PLANTAARDIGE REAGEERBUISBABY'S

OPENBARE LES

uitgesproken bij
de aanvaarding van het ambt
van persoonlijk lector, verbonden
aan het Laboratorium voor
Tuinbouwplantenteelt van de
Landbouwhogeschool te Wageningen
op 10 mei 1979
door

Dr.Ir. R.L.M. Pierik

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

Mijnheer de Rector Magnificus, Dames en Heren,

In 1978 is door de massamedia uw aandacht gevraagd voor de eerste levensvatbare menselijke reageerbuisbaby. Ten onrechte suggereert het woord reageerbuisbaby, althans bij de mens, dat zich in een reageerbuis met een voedingsmedium een volledig menselijk individu zou hebben ontwikkeld. De werkelijkheid is echter anders. Twee engelse artsen verwijderden bij een vrouw, die wegens het niet functioneren van de eileider onvruchtbaar was, een onbevruchte eicel. Deze werd buiten het lichaam in een kweekmedium bevrucht en nadat deze bevruchte eicel enkele celdelingen hadden ondergaan, werd het embryo terug getransplanteerd in de baarmoeder. In juli 1978 werd de eerste 'reageerbuisbaby' geboren. We kunnen in dit geval beter spreken van bevruchting, gevolgd door enkele celdelingen in een reageerbuis. In analogie met dit verhaal kan ik nu reeds zeggen, dat bevruchting in vitro ook bij planten kan worden gerealiseerd, doch dat het terug transplanteren van een embryo in de plant nog nooit is gerealiseerd en ook weinig zinvol lijkt.

In 1978 bent u via de massamedia ook geconfronteerd met het klonen, d.w.z. het op ongeslachtelijke wijze vermeerderen, van de mens. Indien men het boek van de wetenschapsjournalist Rorvik (1) weinig kritisch leest, zou u nog geloven dat het waar is ook. Hij beschrijft hoe na isolatie van een onbevruchte menselijke eicel en de verwijdering van de haploïde celkern daaruit, een

diploïde celkern uit een lichaamscel wordt geïmplanteerd. Uit deze cel, een fusie tussen cytoplasma van de moeder en een kern van de vader, ontwikkelt zich in een kweekmedium een blastocyst, die zich vervolgens na overplanting in de baarmoeder van een jonge vrouw ontwikkelt tot een mannelijke baby. Rorvik (1) suggereert slechts, dat de mens op deze wijze te klonen zou zijn. Zijn boek is gelukkig pure science fiction en het hoeft bij geen van u de valse verwachting te wekken, dat er via vegetatieve vermeerdering een nieuw aards leven voor de deur zou staan. Bij planten daarentegen is het vegetatief vermeerderen in kweekbuizen, zij het volgens een geheel ander systeem dan via kerntransplantatie enz., aan de orde van de dag.

Indien u na deze inleiding, en niet beter wetend, zou denken, dat ik vandaag het ambt aanvaard van lector in gynaecologie, heeft u het mis. Het is slechts mijn bedoeling om u te voeren naar de plantaardige reageerbuisbaby's en klonen, die heel wat realistischer zijn dan de menselijke. Later in mijn verhaal zal ik u ook moeten confronteren met het probleem van abortus, bij planten weliswaar geen provocatus, doch slechts het voorkomen daarvan. Dus toch een beetje 'plantengynaecologie'.

Plantaardige reageerbuisbaby's

De basis voor het ontstaan van plantaardige reageerbuisbaby's in vitro werd in 1838-1839 in feite gelegd door de formulering van de totipotentietheorie door

Schwann en Schleiden. Deze theorie zegt dat cellen autonoom zijn en in principe in staat om onbegrensd te delen en te groeien. Zij bezitten de eigenschappen om, net zoals de bevruchte eicel, een volledig organisme te reproduceren. In iedere cel zijn de eigenschappen aanwezig om een volledig individu te vormen.

Doch wat zijn nu plantaardige reageerbuisbaby's? Hoe kunnen we ze laten ontstaan en waaruit ontstaan ze? Wat zijn de motieven om ze te laten ontstaan? En zijn er gevaren aan het ontstaan verbonden? Dat zijn de kernvragen bij het bedrijven van een speciaal soort plantenteelt, die ik met de naam van plantenteelt in kweekbuizen heb aangeduid (2).

Plantaardige reageerbuisbaby's zijn complete plantaardige individuen, die op kunstmatige voedingsmedia en onder steriele omstandigheden, dus onder uitsluiting van microörganismen, ontstaan. Het zal u duidelijk zijn, dat we met deze nogal gecompliceerde miniteelt iets op het oog hebben, dat niet gerealiseerd kan worden in het veld, in de kas of aan of in de plant. Er wordt dus een hulpmiddel, in feite een zeer beschermde teelt onder geconditioneerde omstandigheden, toegepast, die uiteindelijk leidt tot een individu of groepen van individuen, die normaliter niet zouden ontstaan.

Reageerbuisbaby's kunnen regenereren uit protoplasten (cellen zonder celwand), cellen, weefsels, organen, embryo's of zaden. Het zal u niet verwonderen, dat het laten ontstaan van een compleet individu in vitro veel

gemakkelijker te realiseren is aan een geïsoleerd orgaan, een embryo of zaad dan aan geïsoleerde protoplasten, cellen of weefsels. Indien nl. de ontwikkeling reeds in of aan de plant relatief ver is voortgeschreden, hoeft in de reageerbuis 'slechts' iets voltooid te worden. Moeten we daarentegen de gehele differentiatie en morfogenese in vitro laten geschieden, dan kunnen we spreken van 'kunst en vliegwerk'.

Het ontstaan van plantaardige reageerbuisbaby's in vitro kan men indelen in 3 categorieën:

1. Het ontstaan van individuen waarbij de oorspronkelijke organisatiestructuur min of meer behouden blijft. Hiertoe kunnen we rekenen de ontwikkeling van zaden, embryo's, meristemen en scheuttopjes, tot complete individuen. De kans, dat bij dit type van kweek afwijkingen ontstaan, is betrekkelijk gering.
2. Het ontstaan van individuen uit weinig of niet gedifferentieerde cellen of weefsels. Bij dit type cultuur gaat de oorspronkelijke organisatiestructuur eerst volledig verloren. Na isolatie van een gedifferentieerd weefsel treedt eerst dedifferentiatie op, die gevolgd wordt door celdeling, resulterend in een min of meer ongedifferentieerd weefsel, dat de naam draagt van woeker- of callusweefsel. Door bepaalde ingrepen, d.w.z. door veranderingen in het voedingsmedium of in de wijze van kweken of soms spontaan, kunnen zich uit zo'n weefsel adventieve embryo's of organen, zoals wortels en spruiten, vor-

men. In tegenstelling met de eerste categorie ontstaan bij dit type cultuur frequent individuen, die afwijken van het uitgangstype.

