UBN

J. Margara

GRONDSLAGEN VAN DE VEGETATIEVE VERMEERDERING

MERISTEMEN EN ORGAANVORMING

sept. '87

NEDERLANDSE VERENIGING VOOR
PLANTECEL- EN -WEEFSELKWEEK
NETHERLANDS SOCIETY FOR PLANT CELL AND TISSUE CULTURE

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS
0000 0939 9623

ISN = 480194

GRONDSLAGEN VAN DE VEGETATIEVE VERMEERDERING

MERISTEMEN EN ORGAANVORMING

Jacques Margara

Laboratoire de Morphogénèse

I.N.R.A. - Versailles

Vertaald en aangevuld door

F.A. Hakkaart

NVPW

Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek

Postbus 48, 6700 AA Wageningen

Omslagtekening: L.J.W. Gilissen

Oorspronkelijke titel: J. Margara
Bases de la multiplication végétative.
Les méristèmes et l'organogenèse. Copyright C 1982 INRA, 149, Rue de Grenelle, 75341 Paris Cedex 07, La France.

Vertaling: Ir. F.A. Hakkaart
Copyright C 1987 for the Dutch translation by the Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek, Postbus 48, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotocopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek, Postbus 48, 6700 AA Wageningen. No part of this book may be reproduced in any form, by print, pnotoprint, microfilm or any other means, without written permission from the Netherlands Society for Plant Cell and Tissue Culture, P.O. Box 48, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

ISBN 2-85340-379-3

Deze uitgave is mogelijk geworden mede dankzij een financiële bijdrage van:

AMSTELSTAD B.V., AMSTERDAM
BRAAM VARENS B.V., DE KWAKEL
BRUINSMA SELECTIEBEDRIJVEN B.V., NAALDWIJK
CEBECO HANDELSRAAD, LELYSTAD
COSTAR-EUROPE LTD., BADHOEVEDORP
D.J. VAN DER HAVE B.V., RILLAND
HOLLANDSE SUIKERBIETEN SELECTIE MIJ. B.V., ZEEWOLDE
RIJK ZWAAN B.V., DE LIER
SES-HOLLAND, ST. ANNA PAROCHIE
LABORATORIUM VAN DER SPRONG, ROELOFSARENDSVEEN
HANDELSKWEKERIJ M.C. VAN STAAVEREN B.V., AALSMEER
PVBA HERMAN VERMEULEN, KESSEL-LO (BELGIE)
ZWAAN EN DE WILJES' ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V., SCHEEMDA

SPECIALE DANK AAN:

BRUNSCHWIG CHEMIE, AMSTERDAM.

INHOUD

BIJ DE NEDERLANDSE UITGAVE 9

NOOT VAN DE VERTALER 11

TEN GELEIDE 13

VOORWOORD 17

INLEIDING

A. **Meristemen en meristematische toestand** 23

1. Differentiatie en dedifferentiatie 23

2. Classificatie van de meristemen 26

B. **Meristemen en vegetatieve vermeerdering** 31

1. Vegetatieve vermeerdering en geslachtelijke voortplanting

2. Bezwaren en beperkingen van vegetatieve vermeerdering 33

3. Fundamentele rol van meristemen in de vegetatieve vermeerdering 34

4. Lessen over spontane vegetatieve vermeerdering 35

4.1. Vermeerdering en knopvorming 36

4.2. Afscheiding en beworteling 39

4.3. Bijzondere aanpassingen aan vegetatieve vermeerdering 39

4.4. Belang van voorbeelden van spontane vermeerdering voor het in vitro onderzoek 41

5. Kunstmatig veroorzaakte vegetatieve vermeerderingswijzen 43

5.1. Traditionele vegetatieve vermeerdering 43

5.2. Methoden van de in vitro vermeerdering 45

I. STRUCTUUR EN FUNCTIE VAN PRIMAIRE MERISTEMEN

A. **Structuur van wortel- en stengelmeristemen** 53

1. Structuur van het wortelmeristeem 53

2. Structuur van het stengelmeristeem 54

2.1 Begrippen 'tunica' en 'corpus' 55

2.2 Zonering van het meristeem 56

B. Stengelmeristeem en phyllotaxie (bladstand) 57

1. Verscheidenheid in bladstanden 57
2. Beschrijvende systemen met de verspreide bladstand als voorbeeld 58
   - 2.1 Divergentiehoek 59
   - 2.2. Parastichen 59
3. Hypothesen over de werking van het meristeem 60
4. Autonome werking van het meristeem 62
   - 4.1 Effecten van dieper gelegen weefsels 62
   - 4.2 In vitro cultuur van het geïsoleerde topmeristeem 62
5. Determinatie van bladprimordia 63

C. Probleem van de eventuele omkeerbaarheid van wortel- en stengelmeristemen 64

1. Onomkeerbaarheid van beide typen meristemen 64
2. Het bijzondere geval van Nasturtium officinale 65
3. Eventuele mogelijkheden van omkeerbaarheid van 'promeristemen' bij weefselkweek 65
4. Onderlinge verwisselbaarheid van de stengel- en wortelmeristemen bij Selaginella's 66

D. Morfologische en structurele veranderingen in verband met de bloemaanleg 67

1. Drie soorten meristemen: vegetatieve meristemen, meristemen van de bloeiwijze en van de bloem 67
2. Morfologische en structurele veranderingen verband houdend met de bloemaanleg 68
   - 2.1 Morfologische veranderingen 68
   - 2.2 Structuurveranderingen 73

II. VORMING VAN NIEUWE MERISTEMEN EN SOMATISCHE EMBRYOGENESE

A. Wortelvorming 79

1. Herkomst van de wortels 79
   - 1.1 Verschillende herkomst van wortelmeristemen 79
   - 1.2 Stadia in de vorming van het wortelmeristeem 81
   - 1.3 Determinatie van de meristematische gebieden 82
2. Hormonale regeling van de beworteling 82

2.1 Stimulerend effect van het blad of de scheut 82
2.2 Opvatting van een specifiek rhizocaline 83
2.3 Auxine en wortelvorming 83
2.4 Interactie van factoren 84
3. Verschillende factoren bij de wortelvorming 87
3.1 Omgevingsfactoren 87
3.2 Factoren verband houdend met de herkomst van de stek 87
3.3 Fysiologische correlaties en wortelvorming 88
4. Wortelvorming in de weefselkweek 89
4.1 Uitgangsexplantaat geschikt voor wortelvorming 89
4.2 Uitgangsexplantaat aanvankelijk ongeschikt voor wortelvorming 90

B. Scheutvorming 91
1. Verschillende soorten scheuten 91
2. Hormonale regeling van scheutvorming 91
2.1 Opvatting over de verhouding in de concentratie cytokininen en auxinen 92
2.2 Begrip concentratiedrempel 93
2.3 Soort auxine en cytokinine 93
2.4 Volgorde van de groeistoffen 94
2.5 Effect van verschillende groeistoffen 94
3. Verschillende factoren bij scheutvorming 95
3.1 Fysische factoren 96
3.2 Plaats van de scheutvorming 97
3.3 Polariteit van de scheutvorming 98
3.4 Herkomst van de weefsels 99
3.5 Variatie van het vermogen tot scheutvorming afhankelijk van het gewas 105
4. Verloren gaan van het vermogen tot scheutvorming 107
5. Scheutvorming op bloeiwijzen of bloemen 109
5.1 Modelvoorbeeld tabak 109
5.2 Modelvoorbeeld witlof 113
5.3 Andere voorbeelden van de vorming van scheuten die bloeiwijzen of bloemen in de weefselkweek geven 116

C. **Somatische embryogenese** 119
1. Het begrip somatisch embyro - definities - geschiedenis 119
1.1 Spontane polyembryonie 120
1.2 Kunstmatige somatische embryogenese in vitro 120
2. Factoren bij somatische embryogenese 123
2.1 Eventuele rol van de isolatie van de cellen 123
2.2 Voedings- en andere omgevingsfactoren 124
2.3 Reeks van voedingsmedia 124
2.4 Inductie tot embryogenese en verloren gaan van dit vermogen 125
3. Vóórkomen van de somatische embryogenese
3.1 Verscheidenheid aan taxonomische soorten die in vitro embryoïden gevormd hebben 126
3.2 Verscheidenheid van de herkomst van weefsels die embryoïden vormen 129
4. Discussie en perspectieven betreffende somatische embryogenese 130

III. MOGELIJKHEDEN TOT ORGAANVORMING VAN HET STENGELMERISTEEM IN WEEFSELKWEEK

A. **Doelstellingen van de cultuur van meristemen of stengeltoppen** 135
1. Kweek van meristemen of stengeltoppen als techniek bij experimenteel onderzoek 135
2. Kweek van meristemen of stengeltoppen met als doel vegetatieve vermeerdering 136

B. **Meristeemcultuur en het opbouwen van gezonde klonen** 137
1. Het plantenziektenkundige probleem 137
2. Principe van de methode 137
3. Kweektechniek 139
3.1 Stadia in de kweek 139
3.2 Kweekmedium 141
3.3 Verschillende technische problemen 141
4. Uitbreiding van de methode tot talrijke andere gewassen 142

C. **In vitro vermeerdering van protocormen van orchideeën** 145
1. Bijzondere ontwikkeling van het orchideeënmeristeem 145
1.1 Het protocorm dat na kieming ontstaat 145
1.2 Het protocorm in de weefselkweek 146

2. Cymbidium als modelvoorbeeld 148
2.1 Orgaanvormende mogelijkheden van het protocorm van Cymbidium 148
2.2 Kweekmedia 149
2.3 Begrip protocorm 149
3. Regeneratiewijzen van plantjes bij verschillende orchideeën 150
3.1 (Uitbreiding van de) vermeerdering van andere orchideeën door kweek van protocormen in vitro 150
3.2 Variatie in de gebruikte organen en weefsels 151
4. Bijdrage van het onderzoek van Morel over orchideeën aan de vegetatieve in vitro vermeerdering 152

D. Proliferatie van axillaire scheuten in de meristeemcultuur 154
1. Voorbeeld aardbei 154
1.1 Achtereenvolgende stadia van de in vitro vermeerdering 155
1.2 Belang en beperkingen van de methode van in vitro vermeerdering door axillaire scheuten 156
2. Verschillende manieren van vegetatieve vermeerdering door meristeemcultuur 157

E. Terugkeer naar de juveniele toestand bij de meristeemcultuur 160
1. Behoud van de aanvankelijke morfogenese in vitro 160
2. Opnieuw optreden van juveniele morfologische kenmerken in vitro 161
3. Opnieuw verschijnen van juveniele fysiologische eigenschappen in situ 162

F. Effect van de herkomst van het explantaat op de in vitro ontwikkeling 164

G. Versnelling van de bloemaanleg en terugkeer naar de vegetatieve toestand 165
1. Bloemaanleg van meristemen in vitro
2. Terugkeer naar de vegetatieve toestand van meristemen in bloeiwijzen 166
2.1 Omkeer van de volledige plant 167
2.2 Omslag in de weefselkweek 169
3. Problemen bij het gebruik van organen van bloeiwijzen voor vegetatieve vermeerdering 172
3.1 Voorbeeld bloemkool 172

3.2 Voorbeeld chrysant 174

CONCLUSIES

A. De belangrijkste rol van meristemen bij de vermeerdering van hogeren planten 179

B. De praktijk van de vegetatieve vermeerdering in de weefselkweek 180
1. Voordelen van de methode 180
2. Beperkingen van de methode 181

C. Orgaanvorming en vegetatieve vermeerdering 182

AANHANGSEL I: WEEFSELKWEEKTECHNIEKEN; METHODOLOGISCHE BEGINSELEN

A. Algemene methoden
1. Glaswerk 186
2. Steriliteit (aseptie) en kiemvrij maken (antiseptie) 187
2.1 Steriele omstandigheden 187
2.2 Sterilisatie van het plantmateriaal 189
2.3 Kweekruimten 190

B. Kweekmedium
1. Vast of vloeibaar 191
1.1 Agar 191
1.2 Bio-gels 191
1.3 Vloeibaar medium 192
1.4 Toevoeging van actieve koolstof 192
2. Minerale samenstelling 196
2.1 Bijzondere voedingsproblemen in de weefselkweek in vitro 196
2.2 Studie van de minerale voeding in vitro 198
2.3 Samenstelling van de minerale basismedia (macro-elementen) 199
2.4 Spore-elementen 206
3. Organische verbindingen 209
3.1 Suikers 209
3.2 Vitaminen 211

3.3. Aminozuren en verschillende eiwitextracten 211
3.4 Organische zuren 212
3.5 Stimulerende stoffen van slecht gedefiniëerde samenstelling 213
4. Groeistoffen 214
4.1 Auxinen en antiauxinen 214
4.2 Cytokininen 216
4.3 Gibberellinen 217
4.4 Verschillende andere stoffen 217
4.5 Keuze van de samenstelling van groeistoffen in het medium 219
5. Praktische opmerkingen over de keuze van de samenstelling van het voedingsmedium 220

AANHANGSEL II: TOEVOEGING DOOR F.A. HAKKAART
I. Glazigheid of vitrificatie 229
II. Overdracht in grond 229

AANHANGSEL III: VERKLARENDE WOORDENLIJST 240

LITERATUURLIJST 252

TREFWOORDENREGISTER 293

REGISTER VAN PLANTENAMEN 294

BIJ DE NEDERLANDSE UITGAVE

Het vakgebied van de plantaardige weefselkweek vertoont sinds enige jaren een onstuimige groei. De moeizaam verworven onderzoeksresultaten en inzichten hebben hun weg naar de praktijk gevonden en worden nu op steeds grotere schaal toegepast. Anno 1985 waren er in Nederland 36 miljoen planten, verkregen via in vitro vermeerdering, op de markt gebracht; de verwachting is dat dit aantal in 1990 de 100 miljoen ruim gepasseerd zal zijn.

Voor een oordeelkundige toepassing van weefselkweek is een adequate methodische en theoretische kennis onontbeerlijk. Hoewel al een verdienstelijke aanzet tot vorming en overdracht van deze kennis via landbouwonderwijs en -voorlichting wordt gerealiseerd (denken we onder meer aan het boek van prof.dr. R.L.M. Pierik: 'Plantenteelt in kweekbuizen'), toch doet zich het gebrek aan goede handboeken voelen, te gebruiken door bedrijfsleiders, kwekers, onderzoekers en studenten, met name om een beter begrip te krijgen van fundamentele processen als de groei van plantecellen, de werking van meristemen en de ontwikkeling van organen.

Door zijn activiteiten bij de totstandkoming van bilaterale betrekkingen tussen Frankrijk en Nederland op het niveau van landbouwkundig onderzoek (en met name de plantebiotechnologie) kwam Dr. P.A.Th.J. Werry rond 1983 als toenmalig onderzoekscoordinator bij de Directie Landbouwkundig Onderzoek (DLO) van het Ministerie van Landbouw en Visserij en toendertijd als voorzitter van de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek in aanraking met het boek 'Bases de la multiplication végétative' van Dr. J. Margara en bracht het onder de aandacht van de Vereniging. Dit boek bleek een schat aan informatie te bevatten en op een dusdanige manier geschreven te zijn dat het de functie van het gewenste handboek uitstekend zou kunnen vervullen. Van het boek bestond helaas alleen een Franstalige versie. Een van de leden van de Vereniging, Ir. F.A. Hakkaart, bood zich echter spoedig aan om het boek in het Nederlands te vertalen.

Ofschoon deze vertaling in ruwe versie spoedig gereed was waren diverse contacten vanuit het Bestuur met uitgeverijen negatief. Men was met name huiverig voor de relatief kleine Nederlandstalige markt. Het Bestuur besloot daarop zelf de rechten van de vertaling bij de INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) te verwerven. Het opvragen en vrijgeven van deze rechten en met name van de originele foto's en schema's bleek een zeer moeizame procedure, alle bilaterale verdragen ten spijt. Het is uiteindelijk

gelukt, ware het dat niet alle originele afbeeldingen verkregen konden worden. De tekst diende derhalve hieraan aangepast te worden, naast diverse andere ingrepen. Een redactiecommissie, bestaande uit Dr. J.H.N. Schel, Dr. L.J.W. Gilissen en Mw. Drs. S.E. Stumpel-Rienks heeft zich van deze taak gekweten. Hulp werd hen daarbij geboden door Dr. G. Staritsky, Dr.ir. S. Roest en Ir. D.H. Vuyk. De tekstverwerking vond plaats door Mw. J. Cobben-Molenaar en mw. G.G. van der Hoef-van Espelo.

Ondertussen was contact gezocht met een aantal firma's - allen als leden binnen onze Vereniging aanwezig - met het verzoek om een financiële bijdrage voor het project. Toen dan ook nog uiteindelijk een garantie-subsidie bij een van hen voor de drukkosten verkregen kon worden stond niets meer een verdere uitgave in eigen beheer in de weg. Drukkerij Ernsting te Wageningen mocht het karwei afmaken. Het resultaat van deze gezamenlijke inspanningen ligt thans voor U. Wij zijn een ieder, die hierbij betrokken is geweest, bijzonder erkentelijk.

mei 1987

Het bestuur van de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en -weefselkweek

NOOT VAN DE VERTALER

Het bestuur van de Nederlandse Vereniging voor Plantecel- en weefselkweek heeft besloten het Franstalige handboek over weefselkweek door J. Margara in het Nederlands te laten vertalen en uitgeven. Ondergetekende heeft geprobeerd van dit boek een zo getrouw mogelijke weergave te maken. Bij het doorwerken van de tekst krijgt de lezer veel waardering voor de wijze waarop de stof is behandeld. Wel ben ik van mening dat enkele problemen van de weefselkweek onvoldoende aandacht hebben gekregen. Na overleg met het bestuur werd overwogen over twee van deze problemen een aparte korte samenvatting te schrijven en deze als aanhangsel aan het boek toe te voegen.

Het eerste onderwerp betreft glazigheid in de weefselkweek. Dit probleem wordt niet in het boek behandeld, maar elke weefselkweker krijgt er mee te maken. In enkele gevallen is het zelfs een beperkende factor. De laatste jaren is iets meer bekend geworden over de achtergrond en het voorkómen van dit verschijnsel. Ik heb geprobeerd de stof kort samen te vatten en vooral recente gegevens te verwerken.

Het tweede onderwerp betreft de overgang van het jonge weefselkweekplantje naar de grond. Dit wordt door de auteur zeer summier behandeld. Vooral de toegepast werkende weefselkweker weet, dat in dit stadium grote verliezen kunnen optreden en dat deze fase soms zelfs een beperkende factor wordt. Moeite en kosten, die in voorgaande stadia zijn gemaakt gaan dan verloren. Het onderzoek heeft zich nog te weinig met dit probleem bezig gehouden. Ook hier heb ik geprobeerd, zonder volledig te zijn, het onderwerp beknopt samen te vatten en de belangrijkste factoren te behandelen, waarbij vooral recente literatuur geciteerd wordt. De lezer kan zich in korte tijd inwerken en zich aan de hand van de literatuur verder in het onderwerp verdiepen.

Een derde onderwerp betreft variatie in de weefselkweek. Dit verdient volgens mij in een handboek meer aandacht dan het hier heeft gekregen. Het onderwerp is echter dermate uitgebreid, dat ik van een beknopte bewerking heb afgezien.

Samenvattend meen ik, dat er nu een aantrekkelijk boekwerk beschikbaar is, dat voor veel Nederlandstaligen gemakkelijker toegankelijk is dan de originele uitgave. Studenten zullen na bestudering van dit boek een goede basiskennis van het vakgebied hebben, waarop ze kunnen voortbouwen. De gevorderde weefselkweekonderzoekers en leiders van commerciële weefselkweek-

laboratoria zullen in het boek ongetwijfeld elementen aantreffen, die bij hun eigen werk van nut kunnen zijn.

Dat het boek in het Nederlandse taalgebied goed ontvangen mag worden!

Ir. F.A. Hakkaart

Jean REBISCHUNG heeft mij tot het schrijven van dit werk aangezet. Ik draag het op ter nagedachtenis aan hem en aan George MOREL.

TEN GELEIDE

Onbeperkt doorkweken van planteweefsels is sinds 45 jaar mogelijk. In het voorjaar van 1937 werd het eerste weefsel geïsoleerd waarvan de groeikracht dankzij regelmatig overzetten tot nu toe in stand is gebleven. Sinds 1941 kon men volledige planten verkrijgen uit kleine delen van organen of uit stukjes weefsel. Toch was deze vegetatieve vermeerdering in vitro slechts mogelijk door gebruik te maken van weefsel met slapende knoppen of van weefsel dat in staat was om deze spontaan te vormen. De beworteling bood geen enkel probleem dankzij wortelvormende auxinen, waarvan het gebruik al geruime tijd bekend was. In 1955 heeft de ontdekking van kinetine - een stof met een krachtige scheutvormende werking - en daarna van andere cytokininen het mogelijk gemaakt om de vorming van adventieve scheuten in bijna onbeperkte mate te bewerkstelligen. Na beworteling van deze scheuten door behandeling met gibberellinezuur en auxinen, groeiden ze uit tot volledige planten. Deze vegetatieve vermeerdering in vitro werd sinds 1962 vergemakkelijkt door de ontwikkeling van bijzonder geschikte minerale voedingsmedia.

De kweek van topmeristemen met als doel virusziekten te elimineren werd ongeveer dertig jaar geleden gerealiseerd. De eerste toepassing van wat men op een weinig elegante manier microvermeerdering noemt, vond een twintigtal jaren geleden plaats. De vorming van somatische embryo's uit in vitro gekweekte weefsels werd voor het eerst ontdekt in 1947, terwijl de produktie van embryo's uit pollenkorrels pas in 1964 verkregen werd.

Een ander belangrijk onderzoeksgebied werd vanaf 1950 ontgonnen door onderzoekers, die in de farmaceutische industrie werkzaam waren. Zij begonnen via celkweken van medicinale planten geneesmiddelen te produceren. Hun resultaten, die weliswaar uit fundamenteel oogpunt zeer oorsponkelijk waren, vonden op dat ogenblik echter geen praktische toepassing.
In 1954 bracht men de kweek van vrije cellen tot stand, hetgeen grote verwachtingen wekte bij de genetici. Tien jaar later werden deze verwachtingen gesteld aan protoplasten, waarvan de isolatie aan het einde van de 19e eeuw en de fusie al in 1909 gelukt was.
Zo waren vóór 1965 de hoofdlijnen van de weefselkweek volledig bekend. Dit resultaat werd, zoals we zullen zien, in een periode van dertig jaar stap voor stap tot stand gebracht. Dit is begrijpelijk, aangezien het werk van pioniers in wezen op ideeën gebaseerd was. Hierdoor kan de ontwikkeling niet even snel gaan als die in de techniek.

Ofschoon weefselkweek een methode is die gemakkelijk te populariseren was, bleef deze gedurende enige decennia met een waas van geheimzinnigheid omgeven. Enkele tuinbouwkundigen pasten weefselkweek echter met succes toe bij de studie van concrete en economisch belangrijke problemen, zoals het elimineren van virusziekten of de vermeerdering van orchideeën. Hun vooruitgang was overigens bescheiden en de beschikbare middelen waren beperkt. Maar nog geen tien jaar geleden wekte de weefselkweek plotseling een ware geestdrift op. Onderzoekers, praktijkmensen, industriëlen, financiers en zelfs politic gingen hartstochtelijk de verwachtingen koesteren, die meer dan dertig jaar onderdrukt waren.

De pioniers werden toen overspoeld door de haast van diegenen die plotseling het belang van deze methode waren gaan inzien, een methode die geduldig ontwikkeld was met behulp van vaak belachelijk weinig middelen. Deze explosieve ontwikkeling kon natuurlijk niet harmonieus verlopen. Vaste regels werden veronachtzaamd en met stelligheid gepresenteerde voordrachten maskeerden de voosheid van bepaalde resultaten.
Deze situatie was in zekere zin vergeeflijk, want de beginners beschikten niet over degelijke handboeken. Die van de pioniers waren uit de tijd geraakt, terwijl ook in de werken van de meest bekwame onderzoekrs de technische aspecten nauwelijks enige aandacht kregen.
Men realiseerde zich zeer goed dat de meestbelovende toepassing van weefselkweek die van de vegetatieve vermeerdering was. Daarom was het wenselijk om over een boekwerk te beschikken, dat in staat was om de overgang te verzekeren van de klassieke technieken naar de nieuwe methoden van weefselkweek. Het is de verdienste van Jacques Margara een dergelijk werk gerealiseerd te hebben.

Daar hij zich al meer dan twintig jaar bezighoudt met de verschijnselen van orgaanvorming, welke optreden in weefsels, die in vitro gekweekt worden, is hij zeer ter zake kundig, waardoor hij in staat is om zowel de kracht als de beperkingen ervan te onderkennen. Hij weet zeer goed, dat bepaalde traditionele werkwijzen nu verouderd zijn, en dat het nodig is om deze te verlaten of ze te vernieuwen zonder evenwel uit het oog te verliezen, dat bepaalde plannen nog tot het rijk der dromen behoren.
Dit werk steunt op strikt fundamentele gegevens, waaraan voortdurend gerefereerd wordt. Jacques Margara brengt de lezer er niet toe om de realiteit van de feiten uit de weg te gaan, maar legt het accent op de bruikbaarheid van de methode.

Mensen uit de praktijk zullen er niet aan voorbij kunnen gaan om voortdurend dit heldere en opmerkelijk goed geïllustreerde boek te raadplegen, hetgeen hen voor heel wat mislukkingen zal behoeden. Voorts zullen mensen uit het fundamentele onderzoek er talrijke onderwerpen ter overweging in vinden en, zoals mijn leerling George Morel zaliger suggereerde, hierdoor kunnen nadenken over wat wel en wat niet mogelijk is in de weefselkweek.

Professor R. Gautheret

Professor R. Gautheret, die zich voortdurend voor mijn werk over de vegetatieve orgaanvorming of bloemvorming in vitro interesseerde, heeft mijn manuscript doorgelezen en mij veelvuldig raad gegeven. Dat hij hier de uitdrukking van mijn zeer diepe dankbaarheid moge vinden.

Nous ne sommes savants que de la science présente
Montaigne

VOORWOORD

Het vermogen tot vegetatieve vermeerdering* kan beschouwd worden als een fundamentele eigenschap van planten. In principe bezit elke diploïde cel in zijn kern de totale karakteristieke informatie van het genotype. Het ontstaan van een individu langs ongeslachtelijke weg vanuit een cel of een klein aantal cellen is een uiting van de totipotentie* van de cel. Binnen het geïntegreerde leven in een veelcellig organisme brengen de cellen in het algemeen slechts een klein gedeelte van deze informatie tot expressie. De fundamentele totipotentie krijgt in het algemeen geen gelegenheid om tot uiting te komen. Tijdens de ontwikkeling van het embryo en vervolgens van de plant zelf differentiëren en specialiseren de uit opeenvolgende delingen afkomstige cellen zich. De cellen van volgroeide en verouderende organen houden op met delen. Bij hogere planten blijven er evenwel altijd meristemen* bestaan, groepen van cellen, waaruit weefsels (histogenese*) of organen (organogenese*) opgebouwd worden. Door hun bestaan is bij de plant een voortdurende en onbeperkte orgaanvorming mogelijk. Dit in tegenstelling tot de beperkte ontogenese* van hogere dieren, waar de vorming van organen uitsluitend gedurende het embryonale leven plaatsvindt.

Er bestaat een verscheidenheid aan meristemen. Sommige zijn histogeen* en produceren gewoonlijk slechts weefsels (intercalaire meristemen, cambium, enz.); andere zijn organogeen*. Wortelmeristemen zijn betrekkelijk eenvoudig in hun structuur en hun werking. Stengelmeristemen zijn ingewikkelder en verschillen meer van soort tot soort. Bovendien wijzigt hun structuur zich tijdens de overgang naar de generatieve fase. Gescheiden van de moederplant zijn ze vaak in staat om een nieuwe wortel aan de basis te maken en zo een jonge plant te vormen. Ze verdienen dus de naam die hen vaak gegeven wordt, namelijk 'vegetatiepunten'. De vegetatieve vermeerdering van hogere planten is strikt afhankelijk van meristemen. De vele vegetatiepunten, zowel terminaal als axillair, zijn alle uitgangspunten voor vermeerdering. Dit verzekert overleving ingeval van gedeeltelijke vernietiging en mag beschouwd worden als een aanpassingsverschijnsel ter compensatie van de risico's van de vaste standplaats.

* De sterretjes verwijzen naar de verklarende woordenlijst.

Welke ook de wijze van vegetatieve vermeerdering moge zijn (tradionele stekmethode, kweek van meristemen of stengeltoppen, scheutvorming op een callus of somatische embryogenese in vitro), het gaat altijd om de vorming van nieuwe meristeemweefsels.

Spontane vegetatieve vermeerdering bij hogere planten is niet zeldzaam, en er bestaan verschillende mechanismen en organen (stolonen*, bulbillen*, enz.) die aangepast zijn aan deze wijze van vermeerdering. Hoe gevarieerd ook, de aanpassing aan de vegetatieve vermeerdering blijft niet beperkt tot deze voorbeelden. Uitbreiding van deze wijze van vermeerdering bij een zeer groot aantal soorten en vele typen weefsels is één van de belangrijkste toepassingen van de technieken van het in vitro kweken, waarmee R. Gautheret begonnen is en waartoe het werk van wijlen G. Morel veel heeft bijgedragen. De in vitro* cultuur van organen of weefsels veroorzaakt het opnieuw beginnen van de mitosen. Door het bevorderen van de differentiatie* van de cel wordt aan een groot aantal soorten eigenschappen, die onder normale omstandigheden onderdrukt worden, de mogelijkheid gegeven om tot expressie te komen.

De drie methoden van in vitro vermeerdering worden van elkaar onderscheiden op grond van de toename in moeilijkheidsgraad van de fundamentele problemen die ermee samenhangen.

1. Het kweken van meristemen of stengeltoppen is een microstekmethode, die het ontwikkelen van specifieke voedingsmedia noodzakelijk maakt. Dit blijft de meest algemeen toepasbare methode en is de meest zekere om het optreden van varianten* te voorkomen en de 'reproductie van gelijke copieën' te waarborgen. Bovendien heeft deze het voordeel dat het 'fytosanitaire' aspect eventueel gekoppeld kan worden aan de vermeerdering.
2. Het produceren van planten door nieuwvorming* van scheuten en wortels aan een callus* kan in een misschien verre toekomst gebruikt worden om deze wijze van vermeerdering tot elk willekeurig weefsel en elke willekeurige plantesoort uit te breiden. Deze doelstelling is echter nog lang niet bereikt, temeer daar de scheutvorming hierbij meer afhankelijk is van het oorspronkelijke weefsel dan van het voedingsmedium. De methode toont dus de noodzaak van het onderzoek naar nog onbekende faktoren van de dedifferentiatie* en de organogenese.
3. De somatische embryogenese* zou in de toekomst de ideale aanvulling van het manipuleren op celniveau (mutagenese, protoplastenfusie, enz)

kunnen zijn, en de regeneratie van losse cellen mogelijk moeten maken.

Spontane polyembryonie* (meestal van cellen uit de nucellus) is slechts bij een klein aantal soorten bekend (Citrus, Mangifera, enz). Weefselkweek heeft het mogelijk gemaakt om de waarnemingen met betrekking tot somatische embryogenese uit te breiden over enige tientallen families. Dit aantal blijkt echter nog beperkt en de resultaten zijn niet altijd volledig reproduceerbaar.

Op het ogenblik is het verkrijgen van planten, die identiek zijn aan het uitgangsmateriaal, een wezenlijk doel in de praktijk van de vermeerdering op half-industriële schaal. Door de kweek van meristemen of stengeltoppen (Morel en Martin 1952, 1955) wordt nu in de meeste gevallen het ontstaan van homogene klonen gewaarborgd (zie Martin 1980).

Op het fundamentele vlak vereist een beter begrip van de fysiologische processen die samenhangen met de vermeerdering altijd een verdieping van het onderzoek naar het ontstaansmechanisme van vegetatiepunten en van de embryogenese. De uitbreiding van de vegetatieve vermeerdering, die aan de weefselkweek ten grondslag ligt, is van praktisch belang. Dit wordt steeds duidelijker ervaren op de beide terreinen die er rechtstreeks gebruik van maken, n.l. de teelt (tuinbouw, boomteelt, enz.) en de plantenveredeling.
De vegetatieve vermeerdering in vitro wordt in de meeste gevallen nog lang niet volledig beheerst. Dit zal pas gebeuren wanneer meer kennis over de fundamentele mechanismen van differentiatie en dedifferentiatie van de cel verworven is. Momenteel is dit afhankelijk van de voortgang van de weefselkweektechnieken enerzijds en van een grondige uitbreiding van de kennis over het plantmateriaal en de eigenschappen der verschillende weefsels en organen.

Welke de gebruikte methoden ook moge zijn, de vegetatieve vermeerdering heeft met talrijke aspecten van de fysiologie van groei en ontwikkeling te maken. Voorbeelden hiervan zijn de problemen van tijdelijke groeistilstand van het meristeem, van rust, van de remming door apicale dominantie, van bloei-inductie en eventuele terugkeer naar de vegetatieve fase. Gebruik voor de vegetatieve vermeerdering van bloemen of weefsels van bloeiwijzen of bloemen (die soms een bijzonder vermogen tot orgaanvorming bezitten) brengt het probleem van de 'pre-inductie' van de bloem op weefselniveau en van verschillende manieren van terugkeer naar de vegetatieve toestand met zich mee. Behalve met het samenstellen van specifieke voedingsmedia heeft de

weefselkweek met talrijke andere problemen te maken, zoals de ontwikkelingsfase van de moederplant en de behandelingen, die deze eventueel ondergaan heeft. Evenals de praktijk van de vegetatieve vermeerdering al op grote schaal kan profiteren van de vooruitgang van onze kennis over de cellulaire differentiatie, kunnen de oorspronkelijke waarnemingen, als gevolg van het beoefenen van weefselkweek, richting geven aan het fundamentele onderzoek en dit vergemakkelijken.

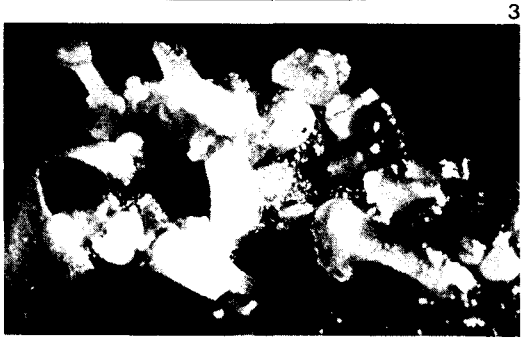
Het voor u liggende boek heeft als doel de verschillende aspecten van de orgaanvorming, die als basis van de vegetatieve ontwikkeling beschouwd worden, te onthullen. In werkelijkheid is er geen spontane of kunstmatige vermeerdering zonder vorming en ontwikkeling van scheuten, wortels of embryo's. We hebben gemeend dat het aanbieden van deze grondslagen op beknopte en geordende wijze nuttig zou kunnen zijn voor studenten en eveneens voor praktijkmensen. Zij kunnen nu op een bondige manier de fundamentele gegevens terugvinden, die dikwijls erg verspreid staan in de literatuur.
Dit werk is noch een uitvoerige verhandeling, noch een verzameling van technieken. Na het behandelen van algemene wetenswaardigheden over de relatie tussen meristemen en vegetatieve vermeerdering wordt op de eerste plaats ingegaan op de structuur en de werking van meristemen, en daarna op de orgaanvorming als grondslag van de vegetatieve vermeerdering: nieuwvorming van wortels, scheuten en somatische embryo's. Vervolgens is een bijzondere plaats ingeruimd voor de bestudering van het meristeem in de in vitro cultuur, bekeken vanuit verschillende gezichtspunten.
De lezer zal in aanhangsel I een beknopte verwijzing vinden naar diverse weefselkweektechnieken, in het bijzonder met betrekking tot voedingsmedia, en voorts een verklarende woordenlijst van de gebruikte technische termen aantreffen.

Uit zorg voor helderheid en homogeniteit dient opgemerkt te worden, dat wij erop gelet hebben binnen de grenzen van het aldus gedefiniëerde onderwerp te blijven door behandeling van talrijke verwante problemen te vermijden. In principe hebben wij ons niet gericht tot de gespecialiseerde onderzoeker, die zeker leemten zal ontdekken. Wij hebben slechts voorbeelden gekozen. Hierbij is ter illustratie voor het grootste deel van onze eigen foto's gebruik gemaakt. Dit heeft ons in staat gesteld persoonlijke en vaak ongepubliceerde waarnemingen te laten zien en zo aan het werk een oorspronkelijk karakter te geven.

1

2

3



Plaat 1

VERSNELDE IN VITRO VERMEERDERING

1. Blad van Saintpaulia ionantha (cv Diana).
   De nieuwgevormde scheuten komen uit een bladstukje. De morfologie van de bladen is normaal (Foto J. Margara).

2. Scheuttop van aardbei (cv Gorella).
   De axillaire scheuten vorm zelf opnieuw weer axillairen. De bladschijven zijn gereduceerd en dikwijls abnormaal. De intensieve vermeerdering, die veroorzaakt is door het cytokinine in het voedingsmedium, domineert over de harmonieuze groei. Deze kan in principe hersteld worden op een voedingsmedium zonder cytokininen (foto J.F. Muller).

3. Bloemblad van Begonia x elatior (cv Schwabenland Rood).
   Bolvormige structuren groeien of delen zich in een vroegtijdig stadium. Sommige produceren geïsoleerde bladen (en soms normale scheuten). Deze vermeerdering treedt zeer vroegtijdig op, gaat vooraf aan de vorming van scheuten en wordt bevorderd door het toevoegen van 2,4-D aan het voedingsmedium (Foto J. Margara).

Deze drie extreme gevallen van intensieve vermeerdering tonen een gradatie in de verstoring van de normale ontwikkeling.

INLEIDING

A. MERISTEMEN EN MERISTEMATISCHE TOESTAND

1. Differentiatie en dedifferentiatie

1.1 Differentiatie*

De cellen van een organisme komen alle voort uit één enkele bevruchte eicel of zygote. Tijdens de ontogenese* ontstaan de verschillende weefsels door de differentiatie van de cellen, ten gevolge waarvan een verscheidenheid op diverse niveau's ontstaat op cytologisch niveau (structuren en infrastructuren van de cel), op biochemisch niveau en op fysiologisch niveau (de levensverrichtingen). Cytologisch onderzoek is veelal voldoende om een gradatie te laten zien in de cellulaire differentiatie: van meristeemcellen tot dode en verhoute cellen van het vaatweefsel.

We zullen in het kort de bekende cytologische eigenschappen van meristematische cellen in herinnering brengen: een grote kern met een vaak omvangrijke nucleolus, een grote verhouding tussen de kern en het cytoplasma, een gereduceerde vacuole, talrijke mitochondriën en afwezigheid van gedifferentiëerde plastiden.

Uitgaande van deze meristematische cellen gaat de differentiatie in het algemeen gepaard met een vergroting van het celvolume, een verlaging van de verhouding tussen de kern en het cytoplasma, een aanzienlijke vergroting van de vacuole en een verandering (of differentiatie) van de celbestanddelen: differentiatie van de proplastiden tot plastiden (chloroplasten, amyloplasten) en ontwikkeling van de wand. Deze structurele differentiatie vormt een fysiologische aanpassing aan bepaalde functies: transport, fotosynthese en opslag van reservestoffen.

