

Bosboomteelt via weefselkweek: plantontwikkeling in vitro met bosbouwkundige doelstellingen

Propagation of forest trees by tissue culture: in vitro plant development for forestry requirements

P. W. Evers

Dorschkamp; LH, vakgroepen Bosteelt en Tuinbouwplantenteelt

1 Inleiding

De plantenteelt in kweekbuizen maakt in Nederland de laatste jaren een snelle ontwikkeling door. Na een lange periode van intensief experimenteren volgde een snelle uitbreiding van toepassingen van deze vorm van biotechnologie in de praktijk, echter vrijwel uitsluitend in de land- en tuinbouw. De belangrijkste doelstelling bij deze toepassing was te komen tot een systeem van commerciële massavermeerdering en dan nog uitsluitend vegetatieve vermeerdering. Al snel voegde zich hierbij de doelstelling dit massaal vermeerderde materiaal ziektevrij te maken. Dan wel ziektevrij materiaal massaal te vermeerderen. Vrijwel tegelijkertijd realiseerde men zich in de praktijk welk een ruimtebesparing dit micro-vermeerderingssysteem mogelijk maakt. In de beginperiode en ook nu nog komen de belangrijkste gewassen uit de bloemeteelt hoewel ook al snel enkele voedingsgewassen zoals granen, rijst en aardbeien in kweekbuizen werden vermeerderd. In de meeste gevallen ging men bij de in vitro teelt van deze gewassen uit van jong, reactief weefsel, dat uit geselecteerde exemplaren werd gesneden. Het onderzoek had in deze gevallen dan reeds aangetoond welk weefsel potentieel kon leiden tot de grootste plantproductie. Uit dit weefsel moest in korte tijd een groot en uiterst uniform nakomelingenschap komen. Het feit dat massavermeerdering van genetisch uniform materiaal nog steeds de belangrijkste of in ieder geval de economisch meest interessante toepassing van weefselkweek is, heeft geleid tot de wijd verbreide misvatting dat het de enige toepassing van deze technologie is. Het is daarom begrijpelijk dat er in het recente verleden onduidelijkheden en vooroordelen zijn ontstaan omtrent de rol van in vitro teelt en daarmee samenhangend onderzoek in de bosbouw. Het zal duidelijk zijn dat massaproductie van genetisch uniform materiaal in conflict komt met recente opvattingen over plantgebruik in het bos. Het feit dat massaproductie zo vaak op de voorgrond treedt bij de weefselkweek is zeker niet terecht daar in zowel praktisch als fundamenteel gericht onderzoek vele andere toepassingen de meeste aandacht hebben gekregen, wat geleid heeft tot het oplossen van fundamentele problemen. Enkele voor-

Summary: see p. 277

beelden hiervan zijn het omzeilen van embryoabortie in zaden door het kweken van embryo's in vitro, het vermeerderen van embryo's in kweekbuizen bij zaadtekorten, het bestuderen van de fysiologie van de bloei, het verzenden van ziektevrij materiaal in vitro, en het ontwikkelen van een microgenenbank door het bewaren van planten in kweekbuizen. Bij de voedselproductie en de productie voor de sierteelt hebben onderzoeken naar het functioneren van plantenorganen in weefselkweek menigmaal tot een doorbraak geleid. Ook bij bosbomen is het belangrijk meer gegevens te hebben over het functioneren van plantenorganen alsmede omtrent het functioneren van het organisme als geheel. Daarnaast is het van belang in de bos- en landschapsbouw alleen bomen te gebruiken die aan enkele minimumeisen in genetisch opzicht voldoen. Echter, voldoende plantmateriaal en zaad dat aan deze eisen voldoet is vaak niet beschikbaar. Sommigen onderkennen dit probleem niet daar er wel voldoende materiaal te koop is, dat echter van onbekende herkomst is of ronduit ongeschikt. Ook voor de bosbouw kan de weefselkweek voor deze problemen oplossingen bieden. De moeilijkheden bij plantvermeerdering en andere toepassingen van weefselkweek zijn in de bosbouw echter groter dan in de tuinbouw daar er nog weinig specifieke methodes bestaan voor de boomteelt; bovendien verschilt de vraagstelling van een bosbouwer essentieel van die van bijvoorbeeld een Gerbera-kweker. De meest in het oog springende verschillen met de weefselkweek in de land- en tuinbouw liggen in de grotere gecompliceerdheid van de opbouw van de boom, de geringere bewortelbaarheid van micro- (= in vitro) stekjes en de veel grotere ruimtebesparing bij de vermeerdering vergeleken met de klassieke technieken. Bij vermeerdering in vitro worden vaak knoppen als uitgangsmateriaal genomen. Knoppen van één en dezelfde boom blijken sterker van elkaar te verschillen dan het geval is bij kruidachtige gewassen. Al deze specifieke problemen hebben geleid tot intensief onderzoek; toepassing van weefselkweek in de bosbouw ligt voor bepaalde soorten nu binnen handbereik.

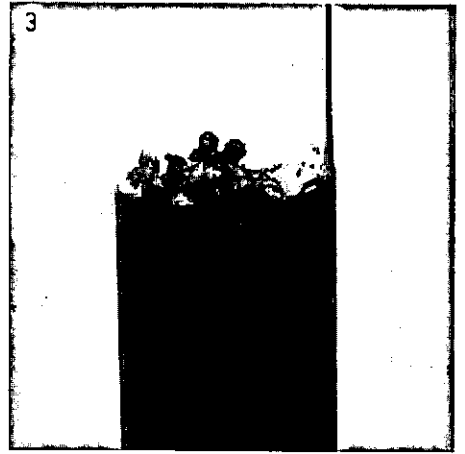
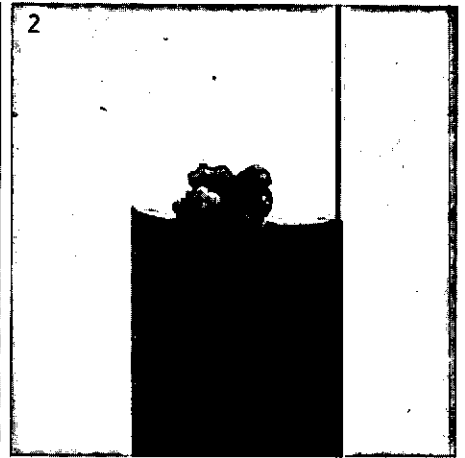


Fig. 1. Doorsnede van douglaszaad (20 \times): embryo in endosperm. Fig. 2, 3, 4. Het ontstaan van adventieve scheutjes op een embryo (2 \times) resp. na 1, 3 en 6 weken. Fig. 5. De vorming van adventieve scheutjes uit het eindmeristeem van de koppen van jonge zaailingen na een cytokininebehandeling (0,9 \times).

