

# Minor plantenveredeling 1

# Dictaat Weefselweek



M. Drok

juli 2009

# Dictaat Weefselkweek

## Gedeelten “Basis” en “Verdieping”

Onderdeel van het spectrum van dictaten gemaakt in het kader van het RIGO-project “Minor Plantenveredeling” door Jasper den Besten (HASDB)

Wieneke van der Heide(CAH)

Barend Gehner (CAH)

Michiel Drok (CAH)

In nauwe samenwerking met vertegenwoordigers van het Plantenveredelingsbedrijfsleven

Juli 2009

## Voorwoord

De plantenveredelingsector heeft grote moeite de openstaande vacatures vervuld te krijgen. De instroom in de faculteit Plantwetenschappen op de Landbouwniversiteit en die in Tuin-, en Akkerbouw op het Hoger Agrarisch Onderwijs is te klein om de openvallende plaatsen in te vullen en aan de behoefte te voldoen. Bovendien gaat dit gepaard met een sterke groei van de veredelingsbedrijven.

In 2006 is een RIGO-project aangevraagd en toegekend dat tot doel heeft de eisen op gebied van competenties, kennis, vaardigheden en houding goed te definiëren voor een assistent veredelaar. Deze competenties kunnen worden behaald in een halfjaardurende specialisatie binnen het Hoger Agrarisch Onderwijs. In de wandeling werd het project de “Minor Plantenveredeling HAO” genoemd.

Deze minor plantenveredeling is tot stand gekomen in samenspraak met Wageningen Universiteit, HAS Den Bosch, CAH-Dronten en de volgende veredelingsbedrijven: Bejo, De Ruiter Seeds, Enza Zaden, HZPC, Nunhems, Rijk Zwaan en Syngenta. Ook heeft de brancheorganisatie PlantumNL een bijdrage geleverd.

Dit project is afgesloten in de zomer van 2009 en heeft naast een verdergaande samenwerking tussen de partners een aantal dictaten opgeleverd die de leerstof beschrijven zoals die in overleg is vastgesteld.

Dit dictaat is een van de resultaten van het project.

Voor commentaar op, overleg over en gebruik van dit projectresultaat kunt U contact opnemen met:

Mevr. Ir. W. M. van der Heide

De Drieslag 1

8251 JZ Dronten

0321-386151

[hew@cah.nl](mailto:hew@cah.nl)

Inhoud:

Inleiding.....	8
1. Historie, stand van zaken.....	9
1.1 Historie.....	9
1.2 Enige (oude) cijfers.....	12
2. Typen cel- en weefselcultuur.....	14
2.1 Inleiding.....	14
3. Benodigdheden voor in-vitro cultuur.....	16
3.1 Algemene gang van zaken.....	16
3.2 Opkweek plantmateriaal.....	17
3.3 Het maken van het medium.....	17
3.4 Sterilisatie plantmateriaal.....	18
3.5 Sterilisatie van het medium.....	18
3.6 Het verkrijgen van het explantaat.....	19
3.7 Het enten van het explantaat.....	19
3.8 Het kweken van het geënte explantaat.....	19
3.9 Overgaan naar in-vivo.....	19
4. Factoren van invloed op in-vitro cultuur.....	20
4.1 Inleiding.....	20
4.2 Medium.....	20
4.2.1 Minerale zouten.....	20
4.2.2 Koolstofbron.....	21
4.2.3 Vitaminen.....	22
4.2.4 Hormonen.....	22
4.2.5 Andere organische stoffen.....	23
4.2.6 Antibiotica en systemische fungiciden.....	24
4.3 Explantaat.....	24
4.3.1 De grootte van het explantaat.....	25
4.3.2 Positie van het explantaat in de plant.....	25
4.3.3 Fysiologische ouderdom van het explantaat.....	25
4.3.4 Genotype van het explantaat.....	26
4.3.5 Polariteit.....	26
4.3.6 Subcultuur.....	27
4.4 Licht.....	28
4.5 Temperatuur.....	29
4.6 Gasfase.....	30
4.7 Seizoensinvloeden.....	31
5. Snelle vermeerdering.....	32
6. Meristeencultuur.....	33
7. Synthetic seed.....	35
7.1 Keuze van het gewas.....	35
7.2 Optimalisering van de embryogenese.....	37
7.3 Optimalisering van de embryorijsing.....	38
7.4 Automatisering van de productie.....	38
7.5 Synchronisatie en accumulatie van somatische embryo's.....	39

7.6	Inhulling van embryo's.....	40
7.7	Bewaring, verpakking.....	42
7.8	Verzaaibaarheid.....	43
7.9	Kiemplantontwikkeling.....	43
7.10	Bescherming tegen ziekten en plagen.....	43
7.11	Kwaliteit en prijs t.o.v. klassiek uitgangsmateriaal.....	43
8.	Embryocultuur.....	44
8.1	Groei en ontwikkeling van normale embryo's.....	44
8.2	In vitro kweek van embryo's.....	44
8.2.1	Cultuur van onvolgroeide embryo's.....	45
8.2.1.1	Voortijdige kieming.....	45
8.2.2	Cultuur van volgroeide embryo's.....	46
9.	Calluscultuur.....	47
10.	Antherencultuur.....	49
10.2	Factoren van invloed op een antherencultuur.....	51
10.2.1	Genotype.....	51
10.2.2	Omstandigheden waaronder donor-planten zijn opgegroeid.....	51
10.2.3	Leeftijd van de donor plant.....	51
10.2.4	Ontwikkelingsstadium van het pollen.....	51
10.2.5	Methode van sterilisatie.....	52
10.2.6	Voorbehandeling van antheren.....	52
10.2.7	Medium.....	52
10.2.8	Gasfase.....	53
10.2.9	Cultuurdichtheid.....	53
10.2.10	Incubatie-omstandigheden: licht en temperatuur.....	53
10.2.11	Conditie voor regeneratie van complete planten.....	54
10.3	Karakteristieken van geregenereerde planten.....	54
10.4	Conclusies.....	55
11.	Protoplastencultuur.....	56
11.1	Uitgangsmateriaal.....	56
11.1.1	De opkweek.....	56
11.1.2	De selectie van planteweefsels.....	56
11.2	Van weefsel tot protoplast.....	57
11.2.1	Sterilisatie van plantmateriaal.....	57
11.2.2	Het osmoticum.....	58
11.2.3	Zuivering.....	58
11.2.4	De selectie op levensvatbaarheid.....	59
11.2.5	Regeneratie.....	59
12	Toepassingen in de plantenveredeling.....	61
12.1	Chromosoomverdubbeling.....	61
12.2	Mutatie-inductie en selectie in vitro.....	61
12.3	Productie van haploïden via antheren-, microsporen-, zaadknop- of vruchtbeginselcultuur.....	62
12.4	In vitro bevruchting.....	62
12.5	Embryocultuur.....	62
12.6	Somatische hybridisatie.....	62

---

---

12.7 Genoverdracht.....	62
13. Toepassingen in de gewasbescherming.....	64
13.1 Fytosanitair transport .....	64
13.2 Zoeken naar resistenties.....	64
13.3 In vitro selectie op resistentie .....	64

## Inleiding

Als onderdeel van de minor Plantenveredeling een onderdeel "Weefselkweek" opgenomen. Dit is onderverdeeld in een gedeelte "Basis" en "Verdieping". Ook maakt een stuk practicum onderdeel uit van de module.

Gewoonlijk wordt gesproken van "Weefselkweek". Daarmee wordt aangegeven dat plantenweefsels als uitgangsmateriaal kunnen dienen voor nieuwe planten. Het is ongetwijfeld één van de belangrijkste steunpilaren voor de plantenbiotechnologie. Weefselkweek is het proces waarbij kleine gedeelten van levend weefsel (explantaten) geïsoleerd worden uit organismen en waarbij die gedeelten steriel worden opgegroeid voor onbepaalde tijd op een min of meer gedefinieerd voedingsmedium. Deze oorspronkelijke definitie moet voor het geval van planten wat uitgebreid worden. Een hele serie explantaten variërend van groot, zoals zaailingen en complete organen (bijv. embryocultuur) tot klein, zoals enkele cellen of protoplasten (celcultuur resp. protoplastencultuur), kan op een voedingsmedium worden gekweekt.

De belangrijkste toepassing wordt gevonden in de zogenaamde '*snelle vegetatieve vermeerdering*' zoals die wordt geïmplementeerd door diverse Nederlandse bedrijven. Zij wordt vooraf gegaan door een kort historisch overzicht. Niet omdat dat nu eenmaal zo hoort, maar meer omdat diverse problemen waartegen onderzoekers in het verleden aanliepen, nog steeds actueel zijn. Ook zal er aandacht besteed worden aan *meristeen* en *kunstaad*.

Zelf gaan we ook het één en ander aan weefselkweek doen. Daarvoor is het nodig een aantal zaken op een rijtje te zetten. Wat zijn de stappen in zo'n kweek, wat hebben we ervoor nodig en welke factoren zijn van invloed op het slagen van een weefselkweek?

Dit dictaat dient slechts als leidraad voor de theorielessen. Uitgebreidere informatie is te vinden in het boekje van prof. Pierik: 'Plantenteelt in kweekbuizen'. Ook het boekje van Margara is aan te bevelen (beide zijn te vinden in de mediatheek). Voor meer praktische tips wordt verwezen naar de practicumhandleiding.



# 1. Historie, stand van zaken.

## 1.1 Historie

De eerste weefselkweek vond plaats met dierlijk weefsel. Roux (1885) plaatste een gedeelte van de neurale plaat van een vogelembryo op een warme zoutoplossing. Het weefsel begon te delen.

Als eerste planteweefselkweker geldt Gottlieb Haberlandt (1854-1945). In 1902 probeerde hij geïsoleerde cellen te kweken op een voedingsmedium. Dit mislukte echter. Achteraf gezien is dat niet zo verwonderlijk. Haberlandt werkte met een monocotyl (*Tradescantia*); monocotylen zijn in de weefselkweek niet de gemakkelijkste soorten. Bovendien betrok hij zijn cellen van volwassen pallisadeparenchym uit bladeren. Dit weefsel was hoog gedifferentieerd en waarschijnlijk besmet met bacteriën.

De cultuur die Haberlandt probeerde, zou in deze tijd met de beschikking over moderne media en mogelijkheden om aseptisch te werken, ook niet de eenvoudigste zijn. Dat Haberlandt een toekomstvisie had, mag blijken uit de volgende uitspraak gedaan in 1902:

*'Ik zou erop willen wijzen dat in mijn culturen, ondanks regelmatig te constateren groei, celdeling (bijna) nooit optreedt. Het zal het probleem van toekomstige cultuurexperimenten zijn, te onderzoeken onder welke voorwaarden cellen delen'*

Inderdaad is het zo dat het moeilijkste onderdeel van regeneratie van planten uit losse cellen of protoplasten, is gelegen in het op gang brengen van de celdeling.

Terwijl Haberlandt met losse cellen werkte, probeerde Harrison (1907) het met intact weefsel. Hij plaatste levende bladnerven op een medium. De cultuur mislukte.

Carrel heeft de lijn van Haberlandt voortgezet maar dan met dierlijke cellen. In 1948 verklaarde hij dat:

*'Het bestuderen van levende cellen in een erlenmeyer even gemakkelijk is als het bestuderen van bijen in een bijenkorf!'*

Vanaf ca. 1920 zijn diverse onderzoekers bezig geweest complete planten te verkrijgen uit wortelpuntjes van diverse planten. In 1934 is het White gelukt een cultuur van tomatenplanten te verkrijgen uit tomatewortels op een door hem zelf ontworpen medium.

Bovengenoemd onderzoek werd ingegeven door de idee van de totipotentie. Omdat somatisch weefsel (weefsel bestaande uit 'lichaamscellen', dus niet-geslachts cellen) uiteindelijk het product is van mitotische delingen, zal elke cel in het organisme in staat zijn een ander vergelijkbaar organisme te genereren, verondersteld dat daarvoor de omstandigheden gunstig zijn. Of, in definitie, totipotentie is het vermogen van een enkele cel, het fenotype te regenereren van het complete en gedifferentieerde organisme waarvan hij afkomstig is.

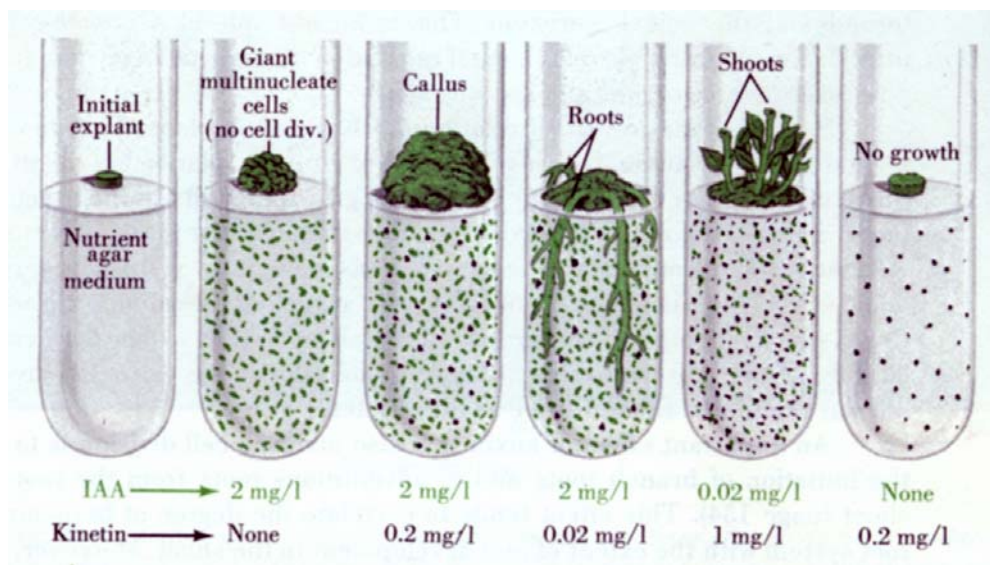
In planten vindt de meeste, gecoördineerde celdeling plaats in geconcentreerde gebieden bekend als meristemen, deze meristemen ontstaan op diverse plaatsen in een zich ontwikkelend organisme. De activiteit van het meristeem is afhankelijk van de differentiatiegraad in het meris-

teem. Deze wordt weer gereguleerd door genetische en/of uitwendige controlemechanismen.

Uit dit inleidend verhaaltje over de totipotentietheorie moge duidelijk zijn waarom verschillende onderzoekers gewerkt hebben met wortelpuntjes; daar bevindt zich immers meristematisch weefsel. Niet alleen wortelpuntjes hebben in de eerste helft van deze eeuw in het middelpunt van de belangstelling gestaan. Ook andere invalshoeken, in mindere of meerdere mate gebaseerd op het totipotentie-concept, zijn gekozen. Voorbeelden:

- \* 1934: Gautheret zet weefsel aanwezig rondom een wond op een vast medium. Er trad callusvorming op (callus = ongedifferentieerd weefsel). Dit werk is later voortgezet door fytopathologen. Kroongallen (geproduceerd door *Agrobacterium tumefaciens*) konden vrij gemakkelijk gekweekt worden op medium.
- \* Ball (1946) wist precies aan te geven uit welk deel van het scheutmeristeem van *Tropaeolum* (Oostindische kers) en van lupine, de hele plant kon ontstaan.

De ontwikkelingen in de eerste helft van deze eeuw werden gekenmerkt door het grote aantal mislukkingen. De belangrijkste oorzaak hiervan is het ontbreken van kennis aangaande groeiregulators. In 1957 kwam daar verandering in. Men ontdekte dat kokosmelk een stimulerende werking had op de groei van verschillende planten. Het effect moest vooral toegeschreven worden aan de werking van kinetine, een van de vertegenwoordigers van de cytokininen. Skoog & Miller constateerden dat auxine en cytokinine tezamen een synergistisch effect hadden op het bevorderen van de celdeling.



Figuur 1. Groei-reactie van plantweefsel op auxine en kinetine. Het explantaat is een stukje merg uit de stengel van tabak (uit: Skoog en Miller 1957)

Sinds deze ontdekkingen zijn de ontwikkelingen snel gegaan. Enkele voorbeelden:

- \* 1958: Steward c.s. berichten dat wortelcelsuspensies ongeorganiseerde celclusters produceerden, welke eerst weer wortels, later scheuten en tenslotte complete planten opleverden.

- \* 1962: Murashige & Skoog publiceren een voorschrift voor een medium voor tabak. Dit medium is nog steeds het meest gebruikte. (MS-medium)
- \* Hildebrandt regeneert een complete volwassen tabaksplant uit één cel.
- \* 1981: Het is gelukt om een hele tabaksplant te verkrijgen uit één vrije protoplast.

De tijdsduur tussen de geslaagde regeneratie van een tabaksplant uit een cel en die uit een protoplast, laat zien dat die regeneratie niet eenvoudig is. Ook nu nog zijn de regeneratieproblemen levensgroot. Bedacht moet worden dat een techniek als protoplastenfusie alleen zin heeft wanneer een plant uit het fusieproduct geregeneerd kan worden.

Enkele ingewijden hebben over de regeneratieproblematiek het volgende gezegd:

*'Het probleem van het induceren van morfogenese is zo fundamenteel dat, ondanks toevoeging of manipulatie van auxinen, cytokininen of andere componenten van het medium of van het uitwendige milieu, onderzoekers soms niet in staat zijn celdelingen te stimuleren of echt callus te verkrijgen. Zelfs wanneer callusvorming optreedt, worden in de verdere regeneratie vaak wortels geproduceerd en niet scheuten; regeneratie van de hele plant vindt niet plaats'.*

En:

*'De totipotentie van cellen is op zijn best fragiel. Fundamenteel onderzoek van de biochemie van de morfogenese is hard nodig'.*

Fundamenteel onderzoek met betrekking tot de weefselkweek staat op een laag pitje; er is geen geld mee te verdienen. Slechts op een paar plaatsen in Nederland wordt eraan getrokken met name in Nijmegen, Wageningen en Leiden. Overigens komen we de beperkingen in de kennis steeds vaker tegen en daarom wordt er op een aantal andere laboratoria ook wel het een en ander aan 'toegepast fundamenteel' onderzoek gedaan. Theoretische kunnen we er wel het één en ander over zeggen.

De totipotentie-theorie veronderstelt dat somatische cellen afkomstig van meristemen, tijdens de differentiatie al hun DNA behouden en dat dat DNA functioneel blijft. Differentiatie mag dus niet resulteren in permanente veranderingen in het DNA. Het lijkt erop dat dergelijke veranderingen wel degelijk optreden en dat totipotentie dus afhankelijk is van het differentiatiestadium.

Cellen die zich in een vroeg ontwikkelingsstadium bevinden (bijv. meristematische en embryogene cellen), worden '*niet-gedetermineerd*' genoemd. Deze cellen kunnen zich in alle mogelijke richtingen ontwikkelen, afhankelijk van de omstandigheden. Niet-gedetermineerde cellen kunnen ook gemakkelijk de-differentiëren om zo calli te vormen. Cellen die zo ver ontwikkeld zijn dat ze een bepaald gespecialiseerd weefsel vormen (bijv. floëemcellen), kunnen moeilijk de-differentiëren en callus vormen.

De conclusie is dat alleen weinig gedetermineerde cellen totipotentie vertonen en geschikt zijn voor snelle vermeerdering in-vitro.

Een complicerende factor is nog dat lang niet alle cellen zonder meer diploïd zijn. In bladeren is het merendeel dat nog wel maar nerven, stengels en wortels hebben een rijke schakering in ploïdie niveaus

De boven geschetste ontwikkelingen hebben zich voorgedaan vooral in Europa en Amerika. Wanneer we de ontwikkelingen in Nederland bezien, dan kunnen we constateren dat de weefselkweek hier te lande een flinke duw heeft gekregen door de behoefte aan virusvrij plantmateriaal.

Het grote voorbeeld zijn Morel & Martin in Frankrijk geweest. In 1952 wisten zij virusvrije dahlia's te verkrijgen door meristeemcultuur in-vitro toe te passen. In 1957 konden onderzoekers de anjer virusvrij vermeerderen. Het werk is vanaf 1960 overgenomen door het Nederlandse bedrijfsleven.

De orchideeënvermeerdering heeft een dergelijke ontwikkeling doorgemaakt. In 1960 kon Morel in Frankrijk *Cymbidium* vegetatief in-vitro vermeerderen. Vanaf 1965 wordt dit door het bedrijfsleven gedaan. Sinds ongeveer 1976 worden verschillende gewassen door het bedrijfsleven vermeerderd in-vitro.