De meristematische gebieden kunnen zelf ook een zekere gradatie vertonen in de mate van differentiatie. De cellen van het cambium zijn b.v. minder typisch 'meristematisch' dan de cellen van de eindmeristemen (tamelijk kleine kern, die min of meer aan de zijkant ligt). Zelfs binnen een apicaal stengelmeristeem bestaat er een zonering (Lance 1957). De cellen van de verschillende gebieden vertonen duidelijke cytologische verschillen: de cellen van het mergmeristeem b.v. lijken op cambiumcellen, waarvan de kenmerken minder uitgesproken meristematisch zijn dan van die uit de apicale axiale zone. De meeste auteurs nemen ook in wortelmeristemen de aanwezigheid

van een 'rustend centrum' waar. Dit bestaat uit cellen met zwakke of afwezige mitotische activiteit. De differentiatie van de cel vertoont dus een doorlopende gradatie, waardoor de opvattingen over het begrip 'differentiatie' uiterst genuanceerd dienen te zijn. De cytologische differentiatie hoeft niet noodzakelijk verband te houden met de biochemische en fysiologische differentiatie.

Fig. 1.

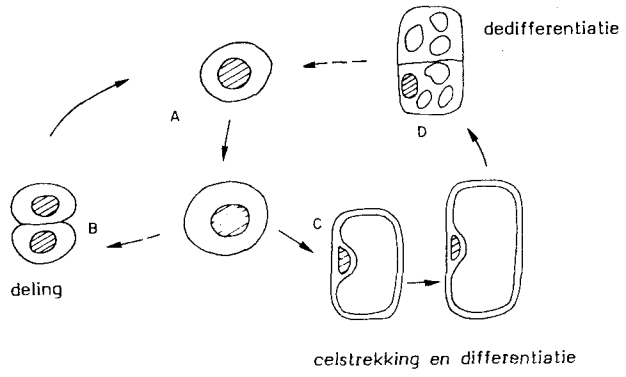


Fig. 1. Schematische voorstelling van de verschillende mogelijkheden in de cellulaire ontwikkeling.

A. Primair meristematische fase.

B. Vermeerdering en instandhouding van de meristematische fase. De meristematische cellen blijven zich delen. Deze ontwikkeling kan in vivo binnen de meristemen waargenomen worden of in vitro in een callus of een suspensiecultuur.

C. Differentiatie. De cellen delen zich niet meer. Zij strekken en differentiëren zich.

D. Hervatting van de mitosen en dedifferentiatie. Dit kan vooral tijdens de in vitro cultuur waargenomen worden, maar ook in situ bij de vorming van adventieve wortel- of stengelmeristemen. De dedifferentiatie verloopt via opeenvolgende stadia. Het laatste stadium is de terugkeer tot de primair meristematische toestand.

1.2 De Dedifferentiatie

Omgekeerd kunnen reeds gedifferentiëerde weefsels zich dedifferentiëren, d.w.z. de cytologische eigenschappen en de mogelijkheden van embryonale cellen terugkrijgen. Alhoewel de verschijnselen van dedifferentiatie ook bij dieren waargenomen kunnen worden, is het veelvuldig voorkomen en het belang ervan bij planten de basis voor de vegetatieve vermeerdering. Hierbij is de mogelijkheid tot vorming van nieuwe meristemen vaak een voorwaarde. Het is duidelijk, dat dedifferentiatie slechts plaats kan vinden in cellen die niet al te ver gespecialiseerd zijn.

Dedifferentiatie kunnen we onder natuurlijke omstandigheden waarnemen tijdens de vorming van adventieve scheuten en wortels. De vorming van een wortelprimordium uit pericykel-cellen, of van een scheutprimordium uit een bladstukje kan alleen via dedifferentiatie en door de hervatting van mitotische activiteit. Evenals differentiatie verloopt dedifferentiatie stapsgewijs. Voor de weefselkweek zijn deze stadia beschreven door Buvat (1945). Het in cultuur brengen leidt eerst tot de vorming van een callus, een nieuwgevormd weefsel dat aanvankelijk betrekkelijk homogeen is en uit cellen bestaat die zich min of meer actief delen. Er bestaan overigens diverse typen callus waarvan de structuren beschreven zijn door Gautheret (1959). Binnen een betrekkelijk homogeen callus kan secundair een zekere heterogeniteit ontstaan. Bepaalde cellen differentiëren zich b.v. tot tracheïden. Maar plaatselijk kunnen celgroepen ook een nog verder doorgevoerde dedifferentiatie ondergaan, die tot de vorming van cellen van het cambiale type leidt. Een later stadium (de secundaire dedifferentiatie volgens Buvat) kan uitmonden in de vorming van celgroepen met meristematische eigenschappen (kleine cellen met een grote kern, die zich actief delen), die zich verder zullen ontwikkelen tot primaire wortel- en stengelmeristemen. Een ver doorgevoerde dedifferentiatie is altijd een voorloper van orgaanvorming die zelf aan het begin staat van elke vegetatieve vermeerdering, of deze nu voortkomt uit de onafhankelijke vorming van scheuten en wortels of uit de vorming van embryoïden met een bipolaire structuur (tabel I).

Fig. 1 geeft een schema van de verschillende wegen van de cellulaire ontwikkeling: celstrekking (A) en differentiatie (C), actieve deling en handhaving van de meristematische toestand (B) en cytologische dedifferentiatie (D).

TABEL 1

De stadia van dedifferentiatie

1. Callusvorming*
   In het callus*, een wellicht 'neoplastisch' wondweefsel, vindt tegelijkertijd plaats:
   a. hervatting van celdelingen (mitosen);
   b. het begin van dedifferentiatie; dit leidt tot de vorming van een betrekkelijk homogeen en ongeorganiseerd weefsel.
2. Eerste fase van dedifferentiatie (volgens Buvat 1945).
   Hierdoor ontstaat een cytologische structuur, die vergelijkbaar is met die van cambiumcellen* (of cellen van secundaire meristemen).
3. Tweede fase van dedifferentiatie.
   Hierdoor ontstaat de cytologische structuur van cellen van de primaire meristemen en de vorming van 'promeristemen'.

2. Classificatie van de meristemen

De volwassen plant beschikt over een verscheidenheid aan meristemen: primaire meristemen*, cambia*, intercalaire meristemen en bladmeristemen (tabel II). Deze dragen alle bij aan het opbouwen van de architectuur van de plant. Ze hebben echter niet allemaal dezelfde betekenis uit het oogpunt van de ontogenese. Sommige zijn histogeen*, andere organogeen*. Wortelmeristemen hebben een veel eenvoudiger structuur dan stengelmeristemen.

Fig. 2.

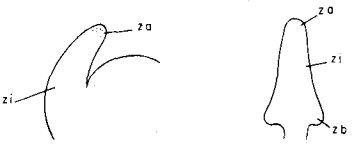


Fig. 2. Schematische voorstelling van de meristematische gebieden van het blad. Voorbeeld: de suikerbiet.

- Links. Jong bladprimordium dat zijdelings wordt gevormd in de sub-apicale zone (primaire meristeemring) van een stengelmeristeem.
- Rechts. Jong blad. za: meristematische apicale zone; zi: zone van intermediaire groei; zb: basale zone.

Bij de suikerbiet blijft het proximale of basale gebied lang actief, hetgeen resulteert in de vorming van lobben aan de voet van de bladschijf van grote bladen bij de volgroeide plant.

TABEL II

De verschillende soorten meristemen

---

1. Primaire (of apicale) meristemen. Zij bepalen de plaats van de assen.
   a. Wortelmeristemen: -terminaal (of apicaal*)
      -lateraal
      -adventief* (kunnen gevormd worden door een ander orgaan dan de wortel: stengel, bladeren
   b. Stengelmeristemen: -terminaal
      -axillair (in de oksel van een blad of een bractee)
      -adventief* (kunnen gevormd worden op een stengelinternodium, een blad, een wortel, enz.)

   N.B. De wortel- of stengelmeristemen, die in vitro op een callus gevormd worden, kunnen beschouwd worden als een bijzonder geval van adventieve meristemen. In dit boek worden ze 'nieuwgevormde meristemen' genoemd.

2. Secundaire meristemen of cambia. Zij zijn bij dicotylen verantwoordelijk voor het optreden van de diktegroei van stengels en bepaalde wortelknollen (b.v. suikerbiet).

3. Intercalaire meristemen. Dit zijn meristematische zones, die, liggend tussen twee gedifferentiëerde weefsels, de lengtegroei verzorgen.
   Voorbeelden:
   a. meristemen aan de basis van de internodiën bij gramineeën
   b. intercalaire meristemen in de bloemstengel van waterlelies
   c. meristemen in de gynofoor van de aardnoot, waarvan de verlenging het binnendringen van de vrucht in de grond mogelijk maakt.

Bladmeristemen (fig. 2) zijn de verschillende meristematische gebieden welke door hun gelijktijdige of achtereenvolgende activiteit het blad zijn bijzondere vorm geven. De veelvuldigheid aan bladvormen wordt veroorzaakt door verschillen in de relatieve activiteit van deze meristematische zones. Hun werking is beperkt in de tijd en houdt volledig op wanneer het blad eenmaal zijn definitieve vorm en afmeting heeft bereikt.

Intercalaire meristemen kunnen zowel voorkomen ter hoogte van de stengelinternodiën (bij talrijke monocotylen), als in de bloemstengel of in het blad. Zij liggen tussen twee gebieden van gedifferentiëerde weefsels en maken een meer of mindere lengtegroei mogelijk. Evenals bij de bladmeristemen is hun werking van tijdelijke aard. Als voorbeeld kunnen genoemd worden de intercalaire meristemen in de stengels van gramineeën, in de bloeistengel van de waterlelie en in de gynofoor van de aardnoot die het binnendringen van de vrucht in de grond mogelijk maakt. Bij de meeste pteridophyten en monocotylen en soms bij dicotylen (waterleliefamilie, enz) behoudt de stengel de primaire structuur gedurende het gehele leven van de plant. Het cambium*, dat bast en hout afzet, en het fellogeen, dat kruk en felloderm afzet, zorgen voor de diktegroei. Bij de meeste dicotylen, evenals bij de gymnospermen, is de diktegroei die bij houtige gewassen aanzienlijke vormen kan aannemen, het gevolg van de toevoeging van secundaire weefsels, die door de cambia worden afgezet (fig. 3).

Fig. 3.

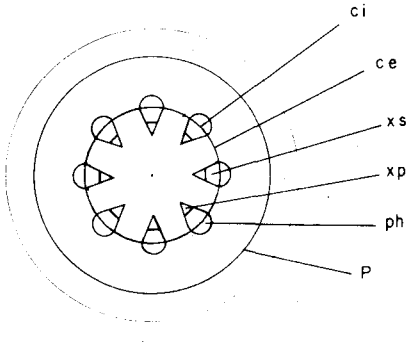


Fig. 3. Schematische voorstelling van de cambia bij een dicotyl. ci: cambium binnen de vaatbundels (fasciculair); ce: cambium buiten de vaatbundels (interfasciculair); xp: primair xyleem; xs: secundair xyleem; ph: floëem (of bast). De primaire bast ligt aan de buitenzijde, de secundaire bast aan de binnenzijde. p: fellogeen (of kurkcambium): dit zet felloderm af aan de binnenzijde en kurk aan de buitenzijde.

Het **cambium*** produceert bast en hout en vormt dikwijls een bijna doorlopende cylinder. Ter hoogte van de vaatbundels wordt het cambium gevormd uit het procambium. Tussen de vaatbundels ontstaat het interfasciculair cambium binnen het parenchym. De afgeplatte cambiumcellen vertonen cytologische eigenschappen, die niet zo typisch meristematisch zijn als die in de apicale axiale zone van de vegetatiepunten. De cambia zijn doorgaans histogene* meristemen, die weefsels afzetten in de loop van de normale ontwikkeling. Door hun ongedifferentiëerde toestand zijn ze dikwijls geschikt voor callusvorming en zelfs voor orgaanvorming, zoals bij het stekken en bij de weefselkweek. Bij witlof bijvoorbeeld worden er meer scheuten gevormd indien de wortelexplantaten cambium bevatten (Rancillac 1973a).
Bij overblijvende planten, in het bijzonder bij de houtige, vertoont de vorming van hout en bast ten gevolge van de activiteit van het cambium een seizoensritme dat overeenkomt met de periode van actieve groei. Dit ritme is gewoonlijk afhankelijk van klimaatsfactoren (daglengte, temperatuur) en van hormoonprikkels.

Het **fellogeen** wordt in het algemeen later gevormd dan het cambium en kan zelfs ontbreken. De oorsprong varieert. Meestal wordt het gevormd ter hoogte van de schors. Soms kan het ook ontstaan uit diepere of juist meer oppervlakkige zones (lagen onder epidermis b.v. bij vlier). Deze afzetting is het uiteindelijke gevolg van de dedifferentiatie (meestal van parenchymcellen), soms van collenchymcellen). Het fellogeen bouwt de peridermis op, een beschermend weefsel bestaande uit het parenchymfelloderm (enkele cellagen) en vooral uit kurk.

De **primaire meristemen** worden verdeeld in wortelmeristemen en stengelmeristemen (of vegetatiepunten). Hun structuur zal later besproken worden. We merken hier echter op, dat bij de meeste soorten zaadplanten het wortelmeristeem een betrekkelijk eenvoudige en homogene structuur bezit. De wortel is in feite een onvertakte as: de zijwortels ontstaan op een bepaalde afstand onafhankelijk van het eindmeristeem. Het stengelmeristeem daarentegen bezit een structuur die afhankelijk van de soort veel ingewikkelder en gevarieerder is. Bovendien evolueert het in de loop van de vegetatieve groei en verandert volledig van structuur in de voortplantingsorganen.
De wortel- of stengelmeristemen ('méristèmes caulinaires') kunnen terminaal (eindstandig) of lateraal (zijdelings) zijn. De laterale stengelmeristemen kunnen axillair zijn (in de oksel van een blad of een bractee) of adventief*, d.w.z. gevormd als gevolg van plaatselijke dedifferentiatie op een

Fig. 4.

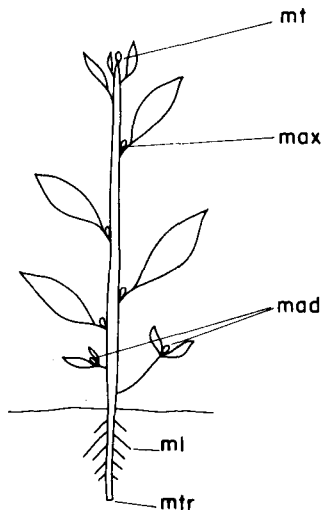


Fig. 4. Ligging van de primaire meristemen. Onder natuurlijke omstandigheden onderscheidt *men op de plant primaire stengel- en* wortelmeristemen. De stengelmeristemen kunnen zijn: terminaal (mt), axillair (max) of adventief (mad), d.w.z. niet staande in de oksel van een blad, maar nieuw gevormd als gevolg van een plaatselijke dedifferentiatie van de cel. De adventieve meristemen kunnen van *verschillende herkomst zijn. In het* bijzonder kunnen zij uit de stengel of uit de wortel voortkomen.
De wortelmeristemen kunnen terminaal zijn (mtr) of lateraal (ml).

ongewone plaats: stengelinternodium, wortel, blad, enz. (fig. 4). Bij de toepassing van vegetatieve vermeerdering* is het noodzakelijk om voortdurend onderscheid te maken tussen de verschillende soorten stengelmeristemen (axillair, adventief, nieuw gevormd op een callus), omdat ze verschillende fysiologische eigenschappen kunnen bezitten. Alleen de axillaire meristemen of de spontaan gevormde adventieve meristemen zijn 'natuurlijke vormingen'. De adventieve meristemen echter, die men vaak in bundels kan laten ontstaan door de toevoeging van cytokininen in hoge concentratie, vooral ook de meristemen, die uit een callus gevormd worden door de werking van een sterk auxine (2,4-D) of door hoge concentraties auxine, moeten beschouwd worden als abnormale of experimentele structuren, die soms planten kunnen opleveren welke afwijken van het oorspronkelijke type (varianten*).

B. MERISTEMEN EN VEGETATIEVE VERMEERDERING

1. Vegetatieve vermeerdering en geslachtelijke voortplanting

De vervanging van individuen die door afsterven wegvallen, hetgeen inherent is aan het leven, vindt plaats op twee manieren: de geslachtelijke voortplanting en de vegetatieve vermeerdering. Op talrijke punten hebben zij tegenovergestelde kenmerken. Er is geen geslachtelijke voortplanting zonder meiose (resulterend in de vorming van gameten met n chromosomen), terwijl bij vegetatieve vermeerdering uitsluitend mitose plaats vindt.

Vegetatieve vermeerdering wordt gekenmerkt door het voortbrengen van individuen die genetisch identiek aan de moederplant zijn. Dit leidt tot het ontstaan van homogene klonen. Wanneer de vermeerdering niet onmiddellijk gevolgd wordt door het afstoten van de nakomelingen, kan dit leiden tot vorming van kolonies. De definitie van het begrip 'individu' wordt dan wel zeer lastig. Lemna ('kroos') bijvoorbeeld, splitst zich in meerdere stukken die zichzelf weer vermenigvuldigen. Afhankelijk van de milieu-omstandigheden vindt deze afsplitsing meer of minder snel plaats, waardoor de kolonies, al dan niet talrijk, tezamen in korte tijd de totale oppervlakte van een stuk water kunnen bedekken. Evenzo kan bij de adelaarsvaren de populatie rhizomen die afkomstig is van één enkel oorspronkelijk individu een grote oppervlakte grond in beslag nemen en een groot aantal planten laten ontstaan die op zichzelf lijken te staan, ook al zijn zij nog verbonden met de oorspronkelijke plant. Waar begint en waar eindigt het begrip individu? Men kan dus zeggen dat de vegetatieve vermeerdering 'slechts een bijzonder geval is van groei met afsplitsing'.

Geslachtelijke voortplanting is gekenmerkt door bevruchting. Het is een echte 're-productie', het voortbrengen van een zygote met 2n chromosomen door de versmelting van 2 gameten. Dit resulteert in de vorming van waarlijk nieuwe individuen, aangezien hun genotypische samenstelling afwijkt van die van de ouders (behalve in de gevallen waarin deze behoren tot een 'zuivere lijn'). Geslachtelijke voortplanting biedt de mogelijkheid tot nieuwe combinaties van genen. Het is dus een bron van variabiliteit, die de aanpassing en de overleving van de soort vergemakkelijk, wanneer de milieu-omstandigheden veranderen. Op de lange termijn is dit zeker de meest doeltreffende wijze van vermeerdering om overleving en tenslotte evolutie van de soort te waarborgen. Het blijft voor de veredelaar een wezenlijk hulpmiddel.

In tegenstelling tot geslachtelijke voortplanting verzekert vegetatieve vermeerdering de stabiliteit, omdat immers alle individuen van een kloon identiek zijn, aangenomen dat er geen mutaties of 'variatie'* optreden. De soorten die over het vermogen tot vegetatieve vermeerdering beschikken, kunnen hierdoor op de korte termijn de beschikbare ruimte snel bezetten. Bij bepaalde families, zoals de gramineeën, neemt vegetatieve vermeerdering een zeer belangrijke ecologische plaats in, en biedt de mogelijkheid tot begroeiing van weilanden of steppen. Deze wijze van vermeerdering is zelfs zo doeltreffend dat uiteindelijk (bijvoorbeeld bij bepaalde populaties van Lemna) de geslachtelijke voortplanting gaat ontbreken.

De twee begrippen van geslachtelijke voortplanting en vegetatieve vermeerdering blijken dus heel duidelijk elkaars tegengestelden te zijn. In werkelijkheid echter bestaan er talrijke overgangsgevallen tussen deze twee manieren van vermeerdering. De 'parasexualiteit'* vat deze overgangsgevallen samen: pseudomixie*, parthenogenese* sensu stricto, apomixie* of apogamie*. Men vindt dus een heel gamma van overgangen, die een continu verloop te zien geven tussen echte sexualiteit en vegetatieve vermeerdering.
Bij de cultuurplanten levert de kloon* wegens de homogeniteit een enorm voordeel op ten opzichte van de cultivars die uit zaad verkregen zijn.

De selectie van vegetatief vermeerderde planten is op het eerste gezicht bijzonder gemakkelijk. Elke interessante plant verkregen via zaad of elke bijzondere mutant van een kloon kan vermeerderd worden, waardoor de mogelijkheid ontstaat nieuwe klonen te krijgen die direct homogeen zijn. Het is dus niet verwonderlijk, dat de planten die via ongeslachtelijke weg vermeerderd worden (stekken, marcotteren, enten) een belangrijke plaats innemen onder belangrijke cultuurgewassen (aardappel, tropische voedingsgewassen, enz), tuinbouwgewassen en in het bijzonder sierplanten en vruchtbomen. Het is echter ook duidelijk, dat vegetatieve vermeerdering in de toekomst een wezenlijke bijdrage zal leveren aan de plantenveredeling. Naarmate de selectiemethoden ingewikkelder en meer geperfectioneerd worden heeft de veredelaar steeds meer de behoefte om elk genotype dat hem interesseert te fixeren, en wel in elk willekeurig stadium van de ontwikkelingscyclus van de plant. Bovendien hoopt men dat in een verdere toekomst de plantenveredeling zal kunnen profiteren van methoden uit de celbiologie: mutagenese in celsuspensies, verschillende manipulaties uitgevoerd met protoplasten (cellen ontdaan van hun celwand). Dit zal echter in de meest uitgebreide zin een volledige beheersing vereisen van de regeneratie van planten uit cellen, en

niet alleen bij modelvoorbeelden, zoals tabak.
Ondanks de onmiddellijk voor de hand liggende voordelen kan vegetatieve vermeerdering in de teelt niettemin bepaalde risico's opleveren.

2. Bezwaren en beperkingen van vegetatieve vermeerdering

Onder natuurlijke omstandigheden heeft een kloon niet zo'n groot aanpassingsvermogen als genetisch heterogene populaties. Aan de andere kant kunnen spontane mutaties, alhoewel zeer zeldzaam voorkomend, de homogeniteit verloren doen gaan. Bij cultuurplanten wordt door de vermeerdering via klonering de ophoping van virussen bevorderd. De meeste verschijnselen van 'degeneratie' (bekend bij aardappel, aardbei, framboos en talrijke planten die via klonen vermeerderd worden) zijn toe te schrijven aan latente virussen of aan *mycoplasma's*.

We merken op dat men om dit bezwaar van de vegetatieve vermeerdering te ontlopen vaak z'n toevlucht neemt tot de 'meristeemcultuur' (zonodig gecombineerd met een warmtebehandeling), d.w.z. tot een andere methode van vegetatieve vermeerdering (micro-stekken in vitro).

Het belangrijke bezwaar van de vegetatieve vermeerdering via weefselkweek is het mogelijke optreden van duidelijk verschillende individuen. Deze worden in het algemeen aangeduid met de naam 'varianten'* uit onbekendheid met de juiste oorzaak van deze variatie*. De 'varianten' kunnen ontstaan door veranderingen in het aantal chromosomen (polyploïdie en aneuploïdie), door afwijkingen van verschillende chromosomen en misschien door eventuele veranderingen in de organellen (mitochondriën) of in het cytoplasma. De variatie hoeft niet erfelijk te zijn; indien wel dan kan deze overgedragen worden volgens een niet mendelende erfelijkheid. De stabiliteit in de weefselkweek is afhankelijk van de soort en uiterst variabel bij verschillende planten.

De varianten kan men nogal eens waarnemen bij de regeneratie van scheuten uit een callus: hun vorming schijnt bevorderd te worden door het gebruik van groeistoffen met name door de 'combinatie cocosmelk - 2,4-D'. Hoewel minder vaak waargenomen, kunnen ze ook aanwezig zijn bij het kweken van meristemen of scheuten.

Het verkrijgen van 'identieke copieën' blijft een hoofdprobleem van de vegetatieve vermeerdering in vitro (vandaar het voordeel van axillaire scheutvorming boven nieuwvorming). Niettemin kan het in de toekomst mogelijk

zijn, dat de genetici deze, thans voor de praktijk hinderlijke variatie kunnen uitbuiten.

We merken tenslotte op, dat klakkeloze toepassing van vegetatieve vermeerdering nog andere risico's met zich meebrengt: b.v. indien men slechts één kloon van een bepaalde bosbouwkundig belangrijke boom vermeerdert, is het risio groot dat op zekere dag een mutant van een parasiet verschijnt die aan deze kloon is aangepast en daardoor zeer gevaarlijk is.

3. Fundamentele rol van meristemen in de vegetatieve vermeerdering

Er bestaat een wezenlijk verschil tussen de ontwikkeling van planten en die van hogere dieren. Bij de laatste is de embryogenese begrensd en de orgaanvorming beperkt in de tijd, terwijl de groei ophoudt voordat het volwassen stadium bereikt is. Daarentegen blijft bij hogere planten de orgaanvorming doorgaan en is de groei theoretisch onbeperkt. Voor de voortdurende productie van weefsels en organen verzorgen histogene of organogene groepen van cellen, de meristèmen. Deze wijze van vermeerdering is niet beperkt tot het plantenrijk. Zij komt ook vaak voor bij lagere dieren. We zien dan parthenogenese, wat men mag beschouwen als een degradatie van de sexualiteit (bladluizen, enz.) of, vaker nog, knopvorming (sponsachtigen, holtedieren, wormen).

De vegetatieve vermeerdering dankt echter haar benaming aan het veelvuldig voorkomen van het verschijnsel bij planten. Deze mogelijkheid houdt verband met het bestaan van meristemen en het vermogen om deze nieuw te vormen (fig. 5).

Evenals in de in vitro cultuur is in de traditionele tuinbouwpraktijk de vermeerdering zonder de vorming van meristemen niet mogelijk. Een tuinbouwer, die de techniek van het stekken toepast, kan afhankelijk van het gewas stekken gebruiken met of zonder knoppen. In het eerste geval profiteert hij van de reeds aanwezige knopvorming op de moederplant; de stek moet dan nog altijd nieuwe wortelmeristemen vormen. In het tweede geval eist hij van de stek nieuwvorming van wortelmeristemen en stengelmeristemen.

De volgende bladzijden zullen aantonen, dat het vermogen tot dedifferentiatie en orgaanvorming zeer ongelijk verdeeld is over soorten, organen en weefsels. Vegetatieve vermeerdering mag beschouwd worden als een fundamenteel en algemeen vermogen van planten dat echter vaak onderdrukt is. Het is aan de weefselkweek om het fundamentele vermogen tot orgaanvorming bij

een groot aantal soorten, die dit nooit spontaan vertonen, tot uitdrukking te laten komen.

Fig. 5.

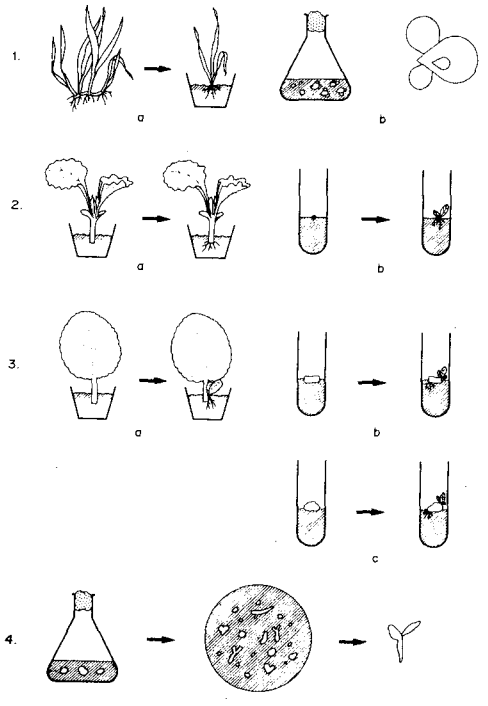


Fig. 5. Verschillende manieren van nieuw-vorming van meristemen tijdens de vegetatieve vermeerdering.
De vegetatieve vermeerdering hangt altijd samen met de vorming van nieuwe meristemen, zij het op verschillende manieren.

1. De vermeerdering van de vegetatiepunten gaat vooraf aan het afscheiden van dochter-individuen.
   a. Voorbeeld van scheuren van een graspol (zodevormende plant).
   b. Voorbeeld van Lemna (kroos) in weefselkweek.
2. Een stek met een bebladerde scheut of stengeltop hoeft slechts nieuwe wortelmeristemen te vormen.
   a. Klassieke stekmethode van een bebladerde scheut.
   b. Microstekken in vitro van een top of een stengelmeristeem.
3. Een orgaan (blad) zonder vegetatiepunten moet tegelijkertijd stengel- en wortelmeristemen vormen.
   a. Voorbeeld van een blad van Saintpaulia dat aan de voet adventieve scheut- en wortelmeristemen vormt.
   b. Voorbeeld van een wortelstukje van witlof in weefselkweek. Het oorspronkelijke explantaat vormt nieuwe scheuten en wortels.
   c. Hier kan het callus, dat overgezet is op een voedingsmedium met een auxine, zich willekeurig verder ontwikkelen; het kan later ook nieuwe meristemen vormen.
4. Een bijzonder geval van somatische embryogenese in vitro. Uit celaggregaten ontwikkelen zich somatische embryo's die gekenmerkt worden door hun bipolaire structuur: een stengelmeristeem en een wortelmeristeem ontwikkelen zich gelijktijdig tegenover elkaar.

4. Lessen over spontane vegetatieve vermeerdering

Spontane vegetatieve vermeerdering kan men in de natuur bij een groot aantal soorten waarnemen, en de natuurlijke selectie heeft geleid tot een grote verscheidenheid aan fysiologische mechanismen en anatomische structuren, die aan deze wijze van vermeerdering aangepast zijn. Morfologisch en experimenteel werkzame onderzoekers kunnen beiden profiteren van de ervaring

die de natuur opgedaan heeft, en van de lessen die ons door deze aanpassingsmechanismen gegeven worden.

Planten, die zich spontaan vegetatief vermeerderen, moeten een bepaald aantal problemen overwinnen. Het eerste is de vorming van een voldoende aantal scheuten, hetzij na, hetzij voor het afsplitsen van de dochtereenheden. De scheuten of afgescheiden plantedelen moeten in staat zijn om te bewortelen. Beworteling kan zowel voorafgaan aan of volgen op de afstoting. Het overleven na de afstoting kan bevorderd worden door aangepaste mechanismen met betrekking tot koude- of droogteresistentie en door een opeenhoping van reserves in gespecialiseerde organen.

De organen die voor de vermeerdering zorgen kunnen scheuten of normale takken zijn die geen enkele anatomische verandering hebben ondergaan. In talrijke gevallen echter gaat het om veranderde en aangepaste organen: bollen* en bulbillen*, stolonen*, wortelscheuten, knollen*, winterknoppen*, propagulae*, enz.

De studie van de vegetatieve vermeerdering heeft rechtstreeks betrekking op de verschillende aspecten van de morfogenese. Het uitlopen van okselknoppen houdt het opheffen van de apicale dominantie in, d.w.z. de groeiremming van de okselknoppen die door de eindknop wordt uitgeoefend. De groeiwijze van de tak, plagiotroop (horizontaal), orthotroop (rechtop), de knolvorming, de rust van de knoppen, de bloei-inductie en de mogelijkheden tot terugkeer naar het vegetatieve stadium zijn fysiologische aspecten van de groei en ontwikkeling die een rol spelen in de vermeerdering.

Voorafgaande aan vegetatieve vermeerdering vindt altijd knopvorming plaats, d.w.z. de vorming van vegetatiepunten.

4.1. Vermeerdering en knopvorming.

a. De verschillende soorten knoppen

Knoppen die door het organisme onder natuurlijke omstandigheden gevormd worden, kunnen worden verdeeld in meerdere soorten: eindknoppen, axillaire knoppen en adventieve knoppen.

De beginknop van het embryo is een knop die de hoofdknop van de plant zal worden. In de oksel van de bladeren, die zijdelings worden gevormd door het eindmeristeem, komen cellen voor die meristematisch gebleven zijn of geschikt zijn tot dedifferentiatie; uit deze cellen ontstaan al dan niet de stengelmeristemen.

Okselknoppen worden in het algemeen gevormd door twee of drie aan de oppervlakte gelegen cellagen van de stengel. De okselknop, die nu secundair een eindknop van een vertakking geworden is, zal op haar beurt okselknoppen van een nog hogere orde kunnen voortbrengen.

Adventieve* knoppen worden gevormd op ongewone plaatsen: stengelinternodium, knol, wortel, blad, bloeiwijze. Ze ontstaan uit cellen die hun embryonaal karakter bewaard hebben of vaker nog uit niet-gespecialiseerde cellen, die tot dedifferentiatie in staat zijn.

b. Plaats van de scheutvorming en aanpassingsvermogen

Spontane vegetatieve vermeerdering vindt meestal plaats door knoppen die al bestonden voor de afscheiding. De tuinbouwer doet dit ook in de praktijk bij het marcotteren en het stekken van bebladerde plantedelen. De vermeerdering wordt dan meestal gewaarborgd door eindknoppen of axillaire stengelknoppen en eventueel door adventieve scheuten, die aan de voet van de stengel of aan een ondergronds deel gevormd worden.

Okselknoppen. Het vermogen tot het vormen van okselknoppen is zonder meer een gunstige eigenschap voor de vermeerdering. Een belangrijke factor is dus de intensiteit van de apicale dominantie, d.w.z. de groeiremming die uitgeoefend wordt door de eindknop op de axillaire knoppen. Wanneer deze dominantie bijna absoluut is, zoals bij vlas (onvertakte stengels, hierdoor is deze plant geschikt als vezelgewas), is de kans gering, dat de plant zich op een spontane manier kan vermeerderen. De zeer zwakke dominantie bij gramineeën, die talrijke gemakkelijk bewortelbare uitlopers* maken, bevordert daarentegen in hoge mate het koloniseren van een gebied.

De knoppen, die voor de voortplanting zorgen, moeten zich kunnen onttrekken aan de dominantie. Deze situatie kan op zeer verschillende manieren gerealiseerd worden. De knoppen van de stengelvoeten ontlopen de dominantie als gevolg van hun afstand tot de top. De bloei-inductie gaat dikwijls gepaard met een min of meer volledige opheffing van de apicale dominantie, hetgeen soms de ontwikkeling van vegetatieve knoppen op de bloemstengels met zich mee kan brengen. Knoppen kunnen eveneens ontkomen aan deze gecorreleerde remmende invloed, wanneer zij ontstaan op organen die bezig zijn te verouderen.

Adventieve stengelknoppen. De adventieve knoppen, die geproduceerd worden door de stengelinternodiën, spelen nauwelijks een rol in de vegetatieve vermeerdering. Men ziet ze vooral bij 'heksenbezems' als gevolg van

de aantasting door parasieten (insecten, schimmels) of bij de vorming van 'crown gall' tumoren (veroorzaakt door Agrobacterium tumefaciens).

De vorming van adventieve takken op de stengel kan men echter bij talrijke bomen zien als gevolg van verwondingen of het aansnijden van de stam, waarbij de knoppen zich dan kunnen vormen ter hoogte van het cambium. Deze toevallige nieuwvorming van de stengel openbaart mogelijkheden die gewoonlijk tijdens de normale ontwikkeling verborgen blijven maar bij de weefselkweek volop gebruikt kunnen worden.

Epiphylle knoppen*. Spontane epiphylle knopvorming kan men bij bepaalde soorten onder bijzondere omstandigheden waarnemen. Zo vormt de veldkers in vochtige gebieden knoppen die vaak ter hoogte van de vertakking van de nerven liggen. Bij andere soorten heeft de epiphylle knopvorming een meer toevallig en uitzonderlijk karakter: b.v. de vorming van knoppen bij verschillende Brassica's als gevolg van parasitaire aantastingen of kleine verwondingen. Het kan daarentegen bij bepaalde Bryophyllum- of Kalanchoë-soorten regel worden. Het is dan gelokaliseerd op bepaalde plaatsen ter hoogte van de insnijding van de bladrand. Het voorkomen hangt af van de fotoperiode. Het kan gebeuren dat epiphylle knopvorming gepaard gaat met knolvorming in de vorm van bulbillen of broedbollen, b.v. bij de varen Tectaria bulbifera. Hoewel de spontane epiphylle knopvorming tamelijk zeldzaam is, kan het voorkomen ervan niettemin doen veronderstellen dat bladen een tamelijk groot potentiëel vermogen bezitten.

Adventieve wortelmeristemen. Onder natuurlijke omstandigheden zijn takken, die voortkomen uit de adventieve knoppen ter hooge van de wortel, typisch wortelscheuten, die vaak bij houtige gewassen (sering, hazelaar, Rubus, enz.), maar eveneens bij kruidachtige gewassen aangetroffen worden (b.v. Isatis tinctoria).

Knoppen gevormd door weefsels van de bloeiwijze. Het meest voorkomende geval is de ontwikkeling van broedbollen ('bulbilles d'inflorescences'), met name bij Allium-soorten (A. vineale, e.a.). Bepaalde cactussen hebben vruchten die in staat zijn om knoppen te vormen. De bloemstengel zelf produceert slechts in uitzonderlijke gevallen spontaan adventieve knoppen. Onder experimentele omstandigheden kan deze vermogen tot nieuwvorming vertonen hetgeen gewoonlijk gemaskeerd is. Chouard (1934) heeft dit vermogen tot vorming van bulbillen op bloemstengels, die na de bloei waren geïsoleerd, al gebruikt bij Scilla verna.

In de weefselkweek kan men ruimschoots gebruik maken van het bijzondere vermogen tot differentiatie van weefsels uit bloeiwijzen.

4.2. Afscheiding en beworteling.

Knoppen of takken, die van de moederplant gescheiden gaan worden, moeten aan de voet wortels maken. Planten die zich vegetatief vermeerderen hebben altijd een groot vermogen tot wortelvorming, zij het op verschillende manieren.

a. De beworteling gaat vooraf aan de afscheiding. Bij kruidachtige (kruipend zenegroen) of houtige planten (bramen) kunnen kruipende, nauwelijks veranderde bovengrondse stengels ter hoogte van de knopen wortels vormen en zo spontaan marcotteren. De afscheiding kan later plaatsvinden na afsterven van oude delen.
   In bepaalde gevallen (Lithospermum) kan de beworteling plaatsvinden aan het eind van een omgebogen tak. Het gebeurt zelfs dat de wortels zich vormen voordat de stengel contact gemaakt heeft met de grond.
   Bij de grasachtige planten (graminieeën, Carex, enz.) die 'zodevormend' zijn, vormen de korte bebladerde stengels zoden die aan de buitenzijde aangroeien en zich hoe langer hoe meer over een gebied uitbreiden.
b. De afscheiding gaat vooraf aan de beworteling. Bij talrijke aquatische soorten vormen stengelstukken, die meegenomen worden door de waterstroom, naderhand wortels (Potamogeton, Elodea, enz.). Deze afscheiding (autotomie*), die men minder vaak ziet bij landsoorten (Sedum), levert spontaan stekken en toont hiermee een bijzonder vermogen tot wortelvorming.