3. Een derde categorie zit enigszins tussen de beide eerstgenoemde in. Aan een geïsoleerd weefselstukje of explantaat ontstaan wel eerst dedifferentiatie, die gevolgd wordt door celdeling, doch de celdeling is bepaald niet ongecoördineerd. Vrij snel differentieert een orgaan zoals een wortel en/of een spruit. M.a.w. we zien hier niet een wilde celwoekering, zoals in categorie 2. De kans, dat bij dit type cultuur afwijkingen ontstaan, is groter dan bij categorie 1, doch vele malen kleiner dan bij categorie 2.

Het zal u duidelijk zijn, dat een strikte scheiding tussen categorie 1, 2 en 3 niet mogelijk is. Er zijn talrijke overgangsgevallen. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk, dat uit een stukje gedifferentieerd weefsel eerst woeker- of callusweefsel ontstaat en dan relatief snel daaruit een adventief embryo of een orgaan. Uit een geïsoleerde stuifmeelkorrel kan een haploïd embryo ontstaan met of zonder callusfase daaraan voorafgaand.

Het is in dit stadium van mijn bespreking realistisch om vast te stellen, dat we bij tal van hogere planten nog helemaal niet in staat zijn om complete individuen te laten ontstaan. Vaak lukt het wel om het organisatiepatroon tot de grond toe af te breken en woekerweefsel te kweken, doch redifferentiatie van embryo's

of organen is in veel gevallen onmogelijk. Ik doel hier in het bijzonder op de groep van houtige gewassen.

Thans wilde ik overgaan tot de bespreking van de verschillende typen plantaardige reageerbuisbaby's en hun mogelijkheden voor teelt en veredeling.

Embryocultuur

Hieronder verstaan we het steriel isoleren en opkweken van embryo's of bevruchte zaadknoppen met het doel daaruit levensvatbare individuen te verkrijgen. Er is hier dus sprake van 'künstliche Frühgeburt' zoals Dietrich dat in 1924 (zie 2) noemde. Men beoogt hiermee om embryoabortie, het vroegtijdig afsterven van het embryo, te voorkomen. Dit afsterven kan optreden indien, zoals bij vroegrijpende steenvruchten, het embryo aborteert, omdat het vroegtijdig wordt afgesloten van de toevoer van voedingsstoffen. Ook treedt embryo-abortie frequent op, wanneer er in veredelingstermen sprake is van een kruisingsbarrière; het endosperm ontwikkelt zich dan niet of zeer onvolledig, waardoor het embryo aborteert, dat volledig afhankelijk is voor zijn groei en ontwikkeling van dit reservevoedsel. In bovengenoemde gevallen komt het er dus op neer om vroegtijdig, d.w.z. voordat abortie in de plant optreedt, het embryo te isoleren en toch te laten ontwikkelen. Deze techniek is van grote betekenis geweest voor de plantenveredelaars, die op deze wijze hybriden verkregen, die anders beslist niet in leven waren gebleven.

Embryocultuur wordt ook toegepast om de teeltcyclus, de periode van zaad tot zaad, te verkorten. Indien de zaadkieming, door remstoffen in de zaadhuid of de ondoordringbaarheid daarvan, niet of zeer langzaam verloopt, isoleert men het embryo op een voedingsbodem, dat daarna meestal snel tot ontwikkeling komt. In een aantal gevallen zoals bij Pinus, banaan en Colocasia (3) kan zelfs een absolute remming van kieming door toepassing van embryocultuur worden opgeheven.

Embryocultuur kan ook een hulpmiddel zijn voor het verkrijgen van haploïde individuen, zoals door Jensen (5) voor gerst werd beschreven. Wanneer Hordeum vulgare wordt gekruist met Hordeum bulbosum, ontstaat een hybride, waarin echter vrij snel de 'bulbosum' chromosomen worden geëlimineerd, hetgeen resulteert in een 'haploïd vulgare' individu. Doordat de endospermontwikkeling achterwege blijft, is het haploïde vulgare individu niet levensvatbaar in vivo. Isolatie van het embryo in vitro echter, resulteert wel in een levensvatbaar haploïd doch steriel individu, dat na chromosoomverdubbeling diploïd, homozygoot en fertiel kan worden gemaakt.

Tenslotte moet worden vastgesteld dat de embryocultuur geleidelijk enigszins in het slop is geraakt. In de laatste 10 jaren is relatief weinig onderzoek verricht over de ontwikkeling van onvolgroeide zygotische embryo's in vitro; het accent is helaas bijna exclusief komen te liggen op de morfogenese van somatische embryo's in cel- en suspensiecultures. Het is opvallend, dat we in feite

niet in staat zijn om zeer jonge zygotische embryo's tot levensvatbare individuen in vitro op te kweken, terwijl honderden publikaties handelen over de somatische embryogenese in cel- en suspensiecultures.

Om een beter inzicht te krijgen in de ontwikkeling van embryo's in vitro, zijn zaden van orchideeën een bijzonder geschikt object. Zij zijn omgeven door een dunne zaadhuid, bevatten geen endosperm en bestaan slechts uit een groepje weinig gedifferentieerde cellen, terwijl er in het zaad geen wortel- en spruitprimordium aanwezig is. Hier liggen uitstekende mogelijkheden voor de experimentele embryoloog. Daarmee ben ik gelijk gekomen op mijn volgende onderwerp.

Kieming van orchideeënzaden

Voor de leken onder u zal het een verrassing zijn, dat de meeste zaden van onze gekweekte orchideeën niet in grond doch op voedingsbodems worden uitgezaaid. Ofschoon aanvankelijk werd verondersteld, dat de kieming en ontwikkeling van orchideeënzaden alleen konden verlopen, wanneer zij in symbiose leven met schimmels, is rond 1922 door Knudson (zie 2) aangetoond, dat deze zaden ook asymbiotisch kunnen kiemen op synthetische media. De vraag rijst dan onmiddellijk waarom men op grote schaal onze orchideeën is gaan zaaien op voedingsbodems. Uit de omschrijving van de fragiele orchideeënzaden, die ik u eerder gaf, zal het duidelijk zijn, dat de kansen op overleving bij zaai in grond daardoor minimaal zijn.