## 1.2 Enige (oude) cijfers

Op het moment is het zo dat voor zo'n 3500 soorten in-vitro vermeerdering mogelijk blijkt. Dat is veel, maar voor een aantal plantensoorten is het nog niet (of nauwelijks) gelukt zo'n vermeerdering te bewerkstelligen.

Wanneer we het sortiment overzien dan blijken de meeste in-vitro plantjes tot de siergewassen te behoren. In Nederland worden 30 plantensoorten op grote schaal vermeerderd (meer dan 100.000 planten per jaar). Slechts één hiervan behoort tot de voedingsgewassen, nl. de aardappel.

De geschatte totale productie van vegetatief vermeerderde planten is in Nederland 3 miljard. Professor Pierik publiceerde elk jaar een overzicht van de productie van de diverse planten in-vitro. In 1990 is hij er mee gestopt omdat het bedrijfsleven niet meer mee wilde werken (uit concurrentie overwegingen). Het ging in die jaren niet meer zo goed met de marges in de gewone snelle vermeerdering. In 1990 zijn waarschijnlijk zo'n 100 miljoen planten (dus ca. 2% van de totale productie) door 50 à 60 weefselkweek-vermeerderingsbedrijven geproduceerd. De vier belangrijkste gewassen zijn uiteraard afkomstig uit de sierteeltsector:

gerbera	18 miljoen stuks
<i>Nephrolepis</i> (varen)	12 miljoen stuks
kaaps viooltje	10 miljoen stuks
lelie	9 miljoen stuks

Laten we twee vergelijkende voorbeelden bekijken:

### Gerbera

Er is in Nederland een jaarlijkse behoefte van ca. 25 miljoen stekken voor de snijbloemproductie. Hiervan wordt 90% geproduceerd in weefselkweeklaboratoria.

## Lelie

De klassieke vermeerderingsmethode vindt plaats via schubcultuur (300 miljoen stuks in Nederland). De productie van 9 miljoen (3%) via weefselkweek betreft voornamelijk de snelle vermeerdering van nieuwigheden.

Indien de weefselkweekproductieprij tot 1/3 van de huidige prijs kan worden teruggedrongen zal waarschijnlijk ook bij de lelies de klassieke vermeerderingsmethode verdrongen worden door de weefselkweek.

Wat voor de lelie verwacht wordt, geldt ook voor andere gewassen: de totale productie van weefselkweekplanten zal gestaag stijgen.

De commerciële weefselkweek heeft zich in Nederland vooral toegelegd op snelle, efficiënte, veelal vegetatieve vermeerdering van gewassen. Omdat bij die vermeerdering vele mensenhanden komen kijken, zijn de loonkosten in die bedrijven hoog (60-70% van de totale kosten). We zien dan ook een opbloeiende concurrentie met landen waar de lonen lager liggen (bijv. Italië, Spanje, Polen en India). Een land als Italië heeft zich voornamelijk toegelegd op de vermeerdering van houtige gewassen zoals fruitgewassen (bijv. perzikonderstammen: 10 miljoen planten/jaar) en laan- en bosbomen, en daarnaast op aardbeimoerplanten (virusvrij via meristecultuur).

In november 1996 is er een meer summier overzicht gegeven in een lezing die Pierik gehouden heeft. Hij vertelde dat er ook in 1995 nog ongeveer 100 miljoen planten door NL werden geproduceerd maar dat er een duidelijke spreiding te zien is. Nederlandse bedrijven doen de moeilijke dingen zelf en de massa vermeerdering wordt gedaan in landen als India en Polen. In India wordt de productie doorgaans gedaan in satelliet-laboratoria van multinationale vermeerderingsbedrijven of door dependences van kleinere vermeerderaars, o.a. uit NL en GB. De productiesnelheid en kwaliteit zijn hoog en er zijn geen douane beperkingen (bijv. i.v.m. quarantaine) omdat de plantjes steriel zijn. Zo kan de prijs per plantje concurrerend worden gehouden. Van de "Nederlandse" productie komt zo'n 65% uit laboratoria die door Nederlanders in die landen zijn opgericht en worden gerund. Ook al omdat het aanbod van arbeid vrij ruim is worden er ook soepele aanname- en ontslagregelingen geïmplementeerd. De letterlijke inhoud van de kreet "tijdelijk werk" is daar goed te vatten.

Om de concurrentieslag te overleven wordt naarstig gezocht naar methoden om de loonkosten te drukken. Een mogelijkheid is gelegen in de introductie van de robot. Deze zou buizen en potten automatisch kunnen vullen en plantjes versnijden. In Nederland is zo'n robot te koop die gestrekte erwte-(maar ook andere)plantjes met laserlicht in stukken snijdt en plaatst op een medium. Wanneer we te maken hebben met meer rozetvormige planten (bijv. de gerbera), lijkt deze methode vooralsnog niet toepasbaar.

Vegetatieve vermeerdering in-vitro blijkt dus een populaire techniek te zijn. Enkele vragen kunnen nu gesteld worden:

1. Waarom wordt die vermeerdering toegepast?
2. Op welke manieren kan de vegetatieve vermeerdering worden toegepast?
3. Aan welke eisen moet zo'n vermeerderingsmethode voldoen?

- Ad 1. Enkele redenen waarom vegetatieve vermeerdering (klonen) in-vitro wordt toegepast:
- a. Snelle vermeerdering van nieuwe cultivars om ze te testen en vervolgens in commerciële productie te brengen.
  - b. Eliminatie van virussen uit geïnfecteerde voorraden.
  - c. Vegetatieve vermeerdering van generatief moeilijk te vermeerderen soorten.
  - d. Jaarrond vermeerdering van planten mogelijk. (In de buis ook seizoensinvloeden!)
  - e. Vermeerdering van genetisch uniforme planten in grote aantallen voor bijv. groot-schalige zaadproductie (van bijv. hybriden).
  - f. Ruimtebesparing door kweek in buis in plaats van in de kas.
  - g. Goedkoper (?)

Ad 2. Dit zal in een volgend hoofdstuk worden behandeld.

Ad 3. De ideale vermeerderingsmethode moet voldoen aan de volgende eisen:

- a. Er moeten zoveel mogelijk plantjes uit één plant gevormd worden.
- b. De groei van deze plantjes moet goed zijn.
- c. Plantjes moeten na uitplanten in de grond goed uitgroeien.

Onderzoek dat gericht is op het optimaliseren van de vermeerderingsmethode, is vaak geconcentreerd op deze 3 aspecten. Bedacht moet worden dat er onderlinge concurrentie tussen de aspecten mogelijk is. Zo zal een hoger aantal plantjes per pot/buis (a) vaak te koste gaan van een goede groei van de plantjes (b).

Bovenstaand verhaal spitste zich toe op de snelle vegetatieve vermeerdering zoals die o.a. in bedrijven wordt uitgevoerd. Maar ook in andere sectoren wordt veelvuldig gebruik gemaakt van cel- en weefselkweek, bijv. in de veredeling en in de gewasbescherming. Dikwijls gaat het dan niet om snelle vegetatieve vermeerdering, maar om andere (ingewikkelder) technieken zoals antheren-, embryo- en protoplastencultuur.

## 2. Typen cel- en weefselcultuur

### 2.1 Inleiding

Naar de aard van het explantaat dat in cultuur wordt gebracht, onderscheiden we diverse typen

cel- en weefselweek.

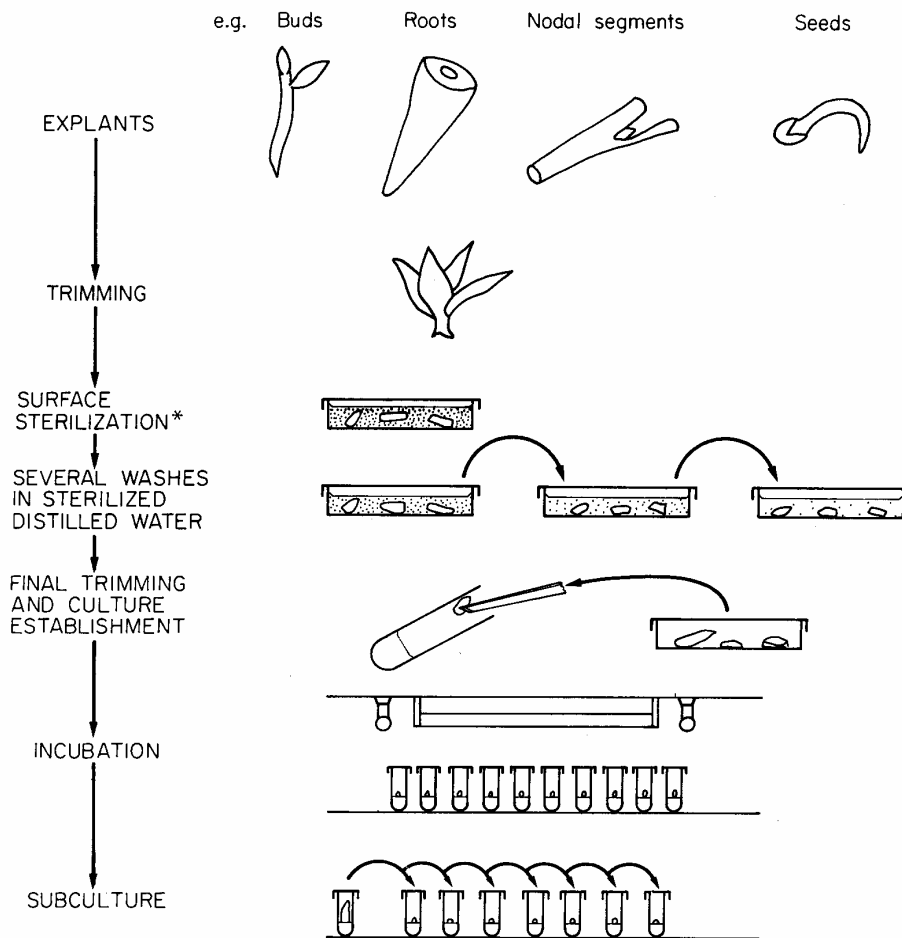
Wanneer we de verschillende typen opsommen en daarbij het belangrijkste doel van toepassing aangeven, krijgen we het volgende schema:

<u>Type cultuur</u>	<u>Doel van gebruik van de cultuur o.a.</u>
- Zaadcultuur	Het verkrijgen van planten in steriele cultuur
- Meristeencultuur	Het verkrijgen van ziektevrij materiaal
- Embryocultuur	Bescherming tegen embryoabortie (embryo rescue)
- Explanataatcultuur	Het kloneren van planten via adventieve scheutvorming
- Scheuttopcultuur	Vermeerdering van o.a. varens. Ook als tussenstap bij bijv. de axilaire spruitmethode
- Internodiëncultuur	Het kloneren van planten via axillaire knoppen (microstekmethode of oogstekmethode)
- Calluscultuur	Tussenschakel in klonale vermeerderingstechnieken
- Cultuur van eicellen	Omzeilen van de incompatibiliteit door en afgesneden stijlen bevruchting op voedingsbodem. (In-vitro Fertilisatie)
- Antherencultuur	Productie van haploïden, als er tenminste planten uit pollenkorrels regenereren
- Protoplastencultuur	Somatische hybridisatie
- (Cel)suspensiecultuur	Productie van secundaire metabolieten. Ook voor microsporenvermeerdering en eerste aanzet tot deling.
- Somatische embryogenese	Vermeerdering van embryo's, ook een methode om planten te regenereren uit een cel.

### 3. Benodigheden voor in-vitro cultuur.

#### 3.1 Algemene gang van zaken

Na een wat theoretische beschouwing over in-vitro vermeerdering, gaan we in dit hoofdstuk wat praktischer bezig. Hoe wordt nu een kweek opgezet en wat hebben we er allemaal voor nodig?



\*See Appendix 4 for sterilizing agents

Figuur 2. Schematische voorstelling van de basisprocedure die gevolgd wordt bij het opzetten van een weefselweek (Uit: Pierik; *In Vitro Culture of Higher Plants*)

In de bovenstaande figuur is schematisch weergegeven hoe weefselweek in z'n werk gaat. Een explantaat wordt verwijderd uit een opgekweekte plant. Daarna wordt de lucht eruit verdreven



m.b.v. 70% alcohol (enkele seconden) en vervolgens wordt het uitwendig ontsmet met een chlooroplossing (ca. 15 min.), gevolgd door spoelen met steriel leidingwater. Vervolgens wordt in een steriele entkast het explantaat geënt op een vast of vloeibaar voedingsmedium, dat zich in een buis of potje bevindt. Tenslotte vindt incubatie plaats bij bepaalde temperatuur en fotoperiode.

Wanneer het explantaat te groot dreigt te worden of wanneer het medium raakt uitgeput, zal moeten worden overgeënt (subcultuur) en dan meestal op een ander medium. Voor een uitvoerige beschrijving van de werkwijze wordt verwezen naar de practicumhandleiding.

Onderstaand wordt nu een opsomming gegeven van de benodigdheden voor het uitvoeren van een weefselkweek. Vooraf zullen eerst wat opmerkingen worden geplaatst.

- De gegeven opsomming is zeer beknopt, een uitvoerige beschrijving is te vinden in het boekje van prof. Pierik.
- Benodigdheden zowel als efficiëntie zijn sterk afhankelijk van het doel van je kweek: wil je in zo'n kort mogelijke tijd zoveel mogelijk plantjes zo goedkoop mogelijk verkrijgen of is de kweek een hulpmiddel bij de veredeling?
- Ook het type plant dat je wilt gebruiken kan van invloed zijn op de benodigdheden (buizen versus potten, petrischalen of kolven, type medium etc.).

### 3.2 Opkweek plantmateriaal

- kas, klimaatcel
- eventueel kan plantmateriaal gekocht worden

### 3.3 Het maken van het medium

- weegapparatuur (bovenweger, analytische balans, spatels)
- verwarmingsplaatje met magnetische roerder
- pH - meter
- glaswerk: bekers, erlenmeyers, maatcilinders e.d. (Niet alle plastic is geschikt door vrijkomen van oplosmiddelen, de laatste tijd wordt er ook weer meer kunststof vervangen door glas)
- (micro)pipetten om medium te verdelen (evt. dispenser = automatische verdeler)
- buizen, potjes, petrischalen en/of kolven (vloeibaar medium)
- afsluitmateriaal voor buizen
- metalen buizenrekjes

- chemicaliën:

\* saccharose (= sucrose = glucose + fructose)

\* NaOH of HCl om pH bij te stellen

\* Agar (indien vast medium). In sommige culturen is een ander geleermiddel gewenst zoals agarose of Gel-Rite

\* hormonen: # Auxinen: IAA (vrij zwak)

IBA en NAA (sterker)

2,4-D (sterk)

# Cytokinen: kinetine, BAP, IPA (= 2-IP)

# Gibberellinen: GA<sub>3</sub>

\* gedestilleerd (evt. gedemineraliseerd) water. Er zijn weinig voorbeelden te vinden waarbij zeer zuiver water (bijv. Milli-Q) onontbeerlijk is.

- minerale voeding: macro- en microzouten. Deze moet je òf afzonderlijk afwegen òf kant en klaar kopen

- vitamines: bijv. ascorbinezuur, vit. B<sub>12</sub> etc.

Opmerking:

- Voor op grote schaal vermeerderde gewassen zijn kant en klare media beschikbaar.
- Veel van de materialen zullen steriliseerbaar moeten zijn, d.w.z. dat ze hun vorm en functie moeten behouden bij 125°C (stoomsterilisatie) à 180°C (droge sterilisatie).

### 3.4 Sterilisatie plantmateriaal

- alcohol, 70%
- bleekwater (tegenwoordig meestal 4%) + Tween (uitvloeier)
- steriel leidingwater

### 3.5 Sterilisatie van het medium

- hogedrukpan of autoclaaf
- evt. droogstoof voor sterilisatie van glaswerk, filters e.d.
- Millipore filtersysteem om bepaalde stoffen na het autoclaveren toe te voegen, bijv: gibberellinen, vit. B<sub>1</sub>, colchicine, antibiotica en enzymen.

### 3.6 Het verkrijgen van het explantaat

- steriele entkast met gasaansluiting
- Bunsenbrander, liefst met voet-ontsteking. (Deze kan ook worden vervangen door een houder met te verhitten glaspaleltjes)
- alcohol 96%
- pincet, scalpelmesje, prepareernaald e.d. (dubbel setje)
- snijplankje' (bijv. filtreerpapier, petrischaal)

### 3.7 Het enten van het explantaat

- discipline
- geduld

### 3.8 Het kweken van het geënte explantaat

- kweekcel of -kast; officieel heet de laatste een koelbroedstoof. Dit apparaat moet kunnen:
  - \* koelen, verwarmen
  - \* verlichten
  - \* tijdklok voor daglengte
- schudmachine (indien vloeibaar medium)

### 3.9 Overgaan naar in-vivo

- kas met "dubbel glas"
- microplug of iets dergelijks

## 4. Factoren van invloed op in-vitro cultuur.

### 4.1 Inleiding

Iedereen die wel eens met cel- en/of weefselkweek is bezig geweest heeft te maken gehad met een menigte factoren die elk de slagingskans van zo'n kweek sterk kunnen beïnvloeden. Dit hoofdstuk heeft dan ook alles in zich om uit te groeien tot een complex geheel. In de literatuur zijn dan ook erg veel artikelen te vinden die de goede ervaringen van bepaalde onderzoekers met een bepaald medium voor een bepaalde cultivar beschrijven. Ook zijn er regelmatig verslagen van experimenten bij die het optimaliseren van kweekomstandigheden weergeven. Als je zoiets dan zelf probeert te reproduceren dan lukt dat lang niet altijd. Zeker bij het opzetten van een kweek van een 'nieuw' gewas of een andere cultuurmethode zal er veel moeten worden geëxperimenteerd. Veelal zullen verschillende aspecten of componenten van een kweek gevarieerd moeten worden alvorens de combinatie met de grootste slagingskans gevonden is.

Om een structuur aan te brengen in de veelheid van gegevens is er gekozen voor de volgende opzet: De factoren worden onderverdeeld naar drie gebieden van 'herkomst', n.l.

- Factoren die te maken hebben met de samenstelling van het medium,
- Factoren die te maken hebben met (de keuze van) het explantaat
- en tenslotte de omgevingsfactoren die op beide in kunnen werken.

Factoren die betrekking hebben op het menselijk handelen (steriel werken bijv.) zullen hier buiten beschouwing gelaten worden. Niet omdat de invloed op het slagen van de kweek gering zou zijn (!), maar omdat dan de variatie wel erg groot wordt.

### 4.2 Medium

Het is natuurlijk het eenvoudigst gebruik te maken van kant en klare media. In veel voorschriften wordt echter gesproken over een bepaald medium waarbij één of enkele onderdelen (bepaalde zouten bijv.) in bijv. halve sterkte moeten worden toegevoegd. Dan zal toch zelf het medium moeten worden samengesteld.

Een aantal afzonderlijke media-componenten en hun invloed op de kweek zullen nu besproken worden.

#### 4.2.1 Minerale zouten

Het meest gebruikte medium in weefselkweek is dat van Murashige & Skoog (1962). Het

zoutenmengsel in dat medium bestaat uit macrozouten (N, P, K, Ca, Mg, Fe) en microzouten (Mn, Cu, Zn, B, Na, Cl, I, S, Mo, Co, Al en Ni). De exacte samenstelling is te vinden in Pierik, blz. 35.

Wanneer niet duidelijk is welk medium geschikt is voor een nieuw te vermeerderen gewas, wordt meestal begonnen met het MS-medium. In sommige gevallen blijkt een ander medium noodzakelijk te zijn. Gamborg's B5-medium heeft een hoog kalium-nitraat gehalte en heeft daardoor een positieve invloed op de vorming van callus.

Voor zoutgevoelige gewassen (bijv. Gerbera) moet een zoutarm medium worden gebruikt.

Via berekening kan de totale ionenconcentratie van een medium worden vastgesteld. Een hoog aantal ionen (in mmol/l) komt dan overeen met een hoge zoutconcentratie.

Voor de zogenaamde microzouten wordt een grote verscheidenheid van zouten gebruikt en in zeer wisselende samenstellingen. Een aantal stoffen zoals zwavel, chloor en natrium worden gewoonlijk via de macrozouten al toegevoegd.

IJzer is essentieel voor de groei en morfogenese van in-vitro plantjes. Vroeger werd ijzer altijd in de zoutvorm toegediend (bijv. ijzercitraat). Er bleek regelmatig een neerslag van ijzer op te treden. Tegenwoordig wordt meestal gebruik gemaakt van een chelaat-vorm: Fe gebonden aan EDTA. Over de rol van kobalt en nikkel zijn de meningen niet éénduidig. Kobaltnitraat lijkt een etheen-biosyntheseremmer te zijn.