4.3. Bijzondere aanpassingen aan vegetatieve vermeerdering.

a. Bij de meeste planten vertonen de bovengrondse stengels een negatieve geotropie. Zij staan rechtop, hun groeiwijze is orthotroop. In bepaalde gevallen wordt de geotropie gewijzigd en kunnen de takken een horizontale groeiwijze aannemen ofwel plagiotropie vertonen.
   Wanneer de eindknop of de knopen tot beworteling in staat zijn, is de plagiotrope groeiwijze zeer geschikt om geleidelijk aan een steeds grotere oppervlakte te begroeien.
   De stolonen, veranderde plagiotrope stengels met lange internodiën en gereduceerde bladeren, vormen een voorbeeld van organen, die aangepast zijn aan vegetatieve vermeerdering. Bij bepaalde aardbeien (Fragaria collina) vindt de beworteling ter hoogte van de eindknop plaats en produ-

ceren de axillairen nieuwe stolonen. Dit is een voorbeeld van 'autopodische' groei. Bij andere soorten met een 'sympodische' ontwikkeling wordt de groei afgewisseld met de beworteling van axillaire knopen. De vermeerdering door stolonen zien we bij talrijke ecologische groepen: planten van grasvelden, of groeiend onder bomen, maar ook rotsplanten (Sempervivum, Saxifraga sarmentosa) en zelfs waterplanten (Vallisneria spiralis).

b. Reserveorganen, bollen*, klisters* en bulbillen* (broedbollen. Knolvorming kan een aanpassing zijn aan vegetatieve vermeerdering in die zin, dat deze dankzij de ophoping van reserves niet alleen scheutvorming en beworteling kan vergemakkelijken, maar vooral de overleving en de groei van de nieuwe plant na de afscheiding kan waarborgen. Knolvorming is evenwel niet altijd en noodzakelijkerwijs verbonden aan vegetatieve vermeerdering.

De vorming staat dikwijls in relatie met de fotoperiodiciteit (inductie van de knolvorming bij aardappel door korte dag. Zie knollen*) en met de thermoperiodiciteit (voorbeeld: tulp). Rhizomen*, al dan niet voorzien van reservestoffen en al of niet langwerpig van vorm, zijn vaak organen die de vegetatieve vermeerdering vergemakkelijken. De reserveorganen die het meest typisch samenhangen met de vermeerdering zijn de 'bulbillen' of broedbollen. Dit zijn kleine bollen, d.w.z. korte stengels, waarvan de bladeren knolvormig verdikt zijn en de buitenste bladen in beschermende schubben veranderd kunnen zijn.

Bulbillen zijn meestal bovengrondse organen. Zij staan soms ingeplant ter hoogte van de wortelhals, zelden ondergronds. De bulbillen worden vaak in de bloeiwijze gevormd, vooral bij lelieachtigen. De knolvorming kan echter verschillende organen betreffen: wortel, hypocotyl, stengel, blad. Een tulpebol bevat alle vegetatieve organen: korte stengel (bolbodem), bladen (rokken) en wortels.

c. Stengelbosjes en organen voor resistentie tegen kou of droogte. Bij bepaalde soorten ontwikkelt zich in de oksel van de bladen niet slechts een enkelvoudige okselknop, maar een bosje korte stengeltjes ('pousses prolifères'). Deze wijze van vermeerdering komt tamelijk zelden voor. Men vermoed echter dat als gevolg van bepaalde behandelingen, zoals toepassing van cytokininen, een knop die enkelvoudig zou blijven, zich kan ontwikkelen tot axillaire bosjes van de tweede of van een hogere orde. Van deze eigenschap wordt in de praktijk van de 'meristeemcultuur' ruim-

schoots gebruik gemaakt. Bij verschillende Chlorophytum-soorten ontwikkelen deze stengelbosjes zich na de bloei ter hoogte van de bloeiwijze. Ze mogen beschouwd worden als een bewijs van terugkeer naar de vegetatieve toestand. Het voorbeeld van Chlorophytum (net als van ananas) had al veel eerder toegepast kunnen worden bij een meer systematisch gebruik van de mogelijkheden van terugkeer naar de vegetatieve toestand bij vermeerdering uit bloemorganen.

d. Spontane polyembryonie*. Er bestaan in de natuur een aantal voorbeelden van ontwikkeling van embryo's uit verschillende cellen afkomstig van de zygote. De polyembryonie resulteert in de vorming van verscheidene embryo's in het zaad. De oorzaak van dit verschijnsel kan variëren (zie pag. 120).
De polyembryonie bij Citrus is een opmerkelijk geval van vegetatieve vermeerdering, omdat het hier gaat om spontane embryogenese* uit diploïde cellen (meestal van de nucellus). Dit reeds lange tijd bekende voorbeeld zou kunnen doen veronderstellen, dat de embryogenese een vermogen van de cel is dat niet uitsluitend voorbehouden is aan de zygote. Omgekeerd suggereert het feit, dat de spontane polyembryonie zelden in de natuur voorkomt eveneens, dat er waarschijnlijk aangepaste mechanismen bestaan om het algemeen tot uitdrukking komen van dit fundamentele vermogen te verhinderen.

4.4. Belang van voorbeelden van spontane vermeerdering voor het in vitro onderzoek.

Samenvattend toont het veelvuldig voorkomen van spontane vegetatieve vermeerdering (welke onderwerp is geweest van een classificatie door Chouard, 1934) de grote verscheidenheid aan van aanpassingsmechanismen bij hogere planten (tabel III).

TABEL III

Herkomst van de vertakkingen bij de spontane vegetatieve vermeerdering

1. Onveranderde stengels
   - Autotomie: afscheiding van scheuten of stengelstukken. De beworteling volgt na de afscheiding. Voorbeelden: terrestrische Sedum-soorten, aquatische Potamogeton-soorten.
   - Fragmentatie van pollen (zodevormende planten). Voorbeelden: gramineeën, cyperaceeën.
   - Natuurlijke marcottage (stengels die bijwortels vormen). De beworteling gaat vooraf aan de afscheiding. Voorbeeld: talrijke Rubus-soorten.

2. Veranderde en aangepaste stengels.
   - Lange stengels: bovengronds: stolonen
     ondergronds: rhizomen
   - Korte stengels: bollen en bulbillen (broedbollen)
     winterknoppen (waterplanten, b.v. Hydrocharis morsus-ranae)

3. Adventieve stengels.
   - voortkomend uit de stengel
   - voortkomend uit de wortel (of de pol): wortelscheuten
   - voortkomend uit het blad (epiphylle knoppen).
     Voorbeeld: Bryophyllum daigremontianum
   - voortkomend uit de vrucht ('sobolen'*)
     Voorbeeld: Crocus soboliferus

4. Adventieve embryo's voortkomend uit de nucellus. Bijzonder voorbeeld van 'polyembryonie' bij bepaalde Citrus-soorten (b.v. C. microcarpa).

Deze verscheidenheid toont duidelijk aan dat niet alle organen van alle planten even geschikt zijn voor dedifferentiatie en orgaanvorming. Het lijkt erop, dat de mogelijkheid tot vegetatieve vermeerdering misschien algemeen is, maar dat het tot uiting komen meestal bijzondere omstandigheden vereist.

Het kan voor de weefselkweekonderzoeker uiterst nuttig zijn om een terugkeer te bewerkstellign naar de beginsituatie, en daarbij te steunen op het waarnemen van voorbeelden uit de natuur. Door te letten op bepaalde spontane verschijnselen zou men al veel eerder op het idee hebben kunnen komen van bepaalde mogelijkheden, die sinds kort bij de weefselkweek worden toegepast. Met name het bijzondere vermogen tot scheutvorming van bepaalde meristemen uit bloeiwijzen (bijvoorbeeld de terugkeer van bepaalde meristemen in jonge bloeiwijzen naar de vegetatieve toestand en de polyembryonie in nucellusweefsel bij Citrus) kunnen het idee geven de somatische embryogenese meer te benutten.

Laten we echter wel bedenken, dat de meest voorkomende methoden in de natuur niet noodzakelijkerwijze de meest interessante voor de onderzoeker zijn. Spontane vermeerdering berust vooral op het reeds bestaan van scheuten aan de moederplant en op aanpassingsmechanismen, waarbij door het opheffen van de apicale dominantie het uitlopen van de okselknoppen mogelijk wordt. Dit vereist altijd een groot vermogen tot beworteling.

Natuurlijke adventieve scheutvorming is zeldzamer, hetgeen niet betekent dat de mogelijkheid niet bestaat. Zij kan bij sommige soorten gemaskeerd zijn door het ontbreken van spontane fragmentatie.

De rol van de onderzoeker is dus om systematisch de mogelijkheden tot orgaanvorming, die niet tot uiting komen in de normale ontwikkeling van de meeste planten, na te speuren.

5. Kunstmatig veroorzaakte vegetatieve vermeerderingswijzen (tabel IV)

5.1. Traditionele vegetatieve vermeerdering

De traditionele methoden in de tuinbouw of de boomteelt zijn: scheuren, marcotteren, stekken en enten. Deze methoden maken vaak gebruik van een speciale aanleg van het gewas tot vermeerdering.

De meest eenvoudige methode, het scheuren, houdt in feite de vorming in van een tamelijk groot aantal axillaire of adventieve scheuten, die al beworteld zijn op de moederplant vóór de afscheiding of het vermogen daartoe bezitten. Zij maakt dus gebruik van een vooraf bestaande aanpassing aan de spontane vegetatieve vermeerdering.

Bij het marcotteren induceert men de wortelvorming voor de afscheiding. We zien dat bepaalde gewassen (zoals framboos) zich wel spontaan laten marcotteren, maar zich slecht laten stekken, hetgeen wijst op de wezenlijke rol van de interrelaties tussen de organen van de moederplant bij de wortelvorming.

TABEL IV

Methoden van de kunstmatige vegetatieve vermeerdering

Traditionele tuinbouwkundige methoden	Bijzonderheden met betrekking tot de meristemen
Scheuren	De vorming van stengelmeristemen (en eventueel wortelmeristemen is spontaan en gaat vooraf aan de afsplitsing van de moederplant.
Marcotteren	De vorming van adventieve wortelmeristemen wordt kunstmatig teweeggebracht. Zij gaat vooraf aan de afsplitsing.
Stekken	De vorming van nieuwe wortelmeristemen komt altijd na de afsplitsing. Dit is in bepaalde gevallen ook zo met stengelmeristemen, zoals bij bladstukjes, stukjes stengelinternodiën en wortelstukjes.
Enten	In dit bijzondere geval is er geen vorming van nieuwe meristemen: de stengelmeristemen (ent) waren al op de ent aanwezig. De wortels worden geleverd door de uit zaad gekweekte onderstam.
Methoden van vermeerdering in de weefselkweek	
Kweek van een top of meristeem	'Micro-stekken'
Enten van een top	'Micro-enten'
Regeneratie van plantjes uit het oorspronkelijk explantaat of nieuw gevormd callus.	Dit maakt de vorming van nieuwe stengel- en wortelmeristemen noodzakelijk; deze twee typen kunnen met elkaar verbonden of onafhankelijk van elkaar zijn.
Somatische embryogenese	De somatische embryogenese is te beschouwen als een bijzonder geval van nieuwvorming van meristemen.

Het stekken omvat daarentegen de afscheiding van de stek voor de beworteling. Omdat de stek een of meer knoppen bezit, is juist de wortelvorming het voornaamste probleem van de orgaanvorming bij deze methode van vermeerderen. Wanneer het gaat om een stengel- of wortelstuk zonder knoppen, moet de stek tegelijkertijd naast wortel- ook nog stengelmeristemen vormen, waarbij de volgorde van het optreden van de twee soorten meristemen afhangt van het gewas. Bij veel gekweekte gewassen bestaat er een verscheidenheid in aanpassingsmechanismen en organen die geschikt zijn voor vegetatieve vermeerdering: wortelscheuten van framboos, uitlopers van aardbei, rhizomen van Iris, knollen van topinambour (aardpeer), bollen en bulbillen (broedbollen), enz.

Het enten is een heel bijzonder geval van vegetatieve vermeerdering, dat we niet zullen behandelen. Het maakt in feite de vermeerdering van de kloon, waartoe de enten behoren, mogelijk. Het vereist een plantaardige ondersteuning (onderstam), die in het algemeen uit zaad verkregen wordt.

5.2. Methoden van de in vitro vermeerdering

Welke de gekozen methode ook is (afhankelijk van het gewas, het toeval en de doelstellingen), het centrale probleem van de vermeerdering blijft de vermenigvuldiging van vegetatiepunten, die scheuten maken en kunnen bewortelen. Drie hoofdmethoden kunnen toegepast of onderscheiden worden.

a. Kweek van meristemen of stengeltoppen. De meristeemcultuur mag beschouwd worden als een micro-stekmethode. Ze is ontwikkeld en voor het eerst gebruikt door Morel en Martin (1952, 1955) bij dahlia en aardappel voor het produceren van gezonde klonen uit planten, die besmet waren met virusziekten.

   Omdat hierbij gebruik gemaakt wordt van reeds bestaande vegetatiepunten, is op het eerste gezicht de beworteling het enige probleem van de orgaanvorming bij meristeemcultuur, afgezien dan van het opnieuw beginnen van de normale groei van het uitgesneden meristeem.

   Uit waarnemingen van Morel (1960) bij orchideeën en uit die van andere auteurs over de mogelijkheid tot scheutvorming uit axillaire knoppen van de aanvankelijk gekweekte top, bleek, dat de meristeemcultuur of kweek

van een stengeltop naast een plantenziektenkundig belang ook vermeerdering op grote schaal mogelijk zou kunnen maken.
Het is ook duidelijk dat bij de meristeemcultuur talrijke aspecten van de fysiologie van groei en ontwikkeling betrokken zijn, zoals knoprust, apicale dominantie, mogelijkheden van terugkeer naar de vegetatieve toestand bij toppen van bloeiwijzen.

b. Regeneratie van planten door vorming van nieuwe knoppen en wortels op een callus

De spontane vorming van adventieve knoppen is onder natuurlijke omstandigheden betrekkelijk zeldzaam. Een van de bijdragen van de weefselkweektechniek, waarbij van meet af aan gebruik gemaakt wordt van groeistoffen, was het benutten van de verborgen mogelijkheid bij talrijke gewassen tot vorming van nieuwe knoppen na voortgezette dedifferentiatie van de cel. Dit resultaat komt in wezen voort uit de toepassing van evenwichten tussen cytokininen en auxinen en van geschikte minerale voedingsmedia (type Murashige en Skoog, 1962). Het steunt veelal niet alleen op de doordachte keuze van het orgaan en het weefsel, maar ook op de keuze van het geïsoleerde weefsel: de weefsels van bloeiwijzen vertonen soms een groter vermogen tot regeneratie dan vegetatieve weefsels; oppervlakteweefsels zijn vaak geschikter dan dieper gelegen weefsels, enz.
Het grootste bezwaar van de vorming van plantjes uit callus is het bevorderen van het ontstaan van 'varianten', vooral wanneer ingewikkelde mengsels van groeistoffen gebruikt worden.
Het doel waarom het gaat is de vorming van nieuwe scheuten van een groot aantal gewassen en uit verschillende soorten weefsels teneinde vermeerdering in diverse stadia van de ontwikkelingscyclus te verkrijgen. Ondanks de toenemende mate van succes bestaan bij talrijke gewassen, vooral monocotylen en houtige planten, nog steeds veel problemen bij de regeneratie tot plantjes in vitro.

c. Somatische embryogenese

De vorming van embryo's uit gewone somatische cellen is in de weefselkweek bij peen verkregen door Reinert (1958 en volg.) en Steward et al. (1958 en volg.) en vervolgens bij een aantal gewassen, die tot zeer verschillende families behoren.
De vorming van een embryo mag dus niet meer beschouwd worden als het

uitsluitende voorrecht van de zygote, die uit de bevruchting ontstaan is. De bijzondere omgeving van het kiemwit (albumen) blijkt evenmin noodzakelijk te zijn. De embryo's kunnen zich kennelijk uit gewone, diploïde of zelfs, in het geval van 'androgenese', haploïde cellen ontwikkelen.
Het gebeurt echter dikwijls, dat men uit bepaalde publicaties niet precies kan opmaken of de geregenereerde plantjes nu ontstaan zijn uit echte somatische embryo's (of embryoïden*) ofwel uit de opeenvolgende ontwikkeling van een scheut en wortels. In feite kunnen na een bepaalde tijd de twee typen niet meer van elkaar onderscheiden worden. Het embryoïde volgt dezelfde ontwikkelingsgang als een normaal embryo en doorloopt de stadia beschreven voor de klassieke embryogenese: 'bolvormig stadium', 'hartvormig stadium', 'torpedo stadium', enz. Het is gekenmerkt door een bipolaire structuur met gelijktijdige ontwikkeing van een stengelmeristeem en een wortelmeristeem.

Het feit, dat een embryo niet noodzakelijkerwijze het produkt van bevruchting is, heeft een aanzienlijke biologische en fundamentele draagwijdte. De somatische embryogenese heeft het begrip van 'totipotentie' van de cel onderstreept. Elke cel bezit in zijn genoom de noodzakelijke informatie om een volledige plant te worden. Het blijkt dat dit alleen effectief kan worden als het mechanisme van de differentiatie niet al te ver is voortgeschreden en de cel in een geschikte omgeving geplaatst wordt.

De somatische embryogenese schijnt theoretisch de 'ideale' methode van vegetatieve vermeerdering te zijn. Zij zou vooral in de toekomst het gebruik van eventuele resultaten van manipulaties op celniveau mogelijk moeten maken (zoals mutagenese, fusie van protoplasten).
Helaas is de vorming van 'embryoïden' betrekkelijk zeldzaam, hoewel deze bij verschillende families is waargenomen. Algemene toepassing blijkt nog moeilijk te zijn. Het feit, dat op een bepaald ogenblik alle resultaten uitsluitend bij enkele bevoorrechte families verkregen waren (schermbloemigen, nachtschade-achtigen) toont aan dat deze vorming waarschijnlijk bevorderd wordt door onbekende of onbepaalde erfelijke factoren en eigenschappen van weefsels.

d. Micro-enting' in vitro

Het enten van meristemen of groeipunten onder steriele omstandigheden in de weefselkweek kent twee perspectieven:

1. Kweek van virusvrije planten in die gevallen, waar de cultuur van groeipunten moeilijkheden oplevert, vooral bij bepaalde houtige gewassen.

De methode is met succes toegepast bij Citrus-soorten (Navarro et al. 1975), perzik (Alskieff 1977) en appel (Alskieff en Villemur 1978). in het laatste geval ent men toppen van eindscheuten van 2 à 3 cm lengte van jonge bomen op plantjes van 15 dagen oud, die 1,5 cm boven de cotylen zijn getopt. De opbrengst aan bebladerde scheuten is ongeveer 23%. De geschiktheid van toppen voor enten in vitro varieert trouwens met het jaargetijde, met een optimum in juni, wanneer de activiteit van peroxydase in de top minimaal is (Poessel et al. 1980).

2. Vorming van klonen uit oude planten, welke niet geschikt zijn voor het stekken wegens moeilijkheden met de beworteling.
Het enten van stengeltoppen van oude bomen op juveniele onderstammen is onlangs gebruikt om een fysiologische verjonging te verkrijgen, die de beworteling en het enten vergemakkelijkt. Zo heeft Franclet (1979) klonen van Eucalyptus camaldulensis gemaakt na het enten van oude planten, gevolgd door het stekken van de verjongde enten. Deze methode kan ook op andere gewassen worden toegepast en zal waarschijnlijk in de toekomst op grotere schaal gebruikt worden.
Vegetatieve vermeerdering gaat altijd gepaard met vorming van talrijke meristemen (in stengel of wortel), resulterend in een dedifferentiatie van de cel.
Het vermogen tot vorming van embryo's en organen is een fundamentele eigenschap van de cel; in de praktijk komt dit meestal slechts onder bepaalde omstandigheden tot uitdrukking.
Bij een aantal wilde planten heeft de natuurlijke selectie bijgedragen tot het ontstaan van aanpassingsmechanismen die de vegetatieve vermeerdering bevorderen. In de natuur blijft de spontane orgaanvorming beperkt tot bepaalde gewassen, organen en weefsels.
De traditionele land- en tuinbouwpraktijk heeft ruimschoots gebruik gemaakt van de mogelijkheden tot vegetatieve vermeerdering. Het streven van de onderzoeker is de techniek van de weefselkweek toe te passen bij een zo groot mogelijk aantal gewassen en weefsels.
De vermeerdering in vitro steunt dus tegelijkertijd op onderzoek van de meest fundamentele factoren en eigenschappen van de orgaanvorming, als op

toekomstige studie van veel bijzondere gevallen, die het tot uiting komen van dit vermogen bevorderen.
Feitelijk hangen de problemen van vegetatieve vermeerdering samen met talrijke aspecten van de morfogese.

I

STRUCTUUR EN FUNCTIE VAN PRIMAIRE MERISTEMEN

STRUCTUUR EN FUNCTIE VAN PRIMAIRE MERISTEMEN

De meristemen bepalen de architectuur van de plant. Reeds vanaf de eerste delingen van de zygote ontstaat er een polariteit met vroegtijdige vorming van twee meristemen, die tegenover elkaar staan en waaruit gelijktijdig de hoofdknop en de wortel ontstaan.

A. STRUCTUUR VAN WORTEL- EN STENGELMERISTEMEN

1. Structuur van het wortelmeristeem

Het wortelmeristeem eindigt in een beschermend wortelmutsje (calyptra), dat bestaat uit afschilferende en afstervende cellen. Door histologisch onderzoek in de laatste decennia neemt men algemeen het bestaan aan van een 'rustend centrum', 'centre quiescent' in het wortelmeristeem, dat onmiddellijk onder de cellen van het wortelmutsje gelegen is. De cellen van het 'rustend centrum' zouden een zwakke of zelfs helemaal geen mitotische activiteit vertonen (Clowes 1959). Ze behouden echter het vermogen om zich onder bepaalde omstandigheden te delen (microchirurgische proeven, koudebehandelingen). In bepaalde gevallen is het 'rustend centrum' van jonge wortels nog niet te zien; het zal zich pas later ontwikkelen.
De theorie van de histogenen van Hanstein, 1868 (geciteerd door Clowes 1959) is algemeen verlaten. Deze veronderstelde het bestaan van drie lagen begincellen in het apicale meristeem, de histogenen. Deze weefselvormende lagen, dermatogeen, peribleem en pleroom zouden respectievelijk epidermis, schors en centrale cylinder doen ontstaan. Deze indeling wordt soms nog gebruikt op een beschrijvende manier zonder noodzakelijkerwijs aan de waargenomen cellagen het idee van een vroegtijdige en specifieke bestemming te verbinden.
De structuur van het wortelmeristeem (fig. 6) is duidelijk eenvoudiger dan die van het stengelmeristeem. Het wortelmeristeem is een as, die longitudinale rijen cellen afzet. Het zal normaliter geen zijwaartse expansie vertonen. De zijwortels worden op een bepaalde afstand van het topmeristeem gevormd. Zij hebben in het algemeen een diepere oorsprong (vaak uit de pericykel) in tegenstelling tot de vaak, maar niet altijd meer oppervlakkige herkomst van de axillaire of adventieve stengelmeristemen.

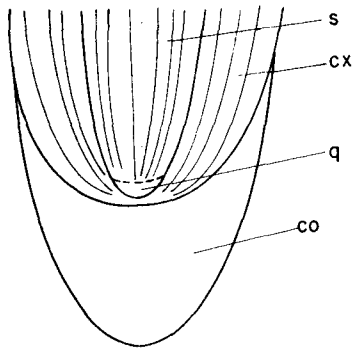


Fig. 6.

Fig. 6. Schema van een wortelmeristeem. co: wortelmutsje (calyptra), q: "rustend centrum", cx: schors, s: stele. Het wortelmutsje dat een beschermende funktie heeft, bestaat gedeeltelijk uit dode cellen. Het "rustend centrum" bestaat uit weinig actieve cellen, die slecht gekleurd worden door de specifieke kleurstoffen van de nucleïnezuren. De longitudinale celrijen van de stele en de schors ontstaan door de actieve delingen van cellen, die onder of tegen het "rustend centrum" aanliggen. De wortel is typisch een onvertakte as. Het wortelmeristeem is een betrekkelijk eenvoudige en weinig gedifferentieerde structuur, afhankelijk van het gewas.

2. Structuur van het stengelmeristeem

De stengel is een ingewikkeld orgaan, waartoe de eigenlijke stengelas en de bladen behoren. Deze laatste zijn uitgroeisels aan de zijkant met zowel een beperkte groei als een dorsiventrale symmetrie. De scheuten hebben daarentegen een onbeperkte groei en een radiale symmetrie.
De stengel wordt vaak beschouwd als een samenvoeging van bladsegmenten zonder eigen individualiteit. Het merg, dat uit de medullaire meristeemzone voortkomt, heeft een typisch stengelkarakter.

Bij de vaatplanten zijn de vor en de structuur van de stengelmeristemen zeer variabel, afhankelijk van het gewas. De belangrijke verschillen zien we echter vooral bij drie hoofdtypen van structuren, die voorkomen bij de vaatcryptogamen, de naakt- en bedektzadigen.

Bij een paardestaart of een varen ziet men een grote terminaal gelegen cel, de topcel, die, zoals bekend, door delingen in verscheidene vlakken de andere cellen van het meristeem voortbrengt.

Bij een naaktzadige is de structuur geheel anders. We zien in het apicale gebied radiale celrijen. Er is dus niet één topcel, maar een groep van zulke cellen (initialen) (zie Clowes, 1961).
We zullen beknopt de structuur van het meristeem van de bedektzadigen beschrijven. De afmetingen van het stengelmeristeem zijn uiterst variabel: van 20 tot 50 µm bij de aardbei en van 1200 tot 1500 µm bij een Mammillaria-soort (Cactaceae). De morfologie van het meristeem en zijn structuur zijn eveneens variabel.
Het meristeem bij de waterlelie is vlak, bij mais is het meer langwerpig van vorm en de axillaire meristemen ontwikkelen zich vroegtijdig. Ondanks deze verscheidenheid onderkennen we echter een aantal overeenkomstige eigenschappen.

2.1. Begrippen 'tunica' en 'corpus'

In navolging van Schmidt (1924) geciteerd door Clowes 1961) maken we vaak onderscheid tussen de tunica, die bestaat uit enkele buitencellagen en het dieper liggende corpus (fig. 7). Het wezenlijke verschil tussen deze twee betreft het delingsvlak.

Fig. 7.

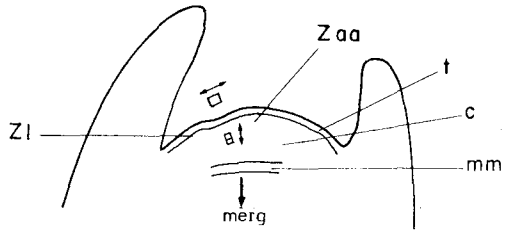


Fig. 7. Schema van een stengelmeristeem bij een bedektzadige. zaa: apicale axiale zone, zl: laterale zone (of "primaire meristeemring"). In deze subterminale en ringvormige zone wordt de afzetting van de bladprimordia voorbereid; mm: meristematische zone van de medulla, waar cellen van het cambiumtype het merg opbouwen; t: tunica, meestal gevormd uit 1 tot 3 cellagen. In de tunica vinden de delingen noodzakelijkerwijze in een anticlinaal vlak plaats, loodrecht op de oppervlakte; c: corpus. In het diepere corpus vinden de delingen in alle richtingen plaats.

In de tunica vinden de anticlinale delingen plaats in een vlak loodrecht op de oppervlakte.
In het corpus geschieden de delingen in alle richtingen.
Het bestaan van een tunica, die duidelijk onderscheiden is van het corpus komt voor bij de bedektzadigen. Het aantal cellagen van de tunica is karakteristiek voor het gewas. Dit varieert met de leeftijd en het ontwikkelingsstadium. Er is veel discussie geweest over de waarde van deze begrippen.

2.2. Zonering van het meristeem

De studie van de structuur van het meristeem heeft aanleiding gegeven tot vele controversen. Foster (1938) onderscheidde diverse zones in het meristeem van Ginkgo biloba; Popham (1951) beschreef bij de vaatplanten zeven klassen meristemen. Naar aanleiding van het werk van Plantefol (1948a), Buvat (1955), Nougarède (1965) en talrijke andere onderzoekers onderscheidt men in het algemeen in het meristeem van bedektzadigen een apicale axiale zone, die meestal een gereduceerde mitotische activiteit en RNA-synthese vertoont, en een laterale zone, de 'primaire-meristeemring' volgens Plantefol, die de bladprimordia vormt. Het mergmeristeem, dat uit cellen bestaat die meer op cambium lijken, produceert het merg (fig. 7).
De aanleg van een bladprimordium in de 'primaire meristeemring' begint in het algemeen met een periclinale deling (langs een vlak evenwijdig aan de oppervlakte) ter hoogte van de tweede of derde cellaag).
Bij dicotylen ondergaan de cellen van de aan de oppervlakte gelegen laag van de tunica anticlinale delingen (langs een vlak, loodrecht op de oppervlakte), waaruit zo de epidermis van de bladprimordia ontstaat. Bij monocotylen ziet men echter periclinale delingen in de oppervlaktelaag van de tunica (Cutter 1971).

Schematiserend wordt de vegetatieve fase gekarakteriseerd door de actieve werking van de primaire meristeemring, die de bladeren produceert, terwijl de apicale zone ('wachtmeristeem') (méristème d'attente) volgens Buvat geactiveerd wordt tijdens de overgang naar de generatieve fase en dan een wezenlijke rol speelt in de vorming van de bloeiwijze.
Bij éénjarigen, die vroeg bloeien, zoals Aquilegia (Tepfer 1953) kunnen de cellen van de terminale zone een vroegtijdige mitotische activiteit vertonen, zonder dat men op enig moment een duidelijke zonering kan onderschei-

den. Bij bepaalde gewassen, zoals Helianthus annuus (Steeves et al. 1969) kan dit zeer duidelijk zijn.

De cellen van de apicale zone kunnen trouwens actief gaan delen in een afgesneden en in vitro gekweekte top (Ball 1960). Wel dient opgemerkt te worden, dat microchirurgische proeven gegevens kunnen opleveren over de mogelijkheden van het meristeem en zijn verschillende zones, maar dat we voorzichtig moeten zijn om er conclusies aan te verbinden met betrekking tot de normale werking.

B. STENGELMERISTEEM EN PHYLLOTAXIE (BLADSTAND)

Het stengelmeristeem bepaalt de architectuur van de bebladerde stengel. Tijdens de generatieve fase zal het de bloeiwijze en de bloemen voortbrengen. De bladeren worden gevormd volgens een regelmatig patroon, dat we phyllotaxie noemen. Deze rangschikking is typisch voor het gewas. Zij kan een adaptieve rol spelen: door bepaalde patronen kan een maximaal bladoppervlak aan het zonlicht blootgesteld worden. De phyllotaxie interesseert ons hier voornamelijk met betrekking tot de werking van het meristeem.

1. Verscheidenheid in bladstanden

Afhankelijk van het gewas is de rangschikking van de bladprimordia uiterst variabel. We onderscheiden talrijke typen in de bladstand. De voornaamste zijn de volgende:

Afwisselende bladstand. De bladprimordia worden afwisselend in hetzelfde vlak onder een hoek van 180° afgezet.

Kruisgewijze bladstand. De tegenover elkaar staande bladeren zijn bij elke knoop in paren gerangschikt, waarbij twee achtereenvolgende paren met elkaar een rechte hoek vormen.

Kransstadige bladstand. Het aantal bladeren per knoop bedraagt meer dan twee.

Verspreide bladstand. De bladeren staan spiraalsgewijs gerangschikt en benaderen de 'genetische spiraal' ('spirale génératrice') van Schimper en Braun (geciteerd door Plantefol 1948b). Zij kunnen genummerd worden in volgorde van verschijning.

2. Beschrijvende systemen met de verspreide bladstand als voorbeeld

De phyllotaxie is het onderwerp geweest van talrijke controversen. Zo zijn veel systemen bedacht om de rangschikking van bladeren op een stengel of van bloemen op een bloeiwijze weer te geven en de werking van het meristeem te verklaren. De meeste waarnemingen hebben betrekking op de verspreide bladstand (fig. 8). Wij zullen hier slechts een zeer beknopte samenvatting geven.

Fig. 8.

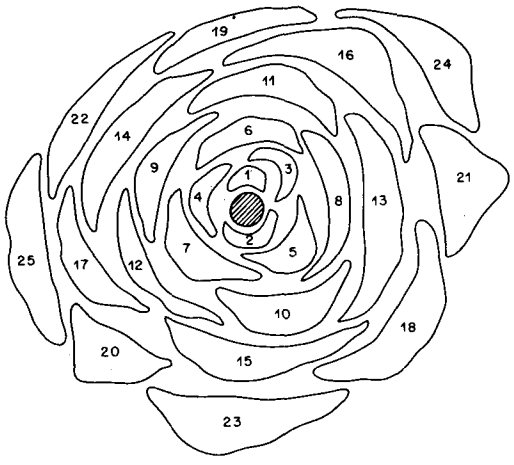


Fig. 8. Voorbeeld van verspreide bladstand. Vegetatief rozet van de suikerbiet (waarnemingen van de auteur).

De bladen worden genummerd in volgorde van verschijnen.
Ieder blad ligt aan tegen twee oudere bladen, die in twee spiralen geplaatst staan, die in omgekeerde richting lopen, b.v. beginnend bij blad 2, bestaat de linker spiraal uit de bladen 2, 5, 8, 11, 14, ... (in een rekenkundige reeks met rede 3) en de rechter spiraal uit de bladen 2, 4, 6, 8, ... (in een rekenkundige reeks met rede 2). We kunnen 2 rechter spiralen onderscheiden (met rede 2) en 3 linker spiralen (met rede 3). Aan de buitenkant van het rozet is het aantal schroeven of parastichen* toegenomen als gevolg van het uiteenwijken van de bladen. Zo staat blad 15 in direct contact met de bladen 18 en 20. We kunnen opnieuw 5 rechter spiralen (met rede 5) en 3 linker spiralen onderscheiden.

2.1 Divergentiehoek

De divergentiehoek is de tweevlakshoek, die bepaald wordt door de as van de stengel en de symmetrievlakken van twee achtereenvolgende bladeren. Deze hoek wordt op de volgende manier bepaald. Uitgaande van het gekozen blad volgt men de genetische spiraal tot men een bovenstaand blad tegenkomt. Het aantal keren dat men de stengel rond gaat is de teller van een breuk (b.v. 2): het aantal bladeren dat men tegenkomt is de noemer (b.v. 5). De divergentie is in dit geval 2/5.

Helaas komt men bij de verspreide bladstand nooit twee bladeren tegen, die exact boven elkaar staan. De genetische spiraal vertoont vaak afwijkingen en is slechts een benaderend begrip. We zien dat metingen, die aan een orgaan (stengel of bloemhoofdje van een bloeiwijze) van variabele geometrische vorm uitgevoerd worden, resultaten geven die zeer afwijken van de metingen aan de top. Alleen deze laatste kunnen inlichtingen geven over de werking van het meristeem zelf. In feite is de phyllotaxie van een stengel of een bloeiwijze het complexe resultaat van talrijke factoren. De aanvankelijk rangschikking in de top verandert kennelijk door de groei van de stengel.
Terwijl de divergentiehoek van een stengel zeer gewasafhankelijk is, is de hoek, die aan de top tussen twee achtereenvolgende bladprimordia gemeten wordt, dikwijls tamelijk constant en fluctueert meestal om de hoek van Fibonacci*.

2.2. 'Parastichen'*

Een willekeurig bladprimordium en de twee meer naar buiten gelegen jonge primordia waarmee het contact heeft, bepalen de twee spiralen die in tegenovergestelde richting gaan: de één rechtsom, de andere linksom. Deze spiralen noemt men de 'parastichen'. Er kunnen er b.v. 3 zijn, die in de éne richting lopen en 5 in de andere. Church (1920) definieerde de bladstand van een soort aan de hand van het aantal rechter en linker parastichen dat men waarnam. Een bladstandensysteem zou aldus aangeduid kunnen worden door twee cijfers, b.v. (2 + 3), (3 + 5), (5 + 8), enz.
We zien dat het aantal parastichen, die we op een plant tegenkomen, in het algemeen twee achtereenvolgende termen zijn uit de 'reeks van Fibonacci'*, waarvan elke term de som is van de twee voorafgaande termen: 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, ... We kunnen echter hiervan afwijkende series tegenkomen.
Hoge aantallen kan men waarnemen op een bloeiwijze met een groot oppervlak

en talrijke primordia, b.v. een bloemhoofdje van de artisjok. Het meest ingewikkelde systeem komt waarschijnlijk voor op het bloemhoofd(je) van de zonnebloem (55 + 89).

3. Hypothesen over de werking van het meristeem

Al geruime tijd vraagt men zich af hoe de afzetting van de bladprimordia aan de top bepaald wordt. De verschillende theorieën, die hierover opgesteld zijn, steunen op vergelijkende waarnemingen aan bladstanden en soms op onderzoek en microchirurgie.

a. De hypothese van de beschikbare plaats (Hofmeister 1868; Van Iterson 1907; geciteerd door Sinnott 1960) is één van de oudste. Het initium (toekomstig primordium) zou afgezet worden in de eerst beschikbare ruimte, die opengelaten is door de voorafgaande primordia. Helaas geeft deze oude hypothese geen enkele fysiologische verklaring.

b. De hypothese van de wederkerige remming. Deze is afgeleid van de oude theorie van Schoute (1913). De zich ontwikkelende primordia zouden een 'remmingsveld' scheppen, hetzij rechtstreeks door de werking van remstoffen, hetzij indirekt als gevolg van een competitie om voedingsstoffen of hormonen. Het laatst gevormde primordium zou een maximale remming uitoefenen op het initium (het toekomstige primordium).
Men kan zich indenken, dat de hoek tussen twee achtereenvolgende primordia de ideale waarde benadert, overeenkomstig de grootst mogelijke afstand tussen twee primorida. Deze ideale waarde is precies de hoek van Fibonacci (ongeveer $137,5^0$).
Er bestaan trouwens andere voorbeelden van morfogenese waar wederkerige remmingen bijdragen aan het afzetten van structuren. Eén van de beste voorbeelden is dat van de huidmondjes, waarbij de plaatsen van aanleg tijdens de vorming van het blad elkaar onderling schijnen te remmen en zo een goede verdeling waarborgen.

c. De theorie van de bladspiralen (Plantefol 1948b). De 'genetische spiraal', gedefinieerd door de volgorde in de verschijning van bladen, zou geen enkele fysiologische betekenis hebben. Het enige reële van de bladstand zou het totaal zijn van de bladspiralen. De bladen van één spiraal zouden afgezet worden door een enkel ontwikkelingscentrum, dat in het meristeem ter hoogte van de primaire meristeemring gelegen is.