Het stoffijne orchideeënzaad wordt daarom onder zeer beschermde omstandigheden onder uitsluiting van micro-organismen op voedingsbodems tot kieming en ontwikkeling gebracht om zo het aantal nakomelingen drastisch te verhogen. Dit speelt, zoals u begrijpt, bij onze kostbare orchideeën een grote rol.

Nog lang niet alle genera en species en hun zeer talrijke kruisingsprodukten kunnen op volledig synthetische media tot ontwikkeling worden gebracht. De meest vreemde produkten worden door kwekers en veredelaars aan de media toegevoegd. Plantensociologisch is het interessant op te merken, dat populaties van orchideeënzaailingen een sterk 'community-effect' vertonen. Zij kiemen, groeien en ontwikkelen in gemeenschap veel beter dan solitair levend. Dit phenomeen is tot op heden volkomen onverklaarbaar.

Bij orchideeën, een groep van gewassen met een zeer lange duur van bevruchting tot zaadrijping, kan ook zeer efficiënt embryocultuur worden toegepast. Dit betekent, dat onvolgroeide zaden vroeger in vitro tot ontwikkeling kunnen worden gebracht, hetgeen voor de telers en veredelaars van belang is.

Het is thans echter op zijn plaats om enkele kritische kanttekeningen te maken met betrekking tot de voedingsbehoefte van orchideeënzaden, welke nog slechts fragmentarisch is onderzocht. Complicerende factoren bij dit onderzoek zijn de enorme verscheidenheid binnen de familie van de orchideeën, de beschikbaarheid van geschikt

en reproduceerbaar uitgangsmateriaal en tevens de genetische heterogeniteit van zaailingpopulaties. Vele experimenten komen tevens op losse schroeven te staan, omdat men de fysiologie van de kieming en de voedingsbehoeften getoetst heeft op agar-media. Agar, dat een plantaardig produkt is en uit zeealgen wordt bereid, bevat nl. ondanks consciëntieuze zuivering vele organische en anorganische verontreinigingen. Het wordt daarom hoog tijd, dat we met de hulp van colloid-chemici zo snel mogelijk overstappen op synthetische polymeren, die de interpretatie van onze experimenten vergemakkelijken. Dat geldt overigens ook voor ander in vitro onderzoek.

Afgezien van het gebruik van agar kan ook gesteld worden, dat verschillende media ten behoeve van de kieming van orchideeënzaden complexe mengsels van plantaardige origine bevatten, zoals: cocosnootmelk, tomatensap, bananenhomogenaat, visemulsie, enz. Dit betekent in feite, dat we niet exact weten welke stoffen vereist zijn voor kieming en groei. Een zeer speciale groep vormen de venusschoentjes, het genus Paphiopedilum. Deze in economisch opzicht belangrijke groep geeft op dit moment de grootste moeilijkheden bij de kieming en ontwikkeling in vitro.

De vegetatieve vermeerdering van orchideeën

Orchideeën stonden bekend als luxe-planten, die slechts betaalbaar waren voor de enkeling. De belangrijkste oorzaak hiervan is, dat de vegetatieve vermeerdering

vooral via scheuren weinig efficiënt is. Rond 1965 is door Morel (zie 2) een in vitro systeem ontwikkeld om orchideeën zeer snel via de zogenaamde meristeem- of protocormcultuur vegetatief te vermeerderen. Morel ontdekte, dat een geïsoleerd meristeem zich in vitro kan transformeren in een protocormachtig orgaan, dat sprekende gelijkenis vertoont met het protocorm, dat ontstaat na kieming van orchideeënzaden. Indien zo'n protocorm, een knolachtig orgaan, in delen wordt gesneden en op de juiste voedingsmedia verder wordt gekweekt, treedt nieuwvorming van protocormen op, de zogenaamde adventieve protocormen. Dit versnijden van protocormen kan men iedere 6-10 weken herhalen en zo ontstaat in een betrekkelijk korte tijd een kloon van protocormen. Indien men stopt met het delen van de protocormen, groeien deze relatief snel uit tot planten, die in grond kunnen worden overgebracht. Het is bij verschillende orchideeën mogelijk gebleken om zo uitgaande van één meristeem in een jaar tijd honderdduizenden planten te verkrijgen. Deze methodiek wordt thans met groot succes over de gehele wereld, ook in ontwikkelingslanden, op grote schaal toegepast. Opvallend is dat bij deze orchideeënvermeerdering via meristeemcultuur, die leidt tot zogenaamde 'meriklonen', nog te weinig aandacht wordt geschonken aan het virusvrij vermeerderen, waarvoor dezelfde Morel de basis heeft gelegd.

Volledigheidshalve moet nog worden vermeld, dat in de afgelopen jaren ook verschillende andere systemen voor de vegetatieve vermeerdering van orchideeën tot ontwikkeling zijn gebracht.

Produktie van virusvrije planten

Bij planten, die via zaad worden vermeerderd, vindt als regel geen overdracht plaats van virus op dit zaad; op wonderlijke wijze ontsnappen de bevruchte eicel en het embryo, dat zich daaruit ontwikkelt, aan virusinfectie. Bij planten, die ongeslachtelijk (via scheuren, stekken, enz.) worden vermeerderd, wordt het virus wel overgedragen op de nakomelingen. Bij deze gewassen kunnen in een aantal gevallen via warmtebehandeling virusvrije planten worden verkregen. Al met al bleef de bestrijding van virusziekten echter een zeer moeizame zaak.

Door Morel en Martin (zie 2) werd in 1952 een methode ontwikkeld om virusvrije planten te verkrijgen. Zij gingen uit van het feit, dat de virusconcentratie in wortel- en scheuttopjes ongelijk verdeeld is en veronderstelden, dat het apicale meristeem mogelijk geheel virusvrij zou zijn. Zij isoleerden scheutmeristemen van dahlia op voedingsbodems en stelden inderdaad vast, dat men met behulp van deze techniek virusvrije planten kon verkrijgen. Later is deze cultuur, die de naam meristeemcultuur kreeg, bij tientallen andere gewassen met groot succes toegepast. Om het virusvrij maken te vergemakkelijken, werd later vaak warmtebehandeling en meristeemcultuur beide toegepast.