#### 4.2.2 Koolstofbron

Plantjes in-vitro hebben, in tegenstelling tot de in-vivo situatie, een koolstofbron nodig omdat de fotosynthese nog niet optimaal is. In Japan werden experimenten gedaan waarbij CO<sub>2</sub>-bemesting in de buis wordt toegepast; het blijkt dan niet meer nodig suiker aan het medium toe te voegen. Recent onderzoek heeft aangetoond dat rozeplanten tijdens een in-vitro vermeerdering 25 - 60% van de koolstof uit de CO<sub>2</sub> halen.

Als energiebron kunnen sucrose, glucose en fructose dienen. Overige suikers blijken veel minder geschikt. Het belang van suikers is niet alleen gelegen in het functioneren als energiebron, maar ook in het op peil houden van de osmotische waarde van het medium. Dit laatste speelt een bijzonder belangrijke rol als er wordt gewerkt met zeer kwetsbare explantaten, zoals protoplasten en microsporen.

*bijv. Tabak: De beste productie van scheuten wordt verkregen bij een osmotische waarde die wordt verkregen bij een suikergehalte tussen 2% en 4%, ook indien een gedeelte van de sucrose wordt vervangen door mannitol (mannitol kan niet of nauwelijks als energiebron gebruikt worden).*

De hoeveelheid suikers speelt een rol bij de morfogenese (het ontstaan van de vorm van een plant).

*Bijv. Liliaceae: 30 g/l sucrose: 100% van de scheuttopexplantaten vormt bolletjes. 90 g/l: ca. 10% vormt bolletjes, overige callus; bij deze concentratie was de rhizogenese (vorming van wortels) beter dan bij 30 g/l.*

### 4.2.3 Vitaminen

In-vitro plantjes hebben vitaminen nodig. In de meeste gevallen kunnen planten die zelf maken wanneer maar voldoende N voorhanden is.

In sommige gevallen worden vitaminen bij wijze van voorzorg toegediend. In andere gevallen blijkt bij toevoeging de cultuur wat beter te verlopen. Voorbeelden van vitaminen die regelmatig gebruikt worden: inositol en thiamine (= vit. B<sub>1</sub>).

### 4.2.4 Hormonen

Skoog & Miller (1957) ontdekten dat één van de fundamentele reguleringsmechanismen in de organogenese (vorming van plant'organen', zoals scheutjes en wortels) de verhouding tussen de niveaus van cytokininen en auxinen is. In het modelsysteem tabak waarmee zij werkten bleek een relatief hoge ratio van auxine t.o.v. cytokinine (IAA/kinetine) de wortelvorming te bevorderen, terwijl het omgekeerde de scheutvorming bevorderde. Tussenliggende verhoudingen induceerden callus.

In veel gevallen worden momenteel zowel cytokininen als *auxinen* aan het medium toegevoegd. Aangezien 2,4-D een stof is met een sterke auxinewerking, wordt het vaak gebruikt voor de inductie van callus. Toch heeft het middel een aantal nadelige eigenschappen:

- Soms wordt de morfogenese geremd of negatief beïnvloed.
- 2,4-D kan mutaties induceren.
- In het algemeen wordt de fotosynthese in-vitro door 2,4-D geremd.

Het belang van *cytokininen* in het medium is sterk afhankelijk van het plantweefsel. Voor sommige weefsels is cytokinine onontbeerlijk, andere kunnen gemakkelijk zonder. Er zijn aanwijzingen dat de behoefte aan cytokininen genetisch bepaald is. Er kan gewenning (habitatie) optreden: Na verloop van tijd hebben culturen geen of minder behoefte aan een bepaalde regulator. Deze veranderingen zijn hoogstwaarschijnlijk epigenetisch (letterlijk: na-genetisch) van aard. De samenstelling van de genen is niet aan veranderingen onderhevig, maar de genactiviteit verandert gedurende de verschillende fasen van de ontwikkeling.

In het algemeen hebben *gibberellinen* een remmend effect op scheut- en wortelgroei. Soms zijn ze bevorderlijk voor strekking van internodiën en verbreking van kiemrust. Vandaar dat toevoeging aan het medium plaatsvindt wanneer men bloemknoppen laat uitlopen, of in het geval van embryocultuur. Gibberellinen zijn thermolabiel. Ze kunnen dus niet meegesteriliseerd worden in hogedrukpan of autoclaaf. Filtersterilisatie is dan nodig.

*Abcissinen* hebben in het algemeen een negatieve invloed op de morfogenese. Soms zijn ze bevorderlijk voor callusgroei en embryogenese. Ook voor het geschikt maken van het weefsel voor cryopreserving is ABA een gewilde factor.

Voor de effecten die het hormoon *etheen* kan hebben wordt wat uitgebreider ingegaan in de paragraaf die handelt over de gasfase.

#### 4.2.5 Andere organische stoffen

Net als in het geval van vitaminen, is de plant normaliter in staat aminozuren te synthetiseren. Er zijn enkele uitzonderingen, vandaar dat caseïne-hydrolysaat, L-glutamine, L-asparagine en adenine(sulfaat) nog wel eens aan het medium worden toegevoegd.

In het verleden werd regelmatig gebruik gemaakt van stoffen met een bijzondere werking in de weefselkweek. Met name kokosmelk en vooral actieve kool worden heden ten dage nog steeds gebruikt.

##### **Kokosmelk**

Deze stof bevordert bij veel gewassen groei, celdeling en differentiatie.

Het bevat:

- cytokininen
- vrije aminozuren
- myo-inositol: deze stof speelt een rol in de synthese van fosfolipiden, celwandpectinen en cytoplasmatische membraansystemen.

##### **Actieve kool**

Van deze stof zijn zowel positieve als negatieve effecten bekend. Die effecten kunnen toegeschreven worden aan 3 factoren:

- Verdonkering van het medium waardoor de wortelinductie en -groei worden beïnvloed, maar waardoor ook de temperatuur van het medium (en van de gasfase in de buis) moeilijker te regelen wordt.
- Adsorptie van remmende componenten zoals fenolachtige bestanddelen. Deze zouden de groei van de wortels kunnen beïnvloeden. Een enkele keer zou het ook de gasfase in de buis kunnen 'zuiveren'.
- Adsorptie van hormonen uit het medium.

Actieve kool wordt bijv. toegediend aan het medium wanneer men soorten wil vermeerderen via somatische embryogenese. De aanvankelijk hoge auxineconcentratie die nodig is voor inductie van somatische embryo's, wordt automatisch verlaagd doordat de actieve kool het auxine wegvangt.

- Sommigen beweren dat actieve kool een soort 'slow-release' functie heeft, waardoor allerlei bestanddelen langzaam ter beschikking komen van het plantendeel. Of dat ook inderdaad zo werkt is mij niet bekend. In artikelen over bewaring in-vitro door overzetten op media die alleen langzame groei toestaan wordt over het toevoegen van actieve kool niets vermeld.

Actieve kool wordt toegevoegd in concentraties variërend van 0,5 - 3%. Vòòr toevoeging wordt meestal eerst gewassen met zuren en daarna geneutraliseerd. Dit om verontreinigingen te verwijderen. Dat geldt natuurlijk niet voor actieve kool die speciaal voor de weefselkweek wordt verkocht. De prijs doet vermoeden dat dat al gebeurd is.

#### 4.2.6 Antibiotica en systemische fungiciden

Eén van de grotere problemen bij de cel- en weefselkweek is het naar voren komen van inwendige besmettingen. Uitwendige sterilisatie is niet in staat de diep in het weefsel liggende bacteriën en schimmels te doden. Vroeg of laat krijg je dan van deze pathogenen last. Met name bij de vermeerdering van houtige gewassen speelt deze problematiek.

In navolging van de reguliere gewasbescherming zijn dan ook pogingen ondernomen om antibiotica (zoals streptomycine en rifampicine) of fungiciden (zoals benomyl, 10 mg/l) aan het medium toe te voegen.

Er treden problemen op wanneer deze middelen worden gebruikt:

- antibiotica zijn vaak schadelijk voor plantencellen; vooral aantasting van ribosomen vindt plaats;
- benomyl remt de ontwikkeling (zowel groei als morfogenese) van de plant.

Een verbetering kan op twee gebieden worden gezocht: determinatie van pathogenen en een verbeterde toediening. Wat het eerste onderdeel betreft, het verdient aanbeveling om bij een infectie de naam van het organisme te achterhalen die de verontreiniging veroorzaakt.

Bijvoorbeeld alleen al een toetsje of je met gram-positieve dan wel met gram-negatieve bacteriën te maken hebt. Er wordt dan niet onnodig een confrontatie veroorzaakt tussen een organisme en een niet adequaat werkend bestrijdingsmiddel. Het zomaar toedienen van een mix antibiotica kan allerlei vervelende bijwerkingen hebben. Bijvoorbeeld met opbouw van resistentie.

Een andere verbetering kan gevonden worden in een andere manier van toediening. Gewoonlijk wordt een plantendeel ontsmet door het onder te dompelen in alcohol en vervolgens in verdund bleekwater. Daarmee wordt er oppervlakkig ontsmet. Beter zou het zijn voor het ontsmetten van de binnenzijde van het plantendeel een middel te zoeken wat niet zo agressief is voor de plantencellen, wat er vervolgens met behulp van onderdruk ingezogen wordt. Er is geëxperimenteerd met het bij onderdruk brengen van (houtige) plantedelen, waarna de onderdruk werd opgeheven door een damp of een spray van ontsmettingsmiddel.

#### 4.3 Explantaat

Onder 'explantaat' verstaan we: een stukje weefsel of een gedeelte van een orgaan dat verwijderd is van een plant met het doel er een cultuur mee te beginnen. Succes van de cultuur is afhankelijk van:

1. De grootte van het explantaat.
2. De positie van het explantaat in de plant.
3. De fysiologische ouderdom van het explantaat.
4. Het genotype van het explantaat.
5. De polariteit van het explantaat.
6. Het effect van een groot aantal subculturen



### 4.3.1 De grootte van het explantaat

Meestal geldt: hoe groter het explantaat, hoe groter de kans op orgaan-(of callus-)vorming.

Bijv. Chrysant: *scheuttoppen tussen 0,2 en 0,5 mm produceren enkelvoudige scheuten; scheuttoppen vanaf 0,5 mm geven meerdere scheuten.*

Over het algemeen nemen we liever grotere explantaten (gemakkelijker te prepareren) dan kleinere. Slechts in het geval van bijv. embryocultuur en zeker ook van meristeemcultuur, **moeten** we kleine explantaten gebruiken. Bij meristeemcultuur kan dan een afweging tussen grote kans op ziektevrrije plantjes en een grotere regeneratiekans noodzakelijk zijn.

### 4.3.2 Positie van het explantaat in de plant

In een eerder hoofdstuk kwamen we de totipotentie-theorie tegen. Deze theorie leert dat elke plantecel in principe embryogeen vermogen bezit. In de praktijk blijkt regelmatig dat er plantecellen zijn die wel planteorganen kunnen vormen (bijv. òf wortels òf scheutjes), maar die het embryogeen vermogen verloren hebben. Deze cellen zijn min of meer gedetermineerd.

Bijv.: *Callus afkomstig van wortels van Wilde Nigelle produceert alleen wortels. Callus afkomstig van stengel- en bladweefsel produceert alleen scheuten.*

Het is hoogst onwaarschijnlijk dat hoog-gedifferentieerde cellen zich kunnen ontwikkelen tot embryo's. Binnen een plant verschillen de weefsels in determinatiegraad.

Bijv.: *onderzoek bij lelie naar de in-vitro productie van bollen door diverse explantaten:*

- *meeldraden en helmhokjes: geen bollen*
- *bladeren: explantaten overleefden niet*
- *bloembladeren: 75% bolvorming*
- *bolrok: 95% bolvorming*
- *bolrokexplantaten van in-vitro gekweekte bollen: 100% bolvorming.*

Om succesvol een plantensoort in-vitro te kweken, is het van belang te onderzoeken welk explantaat de beste resultaten geeft. Het onderzoek naar de morfogenese van de explantaten wordt bemoeilijkt door de wisselende behoeften van de diverse explantaten aan nutriënten en regulatoren in het medium. Ofwel: zijn de gevonden verschillen nu toe te schrijven aan het medium of aan het type explantaat ?

### 4.3.3 Fysiologische ouderdom van het explantaat

Door de bank genomen heeft jonger weefsel een groter morfogenetisch vermogen dan ouder weefsel.

Voorbeelden:

- Iris: scheuten kunnen alleen verkregen worden uit stengeldelen die afkomstig zijn uit het jongste gedeelte van de stengel (dicht bij de knop).
- Anthurium: alleen callusvorming op jong weefsel.
- Rhododendron: vermogen om wortels te vormen aan stengelstukjes neemt af bij toenemende ouderdom van de stengelstukjes.

Professor Pierik heeft het, vooral in relatie tot houtige explantaten, vaak over rejuvinatie. Daarmee bedoelt hij het vermogen van weefsel om te de-differentiëren en vervolgens te re-differentiëren. De juveniele fase van meerjarige, maar ook wel éénjarige, gewassen is over het algemeen meer tot regeneratie te bewegen dan de volwassen fase. Tenslotte is niet altijd duidelijk wat onder het begrip 'fysiologische ouderdom' moet worden verstaan. Bij bollen en knollen bijvoorbeeld is de voorgeschiedenis erg belangrijk bij de beoordeling van de fysiologische ouderdom van het weefsel. Identieke groei-omstandigheden in het laatste groeiseizoen zijn dan onvoldoende om de verschillen in fysiologische ouderdom glad te strijken.

#### 4.3.4 Genotype van het explantaat

Een verschijnsel dat menig onderzoeker naar het hoofd doet grijpen, is de genotype-invloed op de vermeerderbaarheid. Binnen een soort zijn sommige 'cultivars' gemakkelijk en andere juist moeilijk te vermeerderen.

Bijv.:

- Bij Anthurium blijkt dat 1/3 van alle A. andraeanum genotypen callus kan vormen terwijl 3/4 van A. scherzerianum genotypen callus vormt, waaruit vervolgens planten geregenereerd kunnen worden.
- Bij Geranium varieert het percentage antheren (helmknoppen) waarop callus geïnduceerd kan worden van 10% voor het ene genotype tot 62% voor een ander genotype.

Het feit dat hier sprake is van een genotype-invloed, doet vermoeden dat dergelijke verschillen genetisch bepaald zijn. Er is hier nog weinig onderzoek naar gedaan. Uit het weinige werk op dit terrein het volgende voorbeeld:

Bijv.: Er is onderzoek gedaan naar de groeireactie van protoplasten afkomstig van inteeltlijnen van Petunia op diverse media.

Genetische analyse heeft geleerd dat:

- Slechts enkele genen betrokken zijn bij de verschillen in hormoonbehoefte.
- Diverse stadia in de ontwikkeling van protoplasten geregeld worden door verschillende genen.

#### 4.3.5 Polariteit

In-vitro kunnen polariteitseffekten optreden: de oriëntatie van het explantaat in het medium vergeleken met de oriëntatie in de plant, kan van invloed zijn op de organogenese.

Polariteitseffekten zijn waargenomen bij diverse gewassen: gladiool, asperge, Amaryllus, Rhododendron, Narcis etc.

Voorbeelden: -*Rhododendron*: apolair geënte stukjes stengel (basale zijde, oftewel de onderkant, boven) vormen gemakkelijker wortels.

-*Narcis*: apolair enten is absoluut vereist; organogenese vindt alleen plaats wanneer de bloemstengel op z'n kop geënt wordt.

Bij bolrokexplantaten vindt dikwijls alleen organogenese plaats vanuit de bolbodem. Wanneer die bolbodem boven het medium wordt geplaatst (bolrok dus apolair geënt), wordt de organogenese bevorderd.

Polariteitseffekten kunnen worden toegeschreven aan:

- betere O<sub>2</sub>-voorziening boven het medium
- minder last van remmende stoffen die in het medium diffunderen
- andere hormoongradiënten in het weefsel.

Wanneer op een vloeibaar medium wordt gekweekt, is met name de eerste factor van belang: de O<sub>2</sub>-voorziening moet goed zijn. Om dit te bereiken zijn speciale apparaten ontworpen (de zgn. Steward kolf, zie Pierik, blz. 27).

#### 4.3.6 Subcultuur

Omdat een medium uitgeput kan raken of omdat een cultuur de buis uitgroeit, moet er regelmatig overgeënt worden. Regelmatig overenten van een explantaat kan de volgende veranderingen opleveren:

- a. Verlies van morfogenetisch vermogen.
- b. Toename van variatie.

##### a. Verlies van morfogenetisch vermogen.

Dit treedt vooral op na herhaaldelijk overenten van callus of celsuspensieculturen.

Bijv.: lang bewaarde wortelcelculturen (*Daucus*) verliezen morfogenetisch vermogen. Vermogen kan teruggehaald worden m.b.v. kinetine.

Soms kan het morfogenetisch vermogen lang gehandhaafd blijven.

Bijv.: *Chrysant* vermeerderd door callus met meristematische gebieden, behoudt morfogenetisch vermogen gedurende 3,5 jaar.

Verlies van morfogenetisch vermogen kan op verschillende manieren optreden:

- Scheutproductie vindt soms plaats vanuit georganiseerde centra voor celdeling (meristemoïden) binnen een callus. Deze meristemoïden zijn afkomstig van het oorspronkelijke explantaat. De georganiseerde centra kunnen verloren gaan door herhaald overenten (verdunningseffekt). Dit is o.a. geconstateerd bij Pelargonium-callus.
- Verlies kan zich voordoen doordat de hormoonniveau's in het weefsel afnemen. Dit is o.a. geconstateerd bij wortelcel-culturen.
- Bij callus komen nogal eens chromosoomabnormaliteiten voor. Hierdoor kunnen bepaalde

ontwikkelingsprocessen geremd worden. Opvallend is het trouwens dat in geregenereerde planten de abnormaliteiten zo goed als volledig geëlimineerd zijn. Er is blijkbaar sprake van een selectieve morfogenese van 'normale' cellen.

#### b. Toename van variatie.

Herhaald overenten leidt over het algemeen tot een groter aantal fenotypische veranderingen:

Bijv.: *Geranium* verkregen uit herhaaldelijk overgeënt callus laat de volgende fenotypische veranderingen zien:

- afwijkende bladeren
- verminderde hoeveelheid anthocyaan
- dwerggroei
- veranderingen in essentiële oliën-samenstellingen
- veranderde bloemmorfologie.

Variatie kan o.a. toegeschreven worden aan:

- segregatie van chimaeren
- veranderingen in chromosoomaantal of -structuur
- genmutaties (zowel nucleair als cytoplasmatisch)
- terugkeer naar juveniel stadium
- niet-overerfbare fysiologische adaptaties.

## 4.4 Licht

Aangezien fotosynthese in-vitro in het algemeen minder belangrijk is omdat het medium al suiker bevat, is licht in principe bij de meeste vormen van in-vitro cultuur misbaar. Cel- en weefselculturen worden dan ook regelmatig in het donker gekweekt (bijv. callus). Toch blijkt licht in veel gevallen een essentiële rol te spelen bijvoorbeeld bij de inductie van orgaanvorming.

Bijv.: *Bij Iris, Freesia, Crocus en lelie: calluskultuur in het donker produceert pas scheuten wanneer zij wordt overgebracht naar het licht.*

Er zijn aanwijzingen dat de inductie van de regeneratie gerelateerd is aan de ophoping van zetmeel in bepaalde cellen geproduceerd bij fotosynthese. Deze cellen zouden het voortouw kunnen nemen bij de organogenese. Overigens is ook in-vitro is geconstateerd dat licht remmend werkt op de wortelvorming.

Onlangs is onderzoek gedaan naar de invloed van fotosynthese op de groei en kwaliteit van in-vitro vermeerderde rozeplanten. Daaruit bleek dat de planten beter doorgroeiden na een transplantatie als het medium ook nog vrij veel suiker bevatte naast een redelijke belichting en een verhoogd CO<sub>2</sub>-gehalte. De hoeveelheid zetmeel in de chloroplasten bleek een goede maat

voor de doorgroei-kracht.

De invloed van de fotoperiode, de golflengte en de hoeveelheid licht worden in plantenfysiologie behandeld.

