepen heeft.
 - P281: de nodige persoonlijke beschermingsuitrusting gebruiken.
 - P308 + P313: **na** (mogelijke) blootstelling: een arts raadplegen.
 - P332 + P313: bij huidirritatie: een arts raadplegen.
 - P302 + P352: **bij contact met de huid**: met veel water en zeep wassen.
 - P301 + P312: **na inslikken**: bij onwel voelen een **antigifcentrum** of een arts raadplegen.
 - P330: de mond spoelen.
 - P260; P264; P270; P280; P314; P321; P362; P405; P501: zie hierboven.

3) Chloroform – isoamyl alcohol mengsel

- H-zinnen:
 - H302; H315; H351; H373: zie hierboven.
- P-zinnen:
 - P281: de nodige persoonlijke beschermingsuitrusting gebruiken.
- a. Isoamylalcohol (3-methyl-1-butanol)
 - H-zinnen:
 - H226: ontvlambare vloeistof en damp.
 - H332: schadelijk bij inademing.
 - H335: zie hierboven.

- P-zinnen:
 - P210; P243; P241; P242; P240; P261; P271; P280; P312; P304 + P340; P303 + P361 + P353; P370 + P378; P403 + P233; P403 + P235; P405; P501: zie hierboven.
- 4) Isopropanol (propaan-2-ol isopropylalcohol)
 - H-zinnen:
 - H225: zie hierboven.
 - H336: kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken.
 - H319: zie hierboven.
 - P-zinnen:
 - P337 + P313: bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen.
 - P210; P243; P241; P242; P240; P261; P264; P271; P280; P312; P304 + P340; P303 + P361 + P353; P305 + P351 + P338; P370 + P378; P403 + P233; P403 + P235; P405; P501: zie hierboven.

GELELECTROFORESE

- 1) Ethidiumbromide
 - H-zinnen:
 - H341: verdacht van het veroorzaken van genetische schade.
 - H330: dodelijk bij inademing.
 - H302: zie hierboven.
 - P-zinnen:
 - P320: specifieke behandeling dringend vereist (zie informatie op dit etiket).
 - P201; P202; P260; P264; P270; P271; P281; P284; P308 + P313; P310; P304 + P340; P301 + P312; P330; P403 + P233; P405; P501: zie hierboven.
- 2) Ultraviolet licht
 - Bij gebruik van de camera, is er geen UV-blootstelling voor de gebruikers.

RASTERELEKTRONENMICROSCOPIE

- 1) Formaldehydedimethylacetaat
 - H-zinnen:
 - H225: zie hierboven.
 - H319; H335: zie hierboven.
 - P-zinnen:
 - P337 + P313: bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen.

- P210; P243; P264; P271; P280; P312; P304 + P340; P305 + P351 + P338; P370 + P378; P405; P403 + P233; P403 + P235; P501: zie hierboven.

2) Vloeibaar CO₂

- H-zinnen:
 - H280: bevat gas onder druk; kan ontploffen bij verwarming.
- P-zinnen:
 - P410 + P403: tegen zonlicht beschermen. Op een goed geventileerde plaats bewaren.

3) Argon

- H-zinnen:
 - H280: zie hierboven.
- P-zinnen:
 - P410 + P403: zie hierboven.

PLANT CONSERVATION AND POPULATION BIOLOGY

Kasteelpark Arenberg 31 – box 2435
3000 LEUVEN, BELGIË
tel. + 32 16 32 15 20
fax + 32 16 32 19 68
www.kuleuven.be