Fig. 1. Section through a Douglas fir seed (20 \times): embryo in endosperm. Fig. 2, 3, 4. The emergence of adventitious shoots on an embryo (2 \times) after a cytokinin treatment during 1 week after 1, 3 and 6 weeks, respectively. Fig. 5. The emergence of adventium of the heads of young seedlings after a cytokinin treatment (0.9 \times).

2 Geschiedenis

De eerste vorm van weefselkweek werd gerealiseerd door Haberlandt (1902); gedurende enige tijd bleven onder steriele omstandigheden plantecellen in leven op een kunstmatige voedingsbodem. Doordat de cellen al snel afstierven kwam hij op het idee een belangrijke rol toe te denken aan celregulerende stoffen, welke in zijn kweek zouden ontbreken. Deze hormonen zijn later inderdaad de sleutelfactor van de weefselkweek gebleken. Haberlandt vermoedde, dat elk van de cellen uit zijn kweek in staat was elk plantenorgaan te vormen als hij maar onder de juiste omstandigheden werd gebracht. Later kristalliseerden deze denkbeelden uit tot de "totipotentie" theorie van de cel. Al snel na deze eerste resultaten werd het eerste embryo in kweek gebracht (Hannig, 1904), waarbij de voedingsbodem als vervangend voor het endosperm diende. Ook werden er al in de twintiger jaren weefsels van bomen in kweek gebracht maar ook hier betrof het nog alleen fundamenteel onderzoek. Het betreffen was op de identificatie van de plantenhormonen, de groeiregulerende stoffen waarmee vele processen in de plant gestuurd worden. Als eerste werd het wortelvormende hormoon IAA uit de auxine-groep geïdentificeerd (Kögl et al., 1934). Later volgde het scheutvormende hormoon kinetine uit de cytokininegroep (Miller et al., 1956). Men meende al snel alle processen te kunnen sturen door te zoeken naar de juiste auxine-cytokinine verhouding in de voedingsbodem bij het kweken van plantecellen of -organen. Dit bleek echter een veel te simplistische voorstelling van zaken: vele andere factoren spelen een rol waaronder vertegenwoordigers uit drie andere hormoongroepen (gibberellinen, abscissinen en ethyleen). Toch leidde de ontdekking van de groeiregulatoren tot belangrijke doorbraken zoals de kweek van woekerend wondweefsel (callus) van enkele plantensoorten (Gautheret, 1939) en het ziektevrij maken van planten door meristeemcultuur (Ball, 1946). Al snel werden de eerste commerciële toepassingen mogelijk in de orchideeënkweek. De eerste succesvolle orgaankweek van bomen volgde in het begin van de zestiger jaren. Al snel regeneerde men in het laboratorium op bescheiden schaal de eerste volledige bomen uit deze organen. Men startte de weefselkweek echter uitsluitend met knoppen of jonge scheutjes van enkele jonge exemplaren van makkelijk te stekken boomsoorten zoals de populier (Pierik, 1979). Bij andere boomgroepen zoals de naaldhoutsoorten sloot men op enorme moeilijkheden met name bij de regeneratie van nieuwe plantjes in vitro waarvan tot op heden nog slechts een bescheiden deel tot klaarheid is gebracht. Inductie van plantvorming in callusweefsel met de daaropvolgende regeneratie van volledige bomen kwam in het begin van de zeventiger jaren op

gang (Winton, 1972a, 1972b, Winton en Huhtinen, 1976). Tegelijkertijd volgde een enorme uitbreiding in het fundamentele onderzoek naar de fysiologie van naaldhoutsoorten en vooral van loofbomen; regulatie van de groei en de bloei, consequenties van bemestingen etc. werden tot op cellulair niveau onderzocht. Het aantal boomsoorten dat in weefselkweek wordt onderzocht is sterk toegenomen; het aantal soorten dat in de praktijk via weefselkweek wordt vermeerderd is nog gering ondanks dat het onderzoek in de laatste jaren al voor veel soorten deze toepassing heeft mogelijk gemaakt. Het betreft hier echter vrijwel uitsluitend kweekmethoden van knoppen van bomen of van knoppen die op embryo's in vitro werden geïnduceerd gevolgd door regeneratie van volledige planten. Uit callus zijn er nog slechts enkele bomen geregenereerd. Bij coniferen is dat nog nooit gelukt hoewel zeer onlangs het begin van plantvorming werd aangetoond. Een ander onderzoeksgebied waaraan momenteel veel aandacht besteed wordt is de genenbewaring van bomen in vitro. Men is er al in geslaagd scheutjes bij een lage temperatuur jaren in leven te houden; onlangs werden veelbelovende resultaten met kryopreservatie (het bewaren van weefsel in bevroren toestand) gemeld. Ook aan bloemknoppen van bomen wordt veel onderzoek verricht; uit antheren (pollenhokjes) werden al bomen geregenereerd.

Uit het bovenstaande overzicht blijkt dat er nog veel onderzoek nodig is; optimalisatie van ontwikkelde technieken alsmede het ontwikkelen van praktijkmethoden hebben een hoge prioriteit. Voor boomsoorten die in de Nederlandse bosbouwpraktijk gebruikt worden is wat betreft het vermeerderingsaspect de situatie als volgt:

- praktijkmethode gereed, optimalisatie gewenst: populier, iep, plataan;
- onderzoeksmethode gereed, praktijkmethode nog te ontwikkelen: douglas (Evers, 1981a, 1981b, 1982a, 1982b, 1982c), groveden, jeneverbes, wilg;
- in onderzoek: eik, kastanje, berk, els.

In het hierna volgende wordt een overzicht gegeven van het bij de LH en "De Dorschkamp" verrichte onderzoek.