Bij enkele gewassen zoals hyacint, lelie en gladiool is vastgesteld, dat na regeneratie van adventieve spruiten aan systemisch geïnfecteerde weefsels ook virusvrije planten kunnen worden verkregen. Een verklaring voor dit

verschijnsel is niet bekend. Het zou te maken kunnen hebben met de intensieve celdeling, die bij regeneratieprocessen plaats vindt en die virusvermeerdering zou kunnen remmen (Hildebrandt, 6).

Met betrekking tot het virusvrij maken via meristeemcultuur dient helaas te worden opgemerkt, dat ook thans een sluitende verklaring voor het virusvrij maken niet gegeven kan worden.

Voor de hand ligt natuurlijk om te stellen, dat door het ontbreken van vaatelementen in meristemen geen of een verminderd virustransport plaats vindt, waardoor het meristeem eventueel virusvrij zou kunnen worden. Bij verschillende gewassen werd echter vastgesteld, dat ook in de meristemen virusdeeltjes voorkomen. Doch hoe ontstaat dan toch een virusvrije plant? Verondersteld wordt, dat ondanks de aanwezigheid van virus in een meristeem, de jonge meristematische snel delende cellen daarin, het winnen van de zich vermeerderende virusdeeltjes. Deze verklaring wordt gesteund door experimenten met weefselcultures, waarbij werd vastgesteld, dat de virusmultiplicatie slechter verloopt naarmate de celdeling van de plant intensiever is (Quak, 7). Het zou van groot wetenschappelijk en economisch belang zijn wanneer we door fundamenteel onderzoek een beter inzicht zouden krijgen in het waarom van de virusmultiplicatie in delende respectievelijk niet delende cellen van onze hogere planten. Door toepassing van vooral protoplast- en celcultures moet het mogelijk zijn om ons inzicht in de virusinfectie,

replicatie en resistentie verder te verdiepen. Voor de weefselkweker blijft het zaak om te trachten door juiste voorbehandeling en een doelmatige keuze van de groeiomstandigheden, de eventueel virusvrije zone te vergroten en/of de virusconcentratie in meristemen tot het uiterste te beperken.

Vegetatieve vermeerdering

Een van de belangrijkste toepassingen van in vitro cultuur ten behoeve van veredeling en teelt is de ongeslachtelijke of vegetatieve vermeerdering van planten. Als doel staat dan meestal voor ogen om gewassen, die zonder verlies van de gewenste kenmerken niet generatief zijn te vermeerderen, sneller en efficiënter te klonen. Soms wordt zelfs vegetatieve vermeerdering in vitro gerealiseerd bij gewassen waarbij dit volgens de klassieke methoden zoals scheuren, stekken en enten niet mogelijk is. Soms staat ook ziektevrije massavermeerdering als een van de wensen op het verlanglijstje.

In de loop der jaren zijn diverse methoden voor in vitro vermeerdering ontwikkeld, die ik kort de revue zal laten passeren. Bij de oogstekmethode worden rustende knoppen, die men in vitro eerst tot scheutjes laat uitlopen, beworteld; de vermeerderingssnelheid hierbij is betrekkelijk klein, omdat iedere plant slechts over een gering aantal knoppen beschikt.

Een modificatie van deze methode bestaat uit het isoleren van scheuttopjes, waaraan de apicale dominantie

wordt verbroken door een hoge concentratie cytokinine in het medium: het hoofdvegetatiepunt wordt dan stil gezet en de axillaire knoppen lopen uit tot scheutjes. De verkregen scheutjes worden weer overgeënt op een nieuw medium en het proces herhaalt zich. Deze methode wordt met succes toegepast bij tal van gewassen zoals gerbera, aardbei en diverse bladplanten waaronder varens. Indien voldoende scheutjes zijn verkregen, worden deze met behulp van auxine beworteld.

Een geheel andere methode is de explantaatcultuur. Uit de plant worden stukjes weefsel gesneden, waaraan zich geen meristemen of slapende knoppen bevinden. De stukjes weefsel moeten meestal met behulp van hormonen worden gedwongen om via nieuwvorming, dus adventief, spruiten en wortels te vormen. Deze orgaanvorming wordt door tal van factoren gelimiteerd en het grootste probleem is meestal om adventieve spruitvorming op te wekken. Bij houtige gewassen is de adventieve wortelvorming vaak een onoverkomelijk probleem.

De callusmethode, waaraan veel gevaren zijn verbonden, bestaat uit het isoleren van een stukje weefsel, waarop eerst callus moet gaan groeien. Callus is een min of meer ongedifferentieerd woekerweefsel met een sterke groeikracht. Zulk callus wordt voortgekweekt op vaste of in vloeibare voedingsmedia. Na deze vermeerderingsfase moet de nieuwvorming van adventieve organen, spruiten en wortels, worden geïnduceerd. Bij tal van gewassen is het ook mogelijk gebleken om in suspensiecultures en klompjes callus de vorming van zogenaamde adventieve embryo's op te wekken.

Bij de vegetatieve vermeerdering in vitro baart het behoud van de genetische stabiliteit grote zorgen. Naarmate de bestaande organisatiestructuur verder wordt afgebroken, zoals dit het geval is bij cel- en callusculturen, zijn de kansen op afwijkingen als gevolg van chromosoombreuken, aneuploïdie en polyploïdie niet denkbeeldig. We moeten ons eerst afvragen wat de oorzaken zijn van deze afwijkingen en komen dan terecht bij het uitgangsmateriaal en bij het milieu met vaak agressieve en onnatuurlijke componenten zoals 2,4-D en de synthetische cytokininen. Vast staat, dat de plant zoals wij deze in zijn totaliteit kennen, niet zo homogeen is als we denken. Waarschijnlijk is iedere plant wel een verkapte chimaer, de ene sterker, de andere zwakker. In de intacte plant komt deze verkapte chimaerie vaak niet tot expressie, omdat de 'normale' cellen de 'abnormale' cellen in bedwang houden. Krijgen cellen de gelegenheid zich in vitro onafhankelijk van elkaar te ontwikkelen, dan krijgen abnormale cellen ook een kans. Het gevolg is dan een heterogeen nakomelingschap van een schijnbaar genetisch homogene plant. De afwijkende nakomelingschappen zijn vaak ook een gevolg van het feit, dat wij door gebruik van agressieve stoffen mutaties verwekken en selectief misschien celdelingen opwekken in die cellen, die van het standaard type afwijken. Eigenlijk is het onverantwoord om in cel- en weefselkweken nog een stof als 2,4-D te gebruiken. Of het veelvuldig optreden van endoreduplicatie een gevolg is van het gebruik van agressieve chemi-

caliën is onvoldoende bekend.