Er zouden in het 'vegetatiepunt' evenveel ontwikkelingscentra voorkomen als er spiralen zijn.

d. Wiskundige studies over de bladstand, waarvan er enkele al héél oud zijn, geven geen uitsluitsel over de verschillende hypothesen.
De meest recente onderzoekingen (zie Williams 1975) steunen hoofdzakelijk op het werk van Richards (1948) en lijken erop te wijzen dat de rangschikking van de spiralen een onvermijdelijk geometrisch gevolg is van de activiteit van de top. Eenvoudig gesteld zien we, dat wanneer de afstand tot het centrum bij elk plastochroon* aanzienlijk toeneemt, alle spiralen snel uit elkaar wijken. Het meristeem is dan langgerekt en produceert een klein aantal spiralen. Indien, omgekeerd, de radiale afstand tot het centrum gedurende elk plastochroon weinig toeneemt, dan staan de primordia dicht tegen elkaar op een afgeplat meristeem, zoals b.v. in een dennekegel of duidelijker nog in een bloemhoofdje van een zonnebloem. Het aantal spiralen kan dan erg groot zijn.
In bladstanden die ingewikkeld worden, gaat het aantal 'parastichen', die elkaar ongeveer rechthoekig kruisen, aan de buitenkant van het éne systeem in een ander over, b.v. van het systeem 5 + 8 naar 8 + 13 (volgens de terminologie van Church). Deze rangschikking van spiralen is geen biologisch wonder, maar is waarschijnlijk het gevolg van de bijzondere eigenschappen van de hoek van Fibonacci. Zoals we al gesignaleerd hebben kan deze beschouwd worden als de ideale grenswaarde, die in een verspreide bladstand overeenkomt met de grootst mogelijke afstand tussen twee opeenvolgende primordia.

e. Microchirurgische proeven, uitgevoerd aan de top (Ball 1946; Snow et Snow 1947; Wardlaw 1968) leveren geen beslissend bewijs op. Zij ondersteunen noch de hypothese van de remmingen, noch die van effect vanuit de onderliggende weefsels. Zij verschaffen wel argumenten ten gunste van het denkbeeld over de pluripotentie van embryonale, nog niet voorbestemde, zones. We herinneren er aan, dat Loiseau (1959), naar aanleiding van microchirurgische experimenten aan de top bij balsemienen, veranderingen van de bladstand heeft beschreven, die geïnterpreteerd kunnen worden als gevolg van de onderdrukking van een bladspiraal.

4. Autonome werking van het meristeem

Men heeft er lang over gediscussieerd of het afzetten van de bladprimordia door het stengelmeristeem en de bladstand, die er uit resulteert, het gevolg zijn van autonome werking van het meristeem ofwel van interacties met dieper liggende weefsels.
De gegevens over dit probleem zijn nogal tegenstrijdig en het is niet uitgesloten dat het meristeem, dat afgescheiden wordt van de moederplant en in vitro gekweekt , een potentiële autonomie vertoont, die in het algemeen niet tot uitdrukking komt tijdens de integrale ontwikkeling in de intacte plant.

4.1. Effecten van dieper gelegen weefsels

Verscheidene auteurs, met name Esau (1965), hebben lang geleden diverse malen waargenomen, dat de ontwikkeling van bladsporen aan de vorming van primordia van bladeren kon voorafgaan.
Recente anatomische studies van Larson aan Populus deltoides (1975, 1977) hebben aangetoond, dat acropetaal gedifferentieerde floëemelementen kunnen worden waargenomen op een afstand van ongeveer 250 um onder het primordium. Het is mogelijk, dat de invloed van jonge provasculaire elementen zich duidelijk uitstrekt voorbij de plaats, waar de gebruikte kleuringstechnieken ze zichtbaar maken.

4.2. In vitro cultuur van het geisoleerde topmeristeem

Als 'meristeemculturen' toegepast worden ten behoeve van de vegetatieve vermeerdering en het opbouwen van virusvrije klonen, omvatten ze in feite explantaten, die behalve het meristeem ook bladprimordia en onderliggende weefsels bevatten. Zelfs wanneer het explantaat klein is (ongeveer 200 um) bevat het nog één of twee bladprimordia.
Weefselkweekproeven van Ball (1946, 1960) aan het meristeem van lupine, evenals die van Wetmore en Morel (1949) en van Wetmore (1954) aan het meristeem van varens, leveren ons nauwelijks gegevens over de werkelijke autonomie van het meristeem sensu stricto.

Daarentegen zouden de proeven van Smith en Murashige (1970), die uitgevoerd zijn aan verschillende gewassen (tabak, lupine, Oost-Indische kers, enz.) de autonomie van de werking van het topmeristeem zonder primordia bewijzen. Het opnieuw beginnen van de groei van het meristeem hangt trouwens van de toevoeging van groeistoffen aan de voedingsbodem af. Afhankelijk van

het gewas is het absoluut nodig aan het basale voedingsmedium hetzij een auxine, hetzij een cytokinine toe te voegen. Maar de voorbestemming van primordia en de bladstand hangt alleen maar van het meristeem zelf af. Deze conclusies lijken geheel in tegenspraak met de waarnemingen betreffende de effecten van dieper gelegen weefsels.
Hierover moeten we echter twee opmerkingen maken:

a. In het geval van kweek van meristemen of stengeltoppen is het niet mogelijk zonder nieuw onderzoek te bewijzen, dat er aan de basis van de explantaten geen 'prevasculaire' weefsels bestaan, die eventueel een inducerende rol kunnen spelen.
b. Niets bewijst, dat het geïsoleerde meristeem zich exact op dezelfde manier gedraagt als het meristeem in situ.

In het eerste geval zal het geïsoleerde meristeem zijn fundamentele totipotentie kunnen laten blijken, die gewoonlijk gemaskeerd is. In het tweede geval zou de werking in situ in feite het resultaat zijn van ingewikkelde interacties.

5. Determinatie van bladprimordia

We kunnen ons afvragen in welke mate de bladprimordia voorbestemd zijn om altijd en noodzakelijkerwijs naar bladeren te evolueren of dat zij daarentegen een onbestemde fase doorlopen en zich hetzij tot bladeren, hetzij tot scheuten kunnen ontwikkelen.
Verschillende proeven met micro-chirurgie steunen de tweede hypothese: de zeer jonge bladprimordia kunnen nog niet gedetermineerd zijn.
In de klassieke proeven van Wardlaw (1949) met de varen Dryopteris dilatata kan, wanneer de plaats (I_1) van het toekomstige primordium door een insnijding geïsoleerd wordt van de apicale zone van het meristeem, zich een knop ontwikkelen met radiale symmetrie in plaats van een blad met dorsiventrale symmetrie.

In de latere proeven van Steeves (1962) met Osmunda cinnamomea worden de jongste primordia (P_1) omgezet in scheutmeristemen, indien ze geïsoleerd en in vitro gekweekt worden. De oudere primordia (P_3) worden bestemd tot bladeren.
Haight en Kuehnert (1969) hebben aangetoond, dat de top van de primordia zijn bladkarakter behoudt, maar soms kunnen nieuwe laterale en adventieve scheuten gevormd worden. De relatieve verhoudingen van primordia, die zich

uitsluitend tot bladen ontwikkelen of scheuten vormen, variëren volgens de omstandigheden van de kweek. De toevoeging aan het medium van oudere bladprimordia of van bladextracten bevordert de irreversibele bestemming tot bladen.
Hicks en Steeves (1969), die eveneens met koningsvaren werkten, isoleren met een diepe insnijding de plaats I_1 van het toekomstige primordium van het apicale gebied van de top. Wanneer men een plaatje mica in de insnijding houdt, zijn het scheuten in 75% van de gevallen scheuten die zich op I_1 ontwikkelen. Wanneer, zonder mica de weefsels helen en de verbindingen zich herstellen zal men juist de vorming van bladen zien op dezelfde plaats I_1 bij 80% van de behandelde toppen.
Bij het bekijken van de resultaten van deze twee schijnbaar tegenstrijdige proeven, lijkt het apicale gebied aanvankelijk de rol te spelen van 'organisator' bij het determineren van de aard van het geproduceerde orgaan tot blad of scheut. Omdat de jonge primordia P_1 niet op een definitieve manier voorbestemd zijn tot bladen is het waarschijnlijk, dat de invloed van de oudere organen secundair werkt.

C. PROBLEEM VAN DE EVENTUELE OMKEERBAARHEID VAN WORTEL- EN STENGELMERISTEMEN

1. Onomkeerbaarheid van beide typen meristemen

De stengel- en wortelmeristemen van de bedektzadigen vertonen een verschillende structuur en werking. Sommige botanici (Emberger 1960) denken echter, dat de twee soorten assen (stengel- en wortelas) een gemeenschappelijke oorsprong hebben gehad in de loop van de fylogenie en niet fundamenteel verschillen.
Algemeen wordt aangenomen dat bij de bedektzadigen geen omkeerbaarheid mogelijk is tussen de twee typen meristemen. De weinige voorbeelden, die als overgangsgeval beschouwd worden van een worteltop naar een stengelmeristeem, hebben waarschijnlijk betrekking op de laterale vorming van een nieuw stengelmeristeem als gevolg van de plaatselijke dedifferentiatie van de wortelweefsels.

2. Het bijzondere geval van Nasturtium officinale

Het geval van Nasturtium officinale, beschreven door Ballade (1970) laat de vorming zien van stengelmeristemen op plaatsen van wortelmeristemen. Onder natuurlijke omstandigheden kunnen we in de oksel van de bladen ontwikkeling van scheuten en wortels zien. De morfogenese kan gericht worden door toevoeging van groeistoffen: de behandeling met kinetine van geïsoleerde knoppen, die zeer jonge wortels dragen, met een lengte beneden de 0,4 mm, kan de vorming van een stengelmeristeem op de plaats van een wortelmeristeem tot gevolg hebben. Het is waarschijnlijk, dat het hier eerder gaat om een nieuwvorming dan om een transformatie van een meristeem.

3. Eventuele mogelijkheden van omkeerbaarheid van 'promeristemen' bij de weefselkweek

Bij weefselkweek is er tijdens de vorming van promeristemen* in een callus geen onderscheid tussen een scheutprimordium en een toekomstig wortelmeristeem. We kunnen ons dus afvragen of de toekomst van beide typen meristemen vooraf bepaald is, of dat dit gedurende een zekere tijd onbestemd blijft.
Deze vraag blijft zonder beslissend antwoord open voor onderzoek. Wij merken alleen op, dat we zelf op het callus aan de voet van bloemen van Kalanchoë blossfeldiana en Begonia x elatior cf Rieger de vorming van een groot aantal 'meristemoïden'* hebben opgemerkt. Het gaat in dit voorbeeld niet om 'embryoïden', die door hun bipolaire structuur gekenmerkt zijn. Deze 'meristemoïden' kunnen drie verschillende typen van ontwikkeling vertonen:

a. voortzetting van proliferatie
b. vorming van wortelmeristemen
c. vorming van stengelmeristemen.

We weten niet of het identieke 'meristemoïden' zijn, die zich later tot stengel- of wortelmeristemen ontwikkelen of dat schijnbaar gelijke 'meristemoïden' al van te voren gedetermineerd zijn.

4. Onderlinge verwisselbaarheid van de stengel- en de wortelmeristemen bij Selaginella's

Bij bepaalde vaatcryptogamen kan het jonge meristeem zonder bestemming zich ontwikkelen tot een stengel- of een wortelmeristeem.
Deze verwisselbaarheid van het jonge meristeem is door verschillende auteurs bij de Selaginella's bestudeerd, welke een merkwaardig voorbeeld van flexibiliteit van het meristeem te zien geven. Dit voorbeeld doet veronderstellen, dat het gebrek aan flexibiliteit van het meristeem van de bedektzadigen een eigenschap is die in de loop van de evolutie secundair verkregen is; vandaar de hoop om deze misschien in bijzonder gungstige gevallen terug te krijgen.
De vertakking van de Selaginella's is dichotoom. Het jonge meristeem ontwikkelt zich tot stengel- of wortelmeristeem afhankelijk van de positie (dorsaal of ventraal) en de hormoonbehandeling, die men toepast. Auxine bevordert de wortelvorming. Het 2,3-5 trijoodbenzoëzuur (TIBA) stimuleert de vorming van stengels, zelfs in ventrale positie (Wochok en Sussex 1975). In de weefselkweek zouden wortelmeristemen zich zelfs kunnen heroriënteren tot stengelmeristemen (Wochok en Sussex 1976).

Dit voorbeeld van de Selaginella's, dat lijkt op bepaalde waarnemingen in de weefselkweek, zou ons op het idee kunnen brengen om te proberen eigenschappen van de voorouders, die niet voorgoed verloren, maar slechts onderdrukt zijn, bij nieuw gevormde meristemen terug te krijgen.

We kunnen als werkhypothese stellen dat wortel- en stengelmeristemen, die bij een zekere graad van structurering op een irreversibele manier hun bestemming kregen, bij bepaalde soorten in een uiterst vroegtijdig stadium van hun ontwikkeling wellicht onbepaald en verwisselbaar zouden zijn (zie boven).
Het stengelmeristeem blijkt een ingewikkelde structuur te hebben, waarvan de integrale werking de resultante is van veelvoudige interacties, binnen het meristeem zelf of voortkomend uit uitwendige invloeden[1]. De totipotentie

---

(1) Van de overzichtsartikelen of te raadplegen werk over het meristeem en de orgaanvorming citeren we: Gifford (1954), Buvat (1955), Clowes (1961), Cutter (1965, 1971), Esau (1965), Wardlaw (1968), Williams (1975), Nougarède (1965), Halperin (1978).

van meristeemcellen met embryonaal karakter kan zich uiten als gevolg van chirurgische ingrepen, die leiden tot storingen in de bladstand of tot de vorming van onverwachte structuren (b.v. vorming van een scheut i.p.v. een blad).

D. MORFOLOGISCHE EN STRUCTURELE VERANDERINGEN IN VERBAND MET DE BLOEMAANLEG

1. Drie soorten meristemen: vegetatieve meristemen, meristemen van de bloeiwijze en van de bloem

De bloem ontwikkelt zich uit een bloemmeristeem. De bloemen kunnen alleen staan of gegroepeerd zijn in bloeiwijzen.
In het eerste geval zien we de direkte vorming van bloemmeristemen. In het tweede geval ontstaan de bloemmeristemen uit meristemen van bloeiwijzen. Bij monocarpe planten, die na de bloei afsterven, mogen we aannemen, dat alle meristemen uitlopen op bloeiwijzen en uiteindelijk op bloemen. Bij polycarpe planten, zoals tweejarige en overblijvende planten, moet er na bloei en vruchtvorming noodzakelijkerwijze een bepaald aantal vegetatieve meristemen overblijven, die voor het overleven van de plant zorgen. De bloeiwijze is in het algemeen een samengesteld orgaan, dat één of meer stengelassen omvat, die de bladeren, bracteeën en bloemen dragen. Op één bloeiwijze kunnen dus vegetatieve meristemen, meristemen van de bloeiwijze en bloemmeristemen naast elkaar voorkomen.
Deze drie soorten meristemen verschillen in hun structuur en hun werking. De vegetatieve meristemen splitsen de bladprimordia af volgens de bladstand van het gewas. De meristemen van de bloeiwijze kunnen tegelijkertijd vegetatieve organen en bloemmeristemen vormen.
De bloemmeristemen bouwen achtereenvolgens de kransen op van bloemdelen. Er is veel gediscussieerd over de vraag of er een doorlopende overgang bestaat tussen de vegetatieve top en de top van de bloeiwijze of van de bloem, of dat het bloemmeristeem daarentegen moet worden beschouwd als een orgaan sui generis, dat niet vergelijkbaar is met een getransformeerde vegetatieve top (Gregoire, 1938).

Sommigen hebben de achtereenvolgende ontwikkeling van het meristeem in genetische termen willen uitdrukken. Wardlaw (1961) veronderstelt, dat de vorming van verschillende typen laterale organen door het meristeem corres-

pondeert met verschillende fysiologische stadia van het meristeem zelf en de opeenvolgende expressie ('évocation') van verschillende genen tot uitdrukking brengt. Omdat elke toestand afhangt van de voorafgaande, zou de ontwikkeling dus van epigenetische aard zijn. Heslop-Harrison (1964) drukt een dergelijke zienswijze met wat meer nauwkeurigheid uit.

We zullen beknopt enkele klassieke gegevens over de morfologische en structurele overgangen samenvatten, die waar te nemen zijn tijdens de overgang van de vegetatieve toestand naar de bloei, teneinde het probleem van de terugkeer naar de vegetatieve toestand te kunnen behandelen. De mogelijkheid tot terugkeer bepaalt de vegetatieve vermeerdering uit organen van de bloeiwijze of van de bloemen.

2. Morfologische en structurele veranderingen verband houdend met de bloemaanleg

2.1. Morfologische veranderingen

De morfologische veranderingen, die men het meeste tegenkomt, zijn de toename van de afmetingen van het meristeem en de veelvuldige verandering van de bladstand, samenhangend met een versnelling van de ontwikkeling. Op de bladen volgen bracteeën in de oksel, waarvan de axillaire knoppen zich meestal vroegtijdig ontwikkelen. Bij chrysant kan de oppervlakte van de top tijdens de opbouw van het bloemhoofdje 400x zo groot worden (Schwabe 1959).

Om de morfologische stadia van de ontwikkeling tijdens de overgang van de vegetatieve naar de generatieve toestand te illustreren kiezen we het voorbeeld van de bloemkool.

a. Morfologische stadia van de ontwikkeling bij bloemkool.

Via waarnemingen met het rasterelektronenmicroscoop (Margara en David 1978) is het mogelijk drie belangrijke stadia in de ontwikkeling te onderscheiden: de vegetatieve fase, de fase van de ontwikkeling van de bloeiwijze en de fase van aanleg van de bloemmeristemen.

De tweede fase (phase 'préinflorescentielle') kan zelf weer ondervverdeeld worden. Onder natuurlijke omstandigheden kunnen onder invloed van abnormale klimaatsfactoren of onder proefomstandigheden verscheidene abnormale gevallen waargenomen of verkregen worden.

Fig. 9 illustreert de voornaamste waargenomen stadia.

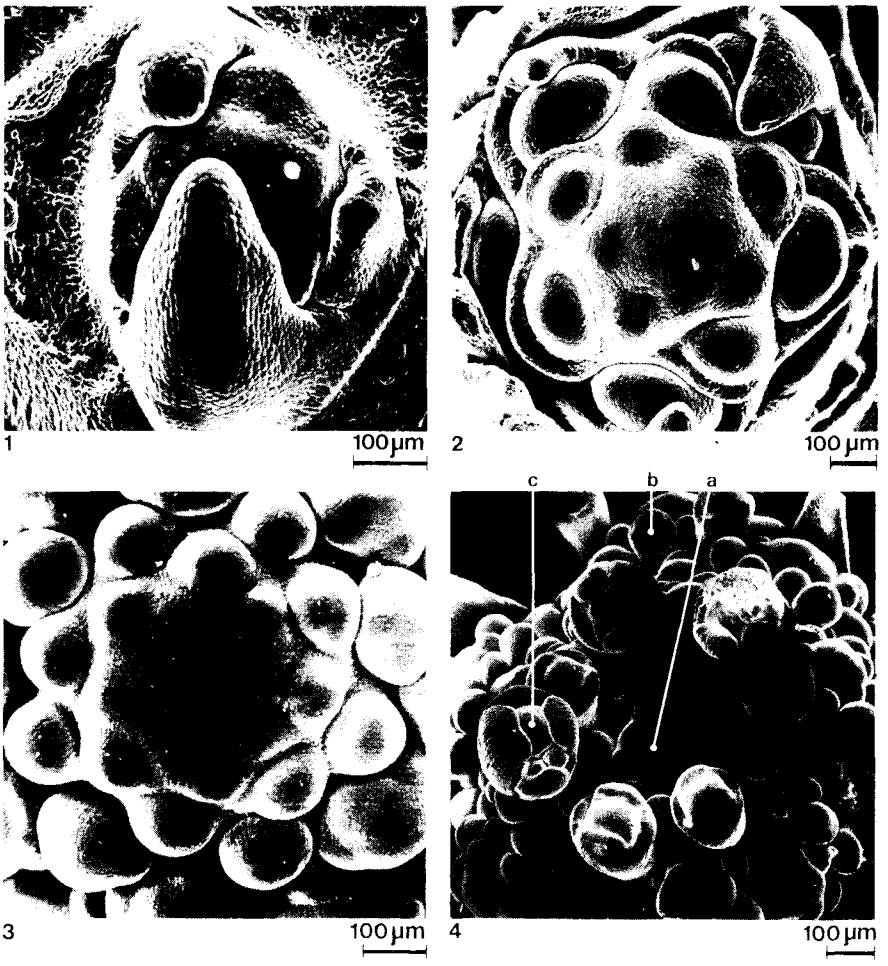


Fig. 9. De morfologische stadia van de ontwikkeling van het meristeem van bloemkool (naar Margara en David 1978).

1. Het vegetatieve meristeem zet bladprimordia af. In dit stadium zien we geen enkel axillair scheutprimordium (verg. x92).
2. De aanleg van de toekomstige bloeiwijze is gekenmerkt door de zeer vroegtijdige ontwikkeling van axillaire meristemen, die leiden tot de paarsgewijze aanleg van een bractee en een meristeem (verg. x66).
3. De meristemen van de bloeiwijze van een rijpe bloemkool leggen zijmeristemen direkt aan zonder bijbehroende bractee (verg. x163).
4. Tijdens de bloemdifferentiatie onderscheidt men meerdere soorten meristemen: a. meristeemgroep van de bloeiwijze (zie 3, hiernaast); b. "aangelegd" lateraal meristeem, dat zich verlengt alvorens zich te differentiëren; c. bloemmeristeem, dat kelk- en kroonbladen afsplitst.

I. Gedurende de vegetatieve fase splitst het stengelmeristeem de bladprimordia af volgens een bepaald 'plastochroon' ritme zonder een zichtbaar axillair meristeem.

II. Het eerste stadium van de aanleg van de toekomstige bloeiwijze (de bloemkool) is gekenmerkt door de vroegtijdige ontwikkeling van meristemen in de oksel van primordia van bladeren of bracteeën. We zien hier dus de paarsgewijze vorming van een bractee en een meristeem.

III. Bij het volwassen worden van de bloemkool produceert elk eindmeristeem bracteeën. Zo zien we meristematische 'groepen', die een tiental meristemen kunnen omvatten. De meest aan de buitenkant gelegen meristemen maken zich los uit de groep en worden eindmeristemen van een nieuwe tak.

Deze ontwikkeling eindigt in de vorming van de bloemkool, een bijzonder sterk vertakte bloeiwijze, die vele tienduizenden, zelfs meerdere honderdduizenden meristemen bevat.

In dit stadium hebben de meristemen van de bloeiwijze een wel héél bijzondere werkingswijze, die anders is dan die van vegetatieve meristemen en ook anders dan die van bloemmeristemen.

IV. In een bepaald ontwikkelingsstadium van de bloemkool ontstaan de bloemmeristemen uit laterale meristemen, die los van de meristematische groepen staan.

Deze meristemen produceren noch bracteeën noch axillaire meristemen, maar ze worden langwerpig en zetten achtereenvolgende kransen van bloemdelen af (kelkbladen, kroonbladen en meeldraden) volgens een ontwikkelingsprogramma, dat typisch voor een bloem is.

De bloeiwijze van de bloemkool is een trosvormige bloeiwijze, die tegelijkertijd uitzonderlijk is door z'n graad van vertakking en tevens typisch voor bloeiwijzen van het onbepaalde type (zoals trouwens de naam Brassica oleracea L. var. botrytis aangeeft). De ontwikkeling is dus heel anders dan bij cymeuze (bepaalde) bloeiwijzen.

Het onderkennen van de 'phase préinflorescentielle' maakt het in dit geval mogelijk zeer duidelijk onderscheid te maken tussen de drie soorten meristemen: vegetatieve, die van de bloeiwijze en die van de bloem. Een wezenlijk verschil tussen de werkingswijze van het vegetatieve meristeem en dat van de bloeiwijze betreft het

omkeren van de aanleg van het primordium van blad of bractee en het bijbehorende okselmeristeem.

Ter hoogte van de vegetatieve top zijn de axillaire meristemen onontwikkeld. In de top tijdens de 'phase préinflorescentielle', korte tijd voor het stadium van de oogst van de bloemkool, komen daarentegen de bracteeën niet meer voor. Een tussenstadium wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van paren van bracteeën en meristemen (fig. 9). Naarmate de bloemkool meer een kool gaat vormen komt de ontwikkeling van de axillaire meristemen in een versnelling. De vegetatieve fase (opbouw van bladeren zonder okselmeristeem) komt niet meer voor. De tussenfase (vorming van paren van een bractee met een meristeem) kan eveneens onderdrukt worden; we zien dan de direkte vorming van nieuwe meristemen van de bloeiwijze.

Deze versnelling in de ontwikkeling, die gepaard kan gaan met een wijziging in de bladstand (toename van het aantal spiralen) schijnt altijd kenmerkend voor de overgang naar de generatieve toestand te zijn.

We merken nogmaals op, dat het meristeem van de bloeiwijze, hoewel het door structuur en werking afwijkt van het vegetatieve meristeem, hier voortdurend mee in contact blijft, zodat de overgang geleidelijk plaatsvindt.

Omgekeerd werkt het bloemmeristeem direkt volgens een organisatiepatroon, dat volledig verschilt van de vegetatieve 'patronen' of dat van de bloeiwijze (fig. 9-4).

b. Andere voorbeelden van de ontwikkeling van de bloeiwijze

Bij een composiet zoals witlof, Cichorium intibus L., is de bloeiwijze een uit bloemhoofdjes bestaande tros, terwijl het bloemhoofdje zelf een ineengedrongen tros is. In het bloemhoofdje zien we een zeer grote versnelling van de ontwikkeling: de laterale meristemen, die door het meristeem van de bloeiwijze worden afgezet, zijn bloemmeristemen, die direkt hun bestemming hebben (fig. 10). Zij zullen direkt de kransen van de bloemdelen opbouwen.

Fig. 10. Morfologische stadia van de overgang van de vegetatieve toestand naar de generatieve bij een bloemhoofdje van een composiet (witlof) (ongepubliceerde waarnemingen van de auteur).
De apices, die met het rasterelekronenmicroscoop bestudeerd zijn, werden geïsoleerd van planten uit de kas, gekweekt bij een daglengte van 18 uur en een koudebehandeling bij + 5 °C.

1. Het eindmeristeem van de toekomstige bloemstengel is nog vegetatief. Het maakt bladprimordia zonder zichtbare axillaire knoppen volgens de normale bladstand.
2. Het meristeem heeft vóór de bloeiwijzevorming zijn afmetingen aangenomen. De versnelling in de ontwikkeling blijkt uit de vorming van axillaire meristemen.
3. Het meristeem van de bloeiwijze legt meristemen aan. Het maakt direkt de toekomstige bloemmeristemen, die niet noodzakelijkerwijs in de oksel van een bractee staan of door een bractee gedragen worden.
4. De bloeiwijze (bloemhoofdje) is gevormd. De bloemmeristemen vangen hun differentiatie aan volgens een plan, dat sterk verschilt van de programma's voor vegetatieve en bloeiwijze-ontwikkeling.

Een ander voorbeeld van een trosvormige bloeiwijze is biet. De bloeiwijze bestaat uit 'bloemkluwens', terwijl het bloemkluwen zelf een ineengedrongen bloeiwijze is (cymus), die uit 2 tot 4 bloemen bestaat. Het meristeem van de bloeiwijze is langgerekt en vormt talrijke paren van een bractee en een meristeem volgens een gewijzigde bladstand (toename van het aantal bladspiralen).
De 'Rieger' begonia is een voorbeeld van zo'n bloeiwijze, het cymeuze (bepaalde of middelpuntvliedende) type. Elke bloemtak draagt aan zijn uiteinde een eindbloem. De determinatie van de bloemmeristemen wordt vroegtijdig bepaald. Bij soorten, die een dergelijk type bloeiwijze vertonen, is de mogelijkheid van een latere terugkeer naar de vegetatieve toestand moeilijk voor te stellen, zoals voorkomt bij biet onder invloed van korte dag samen met hoge temperatuur (Margara 1960).

2.2. Structuurveranderingen

De anatomische veranderingen, die het meristeem tijdens de overgang naar de generatieve fase betreffen zijn door talrijke auteurs bestudeerd (zie Buvat 1952; Lance 1957; Nougarède 1965; Gifford en Terper 1962; Gifford 1964; Bernier 1964).
De meest algemene kenmerken van deze wijzigingen schijnen te zijn:

a. variatie in de vorm van het meristeem, toename van de afmetingen en de hoeveelheid protoplasma, verandering in de bladstand en in het 'plastochroon' ritme, gepaard gaande met een versnelling in de ontwikkeling;
b. toename van de algemene mitotische activiteit;
c. toename van de mitose index en van het gehalte aan RNA van de cellen van de apicale axiale zone.

Deze cytologische en anatomische veranderingen leiden tot de vorming van een homogene meristematische zone, die kenmerkend is voor de fase voorafgaand aan de generatieve fase.
Onder niet inducerende omstandigheden, b.v. ongunstige daglengte voor inductie bij daglengtegevoelige soorten, zien we twee vormen van ontwikkeling.

a. Bij soorten zoals biet, die onder ongunstige omstandigheden voor bloeiinductie (korte dag, hoge temperatuur) gemakkelijk terugkeren naar de vegetatieve toestand, kan de top van planten, die lang onder ongunstige omstandigheden verkeren (korte dag) een structuur gaan vertonen, die typisch is voor het vegetatieve meristeem.
b. Bij facultatieve soorten, die uiteindelijk toch gaan bloeien onder niet

inducerende omstandigheden, en ook bij planten, die door een klein aantal inducerende daglengten geïnduceerd kunnen worden, kan het meristeem de structuur van de 'overgangsfase' gaan vertonen, die beschreven is door Nougarède (1965).

Dit is het geval bij Perilla nankinensis (Nougarède et al. 1964). Het duidelijk bolvormige meristeem gaat cytologische en cytochemische eigenschappen vertonen, die tussen de eigenschappen van vegetatieve meristemen en die van meristemen voorafgaand aan de bloei in liggen. Deze tussenfase treedt onder lange dag-omstandigheden op bij de korte dag plant Perilla. Enkele korte dagen met als minimum één, volstaan om de bloemaanleg weer op gang te brengen.

Bij de lange dag plant witlof, die een koude-behoefte heeft, veroorzaakt het forceren in het donker bij een temperatuur van 20-25°C de vorming van het lof. Het meristeem van dit lof is typisch in de intermediaire fase (Rancillac 1973a). De ontwikkeling van witlof in het donker wordt gewijzigd door een verandering in de activiteit van de apex. Deze vormt geen rozet meer van bladeren, die ingeplant staan op een stengel met zeer korte internodiën, maar lof, dat bestaat uit rechtopstaande en in elkaar geschoven bladeren, die ingeplant staan op een stengelas, die lichtelijk verlengd is. Wanneer het forceren in het donker volgt op een lange bewaring in de kou, verlengen de stengelinternodiën zich sterk. Dan kan een klein aantal lange dagen volstaan om bloemaanleg te verkrijgen.

Het onderzoek gekoppeld aan een histologische studie versterkt het idee nog van een nauwe relatie tussen histologische verandering van het stengelmeristeem en bloemaanleg. Bij nagelkruid Geum urbanum L. (Tran Thanh Van 1965) kan de bloemaanleg bevorderd worden door verschillende factoren: normale koudebehandeling, opheffing van de apicale dominatie door het wegnemen van de eindknop, eventueel gekoppeld aan een behandeling met gibberellinezuur.

Deze verschillende behandelingen leiden alle uiteindelijk op meristeemniveau tot een ver doorgevoerde dedifferentiatie van de cytologische eigenschappen. Bij witlof, Cichorium intybus L. (Rancillac 1973a) kan scheutvorming in de weefselkweek op een wortelstukje tot versnelde bloemaanleg voeren (na ongeveer 3 weken cultuur) op een agarmedium met saccharose en onder continu licht. Maar het is mogelijk alle cultures vegetatief te houden onder verschillende omstandigheden, zoals korte dag of continu donker, lange dag en kweek in vloeibaar medium welke een sterke hydratie van de explantaten met

zich meebrengt. Onder deze omstandigheden vertonen de cellen van de apicale axiale zone van het nieuwe meristeem, dat vegetatief zal blijven, cytologische kenmerken, die minder typisch meristematisch zijn. Vooral de vacuole is meer ontwikkeld dan bij meristemen, die gevormd zijn onder omstandigheden, die gunstig zijn voor de bloemaanleg.
We zien dus bij witlof een merkwaardige overeenkomst tussen de cytologische kenmerken van het nieuwgevormde meristeem en zijn toekomst, hetzij vegetatief of generatief. Alle factoren, die de dedifferentiatie versterken, bevorderen ook de generatieve toestand (Rancillac 1973b).

II

VORMING VAN NIEUWE MERISTEMEN EN SOMATISCHE EMBRYOGENESE

II. VORMING VAN NIEUWE MERISTEMEN EN SOMATISCHE EMBRYOGENESE

Orgaanvorming is de fundamentele grondslag van vegetatieve vermeerdering, die altijd steunt op de vorming van nieuwe meristemen. In de komende paragrafen zullen we drie aspecten van de orgaanvorming bekijken: wortel-, stengel- of scheutvorming en somatische embryogenese.

A. WORTELVORMING*

Wortelvorming is het meest algemeen voorkomende verschijnsel van orgaanvorming, waarmee we bij vegetatieve vermeerdering te maken hebben. Een stek met bladeren of een stengeltop, die in de weefselkweek gebracht wordt, heeft minstens één stengelmeristeem. Welke methode van vegetatieve vermeerdering ook toegepast wordt, het gebruikte materiaal moet altijd in staat zijn om nieuwe wortels te vormen.

Vooruitgang in de kennis van wortelvorming is dus een voorwaarde voor de beheersing van vegetatieve vermeerdering. De begrippen over wortelvorming proberen een samenhangende verklaring te geven voor een zeer ingewikkeld geheel van gegevens. Deze begrippen zijn gelijktijdig met onze kennis van groeistoffen geëvolueerd. De studie van de wortelvorming neemt meer en meer de complexe interacties van factoren in aanmerking, maar blijft gedomineerd worden door het probleem van de hormonale regeling en vooral door de rol van de auxinen in de orgaanvorming.

Op het fundamentele vlak blijft de orgaanvorming, die toegankelijker voor onderzoek is dan de scheutvorming, een goede benaderingswijze voor het onderzoek van de determinatie van de orgaanvorming. Deze determinatie hangt samen met de mechanismen van differentiatie en dedifferentiatie van de cel.

1. Herkomst van de wortels

1.1. Verschillende herkomst van wortelmeristemen

De wortelmeristemen worden volgens hun herkomst in verschillende soorten verdeeld.

a. <u>De laterale meristemen</u> van de hoofdwortel vormen zich "spontaan" onder natuurlijke omstandigheden.

b. <u>De adventieve meristemen</u> worden door verschillende organen gevormd (stengel, knol, bol en blad) hetzij spontaan, hetzij toevallig na

verwonding, vaak ook doelbewust door enten en marcotteren.

c. Nieuwgevormde meristemen in een callus bij de weefselkweek mogen beschouwd worden als een bijzonder geval van adventieve meristemen (fig. 11).

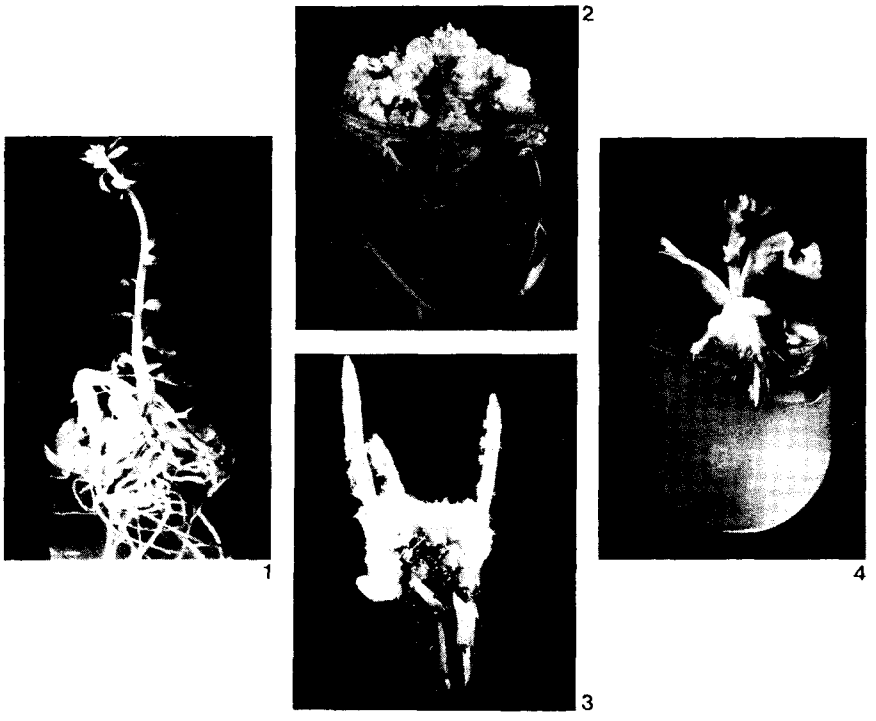


Fig. 11. Beworteling in de weefselkweek (waarnemingen van de auteur).

1. Zeer overvloedige wortelvorming op een callus aan de voet van een stengeltje van vlas, Linum usitatissimum L. cv. Clara.
2. Vorming van nieuwe wortels op een callus van de peen Daucus carota L. cv. Blanche d'Orthe. De wortels ontwikkelen zich in de voedingsbodem met een normale positieve geotropie. Ze bevatten vaak bladgroen.
3. Vorming van nieuwe wortels op een callus van Cymbidium (orchidee). De luchtwortels met velamen vertonen een negatieve geotropie. De knoppen ontwikkelen zich in de voedingsbodem (auxinen NAA + IBA 5.10^{-6} M).
4. Overvloedige wortelvorming aan de voet van een bloemstengel van witlof, Cichorium intybus L.
   Een knop, die in de weefselkweek gevormd wordt onder continu licht op een wortelstuk van witlof, werd van het explantaat afgenomen en overgezet op een bodem met veel auxinen. De kleine bloemstengel heeft zich gelijktijdig met de wortels ontwikkeld. De twee verschijnselen van morfogenese, nl. bloemaanleg en beworteling, blijken volledig onafhankelijk van elkaar te verlopen en oefenen in dit voorbeeld geen duidelijk bevorderende en ook geen remmende werking op elkaar uit.

Deze voorbeelden tonen de verscheidenheid aan manieren van beworteling in de weefselkweek aan.

1.2. Stadia in de vorming van het wortelmeristeem

De vorming van nieuwe wortel- en ook stengelmeristemen komt altijd voort uit een ver doorgevoerde dedifferentiatie van de cel, die eindigt in de vorming van primaire meristematische cellen en in de vorming van een meristematisch primordium.

De dedifferentiatie verloopt in achtereenvolgende stadia volgens de klassieke beschrijving van Buvat (1945). Afhankelijk van de aard van het uitgangsweefsel (pericykel-, bast-, parenchym- of cambiumcellen) bestaan er in detail verschillende manieren.

a. De laterale wortels komen in het algemeen uit diepere weefsellagen. Ze worden meestal in de pericykel gevormd, soms in de endodermis en nog zeldzamer in de schors. Daar vindt plaatselijke dedifferentiatie plaats van cellen, die zich ontwikkelen tot de primaire meristematische toestand.

b. De adventieve wortels kunnen woren aangelegd aan de stekvoet na voorafgaande vorming van een wondcallus. De activering van de stekvoet is het gevolg van het isoleren van het gestekte deel, hetgeen verschillende consequenties met zich meebrengt: plaatselijke verstoringen als gevolg van het wondeffect, verbreking van de fysiologische correlaties en eventuele wijzigingen in de polariteit.
Het hervatten van de mitotische activiteit leidt tot de vorming van een wondweefsel. Dit kan ook leiden tot een verder doorgevoerde dedifferentiatie, die eindigt in de vorming van primaire meristematische cellen en tot de vorming van meristemen.