3 Embryo- en zaailingvermeerdering

De beschikbaarheid van voldoende zaden van Nederlandse bosboomsoorten welke aan een aantal minimeisen voldoen is vaak twijfelachtig. In een aantal gevallen treedt bloei onvoldoende op met te lange intervallen; bij een aantal exoten dreigen in het land van herkomst de opstanden die het meest geschikte zaad voor Nederland leveren te verdwijnen. Deze beide problemen treden bijvoorbeeld op bij de douglas. In andere gevallen leveren zaadgaarden zeer hoogwaardig

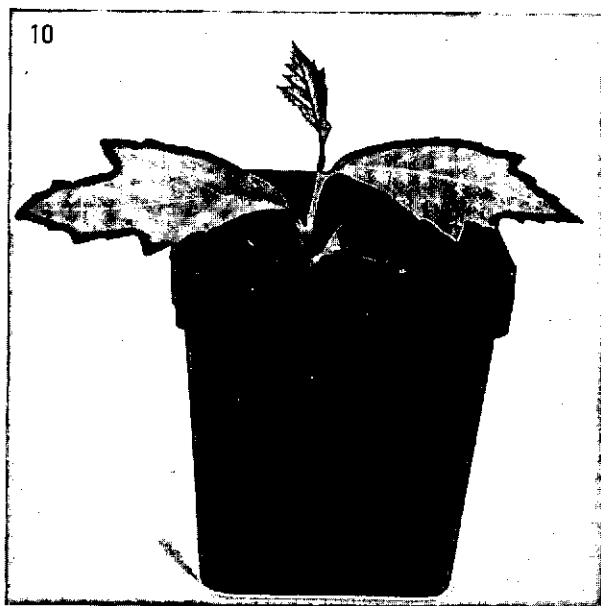
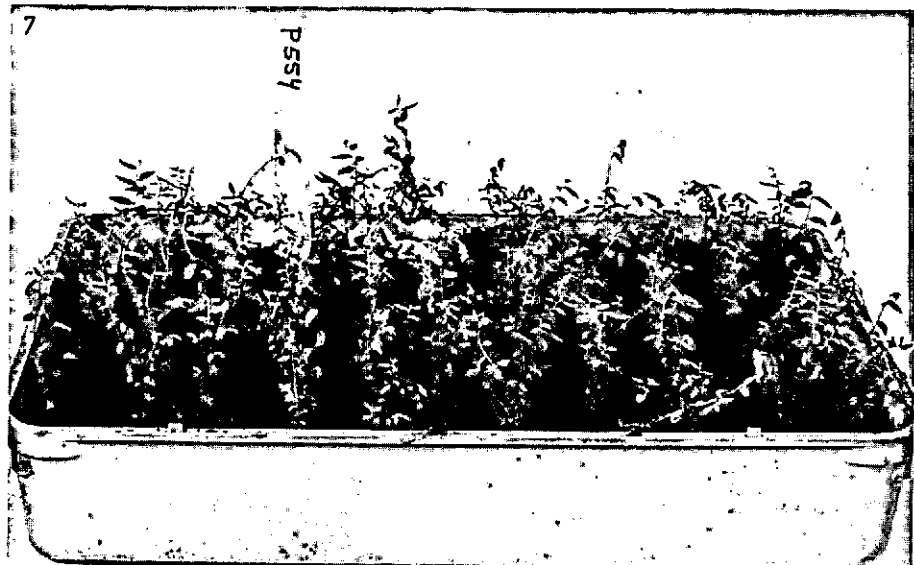


Fig. 6. Vertakt en beworteld scheutje van *Ulmus villosa* na 6 weken in vitro (1 \times). Fig. 7. Gewenning van *U. villosa* plantlets aan de atmosfeer buiten de buis (0.23 \times). Fig. 8. Groeiende *U. villosa* plantjes in de kas na de gewenning (0.29 \times). Fig. 9. Bewortelde *Platanus orientalis* plantjes, in 4 weken in vitro gekweekt uit een knop (0.63 \times). Fig. 10. *P. orientalis* plant na in vitro kweek in de kas (0.5 \times).

Fig. 6. Branched and rooted shoot of *Ulmus villosa* after 6 weeks in vitro (1 \times). Fig. 7. Adaptation of *U. villosa* plantlets to the atmosphere outside the tube (0.23 \times). Fig. 8. Growing *U. villosa* plantlets in the greenhouse after adaptation (0.29 \times). Fig. 9. Rooted *Platanus orientalis* plantlets, cultured in 4 weeks in vitro from a bud (0.63 \times). Fig. 10. *P. orientalis* plant after in vitro culture in the greenhouse (0.5 \times).

zaad doch in een te geringe hoeveelheid. Om te voorkomen dat in dergelijke gevallen onbekend dan wel ongeschikt zaad zal worden gebruikt is het ontwikkelen van methoden voor massavermeerdering uit de beperkte hoeveelheid gaardzaad noodzakelijk. Voor de douglas en de groveden is de methode in het laboratorium reeds toepasbaar gebleken. Er zijn twee varianten in deze weefselweektechniek; zij zullen worden beschreven aan het voorbeeld van de douglas. De eerste variant gaat uit van embryo's, die uit het zaad zijn geprepareerd. De zaden worden aan de buitenzijde gedesinfecteerd waarna onder steriele omstandigheden het embryo wordt losgesneden (fig. 1). Vervolgens wordt het embryo op een voedingsbodem geplaatst met een hoge cytokinine concentratie. Deze inductie duurt één week waarna het embryo overgezet wordt op een bodem zonder hormonen. Het embryo is dan al gezwollen en groen van kleur. In deze tweede fase ontstaan op de toppen van de cotylen kleine knopjes (fig. 2) die weldra naalden gaan vormen (fig. 3) en uitgroeien tot complete scheuten (fig. 4). Dit hele proces duurt ongeveer zes weken. De scheuten kunnen van het embryo worden gesneden waarna beworteling optreedt op een voedingsbodem met een hoge auxineconcentratie. De efficiëntie van de beworteling is beter dan bij scheuten, die ontstaan zijn uit knoppen in vitro, daar scheuten van embryo's afkomstig zijn van het meest juveniele weefsel van de plant. Het is beter de scheuten al snel van het embryo te snijden, daar er anders concurrentieverschijnselen gaan optreden.