In de literatuur wordt mijns inziens te veel nadruk gelegd op het feit, dat vanwege het optreden van afwijkingen in cel-, suspensie- en calluscultures, waardevolle nieuwe cultivars kunnen worden gewonnen. Dat dit het geval is voor suikerriet (Heinz cs., 8) staat vast, maar het aantal andere voorbeelden is gering. Tevens moet worden bedacht, dat het verloren gaan van het regeneratievermogen bij calluscultures, wel eens het gevolg zou kunnen zijn van polyploïdisatie, die frequent optreedt.

Het optreden van afwijkingen komt niet alleen om de hoek kijken bij cel- en weefselcultures, doch evenzeer bij een proces als adventieve spruitvorming. Vindt zo'n adventieve spruit zijn oorsprong in één cel en de uitgangsplant is een chimaer dan is het duidelijk, dat de nakomelingen niet identiek behoeven te zijn aan het uitgangsmateriaal.

De fundamentele vraag blijft tenslotte over hoe wij celdeling bij van nature afwijkende cellen kunnen voorkomen. Kritisch zal moeten worden nagegaan welke stoffen in onze voedingsmedia op het verdachtenbankje moeten worden geplaatst. Welke stoffen zijn mutageen en welke stoffen stimuleren juist celdelingen in afwijkende cellen. Zo verdenken wij de synthetische cytokinine N^6 benzylaminopurine ervan, dat deze stof afwijkingen oproept bij de vegetatieve vermeerdering van gerbera's; deze hypothese zal nader moeten worden geverifieerd.

Een ander probleem bij de bestudering van de remor-

fogenese in vitro is de vraag, hoe wij deze naar willekeur kunnen sturen. Zeer simplistisch is de bewering, dat de groep van de auxinen de adventieve wortelvorming reguleert, terwijl de cytokininen de adventieve spruitvorming sturen. We hebben echter geen enkel idee van het waarom van deze regulatie, laat staan waar en hoe deze in chemisch opzicht relatief eenvoudige verbindingen organogenese kunnen opwekken. Ook de ware redenen voor het ontstaan van adventieve embryo's aan hypocotylen, geïsoleerde helmknoppen, en in het bijzonder juveniele weefsels blijft omgeven met een duister waas. De regeneratie van somatische embryo's in cel- en suspensiecultures zit vol vraagtekens en is slechts bij een beperkt aantal families op grote schaal mogelijk.

Vooral bij houtige gewassen en ik denk hier speciaal aan gewassen uit de bosbouw, de boomteelt en tal van economisch belangrijke tropische gewassen zoals de groep van de palmen, is de adventieve wortelvorming aan geïsoleerde scheutjes een bijna onoplosbaar probleem. Op dit moment is het bij slechts enkele gewassen mogelijk om adventieve wortelvorming te induceren aan scheutjes van houtige gewassen. Indien dit op grote schaal realiseerbaar zou zijn, liggen hier grote mogelijkheden. Anatomisch/histologisch onderzoek is tevens noodzakelijk om vast te stellen of misschien wel wortelprimordia worden aangelegd, die macroscopisch niet zichtbaar zijn. Is dit het geval, dan dient te worden gewerkt aan het doorbreken van eventuele mechanische barrières voor de uitgroei van deze wortelprimordia.

Een andere grote bottle-neck voor de remorfogenese, dat is het nieuw ontstaan van individuen uit cellen, weefsels, enz., is de volwassen status van deze cellen en weefsels. We stuiten bij het definiëren van juveniel en volwassen direct al op een groot probleem, omdat we helemaal niet weten wat juveniliteit en volwassenheid eigenlijk inhouden. Juveniele cellen worden zo genoemd, omdat ze een veel grotere groeikracht bezitten dan volwassen cellen, terwijl het vermogen van deze cellen tot adventieve orgaan- of embryovorming groter is. En daarmee is het met onze kennis gedaan. Er zijn wel aanwijzingen, dat isolatie van somatische cellen uit een volwassen plant voert tot complete rejuvenatie, maar het waarom hiervan blijft in de mist. In feite doet zich in de intacte plant dezelfde situatie voor. Immers het embryo, dat ontstaat uit een geïsoleerde bevruchte eicel, is ook weer juveniel. Isolatie van een cel speelt dus een belangrijke rol, maar hoe? Zeer centraal blijft de vraag, welke stoffen in staat zijn om cellen volledig te dedifferentieren en te rejuveneren, opdat cellen van een volwassen plant zich gedragen als bevruchte eicellen.

Het zou bijzonder interessant zijn om te trachten celfusies te realiseren tussen juveniele en volwassen cellen van dezelfde plant. We zouden dan kunnen vaststellen hoe het genoom van een juveniele cel die van de volwassen cel beïnvloedt en vice versa. Tevens zou bij eliminatie van één genoom kunnen worden nagegaan of het gedrag van het andere is veranderd. Zou dit laatste het

geval zijn, dan biedt dit grote mogelijkheden voor vegetatieve vermeerdering van geselecteerde genotypen. Immers, celfusie gevolgd door eliminatie van het juveniele genoom, zou op deze manier kunnen leiden tot een gerejuveneerde volwassen cel. Dit zou het klonen van volwassen genotypen van bomen en andere gewassen, die normaliter niet tot regeneratie in vitro in staat zijn, mogelijk maken.

De bevruchting in vitro

Wanneer stuifmeelkorrels niet kiemen of wanneer de groei van de pollenbuis is geremd, kan geen bevruchting optreden en verkrijgt men geen nakomelingen. Indien wel bevruchting optreedt, doch de bloemen vallen vroegtijdig af, zitten we met hetzelfde probleem.

Bovenstaande impasse kan worden doorbroken met behulp van in vitro cultuur. Wanneer de val van bloemen niet te voorkomen is aan de plant, kan de volledige bloem in vitro worden gekweekt en bevrucht en we spreken dan van 'stamperbevruchting'.