1. De adventieve wortels kunnen vanuit dieper gelegen weefsels worden aangelegd. Ze worden dan meestal door het cambium* gevormd. De cellen die daardoor ontstaan ondergaan een dedifferentiatie. Deze dedifferentiatie eindigt in de vorming van primaire meristematische cellen.

2. De adventieve wortels kunnen in zeldzame gevallen voortkomen uit oppervlakteweefsel: epidermis of vaker cellen onder de epidermis. Dit tamelijk zeldzame geval doet zich bij verschillende families voor; vooral bij kruisbloemigen, zoals veldkers. Deze wortels heten dan exogeen in tegenstelling tot het meer algemeen geval van endogene wortels.

c. De wortels, die op een callus in de weefselkweek nieuw gevormd worden, komen voort uit de plaatselijke dedifferentiatie van bepaalde weefsels van het explantaat. De weefsels, waarvan de dedifferentiatie uitgaat, kunnen trouwens verschillend zijn: bastparenchym bij andijvie (Camus

1949) en cambiumweefsel bij iep (Jacquiot, 1955).
Bij aardpeer (cv. Violet de Rennes) bestudeerd door Gautheret (1969) is de vorming van nieuwe wortelmeristemen in vitro uit knolstukjes de laatste van een reeks stadia: plaatselijke proliferatie van de cellen, vorming van floëemeilandjes, van tracheïden en vervolgens van cellen van het cambiumtype. Vanuit deze cambiumcellen worden de meristeemprimordia opgebouwd.

1.3. Determinatie van de meristematische gebieden

De gebieden, die gevormd worden door deze zeer gededifferentieerde primaire meristeemcellen, vertonen in aanvang geen enkele bepaalde structuur. We kunnen in een vroegtijdig stadium de toekomstige wortelprimordia niet onderscheiden van de toekomstige stengelprimordia. De fundamentele oorzaken van de morfogenetische oriëntatie moeten nog steeds opgehelderd worden. Het schijnt, dat de determinatie van ongeorganiseerde zones tot "morfogenetische velden met wortelbestemming" meestal vroegtijdig plaatsvindt.

In het door Champagnat et al. (1967) goed bestudeerde geval van Nasturtium officinale, bestaan er in de bladoksels onbepaalde meristematische zones, die in staat zijn zich tot de wortel of scheut te ontwikkelen, afhankelijk van de groeistof die als "effector" wordt gebruikt (auxine of cytokinine).

2. Hormonale regeling van de beworteling

2.1. Stimulerend effect van het blad of de scheut

Het is soms mogelijk om de vorming van nieuwe wortels uit stengelinternodiën of andere orgaanfragmenten zonder bladen en knoppen waar te nemen. Talrijke proeven, waarbij knoppen wel of niet werden afgesneden hebben duidelijk en doorslaggevend het stimulerend effect van knoppen op de wortelvorming aangetoond. Het aantonen van de betekenis van een stof met polair transport ligt aan de basis van het begrip hormonale regeling van de wortelvorming. Bij houtige gewassen kan ringen beworteling van de bebladerde stek verhinderen. Om dit toch mogelijk te maken is het voldoende om een klein stukje floëem over te laten. De wortelvorming blijkt dus gestimuleerd te worden door een stof, die in basipetale (naar beneden gerichte) richting wordt vervoerd. Aangezien een klein aantal geleidende cellen voldoende is om het transport te verzekeren, denkt men eerder aan een stof met hormonaal

karakter, die in lage concentraties werkt, dan aan energiedragers.

De stimulerende stof of stoffen ontstaan wellicht bij de fotosynthetische activiteit van de bladen; ze zouden eveneens uit de jonge bladen van de knop in actieve groei en desnoods uit de top zelf kunnen voortkomen. Het effect van de knop kan van het jaargetijde afhangen: de knoppen van bepaalde bomen (populier) kunnen in de lente stimuleren, maar in de winer remmen.

De stimulans, die uitgaat van het blad of de knop is meestal bevorderend voor wortelvorming. Men heeft ook gedacht aan remstoffen (Julliard 1963), die vooral waargenomen zijn als de okselknop dicht bij de voet van de stek staat. Bladen, die stimuleren als ze jong zijn, kunnen soms gaan remmen als ze oud zijn.

2.2. Opvatting van een specifiek rhizocaline

De eerste samenhangende opvatting over de mechanismen van wortelworming werd geformuleerd door Bouillenne (1950). De vorming van nieuwe wortels zou door de werking van een mobiele stof veroorzaakt worden. Deze zou in het blad worden gesynthetiseerd en zich op polaire wijze naar de voet van de stengel bewegen. Deze hypothetische specifieke stof voor wortelvorming wordt "rhizocaline" genoemd. Deze zou getransporteerd worden door het floëem en zich ophopen in de knoppen, de cotylen en de zaden. De hypothese steunde op talrijke ontbladerings- en entproeven. Bepaalde entingen tussen taxonomisch ver uit elkaar staande soorten gaven het idee, dat deze factor wijd verbreid voorkomt en misschien zelfs wel universeel is.

2.3. Auxine en wortelvorming

Men is op de gedachte van de centrale rol van auxine bij de hormonale vorming van wortels gekomen door de toepassing van exogeen auxine en door dosering van deze groeistof.

De toepassing van IAA bevordert vaak de beworteling van stekken. Dergelijke resultaten kan men dikwijls ook met synthetische auxinen bereiken. Het meest werkzaam zijn in het algemeen α-naftylazijnzuur (NAA), β-indolylboterzuur (IBA) en β-indolylpropionzuur (IPA), die alleen of gemengd worden toegepast. Deze stoffen worden in de tuinbouw en de boomteelt volop toegepast.

De concentratie van endogeen auxine, bepaald door extracties en biologische toetsen, bevestigt de rol van auxine in de wortelvorming. De hoeveelheid auxine kan toenemen in relatie tot de vorming van nieuwe wortels

(Vardjan en Nitsch 1961). Ook kan auxine zich ophopen bij de knopen, waar zich vaak bij voorkeur wortels vormen (Kulesha 1952). De mechanismen van de werking van auxine op de wortelvorming zijn nog steeds onderwerp van discussie.

Door behandelingen met auxine heeft men veranderingen opgemerkt in de eiwitsynthese. Men is zelfs verder gegaan bij het bestuderen van de veranderingen, die de histonen betreffen, en men heeft een effect van auxine op de derepressie van specifieke genen verondersteld (Fellenberg 1969). De auxinen zouden eveneens op de suikersynthese kunnen inwerken door de hydrolyse en het snelle metabolisme van zetmeel te bewerken. Het werk van Carlier en Van Hove (1964) doet veronderstellen, dat een behandeling met auxine de afbraak van glucose zou kunnen sturen in de aërobe richting van de glycolyse.

Het is evenwel niet zeker, dat de toepassing van exogeen auxine (vooral van de synthetische producten in hoge en niet fysiologische concentraties) altijd vergelijkbare effecten heeft met die van het natuurlijke hormoon.

In de praktijk van het stekken onderscheidt men vaak twee fasen: de aanleg van meristemen wordt vaak bevorderd door toevoeging van exogeen auxine van betrekkelijk hoge concentratie (10^{-7} tot 10^{-5} M), terwijl de latere groei van de wortels een zeer lage auxineconcentratie vereist.

Volgens Gaspar et al. (1977) bestaan er verscheidene opeenvolgende fasen in het proces van de vorming van nieuwe wortels aan een stek van de den. In de voorbereidingsfase van inductie van de wortelvorming is er toename van de activiteit van peroxydase en afname van de auxineconcentratie. Gedurende de aanlegfase zien we een omslag: het endogene auxine neemt toe en de activiteit van peroxydase neemt af. De toepassing van gibberelline (GA3), die zou kunnen leiden tot de toename van de concentratie endogeen auxine, remt de wortelvorming gedurende de eerste fase en stimuleert dit gedurende de tweede fase.

2.4. Interactie van factoren

Het blijkt nu duidelijk, dat auxine niet de enige factor bij de wortelvorming is. Toevoeging van auxine aan stekken helpt in tamelijk veel gevallen niet. Soms is het effect alleen duidelijk bij een eerste toepassing. Na het wegnemen van de nieuwgevormde wortels blijft een tweede toepassing dan zonder resultaat. Alles verloopt alsof een reeds vooraf in de stek bestaande factor tot wortelvorming, die door auxine gemobiliseerd wordt of er zich mee combineert, snel is uitgeput.
substraat (zie Tabel V).

Na talrijke proeven vooral met stukken van Impatiens balsamina heeft Bouillenne (1964) het begrip "wortelvormend complex" ("complexe rhizocalinique") geformuleerd. Het bevat tenminste drie elementen: 1. een onbekende mobiele factor, die in het licht in het blad wordt gevormd en op een polaire wijze migreert; 2. auxine; 3. een factor, die alleen in bepaalde cellen voorkomt, en de fixatie en combinatie van de twee eerste factoren bewerkt. Deze reactie zou deel uitmaken van een oxydatie of aëroob metabolisme. Een aantal feiten doet veronderstellen, dat fenolverbindingen deel uitmaken van het rhizocaline-complex. Deze verbindingen zijn geëxtraheerd uit planten die zich gemakkelijk laten stekken (Hess 1964). De toevoeging van exogene orthodifenolen aan stekken heeft in bepaalde gevallen de wortelvorming bevorderd (Paupardin 1969). Veel onderzoek heeft aangetoond, dat difenolverbindingen, zoals chlorogeenzuur en cafeïnezuur, remmers zijn van auxineoxydase. De werking van fenolverbindingen zou direkt of indirekt kunnen zijn door de bescherming van auxine of de stimulering van de vorming van auxine. Het effect van toepassing van fenolverbindingen is trouwens niet algemeen, en er bestaat twijfel over hun specificiteit met betrekking tot de wortelvorming.

Eventuele cofactoren van de wortelvorming zouden eveneens tot andere groepen stoffen kunnen behoren. Hess (1964) heeft van de jeugdvorm van klimop (Hedera helix), die zich gemakkelijk laat stekken, meerdere stoffen geïsoleerd, die op de wortelvorming werken, waaronder een geöxydeerde terpenoïde verbinding. Hemberg (1953) heeft waargenomen, dat vitamine K1, dat op zich geen effect heeft, synergistisch werkt met het auxine bij de beworteling van boon.

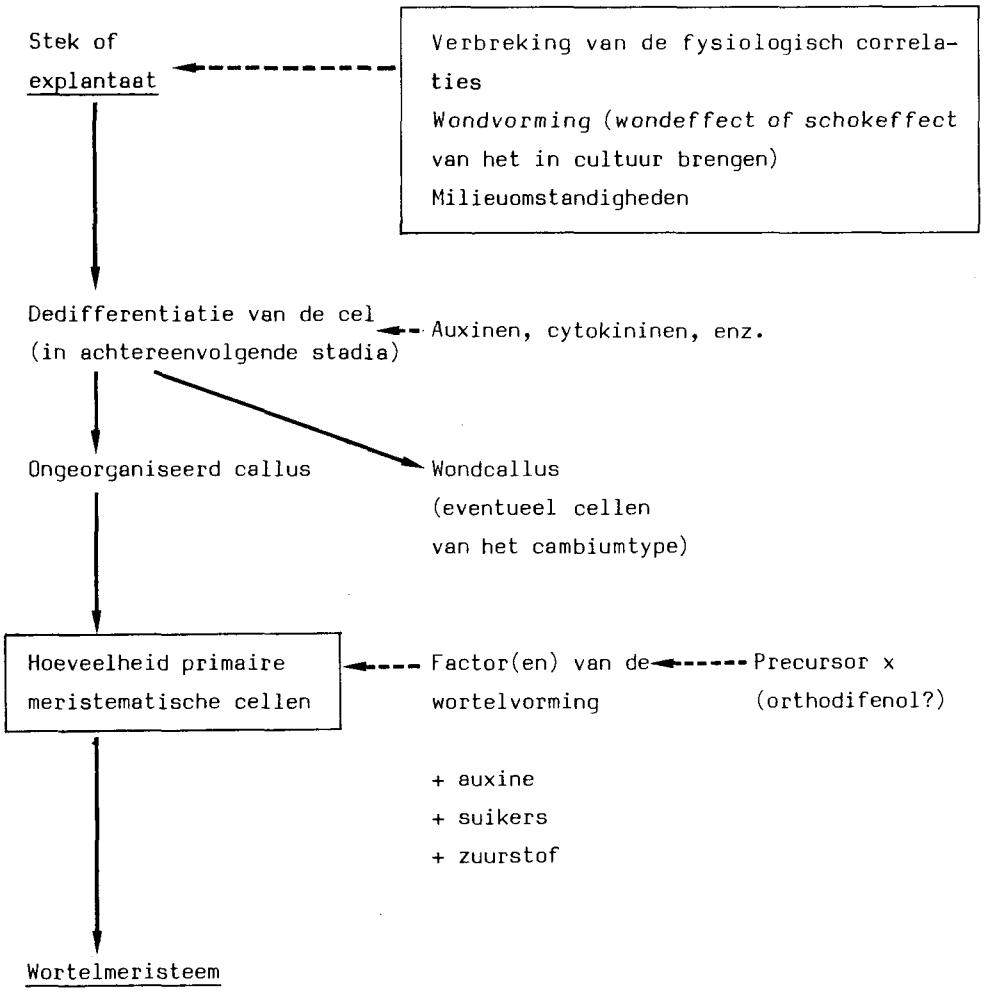
Sommige auteurs, vooral Libbert (1956a en b), hebben verondersteld, dat wortelvorming zou kunnen intreden door de opheffing van een remming. Het bestaan van de remstoffen is niet duidelijk aangetoond, ofschoon het schijnt, dat bepaalde wortels een diffundeerbare remstof kunnen bevatten, die de beworteling van stengelstukken verhindert. Men heeft soms aan remstoffen een remming toegeschreven die het gevolg is van een gebrek, veroorzaakt door het verminderen van gewone voedingsstoffen.

Het optreden van wortelvorming door de werking van stoffen is zeker een complex verschijnsel. Zelfs in een ver vereenvoudigde hypothese, zoals die van de interactie "auxine, auxine-oxydase en fenolen", zou het onvermogen tot aanleg van wortels kunnen voortkomen uit één van de volgende oorzaken: gebrek aan enzymen, gebrek aan activatoren van het enzym, aanwezigheid van remstoffen, gebrek aan fenolsubstraat en scheiding van het enzym en het

TABEL V

Stadia in de wortelvorming

Hypothetisch en vereenvoudigd schema



3. Verschillende factoren bij de wortelvorming

3.1. Omgevingsfactoren

Reeds vóór het gebruik van auxinen in de praktijk van het stekken, kenden de tuinbouwers en boomtelers een aantal omstandigheden, die de beworteling van stekken bevorderen.

- Zuurstofvoorziening van het milieu is altijd als gunstig voor de wortelvorming beschouwd. De keuze van het substraat wordt gericht door de dubbele noodzaak om tegelijkertijd vocht en drainage te verkrijgen.
- Een hoge temperatuur (20 tot 25 °C) bevordert de wortelvorming; vandaar het nut om stekbakken met warm water of electrische stroom te verwarmen.
- De optimale pH hangt van het gewas af. We weten al lang, dat bepaalde planten zuurminnend zijn (azalea's); stekken van Coleus daarentegen verdragen een uitgebreid scala pH-waarden.
- In bepaalde gevallen bevordert aanvullende belichting de beworteling van bebladerde stekken, zonder dat men precies weet of het gaat om een fotoperiodisch effect of werking op de synthese van endogene groeistoffen met de fotoperiodiciteit als tussenschakel.
- Watergeven met mist of kunstmatige nevel geeft vaak uitstekende resultaten, vooral bij kruidachtige stekken. De mist heeft verscheidene effecten: reductie van het waterverlies, verlaging van de temperatuur bij het blad en reductie van de transpiratie. Het maakt het tegelijkertijd mogelijk om op de stek een groter bladoppervlak te handhaven, dat een betere assimilatie met zich meebrengt.
- De behandeling van stekken met antitranspirantia is soms toegepast als het gebruik van nevel niet mogelijk was (Whitcomb en Davis 1970).

3.2. Factoren verband houdend met de herkomst van de stek

De tuinbouwpraktijk toont overduidelijk het wezenlijk belang van de herkomst van de stek voor de beworteling aan. Genetische factoren spelen ongetwijfeld een beslissende rol. Bij dezelfde soort bewortelen bepaalde cultivars gemakkelijk en andere juist moeilijk. De reserves, die de stek met zich meebrengt, vooral aan suikers, bevorderen de wortelvorming, evenals de productie van voedingsstoffen, die verband houden met de fotosynthetische activiteit.

De leeftijd van de moederplant is een algemeen bekende factor. De stekken van jonge planten hebben in het algemeen een beter vermogen tot vorming van wortels dan die van oude planten. Bij houtige gewassen is de beworteling van stekken vaak slechts van jonge gezaaide planten mogelijk.

Gradiënten in vermogen tot wortelvorming heeft men vaak waargenomen afhankelijk van de plaats van de stek op de plant. Het komt vaak voor, dat zijtakken, die vlak bij de voet van de stengelas weggenomen worden, een goed vermogen tot wortelvorming vertonen. Bij veel kruidachtige gewassen maken de stekken met een vegetatieve knop, genomen vanaf een bloeistengel, alleen wortels als ze van het onderste deel van de plant komen, dat het verst verwijderd is van het bloeiende gedeelte (voorbeeld: suikerbiet). Er bestaat geen exacte regel over deze gradiënten. Bij de gladiool b.v. vertonen de schijfjes, die van de stengel van de bloeiwijze komen daarentegen een goed vermogen tot wortelvorming (Ziv et al. 1970).

De gradiënten in vermogen tot wortelvorming schijnen soms overeen te komen met histologische verschillen. Bij Coleus blumei (Moureau 1941) b.v., bevatten de internodiën, die uitzonderlijk goed bewortelen, cambium, dat bezig is zich te dedifferentiëren. Bij houtige gewassen tonen de adventieve scheuten, die gevormd worden na het weghalen van het hout, vaak morfologisch en fysiologisch juveniele eigenschappen, waaronder het vermogen tot wortelvorming.

Herhaald snoeien kan de overblijvende scheuten in staat stellen om verschillende juveniele eigenschappen terug te krijgen, vooral het vermogen tot beworteling. Deze methode wordt vooral gebruikt bij houtige gewassen die lastig bewortelen. Franclet heeft het gepresteerd om noten te stekken, iets dat voor onmogelijk gehouden werd. Onder de omstandigheden van de weefselkweek van scheuten, die van de moederplant afgescheiden zijn, is beworteling gelijktijdig met het opnieuw verkrijgen van juveniele eigenschappen waargenomen bij wijnstok (Galzy 1969) en bij verschillende houtige of kruidachtige gewassen (Nozeran en Bancilhon 1972).

3.3. Fysiologische correlaties en wortelvorming

Onder natuurlijke omstandigheden en ook bij het stekken gaat de wortelvorming onder invloed van fysiologische correlaties, d.w.z. van invloeden uit zones, die min of meer verwijderd liggen van de plaats waar de wortels zich vormen. We hebben de invloed van scheuten of bladeren op de wortelvorming al genoemd. De al reeds bestaande wortels blijken vaak een remmend

effect op de latere vorming van adventieve wortels te hebben. Het stimuleren van de aanleg van zijmeristemen door het wegnemen van de worteltop is een algemene waarneming (Torrey 1950).

4. Wortelvorming in de weefselkweek

De techniek van het in vitro kweken van weefsels en organen kan een belangrijke bijdrage leveren aan de studie van het determinisme van de wortelvorming, doordat dit het onderzoek vergemakkelijkt onder beter gedefinieerde omstandigheden; ook bevordert dit het histologisch en histochemisch onderzoek.

Het isoleren van een explantaat onderdrukt of beperkt fysiologische correlaties, vooral de invloeden van scheuten en bladeren. We kunnen dan proberen dit te compenseren door het toedienen van bekende groeistoffen en zo de interacties bestuderen van de factoren die een rol spelen. De herkomst van het explantaat (genetische factoren, fysiologische leeftijd) kan een beslissende invloed hebben, wat inhoudt, dat belangrijke factoren nog onbekend zijn. Twee verschillende situaties kunnen zich voordoen.

4.1. Uitgangsexplantaat geschikt voor wortelvorming

Het kan dit vermogen in de loop van achtereenvolgende overentingen verliezen. Het probleem wordt dan het zoeken naar omstandigheden om de wortelvorming te handhaven en naar factoren die het verlies veroorzaken.

De wortelprimordia kunnen ontstaan uit verschillende weefsels: cambium, floëem en xyleem. Bij peen, bestudeerd door Buvat (1945), hebben de wortelmeristemen, die uigaan van het floëem, twee verschillende herkomsten. Sommige komen uit wortelvormende zones, op de plaats van oude wortelharen; andere zijn ontstaan uit het opnieuw zich afzonderen en dedifferentiëren van parenchymcellen. Dit laatste type orgaanvorming vereist duidelijk hogere concentraties IAA.

Afhankelijk van het gewas kan de vorming van wortels op een explantaat gepolariseerd zijn. Deze polariteit uit zich op verschillende manieren. Op stukken verdikte wortel bij witlof vormen de nieuwe wortels zich bij voorkeur aan de wortelpool van het explantaat, en de scheuten aan de bladpool; maar alléén indien een cylindrisch explantaat van voldoende grote afmetingen geplaatst wordt op een medium zonder auxine. Veranderingen in de omstandigheden van de kweek, vooral toediening van auxine in hoge concentratie,

kunnen de oorspronkelijke polariteit verstoren (waarnemingen van de auteur).

Bij bloemkool worden uit stukken bloemstengel de wortels en de scheuten in het basale gebied van het explantaat gevormd, indien de bodem een auxine in lage concentratie bevat; ook daar kan het verhogen van de auxineconcentratie of het toevoegen van een cytokinine de polariteit eranderen (Margara 1969).

4.2. Uitgangsexplantaat aanvankelijk ongeschikt voor wortelvorming

Dit vermogen wordt dan secundair verkregen als gevolg van de kweek, of het uit zich onder invloed van interactie van factoren, die meer of minder complex zijn. Spanjersberg en Gautheret (1963) gebruikten gestandaardiseerde stukjes van de knol van de aardpeer als modelmateriaal voor proeven. In dit voorbeeld werken een bepaald aantal factoren samen om beworteling teweeg te brengen: toevoeging van een auxine (NAA), en suiker (glucose), aanwezigheid van mineralen, eventuele toevoeging van gibberellinezuur, licht en temperatuur.

Licht heeft een sterk stimulerende invloed. Het kan werken bij zeer lage intensiteit of gedurende een korte duur (600 lux gedurende minder dan een uur); de optimale continue temperatuur ligt bij 26 ^{o}C. Afwisseling met een lagere temeratuur (15 tot 5 ^{o}C) stimuleert de beworteling met licht, suiker en auxine.

* * *

Beworteling komt, zoals elk verschijnsel van orgaanvorming, tot stand door de interactie van "effectors" en "receptorplaatsen". Ook al kent men stoffen (auxine, fenolverbindingen) en omstandigheden, die de vorming van nieuwe wortels teweegbrengen of bevorderen, men weet nog steeds niets van de werkelijke fysiologische mechanismen af.[1] Men kan zich vooral afvragen op welk niveau de specificiteit van het wortelvormingsmechanisme gezocht moet worden. Men heeft lang geprobeerd om de orgaanvorming door een hormoonspeci-

---

1) Zie als overzichtsartikelen: Bouillenne 1950; Libbert 1956a en b; Torrey 1956; Gautheret 1969; Julliard 1973; Leroux 1973 en het recentere werk van Favre (1977).

ficiteit te verklaren. Men is geneigd om de specificiteit in het licht te zien van "receptorplaatsen", waar de "morfo-genetische velden" zich bevinden i.p.v. "effectors"; en op het niveau van de nucleïnezuren i.p.v. hormonen.

B. SCHEUTVORMING*

Het bepalen van de omstandigheden van scheut- of stengelvorming blijft het centrale punt van de vegetatieve vermeerdering. Elke vegetatieve vermeerdering vereist de aanwezigheid van vegetatiepunten en hun vermeerdering.

Het wezenlijke van onze kennis over de scheutvorming komt voort uit het onderzoek met weefselkweek, hetgeen hier vooral belicht zal worden.

1. Verschillende soorten scheuten

De "scheutvorming" in de meest uitgebreide betekenis omvat tegelijkertijd de aanleg en de ontwikkeling van eindscheuten, axillaire en adventieve scheuten en die welke op een callus worden gevormd.

De hoofdknop is afgeleid van de kiem in het embryo.

Okselknoppen ontwikkelen zich in de oksels van de bladeren uit cellen, die meristematisch gebleven zijn of van cellen, die in staat zijn tot dedifferentiatie.

Adventieve knoppen worden door verschillende organen gevormd: blad, stengelinternodium, knol, wortel en bloemstengel. Ze kunnen ontstaan uit cellen, die een meristematisch karakter bewaard hebben: "doelwitcellen", die een bevoorrechte plaats innemen of uit cellen, die geen bijzondere eigenschappen hebben, maar wel tot dedifferentiatie in staat zijn. De scheuten, die op een callus in de weefselkweek gevormd worden, mogen beschouwd worden als een bijzonder geval van adventieve scheuten.
Onder natuurlijke omstandigheden ontstaan de adventieve scheuten tamelijk vaak uit oppervlaktecellen en men stelt vanouds de oppervlakkiger herkomst van scheuten tegenover de dieper gelegen herkomst van wortels. De plaats van de scheutvorming is evenwel uiterst variabel.

2. Hormonale regeling van scheutvorming

Het laten ontstaan of het stimuleren van de scheutvorming in de weefselkweek is het gevolg van het gebruik van cytokininen, soms gekoppeld aan

auxinen. Na de waarnemingen bij tabaksmerg (Skoog en Miller 1956; Skoog 1971), welke dikwijls bevestigd zijn bij andere gewassen, wordt algemeen aangenomen, dat de scheutvorming op een callus onder invloed staat van interacties tussen cytokininen en auxinen.

Het probleem is evenwel verre van eenvoudig, want de reactie op groeistoffen is sterk afhankelijk van het gewas.
We zullen enkele van de belangrijkste factoren bekijken.

2.1. Opvatting over de verhouding in de concentratie cytokininen en auxinen

Bij tabaksmerg (Skoog 1971) blijken de twee typen groeistoffen (cytokininen en auxinen) niet alleen door hun concentraties in absolute waarde te werken, maar hoofdzakelijk door de verhouding van hun concentraties. De scheutvorming vereist verhoudingsgewijs een hoge verhouding cytokinine-auxine. Zo kan het verhogen van de concentratie van auxinen het noodzakelijk maken die van cytokininen eveneens te verhogen.

Generaliserend zou de scheutvorming afhangen van een optimale verhouding van de totale concentraties van exogene en endogene cytokininen en auxinen. De polariteit van de scheutvorming, die men vaak ziet bij de wortel van witlof, zou men door een complexe biochemische polariteit kunnen verklaren als gevolg van veranderingen van de respectievelijke concentraties aan endogene cytokininen en auxinen (Vardjan en Nitsch 1961). Als de scheutvorming inderdaad afhangt van de verhouding van de concentraties aan groeistoffen i.p.v. de absolute waarden, dan zou men tenminste in bepaalde gevallen scheutvorming kunnen laten optreden door de concentratie van endogeen auxine te verlagen. Inderdaad is het b.v. bij tabak mogelijk geweest de scheutvorming te bevorderen door de toepassing van bepaalde fenolverbindingen (Lee en Skoog 1965), die zouden kunnen werken door het niveau van de endogene auxinen te verlagen door de tussenkomst van hun stimulerende werking op de activiteit van auxine-oxydase.

Eveneens heeft de toevoeging van anti-auxinen soms de scheutvorming bevorderd. We noemen als voorbeeld N-1-naftylftaalzuur bij tabak (Feng en Link 1970) om de werking te bevorderen van 2,4,6-trichloorfenoxyazijnzuur op de embryovorming van peen (Newcomb en Wetherell 1970).

Bij Armoracia rusticana merkt Sastri (1963) het omgekeerde van het klassieke gedrag op. De toevoeging van auxine bevordert de scheutvorming. Verhoging van de kinetineconcentraties remt dit.

2.2. Begrip concentratiedrempel

De rol van de interacties tussen cytokininen en auxinen in de regulering van scheutvorming wordt door niemand bestreden. In bepaalde gevallen lijkt het of de overschrijding van een bepaalde drempelconcentratie van één van de twee groeistoffen, soms van allebei tegelijk, tot scheutvorming aanleiding geeft.

Padmanabhan et al. (1974) veranderden de richting van de orgaanvorming bij tomaat door de concentratie van de groeistoffen te verhogen zonder hun verhouding te veranderen. Bij IAA (2 mg/l) en kinetine (4 mg/l) treedt scheutvorming op. In andere gevallen kan men volstaan door aan het cultuurmedium één van de twee groeistoffen (cytokinine of auxine) toe te voegen, waarbij het gelijktijdig toevoegen niet noodzakelijk is. Dit is met name het geval bij bloemkool (Margara, 1969, 1977b). Indien men stelt, dat het oorspronkelijke explantaat de twee typen groeistoffen in een suboptimale concentratie bevat, zou de toevoeging van één van beide groeistoffen voldoende zijn om scheutvorming te laten ontstaan. Dit verschijnsel schijnt in tegenspraak met de hypothese van Skoog, die vaak als een dogma beschouwd wordt, volgens welke juist de verhouding van de concentratie van cytokininen en auxinen (endogeen of exogeen) bepalend zou zijn. We merken trouwens op, dat het grootste aantal nieuwe scheuten verkregen wordt met betrekkelijk hoge concentraties van de twee groeistoffen.

2.3. Soort auxine en cytokinine

Er schijnt geen algemene regel over de werkzaamheid van de verschillende auxinen en cytokininen op scheutvorming te bestaan, omdat de effecten wezenlijk met het plantmateriaal blijken te verschillen.

De meest gebruikte auxinen zijn IAA, NAA en IBA. De werking van NAA, IBA en IPA bij bloemkool is gelijk. Bloemkool (Margara 1977b) is een bijzonder interessante plant, omdat auxine alleen al scheutvorming kan geven. NAA werkt over een grotere concentratiereeks en is al zeer werkzaam in lage dosering (5.10^{-7} M). IAA is veel minder actief. Fenylazijnzuur, een zwak auxine, is nog minder werkzaam. 2,4-D bevordert de callusvorming en kan onder bepaalde omstandigheden de vorming van somatische embryo's induceren, maar de invloed op de scheutvorming blijkt erg zwak te zijn.

Bij de tomatehypocotyl merkt Ohki (1976) daarentegen een duidelijk effect op van IAA (5.10^{-6} M) samen met 2 iP (isopentenyladenine). Kinetine

is om historische redenen het meest gebruikte cytokinine. Het wordt dikwijls verdrongen door benzyladenine.

De werkzaamheid van het cytokinine varieert met het plantmateriaal (zeatine, isopentenyladenine, benzyladenine en kinetine). Bui Dang Ha (1974) neemt b.v. scheutvorming waar op aspergecallus door benzyladenine, maar niet door zeatine.

2.4. Volgorde van de groeistoffen

In zijn oude proeven met peen had Levine (1950) als eerste opgemerkt, dat men scheutvorming kon verkrijgen door onderdrukking van het auxine uit het voedingsmedium.

Op het ogenblik is het gebruikelijk om een reeks van voedingsmedia te gebruiken in alle gevallen waar scheutvorming niet op het uitgangsexplantaat ontstaat, maar secundair voorkomt op een callus, dat meerdere malen is overgezet.

De klassieke volgorde bestaat uit:

- Eerste medium. Toevoeging van een sterke auxine (b.v. 2,4-D 10^{-7} tot 10^{-6} M) of van een zwakkere auxine in hoge concentratie (IBA of NAA 10^{-6} tot 10^{-5} M) eventueel samen met een cytokinine in lage concentratie.
- Tweede medium. Onderdrukking of verlaging van de concentratie van auxine en toevoeging of verhoging van de concentratie van een cytokinine. Het verkrijgen van scheutvorming bij een groot aantal gewassen, die spontaan geen adventieve scheuten maken, is het gevolg van het gebruik van auxinen en cytokininen.

De belangrijkste punten zijn: keuze van de groeistof, gebruikte concentratie en de uiteindelijke volgorde.

2.5. Effect van verschillende groeistoffen

Het effect van abscicinezuur (ABA) op de scheutvorming is slechts zeer zelden waargenomen. Yamaguchi en Nakajima (1974) zien een stimulerende invloed van ABA op de scheutvorming in vitro bij aardappel.

Bij komijn (Carum carvi) ziet Ammirato (1974) een effect van ABA in lage concentratie (10^{-6}, 10^{-7} M) op het normale verloop van de embryogenese. Levine (1950) was op het idee gekomen om de eventuele invloed van kankerverwekkende stoffen te bestuderen (benzanthraceen, dimethylcholanthreen).

Een bevorderend effect op de scheutvorming is gesignaleerd bij haploïd tabakscallus (Street 1979) na androgenese* vanuit pollencellen.

De effecten van de gibberellinen op de scheutvorming schijnen met het plantenmateriaal te variëren. Stimulering is maar zelden waargenomen (Margara 1969). De gibberellinen schijnen meestal een remmende werking uit te oefenen op de inductie van de stengelvorming, maar soms wel een stimulerend effect te hebben op de latere groei van de meristemen. In de meristeemcultuur worden de gibberellinen vaak in lage concentraties gebruikt om het aan de groei brengen van meristemen te bevorderen. Morel en Muller (1964) hebben als eersten deze invloed van gibberellinen aangetoond bij de meristeemcultuur van aardappel. Bij tabak is het remmende effect van gibberellinen op de scheutvorming bijzonder duidelijk. Het kan al voorkomen bij lage concentraties waarbij callusgroei goed mogelijk is (b.v. 10^{-6} M). Dit effect is bij zeven gibberellinen waargenomen (Murashige 1965) en door meerdere auteurs bevestigd.

In de proeven van Engelke et al. (1973) wordt dit remmende effect van gibberelline echter ongedaan gemaakt door de gelijktijdige toevoeging van een hoge concentratie cytokinine (25 mM), namelijk isopentenyladenine.

De proeven van Aghion-Prat (1965) met tabak laten verschillende effecten van gibberellinezuur zien. We kunnen drie verschillende typen morfogenese onderscheiden:

a. Wanneer een stuk van een bloemsteel op een medium wordt geplaatst met gibberellinezuur (1 mg/l) zien we callusvorming zonder scheutvorming.
b. Als het explantaat van de bloemstengel pas 6 dagen na de isolatie wordt overgezet op het medium met gibberelline ziet men scheuten ontstaan, die vegetatief blijven.
c. Indien de toepassing van gibberelline na 15 dagen plaatsvindt wordt de bloemaanleg versterkt vergeleken met de controle.

3. Verschillende factoren bij scheutvorming

De wezenlijke rol van de "interactie tussen cytokininen en auxinen" bij de scheutvorming mag als een bijzondere vondst beschouwd worden. In de praktijk is het juist het gebruik van deze groeistoffen, dat het mogelijk heeft gemaakt scheutvorming bij een zeer groot aantal gewassen te initiëren.

We zullen beknopt enkele klassieke gegevens over de invloed van de herkomst van de weeefsels vermelden en het belang van de klimaatsfactoren aangeven. Bovendien tonen de effecten van de verschillende groeistoffen, die vaak afhangen van het gewas en de wijze van toepassing, goed de complexiteit van de interacties aan. Toch blijkt de invloed van deze stoffen vaak alleen bij sommige organen of weefsels van een bepaald gewas. Dit feit op zichzelf al doet het bestaan van regulatoren of metabolieten veronderstellen die nog niet bekend zijn.[1)]

3.1. Fysische factoren

a. Vloeibare of vaste voedingsmedia.

De meeste proeven over de scheutvorming in de weefselkweek zijn uitgevoerd met vaste agar-voedingsmedia. Skoog (1944) verkreeg scheutvorming op tabakscallus door de cultures van een agarbodem over te brengen naar een vloeibaar medium.

Wimber (1965) maakte gebruik van vloeibare schudcultures voor de kweek van protocormen van Cymbidium (Orchidaceae). Homès et al. (1973) gebruikten stationaire vloeistofculturen (hetgeen wel een licht zuurstofgebrek met zich meebrengt), om de ontwikkeling van de protocormen van Cymbidium naar een versnelde vermeerdering van adventieve protocormen te sturen.

b. Licht

Het effect van licht op de scheutvorming is maar weinig bestudeerd. De gegevens zijn vaak onnauwkeurig en tegenstrijdig. Weefsels van bepaalde gewassen maken alleen maar scheuten in het licht. Dit is het geval bij bloemkool (Margara 1969). In continu donker kunnen de stengelstukken van de bloeiwijze een overvloedige callusvorming vertonen, maar ze vormen nooit scheuten. Na meerdere weken in het donker blijken de cultures wanneer ze in het licht gebracht worden het aanvankelijk vermogen tot scheutvorming te hebben verloren.

---

1) Van de verbindingen, waarvan het interessant zou zijn wat dieper in te gaan op de rol bij de orgaanvorming, noemen we de fenolamiden, die bij tabak samen schijnen te hangen met de bloei-inductie (Cabanne et al. 1977a, b; Cabanne 1980).

Bij de scheutvorming uit bladweefsel bij witlof (Legrand 1972) beïnvloedt het licht de scheutvorming slechts gedurende de eerste dagen van de kweek ongunstig. Bij tulp krijgt Bancilhon (1974) uitsluitend in het donker scheutvorming op weefsels van de bloeiwijze. Andere gewassen, b.v. witlof en begonia, blijken indifferent te zijn. We weten niet of dit lichteffect wel of niet verband houdt met het phytochroom.

Terwijl veel gewassen voor hun bloei-inductie uitgesproken eisen aan de daglengte stellen, blijkt scheutvorming meestal onafhankelijk van de daglengte te zijn. We noemen echter toch het uitzonderlijke geval van Pelargonium, waarbij de scheutvorming door lange dag wordt bevorderd (Pillai en Hildebrandt 1969).

Bij het mos Physcomitrium turbinatum staat de scheutvorming in lineaire relatie met de lichtintensiteit in het gebied van 300-700 lux (Nebel en Naylor 1968). Murashige (1974) vindt een optimum bij betrekkelijk lage intensiteit (1000 lux) voor de aanleg van adventieve scheuten bij Gerbera saxifraga.

c. Temperatuur.

De gegevens over de invloed van de temperatuur zijn nog schaarser. De meest gebruikte temperatuur in de kweekruimten is ongeveer 25 °C (Murashige 1974).

Bij Begonia blijkt de optimale temperatuur voor scheutvorming duidelijk lager te liggen, ongeveer 15 tot 18 °C (Fonnesbech 1974).

3.2. Plaats van de scheutvorming

a. Exacte plaats van de scheutvorming.

De exacte plaats van de scheutvorming is in enkele gevallen bekend. Een typisch voorbeeld is het blad van Begonia rex (Prévot 1948; Bigot en Chlyah 1970; Bigot 1972). In dit geval komen de scheuten, die op bladstukjes gevormd worden, altijd uit cellen in de direkte omgeving van de haren van de epidermis. Deze cellen zien er trouwens gewoon uit en zijn betrekkelijk gedifferentieerd. Pas na het afsnijden van het blad beginnen ze te dedifferentiëren. In de weefselkweek stimuleert benzyladenine de scheutvorming en deze werking vindt vroegtijdig plaats; reeds vanaf de derde dag na het inzetten blijkt dit uit een aanzienlijke toename van de pyroninofilie van de celkernen, die grenzen aan de voet van de klierharen. Benzyladenine schijnt geen mitotisch effect te hebben op de andere cellen.