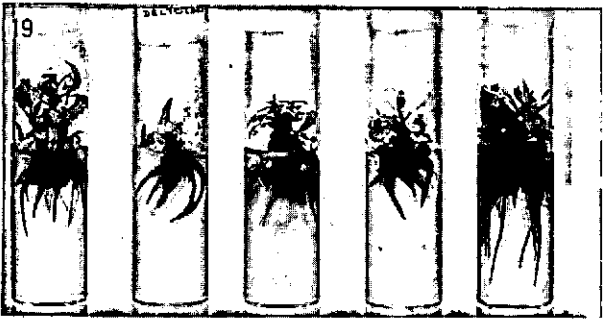
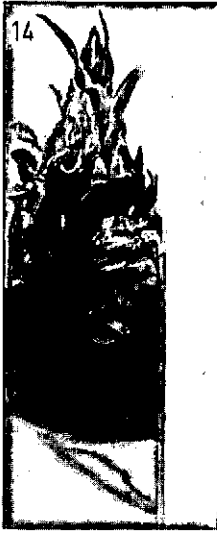
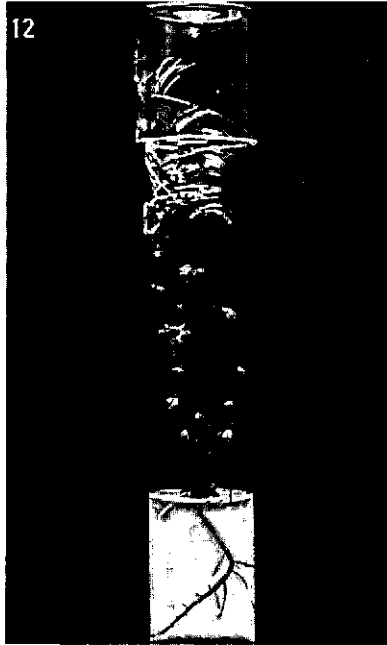
De tweede variant gaat uit van koppen van zeer jonge zaailingen. Hiertoe laat men de zaden op de gebruikelijke wijze kiemen waarna de plant onder de cotylen wordt afgesneden zodra deze blaadjes zijn gestrekt. Het bovengrondse deel van de zaailing ondergaat de gebruikelijke desinfecteringsbehandeling waarna hij ondersteboven op de cytokinine-voedingsbodem wordt gezet. Deze methode wordt toegepast in plastic dozen, daar reageerbuizen voor dit werk te krap zijn. De knopjes ontstaan in dit geval rond het eindmeristeem en niet op de cotylen (fig. 5). De scheuten, die bij deze z.g. "zaad" vermeerdering (beter is te spreken van embryo- en zaailingvermeerdering) ontstaan heten adventieve scheuten om aan te geven dat zij ontstaan uit meristemen, die zijn gevormd na de inductie met cytokinine. Om te voorkomen dat de adventiviteit samengaat met het optreden van mutaties is het beter de cytokinine-dosis te matigen. Door toepassing van een van de twee varianten ontstaan per zaadje 4-20 nieuwe scheuten. Het blijkt echter mogelijk te zijn de vermenigvuldigingsfactor verder op te voeren door het eindmeristeem van de nieuwe scheuten operatief te verwijderen. De scheuten reageren hierop door in vitro vele axillaire knoppen te laten uitlopen; deze scheuten kunnen worden afgesneden en apart worden verder

gekweekt. Deze decapitatie-techniek kan vele malen achtereenvolgend worden herhaald bij de nieuwe axillaire scheuten zodat ook bij geringe hoeveelheden zaad voldoende materiaal kan worden geproduceerd. Het is ter handhaving van voldoende genetische variatie echter beter, steeds nieuwe zaden volgens deze techniek te bewerken.

4 Weefselweek van wortelopslag

Indien gekozen wordt voor de vegetatieve vermeerdering van volwassen exemplaren van groepen verwante genotypen is het eerste onderzoek erop gericht die plantendelen te vinden, die in vitro een snelle ontwikkeling doormaken. De plant, die uit dit weefsel ontstaat moet bovendien een hoge bewortelingsefficiëntie hebben. Bij sommige plantensoorten kan de keuze van het uitgangweefsel de sleutelfactor zijn tot de beworteling. Verder is het belangrijk, dat de toegepaste methode werkt bij de meeste genotypen en niet slechts bij een enkele.

De graad van juveniliteit van het weefsel kan van doorslaggevende betekenis zijn voor ontwikkeling en beworteling: er wordt dan ook gezocht naar het fysiologisch jongste weefsel. In de meeste gevallen blijkt wortelopslag (indien het mogelijk is dit te forceren aan wortelfragmenten in de kas) aan deze eisen te voldoen. Het gaat hier echter om een beperkt aantal boomsoorten. De vegetatieve vermeerdering in vitro via wortelopslag is een goede methode voor bijvoorbeeld *Ulmus villosa*, een soort die met conventionele methoden moeilijk vegetatief te vermeerderen is. Toppen van scheutjes van de wortelopslag, ontstaan op de callusring, ondergaan wederom de desinfecteringsbehandeling waarna ze op een voor dit doel ontwikkelde voedingsbodem worden geplaatst. Bij de juiste belichting en temperatuur van de cultuurbuizen wordt de groei in vitro voortgezet. Om tot een grote vermeerderingsfactor te komen moeten de scheutjes aangezet worden tot een hoge vertaktingsgraad, hetgeen mechanisch (decapitatie) dan wel chemisch (hormonaal) kan gebeuren (fig. 6). *U. villosa* vertoont een zeer efficiënte vertakking; elke tak kan afzonderlijk worden voortgekweekt. Waakzaamheid is echter geboden, daar in een aantal gevallen overstimulatie met hormonen kan leiden tot zgn. "bossigheid" van de plant: het vertakken blijft doorgaan, zelfs na het uitplanten in de grond. Een geringere vertakking is al ruimschoots voldoende, daar het plantje geheel versneden kan worden tot stengelfragmenten met twee blaadjes elk: een vertakt scheutje kan dan in principe leiden tot 40-70 nieuwe vertakte scheuten in zes weken tijd. De beworteling bij dit materiaal van *U. villosa* is geen probleem; hij treedt spontaan op of na stimulatie met een lage auxineconcentratie. Als de hoeveelheid in vitro materiaal



de gewenste grootte bereikt heeft kan gestart worden met de gewenningsprocedure voor de groeiomstandigheden buiten de buis. De plantjes worden uitgeplant in een doos (fig. 7) waarvan de deksel gedurende één week geleidelijk steeds meer wordt opengezet. Vervolgens worden de planten opgepot totdat zij de gewenste grootte hebben bereikt (fig. 8). Behalve de gewenning aan de lagere luchtvochtigheid is ook aanpassing van de bladgrootte belangrijk: de in vitro blaadjes zijn slechts enkele mm groot (fig. 6). Met deze methode is het dus mogelijk het gehele jaar door materiaal te kweken; de snelheid van de vermeerdering is zeer groot. Het gebruik van wortelopslag maakt de methode minder afhankelijk van de leeftijd van de boom dan bijvoorbeeld het geval is bij de kweek van knoppen. Door de tijdwinst en de grotere vermeerderingssnelheid kan deze methode concurreren tegen de klassieke technieken. Het belangrijkste probleem vormt niet de kweek of de beworteling, maar het steriel in de kweekbuis krijgen van het materiaal dat immers in tegenstelling tot de scheutaanleg in de knoppen aan allerlei micro-organismen werd blootgesteld.