Wanneer bij de bevruchting de incompatibiliteitsbarrière gelegen is op de stempel of in de stijl, kunnen onbevruchte ovula samen met stuifmeelkorrrels in vitro worden geïsoleerd. Zo kan na kieming van de stuifmeelkorrels soms toch bevruchting tot stand komen. Gebleken is, dat het isoleren van de placenta met een aantal zaadknoppen een efficiënter systeem is voor het volvoeren van bevruchting dan de kweek van ovula.

Sinds 1962 heeft men met behulp van de zojuist beschreven technieken bij een kleine groep van gewassen zelf- of kruisbestuiving weten te realiseren en levensvatbare nakomelingen verkregen.

Als zeer interessant kan de inductie van haploïde individuen door Hess en Wagner (9) worden aangemerkt. Zij verkregen bij een massa geïsoleerde onbevruchte ovula van Mimulus luteus enkele haploïde individuen, die ontstonden door stuifmeel van Torenia fourneri erbij te brengen. Omdat geen bevruchting optrad, is er hier dus alleen sprake van een pollenstimulus, die enkele onbevruchte ovula tot haploïden liet uitgroeien, hetgeen via helmknopcultuur niet was te realiseren. Deze methodiek biedt interessante toekomstmogelijkheden. Daarmee ben ik gekomen op mijn volgende onderwerp.

Haploïden

Geslachtscellen bezitten slechts de helft van het aantal chromosomen in de lichaamscellen. Wanneer bij de bevruchting zich 2 geslachtscellen verenigen, wordt het aantal chromosomen verdubbeld. Wanneer echter onbevruchte eicellen of stuifmeelkorrels uitgroeien tot individuen, spreken we van haploïden, welke voor de genetici en plantenveredelaars zeer grote betekenis hebben. Spontaan via zogenaamde endoreduplicatie of geïnduceerd via colchicinebehandeling, kunnen uit haploïden diploïden ontstaan. Het opmerkelijke van deze diploïden is, dat zij homozygoot zijn, wat de zaken voor de veredelaar in veler-

lei opzichten aantrekkelijk maakt. Bij de mutatieveredeling dienen bij haploïden verwekte mutanten zich direct aan. Voor de produktie van F_1-hybriden en het verkrijgen van alleen supermannelijke planten, zoals bij asperge, spelen de haploïden een grote rol.

Ofschoon genetici en veredelaars over een aantal methoden beschikken om kunstmatig haploïden op te wekken, hebben de weefselkwekers ook niet stil gezeten. Door isolatie van helmknoppen of stuifmeelkorrels in vitro is het mogelijk om hieruit haploïden te laten ontstaan. Vooral bij vertegenwoordigers van de familie van de Solanaceae, zoals Datura en Nicotiana, is dit relatief eenvoudig gebleken. Het is bij de cultuur van stuifmeelkorrels de kunst te trachten directe embryogenese te induceren zonder een callustussenfase. Indien nl. eerst callus ontstaat en daaruit planten regenereren, is de kans op haploïden klein, omdat meestal diploïden regenereren. Het grote probleem is om in principe alleen celdelingen te induceren in haploïde cellen. Tevens mogen de relatief zwakke haploïden niet worden weggeconcurreerd door diploïden; daar een geïsoleerde helmknop voor het grootste gedeelte bestaat uit eveneens regenererende diploïde cellen, is de kans daarop natuurlijk groot.

Opvallend en onverklaarbaar is, waarom de inductie van haploïden vooral efficiënt mogelijk is bij vertegenwoordigers van de Solanaceae. Slechts bij een beperkt aantal andere gewassen buiten deze familie, zoals enkele granen, Brassica, rijst en asperge is haploïdenproduktie

in vitro op dit moment van betekenis voor de veredelaar.

Het feit, dat de haploïdeninductie in vitro nog zo weinig wordt toegepast bij de praktische veredeling, is een indicatie, dat er nog tal van problemen zijn. De frequentie van haploïden is vaak zeer laag, terwijl men de embryogenese en regeneratie van geïsoleerde stuifmeelkorrels en helmknoppen nog slecht in de hand heeft. Meestal regenereren diploïden en polyploïden, waarop men bepaald niet zit te wachten. Vooral bij granen is het ontstaan van albino's een zeer frequent optredend verschijnsel. Ook zij vermeld, dat de genetische stabiliteit van haploïden in vitro gering is. De in vitro technieken zullen nog drastisch moeten worden geperfectioneerd. Interessant is wel, dat het geven van een koudeschok aan de bloemknoppen op het moment van de eerste pollenmitose, het percentage haploïden drastisch kan verhogen (Nitsch, 10). De mogelijkheden om met behulp van chemicaliën alleen selectieve celdeling in haploïde cellen te induceren zal nader bestudeerd moeten worden.

Somatische hybridisatie

De isolatie en kweek van protoplasten, cellen zonder celwand, heeft het mogelijk gemaakt om somatische hybridisatie te realiseren. Hieronder verstaat men het laten versmelten van 2 protoplasten, waardoor een cel ontstaat, waarin de genetische informatie van beide zijn verenigd. Met behulp van deze techniek wil men trachten om planten te creëren, die langs geslachtelijke weg, dus

via versmelting van geslachtscellen, niet te produceren zijn. Deze parasexuele hybridisatie lijkt niet realistisch en dat is het ten dele ook. Via protoplastenkweek en fusie van protoplasten tracht men echter tevens om planten te modificeren, d.w.z. te veranderen, door het overbrengen van genetisch materiaal van de ene cel naar de andere. Dit laatste lijkt realistischer dan het eerste.

Thans zijn methodieken uitgewerkt om via behandeling met enzymmengsels uit b.v. de bladepidermis of callusweefsels protoplasten te isoleren. Met behulp van polyethyleen glycol heeft men fusie van protoplasten weten te induceren. Bij o.a. tabak (Carlson cs., 11) en petunia (Power, cs., 12) heeft men thans de eerste somatische interspecifieke hybriden verkregen, die dank zij het feit dat zij ook langs geslachtelijke weg geproduceerd kunnen worden, als zodanig herkend konden worden.

Als er één gebied binnen de in vitro cultuur is, waarbij de verwachtingen te hoog gespannen, zelfs opgeblazen zijn geweest, dan is het wel de somatische hybridisatie. We moeten eerst vaststellen, dat het aantal plantensoorten, waarbij men uit protoplasten volledige planten kan opkweken, zeer beperkt is. Diepere inzichten in het sturen van remorfogenese ontbreken. Het is daarom niet realistisch om aan somatische hybridisatie te denken, als men de morfogenese niet volledig kan sturen.