In dit voorbeeld van Begonia rex dedifferentiëren de cellen, die de scheutprimordia zullen opleveren, na het wegnemen van de stek of het explantaat. Bij Bryophyllum daigremontianum liggen de primaire meristemen, die de epiphylle scheuten zullen vormen, op een exact bepaalde plaats in de insnijdingen van de bladschijf. De scheutvorming gaat gewoonlijk optreden onder invloed van korte dag op de gehele plant. Hier is het niet nodig stukken af te snijden noch fysiologische correlaties te verbreken.

b. Niet gelokaliseerde scheutvorming uit gewone cellen.

In andere gevallen kunnen de nieuwe scheuten ontstaan uit een betrekkelijk gedifferentieerd weefsel, zoals tabaksmerg, of uit een oorspronkelijk homogeen callus. Wanneer de scheuten gevormd worden op een callus, dat zelf voortkomt uit een suspensiecultuur of uit cultures van ééncellige oorsprong, zoals die van Lutz (1971) bij tabak, schijnt de scheutvorming geen verband te houden met een speciale herkomst van de cellen of een heterogeniteit van de weefsels, die veelvoudige correlaties met zich brengt.

3.3. Polariteit van de scheutvorming

De scheutvorming kan afhankelijk van het gewas en de experimentele omstandigheden op een min of meer duidelijke manier gepolariseerd voorkomen. We nemen algemeen aan, dat de morfologische polariteit aan het polaire transport van groeistoffen (auxine, enz.) ligt, dat zelf samenhangt met een polariteit op celniveau.

Als voorbeeld van uitgesproken polariteit noemen we Sansevieria trifasciata, Streptocarpus wendlandii en diverse Peperomia's, die bestudeerd zijn door Bigot (1965). Bij deze gewassen zien we op geïsoleerde bladschijfjes altijd scheut-, wortel- en callusvorming aan de basale pool van het explantaat.

De scheutvorming kan volgen op de beworteling, of omgekeerd eraan voorafgaan. Wanneer wortels en scheuten aan dezelfde pool ontstaan kunnen we meerdere hypothesen opstellen.

a. De beperkende factoren voor scheutvorming of beworteling zouden gelijk zijn.

b. De aanwezigheid van één der organen zou noodzakelijk zijn voor de vorming van andere. De eerst gevormde wortels zouden cytokininen kunnen vormen, die noodzakelijk zijn voor de scheutvorming. Als de scheuten daarentegen het eerst gevormd worden, zouden deze het noodzakelijke auxine kunnen leveren.

c. De scheutvorming volgt noodzakelijk op de beworteling en kan daar duidelijk niet aan voorafgaan, aangezien dit plaatsvindt op een callus, dat uit wortelweefsel komt, zoals bij de Peperomia's (Bigot 1965).

In andere voorbeelden vormen de scheuten en wortels zich in het algemeen aan de twee tegenover elkaar liggende polen van het explantaat. Dit is het geval bij wortelstukken van witlof op een agarmedium, die scheuten aan de bladpool en wortels aan de wortelpool maken. Deze polariteit kan gemakkelijk gewijzigd worden. Wanneer het cylindrische explantaat in vertikale stand licht in de agarbodem drukt wordt, verschijnen de scheuten uitsluitend aan de bovenpool in de richting waarin het wortelstuk geplaatst is, onafhankelijk van het feit of de bovenpool eeen blad- of een wortelpool is. In dit geval schijnt het agarmedium een remming uit te oefenen, die over de polariteit domineert.
Deze remming is trouwens zeer betrekkelijk, want als we bovenop het explantaat een ander wortelstuk zetten, gaan zich scheuten ontwikkelen aan de basale pool in contact met de voedingsbodem (waarnemingen van de auteur).

Toevoeging van groeistoffen aan het voedingsmedium verstoort in het algemeen de polariteit. Bij bloemkool b.v. (Margara 1969) kunnen de stukjes van de stengel van de bloeiwijze, die geïsoleerd zijn uit de bloemkool op een medium met een kleine hoeveelheid auxine (b.v. IBA 10^{-7} of 5.10^{-7} M) scheuten ontwikkelen. Onder die omstandigheden kan men vorming van kleine aantallen scheuten en wortels zien op een polaire wijze in de basale omgeving van het explantaat.

Na toevoeging van auxine in hoge concentratie zien we op apolaire wijze vorming van talrijke wortels en van enkele scheuten. Toevoeging van een cytokinine in hoge concentratie (b.v. benzyladenine 5.10^{-6} of 10^{-5} M) aan het basismedium kan de vorming van talrijke scheuten over de hele oppervlakte van het explantaat veroorzaken, samengaande met remming van de beworteling.

3.4. Herkomst van de weefsels

De scheuten kunnen in de weefselkweek op het oorspronkelijke explantaat verschijnen of op een callus, dat meerdere malen is overgezet. In het laatste geval kan de opeenvolging van verschillende media en omstandigheden een beslissende rol spelen. Het scheutvormende callus kan afkomstig zijn uit suspensie- of protoplastencultuur (zie literatuur bij Bajaj 1977).

Wanneer het organogene callus ontstaat uit een orgaandeel, dat verschillende weefsels omvat, zien we dikwijls een bijzonder vermogen tot scheutvorming bij bepaalde soorten weefsels: cambium, vaatparenchym of bastparenchym. Afhankelijk van het gewas zien we vaste regels of juist het naast elkaar bestaan van meerdere mogelijkheden.
Bij witlof toont Buvat (1945) het bijzondere vermogen tot scheutvorming aan van floëemcellen in de buurt van melksapvaten.

In de recentere studie van Rancillac (1973a en b) zien we soms een doorlopende samenhang tussen de gevormde scheut en het cambium waar deze uit voortkomt. Het stengelprimordium, dat dwars door de callusweefsels loopt, blijft door vaatelementen met het cambium verbonden.
In de weefselkweek kan men scheutvorming ook waarnemen in het parenchym zonder duidelijke relatie met het cambium (Camus 1949). De mate hangt duidelijk af van de aard van de weefsels in het explantaat. Deze is zeer groot bij cambium, groot bij floëem- en xyleemweefsels en zeer zwak of afwezig bij het schors- of mergparenchym.
Juveniele weefsels vertonen vaak een groter vermogen tot orgaanvorming dan weefsels van volwassen of verouderende organen. Zo zien we bij de suikerbiet, die moeilijk scheuten vormt, nooit scheutvorming op volwassen vegetatieve organen, maar uitsluitend op callus, gevormd door weefsels van kiemplantjes (Butenko et al. 1972). Dit kan eveneens optreden bij meristeemcultuur na een 'geforceerde verjonging' (rajeunissement provoqué) na ontwikkeling van een groot aantal axillaire scheuten, die onder invloed van een cytokinine gevormd zijn (Margara 1977a).
Bij chrysant hebben Sangwan en Harada (1977) het vermogen tot orgaanvorming van celculturen van verschillende herkomst met elkaar vergeleken. Uitsluitend cellen afkomstig van callus uit meristeemcultuur (van 1 tot 3 mm) waren in staat tot scheutvorming. Cellen van kweken van stengels, bladeren of wortels leverden geen scheuten op.
Bij de moeilijke houtige gewassen is scheutvorming gelukt door kiemplantjes te gebruiken (Ohyama en Oka 1978; Thomas en Vazart 1978). Twee bijzonder interessante manieren om scheutvorming te verkrijgen bij erg lastige soorten zijn het gebruik van meristematische weefsels (komend van kiemplantjes of nog beter uit embryo's) en de 'geforceerde verjonging' van weefsels. De versnelde ontwikkeling van okselscheuten door een cytokinine blijkt een eenvoudig en doeltreffend middel te zijn om 'juveniele' weefsels te krijgen, die vaak in staat zijn om een orgaanvormend callus te vormen.

TABEL VI

Voorbeelden van scheutvorming in de weefselkweek waaruit de verscheidenheid blijkt van de herkomst van de weefsels afhankelijk van het gewas (1)

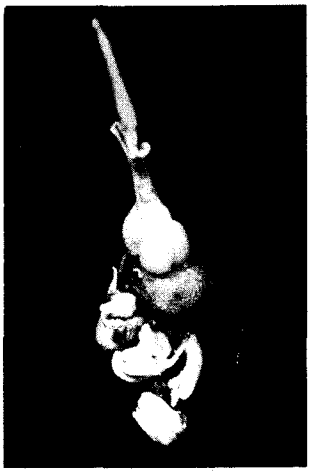
Familie	Gewas	Herkomst van het explantaat	Auteur
Agavaceae	Dracaena sp.	Stengel	De Bergh 1975
-	Sansevieria trifasciata	Blad, rhizoom	Hunault 1976
Amaryllidaceae	Alstroemeria sp.	Ovarium, bloemsteel	Ziv et al. 1973
Araceae	Anthurium sp.	Blad	Pierik en Steegmans 1976
Begoniaceae	Begonia rex	Blad (cellen aan de voet van de haren)	Bigot 1972
-	Begonia 'Rieger'	Kroonblad, bloemknop, blad	Margara (2)
Caricaceae	Carica papya	Embryo en kiemplantje	De Bruijne et al. 1974
Chenopodiaceae	Beta vulgaris	Kiemplantje	Atanasov en Kirindonov 1972
-	-	Bloemknop	Margara 1970b; 1977a
-	-	Blad van een kiemplantje	Rogozinska en Goska 1978
Compositae	Cichorium intybus	Wortel	Camus 1945
-	-	Bloemstengel	Margara 1965
-	-	Blad van het lof (cellen van onder de epidermis	Liebert en Tran Thanh Van 1972
-	Chrysanthemum morifolium	Blad	Broertjes et al. 1976
-	-	Blad	Earle en Langhans 1974
-	-	Bloemhoofdje	Wang en Ma 1978
-	Gerbera sp.	Blad	Pierik et al. 1973
Coniferae	Pinus palustris	Kiemplantje	Sommer et al. 1975
-	Pinus pinaster	Cotyl, hypocotyl	David et al. 1979
-	-	Cotyl, embryo	Rancillac 1979
Convolvulaceae	Convolvulus arvensis	Wortelcallus (celsuspensies)	Earle en Torrey 1965
-	-	Stengelcallus	Hill 1967
Crassulaceae	Crassula sp.	Blad	Murashige 1974

Familie	Gewas	Herkomst van het explantaat	Auteur
-	Kalanchloë sp.	Blad	-
-	Kalanchoë blossfeldiana	Blad, bloemstengel, bloemknop, juist geopende bloem	Margara (2)
Cruciferae	Brassica napus oleifera	Stengel	Kartha et al. 1974
-	-	Bloemknop	Margara en Leydecker 1978
-	Lunaria annua	Bladsteel	Pierik 1965
Cucurbitaceae	Cucurbita pepo	Vruchtwand (pericarp)	Schroeder et al. 1962
Cyperaceae	Cyperus sp.	Jonge knol	Fischer 1977
Dioscoreaceae	Dioscorea sansibarensis	Bulbil	Rao 1969
Gesneriaceae	Saintpaulia ionantha	Blad	Kukulczanska en Suszynska 1972
-	-	Blad, ovarium, kroonblad	Vasquez et al. 1977
Gramineae	Avena sativa	Wortels van het zaad	Carter et al. 1967
-	Eleusine sp.	Mesocotyl	Rangan 1976
-	Hordeum vulgare	Kiemplantje	Cheng en Smith 1975
-	Oryza sativa	Onrijp kiemwit	Nakano et al. 1975
-	Panicum miliaceum	Mesocotyl	Rangan 1974
-	Saccharum officinale	Stengelinternodium	Nickell 1964
-	-	Onrijpe bloeiwijze, jong blad	Heinz en Mee 1969
-	Triticum sp.	Kiemplantje	Shimada et al. 1969
-	-	As van de aar	Dudits et al. 1975
-	-	Kiemend embryo	Caramiello 1970
-	Zea mays	Embryo	Green en Phillips 1975
Iridaceae	Gladiolus sp.	Bloemstengel	Ziv et al. 1970
Liliaceae	Allium sativum	Bladschede	Havranek en Novak 1973
-	Allium porrum	Bolschijf	De Bergh en Standaert de Metsenaere 1976
-	Aloe pretoriensis	Stukje van het zaad	Groenewald 1975

Familie	Gewas	Herkomst van het explantaat	Auteur
-	Asparagus officinalis	Kiemplantje	Wilmar en Hellendoorn 1968
-	-	Stukje van de wortelspruit	Takatori et al. 1968
-	-	Bladachtige stengel (losse cellen)	Jullien 1973
-	-	Wortel, stengel	Hunault 1976
-	Haworthia sp.	Bloeiwijze	Kaul en Sabharwal 1970
-	Hemerocallis sp.	Nieuwgevormde wortel	Chen en Holden 1972
-	Lilium candidum	Bloemdelen (bloemdekbladen, meeldraden, vruchtbladen)	Astié en Coquen 1972 Coquen en Astié 1977
-	Lilium regale	Helmdraden	Montezuma de Carvalho et Guimaraes 1974
Liliaceae	Lilium x enchantment	Bloembodem	Bigot 1970
-	Muscari sp.	Bloemstengel, ovarium, stukje van de bol	Hussey 1975
-	Narcissus sp.	Bloemstengel, bladvoet	Seabrook et al. 1976
-	Scilla sp.	Bloemstengel, ovarium, basis van de bol	Hussey 1975
Meliaceae	Azadirachta indica	Embryo, kiemplantje	Rangaswamy en Promila 1972
Myrtaceae	Eucalyptus citriodora	'Lignotuber'	Aneja en Atal 1969
Polemoniaceae	Phlox drummondii	Bloemknop	Konar en Konar 1966
Rosaceae	Prunus amygdalus	Blad van kiemplantje	Mehra en Mehra 1974
Solanaceae	Nicotiana tabacum	Stengelmerg	Skoog en Tsui 1948
-	-	Weefsel van de epidermis en van onder de epidermis van bloemtak	Tran Thanh Van en Chlyah 1974
Ulmaceae	Ulmus campestris	Cambium	Jacquiot 1951

(1) Deze voorbeelden zijn gekozen uit een groot aantal publicaties om de verscheidenheid van weefsels en organen aan te geven, die als primair explantaat in de in vitro cultuur gekweekt worden voor scheutvorming. Bij bepaalde soorten kan scheutvorming op verschillende organen en weefsels voorkomen, terwijl bij andere de scheutvorming afhangt van de keuze van het weefsel. Deze tabel beperkt zich tot scheutvorming. Embryogenese, androgenese en de productie van axillaire scheuten in de meristeemcultuur zijn niet in de tabel opgenomen; maar in bepaalde gevallen kan men scheutvorming waarnemen samen met embryogenese.

(2) Ongepubliceerde waarnemingen van de auteur.



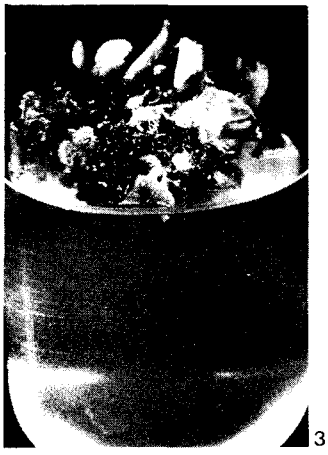


Fig. 12. Vegetatieve scheutvorming op bloemdelen (waarnemingen van de auteur).

1. Scheutvorming op callus aan de basis van een bietebloempje. Het optimale voedingsmedium bevat een auxine, een cytokinine en eventueel een gibberelline.
2. Het callus aan de basis van een koolzaadbloempje ontwikkelt zich tot een gestructureerd 'bolletje' waarin tracheïden worden gevormd en dat hier en daar met een epidermisachtig weefsel bedekt is. Het callus heeft evenals de 'vaatbevattende bolletjes' een sterk vermogen tot orgaanvorming en levert overvloedig scheuten op een bodem met een cytokinen (b.v. BA 5.10^{-6} M).
3. 'Meristemoïd callus' aan de basis van bloemen van Kalanchoë blossfeldiana op een ingewikkeld medium met kokosmelk, 2,4-D en een cytokinine. De meristemoïden ontwikkelen zich snel tot scheuten.
4. Scheutvorming in vitro op een bloemblad van Begonia cf Rieger. De meristemen vormen zich uit enkele gedefferentieerde cellen zonder tussenkomst van een callusfase. De nieuwvorming vindt polair plaats en begint in het basale gebied van het bloemblad en breidt zich hoe langer hoe meer uit.

3.5. Variatie van het vermogen tot scheutvorming afhankelijk van het gewas

a. De verscheidenheid aan gebruikte organen afhankelijk van het gewas. De bestudering van Tabel VI, die overigens slechts een aantal voorbeelden geeft van de vele publicaties, toont de extreme verscheidenheid van organen, die van gewas tot gewas gebruikt worden, met als doel scheutvorming in de weefselkweek te verkrijgen.

Praktisch alle delen van de plant worden gebruikt: embryo's, delen van kiemplantjes (hypocotylen, cotylen), stengel- of bladstukjes en explantaten van bloeiwijzen of bloemdelen. Bepaalde planten, zoals tabak, Begonia en Saintpaulia, zijn in staat op verschillende organen scheuten te vormen.

We noemen als voorbeeld van scheutvorming in vitro het geval van Saintpaulia ionantha, waarbij knoppen op stukjes van kroonbladen worden gevormd.

Bij Actinidia chinensis is het mogelijk om direct scheutvorming op meeldraden te krijgen (Hirsch en Bligny-Fortune 1979) en zelfs ook wortelvorming. Deze wortels kunnen vervolgens een bolvormig en chlorofyllbevattend callus vormen waaruit nieuwe scheuten gevormd kunnen worden (Tripathi en Saussay 1980).

Bij de meeste gewassen komt het vermogen tot scheutvorming in de praktijk slechts op speciale organen tot uitdrukking (fig. 12). In talrijke

gevallen vertonen verscheidene organen of weefsels een zeker vermogen tot scheutvorming, echter met duidelijke kwantitatieve verschillen tussen de diverse organen. Biet b.v. kan in uitzonderingsgevallen scheuten op bladsteelstukjes vormen, bij voorkeur van blad van jonge kiemplantjes. Het percentage van slagen is echter veel hoger als men het callus van bloemknoppen gebruikt.

Het is moeilijk te zeggen welke de meest geschikte organen voor scheutvorming zijn. Niettemin blijken dit toch meestal embryo's te zijn en weefsels van de bloeiwijze of de bloem, die bij alle gewassen meestal het vermogen tot scheutvorming vertonen. Deze verscheidenheid aan orgaanvormende reactie op de cultuuromstandigheden van in vitro en op het gebruik van groeistoffen (cytokininen en auxinen) maakt duidelijk hoe ontoereikend onze huidige kennis is van de factoren die op moleculair niveau van belang zijn.

Het belangrijkste speurwerk van de laatste tientallen jaren over het orgaanvormend vermogen van talrijke plantesoorten kan de biochemicus een belangrijke dienst bewijzen bij de keuze van proefmodellen, die bruikbaar zijn voor onderzoek op moleculair niveau.

b. Het bijzondere geval van de monocotylen. In het begin van de geschiedenis van de plantaardige weefselkweek was het aantal soorten monocotylen, dat met succes te kweken was, betrekkelijk gering. Gautheret (1954) vermeldt 9 soorten monocotylen tegenover 56 soorten dicotylen.
De klasse van de monocotylen (meer dan 64.000 soorten) omvat ongeveer een derde deel van de bedektzadigen en bepaalde families, zoals Gramineae, Liliaceae, Orchidaceae en Palmae, zijn van groot economisch belang. Men heeft zich afgevraagd of de monocotylen in het algemeen afwijkende mogelijkheden bezitten vergeleken met dicotylen met betrekking tot callus- en orgaanvorming. Deze verschillen zouden, zo ze al bestonden, kunnen liggen aan het metabolisme of aan de anatomische structuren, zoals afwezigheid van een doorlopend interfasciculair cambium bij de monocotylen.

Bepaalde monocotylen beschikken over een groot vermogen tot scheutvorming. Dit vermogen schijnt vooral voor te komen in de familie van de Liliaceae en aanverwante families, zoals Agavaceae en Amaryllidaceae. Bij verschillende gewassen, vooral bij de Sansevieria's, bestudeerd door Hunault (1978) vormen de weefselkolonies, die uit bladstukjes komen, snel primaire wortelmeristemen. De callusvorming zou dus van een storing in de orgaanvorming van de primaire meristemen afgeleid kunnen worden, terwijl het vermogen

van gevormde weefsels om zich snel naar de primaire meristematische toestand te ontwikkelen een typische eigenschap van monocotylen is.
Bij rijst (Nakano en Maeda 1974) zien we vermeerdering en desorganisatie van wortelmeristemen binnen weefselkolonies en misschien zelfs binnen het uitgangsexplantaat.
Het callus van gramineeën, waarvan de herkomst heel bijzonder kan zijn, heeft vaak een betrekkelijk zwak vermogen tot scheutvorming. Het vermogen tot scheutvorming gaat gemakkelijk verloren in de loop van achtereenvolgende overentingen; dit is ook het geval bij tarwe (Dudits et al. 1975) en gerst (Cheng en Smith, 1975) evenals bij rijst (Nishi et al. 1973). De capaciteit tot scheutvorming in de weefselkweek bij granen is uitermate afhankelijk van de soort en de cultivar, de leeftijd van de plant, gebruikte organen en herkomst en aard van het explantaat.
Bij mais kan het vermogen tot scheutvorming gedurende meerdere overentingen gehandhaafd blijven, mits men van weefsels van het scutellum (schildje) uitgaat (Green en Philips 1975). De grootste moeilijkheid is niet om een orgaanvormende uitgangscultuur te krijgen, maar om deze eigenschap na overenting te behouden. De uitgangscultuur wordt gewoonlijk ingezet met embryonaal weefsel of met weefsel van het kiemplantje. De stof 2,4-D of een ander auxine is vaak al voldoende om callusaanleg te krijgen. Scheutvorming wordt vaak verkregen door overzetten op een medium zonder groeistoffen.

De eisen van de weefsels van monocotylen met betrekking tot de minerale voeding en de groeistoffen blijken volledig vergelijkbaar te zijn met die van dicotylen (Hunault 1978).
Het belangrijkste verschil zo al aanwezig zou kunnen voortkomen uit het vermogen, dat men vaak ziet bij monocotylen tot versnelde vorming van wortelmeristemen en tot de desorganisatie hiervan tot callus.

4. Verloren gaan van het vermogen tot scheutvorming

De situatie bij verschillende gewassen of weefsels met betrekking tot de scheutvorming kan men verdelen in twee categorieën:

a. In bepaalde gevallen wordt het vermogen tot scheutvorming secundair geïnduceerd als gevolg van achtereenvolgende overentingen en het gebruik van een bepaalde opeenvolging van voedingsmedia.

b. In andere gevallen zien we daarentegen een aanvankelijk vermogen van de explantaten tot orgaanvorming. Dit vermogen kan na een bepaalde kweekduur of aantal overentingen afnemen. Dit verlies aan vermogen tot orgaanvorming kan trouwens in verschillende gevallen van morfogenese waargenomen worden: wortelvorming, scheutvorming en somatische embryogenese.

Verschillende hypothesen zijn opgesteld over de oorzaak van deze voortdurende afname van orgaanvormend vermogen.

a. De genetische hypothese geeft als hoofdoorzaak de variatie in de aantallen chromosomen (polyploïdie, aneuploïdie), die men vaak in de weefselkweek ziet (Wright en Northcote 1973). Een correlatie tussen het ploïdieniveau en het vermogen tot regeneratie is bij tabak bewezen door Murashige en Nakano (1967). De verandering in het karyotype brengt echter niet altijd onvermogen tot orgaanvorming met zich mee (Sacristan en Melchers 1969).

b. De fysiologische hypothese, die overigens de vorige niet uitsluit, zoekt het in het verlies aan endogene factoren, zoals hormonen of voeding. Stoffen, die onmisbaar zijn voor de orgaanvorming en door de hele plant gesynthetiseerd worden, kunnen in het oorspronkelijke explantaat aanwezig zijn en uitgeput raken of tijdens de latere groei van het callus niet meer in voldoende hoeveelheid aangemaakt worden.

5. Scheutvorming op bloeiwijzen of bloemen

Stengelmeristemen die in vitro zijn gevormd, kunnen zich soms versneld tot bloemen ontwikkelen. Dit uitzonderlijke verschijnsel is waargenomen bij een beperkt aantal gewassen, vooral als van bloeiwijzen of bloemen werd uitgegaan (Tabel VII). Het gebruik van bloemknoppen of stukken van bloeiwijzen kan van bijzonder belang voor de vegetatieve vermeerdering in de weefselkweek zijn, vooral voor de selectie.

De weefsels van bloeiwijzen blijken inderdaad een bijzonder vermogen tot orgaanvorming te vertonen (Margara 1970a). Om de vegetatieve vermeerdering uit bloeiwijzen te beheersen is het absoluut nodig om de factoren en de omstandigheden goed te kennen, die de ontwikkeling van scheuten in de ene of de andere richting sturen (vegetatief of generatief).

Fundamentele studies over de omstandigheden van scheutvorming op bloeiwijzen of bloemen in vitro zijn uitgevoerd met twee modelgewassen, tabak en witlof. Andere studies of waarnemingen zijn uitgevoerd op een vijftiental gewassen van verschillende ecologische typen.

5.1. Modelvoorbeeld tabak

Bij de tabakscultivars, die dagneutraal zijn, hangt de determinatie van de knoppen, die in de weefselkweek gevormd zijn, hoofdzakelijk af van de herkomst van het explantaat (Chouard en Aghion 1961). De knoppen, die op een stukje bloemstengel gevormd zijn, worden bloemen indien ze op een medium met suikers gekweekt worden. Onder dezelfde omstandigheden vormen stukjes van een vegetatieve stengel vegetatieve scheuten. De waarnemingen van Chouard en Aghion introduceerden het begrip van bloei-inductie op weefselniveau. Deze 'inductie' van weefsels kan zich uiteraard slechts uiten voor zover men scheutvorming kan verkrijgen. Het tot uiting komen vereist het gebruik van geschikte voedingsmedia door toevoeging van suikers als glucose en saccharose. De oorzaak hiervan is volledig onbekend.

We kunnen drie hypothesen opstellen:

a. De weefsels van de bloeiwijzen, die in cultuur gebracht worden, bevatten groeistoffen of 'florigene metabolieten ('bloeistimulus').
b. Ze bezitten een bijzonder vermogen tot bepaalde synthesen.
c. Hun eigenschappen komen voort uit een preferentiële receptiviteit van bepaalde 'effectors'.

Overigens sluiten deze verschillende hypothesen elkaar niet uit.

TABEL VII

Voorbeelden van vorming van scheuten op bloeiwijze of bloemknoppen in de weefselkweek

Gewas	Ecologisch type (1)	Herkomst van het explantaat	Omstandigheden (2)	Auteur
Arabidopsis thaliana	LD	Hypocotyl	Onder LD	Nitsch 1972
Begonia evansiana	LD	Bladsteeltje	Auxine vereist en adenine gewenst	Ringe en Nitsch 1968
Begonia x elatior	LD	Bloemknop, bloemblad	Zwakke auxine (IBA of NAA 10^{-6}M); nodig voor de meristeemvorming; sterk auxine remt de bloemaanleg Gibberelline A3 gewenst	Margara (3)
Beta vulgaris	LD-K	Bloemknop	Vorming van een stengel van de bloeiwijze op een wondje van het ovarium	Margara 1970
Brassica oleracea botrytis	K	Bloemkool	Anti-auxinen bevorderen versnelde bloemvorming	Margara 1977a
Cichorium intybus	LD-K	Gevernaliseerde wortel	LD vereist: auxine remt de bloem-aanleg	Paulet en Nitsch 1964
-	LD-K	Ongevernaliseerde wortel	Kou kan gemist worden	Margara 1965
Kalanchoë blossfeldiana	KD	Bloemknop, juist geopende bloem	Bloemaanleg treedt in KD of in LD op, auxine remt	Margara (3)
Lilium candidum	KD	Bloemdelen	Bodem met auxine, gevormde bloeiwijzen vaak abnormaal	Astié en Coquen 1972
Lunaria annua	K	Bladsteeltje	Kou vereist. Kan in vitro op weefselniveau werken	Pierik 1966, 1967
Nicotiana tabacum	ND	Bloeiwijze	Medium moet een suiker bevatten	Chouard en Aghion 1962; Aghion en Prat 1965
-	ND	Weefsel onder de epidermis van een bloeiwijze	Vorming van bloeiwijze kan direct zijn zonder een callus tussenfase	Tran Thanh Van en Chlyah 1974

Gewas	Ecologisch type (1)	Herkomst van het explantaat	Omstandigheden (2)	Auteur
Nicotiana tabacum	ND	Bloeiwijze	Auxinen in hoge concentratie remmen de bloemaanleg	Wardell en Skoog 1969
Plumbago indica	KD	Vegetatieve stengel	KD vereist. Auxine en gibberellinen remmen de bloemaanleg; ethyleen en methionine bevorderen deze	Nitsch 1968
Streptocarpus nobilis	KD	Bladschijfjes	KD vereist. Gibberellinezuur remt de bloemaanleg; cytokininen bevorderen deze	Rossini 1970

(1) LD: lange dagplant; KD: korte dagplant; ND: dagneutrale plant; K: plant met koude behoefte.

(2) Voorwaarden noodzakelijk voor bloemaanleg onder omstandigheden van scheutvorming in vitro. Deze omstandigheden kunnen identiek zijn aan of verschillen van die welke de volledige plant vereist.

(3) Ongepubliceerde waarnemingen van de auteur.

Konstantinova et al. (1972) hebben aangetoond, dat de 'preïnductie' van weefsels van bloeiwijzen van tabak een zekere stabiliteit vertoont. Zo vormen explantaten van de bloemstengel op een medium zonder suiker vegetatieve knoppen; maar na overzetten op een voedingsmedium met suikers gaan ze opnieuw bloemknoppen vormen. Deze waarnemingen bij tabak hebben een tweede begrip doen ontstaan, dat men bij meerdere gewassen terugvindt. De scheuten in de weefselkweek kunnen zich onder gunstige omstandigheden versneld tot bloemen ontwikkelen (neotenie*). Een extreem voorbeeld van een dergelijke versnelde bloemontwikkeling is het direct kweken van bloemen zonder tussenkomst van callus op weefsels, die van onder de epidermis komen van takken van de bloemstengel (Tran Than Van en Chlyah 1974).

Fig. 13.

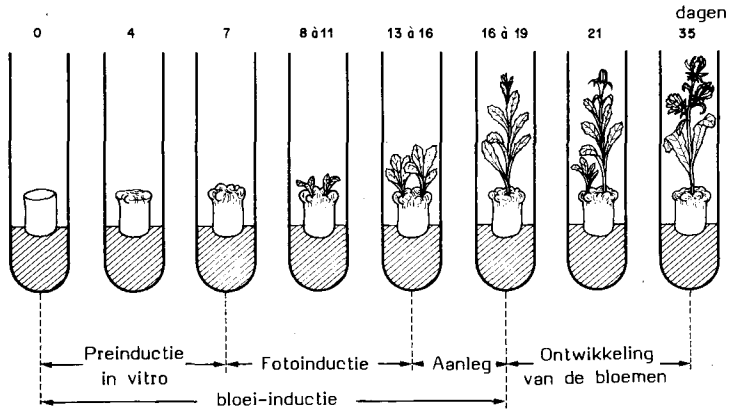


Fig. 13. Chronologische ontwikkeling van scheutjes van Cichorium intybus L., die in vitro worden gevormd (volgens Margara, 1977c). De standaardomstandigheden, die de vorming van bloeiwijzen mogelijk maken, zijn de volgende: cylindrische wortelstukken met cambium worden in de oorspronkelijke stand ingezet op een medium met saccharose (45 g/l) en mineralen volgens Margara et al. (1966). De culturen worden in een kweekcel bij 23 tot 24 °C gezet bij continu licht van ongeveer 4000 lux van TL buizen van het type 'Blanc soleil de luxe'.

Indien we de waarnemingen bij tabak zouden mogen generaliseren, dan zouden weefsels van bloeiwijzen in de weefselkweek in principe nieuwe bloemknoppen vormen. Dan zou vegetatieve vermeerdering uit weefsels van bloeiwijzen moeilijkheden kunnen opleveren. In werkelijkheid blijkt het verschijnsel bij tabak een uitzondering te zijn. Ondanks talrijke pogingen is het trouwens tot nu toe niet gelukt om bloemknoppen op tabakssoorten te krijgen, die gevoelig zijn voor daglengte, zoals de cultivar Maryland Mammouth van Nicotiana tabacum (korte dagplant) of de lange dagplant (Nicotiana sylvestris).

5.2. Modelvoorbeeld witlof

In tegenstelling tot de dagneutrale tabak is witlof een tweejarig gewas, dat om te bloeien eerst kou nodig heeft en dan lange dag.
De ontwikkeling van scheuten in de weefselkweek vertoont bij witlof bepaalde overeenkomsten met die van tabak maar ook belangrijke verschilpunten.
De overeenkomst is het volgende: de scheuten kunnen zich onder gunstige omstandigheden in versneld tempo tot bloemen ontwikkelen (fig. 13). Toevoeging van suikers is noodzakelijk. Auxinen werken al direkt na het inzetten en oefenen een remmende werking uit op de bloemaanleg; deze remming is nog meer uitgesproken dan bij tabak (Paulet en Nitsch 1964). Evenals bij tabak kan de toekomstige ontwikkeling van scheuten afhangen van de herkomst van het uigangsexplantaat. De eisen die de verschillende weefsels stellen zijn echter anders en de situatie is ingewikkelder (fig. 14).

a. Als men knoppen, die zich op de moederplant ontwikkeld hebben, zoals eindknoppen of okselknoppen, in weefselkweek brengt, zijn de voorwaarden voor bloei gelijk aan die van de volledige plant. Deze knoppen zullen alleen een bloeiwijze vormen na koubehandeling gevolgd door lange dag.
b. Als men explantaten uit het wortelcambium wegneemt zonder meristeemaanleg zullen de scheuten na 7 tot 10 dagen cultuur, bloeiwijzen produceren, zelfs zonder enige voorafgaande koubehandeling (bij ongeveer 19°C); maar lange dag blijft altijd onmisbaar. De drempel ligt bij 14 uur daglengte. Continu licht is optimaal (fig. 15).
c. Als het explantaat een stukje van de bloemstengel of het bloemhoofdje is, kunnen de scheuten, die op een callus gevormd zijn zich tot een stengel van de bloeiwijze ontwikkelen, zelfs onder korte dag omstandigheden van 9 uur. Niettemin zal het aantal knoppen, gevormd uit dit callus, dat zich tot bloeiwijzen ontwikkelt wanneer tevens lange dagbehandeling toegepast wordt, stijgen. Er bestaat dus een gradatie in de inductie van de weefsels afhankelijk van hun herkomst.

Fig. 14.

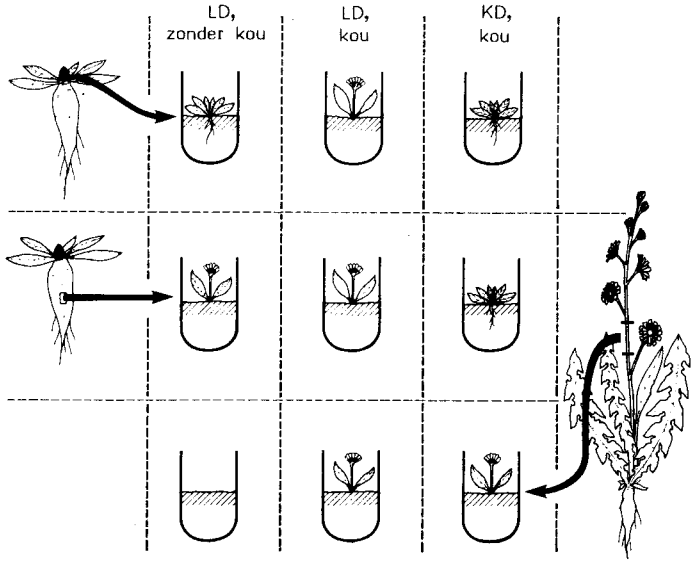


Fig. 14. Effect van de herkomst van het explantaat op de ontwikkeling van vegetatieve of bloemknoppen in de weefselkweek bij Cichorium intybus L. (waarnemingen van de auteur).
Boven: het explantaat is de eindknop van de vegetatieve plant. LD, zonder kou: onder lange dag (16 uur of meer) en zonder kou blijft het explantaat vegetatief. LD, kou: in lange dag na koubehandeling bij ongeveer 5 °C van minstens een maand vormt het explantaat een bloeiwijze. KD, kou: onder korte dag bij 9 uur blijft het explantaat vegetatief ook na koubehandeling.
Midden: het explantaat is een wortelstukje met cambium. De gevormde scheuten ontwikkelen zich tot bloeiwijzen onder lange dag zonder voorafgaande koubehandeling (LD, geen kou) of na koubehandeling (LD, kou); ze blijven vegetatief onder korte dag (KD, kou).
Onder: het explantaat is een stukje van de bloeistengel. De knoppen ontwikkelen zich tot bloeiwijzen onder lange dag (LD, kou) maar ook onder korte dag (KD, kou).

Fig. 15. Versnelde bloemontwikkeling van een bloemhoofdje van witlof (Cichorium intybus L.). Het bloemhoofdje komt uit een scheut voort, die onder lange dag op een wortelstukje is gevormd.

Een ander belangrijk verschil tussen witlof en tabak betreft de terugkeer naar de vegetatieve toestand. Bij tabak schijnt het, dat de preïnductie van de weefsels van de bloeiwijze een zekere stabiliteit vertoont. Zelfs als dit vermogen niet onmiddellijk op een geschikt voedingsmedium tot uiting komt, gaat het toch niet noodzakelijkerwijze verloren. Bij witlof daarentegen gaat het bloeivermogen wel verloren, indien dit zich niet binnen ongeveer 3 weken na het in cultuur brengen van de wortelstukjes kan uiten. De kweek in vloeibaar medium houdt de scheuten in de vegetatieve toestand. Overbrengen na 3 weken van de cultures op een agarmedium herstelt het vermogen tot bloei niet. Om de bloei in lange dag te doen optreden moeten ze een langdurige koubehandeling krijgen bij ongeveer 5°C gedurende 6 tot 8 weken.

De verschillende factoren, die het verlies van het vermogen tot bloei met zich meebrengen (korte dag, continu donker, vloeibaar medium) lopen op histologisch niveau uiteindelijk op hetzelfde uit (Rancillac 1973a en b); de cellen van de apicale axiale zone van de jonge nieuwgevormde meristemen

vertonen reeds een begin van cytologische differentiatie vooral een verder ontwikkelde vacuole. Onder de meest gunstige omstandigheden voor bloemaanleg echter, zijn de cytologische kenmerken van de axiale zone typisch ongedifferentiëerde meristematische cellen met sterk gereduceerde vacuole.