5 Weefselkweek van knoppen

In de meeste gevallen bestaat het uitgangsmateriaal bij de vegetatieve vermeerdering in vitro uit knoppen of net uitgelopen knoppen. In sommige gevallen gaat men uit van bloeiwijzeknoppen, maar doorgaans echter van vegetatieve knoppen. Het werken met de laatstgenoemde organen biedt grote voordelen ten opzichte van andere plantendelen: door de goede omhulling met schubben (althans bij een aantal boomsoorten) is het niet moeilijk het scheutje in aanleg "schoon" op een voedingsbodem te plaatsen. Daarnaast is in de knop het volledige takje al aanwezig: een knop is te beschouwen als een gecompriëerde tak. Het is dus niet nodig in vitro nieuwe organen te induceren (behalve de wortels); de bestaande structuur moet tot ontwikkeling worden gebracht. Dit is, vooral bij de meeste coniferen, toch geen eenvoudige zaak. Elke soort stelt zeer specifieke eisen ten aanzien van de samenstel-

ling van de voedingsbodem en de temperatuur en het licht waarbij de knop zich kan ontwikkelen. Het probleem bij de start van het onderzoek naar in vitro teelt van een nieuwe boomsoort is dat elke bijstelling van het optimum van temperatuur en licht consequenties kan hebben voor de samenstelling van de voedingsbodem. Daarnaast zijn alle optima afhankelijk van het tijdstip in het seizoen waarop de knoppen in cultuur worden gebracht alsmede van de plaats, waarvandaan de knop werd geïsoleerd. Deze door onderzoek verkregen resultaten kunnen bovendien nog gemodificeerd worden door de conditie van de boom. De in vitro kweek van knoppen van bomen vereist dus vele voorzorgen. Zijn er enkele knoppen succesvol in kweek gebracht, dan vormt de in vitro vermeerdering (of microvermeerdering) vaak minder een probleem. In tegenstelling tot klonen in de bloemeteelt, waar slechts één genotype vermeerderd behoeft te worden, is het in de bosbouw noodzakelijk steeds nieuwe knoppen van andere genotypen in kweek te brengen. De hierboven geschetste randvoorwaarden dienen dan ook goed bestudeerd te worden alvorens er tot een praktijkmethode gekomen kan worden.

Voor enkele soorten werden al methoden ontwikkeld uitgaande van vegetatieve knoppen. Verdere optimalisatie, met name wat betreft de seizoensinvloeden en topophysis (plaats van de knop in de boom) is echter nog nodig. De belangrijkste resultaten worden hier geschetst aan de hand van in vitro teelt van een plataan, een iep, populieren en de douglas.

Knoppen van *Platanus orientalis* ontwikkelen zich snel in vitro indien zij geïsoleerd worden van takken, die gedurende enige tijd in vazen werden geforceerd in de warme kas (fig. 9). Ook de vertakking en de beworteling in vitro verloopt snel; er is slechts een geringe hormonale stimulatie nodig. De planten kunnen zonder gewenning uit de buis naar de kas (fig. 10).

De iep (een *Ulmus* hybride) kan uit wortelopslag (fig. 11) of knop (fig. 12) in het microvermeerderingssysteem gebracht worden. Ook knoppen in winterconditie ontwikkelen zich goed maar met een geringere snelheid. Scheutjes van de iep hebben een geringe

Fig. 11. Beworteling van een *Ulmus* hybride in vitro bij een hoge auxine concentratie; plantje gekweekt uit wortelopslag (1.4×). Fig. 12. Scheutvorming bij een *U.* hybride na decapitatie; plantje gekweekt uit een knop (0.5×). Fig. 13. Een *U.* hybride na uitplanten in de kas (0.23×). Fig. 14. Scheutvorming bij *Populus* 'Robusta' bij een hoge cytokinine-concentratie (0.88×). Fig. 15. Adventieve en axillaire scheutvorming op een knoop van *P. trichocarpa* (0.86×). Fig. 16. Als 15, axillaire scheuten verwijderd (1.09×). Fig. 17. Scheutvorming bij *P. trichocarpa* bij een hoge cytokinine concentratie (1.0×). Fig. 18. Beworteling van *P. deltoides* bij een lage auxine concentratie (1.0×). Fig. 19. Als 18, met een hoge concentratie (0.5×).

Fig. 11. Rooting of an *Ulmus* hybrid in vitro at a high auxin concentration; plantlet cultured from shoots on root pieces (1.4×). Fig. 12. Shoot formation in an *U.* hybrid after decapitation; plantlet cultured from a bud (0.5×). Fig. 13. An *U.* hybrid after planting in the greenhouse (0.23×). Fig. 14. Shoot formation in *Populus* 'Robusta' at a high cytokinin concentration (0.88×). Fig. 15. Adventitious and axillary shoot formation on a node of *P. trichocarpa* (0.86×). Fig. 16. As 15, axillary shoots removed (1.09×). Fig. 17. Shoot formation in *P. trichocarpa* at a high cytokinin concentration (1.0×). Fig. 18. Rooting of *P. deltoides* at a low auxin concentration (1.0×). Fig. 19. As 18, at a high concentration (0.5×).