Nog even afgezien van het feit, dat celfusies vaak niet specifiek zijn, en in lage frequentie voorkomen, is de grootste hindernis voor het verkrijgen van soma-

tische hybriden het ontbreken van efficiënte selectieprocedures voor preferentiële groei van somatische hybriden. Slechts in enkele gevallen en ik noem hier tabak (Carlson cs., 11), petunia (Power cs., 12) en Sphaerocarpos (Schieder, 13) beschikt men over zo'n selectieprocedure. Anderzijds moet worden bedacht, dat vele fusieprodukten achteraf chimaeren blijken te zijn en geen echte somatische hybriden. Groot is ook het gebrek aan geschikte biochemische mutanten voor dit onderzoek.

Veelal wordt tevens voorbij gegaan aan het nuchtere feit, dat het niet realistisch is te veronderstellen, dat somatische hybridisatie in vitro zou zijn te volvoeren, terwijl er in de natuur een onoverkomelijke kruisingsbarrière bestaat. Het zou van meer realisme getuigen, indien men somatische hybridisatie zou realiseren bij die gewassen, die dichter bij elkaar staan en waarbij de kruisingsbarrière klein is. Meer voor de hand liggende mogelijkheden van protoplasten en van somatische hybridisatie zijn: het produceren van autoploïden en alloploïden zonder colchicine, de hybridisatie van normaliter steriele planten en de hybridisatie van planten met een lange jeugdfase.

Zeer futuristisch gedacht moet, naast het onderzoek rond de somatische hybridisatie en daardoor de creatie van geheel nieuwe planten, worden gedacht aan het vervaardigen van nieuwe planten door het maken van chimaeren. De vraag of door menging en samengroei van twee of meer typen protoplasten of cellen chimaeren in vitro

zijn te creëren, is echter nog onbeantwoord. Indien ze in vitro kunnen ontstaan, zal het zeer de vraag zijn of ze van praktische betekenis zijn, d.w.z. stabiel en vermeerderbaar.

Enkele problemen tot besluit

Met betrekking tot de conditionering van het milieu kan worden gesteld, dat de meeste weefselkwekers zich er veelal toe beperken om via wijzigingen in het voedingsmedium het gestelde doel te bereiken. Aan de fysische groeifactoren zoals licht, temperatuur, CO_2, O_2 en luchtvochtigheid wordt relatief weinig aandacht geschonken. Men beperkt zich ertoe om de cultures onder geconditioneerde omstandigheden te plaatsen, waarvan men aanneemt, dat ze optimaal zijn. Reeds hier kunnen grote vraagtekens worden geplaatst, omdat we over de invloed van het fysisch groeimilieu op in vitro cultures relatief weinig afweten. Over het microklimaat in de buis of kolf, die soms 'potdicht' met wattenproppen en folie is afgesloten, bekommert men zich nauwelijks. Vragen als 'hoopt zich in of boven het voedingsmedium kooldioxyde of ethyleen op' of 'is er misschien gebrek aan zuurstof' blijven volledig onbeantwoord. Het moet voor microklimatologen een uitdaging zijn om eerst eens een exacte beschrijving te geven van het microklimaat in de buis en ons vervolgens adviezen te geven hoe dit microklimaat verbeterd kan en moet worden. Speciale aandacht

zou ik willen vragen voor de gasuitwisseling, in het bijzonder zuurstof, kooldioxyde en ethyleen, tussen de luchtkolom in de buis en de lucht daarbuiten.

Indien we tot een optimalisering van het mogelijk slechte microklimaat in de buis kunnen komen, zou de overgang van de plant van voedingsmedium naar grond ook veel soepeler kunnen verlopen. Dat vooral de kruidachtige vitro-plant slecht is aangepast aan de groei in grond is een feit. Indien de fysische groeiomstandigheden geoptimaliseerd worden, zou de adaptatie van de vitro-plant in grond wel eens eenvoudiger kunnen worden. De vitro-plant met zijn dunne, zachte en waarschijnlijk fotosynthetisch weinig actieve spruiten, een mogelijk slecht ontwikkelde cuticula en een slechte wortelhaarontwikkeling dient voor de overgang naar grond beter te zijn aangepast. Probleem blijft, dat de vitro-plant fotosynthetisch 'lui' is en ten dele heterotroof, terwijl van deze plant bij overgang naar grond verwacht wordt, dat hij fotosynthetisch actief en autotroof is. Voorts blijft het verkrijgen van een functioneel wortelstelsel bij de overgang van vitro naar grond problematisch. Ook het extreme verschil in relatieve luchtvochtigheid in de buis en daarbuiten is een groot probleem.

Technisch gezien vormen de bruin- en zwartkleuring op de wondvlakken en de afscheiding van toxische produkten in de voedingsmedia vaak een groot probleem voor de weefselkweker. Verondersteld wordt, dat de accumulatie van toxische verbindingen vooral het gevolg is van de

oxydatie van phenolen op verwonde en aangesneden cellen. De weefsels necrotiseren waardoor tevens de voedingstoevoer wordt afgesloten. Bij slechts enkele gewassen is men in staat geweest om door toevoeging van geactiveerde kool of anti-oxydantia (zoals vitamine C, cysteïne, citroenzuur) dit probleem op te lossen. Meestal echter komt men niet uit de problemen en moet het te bestuderen gewas ter zijde worden geschoven. In ons eigen laboratorium is Strelitzia reginae hiervan een sprekend voorbeeld. Chemisch gezien is het echter maar zeer de vraag of de meeste bruine en zwarte verkleuringen op wondvlakken kunnen worden toegeschreven aan oxydatie van phenolen.

Het optreden van zogenaamde inwendige infecties vormt soms een groot probleem. Vaak denkt men te werken met steriele cultures, doch is dit slechts schijn. Na enkele overentingen blijken namelijk organen en weefsels toch inwendig te zijn geïnfecteerd. Het toetsen op eventueel aanwezige microörganismen geschiedt meestal visueel. Het verdient daarom aanbeveling om weefsels en organen eerst op zodanige media te isoleren, dat eventuele inwendige infecties snel tot expressie komen. Verder zullen in zeer recalcitrante gewassen systemische bactericiden en fungiciden, dus via inwendige therapie, moeten worden getoetst op hun eventuele bruikbaarheid. We dienen echter wel te beseffen, dat het gebruik van antibiotica kan voeren tot symptoomloze dragers, hetgeen zeer ongewenst is. Verreweg de voorkeur verdienen phytosanitaire maatregelen, die getroffen moeten worden voorafgaande aan en

tijdens de vitro cultuur.