Drie aspecten kunnen onderscheiden worden aan de invloed van licht op cel- en weefselculturen:

- a. Fotoperiode: de tijd waarin een cultuur gedurende een etmaal wordt blootgesteld aan licht. De meeste culturen worden nooit gedurende het hele etmaal in het licht gezet. Vandaar het gebruik van speciale kweekcellen en -kasten waarin m.b.v. tijdschakelaars het licht aan- en uitgedaan kan worden. De effectieve fotoperiode verschilt per soort. Fotoperiode-effecten in een cultuur hangen waarschijnlijk samen met de beïnvloeding van het endogene niveau van auxinen en cytokininen (onderzoek gedaan bij Begonia en Kalanchoë).
- b. Golflengte van licht: Morfogenese is dikwijls het best bij het absorptiemaximum van fytochroom (660 nm). Hierop bestaan echter vele uitzonderingen. Wit licht (een mix van golflengten) remt meestal adventieve wortelvorming en stimuleert adventieve spruitvorming.
- c. Lichtintensiteit: De lichtintensiteit voor morfogenese is optimaal rond 1000 lux. Plantjes die overgeplaatst worden naar de grond behoeven een veel hogere lichtsterkte (3.000 - 10.000 lux). Lichtintensiteit heeft soms invloed op het type groei in-vitro. Bepaalde lichtintensiteiten bevorderen een toename in volume waar andere intensiteiten meer het gewicht doen toenemen.

## 4.5 Temperatuur

De temperatuur waarbij de cel- of weefselkweek te incuberen wordt gezet, is van eminent belang. Afwijkingen van de optimumtemperatuur leiden in sommige gevallen tot een verminderde groei van de kweek, maar kunnen in andere gevallen ook leiden tot het totaal mislukken ervan.

De meeste culturen hebben een optimumtemperatuur tussen 24-28°C.

Bijv.: *de groei van narcis en de wortelvorming bij rhododendron zijn het best bij 25°C.*

Er zijn diverse culturen die een andere optimum incubatietemperatuur hebben.

Bijv.: *Lilium auratum (goudbandlelie) vormt het best bolletjes bij 20°C. Er is een afname van de bolvorming boven deze temperatuur.*

Een algemene stelregel is dat in-vitro temperatuuroptima redelijk overeenkomen met de optima in de in-vivo situatie.

Bij een aantal culturen is het noodzakelijk gedurende kortere of langere tijd een koudebehandeling toe te passen.

Voorbeelden: *- Houtige gewassen hebben dikwijls een koudebehandeling nodig om de winter na te bootsen.*

*- Diverse zaden hebben koude nodig om de rust te verbreken.*

*- Voor specifieke morfogenetische gebeurtenissen kan koude nodig zijn: de in-vitro inductie*

van gametangiën bij *Funaria hygrometrica* (krulmos) vindt plaats bij 7°C.

De groei en ontwikkeling van een kweek in-vitro kan beïnvloed worden door dag- en nachttemperaturen te variëren.

Bijv.: een hoger dag- dan nachttemperatuur heeft een positief effect op de aardpeer (*Heliathus tuberosus*).

Tenslotte kan de temperatuur een rol spelen in de morfogenese. Het blijkt dat vaak een interactie met de invloed van hormonen plaatsvindt.

Bijv.: Sla: bij 17°C produceren explantaten alleen scheuten bij hoge kinetineconcentratie. Bij 28°C worden alleen scheuten geproduceerd op medium zonder kinetine (wanneer tenminste adequate hoeveelheden auxinen aanwezig zijn in het medium).

## 4.6 Gasfase

De samenstelling van de gasfase (het gebied in de buis boven het medium), in het engels de headspace genoemd, kan van belang zijn voor de groei en ontwikkeling van de cultuur. Diverse stoffen in die gasfase hebben de aandacht getrokken.

Etheen (een verouderingshormoon) is het meest besproken stofje in die gasfase. Deze stof blijkt in de meeste gevallen remmend op de morfogenese en stimulerend op de callusvorming te werken.

Er is een twistpunt aangaande het flamberen van buizen. Vele onderzoekers beweren dat door het flamberen grote hoeveelheden etheen in de buis komen waardoor de kweek sterk negatief beïnvloed wordt. Anderen beweren dat dat wel meevalt: het gas verdwijnt vrij snel (binnen 2 uur) weer uit de buis, indien de buis tenminste niet te dicht is afgesloten. Dit laatste wordt ondersteund door het onderzoek gedaan door Beasley & Eaks. Zij plaatsten katoen-embryo's op medium. Op een medium met GA<sub>3</sub> bleek er sterke callusvorming op de embryo's op te treden wanneer de etheenconcentratie hoog was. Op een medium met IAA bleek een verhoogde etheenconcentratie de orgaanvorming vanuit de embryo's te remmen.

Wanneer sterk afgesloten buizen vergeleken werden met buizen die regelmatig gelucht konden worden, bleken in het eerste geval bovenstaande verschijnselen sterker op te treden. Dit duidt erop dat afgesloten buizen de etheenconcentratie doen toenemen en minder afgesloten buizen hun etheen kwijt kunnen.

Niet alleen het explantaat geeft etheen af, ook de agar doet dat, vooral als de hoeveelheid licht wat hoger is. De hoeveelheden die uit de agar vrij komen overtreffen dan al gauw de hoeveelheid die het explantaat kan produceren. Ook de containers voor de weefselkweek zijn niet onverdacht. Het verschil tussen glas of plastic containers is groter dan het verschil tussen het al of niet toevoegen van een etheen-biosyntheseremmer als kobaltnitraat.

Een ander probleem dat zich in aanwezigheid van etheen wat vaker voor kan doen is dat van de 'hyperhydricity', vroeger wel vitrificatie genoemd. In een later stadium zullen we daar nog wat intensiever aandacht aan besteden.

Naast CO<sub>2</sub>- en etheenvorming kan ook de vorming van ethanol en acetaldehyde in-vitro een rol spelen.

Bijv.: *Thomas en Murashige: onderzoek naar ophoping van stoffen bij culturen van tabak. Zij vonden het volgende:*

- *goed afgesloten buizen hadden in de gasfase CO<sub>2</sub>, etheen, ethanol en acetaldehyde;*
- *culturen met goed ontwikkelde scheuten hadden geen ethanol en weinig acetaldehyde;*
- *toevoeging van 2,4-D aan medium (onderdrukt organogenese) gaf een toename van de ethanolproductie, het lijkt erop dat ethanol geproduceerd wordt tijdens de ontwikkeling van organen. Anders gezegd: ethanol-productie en differentiatie zijn omgekeerd evenredig;*
- *ethanol kan bijv. de somatische embryogenese onderdrukken.*

## 4.7 Seizoensinvloeden

Invloeden van het seizoen op de morfogenese zijn o.a. gevonden bij een aantal bolgewassen.

Voorbeelden:- *Lelie: bolrokexplantaten zijn te vermeerderen op medium zonder auxine, alleen wanneer het explantaat afkomstig is uit bollen die in het voorjaar of in de zomer verkregen zijn.*

- *Tulp: de rooidatum blijkt van invloed te zijn op de vermeerdering.*

Het blijkt dat er in het najaar meer auxine en cytokinine nodig is voor dezelfde effecten als in het voorjaar. Dit is ook nog het geval na diverse jaren van sub-cultuur. Wat directer is het verband tussen de regeneratie en de morfogenese van planten waarbij de explantaten op een verschillend tijdstip van het jaar verkregen zijn. De tulp is daarvan wel een sprekend voorbeeld. De rooidatum blijkt van grote invloed te zijn op de vermeerdering. In 1987 bleek dat de beste regeneratie werd verkregen uit bollen die ongeveer 10 dagen voor de normale rooidatum van het gewas werden opgerooid. Daarna zijn er nog een aantal temperatuur-(voor)behandelingen nodig om het weefsel op gang te helpen. Het is natuurlijk niet helemaal uit te sluiten dat hier toch nog iets van fysiologische ouderdom in het spel is.

Ook bij andere gewassen zijn seizoensinvloeden waargenomen:

Voorbeelden:- *'Jerusalem Artichoke' (=aardpeer) -knollen: spontane in-vitro vermeerdering treedt alleen op wanneer de plant in het vegetatieve stadium is. Op andere momenten gebeurt het alleen wanneer IAA aan het medium wordt toegevoegd.*

- *De inductie van haploïde planten uit antherenkulturen van tabak lijkt beïnvloed te worden door het seizoen.*

## 5. Snelle vermeerdering

Snelle vegetatieve vermeerdering kan worden verkregen door:

### a. Het laten uitlopen van okselknoppen

- Oogstekmethode (zie Pierik, 20.2): stukjes stengel waarvan de scheuttop is verwijderd, worden op een medium geplaatst. De ogen in de oksels lopen dan uit. Aan het medium wordt geen extra cytokinine toegevoegd. Wordt bijv. toegepast bij de vermeerdering van de aardappel.
- Axillaire spruitmethode (zie Pierik, 20.3): stukjes stengel, inclusief de scheuttop (spruitjes dus), worden geplaatst op een medium. De scheuttop veroorzaakt apicale dominantie waardoor de okselknoppen niet kunnen uitlopen. Door een extra hoeveelheid cytokinine aan het medium toe te voegen, kan deze apicale dominantie opgeheven worden.

### b. Adventieve scheutvorming

Op explantaten (bij voorkeur jong delend weefsel) kunnen direct of via een callus-tussenfase nieuwe scheutjes ontstaan. De scheutjes ontstaan in principe uit meerdere cellen.

Wanneer er mutaties geïnduceerd worden (bijv. m.b.v. straling), dan heb je kans dat de gevormde scheutjes *chimaer* zijn.

Opmerkingen:

- De bij a en b gevormde scheuten laat men bewortelen door het medium ietwat aan te passen. Aldus ontstaan complete planten.
  - Soms treedt callus als tussenstadium op. Dit is een stadium wat vaak lastig regeneert. Bovendien zijn plantjes geregenereerd uit callus zijn genetisch instabiel. In het geval van de snelle vegetatieve vermeerdering in bedrijven, is dit een ongewenste situatie. Men tracht de callusfase zo veel mogelijk te omzeilen of zo kort mogelijk te houden.
- N.B. Ter vergelijking: De scheuten gevormd door somatische embryo's zijn afkomstig uit één cel. Chimaerie komt dan ook niet voor.



## 6. Meristeencultuur

Het principe van de meristeencultuur is als volgt: een klein gedeelte (0,1 - 1,0 mm lang) van een meristeen (=groeipunt), meestal afkomstig van vegetatieve delen (scheuten), soms echter van generatieve delen (bijv. bloemknop), wordt op een voedingsmedium geplaatst. Een nadeel van deze cultuur is gelegen in de voorwaarde, dat uitgegaan wordt van een klein explantaat. Regeneratie van een complete plant hieruit kan een probleem zijn.

Voor 3 doeleinden wordt meristeencultuur gebruikt:

- a. Vermeerdering van diverse gewassen. Planten uit meristemen verkregen zijn vaak redelijk uniform.
- b. Fundamenteel onderzoek naar de behoefte van meristemen aan bepaalde stoffen voor hun groei en differentiatie; dergelijk onderzoek is bijv. gedaan bij tomaat.
- c. Productie van ziektevrje planten.

ad c: Productie van ziektevrje planten

Virussen zijn lastige ziekteverwekkers omdat ze zo moeilijk te bestrijden zijn. Het blijkt dat met meristeencultuur het mogelijk is een met een virus besmette groep planten virusvrj te krijgen.

De techniek van de meristeencultuur werd voor het eerste toegepast bij Dahlia (Morel & Martin, 1952) en is later via aardappel en anjer uitgebreid naar andere gewassen. Momenteel worden meer dan 50 soorten vermeerderd via meristeencultuur. Deze soorten zijn aldus vrj van diverse virussen.

De vraag kan zich opdringen: hoe komt het dat planten vermeerderd via meristeencultuur virusvrj zijn?

Na onderzoek is gebleken dat in het meristeen een relatief lage virusconcentratie heerst, soms is het meristeen zelfs helemaal virusvrj. Voor dit verschijnsel zijn twee mogelijke verklaringen:

- het groeipunt groeit snel; de virusvermeerdering kan dat niet bijhouden. Geproduceerde nucleïnezuren komen ten goede aan het meristeen en niet aan het nieuwe virus.
- Er is geen vaatsysteem in meristemen; het transport door plasmodesmata (verbindingen tussen cellen) gaat te langzaam.

Recenter onderzoek heeft aangetoond dat er in sommige gevallen wel degelijk hoge concentraties van het virus in het meristeen aanwezig zijn (bijv. PVX in meristemen van aardappel). Desondanks konden virusvrje planten verkregen worden. Blijkbaar gaat door de techniek van de in-vitro cultuur, een aantal virussen verloren. De reden hiervan is onbekend.

In onderstaand verhaal zal puntsgewijs aangegeven worden hoe een meristeencultuur moet worden opgezet. Als voorbeeld wordt een scheutmeristeen gebruikt.

- het liefst uitgaan van een scheut met een actief meristeen

- scheuten ontsmetten
- m.b.v. een binoculair bladeren wegprepareren
- de scheut nog een keer steriliseren
- overige bladeren wegprepareren; meestal houdt men 1 of 2 bladprimordia aan om kans op overleving te vergroten
- meristeem op medium plaatsen. Samenstelling medium is afhankelijk van gewas.

- Bijv.:
- *suikerbiet: B5-medium + 0,5 mg BAP/l + 0.01 mg GA<sub>3</sub>/l*
  - *aardappel: extra K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en GA<sub>3</sub> geeft het beste resultaat*
  - *bolgewassen: hoog auxinegehalte gecombineerd met lage incubatietemperatuur (15°C) wil erg goed. Uitzondering: lelie (incubatie bij 20°C).*

- via meristeemcultuur verkregen plantjes worden getoetst op de aanwezigheid van virussen m.b.v. toetsplanten, elektronenmicroscop (EM) of ELISA.
- virusvrije plantjes verkregen door meristeemcultuur zijn niet immuun. Daarom oppassen voor herinfectie (uitplanten in luisdichte kas).

Niet alleen virussen, ook enkele schimmels en bacteriën kunnen d.m.v. meristeemcultuur geëlimineerd worden. Wanneer meristeemcultuur weinig succesvol blijkt bij de viruseliminatie, is het in sommige gevallen mogelijk aseptisch geïsoleerde scheuten te enten op virusvrije zaailingonderstammen. Op deze manier is het bij Citrus gelukt enkele virussen te elimineren.

Andere hulpmiddelen om het succes van de meristeemcultuur te vergroten zijn uitgeprobeerd.

### Thermotherapie

Vóór het in cultuur brengen van het meristeem, kunnen de scheuten aan een warmtebehandeling worden blootgesteld. Het plaatsen van de planten bij 35-38°C gedurende enkele weken, heeft een gedeeltelijke eliminatie van virussen tot gevolg zodat de meristeemcultuur een handje geholpen is.

- Bijv.: *Wanneer een meristeemcultuur begonnen wordt van spruitende aardappelknollen, wordt geadviseerd die knollen eerst gedurende een maand te bewaren bij 37-38°C.*

Soms wordt thermotherapie toegepast tijdens de in-vitro cultuur periode.

- Bijv.: *Bij meristeemcultuur van Chrysant nam de frequentie van viruseliminatie toe van 9 naar 90%, wanneer in-vitro warmtebehandeling werd toegepast gedurende 20-30 dagen.*

### Virusremmende stoffen

Diverse stoffen zijn aan media toegevoegd met het doel te onderzoeken of ze een virusremmende werking bezitten. Meestal bleek de remming pas op te treden bij concentraties die toxisch waren voor de plant.

Een gunstige uitzondering hierop vormt de stof Ribavirine (Virazole). Dit middel blijkt in-vitro (helaas niet in-vivo) diverse virussen in tabak en aardappel te elimineren (zie de tabel van fig [iv]). Van dit middel zijn geen fytoxische neveneffecten bekend. Wel hebben culturen behandeld met dit virazole meer tijd nodig om te groeien en te differentiëren dan culturen die met warmte behandeld zijn.

## 7. Synthetic seed

Synthetic seeds, in gewoon Nederlands “kunstzaad” moet volgens de zaadbedrijven, die hebben geïnvesteerd in biotechnologie, de toekomst hebben.

Kunstzaad bestaat uit een somatische embryo dat is omgeven door een beschermende laag. Het moet een goedkope massa-vermeerderingswijze worden. De voordelen zijn dan ook duidelijk. Grootschalige productie van genetisch uniforme embryo's die via de normale distributiewegen kunnen worden verkocht en met de gebruikelijke apparatuur kunnen worden verzaaid. Voor de publieksacceptatie is alleen de term kunstzaad niet gelukkig gekozen, het klinkt beter om te spreken van artificiële zaden.

Uit bepaalde weefsels van een plant, zoals de hypocotyle as, bloeistengel en cotylen, maar ook uit microsporen en protoplasten, kunnen somatische embryo's ontstaan. Dit zijn embryo's die niet zijn gevormd door versmelting van geslachtscellen, maar min of meer spontaan uit 'lichaams-cellen' zijn ontstaan. Deze somatische embryo's ontwikkelen zich in de meeste gevallen net zoals de geslachtelijke embryo's: achtereenvolgens worden het bolvormig, hartvormig en het torpedovormig doorlopen, waarna de cotylen en tenslotte de scheutjes en wortels worden aangelegd.

De somatische embryo's kunnen op twee manieren ontstaan. In de meeste gevallen vormt het weefsel van het explantaat zogenaamd embryogeen callus (woekerweefsel met embryonale verdikkingen). Hieruit ontstaan dan de embryo's.

In sommige gevallen ontstaan de embryo's rechtstreeks uit het weefsel. Het blijkt dat dat wat te sturen is door de concentraties hormonen te variëren.

### 7.1 Keuze van het gewas

De keuze van het gewas is van een aantal zaken afhankelijk. Er zijn technologische argumenten en er zijn commerciële argumenten. Technologische argumenten worden vooral gevormd door de stand van zaken in het onderzoek. Is er van het betrokken gewas al een manier bekend om somatische embryo's te maken? Is dat met een redelijke kans op succes te doen? Is er kans op dat de productie kan worden opgeschaald? Blijft er nog enige vitaliteit over na alle behandelingen? Kortom er zijn beperkingen genoeg mede door lacunes in onze kennis.

Commerciële argumenten zijn er ook legio. Als er al geen barricades opgeworpen door de kostbaarheid van het oplossen van de hierboven opgeworpen vragen dan blijft nog de haalbaarheid van artificieel zaad beperkt door de prijs en de kwaliteit van het alternatief. Het proces van somatische embryogenese van *Daucus* (wortel) is inmiddels redelijk goed voorspelbaar, maar het alternatief, gewoon zaad is dermate goedkoop dat artificieel zaad geen

grote markt zal worden, tenzij het iets toevoegt. Een aantal tropische gewassen bijvoorbeeld hebben recalcitrant zaad, gedragen zich onorthodox. Hier wordt mee bedoeld dat ze een korte periode vitaal zijn en bewaard moeten worden bij hoge luchtvochtigheid. (zie de tabel op de volgende pagina). Temperaturen onder 10°C en uitdroging van meer dan 20 - 40% van het versgewicht tasten dan duidelijk de vitaliteit aan. Deze soorten kunnen dan ook moeilijk in zaadgenen banken worden opgeslagen. De orthodoxe, "normale" zaden kunnen wel goed tegen uitdroging en hebben dat ook vaak nodig omdat embryo rijping wordt gestimuleerd.