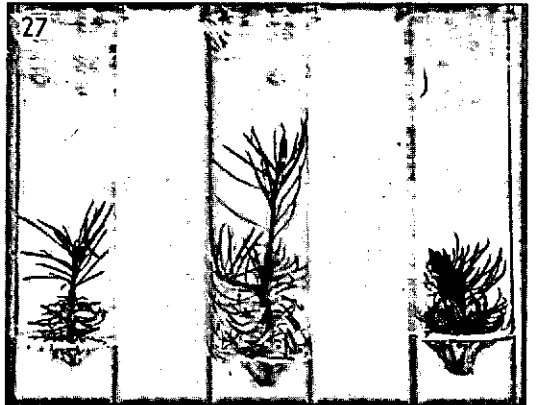
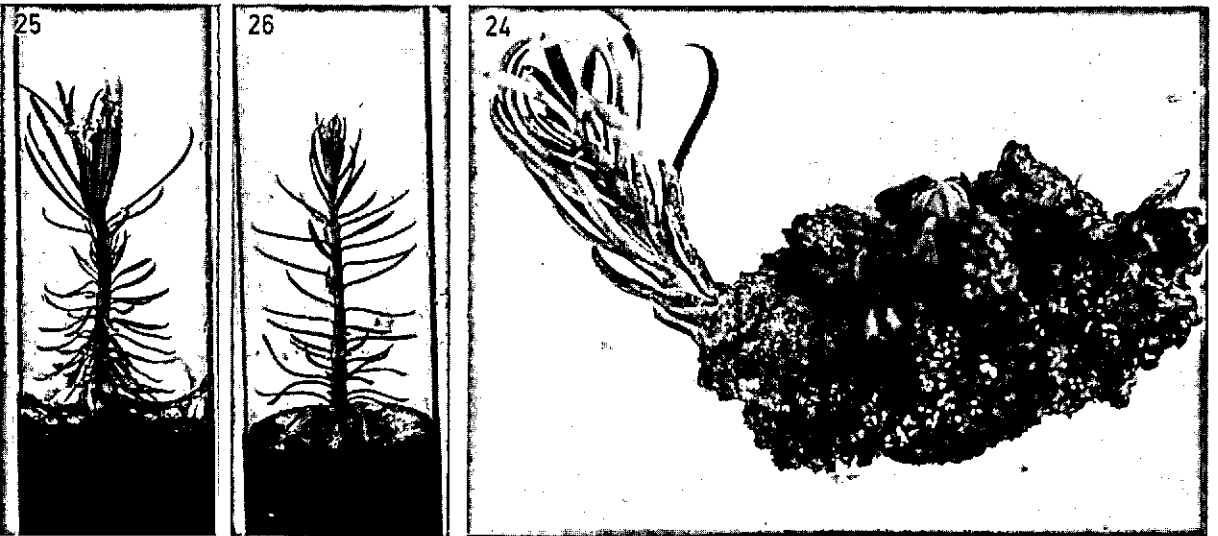
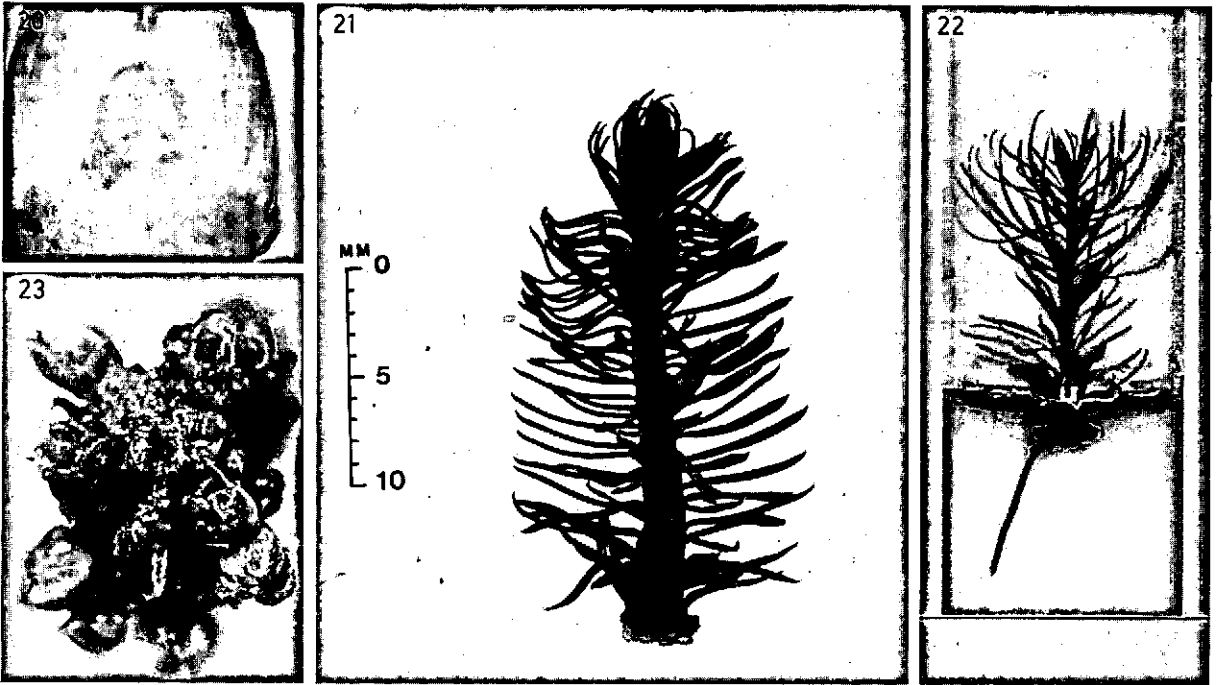


Fig. 20. Doorsnede door een douglasknop (6.7×). Fig. 21. Douglasscheutje na 6 weken in vitro (3.3×). Fig. 22. Beworteld Douglasplantje na 4 maanden in vitro (1.4×). Fig. 23. Knopvorming op een douglasknop na een cytokininebehandeling (5.9×). Fig. 24. Als 23, nu met een uitgelopen eindmeristeem (3.6×). Fig. 25. Ritmisch groeiend douglasscheutje (0.9×). Fig. 26. Vrij groeiend douglasscheutje (0.9×). Fig. 27. Douglasscheutjes in rust na een korte dag behandeling (0.6×).

Fig. 20. Section of a Douglas fir bud (6.7×). Fig. 21. Douglas fir shoot after 6 weeks in vitro (3.3×). Fig. 22. Rooted Douglas fir plantlet after 4 months in vitro (1.4×). Fig. 23. Bud formation on a Douglas fir bud after a cytokinin treatment (5.9×). Fig. 24. As 23, in this case with extended terminal meristem (3.6×). Fig. 25. Rhythmic growing Douglas fir shoot (0.9×). Fig. 26. Free-growing Douglas fir shoot (0.9×). Fig. 27. Dormant Douglas fir shoots after a short day treatment (0.6×).

zoutbehoefte en vertonen een grote tolerantie ten aanzien van temperatuur en licht. Een plotselinge verhoging van het zoutgehalte doet het plantje afsterven maar induceert tegelijk een explosieve ontwikkeling van axillaire scheuten, die echter fysiologische afwijkingen vertonen. Ook na decapitatie ontstaan veel axillaire scheuten (fig. 12) hetgeen resulteert in een microvermenigvuldigingsfactor (d.w.z. het aantal plantjes dat kan ontstaan uit één scheutje in vitro in één maand) van 12. Ter vergelijking: deze factor is bij plataan 7, bij populier 14 en bij de douglas 3. Na gewenning onder plastic groeien de planten uit zonder veel uitval; plantjes met korte dikke wortels gevormd door een hoge auxine-dosering (fig. 11) vertonen aanvankelijk een langzamere ontwikkeling in vitro.

De *populier* kan alleen uit knoppen gekweekt worden na een koude- en een warmtebehandeling van de takken of uit knoppen en met het behorende stengedeel op de voedingsbodem worden geplaatst. Een belangrijk probleem bij de populier is het voorkomen van allerlei endogene infecties die moeilijk te bestrijden zijn; alleen snelgroeiende scheuttoppen bevatten minder vaak micro-organismen in hun vaatstelsel. De vorming van axillaire scheuten wordt sterk gestimuleerd door een hoge cytokinine-dosering in het medium (fig. 14), hetgeen kan leiden tot een massale plantproductie. Met cytokinine is het tevens mogelijk adventieve scheuten te induceren op stengelfragmenten of in callusweefsel dat door deze fragmenten wordt gevormd (fig. 15; fig. 16); in een aantal gevallen vervaagt het onderscheid tussen axillairen en adventieven al snel (fig. 17). Evenals bij de iep worden het bewortelingspercentage, de worteldikte en -lengte beïnvloed door de auxineconcentratie in het medium (fig. 18; fig. 19). Bij beide geslachten bewortelt meer dan 90% in vitro als de auxinedosering is aangepast aan de eisen van de betreffende soorten.