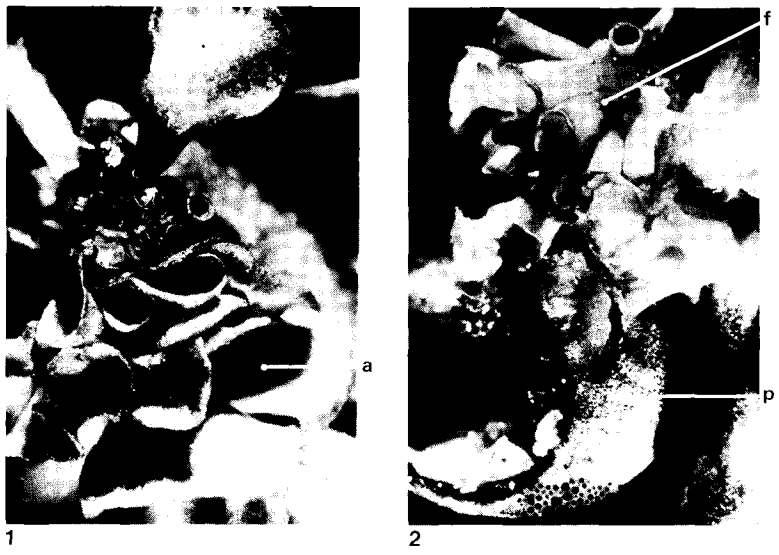


Fig. 16. Vorming van bloemen of bloemdelen op bloemkroonbladen bij 'Rieger" *begonia* (*ongepubliceerde waarnemingen van de auteur*).
1. Gekleurde bloembladachtige bloemdelen (a), die op een kroonblad ontstaan zijn.
2. Vorming van bladen, bracteeën en abnormale bloemen (f). Het oorspronkelijke explantaat is een kroonblad (p).

5.3. Andere voorbeelden van de vorming van scheuten die bloeiwijzen of bloemen in de weefselkweek geven

Vorming in de weefselkweek van scheuten, die bloeiwijzen of bloemen opleveren, wordt verkregen bij een beperkt aantal gewassen, die tot zeer uiteenlopende families en 'ecologische typen' behoren: dagneutrale planten,

korte of lange dagplanten en planten met koudebehoefte (tabel VII).
De enige algemene regels die men kan opstellen zijn die, welke al gemaakt zijn bij de vergelijking tussen witlof en tabak.

We zien bijna altijd een variatie van de mogelijkheden tot orgaanvorming afhankelijk van de herkomst van het weefsel. Bij 'Rieger' begonia kan het kroonblad direct zonder tussenkomst van een callusfase bloemmeristemen vormen, welke vaak abnormaal of onvolledig zijn of opeenhopingen van bloemdelen, zoals kroonbladen, op een ongeorganiseerde wijze (waarnemingen van de auteur, fig. 16).
Bij biet kunnen we alleen in uitzonderingsgevallen de vorming van een stengel van de bloeiwijze vanaf het ovarium ter hoogte van een kleine verwonding waarnemen. Callus aan de basis van bloemen levert over het algemeen vegetatieve scheuten.

Fig. 17. Versnelde ontwikkeling van een bloeiwijze bij bloemkool op een stukje van de stengel van de bloeiwijze (volgens Margara, 1977b).
Het oorspronkelijke explantaat is van de bloemkool afgenomen in het stadium, dat de bloem oogstrijp was. De versnelde ontwikke ling van een bloemtros zien we sporadisch op media met een anti-auxine zoals naftyl-methyl-sulfopropionzuur (5.10^{-5} M).

Bij bloemkool kan men de ontwikkeling van eenzelfde weefseltype, zoals stukjes van ongeveer 10 mm lengte uit de bloemkool zelf, op verschillende manieren sturen door verschillende groeistoffen te gebruiken. De versnelde vorming van bloemen zonder tussenkomst van het 'bloemkoolstadium' is verkregen door het gebruik van anti-auxinen zoals 2,3,5-trijoodbenzoëzuur (Margara 1977b en fig. 17).

In het algemeen blijkt dat de vorming van scheuten, die bloeiwijzen of bloemen maken, toevoeging van betrekkelijk grote hoeveelheden suiker, zoals saccharose of glucose, aan de bodem vereist.

De gebruikte weefsels zijn van de bloeiwijze of van vegetatieve oorsprong:

a. Wanneer de weefsels van het explantaat van een bloeiwijze komen. Deze weefsels zijn waarschijnlijk in zekere mate gepreïnduceerd zonder dat we een vermoeden hebben over de aard van deze preïnductie. In bepaalde gevallen, zoals witlof of Kalanchoë, kan de bloemaanleg zelfs onder niet inducerende omstandigheden worden waargenomen, zoals korte dag bij witlof en lang dag bij Kalanchoë. Dit verschijnsel is verklaarbaar als men aanneemt, dat de weefsls op de bloeiwijze al van te voren geïnduceerd zijn. In andere gevallen, zoals bij bloemkool, is de vorming van bloemknoppen een uitzondering, en de preïnductie van de weefsels van de bloeiwijze kan dan in twijfel worden getrokken.

b. Wanneer de weefsels van het explantaat van vegetatieve organen afkomstig zijn vereist de bloemaanleg van de nieuwe scheuten de invloed van inducerende factoren, zoals lange dag bij Arabidopsis thaliana (Nitsch 1972), korte dag bij Plumbago indica (Nitsch 1968) en koubehandeling bij Lunaria annua (Pierik 1966); bij Lunaria kan de koubehandeling bij de weefsels ook vóór de scheutvorming plaatsvinden.

Wanneer we alle bestudeerde gevallen overzien, valt het verschil in reactie op de groeistoffen op (tabel VII). Auxine, dat vaak de bloemaanleg remt, kan dit echter ook bevorderen. De gibberellinen kunnen afhankelijk van het gewas stimuleren of remmen. Bij witlof hangt de werking van auxine van het toepassingstijdstip af. De werking is remmend tijdens de eerste fase van het inzetten van het uigangsexplantaat (callusvorming en scheutvorming). Zodra het jonge meristeem er is, heeft auxine geen effect meer of werkt licht stimulerend.

Bij deze voorbeelden van bloemaanleg in vitro moeten we niet uit het oog verliezen, dat het uitzonderingsgevallen zijn. We zien meestal juist vegeta-

tieve scheutvorming, wanneer men weefsels van een bloeiwijze in cultuur brengt.

De gewassen, die gemakkelijk bloemknoppen vormen, blijken een bijzonder vermogen tot orgaanvorming te vertonen. Het zijn praktisch allemaal planten die in staat zijn spontaan vegetatieve knoppen te vormen of dit doen na toediening van zeer lage concentraties groeistoffen.
Zelfs bij deze gewassen blijft het altijd mogelijk vorming van vegetatieve scheuten uit weefsels van bloeiwijzen te verkrijgen door geschikte voedingsmedia te gebruiken, welke van gewas tot gewas verschillen. Dit bijzondere vermogen tot vorming van bloemknoppen is dus geen belemmering in de praktijk van de vegetatieve vermeerdering.

C. SOMATISCHE EMBRYOGENESE

1. Het begrip somatisch embryo - Definities - Geschiedenis

Het embryo ontstaat uit de ontwikkeling van de zygote, welke weer resulteert uit de bevruchting van de eicel in de embryozak. Een belangrijke bijdrage van de weefselkweek aan de biologie is geweest om aan te tonen, dat somatische cellen met 2n chromosomen structuren konden opleveren, die vergelijkbaar zijn met embryo's en de naam van somatische embryo's of 'embryoiden'[1] verdienen.

De bijzondere ontstaanswijze van de zygote is dus geen noodzakelijke voorwaarde voor embryogenese. Deze constatering heeft belangrijke repercussies op het fundamentele vlak gehad. Dit zou ook in het toegepaste gebied

---

1) Merk op, dat de androgenese, d.i. het ontstaan van haploïde of zelfs diploïde embryo's uit stuifmeel na verdubbeling van het chromosomenaantal, niet mag worden beschouwd als een methode van vegetatieve vermeerdering, omdat de verkregen populatie normaliter heterogeen is en uit individuen bestaat waarvan het genotype van dat van de moederplant verschilt. Het verkrijgen van haploïde embryo's zullen we hier niet behandelen. Het grote belang ervan is om uitgaande van heterozygote planten zuivere (homozygote) lijnen te krijgen.

het geval moeten zijn. De ontdekking van de mogelijkheid om embryo's in vitro te verkrijgen uit somatische cellen van diverse herkomst is voorafgegaan door studies over polyembryonie, waarvan sommige al heel oud zijn.

1.1. Spontane polyembryonie

We weten al lang, dat de zaadknop soms meerdere embryo's bevat. De gevallen van polyembryonie kunnen we verdelen in verschillende groepen:

a. Het embryo vormt in een vroegtijdig stadium van de ontwikkeling meerdere embryo's.
b. De embryo's ontstaan uit de ontwikkeling van de synergiden of de antipoden, dit zijn haploïde cellen van de embryozak. Hier gaat het dus niet om somatische embryogenese.
c. De somatische embryo's worden meestal gevormd uit cellen van de nucellus of soms uit cellen van de integumenten van de zaadknop.

In al deze gevallen mogen we ze 'adventieve embryo's' noemen, omdat hun ontstaan evenals de plaats van vorming ongebruikelijk is. De embryo's die uit de bijcellen van de embryozak ontstaan, worden zelden volwassen.
De meest voorkomende gevallen van polyembryonie bij bedektzadigen betreffen de diploïde embryo's, die ontstaan uit de cellen van de nucellus bij verschillende Citrus-soorten (C. reticulata, C. microcarpa), mango (Mangifera indica L., Anacardiaceae) en Eugenia (Myrtaceae).

Een uitzonderlijk geval van spontane vorming van structuren analoog aan embryo's uit vegetatieve weefsels komt voor bij de orchidee Malaxis paludosa (Taylor 1967). Bij deze soort kan men aan het apicale uiteinde van de bladeren proliferatie van levenskrachtige embryo's waarnemen, die in staat zijn zich tot normale planten te ontwikkelen als ze van de moederplant losgeraakt zijn. De kennis van deze verschillende voorbeelden van spontane adventieve embryogenese toont al voldoende aan, dat het vermogen een embryo te vormen geen exclusieve eigenschap van de zygote is.

1.2. Kunstmatige somatische embryogenese in vitro

a. Definities

Algemeen wordt aangenomen, dat experimentele embryogenese voor het eerst bij peen door Reinert (1958) waargenomen is en daarna door Steward et al. (1958)[1]. Toen echter talrijke pogingen ondernomen werden om embryogenese tot verscheidene andere gewassen uit te breiden, ontstond er in de

terminologie een zekere verwarring; vandaar het nut van exacte definities.

1. De zygote heeft drie wezenlijke eigenschappen:

- hij ontstaat uit de versmelting van een mannelijke en een vrouwelijke gameet met n chromosomen;
- het is een vrije cel met een onafhankelijke ontwikkeling, die niet onderworpen is aan de interacties van de geïntegreerde cellen van een weefsel;
- de omgeving van het jonge embryo, dat uit de zygote ontstaat, bestaat uit het kiemwit of albumen, dat niet alleen voedingsstoffen maar ook groeistoffen verschaft, die in staat zijn om de achtereenvolgende stadia van de ontwikkeling te sturen.

2. Het normale embryo, dat uit de ontwikkeling van de zygote ontstaat, is behalve door zijn herkomst ook door zijn morfologie en zijn ontwikkeling gekenmerkt.

- het is een polaire as met aan de ene kant een stengelmeristeem en aan de andere een wortelmeristeem. De cotylen hebben een bijzondere morfologie en bouw en dienen vaak als reserveorganen;
- de ontwikkeling van het embryo uit de zygote verloopt in een bepaalde reeks van stadia. De belangrijkste stadia, die men altijd terugvindt zijn het 'bolvormige', het 'hartvormige' en het 'torpedostadium'. Afhankelijk van het gewas bestaat er in details variatie in de structuur van de eicel evenals in de ontwikkeling van het embryo. Het woord somatische embryogenese is gebruikt door Tokin (1964) om bij planten en dieren de vorming van organismen uit een enkele cel of een klein groepje somatische cellen aan te duiden.

3. De term 'embryoïde' (synoniem van 'pseudoembryo') wordt algemeen gebruikt om normale of soms min of meer abnormale somatische embryo's aan te duiden. Het criterium om een somatisch embryo te herkennen is de bipolaire structuur, waarop zich in een vroeg stadium gelijktijdig een stengel- en een wortelmeristeem ontwikkelen.

---

1) Opgemerkt moet echter worden dat de nieuwvormingen, die sinds 1951 door Levine waargenomen werden, waarschijnlijk embryoïden waren, op zijn minst voor een deel.

Om zeker te zijn dat het werkelijk om somatische embryo's' gaat, is het verstandig om in een nauwgezette anatomische studie de achtereenvolgende stadia van de ontwikkeling van het embryo te volgen.
De termen embryoïden of somatische embryo's moeten niet onjuist gebruikt worden, zoals helaas al te vaak het geval is, om de volgende structuren aan te geven, die eveneens 'regeneratie' van planten opleveren:

1. geïsoleerde wortels, die soms in hun proximale gebied een callus vormen, dat in bepaalde gevallen secundair scheuten oplevert;
2. geïsoleerde scheuten, die secundair in hun basaal gedeelte adventieve wortels vormen;
3. callus, dat wortel en - onafhankelijk hiervan - ook scheuten vormt.

b. Het voorbeeld peen

De peen is onderwerp geweest van een zeer groot aantal proeven en discussies, welke veel hebben bijgedragen aan de ontwikkeling van het inzicht in de embryogenese. De proeven over somatische embryogenese bij peen werden voorafgegaan door waarnemingen over scheutvorming. Nobécourt (1946) heeft als eerste scheutvorming in wortelweefsel van peen verkregen; maar de resultaten van deze auteur waren niet reproduceerbaar.
Levine (1951) kreeg eveneens vorming van scheuten of embryoïden uit weefselcellen. Echter, Levine selecteert de orgaanvormende weefsels uit en hij omschrijft de bijzondere omstandigheden van hun ontstaan: frekwent overzetten van actief groeiend weefsel op een medium met een auxine, gevolgd door overzetten op een medium zonder auxine. Deze methode zal later zeer vaak toegepast worden, zowel voor somatische embryogenese als voor scheutvorming.
De vorming van embryoïden bij peen (Steward et al. 1958 en volgende) in suspensieculturen is het eindresultaat van werk, dat in de volgende stadia uitgevoerd is:

1. Het ontwikkelen van kweektechnieken in schudcultuur had als aanvankelijk doel omstandigheden bij overleving te vergelijken met omstandigheden die maximale groei bevorderen.
2. Deze technieken mondden uit in de productie van suspensieculturen, welke tot deling in staat waren en celaggregaten vormden.
3. Het derde stadium was het optreden van orgaanvorming: wortelvorming of vorming van somatische embryo's in deze suspensiecultuur.

Het inzicht, dat Steward en zijn collega's door hun werk hebben verkregen kan als volgt worden samengevat: De somatische cellen van bedektzadigen zijn

totipotent zoals Haberlandt het al in 1902 voorspeld had; maar om de ontwikkeling van een zygote na te kunnen bootsen moet er aan de volgende voorwaarden voldaan zijn:

- isolatie die de cellen losmaakt van de fysiologische correlaties en eventuele remmingen die in situ binnen de weefsels voorkomen;
- toedienen van een complex voedings- en groeistoffen door de omgeving. Onder normale omstandigheden zorgen de stoffen uit het albumen (kiemwit) voor de normale ontwikkeling van de zygote.

2. Factoren bij somatische embryogenese

Als gevolg van de opvattingen geformuleerd door Steward werden de factoren, die de embryogenese bepalen, hoofdzakelijk gezocht in het verbreken van de correlaties, die voortkomen uit de isolatie van cellen in de schudcultuur, en in de voedingstoestand van de omgeving en de samenstelling van het voedingsmedium.

2.1. Eventuele rol van de isolatie van de cellen

Zonder twijfel kunnen de bolvormige pro-embryo's ontstaan uit een enkele somatische cel als gevolg van achtereenvolgende delingen (Reinert et al. 1971). Een duidelijke demonstratie van het vermogen tot embryogenese van cellen in suspensiecultuur is de vorming van embryoïden uit cellen van protoplasten (Grambow et al. 1972).

De bestemming van celaggregaten uit suspensieculturen is niet altijd gelijk. Homès en Guillaume (1967) constateren, dat zeer jonge somatische embryo's zijn opgebouwd uit kleine celletjes met zetmeel, terwijl veel celaggregaten, die zich vormen onder de experimentele omstandigheden van Steward vooral uit grote cellen met grote vacuolen bestaan.

Halperin (1966) nam de ontwikkeling waar van embryoïden uit oppervlaktecellen van celaggregaten. Deze celaggregaten zouden een voedende rol spelen en aan de oppervlaktecellen, die zich tot embryo's ontwikkelen, de noodzakelijke voedingsstoffen en groeistoffen verschaffen. Vanaf het bolvormige stadium voltooien de embryoïden hun ontwikkeling onafhankelijk en kunnen zich dan losmaken van het oorspronkelijke aggregaat.

De somatische embryogenese komt niet uitsluitend in suspensiecultuur voor, maar ook tamelijk vaak op meer of minder los callus op een agarmedium.

2.2. Voedings- en andere omgevingsfactoren

a. De rol van het kiemwit (albumen) - kokosnootmelk. In de eerste fase van het onderzoek van Steward et al. over peen was het logisch om te proberen de normale omgeving van de zygote na te bootsen; vandaar het gebruik van kokosnootmelk, een vloeibaar kiemwit. Ongetwijfeld was dit in een bepaald aantal proeven bij meerdere gewassen gunstig voor de vorming of ontwikkeling van embryoïden. Somatische embryogenese is echter vaker waargenomen zonder dan met kokosnootmelk. Halperin (1966) veronderstelde, dat het effect van het ontwikkelingsstadium afhangt. Het zou geen effect hebben of zelfs remmend werken op de aanleg van embryoïden bij peen; een latere ontwikkeling zou het echter bevorderen. Sussex en Frei (1968) ondersteunden deze stelling.

De variatie in effect van kokosnootmelk komt trouwens overeen met de normale ontwikkeling: de eerste stadia van de ontwikkeling van het embryo verlopen gelijktijdig met de ontwikkeling van het kiemwit; dit laaste zou vooral tijdens de latere ontwikkeling een voedende rol spelen.

b. Toevoeging van stikstof. Het effect van de toevoeging van stikstof en van de vorm, waarin dit wordt verstrekt, zijn vaak onderwerp van discussie geweest.

Halperin en Wetherell (1965) hebben bij wilde peen de noodzaak van toevoeging van gereduceerde stikstof, vooral van ammonium, beklemtoond. Norreel en Nitsch (1970) hebben dit bevestigd. De overvloedige vorming van embryoïden op explantaten van bladstelen van wilde peen komt alleen maar voor bij aanwezigheid van ammoniumionen. Toevoeging van leucine remde deze embryogenese gedeeltelijk. We weten, dat bij bepaalde systemen leucine de vorming van nitraat-reductase remt.

Reinert et al. (1966) hebben echter aangetoond, dat een hoge nitraatconcentratie in afwezigheid van ammoniumionen, somatische embryogenese oplevert. Sussex en Frei (1968) zien bij peen vorming van embryoïden met slechts sporen gereduceerde stikstof in het medium; toevoeging van caseïne hydrolysaat stimuleert de embryogenese echter weer.

2.3. *Reeks van voedingsmedia*

Een reeks van voedingsmedia met weglaten van auxine in het tweede medium is bij proeven over somatische embryogenese vaak toegepast. Halperin en Wetherell (1965) gebruiken 2,4-D in hoge concentratie (1 mg/l) om aanleg

van peenembryoïden te verkrijgen en daarna een lagere concentratie (0,1 mg/l) om de ontwikkeling tot voorbij het bolvormige stadium te laten verlopen.

Norreel en Nitsch (1970) kregen embryoïden op een medium met veel 2,4-D op stukjes bladsteel van peen zonder overenten. Overenten en het wisselen van media zijn dus niet absoluut noodzakelijk. In dit geval bleek naftoxyazijnzuur in een concentratie van 10^{-5} M effectiever te zijn dan 2,4-D met betrekking tot de aanleg van embryoïden. De mogelijke effecten van cytokininen op de somatische embryogenese zijn niet erg duidelijk.

Wiggans (1954) voegde adenine aan het voedingsmedium toe om bij peen scheutvorming te verkrijgen. Tot zijn verbazing kreeg hij orgaanvorming, nadat hij zijn cultures op een tweede medium zonder adenine had overgebracht.[1)]
De noodzaak van toevoeging van een cytokinine bij proeven over somatische embryogenese komen we niet vaak tegen. Toch heeft men soms het effect van kokosnootmelk toegeschreven aan de cytokinine, die het bevat.

2.4. Inductie tot embryogenese en verloren gaan van dit vermogen

De totipotenie van geïsoleerde cellen kan alleen maar onder bijzondere omstandigheden tot uiting komen. Halperin (1967) veronderstelde, dat bepaalde cellen gedurende de eerste fase van het begin van de kweek het vermogen om hun totipotenie uit te drukken konden verkrijgen. Deze inductie zou niet noodzakelijkerwijze alle cellen hoeven te betreffen; op deze manier zou de cultuur bestaan uit een mengsel van wel en niet geïnduceerde cellen.

Latere omstandigheden van de kweek zouden dan de ene of de andere soort cellen bevorderen. Men zou zo dan ook de rol van de onderdrukkende invloed van het auxine in de bodem kunnen verklaren, omdat deze onderdrukking embryogenese of scheutvorming doet optreden. Hoe het ook zij, waarschijnlijk bepalen de omstandigheden van de 'schok van het in cultuur brengen' de latere determinatie.

Het vermogen tot somatische embryogenese kan in de loop van een aantal

---

1) Adenine is geen cytokinine, maar een purinebase, die een onderdeel is van cytokininen. Soms bleek de toevoeging het effect van kinetine of benzyladenine te versterken.

TABEL VIII

Voorbeelden van somatische embryogenese

Familie	Gewas	Auteur
Aizoaceae	Mesembryanthemum floribundum	Mehra en Mehra 1972
Aquifoliaceae	Ilex aquifolium	Hu en Sussex 1971
-	-	Hu 1978
Araliaceae	Panax ginseng	Butenko et al. 1968
Asclepiadaceae	Tylophora indica	Rao en Narayanaswamy 1970
-	Pergularia minor	Prabhudesai en Narayanaswamy 1974
Caricaceae	Carica papaya	De Bruijne et al. 1974
Compositae	Cichorium endivia	Vasel et al. 1964
Coniferae	Biota orientalis	Konar en Oberoi 1965
-	Picea glauca	Durzan et al. 1973
-	Pinus strobus	Isikawa et al. 1973
Crassulaceae	Kalanchoë pinnata	Wadhi en Moham Ram 1964
	-	Moham Ram en Wadhi 1965
Cruciferae	Brassica napus, oleifera	Margara en Leydecker 1978
-	Cheiranthus cheiri	Pareek en Chandra 1978
Cucurbitaceae	Cucurbita pepo	Jelaska 1974
Cycadaceae	Zamia integrifolia	Norstog en Rhamstine 1967
Dioscoreaceae	Dioscorea floribunda	Ammirato 1978
Euphorbiaceae	Croton bonplandianum	Bhojwani 1966
Gramineae	Bromus inermis	Gamborg et al. 1970
-	Sorghum bicolor	Wernicke en Brettell 1980
Leguminosae	Medicago sativa	Kao en Michaylor 1980
-	Trifolium pratense	Robbins 1980
Liliaceae	Asparagus officinalis	Steward en Mapes 1971b
-	-	Jullien 1974
Orchidaceae	Cymbidium sp.	Steward en Mapes 1971a
Palmae	Elaeis guineensis	Rabéchault en Martin 1976
Papaveraceae	Eschscholtzia californica	Kavathekar et al. 1978
-	Macleaya cordata	Kohlenbach 1965
Ranunculaceae	Ranunculus sceleratus	Konar en Nataraja 1965, 1970
-	-	Thomas et al. 1972
-	-	Dorion et al. 1975
-	Nigella damascena	Raman en Greyson 1974
Rubiaceae	Coffea canephora	Staritsky 1970
-	Coffea arabica	Sharp et al. 1973
-	-	Söndahl en Sharp 1977
Rutaceae	Citrus microcarpa	Maheshwari en Rangaswamy 1958

Familie	Gewas	Auteur
-	-	Rangaswamy 1961
-	Citrus sinensis	Kochba et al. 1974
-	-	Button et al. 1974
-	Citrus sp.	Mitra en Chaturvedi 1972
Scrophulariaceae	Antirrhinum majus	Poirier-Hamon et al. 1974
-	-	Sangwan en Harada 1975
Solanaceae	Atropa belladonna	Konar et al. 1972
-	Nicotiana tabacum	Haccius en Laksmanan 1965
-	-	Prabhudesai en Narayanaswamy 1973
-	Solanum melongena	Yamada et al. 1967
-	Petunia inflata	Handro et al. 1972
-	Petunia hybrida	Rao et al. 1973
Umbelliferae	Ammi majus	Sehgal 1972
-	Anethum graveolens	Johri en Sehgal, 1966
-	-	Ratnamba en Chopra 1974
-	Apium graveolens	Reinert et al. 1966
-	Carum carvi	Ammirato 1974
-	Conium maculatum	Netien en Raynaud 1972
-	Coriandrum sativum	Steward et al. 1970
-	Daucus carota	Reinert 1958
Umbelliferae	Daucus carota	Steward et al. 1958, 1963, 1966, 1970
-	-	Homès en Guillaume 1967
-	-	Sussex 1972
-	-	Kato en Takeuchi 1963
-	-	Norreel en Nitsch 1968
-	-	Smith en Street 1974
-	Didiscus coeruleus	Ball en Joshi 1966
-	Foeniculum vulgare	Maheshwari en Gupta 1965
-	Petroselinum hortense	Vasil en Hildebrandt 1966
-	Sium suave	Steward et al. 1970

malen overzetten verloren gaan. Het verlagen van de auxineconcentratie, vooral 2,4-D in het tweede medium heeft juist als doel deze terugslag tegen te gaan.

Onder de factoren, die eventueel verantwoordelijk zijn voor het verloren gaan van de embryogenese, rekent men vaak polyploïdie en de aneuploïdie, die vaak voorkomen in de media met 2,4-D kokosnootmelk. Uitsluitend diploïde cellen vormen de kleine celaggregaten, die de pro-embryo's opleveren.

Halperin (1966) vond, dat het chromosomen aantal veel stabieler is in de schudcultuur dan in callus op agarmedia met 2,4-D en kokosnootmelk. Bij het overenten gaan alleen de celaggregaten met afmetingen beneden 75 µm door de zeef. Er kan zo dus een selectie optreden van kleine celaggregaten, die pro-embryo's vormen en diploïd zijn, waarbij de grote celmassa's met polyploïde cellen worden uitgeschakeld.

Het verlies van het vermogen tot embryogenese en orgaanvorming is eveneens waargenomen onder omstandigheden, waarbij het chromosomenaantal gelijk bleef. De echte oorzaken van dit verloren gaan blijven onbekend (zie voor discussie Smith en Street 1974). Tenslotte veronderstellen sommige auteurs (Reinert en Bajaj 1977) dat de embryogenese in de loop van een serie overentingen op media zonder 2,4-D verloren gaat door de uitputting van een embryo-vormende factor.

3. Vóórkomen van de somatische embryogenese

3.1. Verscheidenheid aan taxonomische soorten die in vitro embryoïden gevormd hebben

De somatische embryogenese is lang als een uitzonderlijk verschijnsel beschouwd dat voorkomt bij specifieke families, zoals schermbloemigen en nachtschade-achtigen.

Tabel VIII vermeldt, zonder volledig te willen zijn, een aantal voorbeelden. Bestudering hiervan toont duidelijk aan, dat het verschijnsel bij zoveel verschillende families voorkomt, dat men het vermogen om een somatisch embryo te vormen wel als fundamenteel mag beschouwen, zelfs als het in de praktijk alleen maar bij enkele gewassen onder speciale omstandigheden en op speciale weefsels en geschikte voedingsmedia te reproduceren is. Op basis van de verscheidenheid aan geslachten en families, die we in de tabel zien,

hoeven we ons trouwens geen illusies te maken. De resultaten zijn niet altijd makkelijk reproduceerbaar. Genetische factoren blijven altijd een belangrijke rol spelen. Dit doet zich voor op familieniveau, zoals bij schermbloemigen, op soortniveau en zelfs bij cultivars. De eerste resultaten, die goed reproduceerbaar waren, zijn hoofdzakelijk met wilde peen bereikt. Bij gekweekte peen echter hebben meerder auteurs rasverschillen opgemerkt in het vermogen tot somatische embryogenese (Norreel en Nitsch 1970; Margara ongepubliceerd). Bij aubergine, Solanum melongena, vinden Yamada et al. (1967) zowel cultivars die embryo's maken, als cultivars die onder dezelfde omstandigheden alleen maar ongeorganiseerd callus vormen.

3.2. Verscheidenheid van de herkomst van weefsels die embryoïden vormen

Somatische embryogenese treedt bij verschillende weefsels op; maar niet alle weefsels bij eenzelfde gewas hebben hetzelfde vermogen tot embryogenese. Als algemene regel zijn het de weefsels, die van een embryo komen die duidelijk en reproduceerbaar het grootste vermogen tot regeneratie tonen. Soms ontwikkelen zich embryo's van de tweede generatie 'spontaan' op een eerste generatie somatische of androgene embryo's (Thomas et al. 1976).

Het ontwikkelingsstadium van de embryo's bij het in cultuur brengen is soms erg belangrijk. Bij Dendrophtoe falcata vormen alleen de weefsels van pro-embryo's, die het hartvormige stadium nog niet voorbij zijn, embryo's (Johri en Bajaj 1965). Andere gewassen vertonen een algemener vermogen tot embryo-vorming, dat ook tot uiting komt bij embryo's die al volledig ontwikkeld zijn.

Weefsels van wortel, stengel, bladstelen en bladeren worden bij voorkeur gebruikt voor soorten die een sterk regeneratievermogen bezitten. Voorbeelden hiervan zijn bladstelen van peterselie (Vasil en Hildebrandt 1966) en stengelstukjes van venkel (Maheshwari en Gupta 1965) of van asperge (Wilmar en Hellendoorn 1968). Maar ook bij gewassen, die maar een zwak vermogen tot orgaanvorming hebben, zoals de oliepalm (Rabéchault en Martin 1976) kunnen deze weefsels gebruikt worden. Het bladmesofyl is soms met succes gebruikt, zoals bij Kalanchoë pinnata (Moham Ram en Wadhi 1965), Macleya cordata (Kohlenbach 1965) en Mesembryanthemum floribundum (Mehra en Mehra 1972). Ook bloemweefsels zijn gebruikt, zoals bij Nigella damascena (Raman en Greyson 1974), koolzaad Brassica napus L. oleifera (Margara en Leydecker, 1978), de vruchtwand van Cucurbita pepo (Schroeder 1968) en de nucellus van meerdere Citrus-soorten (Button et al. 1974).

In veel andere gevallen zijn het de weefsels van jonge kiemplantjes, meestal het hypocotyl, die de uitgangscultuur opgeleverd hebben en niet een direct gebruik van embryo's of embryonale weefsels. Voorbeelden zijn Conium maculatum (Netien en Raynaud 1972) en Asparagus officinalis (Wilmar en Hellendoorn 1968).

Protoplasten hebben indirect somatische embryo's opgeleverd. We noemen het geval bij Ranunculus sceleratus (Dorion et al. 1975). Eerst worden protoplasten uit blad geïsoleerd. Regeneratie van cellen van protoplasten lukt vaak als er glutamine in het voedingsmedium zit. Het ontstane callus kan plantjes opleveren na overzetten op een medium zonder groeistoffen, waarschijnlijk met embryoïden als tussenfase.
De cellen, die uit protoplasten verkregen zijn, blijken dus in dit geval een vergelijkbaar vermogen tot regeneratie te hebben met wat we zien in de gewone celkweek. Ook de gebruikte technieken zijn vergelijkbaar, zoals het weglaten van groeistoffen in het vervolgmedium.

De verscheidenheid aan weefsels ,die het grootste vermogen tot de fundamentele capaciteit tot regeneratie vertonen en die van gewas tot gewas - verschillen, doet veronderstellen dat de wezenlijke factoren bij de somatische embryogenese misschien onbekend of onbepaald zijn.

4. Discussie en perspectieven betreffende somatische embryogenese

Het belang van het onderzoek over somatische embryogenese is om aan te tonen, dat het vermogen om een nieuw individu te vormen een fundamentele eigenschap is van de vegetatieve cel en niet een exclusieve eigenschap van de zygote, zoals men lang gedacht heeft.

De verschillen tussen embryogenese in vitro uit geïsoleerde losse cellen en de normale embryogenese van de zygote (Haccius 1973; Ben Badis 1973) schijnen vooral de eerste stadia van de ontwikkeling bij peen te betreffen[1]; maar een diepergaande vergelijkende structurele studie over deze typen embryo's ontbreekt nog.

1) Het pro-embryo, dat uit de zygote ontstaat, vormt door achtereenvolgende delingen in hetzelfde vlak een geheel van acht cellen, die in één rij staan. Pas na dit stadium treedt de eerste longitudinale deling op. Daarentegen vindt in vitro de eerste longitudinale deling, die tot de vorming van een embryoïde zal leiden, veel eerder plaats (McWilliam et al. 1974) en er wordt eerst een weinig gestructureerd aggregaat van cellen gevormd.

De voornaamste latere stadia in de ontwikkeling van het embryo, zoals het hartvormige en torpedostadium, blijken in beide gevallen identiek te zijn. Kunstmatige embryogenese in vitro, zoals de somatische en de androgene, blijft voor de embryoloog een waardevolle techniek om het onopgeloste probleem van de dieperliggende oorzaken van de embryogenese te bestuderen.

De discussie blijft open over het relatieve belang van a) de afscheiding van de cellen, hetgeen het onafhankelijk worden van de fysiologische beperkingen met zich meebrengt binnen het weefsel; b) het milieu met betrekking tot voedings- en groeistoffen en c) eventuele nog onbekende factoren. Een wezenlijk probleem zijn de factoren die de polariteit van de cel bepalen en de oriëntatie van de eerste delingsvlakken, die tot de vorming van bipolaire structuren leiden met de gelijktijdige werking van een stengel- en een wortelmeristeem.

In het toegepaste vlak van de plantenfysiologie kan het voor de biochemicus van veel belang zijn om over bronnen van stabiele cellen, die wel of geen embryo's vormen, te beschikken en die beiden dezelfde herkomst heben om metabolische verschillen te kunnen vergelijken, o.a. die welke de verschillende endogene groeistoffen betreffen.
De mogelijkheden van toepassing van somatische embryogenese bij vegetatieve vermeerdering zijn momenteel erg beperkt; vaak worden de risico's van het optreden van varianten onderschat.

We hopen, dat de somatische embryogenese in de toekomst steeds als het nodig is om met celculturen te werken, de methode bij uitstek wordt om vermeerdering van plantjes te verkrijgen. Dit zou vooral het complement moeten worden van manipulaties op celniveau, zoals mutagenese en fusie van protoplasten.

In een meer nabije toekomst zou de somatische embryogenese, eventueel gekoppeld aan scheut- en wortelvorming op callus, ook meer gebruikt kunnen worden bij gewassen, die lastig in de meristeemcultuur zijn, zoals bepaalde houtige planten. Dit kan uiteraard alleen wanneer het mogelijk is om bepaalde weefsels zoals bladweefsels, embryonale weefsels of bloemweefsels te gebruiken. In dit perspectief is het bemoedigend te constateren, dat er somatische embryo's verkregen zijn bij een aantal houtige planten, zoals coniferen, hulst, druif, koffie en oliepalm. Parallel aan het gebruik van embryonaal of meristematisch weefsel zou men ook meer weefsels van bloeiwijzen en bloemen moeten gebruiken.

III

MOGELIJKHEDEN TOT ORGAANVORMING VAN HET STENGELMERISTEEM IN WEEFSELKWEEK

III. MOGELIJKHEDEN TOT ORGAANVORMING VAN HET STENGELMERISTEEM IN WEEFSELKWEEK

A. DOELSTELLINGEN VAN DE CULTUUR VAN MERISTEMEN OF STENGELTOPPEN[1]

De cultuur van meristemen of stengeltoppen wordt fundamenteel en in de praktijk uitgevoerd om drie verschillende redenen:

1. bestudering van de werking van het meristeem;
2. produceren van virusvrije of mycoplasma-vrije klonen uitgaande van besmette moederplanten;
3. vegetatieve vermeerdering met een hoge vermeerderingssnelheid en zo min mogelijk kans op varianten (genetisch afwijkende planten).

1. Kweek van meristemen of stengeltoppen als techniek bij experimenteel onderzoek.

De eerste pogingen tot meristeemcultuur gaan terug tot het begin van de geschiedenis van de cultuur van weefsels en plante-organen. Al in 1922 probeerde Robbins, overigens zonder veel succes, om stengel- en wortelgroeipunten van erwt en mais te kweken. Men vroeg zich in die tijd af of het meristeem een autonome groei en ontwikkeling volgens een vooraf bepaald programma volgt, of dat het daarentegen volledig afhankelijk is van de werking van stoffen uit verschillende organen van de plant. De achtergrond van deze allereerste pogingen lag dus op het fundamentele vlak; het werk van Ball (1946), die als eerste - uitgaande van tamelijk grote toppen - uitgroei kreeg van enkele plantjes van lupine en Oost-Indische kers - paste goed in een entourage van micro-chirurgische proeven.

---

1) De term meristeemcultuur in strikte zin zou op de kweek van de apicale koepel of op de kweek van het meristeem met enkele bladprimordia en een kleine hoeveelheid onderliggend mergweefsel moeten slaan. De term meristeemcultuur wordt volledig onjuist indien toegepast op explantaten langer dan 500 µm, laat staan 1 mm. De juiste term is dan stengeltopcultuur, hetgeen zonder nadere aanduiding, het eind van een stengel betreft. In elk afzonderlijk geval is het noodzakelijk om de afmetingen van het explantaat aan te geven.

Ook de eerste kweek van vegetatiepunten (ongeveer 150 μm) bij varens, zoals Adiantum, Osmunda en Selaginella door Wetmore en Morel (1949) en Wetmore (1954) was bedoeld om de vereiste kweekcondities van het meristeem te achterhalen.
Momenteel worden meristeemcultuur en de kweek van stengeltoppen nog altijd gebruikt voor de bestudering van waarschijnlijk ingewikkelde interacties die de morfogenese sturen. De techniek wordt toegepast bij de bestudering van bloei-inductie, van de ontwikkelingsstadia van het bloemmeristeem en ook van de eventuele terugkeer naar de vegetatieve staat.

2. Kweek van meristemen of stengeltoppen met als doel vegetatieve vermeerdering.

Morel en Martin (1952, 1955) hebben als eersten bij de Dahlia en de aardappel uit viruszieke klonen gezonde planten verkregen. De explantaten van ongeveer 200 μm omvatten, behalve de apicale koepel, enkele bladprimordia alsook wat onderliggend mergweefsel. Dit onderzoek heeft groot opzien gebaard, zowel op het fundamentele als het toegepaste gebied:

a. Het bewees het vermogen van vegetatiepunten uit te groeien tot volledige planten; dit bleek een algemene eigenschap van hogere planten en niet exclusief van varens.
b. Het leverde tegelijkertijd het experimentele bewijs van het vermogen van meristematische weefsels om nagenoeg virusvrij te blijven in een besmet weefselmilieu. Meristeemcultuur is inderdaad een methode bij uitstek geworden om gezonde klonen op te bouwen.