**Tabel 1. Voorbeelden van enkele recalcitrante gewassen**

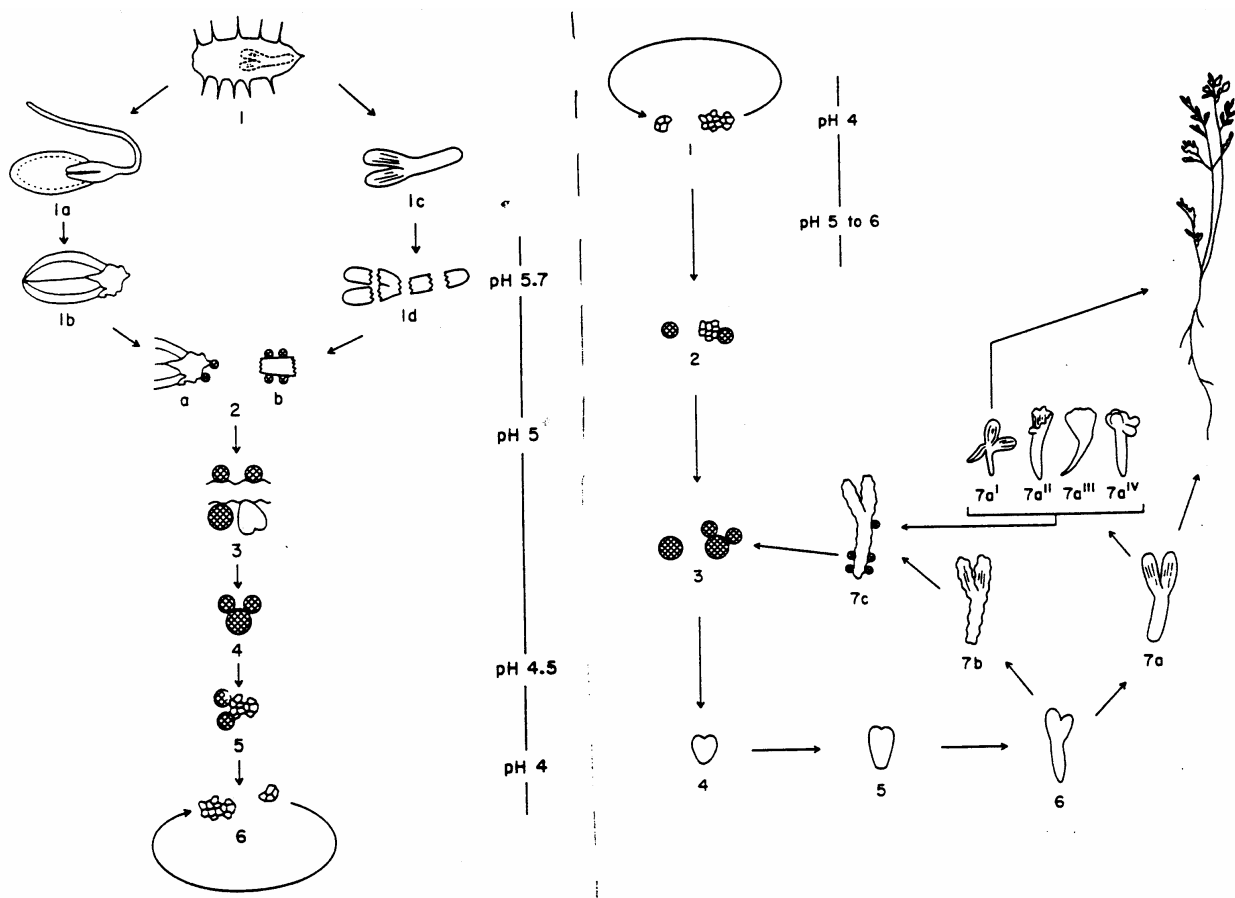
Species	Common name
<i>Achras zapota</i>	Sapodilla
<i>Aleurites</i> spp.	Candlenut, tung oil tree
<i>Artocarpus</i> spp.	Breadfruit
<i>Blighia sapida</i>	Akee
<i>Calocarpum sapota</i>	Sapote
<i>Chrysophyllum cainito</i>	Star apple
<i>Citrus</i> spp.	Orange, lemon, grapefruit
<i>Cocos nucifera</i>	Coconut
<i>Cola nitida</i>	Kola nut
<i>Diospyros virginiana</i>	Persimmon
<i>Dovyalis hebecarpa</i>	Kitembilla
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga
<i>Flacourtia indica</i>	Ramontchi
<i>Garcinia mangostana</i>	Mangosteen
<i>Hevea brasiliensis</i>	Rubber
<i>Litchi chinensis</i>	Litchi
<i>Malpighia</i> spp.	Barbados cherry
<i>Mangifera indica</i>	Mango
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Jaboticaba
<i>Nyssa</i> spp.	Tupelo
<i>Nephelium lappaceum</i>	Rambutan
<i>Swietenia</i> spp.	Mahogany
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao
<i>Trapa natans</i>	Water chestnut

\*Based on Bewley and Black, 1985; Teng and Hor, 1977; Roberts, 1975.

Een andere vorm van alternatieven komt uit de weefselkweek. Er is weinig onderzoek verricht naar somatische embryogenese van siergewassen. Omdat de stuksprijs daar vrij hoog ligt en er weinig fenotypische variatie wordt toegestaan, is de axillaire spruitvermeerdering een goed alternatief. Een tussenvorm is nog te vinden bij *Asclepias tuberosa* waar embryoïde structuren van een callus worden geplukt en als uitgangsmateriaal voor de vermeerdering worden gebruikt. In houtige gewassen is er zo'n lacune in kennis dat het daar ook nog wel enige tijd zal duren, alleen bij oliepalm worden embryo's gebruikt. Deze worden op een medium uitgelegd om scheutproductie te krijgen. De scheutjes worden dan geplukt en beworteld. Een andere handicap bij houtige gewassen is dat het nogal lang duurt voordat je zicht hebt op de variatie die zou kunnen ontstaan. (Corley 1982)

## 7.2 Optimalisering van de embryogenese

Het is bij zeer veel gewassen gelukt om somatische embryo's te krijgen. Helaas is slagen niet hetzelfde als grote aantallen produceren in een beheersbaar systeem. Soms zijn het echt toevalstreffers. Het is vaak niet nodig dat in elke kunstmatig zaadje maar één embryo zit, maar er zal toch een idee moeten zijn van hoeveel plantjes je uit elke unit mag verwachten. Krikorian (1990) bericht over een methode die eenvoudig de somatische embryogenese kan besturen. Gewoonlijk moet er veel worden gedaan om een cel of een aantal cellen zo te pesten dat ze "uit ellende" embryo's gaan maken. Hij liet zien dat een pH verandering al genoeg was. Zie figuur. Helaas blijkt later dat andere groepen die experts bevatten op het gebied van Daucus de experimenten niet kunnen herhalen.



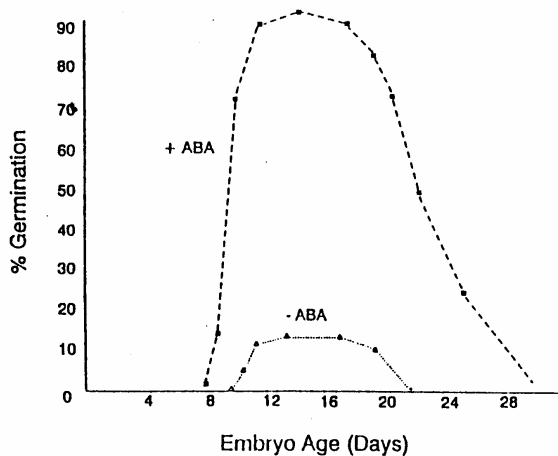
Figuur 3. Schema van de "cyclus" van celdeling, celdeling en embryogenese bij Daucus

Er doet zich met betrekking tot de haalbaarheid een levensgroot probleem voor. Het proces van somatische embryogenese is maar bij een beperkt aantal plantensoorten goed te sturen en dan daarbinnen alleen nog maar voor een paar genotypen. Voor veel andere gevallen is er wel embryovorming waargenomen maar de slagingspercentages zijn onvoorspelbaar en laag.

### 7.3 Optimalisering van de embryorijsing.

In-vitro is er meestal geen sprake van een afronding van de groei. De gevormde embryo's groeien meteen door en ontwikkelen zich tot een plant. In de natuur komt er tijdens de zaadvulling en embryorijsing een moment dat er rust wordt geïnduceerd en het zaadje, en dus ook het embryo, bestand wordt gemaakt tegen uitdroging. Om dat in-vitro na te bootsen zal eerst duidelijk moeten zijn wat de factoren zijn die deze processen beïnvloeden. De uitdrogingstolerantie blijkt in verband te kunnen worden gebracht met een toename van di-, tri-, en tetra-sacchariden. Gewone saccharose is een van de suikers maar ook specifiekere suikers als trehalose en bijv. stachyose zijn belangrijk. Zij blijken een belangrijke rol te spelen in de membraanstabieliteit tijdens uitdrogen en weer bevochtigen. Vooral het verblijf in een laagje water heeft, bij een tekort aan deze suikers, een ernstig lekken van ionen en aminozuren tot gevolg heeft.

Een factor die een rol speelt bij de accumulatie van suikers in-vivo is ABA. Deze stof wordt ook geregeld in verband gebracht met rustinductie. Het is dus een stof die, toegevoegd aan een niet te diverse populatie embryo's, de bewaarbaarheid en de vitaliteit van deze structuren sterk kan beïnvloeden. De optimalisatie van het tijdstip van toediening heeft een erg groot effect.



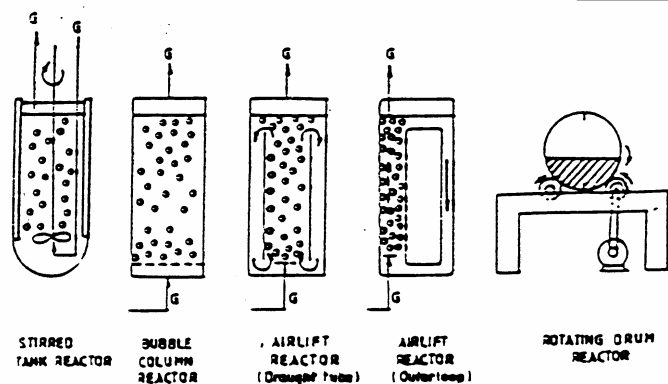
*Figuur 4. Kieming van droge somatische embryo's van luzerne na behandeling met 10 $\mu$ M ABA gedurende 14 dagen bij verschillende stadia van embryo-ontwikkeling. Daarna werden ze gedurende 6 dagen langzaam gedroogd*

De opmerking over de slagingskansen van embryovorming geldt in dezelfde mate voor embryorijsing. Ook de somaclonale variatie doet hier een duid in het zakje.

### 7.4 Automatisering van de productie

Er wordt gewoonlijk uitgegaan van een celsuspensie. Deze kan geïnitieerd zijn door stukje weefsel van een hypocotyl of van een blad, maar door de bewegingen in het reactorvat is er al snel sprake van een celsuspensiecultuur. De groei van plantecellen in een reactorvat, vaak ook wel fermentor genoemd, kent een aantal voordelen en een aantal problemen. De voordelen zijn er

vooral in gelegen dat de cellen in principe continu door kunnen groeien, waardoor er een continue productie en proces ontstaat. De nadelen zijn vooral dat niet alle cellen daar tegen kunnen.



Figuur 5. Een aantal verschillende reactortypen

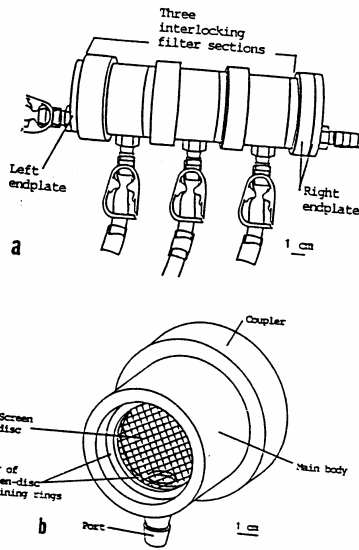
Het aantal plantensoorten dat het in een reactievat volhoudt is beperkt en dat vooral te wijten aan een aantal noodzakelijke voorzieningen, zoals het verpompen van de massa, de zuurstof en nutriënten voorziening en dan vooral door de 'shear-forces', de afschuifkrachten die daarmee gepaard gaan. De problemen zijn al vrij lang bekend en er zijn dan ook diverse reactortypen die in meer of mindere mate aan deze problemen tegemoet komen. In de figuur zijn een aantal typen afgebeeld.

Om cellen zover te krijgen dat ze embryogeen worden moet er enige overredingskracht op ze worden uitgeoefend. Vaak is een aantal kleine pesterijtjes genoeg. Dit is al besproken in een voorgaande alinea. Dit zal dus ook in een reactor moeten gebeuren. Dat kan vrij eenvoudig, maar dat betekent dan automatisch dat je van een continu proces over stapt naar een batch-proces. Eventueel kun je ervoor kiezen om het wat geleidelijker te doen en de cellen die door embryovorming al een bepaalde grootte of een bepaald stadium bereikt hebben er uit te filteren en de rest weer terug te schuiven.

Het spreekt vanzelf dat als je weinig vat hebt op welke prikkels er exact moeten worden gegeven, en eventueel ook nog wanneer, je grote problemen krijgt als je het proces wil opschalen. De aard en toediening van de prikkels is dan moeilijk vergelijkbaar te maken met een kleinschalige (vaak petri-schaal) cultuur.

## 7.5 Synchronisatie en accumulatie van somatische embryo's

Om enige synchronisatie te krijgen is het gewenst om partijtjes van het zelfde ontwikkelingsstadium bij elkaar te krijgen. Er kan dan gelijktijdig een behandeling op worden losgelaten die bijvoorbeeld rust induceert, of weerstand tegen stress opbouwt. In de figuur is een voorbeeld te zien van zo'n filter of zeef unit. De embryo's die inmiddels groot genoeg zijn blijven in het middelste segment hangen en de andere deeltjes verdwijnen naar rechts of links weer terug in de fermentor. (Een andere koppeling is natuurlijk ook mogelijk). Door zo'n zuiveringsstap kan het aantal voldoende uitgegroeide embryo's met een factor 2 tot 2,5 worden geconcentreerd.

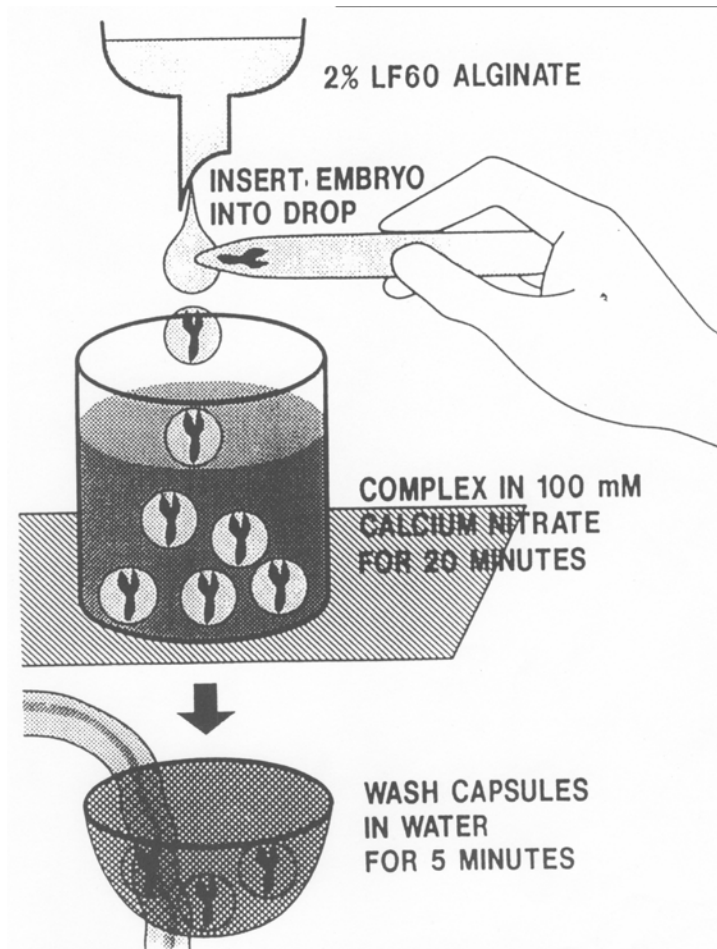


Figuur 6. Voorbeeld van een scheidingszeef

## 7.6 Inhulling van embryo's

De inhulling van de embryo's is ongelofelijk belangrijk. Zo'n omhulsel is nodig om het embryo reservevoedsel mee te geven, te beschermen tegen uitdroging en door de toevoeging van diverse stoffen ook bescherming te bieden tegen belagers. Daarnaast moet de totale capsule goed te bewaren zijn, een goed kiemingsresultaat leveren, goedkoop zijn en met normale zaaiapparatuur te verwerken zijn. De traditionele vormen van zaadcoating zijn niet geschikt om toe te passen op somatische embryo's dus er moest wat anders worden bedacht.





*Figuur 7. Productie van Calcium alginat capsules onder toediening van een embryo*

In grote lijnen zijn er twee typen van artificiële zaden, de gehydrateerde en de uitgedroogde. De gehydrateerde bestaan uit somatische embryo's die apart ingehuld zijn in een hydrogel, bijvoorbeeld calcium alginat. Embryo's worden al dan niet één voor één gemengd met Na-alginat en dan in een bekersglas met een calcium nitraat gegooid, waardoor een calcium alginat capsules ontstaan ( bovenstaande figuur). De capsules worden dan gewassen in water en vervolgens geplant. Bij planten in-vitro is bij luzerne een conversie factor van 60 - 90% gehaald. d.w.z. 60 - 90% van de somatische embryo's vormden complete planten. (tabel hieronder) Bij zaaien in de kas loopt dat percentage terug naar 2 - 10%. De voordelen van alginat zijn duidelijk. Het is een eenvoudig systeem, de embryo's ondergaan een vrij vriendelijke handeling een na een kleverig begin (makkelijk uit te halen) drogen ze vrij makkelijk. Er zijn wel andere kandidaten voor het coating materiaal. Gedacht wordt aan amyloextrinen of kunstharzen.

**Tabel 2. Vooruitgang in kieming van luzerne in-vitro (uit: Redenbaugh 1990)**

Year	Percent in vitro conversion <sup>z</sup> of randomly selected <sup>y</sup> somatic embryos
1982	<0.5
1983	8.0
1984	30.0
1985	40-50
1986	50-70
1987	60-90

<sup>z</sup>Conversion frequency is defined as the percentage of somatic embryos forming complete plants (Redenbaugh et al., 1987a).

<sup>y</sup>All embryos >1 mm in diameter.

De uitgedroogde artificiële zaden worden bijvoorbeeld gemaakt door somatische embryo's te omhullen met poly-oxy-ethyleen glycol. De embryo's worden dan enige uren te drogen gelegd op een Teflon oppervlak onder een steriele stolp. Na re-hydratatie bleek dat alleen gecoate embryo's het overleefden.

Tot nog toe is geen enkele inkapselingsmethode voldoende bevredigend. Gehydrateerde capsules zijn moeilijk te bewaren omdat de embryo ademhaling door blijft gaan. Ze drogen ook vrij snel uit, tenzij ze worden bewaard in een vochtige omgeving of worden omhuld met een hydrofoob membraan. Daar komt nog bij dat dat een aantal zaden behoefte heeft aan een kunstmatig endosperm. Vooral voor grassen lijkt een koolhydraten-, en mineralenbron nodig.

Uitgedroogde embryo's hebben andere problemen. De uitdroging schaadt de embryo's een enkele uitzondering daargelaten. Het blijkt bijvoorbeeld bij druiven dat de uitdroging van de somatische embryo's de rust toestand verminderde en zo 20-30% kieming kon worden gerealiseerd tegen 5% bij niet uitgedroogde embryo's. De kiemkracht liep gedurende de bewaring van deze ongecoate embryo's ook erg snel terug.

## 7.7 Bewaring, verpakking

Zoals al uit het bovenstaande naar voren kwam zijn er de volgende eenheden te verwachten:

- De ingekapselde embryo's
- De uitgedroogde gecoate klompjes embryo's
- De uitgedroogde ongecoate embryo's
- De embryo's in fluid gels, te zaaien m.b.v. de fluid drilling techniek.

de bewaring kan op een aantal manieren gebeuren. Al eerder is opgemerkt dat zaden van diverse gewassen uitdroging niet tolereren, terwijl andere juist niet zonder kunnen. Dat betekent dat er meerdere manieren van bewaring in aanmerking komen. Allereerst is er de keuze, ingekapseld of naakt. Daarna de keuze vochtig of uitgedroogd. In welke situatie dan ook, de samenstelling van de lucht tijdens de bewaring moet er op worden aangepast (vocht, O<sub>2</sub>-gehalte). Tenslotte komen

mogelijkheden als vries-drogen of cryopreservering ook nog in aanmerking

## 7.8 Verzaaibaarheid

"Fluid drilling" is een zaai-techniek die het mogelijk maakt om ook andere dan harde losse deeltjes te verzaaien. Deze techniek zal, afhankelijk van de uiteindelijke manier van inhulling ook vaak moeten worden ingezet. Voor de tweede en derde mogelijkheid als hierboven genoemd is een aangepaste vorm van gewone zaai te overwegen. Bijvoorbeeld iets wat te vergelijken is met het zaaien van Begonia's.

## 7.9 Kiemplantontwikkeling

Er treden veel afwijkende kiemplanten op. Dicotylen die met 1 of 3 cotylen boven de grond komen zijn niet zeldzaam. Als het goed is had je het kunnen zien aan de vorm van de embryo's. Daarmee is nog niet gezegd dat de planten direct onbruikbaar afwijkend zijn. Om problemen te voorkomen wordt dan een "image-analyser" gebruikt om deze afwijkers er uit te gooien voordat de embryo's worden ingehuld. Op de figuur van de proeven van Krikorian kun je zien dat de afwijkers weer terug gaan in de 'prut' om weer nieuwe calli en PEM's te gaan vormen.