Douglas scheutjes liggen goed beschermd en steriel in de knop (fig. 20). De knoppen kunnen dus met een agressief middel worden gedesinfecteerd waarna het uitprepareren weinig problemen oplevert. Er ontwikkelen zich uit de knoppen rechtopgroeiende, wat gedrongen scheutjes met een aangepaste kleine naaldgrootte (fig. 21), ook uit de eindknoppen van de takken: plagiotrope groei treedt niet op in vitro. De samenstelling van de voedingsbodem dient niet alleen aangepast te worden aan de fysiologische veranderingen in het seizoen maar ook aan de plaats waarvandaan de knop werd geïsoleerd: eigenlijk moet er voor elke knoppositie een reeks voedingsbodems beschreven worden voor de verschillende perioden van het jaar. Optimalisatie van de diverse voedingsbodems is zeer belangrijk, daar de bewortelingsinductie slechts mogelijk is bij snel groeiende scheutjes vooral na een rustperiode

(fig. 22). De rustverschijnselen, die zich veelal uiten in de vorming van knoppen of knopschubben in vitro, kunnen worden opgeroepen door een korte dagbehandeling (fig. 27). Mede hieruit blijkt dat scheutjes van de douglas in vitro manipuleerbaar zijn als bevonden zij zich in de boom; bestudering van het gedrag van in vitro plantjes stelt ons in staat diverse processen in de boom te doorgronden. Blijkbaar heeft de boom al vele ontwikkelingsprogramma's in de knoppen vastgelegd: elk knoptype heeft zelfs een eigen karakteristiek in de CO₂-gasuitwisseling (fotosynthese). In de winter ontstaan in vitro scheutjes die alleen componenten bevatten (hoofdas, naalden) die in aanleg al in de knop aanwezig waren. Later in het seizoen is ook uitgroei van het eindmeristeem van de knop mogelijk. Dit uitgroeien kan geschieden na de vorming van een knop (ritmische groei, fig. 25) of zonder rustverschijnselen (vrije groei, fig. 26). Selectie op deze beide scheuttypen verhoogt de kans op beworteling. Het microvermeerderingssysteem werkt bij de douglas trager dan bij de loofhoutsoorten. Stimulering van axillaire uitgroei is hormonaal niet mogelijk; bij overstimulering met cytokinines ontstaan zogenaamde "multiple budding" verschijnselen (fig. 23; fig. 24). Het betreft hier de vorming van adventieve knoppen waarbij de structuur van de oorspronkelijke knop verloren gaat. Het systeem is bruikbaar in de vermeerdering al is de ontwikkelingsnelheid gering. Stimulering van axillaire uitloop door decapitatie is bij de douglas het meest efficiënt. Het verschijnsel kan spontaan optreden indien de kweekbuizen in de zomer bij een hoge lichtintensiteit in de kas worden geplaatst (fig. 28). Vegetatieve vermeerdering in vitro is dus in principe ook bij de douglas mogelijk, en wel door de zaadvermeerderingsmethode. Het knopkweekstelsel is tot op heden slechts mogelijk bij zeer jonge bomen.

6 Genenbewaring en genenverzending

Na toetsing van knoppen op het voorkomen van ziektekiemen en na het ontwikkelen van plantjes in vitro is het mogelijk dit materiaal onder bepaalde voorzorgen in kweekbuizen te verzenden. Voordeel van deze methode is dat er minimaal risico bestaat dat met het verzenden ook bepaalde ziekten worden verbreid. Na aankomst worden de planten gereactiveerd en in het microvermeerderingssysteem gebracht (fig. 29). Verder perfectioneren van het systeem zou quarantaine-bepalingen overbodig kunnen maken.

Na aanpassing van de voedingsbodem, verlaging van de kweektemperatuur en verlaging van de lichtintensiteit is het ook mogelijk, de activiteit van de scheutjes in vitro geleidelijk te verminderen. De frequentie van het verversen van de voedingsbodems kan op deze wijze vertraagd worden tot eenmaal per jaar en in

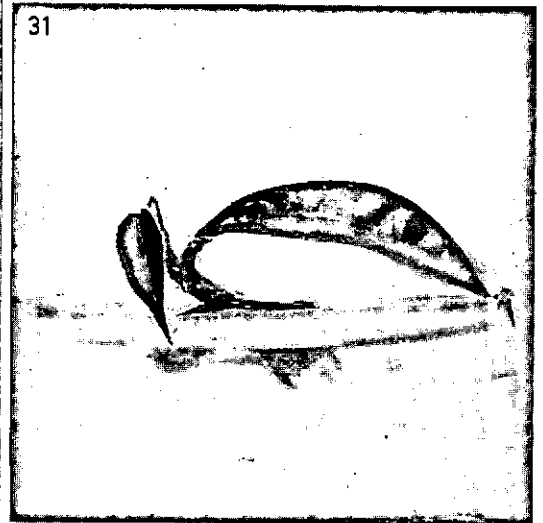
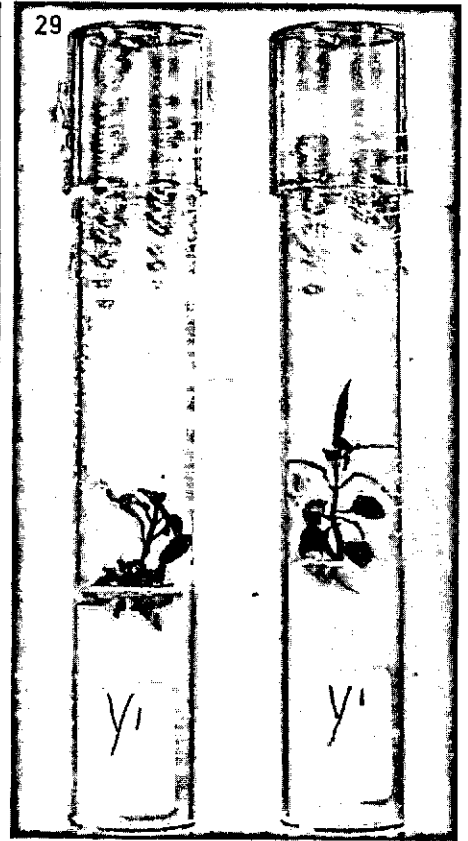
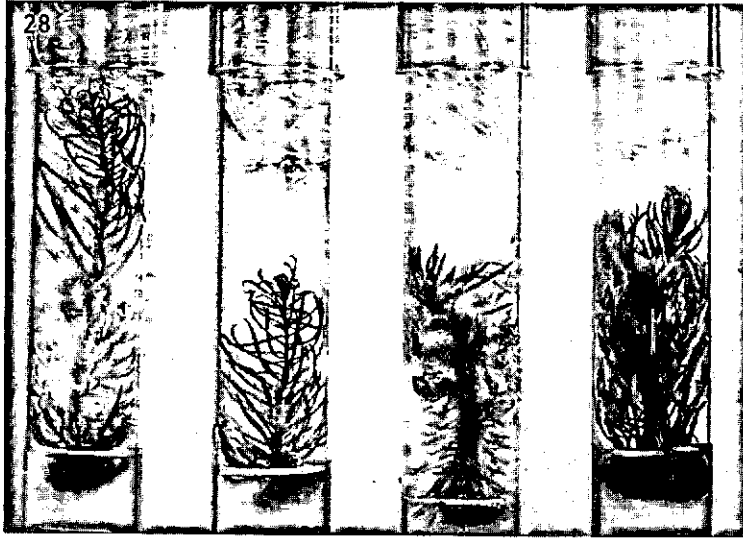