Zeer geachte toehoorders,

In het afgelopen uur heb ik u slechts een zeer globaal en fragmentarisch beeld kunnen schetsen van de wereld der plantaardige reageerbuisbaby's. Vele aspecten van de cel- en weefselkweek, die niet direct gelieerd zijn met reageerbuisbaby's, heb ik moeten laten rusten. Toch hoop ik u te hebben aangetoond, dat de plantaardige reageerbuisbaby's veel realistischer zijn dan de menselijke, waarover ik u in mijn inleiding sprak.

Dames en Heren,

Aan het einde van mijn rede zou ik een dankwoord willen uitspreken, waarbij ik een iets andere volgorde zou willen aanhouden dan te doen gebruikelijk is.

De redenen, dat ik hier sta, zijn zuiver wetenschappelijk gezien, een recombinatie van genen en een goed milieu. Ofschoon deze recombinatie van genen een kansspel is, beschouw ik dit toch als een gave, waarvoor ik de gever van deze gaven dankbaar ben. Het goede milieu is niet zo vanzelfsprekend, omdat dit door mensen wordt gecreëerd. Op de eerste plaats ben ik mijn ouders dankbaar voor het milieu, in de meest ruime zin, dat zij geschapen hebben en voor alle mogelijkheden, die zij mij boden. Mijn echtgenote zie ik als een onmisbare levendige en levensblije schakel zonder welke de ketting al lang gebroken was.

In wetenschappelijk opzicht zijn de Wageningse sferen van groot belang geweest voor mijn ontwikkeling en ontplooiing. Ik denk met vreugde terug aan de periode, dat zovele leermeesters mij beleerden. Na mijn afstuderen speelde vooral Prof. Wellensiek een grote rol. Beste San, ik zal je steeds erkentelijk blijven voor je wijze lessen en voor de mogelijkheden, die jij bood om me in wetenschappelijk opzicht te bekwamen. Tot een andere leermeester, Prof. Doorenbos, zou ik dit willen zeggen. Beste Jan, dank voor jouw beslissing om mij in een nog ongedemocratiseerde LH als jonge wetenschapper aan te stellen als fysioloog en alle kansen en mogelijkheden te bieden. Prof. Gautheret in Parijs ben ik dank verschuldigd voor het feit, dat hij mij heeft ingeleid in de geheimen van de in vitro cultuur.

Veel dank breng ik ook over aan alle leden van de Vakgroep Tuinbouwplantenteelt, die een ideale voedingsbodem samenstelden, die nu eenmaal nodig is om werk te kunnen laten groeien en ontwikkelen. Gedurende een lange reeks van jaren heb ik bij het onderwijs en onderzoek op uw aller medewerking kunnen rekenen en stond u van hoog tot laag klaar om ons te helpen. Alleen dank zij uw inspanningen hebben wij veel kunnen en mogen doen, waardoor in de praktijk van de tuinbouw nieuwe ontwikkelingen op gang konden komen.

In het bijzonder zou ik mijn dank willen overbrengen aan mijn analyste, Mej. Steegmans, en aan de verschillende andere laboratoriumkrachten, die mij in de loop der jaren terzijde hebben gestaan.

De verschillende vakgroepen van de LH zou ik willen oproepen tot een nauwere samenwerking. Mijn rede zal u duidelijk hebben gemaakt, dat de in vitro cultuur van hogere planten tal van raakvlakken heeft met andere vakgroepen. Het verheugt ons, dat recentelijk reeds een hechte samenwerking tot stand kon komen tussen onze vakgroep, de vakgroep Bosteelt en het Bosbouwkundig Proefstation, welke resulteerde in een vitro project met de douglasspar.

Het College van Bestuur van de Landbouwhogeschool ben ik erkentelijk voor het feit, dat zij in mij zoveel vertrouwen gesteld hebben, dat zij hebben gemeend mij voor te dragen voor een persoonlijk lectoraat.

Hare Majesteit de Koningin zou ik willen danken voor mijn benoeming tot persoonlijk lector aan de Landbouwhogeschool.

Dames en Heren Studenten,

Ik beschouw het als mijn belangrijkste taak u op een kritische wijze te begeleiden bij alles wat zich rond de plantaardige reageerbuisbaby's afspeelt. Ik moet u bijbrengen hoe men baas blijft in eigen buis, in de reageerbuis dus. Het is mij gebleken, dat deze begeleiding geholpen wordt door het schrijven van een handboek, dat echter snel veroudert. U zult attent moeten zijn voor de nieuwe ontwikkelingen, die sneller gaan dan ik zelf had kunnen dromen. Ik zal niet nalaten dit in mijn colleges te onderwijzen. Ik beschouw het als lid van een teeltvakgroep

als mijn belangrijkste taak om een brug te slaan tussen de basiswetenschappen en de praktijk. Indien u daarom meent bij mij iets te komen, kunt u gerust bij andere vakgroepen aankloppen.

Ik dank u voor uw aandacht.

Dr.Ir. R.L.M. Pierik

PLANTAARDIGE REAGEERBUISBABY'S

Literatuur

1. Rorvik, D.M. In his image, the cloning of a man. Hamish Hamilton, London 1978, 207 pp.
2. Pierik, R.L.M. Plantenteelt in kweekbuizen. Thieme, Zutphen 1975, 164 pp.
3. Raghavan, V. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (4), 1977: 375-397.
4. Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Berlin 1977, 803 pp.
5. Jensen, C.J. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (4), 1977: 299-330.
6. Hildebrandt, A.C. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (4), 1977: 581-597.
7. Quak, F. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (4), 1977: 598-615.
8. Heinz, D.J. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (4), 1977: 3-17.
9. Hess, D. and Wagner, G.: Z. Pflanzenphysiol. 1974, 72: 466-468.
10. Nitsch, C. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (4), 1977: 268-278.
11. Carlson, P.S. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1972, 69: 2292-2294.
12. Power, J.B. et al. Nature 1976, 263: 500-502.
13. Schieder, O. Z. Pflanzenphysiol. 1975, 74: 357-365.