## 7.10 Bescherming tegen ziekten en plagen

De coating die wordt meegegeven is natuurlijk de meest geëigende plek voor het meegeven van allerlei 'ciden'. En dat is wel nodig ook want de 'natuurlijke' bescherming van het 'zaad' is er niet meer, er is zelfs een bruikbaar substraat voor in de plaats gekomen. Anderzijds is het, juist door het ontbreken van een natuurlijke bescherming, gevaarlijk om deze stoffen toe te voegen. De invloed op het embryo, dat toch al minder weerstand heeft, zal groter kunnen zijn.

## 7.11 Kwaliteit en prijs t.o.v. klassiek uitgangsmateriaal

Voor koffie is uitgerekend dat een prijs tot 2 dollarcent per embryocapsule acceptabel is. De kosten van een goed werkend systeem kunnen komen op een getal dat 1% daarvan is.

## 8. Embryocultuur

Embryocultuur, de oudste vorm van weefselkweek, heeft nog steeds een grote betekenis voor de veredeling en het veredelingsonderzoek. De meest bekende toepassing is die van de embryo-redding bij soort- en geslachtskruisingen. In het verlengde van embryocultuur liggen zaadknop- en ovariumcultuur, welke worden gebruikt voor vroege embryo-redding. Zaadknopcultuur wordt eveneens gebruikt voor het produceren van haploïde planten via gynogenese en voor in vitro bestuiving. Ook bij de meer geavanceerde biotechnologische verdelingsmethoden spelen embryo's een belangrijke rol. Met behulp van micro-injectie en beschieten met DNA worden genen rechtstreeks in embryocellen binnengebracht en hieruit kunnen transgene planten ontstaan. Bij embryocultuur wordt uit zaden het embryo geprepareerd en geplaatst op een voedingsmedium. In het geval van zaadcultuur wordt het hele zaad op een medium geplaatst, het embryo wordt dan dus niet uitprepareerd. Dit laatste kan grote voordelen hebben: het uitprepareren is dikwijls een lastig en tijdrovend karweitje.

### 8.1 Groei en ontwikkeling van normale embryo's

Als techniek is embryocultuur niet erg moeilijk. Belangrijk is te weten hoe de ontwikkeling van de embryo's normaal verloopt bij het betreffende gewas. Er zijn wat dat betreft grote verschillen binnen het plantenrijk zowel in de vorm van de embryo's, in hun ligging in de zaadknop, als ook in hun ontwikkeling in de tijd. Bij komkommer bijvoorbeeld is het embryo na een maand al aan het afrijpen, maar bij tulp verkeert het dan nog maar in het bolvormig stadium, terwijl het bij de oliepalm dan net een zygote van vier cellen is. De grootte van het embryo en zijn ligging in de zaadknop hebben grote consequenties voor de manier van uitprepareren, waarvan velerlei variaties bestaan. Hoe het embryo er uit ziet, is sterk afhankelijk van het ontwikkelingsstadium en van het feit of de cotylen de functie hebben van opslagorgaan van reservevoedsel of niet. Bekende stadia zijn bolvormig-, hartvormig- en cotylstadium, maar een grote verscheidenheid van vormen blijkt uit de aanduidingen als wandelstok- en hoefijzerstadium zoals bij herderstasje en konijneoor- en ankerbladstadium zoals bij komkommer.

### 8.2 In vitro kweek van embryo's

Het is nuttig om eerst ervaring op te doen met het kweken van de normale embryo's voordat wordt overgegaan naar de hybride, aborterende embryo's. Algemeen wordt hierbij onderscheid gemaakt tussen de heterotrofe, nog ongedifferentieerde embryo's en de autotrofe, gedifferentieerde embryo's die al een groeipunt, worteltopje en cotylen hebben gevormd. Deze laatste treffen we aan in afrijpende zaden. Zulke embryo's slaan al aan op een medium met alleen macro-elementen en suiker en gaan daarop goed kiemen. Hoe jonger de embryo's echter zijn, hoe meer extra en bijzondere componenten moeten worden toegevoegd aan het medium om groei en ontwikkeling mogelijk te maken. Voor embryo's halverwege de ontwikkeling, dit is in het cotylstadium, moet het medium ook spore-elementen en vitamines bevatten, terwijl nog jongere

embryo in het bol- en hartvormig stadium speciale aminozuren en hormonen nodig hebben. In het verleden werden bij het kweken van de zeer jonge embryo's belangrijke stappen voorwaarts geboekt na de ontdekking van de zogenaamde '*embryo factors*' in kokosmelk, moutextract en caseïnehydrolysaat e.d. De werking van deze factoren kan voor een groot deel toegeschreven worden aan de aanwezigheid van diverse aminozuren in deze stoffen.

Naast de ontdekking van de '*embryo factors*' heeft ook de ontwikkeling van endosperm als voedsterweefsel de kweek van jonge embryo's gestimuleerd. Bij diverse gewassen is het nu gelukt jonge embryo's te kweken. Voorbeelden zijn tarwe, tabak, katoen, koolsoorten, vlinderbloemigen, vroegrijpende steenvruchten (bijv. kers, appel), vlas, zonnebloem, tulp etc.

Inmiddels lukt het bij de meeste onderzochte gewassen om ook uit zeer jonge embryo's plantjes te kweken. Tegenwoordig worden daarbij ook veel media gebruikt die zijn ontwikkeld voor het kweken van losse cellen en protoplasten.

We kunnen twee typen embryocultuur onderscheiden:

- a. Cultuur van onvolgroeide embryo's
- b. Cultuur van volgroeide embryo's.

### 8.2.1 Cultuur van onvolgroeide embryo's

Onvolgroeide embryo's bevinden zich in onrijp zaad. De cultuur kan worden toegepast wanneer sprake is van diplontische steriliteit: gameten versmelten wel maar het embryo aborteert na verloop van tijd, meestal doordat het endosperm (voedingsweefsel rondom het embryo) zich onvolledig of helemaal niet ontwikkelt. Het embryo kan dan gered worden (voorkómen van embryoabortie) door plaatsing op een medium: 'embryo rescue'.

Deze embryocultuur is belangrijk in de veredeling. Kruisingen tussen soorten (interspecifieke kruisingen) kunnen worden uitgevoerd, indien tenminste embryo's ontstaan.

*Bijv.: TMV-resistentie ingebracht in tomaat: Lycopersicum esculentum x L. peruvianum. Om het uitprepareren uit zaad te omzeilen is bij deze kruising de onrijp-zaad cultuur ontworpen. Onrijp zaad met aborterende embryo's werden geplaatst op aangepast MS-medium + 2,4-D + BA om callus te induceren. Het callus verscheen binnen 2 maanden in 12% van de zaden en werd vervolgens geregenereerd tot interspecifieke, hybride planten.*

#### 8.2.1.1 Voortijdige kieming

Niet alleen voedingsbestanddelen van het medium spelen een rol bij de embryocultuur maar ook fysische eigenschappen van het medium. Vooral de osmolariteit is van belang, die voor een groot deel kan worden geregeld met behulp van de suikerconcentratie. Bekend is in dit verband het verschijnsel "precocious germination" of voortijdige kieming, wat inhoudt dat de embryo's stoppen met het volgen van hun normale embryonale ontwikkeling, terwijl die eigenlijk nog niet voltooid is, en overgaan tot kieming. Dit treedt op bij een lage osmolariteit van het medium of wanneer de embryo's niet goed in contact zijn met het medium. Embryo's die voortijdig kiemen, geven echter vaak zwakke zaailingen met allerlei afwijkingen.

Dit is in vele gevallen een ongewenste situatie. Maar niet in alle. Bij het kweken van

interspecifieke hybride embryo's zal in veel gevallen abortie optreden wanneer de gehele embryonale ontwikkeling wordt voltooid. Voortijdige kieming kan dan een uitkomst zijn. In een aantal gevallen (bijv. bij soortskruisingen binnen het geslacht Cucumis) is het gelukt om uit afwijkende zaailingen toch volwaardige planten te laten ontstaan. Een lage osmotische waarde blijkt voortijdige kieming te bevorderen. In zulke gevallen is het dus raadzaam weinig suiker aan het medium toe te voegen.

### 8.2.2 Cultuur van volgroeide embryo's

Volgroeide embryo's worden verkregen uit afgerijpt zaad. Ze worden uit de zaadhuid geprepareerd en op medium geplaatst. Dit wordt gedaan in gevallen waarbij de embryo's in slecht kiemende zaden zitten (zaadhuid te dik, zaadhuid remt m.b.v. bepaalde stoffen, het embryo is in rust). Door de cultuur van volgroeide embryo's kan de generatieduur verkort worden. Dit is o.a. belangrijk bij houtige gewassen.

Bijv.: *Volgroeide embryo's van Kamperfoelie worden gezet op MS-medium + myoinositol, thiamine + caseïnehydrolysaat (400 mg/l) + 4% sucrose + 0,7% agar + 1 mg/l GA<sub>3</sub> (rustverbrekend).*

Een probleem bij de embryocultuur is de ontsmetting. In veel gevallen is (sterk verdund) bleekwater dodelijk voor de embryo's. Daarom worden enkele alternatieven toegepast.

Bijv.: *-Kamperfoelie: zaad wordt ontsmet i.p.v. embryo.*

*-Zomereik:*

*\* bij de eerste ontsmetting worden de eikels verwarmd (3 uur bij 41°C)*

*\* vervolgens wordt het embryo geprepareerd: zaadhuid wordt verwijderd, cotylen weggesneden. Over blijft een embryo met een laagje endosperm er omheen.*

*\* embryo met endosperm wordt gedurende 20 min. in 2% bleekwater gelegd en daarna in zijn geheel geënt.*

Let wel: Bovenbeschreven embryocultuur is iets anders dan de somatische embryogenese: 'vegetatieve embryo's' die ontstaan uit callus (via embryonale verdikkingen) of direct uit weefselcellen.

Voorbeelden: *-Bloemkool: somatische embryogenese in callus afkomstig van bladeren.*

*\*inductie van embryoïden in callus op MS-medium + 1 mg/l IAA + 1 mg/l kinetine*

*\*wanneer embryoïden gevormd zijn wordt het callus overgezet op een medium met lagere auxineniveaus (0,1 -0.01 mg/l IAA).*

*-Celsuspensieculturen van Selderij: embryoïden ontwikkelen zich het best in afwezigheid van hormonen; vermogen tot embryogenese blijft behouden zolang 2,4-D niet aan medium wordt toegevoegd.*

## 9. Calluscultuur

Onder callus verstaan we: min of meer ongedifferentieerd woekerweefsel, dat meestal ontstaat op wondvlakken van gedifferentieerde weefsels en organen.

Gebruiken we callus als tussenstap bij de in vitro vermeerdering, dan kunnen we de volgende 3 stadia onderscheiden:

### a. Callusinductie

Hiervoor is vaak een hoog auxine-gehalte nodig. Er moet de-differentiatie (re-juvinatie) van weefsel plaatsvinden. Hoe 'ouder' het weefsel is hoe moeilijker dat gaat. De meeste explantaten van de plant kunnen op de één of andere manier wel tot callusvorming aangezet worden.

### b. Calluskweek

Geschiedt dikwijls in vloeibaar medium. De auxineconcentratie wordt vaak verlaagd.

### c. Regeneratie

Dit is de moeilijkste stap in een calluscultuur. Regeneratie van spruiten vindt in het algemeen plaats bij een hoge cytokinine- en lage auxineconcentratie, terwijl wortels beter regenereren bij hoge auxine- en lage cytokinineconcentratie.

Op deze algemene regel zijn natuurlijk uitzonderingen.

*Bijv.: een lage IAA-concentratie is nodig voor regeneratie van wortels uit callus op aardappel-knolweefsel.*

Regeneratie van embryo's uit callus vindt plaats bij hoge auxineconcentratie voor inductie van embryoïden en wat lagere concentratie voor groei en ontwikkeling van die embryoïden.

Zoals gezegd zijn er veel problemen met de regeneratie. Eén ervan is de genotype-afhankelijkheid, bij de ene cultivar is regeneratie eenvoudig, bij de andere cultivar (zelfde soort) erg moeilijk. Daarnaast kan het regeneratievermogen verloren gaan bij langdurige calluskweek. Voor de verklaring hiervan kan het volgende voorbeeld misschien een indicatie leveren:

*Bijv.: Celsuspensieculturen van wortel (Daucus): embryoëen vermogen op een medium met 2,4-D nam af bij toename van de tijd en het aantal subculturen. Dit was direkt gecorreleerd met de toename van het aantal tetraploide cellen.*

In het algemeen kunnen we stellen dat callusculturen cytologisch instabiel zijn. Dikwijls treedt chromosoomverlies, -mutatie en/of polyploidie op. Geregenereerde planten zijn chimaer; er is gebrek aan uniformiteit. Een mogelijke verklaring voor de instabiliteit is de volgende: In het callus is er geen goede selectie op het normale celtype zoals bijv. in een spruitmeristeem van een intakte plant. Cellen met afwijkingen worden in het beschermde milieu van de weefselkweek niet weggeleekerd.

*Bijv.: Komkommer: Op bladponsjes van primaire bladeren ontwikkelt zich callus. Vrij snel ontstaan hierop somatische embryo's. Door goede kweekcondities is het mogelijk dit callus een aantal keren verder te kweken en op elk gewenst moment embryo's te laten ontstaan, waaruit volledige planten worden gekweekt. Hoe ouder het callus, hoe vaker blijkt dat de geregenereerde*

*planten verschillen in groeikracht, gelachtsexpressie e.d.*

Gibberellinen kunnen vorming van callus en regeneratie van scheuten uit callus remmen.

*Bijv.: Tomaat: behandeling met CCC (remt de GA-synthese) heeft tot gevolg dat de hoeveelheid callus en het aantal scheutjes toenemen.*

Voor diverse gewassen, vooral voor monocotylen, is regeneratie van complete planten alleen mogelijk via callus als tussenfase. Dan nog is de regeneratie vaak lastig. Toch is regeneratie voor een aantal monocotylen al wel gelukt (bijv. rijst, haver, mais en lelie). De grootste bottleneck is de beworteling van de geregenereerde scheutjes, terwijl de overgang naar de grond ook nog wel eens problemen geeft.

Regeneratie van planten uit protoplasten gaat ook via een callus-tussenfase. Deze regeneratie is zo belangrijk om veredeling m.b.v. protoplastenfusie mogelijk te maken.

*Bijv.: Lolium (raaigras): Tot voor kort was protoplastenfusie bij dit belangrijke gewas zinloos omdat men geen plantjes kon regenereren. Recentelijk is dit wel gelukt. Helaas blijkt er nog veel variatie aanwezig te zijn in het geregenereerde materiaal. Omdat de callusfase mutaties induceert is men nu bezig een methode voor vermeerdering te ontwikkelen waarbij de callusfase omzeild wordt. Men tracht spermacellen te isoleren om die in vitro te laten fuseren met eicellen uit de zaadknoppen.*

Tenslotte:

Er zijn diverse typen callus en niet elk type regeneert even makkelijk. In de literatuur worden Type I en Type II callus onderscheiden. Type I callus is dan zacht en waterig en Type II een erg compact callus type. Type II wordt weer onderverdeeld in Types A, B, C and D. Type C and D ontwikkelen zich uit Type A en B na een groot aantal subculturen (5 - 8 maanden) en behouden hun regeneratiemogelijkheden meer dan 18 maanden. Samengevat geldt het volgende schema:

*Tabel 3. Typen-indeling callus en hun regeneratiemogelijkheden*

Type I	zacht, waterig, niet embryogeen, onbruikbaar (misschien nog voor cel cultures?)					
Type II	compact, embryogeen, te verdelen in:					
	Kleur	consistentie	embryogeen	regeneert scheut en plant	geschikt voor cel- suspensie	regeneert vanuit cel- suspensie
Type A	gebroken wit	compact	+	+	-	-
Type B	Wit	compact	+	+	-	-
Type C	Vuilwit	verouderd, compact	+	+	+	+
Type D	vuilwit	verouderd, broos	+	+	+	-



## 10. Antherencultuur

Het principe waarvan de antherencultuur gebruik maakt, is de 'androgenese in vitro': De vegetatieve of generatieve kern van een stuifmeelkorrel (microspore) wordt geprikkeld om tot een haploïd individu uit te groeien zonder aan de bevruchting deel te hebben genomen.

### 10.1 Inleiding

In de normale ontwikkeling van pollen ontstaan uit de pollenmoedercellen na een meiotische deling de jonge microsporen. Men spreekt van microsporen indien deze nog maar één kern bezitten.

Vervolgens ondergaan deze microsporen een pollenmitose waarbij in de kern een asymmetrische deling plaats vindt. Er wordt binucleaat (tweekernig) pollen gevormd. Bij soorten met trinucleaat pollen deelt een van de kernen nogmaals. Dit heet de gametofytische ontwikkeling. In de androgenese is sprake van symmetrische delingen van de kern. Dit heet een sporofytische ontwikkeling. Om deze omslag te induceren van een normale gametofytische ontwikkeling naar een sporofytische ontwikkeling is over het algemeen een vorm van stress nodig. Androgenese kan via twee methoden bereikt worden, nl. antherencultuur en microsporencultuur.

Bij antherencultuur wordt de gehele helmknop met onrijpe pollenkorrels op een voedingsmedium geplaatst. De stress kan worden toegediend aan de plant ofwel na overplaatsing van de antheren op het medium. De pollenkorrels gaan sporofytisch delen en vormen een embryo of callus. Na een bepaalde periode, 4 tot 6 weken bij tarwe, barsten de haploïde embryo's of het haploïde callus uit de anthere. De **inductiefrequentie** (=percentage embryo's per 100 uitgelegde antheren) verschilt per genotype. Het callus of de embryo's kunnen worden aangezet tot uitgroei van een plant. Dit noemen we regeneratie. Sommige soorten bijv. Nicotiana tabacum en Datura innoxia hebben een hoge groeisnelheid en duurt het 3 tot 4 maanden van de anthereninoculatie tot aan een volwassen plant. Bij Paeonia duurt de eerste stap van anthereninoculatie tot het tevoorschijn komen van de eerste plantjes 4 tot 6 maanden (Sunderland, 1974)

Aan antherencultuur is het meeste onderzoek gedaan en deze cultuur wordt het meest toegepast in de praktijk.

Voordelen van de haploïden-inductie in vitro:

-Men bereikt via haploïden-inductie na chromosoomverdubbeling met bijv. colchicine (deze stof is gemakkelijk in vitro toe te dienen), op de snelst mogelijke manier homozygotie. Zo kunnen snel inteeltlijnen voor de hybridenproductie verkregen worden.

-Recessieve eigenschappen komen in haploïden boven water.

-Het verkrijgen van alleen mannelijke planten wordt mogelijk.

*Bijv.: Asperge: mannelijke planten produceren beter en vroeger. Helmknoppen van mannelijke planten bevatten X of Y. Na verdubbeling (colchicine) wordt dit XX (vrouwelijk) of YY (super-mannelijk). Na kruising geeft dit 100% mannelijke planten: XX x YY: XY.*

Onder antherencultuur wordt het volgende verstaan: Jonge helmknoppen (antheren) met daarin

stuifmeelkorrels worden geënt op een voedingsbodem. Na verloop van tijd ontstaan direkt embryo's of ontstaat eerst een haploïd callusweefsel, waaruit plantjes geregenereerd kunnen worden.

De werkwijze die gevolgd moet worden bij het isoleren van helmknoppen, wordt beschreven in het boekje van Prof. Pierik, blz. 152.

Als kort voorbeeld hier de stappen voor een antheren cultuur van tarwe

1. opkweek van de donorplanten
2. oogst van de antheren met microsporen in het gewenste ontwikkelingsstadium.
3. de antheren worden, al dan niet na het krijgen van een stressbehandeling, geïncubeerd in een vloeibaar of vast medium.
4. na 4 weken worden de gevormde embryo's overgebracht naar een tweede medium voor regeneratie tot planten.
5. het haploïde materiaal (embryo's, callus, planten) wordt gediploïdiseerd m.b.v. colchicine

Een andere methode van haploïdencultuur is de microsporencultuur: niet de complete helmknop maar de geïsoleerde stuifmeelkorrels (microsporen) worden op een medium gebracht. De isolatie kan op twee manieren uitgevoerd worden: mechanische isolatie of de zgn. 'shed pollen' techniek. Bij mechanische isolatie wordt de helmknopwand kunstmatig opengescheurd en komen de microsporen vrij. Bij de 'shed pollen' techniek worden de antheren in een medium geplaatst waarin na enkele dagen de antheren openbarsten. Op deze manier komen de microsporen ook vrij. Bij microsporencultuur wordt geen stressbehandeling van de antheren toegepast, maar worden de geïsoleerde microsporen aan een stress bloot gesteld (bijv. uithongering of een verhoogde temperatuur) en vervolgens onder niet-stresscondities doorgekweekt. Dit is het geval bij tabak (Garrido et al., 1991) of gerst (Hoekstra et al., 1992). De microsporen kunnen dan sporofytisch gaan delen en uiteindelijk callus of embryo's vormen.