Fig. 28. Vrij groeiende en vertakkende douglasscheuten in vitro; kweekbuizen geplaatst in de kas (0.6×). Fig. 29. Uitgroei van ziektevrj verzonden populierenplantjes in vitro afkomstig uit Nieuw Zeeland (0.6×). Fig. 30. Dipterocarpus grandiflorus scheutje in vitro (2.5×). Fig. 31. Shorea obtusa scheutje in vitro (2.7×).

Fig. 28. Free growing and branching Douglas fir shoots in vitro; culture tubes placed in the greenhouse (0.6×). Fig. 29. Out-growth of disease-free transported poplar plantlets in vitro from New Zealand (0.6×). Fig. 30. Dipterocarpus grandiflorus shoot in vitro (2.5×). Fig. 31. Shorea obtusa shoot in vitro (2.7×).

een aantal gevallen tot eenmaal in de twee tot vier jaar. Soms blijken echter speciale bewerkingen of aanpassingen van het systeem noodzakelijk. Op deze manier is het dus mogelijk, in vrij beperkte kweekruimtes grote hoeveelheden genotypen te bewaren. Het zal een ieder duidelijk zijn, dat de noodzaak tot opslag van genenmaterieel, dat de dag toeneemt. Het in vitro systeem kan op korte termijn een oplossing bieden indien er voldoende in het onderzoek wordt geïnvesteerd. Voor Nederland zijn hierbij een aantal inlandse soorten van belang maar ook exoten afkomstig uit geselecteerde herkomstgebieden. In landen, waar de natuurlijke bossen in hoog tempo verdwijnen, zoals de Dipterocarpaceebossen in Indonesië, is het ontwikkelen van dergelijke systemen nog urgenter dan het aanpassen van de microvermeerdering aan de betreffende boomsoorten (fig. 30; fig. 31). Scheutjesbewaring lijkt voorlopig realistischer dan kryopreservatie (bewaring van cellen bij -160°C), een nieuw systeem dat nog een te lange onderzoeksinspanning vergt.

Dankbetuiging. De beschreven onderzoeken kwamen tot stand met de hulp van W. Kriek, mw. E. Prat, mw. G. Garcia, G. J. Jansen, mw. G. Reitsema en M. Meinhout. Het Dipterocarpacee-onderzoek werd uitgevoerd door mw. W. Smits. De in dit artikel beschreven resultaten zijn een summier neerslag van het onderzoek aan het Rijksinstituut voor onderzoek in de bos- en landschapsbouw "De Dorschkamp" in detachering door de vakgroepen Bosteelt (prof. R. A. A. Oldeman) en Tuinbouwplantenteelt (prof. R. L. M. Pierik) van de Landbouwhogeschool en met steun van de NPC voor het Populierenproject.

7 Referenties

- Ball, E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. *American Journal of Botany* 33: 301-318.
- Evers, P. W., 1981a. Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, in vitro. I. Plant, nutritional and physical factors. Uitvoerig verslag Rijksinstituut voor onderzoek in de bos- en landschapsbouw "De Dorschkamp", Wageningen (16 (1). 44 p.
- Evers, P. W. 1981b. Ibid II. Growth factors, topophysis and seasonal changes. Uitvoerig verslag 16 (2): 40 p.
- Evers, P. W. 1982a. Ibid III. Photosynthesis in vitro. Uitvoerig verslag 17 (1): 35 p.
- Evers, P. W. 1982b. Ibid IV. The influence of topping, forcing, the light intensity and the sucrose concentration. Uitvoerig verslag, in press.
- Evers, P. W. 1982c. Ibid V. The influence of exogenously ap-

- plied growth regulators. Uitvoerig verslag, in press.
- Gautheret, R. J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Acad. Sci. Paris* 208: 118-120.
- Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz. Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss., Wien*, 111: 69-92.
- Hannig, E. 1904. Über die Kultur von Cruciferen Embryonen ausserhalb des Embryosacks. *Bot. Ztg.* 62: 45-80.
- Kögl, F., Haagen-Smit, A. J. and Erxleben, H., 1934. Über eines neues Auxin (Hetero-auxin) aus Ham. *Zeits. Physiol. Chem.* 228: 90-103.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S. et al. 1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin; a substance promoting cell division. *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 1375-1380.
- Pierik, R. L. M. 1979. In vitro culture of higher plants - a bibliography. Ponsen en Looijen, Wageningen, 149 p.
- Winton, L. L. 1972a. Annotated bibliography of somatic conifer callus cultures. *Gen. Phys. Notes* 16: 1-19.
- Winton, L. L. 1972b. Bibliography of somatic callus cultures from deciduous trees. *Gen. Phys. Notes* 17: 1-19.
- Winton, L. L. 1976. Tissue culture of trees. In: *Modern methods in forest genetics*, Miksche, J. P. (ed.), Springer, New York, p. 243-264.

Summary

Propagation of forest trees by tissue culture: in vitro plant development for forestry requirements.

In vitro plant propagation in The Netherlands is making rapid progress; however, the propagation of forest trees is lagging behind because of certain fundamental problems. The history of in vitro propagation of woody species is described and recent results in this field obtained at the Agricultural University and "De Dorschkamp" Institute are discussed. When the availability of a sufficient quantity of good quality seeds is in doubt, "seed propagation" methods in vitro can be used: adventitious shoots are induced on embryos or very young seedlings (Scots pine, Douglas fir). Shoots induced on pieces of root in the greenhouse (elm) are suitable as initial material for in vitro propagation, as are vegetative buds (plane, elm, poplar, Douglas fir). After the shoots have grown out, they can be multiplied by micropropagation (induction of axillary bud extension). The shoots can be rooted after an auxin treatment. In vitro techniques are also suitable for the disease-free transport of plant material and for gene conservation.