In vergelijking tot de antherencultuur kent de microsporencultuur voor- en nadelen.

Voordeel: -geen uitgroei van cellen van de helmknop, zodat geen diploide nakomelingen ontstaan  
-geen last van remmende werking van de helmknop.

Nadeel: De opbrengst van haploïde planten is veelal geringer. Het blijkt nl. (vooral bij granen), dat de antherenwand een essentiële rol speelt tijdens de eerste fase van de cultuur. Na deze fase kan het microsporencallus op een ander medium overgezet worden zonder dat daarbij remming optreedt.

Overwegingen om te kiezen voor microsporencultuur i.p.v. antherencultuur kunnen zijn:

-Microsporencultuur verloopt over het algemeen sneller en kost minder arbeidstijd dan antherencultuur. Bovendien is het effect van een bepaalde behandeling in een experiment direkt te zien.

-Geen hinder van de na enige tijd verbruinende en schadelijk wordende helmknopwand.

-Selectie mogelijkheden op celnivo.

-Grotere aantallen embryo's te verkrijgen dan bij antherencultuur, bijv. bij gerst en koolzaad.

-Bij microsporencultuur zijn alle planten die gevormd worden, ook daadwerkelijk ontstaan uit microsporen, terwijl bij antherencultuur de kans aanwezig is dat er planten geregenereerd worden door de uitgroei van cellen uit de helmknopwand.

In het navolgende zullen eerst enkele factoren die het succes van de antherencultuur beïnvloeden, toegelicht worden. Daarna zullen enkele karakteristieken van uit antheren geregenereerde planten bekeken worden.

## **10.2 Factoren van invloed op een antherencultuur.**

### **10.2.1 Genotype**

Embryovorming en plantregeneratie zijn in hoge mate genotype-afhankelijk. Heritabiliteits voor beide eigenschappen zijn voor tarwe 0.6 tot 0.7 (Lazar, 1984). De genen die verantwoordelijk zijn voor de in vitro androgenese, zijn op het kerngenoom gelegen en niet op het cytoplasmatisch genoom (Bullock et al., 1982). Inkruising van deze eigenschappen biedt dan ook perspectieven. Genotypen met het 1B/1R tarwe-rogge translocatiechromosoom hebben alle een hogere in vitro respons (Foroughi-Wehr & Zeller, 1990; Henry & De Buyser, 1985; Muller et al., 1990). Bij gerst worden m.b.v. microsporencultuur hoge aantallen embryo's verkregen, echter alleen van een beperkt aantal genotypen.

### **10.2.2 Omstandigheden waaronder donor-planten zijn opgegroeid**

De opkweek van de donorplanten voorafgaand aan het moment van antherenoogst heeft een grote invloed op de embryovorming. Over het algemeen wordt bij tarwe gevonden dat veldplanten een betere respons geven dan kasplanten (De Buyser, 1986; Ouyang, 1986). De milieucondities van veldplanten kunnen echter niet gecontroleerd worden, en daarom wordt soms gevonden dat kasplanten een betere respons geven dan veldplanten (Bjornstad et al., 1989). Aangezien er geen microscopisch waarneembaar verschil in morfologie of ontwikkelingsstadium is waar te nemen tussen microsporen uit verschillende seizoenen, wordt verondersteld dat de opkweekcondities de endogene status van donorplanten beïnvloeden (Wenzel & Foroughi-Wehr, 1984). Kritische milieufactoren zijn: lichtintensiteit, fotoperiode, nutriëntenvoorziening, en CO<sub>2</sub>. Bij tabak blijken fotoperiode en lichtintensiteit van invloed op de hoeveelheid microspore-embryo's en de daaruit verkregen plantjes. Tevens blijkt de stikstofgift laag te moeten zijn. Bij diverse gewassen blijkt de temperatuur van opgroei belangrijk. Soms blijkt koude bevorderlijk voor de antherencultuur, in andere gevallen is een hogere temperatuur dan gewoonlijk juist bevorderlijk. Er is dus geen algemene regel voor te geven.

### **10.2.3 Leeftijd van de donor plant**

In de meeste gevallen produceren vroege bloemen of aren antheren met een hogere opbrengst, dan bloemen of aren die later in het seizoen gevormd worden.

### **10.2.4 Ontwikkelingsstadium van het pollen**

Dit blijkt één van de meest cruciale factoren te zijn in het cultuurproces: kleine veranderingen in het ontwikkelingsstadium hebben grote veranderingen in opbrengst tot gevolg.

Bijv.: *Bij tabak blijkt een verschil van 2 mm in bloemkroonlengte (een maat voor het ontwikkelingsstadium van het pollen) een viervoudig verschil in opbrengst van plantjes uit pollen tot gevolg te hebben.*

Embryo's kunnen worden verkregen vanaf de meiotische stadia van de microsporen tot en met het binucleate stadium in de pollenontwikkeling. Bij tarwe geeft het laat uni-nucleate stadium de hoogste opbrengst aan embryo's (He & Ouyang, 1984). Het voor een succesvolle cultuur meest geschikte stadium verschilt per soort. Bij tabak is dat tijdens de eerste mitotische deling. Bij Nicotiana sylvestris wat later, maar bij granen juist vroeger, nl. wanneer de microspore nog éénkernig is. Voor een exacte bepaling van het ontwikkelingsstadium is cytologisch onderzoek nodig. Voor een massale kweek van haploden vertrouwt men meestal op minder betrouwbare, externe, morfologische indicatoren (bijv. lengte van de kroonbladeren).

### 10.2.5 Methode van sterilisatie

Er zijn aanwijzingen bij rijst dat sterilisatie van bloeiwijzen met bleekwater en ook een verlengde behandeling met ethanol van de bloeiwijzen, de regeneratie uit antheren kan remmen.

### 10.2.6 Voorbehandeling van antheren

Lage temperatuur (4-7°C), hoge temperatuur (32-35°C), uithongering, centrifugering, ethrel bespuiting, bestraling, verlaging van de atmosferische druk of osmotische stress zijn allemaal factoren die het uiteindelijke resultaat kunnen beïnvloeden. (Wenzel & Foroughi-Wehr, 1984; Sangwan-Norreel et al, 1986). De resultaten die hiermee werden verkregen zijn echter vaak niet reproduceerbaar door andere auteurs of spreken elkaar tegen (Sunderland, 1974, 1983). Het meest effectief en het meest toegepast bij antherencultuur van tarwe is de lage temperatuur behandeling: de tarwearen worden een periode variërend van 3 tot 14 dagen bij een temperatuur van 4 °C tot 7 °C bewaard. Bij microsporencultuur van gerst wordt veel gebruik gemaakt van uithongering door de antheren of de microsporen in een medium te brengen met mannitol. Bij aardappel wordt een 2 dagen durende bewaring bij 6°C aanbevolen. Optimumtemperatuur en duur van de behandeling verschillen per soort en zijn o.a. afhankelijk van het type explantaat (scheut, bloeiwijze, hele knop, geïsoleerde helmknop) en van de methode van bewaren.

### 10.2.7 Medium

Het optimale medium verschilt tussen soorten en ook binnen de soort. Voor tarwe geeft het Potato-2 medium (P2), waaraan aardappelextract is toegevoegd, goede resultaten (Chuang, et al, 1978). Andere gramineeën geven hoge embryo-opbrengsten op N6 (Chu, 1978), BS (Gamborg, 1970), of MS (Murashige and Skoog, 1962) media. De goede resultaten van media met aardappelextract (P I, P2, P4) worden geweten aan de grote verscheidenheid aan aanwezige aminozuren (Hughes, 1958). Nadeel van media met een toegevoegde organische component is de lage reproduceerbaarheid.

-Zouten: meestal worden MS-zouten (halve sterkte) gebruikt voor Solanaceae, terwijl granen het zoutmengsel volgens Nitsch prefereren.

-Fe: in veel gevallen een kritische faktor

*Bijv.: Bij tabak krijg je bij 0-30  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA alleen globulaire embryo's. Bij 40-150  $\mu\text{M}$  worden hele planten geregenereerd. Toevoeging van Fe induceert veroudering van de antherenwand. Dit is gunstig omdat dan de kans dat diploïde cellen van die wand gaan uitgroeien, geringer wordt.*

-Sucrose: Gramineeën en Cruciferen (volwassen pollen is tricellulair) hebben hoge sucroseniveaus nodig (6 - 15%). Voor Solanaceae (pollen bicellulair) is een sucroseniveau van 2 - 6% optimaal.

-Hormonen: Cytokinen zowel als auxinen zijn meestal vereist.

-Agar: Blijkt componenten te bevatten die remmend werken op de pollen-embryo-productie. Alternatieven zijn:

\* vloeibaar medium. Bijkomend voordeel: remstoffen geproduceerd door microsporen kunnen gemakkelijker weg. Nadeel: embryo's bezinken waardoor ze te weinig 'lucht' krijgen. De stof Ficoll (200 g/l) schijnt de bezinking tegen te gaan.

-Gebruik van agarose i.p.v. agar. Agarose blijkt geen remmende stoffen te bevatten; het is echter wel een dure stof. T.o.v. vloeibare media heeft het gebruik van agarose het voordeel dat de geproduceerde embryo's steun ondervinden.

-Als een soort compromis wordt wel gebruik gemaakt van het zogenaamde twee-fasen systeem: vloeibaar medium boven op een vast medium met agar. Zowel de mogelijkheid om remmende stoffen af te voeren als de steunfunctie zijn in dit systeem aanwezig. Gelrite (Johansson & Calleberg, 1989), PEG (Mohmand & Nabors, 1991) en Ficoll-400 (Datta, et al., 1986) worden gebruikt om de viscositeit van het medium te verhogen. De antheren blijven bij deze hogere viscositeiten op het medium drijven en zo wordt een goede zuurstofvoorziening van de antheren gewaarborgd.

### 10.2.8 Gasfase

Bij tabak is gebleken dat behandeling met stikstof samen met 2,5 of 5% zuurstof, de embryogenese in antheren stimuleert. Bij Papaver en Anemoon wordt door CO<sub>2</sub>-toediening de opbrengst van antheren verhoogd.

### 10.2.9 Cultuurdichtheid

Het aantal antheren per volume-eenheid medium is bij gerst belangrijk. Dit blijkt gerelateerd te zijn aan het voordeel dat geboden wordt door het gebruik van medium dat geconditioneerd is (voorbehandeld is) met andere stukjes weefsel van gerst, bijv. vruchtbeginsels. Ook bij rijst zijn dichtheidseffekten waargenomen.

### 10.2.10 Incubatie-omstandigheden: licht en temperatuur

Licht: culturen worden meestal eerst geïncubeerd in het donker totdat embryo's en callus verschijnen. daarna gaan ze over naar het licht. De invloed van licht is onduidelijk, al lijken er hogere embryo-opbrengsten te worden gehaald in complete duisternis dan in het licht (Bjornstad et al., 1989).

Temperatuur: gebruikelijke incubatietemperatuur ligt tussen 25 en 30 °C. Soms kan een hogere temperatuur voordelen bieden.

Bijv.: *Van de tarwecultivars Orofon en Pitic 62 bleken de antheren geïncubeerd bij 30°C 40% meer microsporecallus en groene planten te vormen dan die geïncubeerd bij 25°C. Bij 35°C ontstonden 2-3 keer zoveel groene planten.*

Ook twee verschillende temperaturen blijken sommige cultivars goed te reageren. Ouyang et al (1983) stelde vast dat een hoge inductietemperatuur aan het begin van de inductie (8 dagen 32 °C) gevolgd door groei bij 25 °C, in een aantal gevallen een hogere embryo-opbrengst geeft.

Zuurstof: Hoekstra et al (1992) vonden in microsporencultuur van gerst dat een goede zuurstofvoorziening tijdens de cultuur het percentage embryo's verhoogde.

### **10.2.11 Conditie voor regeneratie van complete planten**

-Solanaceae: de plantjes groeien direct uit de anthere. De plantjes worden overgezet op een medium met een lager sucrose-gehalte zodat wortels gevormd kunnen worden.

-Cruciferae: embryo's ontstaan uit een callus-tussenfase; de regeneratie wordt bemoeilijkt door adventieve secundaire embryogenese op het embryo-hypocotyl.

-Gramineae: microsporen produceren callus; callus moet overgezet worden op een medium met gereduceerde gehalten auxine en sucrose om scheuten te induceren.

## **10.3 Karakteristieken van geregenereerde planten.**

Drie speciale problemen doen zich voor met planten geregenereerd uit antheren. In de eerste plaats is het ploïdie-niveau niet konstant, vervolgens hebben we regelmatig te maken met albinisme en tenslotte is de genetische stabiliteit soms ver te zoeken. Over deze drie problemen nu iets meer.

### **1. Ploïdie**

Lang niet alle geregenereerde planten zijn haploïd, soms zijn hexaploïden gevonden. Is zo'n hexaploïd afkomstig van een haploïde microspore, dan is de kans groot dat zo'n hexaploïd homozygoot is.

Bij bijv. aardappel en rogge blijken regelmatig niet-gereduceerde heterozygote pollenkorrels voor te komen. De planten die ontstaan uit dat stuifmeel zijn dan ook heterozygoot.

Ontwikkelen de cellen van de antherenwand zich tot somatische embryo's, dan is de kans op heterozygote planten eveneens groot.

### **2. Albinisme**

Het grootste probleem in de antherencultuur is het grote aantal albino's (plantjes zonder bladgroen) onder de regeneranten. De frequentie hiervan is afhankelijk van de soort, het pollenstadium bij inoculatie en de cultuuromstandigheden.

De oorzaak van het optreden van albino's is onduidelijk: zijn de veranderingen al vooraf aanwezig in het pollen of worden ze geïnduceerd door het cultuurproces? Omdat albino's vegetatief blijven, kan de overerving van albinisme niet onderzocht worden.

### **3. Genetische stabiliteit**

Het is mogelijk dat het probleem van het albinisme slechts één aspect is van de totale

reorganisatie van het genoom van pollen of van zijn afstammelingen, vóór of tijdens de cultuur. Veel bewijs is al aanwezig dat er in regeneranten veranderingen in kwaliteit en kwantiteit van kern-DNA en ook van cytoplasmatisch DNA optreden. Deze veranderingen uiteten zich in allerlei morfologische modificaties.

In de meeste gevallen zullen dergelijke veranderingen ongunstig zijn, soms zijn ze echter gunstig (nieuwe variatie).

Androgenese heeft voor de bedrijven nog een aantal haken en ogen voor wat betreft de keuze van de generatie van toepassing:

1. Indien men begint met F1 zaad als donormateriaal neemt men het maximum aan niet wenselijk genen (vatbaarheid voor bepaalde ziektes) mee.
2. Wanneer men begint met F2 populaties als donormateriaal heeft men wel het voordeel dat men een deel van de niet gewenste genen kwijt is, maar men verliest een deel van de tijdwinst t.o.v. een conventioneel programma.
3. Bij wintergerst is er daarnaast nog het probleem dat na een androgenese-stap, de eerste veldgeneratie (DHO-lijnen) veel van de opgedane homozygotie verliest door inkruising als gevolg van open bloei.

## 10.4 Conclusies

Concluderend kan worden opgemerkt dat voor specifieke gewassen nog specifieke problemen opgelost dienen te worden. Het voornaamste probleem is de sterke genotype afhankelijkheid voor embryoproductie en regeneratie. Bij een aantal gewassen wordt androgenese toegepast in het praktische veredelingsprogramma (granen, koolzaad) en microsporencultuur wordt bij een aantal gewassen ook aantrekkelijk wordt voor de bedrijven om te integreren in hun praktische veredelingsprogramma's (koolzaad, gerst). De androgenetische weg is op dit moment financieel de meest aantrekkelijke manier om DH-lijnen te produceren (Foroughi-Wehr & Wenzel, 1990).

Aan het slot van deze paragraaf over antheren- en microsporencultuur, nog enkele woorden over een sterk verwante cultuur. We hebben gezien dat het principe van antherencultuur gelegen is in de androgenese. Een afgeleid principe is de gynogenese: de vrouwelijke megaspore wordt geprikkeld om te gaan kiemen om aldus een hele plant te vormen.

*Bij de zaadknop (ovulum)- en vruchtbeginsel (ovarium)cultuur wordt gebruik gemaakt van dit principe. De opbrengsten bij deze culturen zijn over het algemeen gering. Het percentage albino's is bij deze culturen echter laag hetgeen perspectieven biedt. Deze culturen zullen daarom in de toekomst waarschijnlijk steeds belangrijker worden.*

## 11. Protoplastencultuur

Onder protoplastencultuur verstaan we het kweken van celwandloze plantecellen. Deze cultuur is belangrijk voor de veredelingsstechnieken waarbij gebruik gemaakt wordt van protoplastenfusie: somatische hybridisatie en cybridisatie. Er wordt in het volgende blokje "Toepassingen van Cellen Weefselkweek in de Plantenveredeling" uitvoerig ingegaan op het fuseren van protoplasten.

Vooralsnog is een belangrijke beperking dat niet alle planten vanuit protoplasten te regenereren zijn. Daarom is de opgedane ervaring vooral beperkt tot Solanaceae, de Umbelliferae en de Cruciferae. Een schrijver uit de volgende verzuchting: ".but reproducible success is the exception rather than the rule..". Het blijkt dat door het uit elkaar halen van weefsels de onderlinge informatiestroom en gradiënten vervallen en de cel een gedeelte van zijn informatie verliest of niet tot uiting kan brengen. Het veroorzaakt ook het stoppen van de cytoplasma stroming gedurende een dag en een veranderd patroon in het cytoskelet.

### 11.1 Uitgangsmateriaal

#### 11.1.1 De opkweek

De richtlijnen voor de opkweek van plantmateriaal laten duidelijk zien dat de prioriteit ligt op het vermijden van infecties en het verkrijgen van een krachtig groeiende plant. Voor de opkweek wordt vaak gebruik gemaakt van een klimaatkamer of een kas met veel licht en een intensieve bestrijding van vooral insecten. Tripsen, witte vliegen en ook de spintmijt schijnen door hun steken in de plant een belangrijke bron voor besmetting van bacteriën te zijn. De bestrijding moet overigens niet plaatsvinden met systemische middelen omdat die ook enige invloed op de plant uitoefenen, die nu zeker moet worden vermeden. Nu zou de indruk kunnen zijn ontstaan dat schimmels minder belangrijk zijn. Toch blijkt ook de aanwezigheid van schimmels niet positief uit te werken op de resultaten van de protoplasten-overleving.

#### 11.1.2 De selectie van planteweefsels

Er kan gebruik gemaakt worden van verschillende weefsels van de plant. Soms lijkt het handig om callus uit in-vitro vermeerdering te nemen, of gebruik te maken van kant en klare suspensiecultures, maar in het gebruik blijkt de genetische stabiliteit van dergelijke celgroepen niet zo groot te zijn.

De meeste onderzoekers geven er dan ook de voorkeur aan om uit te gaan van hypocotylweefsel of van bladmateriaal en dan vooral het mesofyl daarvan. Het heeft het voordeel dat ze weinig gedifferentieerd zijn en ook niet sterk gedetermineerd, en bovendien in grote hoeveelheden voorradig. Ook blijkt dat deze weefsels doorgaans regelmatig diploïde zijn, wat lang niet van alle weefsels in de plant gezegd kan worden. Een enkeling vindt juist dat je uit moet gaan van scheuttopjes. Dat weefsel heeft veel grotere kans om tegen minder regeneratieproblemen op te lopen. Bovendien zijn er veel meristematische weefsels in te vinden, die sneller zullen delen en



regenereren.

Bij de keuze voor een celsuspensiecultuur als uitgangsmateriaal is het aan te raden om er één te kiezen die in de exponentiële groeifase verkeert. De wanden zijn dan relatief dun en de celwandafbrekende enzymen hoeven dan niet zolang in te werken.

Welk uitgangsmateriaal er ook wordt gekozen, er blijft een centraal "dogma" overeind: De protoplasten moeten een zeer hoge levensvatbaarheid hebben, zowel voor als na de behandelingen.

## **11.2 Van weefsel tot protoplast**

### **11.2.1 Sterilisatie van plantmateriaal**

Als je uitgaat van plantjes die uit een buis komen zal deze stap weinig problemen opleveren. Bij gebruik van mesofyl van blad van een plant die in vivo heeft gegroeid dan zijn er wel wat problemen te verwachten. De binnenkant van een blad bevat vaak veel bacteriën, en is ook niet zo bestand tegen de gebruikelijke ontsmettingsmethodes. Dit komt de vitaliteit van de protoplasten niet ten goede.

Een manier van steriliseren die in de literatuur nogal eens wordt beschreven is de volgende: Nadat de blaadjes zijn geselecteerd en geplukt worden ze in een pan gedaan en daar wordt een oplossing van 0,1 - 0,15% Na-hypochloriet en een beetje uitvloeier aan toegevoegd. Nadat dat 10 tot 20 minuten heeft staan intrekken, worden de bladeren eruit gehaald en grondig gewassen met steriel water.

Na de sterilisatie wordt de onderepidermis van het blad gepeuterd. De gepelde bladstukjes worden dan in een CPW medium gelegd met 13% mannitol. Als er 2 tot 4 gram bladmateriaal zo is verkregen worden de bladeren in stukjes gesneden. Dan kan de CPW-oplossing worden afgepipetteerd en kan de enzymoplossing worden toegevoegd. Daarmee moet het plantmateriaal worden afgebroken tot een protoplastensuspensie. De enzymen moeten de cellulose, pectine en hemicellulose afbreken.

De keuze van de enzymen kan gevolgen hebben voor het resultaat, omdat sommige enzymen moeilijk te zuiveren zijn. Als het enzympreparaat verontreinigd is met eiwitafbrekende enzymen dan kan dat invloed hebben op de membraaneigenschappen van de protoplasten.

Vaak moet een mengsel van een paar enzymen en ook nog in variërende concentraties worden gebruikt. Het mengsel dat moet worden gebruikt is afhankelijk van de plantensoort en het weefsel daarvan dat wordt gebruikt voor het verkrijgen van protoplasten. Het centrale "dogma" geldt ook hier weer. Dus niet te kort, maar zeker niet te lang laten inwerken.

De bladeren die in het vorige hoofdstukje zijn gesteriliseerd en gewassen zouden als volgt verder behandeld kunnen worden: Voeg de enzymoplossing toe en laat het, langzaam schuddend (50 tpm), een nacht bij 27 °C. staan. Verwijder vervolgens de enzym-oplossing en breng er CPW medium bij verrijkt met 21% sucrose. Voorzichtig roerend en schuddend, zodat de protoplasten

vrij komen, kun je nu het verteerde bladmateriaal opzuigen. De duur van de enzymbehandeling en de omstandigheden waaronder deze plaatsvindt zijn van grote invloed op de vitaliteit van de protoplasten. Zo zijn bijvoorbeeld pH, schudsnelheid en temperatuur belangrijk. Ook wordt de enzymbehandeling in het donker gedaan.

Voordat we de protoplasten verder vervolgen op hun weg naar een nieuwe plant eerst nog een paar woorden over de oplossingen. Het ligt voor de hand dat de cel niet zonder zijn wand kan in een omgeving die een heel andere samenstelling heeft. Als bijvoorbeeld de osmotische waarde van het milieu waarin de protoplast van zijn wand wordt ontdaan veel lager is dan die van de cel zal de protoplast uit elkaar spatten. De osmotische waarde van het vocht om de cel heen wordt tot stand gebracht door een bepaalde concentratie glucose, mannitol of sorbitol en zouten. Door deze vloeistof wordt de membraan van de protoplast "gestabiliseerd".

### **11.2.2 Het osmoticum**

Het osmoticum is een belangrijk onderdeel van de procedure. In deze term worden vanzelfsprekend zouten, maar ook de metabolische actieve suikers, sucrose en glucose, en de metabolisch niet actieve suikers mannitol en sorbitol samengevat. Als je alleen gebruikt maakt van glucose of sucrose dan zal de osmotische waarde van het medium langzaam afnemen omdat de protoplasten deze suikers opnemen en gebruiken. Dit heeft als voordeel dat het voor de protoplasten niet zo'n grote schok is als ze verder moeten groeien in een regeneratie medium. De osmotische waarde blijft gehandhaafd als er gebruik gemaakt wordt van mannitol of sorbitol. Het voordeel daarvan is dat ze niet zoveel last hebben van krimp en zwellen. Verder heeft de aard van de osmotisch actieve stof een vrij grote invloed op de delingen en ontwikkeling van de protoplast. Van aardappelen is bekend dat het gebruik van sucrose enerzijds op een aantal variëteiten een verdubbeling van het aantal bruikbare en regenererbare protoplasten te zien geeft, anderzijds, op andere variëteiten, grote effecten heeft op de regeneratie. Er zijn er bij die bij een verhoging van de sucroseconcentratie doodgaan; er zijn er ook bij die juist eerder beginnen met regeneratie van scheuten. Uit al deze waarnemingen is op te maken dat niet alleen de osmotische waarde van de vloeistof waarin de protoplasten zich bevinden erg belangrijk is, maar ook de beschikbaarheid van metabolisch actieve suikers. De osmotische waarde van de oplossing heeft niet alleen gevolgen voor de toestand van de protoplasten maar ook voor de resultaten van de fusie (zout!). Lagere osmotische waarden geven een hoger aantal fusieproducten, maar tegelijk een lagere levensvatbaarheid op termijn. De osmotische waarde kan ook door andere stoffen als de bovengenoemde suikers worden verzorgd. Het komt nogal eens voor dat er bij de vloeistof die gebruikt wordt om de enzymoplossing eruit te wassen keukenzout wordt gebruikt om de osmotische waarde op peil te houden. Wel moet er dan voor gezorgd worden dat deze waarde ongeveer dezelfde is als verderop in de procedure ( $\pm 500$  mOsm./kg).

### **11.2.3 Zuivering**

Na dat de celwanden zijn verknipt moeten de protoplasten uit het mengsel gezuiverd worden. Een eerste behandeling kan zijn het zeven van de suspensie. De grote brokken kunnen er zo worden uitgehaald. De maaswijdte van de gebruikte zeven moet groter zijn dan ongeveer  $50 \mu\text{m}$ . Vaak worden er 2 zeven gebruikt, de bovenste met een maaswijdte van ongeveer  $300 \mu\text{m}$  en een

tweede van ongeveer 75  $\mu\text{m}$ . Vervolgens moeten de enzymen er nog verder uit gehaald worden. Dit kan bijvoorbeeld door filtratie of door centrifugeren en opnieuw suspenderen. Omdat veel protoplasten kapot gaan tijdens filtratie wordt de centrifugering vaker toegepast. Bij 100g gedurende 10 minuten blijven in een 21%-ige sucroseoplossing de protoplasten bovenin drijven en zakken de andere celresten naar de bodem terwijl je ook de enzymen uitspoelt. Bij bijvoorbeeld 80 g en 10 minuten zakken de protoplasten als ze in een oplossing zitten met 13% mannitol. Ook het wassen wordt veel toegepast. Dit is te vergelijken met het wassen met steriel water na een ontsmetting.

Nu is het zover dat de oogst gekwantificeerd kan worden. Je zou bijvoorbeeld je vloeistof kunnen bemonsteren. 0,1 ml ervan kan onder een haemocytometer worden gebracht en worden geteld. Een haemocytometer is een speciaal kamertje dat gebruikt wordt om onder de microscoop het aantal rode bloedlichaampjes te tellen. Sommige mensen geven er de voorkeur aan om de grote protoplasten uit het mengsel te zoeken. Afgezien van de problemen die de methode met zich meebrengt (je zou bijvoorbeeld een zeef met de juiste maaswijdte kunnen gebruiken) kan het wel voordeel hebben, want grote protoplasten fuseren beter dan kleine. Dit geldt alleen als deze cellen hun volume niet ontleen aan een vacuole. Cellen met een vacuole fuseren slechter dan zonder.

#### **11.2.4 De selectie op levensvatbaarheid**

Een mogelijkheid is om gebruik te maken van een fluorescerende kleuring. Veel wordt daarbij gebruik gemaakt van FDA (Fluoresceïne Di-Acetaat). Dat is een niet fluorescerende kleurstof die de aardige eigenschap heeft dat hij heel makkelijk het plasmalemma van levende protoplasten passeert. Eenmaal binnengekomen wordt hij/zij door de esterasen van de cel gesplitst, waarbij het fluoresceïne vrijkomt. Dat gebeurt dus alleen in levende cellen met intacte membranen. Als deze moleculen worden aangestraald door bijvoorbeeld een U.V.-bron zoals bij een U.V.-microscoop gebeurt dan gaan ze licht geven.

#### **11.2.5 Regeneratie**

Deze valt in minstens twee stappen uiteen n.l.:

1. De vorming van nieuwe celwanden
2. Het aanzetten tot deling en verdere regeneratie

De eerste zal hier wat meer de nadruk krijgen omdat die direct bij deze techniek hoort.

Tijdens de regeneratie van de celwand moeten de  $\text{Ca}^{2+}$ -concentratie en de osmotische waarde van het voedingsmedium hoog zijn. Daarnaast speelt de dichtheid van de oplossing een rol. Als er eenmaal een celwand gevormd is moet de osmotische waarde van het medium verlaagd worden. Dit duurt een tot enkele dagen.

Doorgaans worden de fusieproducten, nadat de heterokaryons er zijn uitgevist, uitgeplaat. Dat kan op een aantal manieren gebeuren. Op een (half)vloeibaar medium in een dun laagje op een petrischaal, al dan niet eerst voorzien van een vast laagje medium. Het verdient aanbeveling om

als stolmiddel agarose (i.p.v. agar) te gebruiken, dat is zuiverder van samenstelling en dat blijkt dan ook minder problematisch voor de fusieprodukten te zijn. Ook wordt wel gebruik gemaakt van druppels, die op een petrischaal worden gezet of aan een glaasje worden gehangen. In zo'n druppel bevindt zich dan één of meer fusieprodukten. De omstandigheden van opkweek zijn niet zo bijzonder. Het voedingsmedium moet goed passen bij de combinatie, en de lichthoeveelheid is meestal laag (< 1000 lux). Voor de eerste celdeling is licht een remmende factor. De dunne membranen kunnen door de inwerking van het licht te lijden hebben. Als er celklompjes zijn ontstaan van 8 à 10 cellen is dat geen probleem meer en zal licht juist een positieve invloed hebben op groei en regeneratie van de plant.

*Nadat de delingen op gang zijn gekomen, meestal na 2 tot 7 dagen, zullen er na verloop van tijd microcalli ontstaan. Deze worden weer overgezet op een ander medium (met een lagere osmotische waarde) waarna de differentiatie en regeneratie langzamerhand in gang gezet kan worden.*

## 12 Toepassingen in de plantenveredeling

### 12.1 Chromosoomverdubbeling

De verdubbeling van het aantal chromosomen is in de veredeling een belangrijke bezigheid. Op de volgende drie manieren kan de cel- en weefselkweek daarbij een handje helpen.

a. Verdubbeling m.b.v. colchicine, een stof die relatief gemakkelijk middels filtersterilisatie aan het medium is toe te voegen. Bovendien heeft men minder kans op chimaeren met een in vitro colchicine-behandeling dan een dergelijke behandeling in vivo.

b. Na adventieve spruitvorming blijkt vaak spontane verdubbeling te zijn opgetreden. Er wordt wel beweerd dat de hoge cytokinine-concentratie die bij een dergelijke vermeerderingsmethode wordt gebruikt, hiervoor verantwoordelijk is.

c. Verdubbeling treedt ook op na somatische hybridisatie (versmelting van  $2n$ -kernen).

### 12.2 Mutatie-inductie en selectie in vitro

Het is relatief eenvoudig om in vitro nieuwe mutaties op te wekken bijv. m.b.v. straling. Wanneer deze mutatie-inductie gevolgd wordt door adventieve spruitvorming, kunnen nieuwe kleur- en vormvarianten verkregen worden. Dit zijn dikwijls chimaeren. Niet alleen mutaties kunnen worden geïnduceerd, ook is het in vitro goed mogelijk te selecteren op nieuwe mutanten. Met name een callusfase kan zulke nieuwe mutanten opleveren. Callus wordt dan gekweekt op een medium dat dikwijls mutagene stoffen bevat. Met deze methode zijn de volgende successen bereikt:

- nieuwe suikerbietlijnen met een hoger suikergehalte
- nieuwe ziekteresistentie tegen Phytophthora
- diverse herbicideresistenties
- resistentie tegen een aantal stress-factoren; bijv. zouttolerantie.

De nieuwe variatie die ontstaat zonder dat er meiotische recombinatie heeft plaatsgevonden, noemen we somaclonale variatie. Deze variatie is te zien in planten geregenereerd uit protoplasten, enkele cellen, celaggregaten of callus. De variatie uit zich in veranderingen in ploëidieniveau en in chromosoomaantal en -structuur, kleine veranderingen binnen chromosomen als wel in epigenetische effecten.

Somaclonale variatie is bij de snelle vermeerdering ongewenst. In de module "Toepassingen in de veredeling" wordt er nog een apart hoofdstuk aan somaclonale variatie gewijd.

### **12.3 Productie van haploïden via antheren-, microsporen-, zaadknop- of vruchtbeginselcultuur**

Dit is al in het vorig hoofdstuk aan de orde geweest.

### **12.4 In vitro bevruchting**

Vruchtbeginsels waarvan stempel en stijl zijn afgesneden, geïsoleerde zaadlijsten of zaadknoppen worden op voedingsmedium geënt, daarna wordt stuifmeel aangebracht. Hybride plantjes bij katoen zijn bijvoorbeeld op deze manier verkregen en ook in de lelie- en tulpenveredeling zijn zo aardige successen geboekt.

Nieuw zijn experimenten waarbij men gebruik maakt van pollen dat aan het kiemen is op een medium. In dat medium heeft men vreemd DNA zitten, waarbij men dan hoopt dat dit door het kiemende pollen wordt opgenomen. Petunia is het proefkonijn.

### **12.5 Embryocultuur**

Embryo's die dreigen verloren te gaan (bijv. na interspecifieke kruisingen), kunnen worden gered. Onder andere bij kruisingen met tulpesoorten wordt deze techniek gebruikt. Ook deze cultuur is in het vorige hoofdstuk behandeld.

### **12.6 Somatische hybridisatie**

Niet-geslachtscellen worden met elkaar versmolten, meestal in de vorm van protoplasten. Interspecifieke kruisingen zijn mogelijk. Er is sprake van zowel overdracht van kern-DNA als overdracht van organellen. Men kan werken met volledig intacte of met gemodificeerde protoplasten. Zie ook vorige hoofdstuk.

### **12.7 Genoverdracht**

Dit thema wordt uitvoerig belicht in de module "Toepassingen in de veredeling". Een hele korte samenvatting hier. In vitro celculturen kunnen worden gebruikt om plantecellen te transformeren met vreemd DNA. Dit gebeurt op het niveau van protoplasten en kan op de volgende manieren plaatsvinden:

-Microinjectie: DNA wordt met een microinjectienaald gezogen uit de donor-protoplast en geïnjecteerd in de receptor.

-Cocultivatie: getransformeerde Agrobacterium tumefaciens cellen worden tezamen met protoplasten gekweekt op een medium. Via natuurlijke overdracht moet dan het DNA ingebracht worden in het DNA van de protoplast.

- Fusie tussen getransformeerde *sferoplasten* (*A. tumefaciens* cellen zonder celwand) en protoplasten m.b.v. Polyethyleen-glycol (PEG).
- Opname door protoplasten van 'naakt' DNA of DNA ingekapseld in fosfolipide-blaasjes (de zogenaamde liposomen).

## 13. Toepassingen in de gewasbescherming

Ook in de gewasbescherming is de in vitro kweekmethode een nuttig hulpmiddel gebleken. Al eerder werd genoemd de mogelijkheid om via meristeemcultuur virusvrije planten te verkrijgen. Maar ook op andere manieren is het mogelijk virusvrije planten te verkrijgen. Incidenteel is het gelukt planten m.b.v. protoplasten-, callus- en zaadknopcultuur te kweken, die minder of in het geheel geen virussen bevatten.

Ook andere toepassingen in de gewasbeschermings sfeer zijn denkbaar. In vitro cultuur biedt mogelijkheden voor fyto sanitair transport. Doordat in weefselkweek regelmatig mutaties optreden (vnl. in callusculturen) kunnen we op zoek gaan naar nieuwe resistenties. Vervolgens kan op grotere schaal selectie op resistentie in vitro plaatsvinden. Tenslotte bieden de cel- en weefselkweek mogelijkheden (fundamenteel) onderzoek te verrichten op fytopathologisch terrein. Al deze toepassingen zullen nu langsgelopen worden.

### 13.1 Fyto sanitair transport

In vitro plantjes kunnen gemakkelijk en ziekte vrij over de grens gebracht worden. Er kunnen meer in vitro dan in vivo plantjes vervoerd worden, en bovendien heb je geen last van hinderlijke effecten van de grond. In die grond kunnen allerlei vervelende verontreinigingen zitten, die niet met het blote oog zichtbaar zijn. Daarentegen is inspectie van de buizen en van de zich daarin bevindende media eenvoudig; verontreinigingen zie je vrij snel.

Virussen zijn niet zo gemakkelijk te constateren. Vandaar dat vóór of tijdens het transport regelmatig steekproeven worden genomen op virusvrij zijn.

### 13.2 Zoeken naar resistenties

Somaclonale variatie opent de mogelijkheid dat nieuwe resistenties worden ontdekt in in-vitro materiaal. Op deze wijze zijn nieuwe resistenties gevonden in planten geregenereerd uit mesofylprotoplasten van de aardappelcultivar Russet Burbank tegen de schimmels Phytophthora infestans en Alternaria solani. Toen de planten echter getest werden in het veld, bleek dat ze vatbaarder waren voor virussen en Erwinia-bacteriën. Eveneens zijn resistenties tegen mycoplasma's gevonden in callusculturen van tabak.

Antherencultuur, en meer in het algemeen haploïdencultuur, kan worden aangewend om resistenties op te speuren die gesitueerd zijn op een recessief allel. Op deze manier is er bijv. een resistentie gevonden tegen het aardappelcysteaaltje.

### 13.3 In vitro selectie op resistentie

Pathotoxinen zijn stoffen die door schimmels worden geproduceerd en die een belangrijke rol spelen in het ziekteproces. Deze toxinen kunnen, omdat ze verantwoordelijk zijn voor de ziekte, gebruikt worden om cellijnen of planteweefsels te screenen op resistentie.

*Bijv.: M.b.v. het pathotoxine van Helminthosporium maydis fysio T, is het gelukt resistentie in maïs te krijgen tegen deze schimmel.*



Problemen met bovengenoemd selectiesysteem zijn er nog genoeg. Wanneer planten geregenereerd worden uit geselecteerde cellen of weefsels, blijkt de expressie van de resistentie dikwijls nog gering te zijn. Voorts is bijv. voor virussen zo'n selectiesysteem nog ver weg. De virusinfectie is vaak complex en specifieke virus-toxinen worden meestal niet gevonden.

Ook bij schimmels is regelmatig onbekend welke toxinen verantwoordelijk zijn voor het ziekteproces. Vaak wordt dan gewerkt met cultuurfiltraten van de schimmel: de schimmel wordt gekweekt op een vloeibaar medium in een schudmachine; na verloop van tijd wordt het schimmelstof bevattende medium afgefiltreerd en eventueel gesteriliseerd m.b.v. filtersterilisatie. Cultuurfiltraten worden o.a. toegevoegd aan het medium bij de selectie op resistentie tegen Phytophthora. Ook vlascellen worden gescreend op resistentie tegen Fusarium oxysporum f.sp. lini met gebruikmaking van het cultuurfiltraat van deze schimmel.

De laatste manier waarop in vitro selectie op resistentie kan plaatsvinden, is een methode waarbij in vitro scheuten worden geïnoculeerd met sporesuspensies van schimmels.

*Bijv.: Men is op zoek naar resistentie in papaya tegen Phytophthora palmivora met gebruikmaking van deze methode.*

Het voordeel van deze methode is dat je te maken hebt met 'echte' plantreacties. Nadelig is dat het inoculeren van vele scheuten een tijdrovende klus is. Wat dat betreft kan veel beter op celniveau gewerkt worden.

### **13.4 Onderzoek**

Op diverse manieren maakt het onderzoek gebruik van de in vitro cultuur. Er wordt bijv. fundamenteel onderzoek verricht naar de aantasting van plantecellen door pathogenen, hun transport daarin etc.

Ook kan men moeilijk sporulerende schimmels laten sporuleren door de schimmel te inoculeren op callus.

*Bijv.: Alternaria brassica geïnoculeerd op callus van Brassica juncea (sarepta mosterd) gaat sporen vormen.*

Tenslotte wordt er in celsuspensies onderzoek gedaan naar de productie van afweerstoffen ('fytoalexinen') door schimmels. Dit gebeurt door de cellen te behandelen met bepaalde stoffen of met een ander pathogeen; de resistentie wordt hierdoor geïnduceerd.

*Bijv.: Celsuspensies van boon worden behandeld met polysacchariden waardoor het fytoalexine phaseoline zich ophoopt.*