Een tweede stap vooruit in de meristeemcultuur met als doel vegetatieve vermeerdering wordt gemarkeerd door de waarnemingen van Morel bij orchideeën. Als het meristeem van Cymbidium van de moederplant wordt afgenomen en in vitro wordt gekweekt, ontstaat er een protocorm, een structuur die zich normaliter via kieming uit het embryo ontwikkelt. Het protocorm is een kleine orgaanvormende knol, die talrijke adventieve vegetatiepunten kan vormen, die op hun beurt nieuwe protocormen kunnen opleveren of zich tot bebladerde scheuten kunnen ontwikkelen. De waarnemingen van Morel bij orchideeën hebben in twee opzichten effect gehad: a. direct, doordat ze de traditionele vermeerderingswijzen van orchideeën omver wierpen; en b. indirect, door te suggereren dat de techniek van in vitro vermeerdering in een vroegtijdig stadium en met een hoge vermeerderingssnelheid waarschijnlijk tot

talrijke andere gewassen zou kunnen worden uitgebreid.

Een derde stap in de geschiedenis van de vermeerdering door meristeemcultuur was het uitwerken van technieken, die de vermeerdering van axillaire of adventieve meristemen bevorderen en bij verschillende gewassen zo een hoge vermeerderingssnelheid mogelijk maken.

Het kweken van meristemen of stengeltoppen blijft de meest algemeen toepasbare in vitro vermeerderingsmethode die de beste garantie biedt om genetisch identieke planten te verkrijgen zonder ongewenste 'varianten'. Het combineert gewasbescherming met een hoge vermeerderingssnelheid. Behalve het praktische belang blijft het een experimentele methode, die altijd bruikbaar is om te proberen onopgeloste problemen van de morfogenese aan te pakken.

Tabel IX geeft een kort overzicht van de voornaamste stadia in de geschiedenis van de meristeemcultuur en van de kweek van stengeltoppen met hun verschillende toepassingen.

B. MERISTEEMCULTUUR EN HET OPBOUWEN VAN GEZONDE KLONEN

1. Het plantenziektenkundige probleem

Als vegetatieve vermeerdering steeds wordt herhaald en gebruikt als hoofdmethode van vermeerdering, bevordert dat opeenhoping van virussen. De aardappel bijvoorbeeld heeft een aanzienlijk economisch belang op het gehele noordelijke halfrond. Virusziekten veroorzaken een voortschrijdende afname in het productievermogen. Dergelijke 'degeneratieziekten' kunnen dan ook aanzienlijke opbrengstverliezen veroorzaken. Schijnbaar gezonde planten kunnen toch dragers van virus zijn; dit kan verliezen veroorzaken in de grootte-orde van 10 tot 15% in vergelijking met gezond gemaakte klonen. Een warmtebehandeling, die langdurig wordt toegepast bij ongeveer 37°C of kort bij 50°C, is niet bij alle virussen even effectief.

2. Principe van de methode

In een besmette plant blijkt de verdeling van het virus af te hangen van het orgaan; er bestaan zeer duidelijke concentratiegradiënten.
Diverse oude waarnemingen suggereerden al dat het meristeem van een zieke plant praktisch vrij is van virus. Overdracht van virus via zaad komt in

TABEL IX

Stadia en vooruitzichten van meristeemcultuur en de kweek van stengeltoppen

. Pogingen tot kweek van stengel- en wortelmeristemen	Robbins 1922
. Ontwikkeling van plantjes uit een topje	Ball 1946
. Meristeemcultuur en ontwikkeling van plantjes bij enkele vaatcryptogamen	Wetmore en Morel 1949 Wetmore 1954
. Meristeemcultuur van bedektzadigen en opbouw van gezonde klonen van dahlia en aardappel	Morel en Martin 1952, 1955
. Vorming van protocormen bij orchideeën door meristeemcultuur en vroegtijdige in vitro vegetatieve vermeerdering met een hoge vermeerderingssnelheid	Morel 1960
. Vorming van axillaire scheuten in stengeltopcultuur. Voorbeelden:	
anjer	Hackett en Anderson 1967
aardbei	Adams 1972
-	Boxus 1974
. Bloei-inductie van afgesneden losse toppen onder niet-inducerende omstandigheden	
Voorbeelden:	
Perilla nankinensis, korte dagplant	Raghavan en Jacobs 1961
Sinapis alba, lange dagplant	Deltour 1970
Terugkeer van een top van een bloeiwijze naar de vegetatieve staat	
Voorbeelden:	
tabak	Martin et al. 1967
bloemkool	Crisp en Walkey 1974 David en Margara 1979

uitzonderingsgevallen voor. Reeds in zijn werk over de weefselkweek van tomatenwortels was White (1934) er in geslaagd om wortels met tabaksmozaiekvirus te kweken. Door wortelstukjes van ongeveer 1 mm lengte vlak bij de top te nemen en over te enten, kreeg hij virusvrij materiaal. Limasset en Cornuet (1949) vonden mb.v. serologische methodes in de stengel dezelfde concentratiegradiënt, die al in de wortel gevonden was en concludeerden dat het meristeem van besmette planten praktisch vrij was van virus.
Steunend op deze waarnemingen en ook op de resultaten van de eerste pogingen tot meristeemcultuur, bewezen Morel en Martin (1952, 1955) proefondervindelijk dat men bij dahlia en aardappel gezonde klonen uit zieke planten kon isoleren.

3. Kweektechniek

3.1. Stadia in de kweek

Meristeemcultuur is een micro-stekmethode. De verschillende stadia van de cultuur die op de aardappel betrekking heeft, maar ook op talrijke andere kruidachtige of houtige gewassen, zijn schematisch voorgesteld in fig. 18.

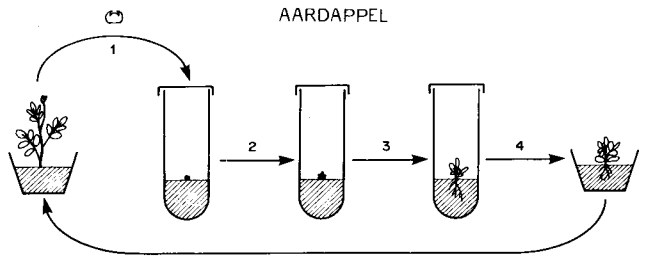


Fig. 18.

Fig. 18. Schema van de meristeemcultuur bij aardappel en diverse andere gewassen met als doel gezond materiaal te verkrijgen.
Achtereenvolgende stadia bij het verkrijgen van gezonde planten:
1. Isoleren van het meristeem;
2. Hervatting van de normale vegetatieve groei en activiteit van het meristeem;
3. Beworteling van de scheut;
4. Oppotten van het plantje.

1e stadium: Isolatie en cultuur van het meristeem

Het meristeem is een orgaanvormende eindzone van de scheut. Het wordt door bladeren en bladprimordia beschermd en dit vergemakkelijkt de ontsmetting. Onderdompelen van de scheut in een oplossing van 5% Ca-hypochloriet gedurende 10 minuten is in eenvoudige gevallen over het algemeen voldoende. De afmetingen van het meristeem hangen af van de cultivar en het ontwikkelingsstadium. Ruwweg kunnen we zeggen dat het eruit ziet als een koepel van ongeveer 100 µm doorsnede en 200 µm lengte. Moeilijkheden kunnen optreden door de kleine afmetingen van het explantaat en de bijzondere eisen die het meristeem stelt.

Het is duidelijk, dat het moeilijker is om uit explantaten met kleine afmetingen normale groei en ontwikkeling van een plantje te krijgen. Daarentegen neemt het risico om virus mee te nemen snel toe bij toename van de afmetingen van het explantaat. Explantaten van 1 mm mogen we niet meer als 'meristemen' beschouwen, maar als stengeltoppen.

In de praktijk kan men met stukjes scheermes, gemonteerd op een naaldhouder, met een zekere handigheid explantaten van afmetingen van 200 tot 500 µm isoleren. De aanwezigheid van bladprimordia blijkt belangrijker te zijn dan het volume van de weefsels.

2e stadium: Hervatting van groei en activiteit van het meristeem

Een probleem is het genezen van de wond en het opnieuw gaan groeien van het explantaat. Het meristeem moet zijn normale 'plastochronische' ontwikkeling met afzetting van bladprimordia hervatten. De samenstelling van het voedingsmedium is daarbij van wezenlijk belang.

3e stadium: Beworteling

Het niet bewortelen van stekken is een beperkende factor in de vermeerdering. Wanneer de kweekomstandigheden niet optimaal zijn, zien we na het aanvankelijk begin van de groei, een groeistilstand optreden.

4e stadium: Oppotten in de kas

Bij de aardappel treden er normaliter geen problemen op. In de praktijk combineren verschillende auteurs warmtebehandeling met meristeemcultuur (zie Quak 1977).

3.2. Kweekmedium

a. Voorbeeld van de aardappel.

Het oorspronkelijke voedingsmedium van Morel en Martin (1955) bevatte de half-verdunde voedingsoplossing volgens Knop, aangevuld met microelementen, 4% glucose, vitaminen in lage concentratie en 0,001 mg/l NAA.

Om groeistilstand, die vaak optreedt, te vermijden toonde Morel en Martin (1964) aan dat het nodig was de concentratie aan kalium, dat onmisbaar is voor de actieve groei van jonge weefsels, te verhogen. Ook was het van belang gibberelline toe te voegen, dat onder deze omstandigheden op de 'primaire meristeemring', waar de bladprimordia worden aangelegd, schijnt in te werken.

Het nut van het toevoegen van gibberelline aan het medium is bevestigd door Pennazio en Redolfi (1974), die een toename van het slagingspercentage zien van 49% vergeleken met de controle op vloeibaar medium.

Het meest gebruikte minerale medium is dat van Murashige en Skoog. Mellor en Stace-Smith (1971) melden het nut van actieve koolstof, dat de groei van de top versnelt en later ook een betere beworteling geeft.

b. Andere voorbeelden.

Het voedingsmedium moet aan elk bijzonder geval aangepast worden. In het algemeen verdient het aanbeveling media te gebruiken, die minder totaal stikstof en ammonium bevatten dan het medium van Murashige en Skoog. De pH kan bij bepaalde gewassen een beperkende factor worden, wanneer een zekere drempel overschreden wordt. Zo meldt Stone (1963) bij de anjer een slagingspercentage van 59% bij pH 5,5 en slechts 4% bij pH 6. Omgekeerd kan een te lage pH vooral op de beworteling remmend gaan werken.

De optimale samenstelling aan groeiregulatoren blijkt eveneens van het gewas af te hangen. Het gunstig effect van gibberellinen is zeker niet algemeen. Toevoeging van een zwak auxine verdient soms aanbeveling.

3.3. Verschillende technische problemen

a. Bruinverkleuring van het medium.

De afscheiding van fenolverbindingen, die het medium en soms het explantaat zelf bruin kleuren en tenslotte een groeiremming veroorzaken, is een probleem dat we vaak tegenkomen, vooral bij houtige gewassen. Voorgestelde oplossingen lopen uiteen: toevoeging van anti-oxydantia,

zoals ascorbinezuur, aan het medium, of actieve koolstof, dat de remstoffen absorbeert, en vroegtijdig overzetten van het meristeem, dat zich uit het ontstane explantaat ontwikkeld heeft, op een nieuw medium. Huth en Bode (1970) voeren meristeemcultuur van aardappel uit in het donker om de activiteit van auxine-oxydase tegen te gaan.
Pillai en Hildebrandt (1968) constateerden dat bij Pelargonium een donkerperiode nodig is om de vorming van polyfenolen te beperken.

b. Verwijdering van virus.

Uitsluitend de apicale koepel schijnt altijd virusvrij te zijn. Als het nodig is om van grotere explantaten uit te gaan dan is het uitgangsexplantaat niet altijd virusvrij.
De verdeling van het virus in de top kan afhangen van de aard van het virus en van de waardplant. De studie van Mori en Hosokawa (1977) met 12 plantesoorten, zoals tabak, petunia en tomaat, en 20 soorten virus, is in dit verband van belang.
Sommige virussen zijn makkelijker te elimineren dan andere. Bij de aardappel (Morel, Martin en Muller 1968; Ten Houten et al. 1968) kon virus A veel gemakkelijker geëlimineerd worden dan virus X. Bij de anjer (Stone 1968) werd het kringvlekkenvirus ('ringspot') veel moeilijker geëlimineerd dan het mozaiekvirus.
Om volledige verwijdering in moeilijke gevallen te verkrijgen, wordt warmtebehandeling soms met meristeemcultuur gecombineerd (Kassanis 1965, 1967). Deze methode kan evenwel het optreden van 'varianten' bevorderen, zoals Hollings (1965) bij Pelargonium heeft opgemerkt.
Bij de aardappel werken Mellor en Stace-Smith (1977) op de volgende manier: Men gaat uit van een besmette knol met één enkel oog om een sterke scheut te krijgen, die eerst gestekt wordt en daarna gedurende 6 weken met warmte behandeld wordt, nl. 36°C overdag en 33°C 's nachts. Tijdens de behandeling wordt getopt om uitlopen van axillaire scheuten te verkrijgen, waarvan de meristemen vervolgens geïsoleerd worden.

4. Uitbreiding van de methode tot talrijke andere gewassen

De aardappel is het eerste voorbeeld van toepassing van meristeemcultuur op grote schaal bij een gewas van groot economisch belang met als doel gezond materiaal te verkrijgen. Mellor en Stace-Smith (1977) geven een lijst van ongeveer 34 cultivars, die op deze wijze gezond konden worden gemaakt.

Hoewel deze lijst waarschijnlijk onvolledig is, geeft het toch het succes van de methode aan. De techniek heeft zich snel uitgebreid tot talrijke tuinbouwgewassen, waaronder veel siergewassen, maar ook tot houtige en tropische gewassen (zie Tabel X).

TABEL X

Voorbeelden van het opbouwen van virusvrije klonen door meristeemcultuur[1)]

Familie	Gewas	Auteur
Amaryllidaceae	Nerine sp.	Hakkaart et al. 1975
Araceae	Caladium hortulanum	Hartman 1974
-	Calocasia esculenta	-
-	Xanthosoma brasiliense	-
Bromeliaceae	Ananas sativus	Sita et al. 1974
Cannabinaceae	Humulus lupulus	Vine en Jones 1969
Caryophyllaceae	Dianthus caryophyllus	Quak 1957, 1961
-	-	Stone 1963
-	-	Hollings 1965
-	-	Maia et al. 1969
-	-	Kowalska 1974
Compositae	Chrysanthemum sp.	Hakkaart en Quak 1964
-	-	Hollings 1965, 1971
-	Dahlia sp.	Morel en Martin 1952
Cruciferae	Brassica oleracea, botrytis	Walkey et al. 1974
Geraniaceae	Pelargonium sp.	Pillai en Hildebrandt 1968
-	-	Beauchesne 1974
Gramineae	Saccharum officinarum	Mori 1971; Leu 1972
Iridaceae	Freesia sp.	Brants en Vermeulen 1965
-	-	Mori et al. 1975
-	Gladiolus sp.	Ziv et al. 1970
Liliaceae	Allium sativum	Mori 1971
-	Hyacinthus sp.	Van Slogteren 1966
-	-	Asjes et al. 1974
-	Lilium sp.	Nishizawa en Nishi 1966
-	-	Sheridan 1968
-	-	Allen 1974
Musaceae	Musa sp.	Berg en Bustamante 1974

TABEL X - vervolg -

Familie	Gewas	Auteur
Orchidaceae	Cymbidium sp.	Morel 1960
Polygonaceae	Rheum rhaponticum	Walkey 1968
Ranunculaceae	Ranunculus asiaticus	Maia et al. 1973
Rosaceae	Fragaria sp.	Miller en Belkengren 1963
-	-	Vine 1968
-	-	Adams 1972
-	-	Mullin et al. 1974
-	Prunus sp.	Boxus en Quoirin 1974
-	Rubus idaeus	Putz 1971
Saxifragaceae	Ribes grossularia	Jones en Vine 1968
Solanaceae	Petunia sp.	Mori 1971
-	Solanum tuberosum	Morel en Martin 1955
-	-	Morel en Muller 1964
-	-	Stace-Smith en Mellor 1970
-	-	MacDonald 1973; Mori 1971
-	-	Mellor en Stace-Smith 1977
Vitaceae	Vitis rupestris	Galzy 1972

1) Zonder volledig te zijn geeft deze tabel enkele voorbeelden, die de verscheidenheid aan gekweekte gewassen aangeven, waarop de meristeemcultuur, aangevangen door Morel en Martin, is toegepast.

Samenvattend blijft de meristeemcultuur voortgekomen uit het werk van Morel en Martin, de meest veilige techniek van in vitro vegetatieve vermeerdering en wel om de volgende redenen: a. geeft de minste kans op varianten; b. kan virus elimineren vooral indien gecombineerd met warmtetherapie; c. is gemakkelijker toe te passen dan regeneratie door scheut- en wortelvorming bij planten met een zwak vermogen tot orgaanvorming in vitro.
Alhoewel meristeemcultuur op ruime schaal wordt toegepast, is het niet zeker of men de mogelijkheden van de techniek volledig heeft uitgebuit. De techniek zou vooral op ruimere schaal kunnen worden gebruikt voor koudebewaring in vitro en ook om de internationale uitwisseling van virusvrije klonen te bevorderen. De oprichting van een 'bank van gezonde planten' is al door Martin in 1959 voorgesteld (Martin 1980).

C. IN VITRO VERMEERDERING VAN PROTOCORMEN VAN ORCHIDEEEN

Orchideeën leveren een uiterst interessant voorbeeld op. Door het bestaan van een bijzondere orgaanvormende structuur, het protocorm, kan de vegetatieve vermeerdering in een vroegtijdig stadium van de ontwikkeling met een geweldige snelheid worden uitgevoerd.
Door het bijzondere geval van orchideeën is men op de gedachte gekomen de methode voor andere gewassen uit te breiden. Het protocorm is nog steeds een interessant proefmodel voor onderzoek over orgaanvorming.

1. De bijzondere ontwikkeling van het orchideeënmeristeem

1.1. Het protocorm, dat na kieming ontstaat

De ontwikkeling van orchideeën is heel bijzonder. Het zaad bevat een erg klein embryo, bestaande uit een betrekkelijk gering aantal cellen. Onder normale omstandigheden kan de verdere ontwikkeling samenhangen met stoffen, die door mycorrhizaschimmels geleverd worden (Bernard 1909). Er wordt ook op eenvoudige voedingsbodems gezaaid.
Het protocorm, dat ontstaat uit het embryo, dat op zijn beurt weer uit zaad voortkomt, heeft in het algemeen een eindknop en een krans van 'rhizoïden'.

In het algemeen vormen de wortels zich altijd later adventief aan de basis van de knopen van de bebladerde stengels. Het protocorm is door een epidermis bedekt. Het is een orgaanvormende structuur, welke door adventieve

knopvorming weer andere protocormen kan vormen. Opdeling van het protocorm veroorzaakt de vorming van deze adventieve protocormen uit cellen van oppervlakkig gelegen weefsels. Het protocorm kan zich vormen zonder dat men een goed gestructureerd primair meristeem ziet. De vorming van primaire meristemen volgt dus na de vorming van het protocorm zelf, in plaats van er aan vooraf te gaan. Deze meristemen kunnen zich tot bebladerde stengels ontwikkelen, waarbij de bladeren een afwisselende bladstand vertonen.

1.2. Het protocorm in de weefselkweek

Morel (1960, 1963) heeft waargenomen, dat Cymbidium-stengeltoppen van ongeveer 1 mm met enkele primordia een protocorm met rhizoïden vormden. We merken op, dat pogingen tot meristeemcultuur sensu stricto, dus van de apicale koepel zonder primordia, nooit geslaagd zijn.

De ontwikkeling van het explantaat is opmerkelijk. Er treedt geen callusvorming op en ook geen onmiddellijke wortelvorming, terwijl het stengelmeristeem ook niet normaal functioneert door afzetting van nieuwe bladprimordia.

De eerste fase van de kweek verloopt met het vormen van een protocorm. De knoppen, die zich later zullen ontwikkelen, zijn adventieve knoppen, die door deze orgaanvormende structuur worden gevormd.

Het protocorm in de weefselkweek heeft dezelfde eigenschappen als het protocorm uit zaad. Het is ook in staat om nieuwe protocormen te vormen, die zich al of niet snel tot bebladerde stengels ontwikkelen. Het kan ook in stukken gedeeld worden en met een uitzonderlijk hoge vermeerderingssnelheid vermeerderd worden. Elke maand kan overgeënt worden en elk protocorm kan in 4 tot 6 stukken opgedeeld worden.

Het voordeel van het protocorm in de weefselkweek, boven het protocorm uit zaad, is dat vermeerdering mogelijk is met behoud van het hybride karakter. De protocormen uit zaad zijn daarentegen gevormd nadat uitsplitsing heeft plaatsgevonden.

De in vitro vermeerdering van orchideeën maakt alleen in het eerste stadium gebruik van meristeemcultuur, nl. het vormen van een nieuw protocorm. De vermeerdering zelf berust op de orgaanvormende mogelijkheden van het protocorm (fig. 19).

Fig. 19.

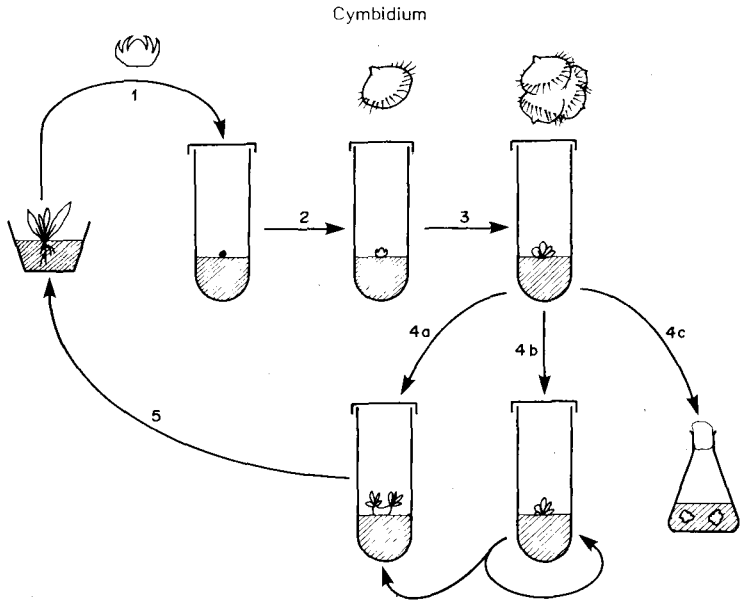


Fig. 19. Schema van vermeerdering van Cymbidium door cultuur van protocormen in vitro.
Achtereenvolgende stadia van de kweek:
1. Isolatie van het meristeem;
2. Begin van groei en vorming van een protocorm;
3. Vorming van adventieve protocormen;
4. Determinatie van de latere morfogenese, 4a. zonder overenten treedt vorming van adventieve scheuten op, gevolgd door wortels, zodat een gehele plant ontstaat, 4b. na opdelen en overenten vorming van adventieve protocormen, 4c. vorming van grote aantallen protocormen in stilstaand vloeibaar medium bij matig zuurstofgebrek;
5. Oppotten van de plantjes in de kas.

2. *Cymbidium als modelvoorbeeld*

2.1. Orgaanvormende mogelijkheden van het protocorm van Cymbidium

Na de ontdekking van Morel, die aangevuld werd door de anatomische studies van Champagnat et al. (1966), hebben vele auteurs de ontwikkeling van het Cymbidium-protocorm in vitro bestudeerd, waarbij ze profiteerden van de flexibiliteit van het materiaal.

Combineren van groeistoffen maakt het sturen van de orgaanvorming bijna naar willekeur mogelijk (Fonnesbech 1972). Op een basismedium zonder groeistoffen eindigt de normale ontwikkeling van het protocorm in de vorming van één of meer bebladerde scheuten uit de adventieve vegetatiepunten. De eerste wortels vormen zich aan de basis van de stengels.

Toevoeging van NAA 10^{-5} M bevordert de ontwikkeling van grote protocormen, terwijl omgekeerd gibberelline 10^{-5} M een strekking veroorzaakt van de scheuten ten koste van de ontwikkeling van de protocormen. Cytokininen in hoge concentratie (kinetine 10^{-4} M) veroorzaken de vorming van een grote hoeveelheid vegetatiepunten.

Andere combinaties veroorzaken een directe vorming van wortels op het protocorm of de vorming van talrijke wortelharen over het hele oppervlak van het protocorm, terwijl onder normale omstandigheden de 'rhizoïden' in het algemeen in een krans geplaats zijn in het midden van het protocorm.

Vooral op vloeibaar medium kan men ook een algemene callusvorming krijgen. Het uitzaaien van kleine celaggregaten kan daarna tot de vorming van nieuwe protocormen leiden (Steward en Mapes 1971a).
Het sturen van de organogenese naar vorming van protocormen of groei van bebladerde scheuten kan ook verkregen worden in eenvoudige media zonder groeistoffen. Homès et al. (1973) constateerden dat een beperkt zuurstofgebrek, door totale onderdompeling van de protocormen in een stationair vloeibaar medium de groei van de vegetatiepunten remde en de orgaanvorming stuurde naar de vorming van een groot aantal protocormen. Op deze manier krijgt men in één of twee maanden soms enorme kolonies.

Opvallend is dat onder deze omstandigheden het eindmeristeem van het protocorm nooit de normale structuur kan krijgen van een stengelmeristeem, dat bladprimordia afsplitst aan de primaire meristeemring.
Wanneer de protocormen niet volledig ondergedompeld zijn herkrijgt het eindmeristeem zijn normale structuur en hervat zijn groei, eindigend in de

vorming van een bebladerde scheut, als die tenminste niet aborteert en vervangen wordt door adventieve meristemen.

2.2. Kweekmedia

Op de eenvoudige voedingsmedia, zoals ze in het begin gebruikt werden, was de groei van de protocormen betrekkelijk langzaam. Toename van de groei werd verkregen door toevoeging van aminozuren, vitaminen, groeistoffen (auxinen, cytokininen), eventueel kokosnootmelk of zeer uiteenlopende planten-extracten.

Het medium van Fonnesbech (1972) veroorzaakt veel groei en bevat naast kinetine 10^{-6} M en NAA 10^{-5} M ook 100 mg/l meso-inositol, vitaminen (thiamine, pyridoxine en nicotinezuur) en aminozuren. Caseine-hydrolysaat (2 tot 3 g/l) kan worden vervangen door glutamine 300 mg/l. Maar arginine werkt remmend en asparagine heeft geen effect.

Orchideeën kunnen in de weefselkweek zonder schade grote hoeveelheden van verschillende organische stoffen verdragen. Het is niet duidelijk of stikstof in organische vorm onmisbaar is. Homès et al. (1973) krijgen goede groei van protocormen op een uitgewogen minerale voedingsbodem. Wanneer we de meest gebruikte minerale samenstelling van de voedingsmedia voor de cultuur van orchideeën vergelijken, dan zien we een betrekkelijk hoog sulfaatgehalte in de media van Knudson (1946), Wimber (1963, 1965) en Homès et al. (1973).

Bij proeven met een reeks minerale basismedia hebben we echter geen significant verschil in toename van vers en drooggewicht gevonden bij verschillende media mits er een mengsel van aminozuren was toegevoegd.
Homès en Vanseveren-Van Espen (1973) hebben aangetoond, dat het veranderen van de concentratie saccharose al genoeg is om de orgaanvorming te sturen. Concentraties in de grootte-orde van 1,6 tot 2% zijn optimaal voor groei en proliferatie van protocormen in een vloeibaar medium. Hoge concentraties, zoals 10% en meer, remmen de groei en de protocormen zien er dan uit als reserveorganen vol zetmeel en vet. Zeer lage concentraties suiker vertragen de groei zonder dat de protocormen er dan als opslagplaatsen voor reservevoedsel uitzien.

2.3. Begrip protocorm

Het protocorm van een orchidee is een bijzonder geval van een knolvormige structuur; het vermogen van orchideeën om pseudobulben te vormen uit

zich hier in een uiterst vroegtijdige knolvorming.
Onder natuurlijke omstandigheden treedt het protocorm op in een overgangsstadium van de ontwikkeling van het embryo tot kiemplantje.

De vegetatiepunt is weinig gestructureerd en kan een bepaalde tijd verstoken blijven van bladprimordia. De cellen die aan het oppervlak van het protocorm gelegen zijn, blijken de totipotentie van de embryonale cellen te behouden: vandaar het vermogen tot vorming van talrijke adventieve vegetatiepunten.
Het protocorm van orchideeën is dus een orgaanvormende structuur, spontaan gevormd uit een embryo, maar die ook onder de experimentele omstandigheden van de weefselkweek van eens tengeltop van een ander protocorm of uit een callus van verschillende organen verkregen kan worden.

Het uitzonderlijk belang voor de vegetatieve vermeerdering komt gelijktijdig voort uit: a. het vermogen van de oppervlakkig gelegen cellen tot orgaanvorming; b. de bijzondere ontwikkeling van het vegetatiepunt, dat weinig structuur vertoont en bij voorkeur zich tot een protocorm ontwikkelt in plaats van een bebladerde scheut. Door het benutten van deze twee mogelijkheden kan men telkens nieuwe protocormen laten ontstaan en aldus in vitro vermeerdering verkrijgen in een uitzonderlijk vroeg stadium in de ontwikkeling.

3. Regeneratiewijzen van plantjes bij verschillende orchideeën

3.1. (Uitbreiding van de) vermeerdering van andere orchideeën door kweek van protocormen in vitro

Morel (1970, 1974) zelf had al zijn oorspronkelijke waarnemingen over vorming en vermeerdering van protocormen tot verschillende andere orchideeën uitgebreid, zoals de genera Cattleya, Phalaenopsis, Phaius, Miltonia, Odontoglossum, Odontioda, Ophrys en Vanda.
Het vermogen tot vorming van adventieve protocormen blijkt wijd verspreid in de gehele familie voor te komen, waarbij wel detailverschillen gevonden zijn. Bij Cattleya zijn de beginexplantaten knoppen van tamelijk grote afmetingen, minstens 1,5 mm lang, en dus voorzien van bladprimordia. De adventieve protocormen worden gevormd aan de basis van bladeren (Champagnat et al. 1970) en talrijke adventieve meristemen ontwikkelen zich direct tot scheuten zonder vorming van een protocorm.

Morel (1974) nam de vorming van duidelijk afzonderlijke protocormen waar bij Lycaste, maar juist een grote hoeveelheid kleine adventieve protocormen bij Odontoglossum en Miltonia. Daarentegen ondervond hij moeilijkheden om regeneratie van plantjes te krijgen, uitgaande van het protocorm bij de moeilijk te vermeerderen Paphiopedilum.
Het werk over de weefselkweek van orchideeën is sedertdien uitgebreid tot talrijke soorten en hybriden; hiervan is door Rao (1977) een lijst opgesteld.

3.2. Variatie in de gebruikte organen en weefsels

De vorming van nieuwe protocormen en uiteindelijk van stengelmeristemen, die zich direct tot scheuten ontwikkelen is bij verschillende organen waargenomen.

a. Blad.

De vorming van nieuwe protocormen en scheuten kan men eventueel bij Cattleya op de basis van het blad krijgen (Champagnat en Morel 1969), maar ook aan de eindpunten van jonge bladeren bij Dendrobium, Epidendrum en Laeliocattleya. De aanleg van protocormen verloopt dan via callusvorming (Churchill et al. 1971, 1973).
Tot nu toe is het niet mogelijk geweest om een directe overgang waar te nemen van het eindmeristeem van het blad in een stengelmeristeem of een meristeem, dat protocormen aanlegt.

b. Stengelweefsel.

De vorming van nieuwe meristemen en de regeneratie van plantjes uit stengelexplantaten, die bij knopen weggenomen zijn, is bij Phalaenopsis waargenomen door Scully (1966) en bij Vanda door Sagawa en Sehgal (1967).

c. Wortels en rhizomen.

Talrijke pogingen tot regeneratie vanuit stukjes luchtwortel zijn op mislukkingen uitgelopen. Toch is de scheutvorming uit rhizoomexplantaten in de weefselkweek na toevoeging van arginine (10^{-3} M) waargenomen.

d. Weefsels van bloeiwijzen.

Bij talrijke soorten behorende tot de monocotylen en dicotylen blijken weefsels van de bloeiwijzen een bijzonder vermogen tot orgaanvorming te hebben. Dit vermogen is bij orchideeën nog maar nauwelijks benut. Toch is orgaanvorming bij Neostylis waargenomen in bloemknopcultures (Intuwong en Sagawa 1973; Singh en Sagawa 1972).

e. Celsuspensiecultuur.

Bij Cymbidium hebben Steward en Mapes (1971a) uitgaande van callus uit meristeemcultuur een celsuspensiecultuur verkregen, waarin men aanleg kan krijgen van protocormne, welke verder ontwikkelen tot plantjes op een agarmedium.

De onderzoekers zien een analogie tussen de directe vorming van protocormen uit kleine celgroepjes en de somatische embryogenese, waarbij ze het protocorm als een ontwikkelingsstadium bij de normale embryogenese beschouwen.

4. Bijdrage van het onderzoek van Morel over orchideeën aan de vegetatieve in vitro vermeerdering

De oorspronkelijke waarnemingen van Morel over het protocorm van Cymbidium komen voort uit de toepassing van meristeemcultuur voor het opbouwen van virusvrije klonen. De in vitro vermeerdering van orchideeën door deling van protocormen verschilt echter van de vermeerdering van aardappel door meristeemcultuur. Bij de eigenlijke meristeemcultuur zijn het axillaire scheuten van het stengeltopje, welke in cultuur zijn gebracht, die zorgen voor de vermeerdering. Bij Cymbidium zijn dit adventieve scheuten die op het protocorm gevormd worden. Meristeemcultuur komt alleen maar in het begin aan de orde tijdens het starten van de cultuur van de protocormen.

De proeven van Morel met orchideeën en het vele onderzoek, dat dit tot gevolg heeft gehad, hebben een belangrijke invloed uitgeoefend op verschillende terreinen van de in vitro vegetatieve vermeerdering. Het oorspronkelijke van Morel's methode bestond hierin, dat hij vermeerderde in een veel vroeger stadium dan bij de traditionele technieken mogelijk was; daardoor realiseerde hij een onvergelijkbaar snelle vermeerdering.

Het uitbreiden van de methode tot een groot aantal genera en soorten heeft de productiemethode van orchideeën volledig veranderd. Men kon echter de directe toepassing van deze methode tot andere zaadplanten moeilijk voorstellen. Toch heeft het economisch belang ervan de gedachte opgewekt om na te gaan of men door gebruik te maken van andere structuren mutatis mutandis deze principes niet zou kunnen toepassen, te weten:

a. de vermeerderingsfase in vitro uit te voeren;
b. de morfogenese te richten naar organogene structuren en niet zozeer naar de groei van organen;

c. de proliferatie van groeipunten in een vroegtijdig stadium te krijgen zonder de ontwikkeling van een plantje af te wachten.

Kortom, het voorbeeld van de orchideeën suggereert, dat het tot uiting komen van de totipotentie van de cel, die leidt tot de regeneratie van plantjes, wellicht onderzocht kan worden, als men bijzondere organogene structuren gebruikt. Bij het protocorm komt deze orgaanvormende structuur spontaan voor en deze komt overeen met een stadium van de normale ontwikkeling.

Onder de gebruikelijke en traditionele omstandigheden van de cultuur van orchideeën werden echter niet alle mogelijkheden van het kortstondig overgangsstadium, dat het protocorm is, benut. Naar aanleiding van dit voorbeeld zal men op een meer systematische wijze de experimentlele orgaanvormende structuren, of het bijzondere orgaanvormde vermogen van speciale weefsels moeten inventariseren. Zo kunnen we bij Anthurium de vorming van een orgaanvormend callus waarnemen aan het uiteinde van jonge blaadjes, die bij voorkeur in de herfst zijn ingezet. Dit callus kan structuren opleveren, die een grote analogie vertonen met protocormen.
Bij koolzaad ontstaat op geïsoleerde bloemknoppen een callus, dat zich kan ontwikkelen tot een georganiseerde structuur met vaatelementen en hier en daar bedekt is met een epidermis. Dit klompje vasculair weefsel kan klompjes van de tweede orde opleveren, die vaak organen vormen.
Geïsoleerde bloemen van Kalanchoë blossfeldiana en de bloembladen van Begonia x elatior cv Rieger kunnen meerdere typen callus produceren. Sommige bestaan uit bolvormige structuren, die zich snel tot wortel-, stengel- of zelfs bloemmeristemen ontwikkelen, maar die ook tot een grote ongedifferentieerde weefselmassa uitgroeien van meerdere mm. Vaak ontstaan er haren aan de basis. De grootste ervan produceren kleine protocormen. De vorming van deze structuren wordt duidelijk bevorderd door toevoeging van 2,4-D in hoge concentraties van 10^{-6} of 10^{-5} M (waarnemingen van de auteur). Deze verschillende waarnemingen wekken de indruk, dat de lessen die we uit het werk van Morel kunnen trekken toch niet voldoende zijn uitgebuit.

D. PROLIFERATIE VAN AXILLAIRE SCHEUTEN IN DE MERISTEEMCULTUUR

Het protocorm is een uitzonderlijke structuur en de in vitro vermeerdering van orchideeën is helaas niet algemeen toepasbaar. Het wezenlijke principe van de methode van Morel bestaat uit het verkrijgen van snelle in vitro vermeerdering zonder het tussenstadium van de vorming van een plant te doorlopen.

Dit wordt ruimschoots toegepast door de morfogenese te sturen in de richting van versnelde afsplitsing van axillaire scheuten, die samengaat met een kortstondige stilstand in de normale groei. Hacket en Anderson (1967) hebben als eersten de mogelijkheid van een dergelijke afsplitsing bij anjer gesignaleerd.

De in vitro vermeerdering via axillaire scheuten na meristeemcultuur blijkt bij de meeste kruidachtige en talrijke houtige gewassen toepasbaar te zijn. Een bijzonder illustratief voorbeeld is dat van aardbei.

1. Voorbeeld aardbei

De methode van Morel en Martin om virusvrije klonen op te bouwen is bij de aardbei snel toegepast, maar lange tijd is de vermeerderingssnelheid beperkt gebleven en leverde elk uitgangsmeristeem maar één plantje met enkele axillaire okselscheutjes op, die gestekt konden worden, Quak (1964), Vine (1968), Belkengren en Miller (1962), Mullin en Schlegel (1975).
Adams (1972) heeft als eerste opgemerkt dat toevoeging van cytokinine aan het voedingsmedium de vorming van talrijke scheuten tot gevolg had. Onder invloed van een tamelijk hoge concentratie cytokinine, tenminste 1 mg/l benzyladenine, zien we een toename van het vermogen tot scheutvorming. De okselknoppen ontwikkelen zich eerst op de normale plaats in de oksel van de bladeren; daarna eventueel in de oksels van de steunblaadjes (stipulae), die normaliter leeg zijn. Tenslotte kunnen scheuten op het basale callus worden gevormd.
Deze gradatie suggereert trouwens, dat er niet zo'n volledige onafhankelijkheid tussen de twee verschijnselen van orgaanvorming, n.l. de ontwikkeling van axillaire scheuten na het opheffen van de apicale dominantie en de vorming van adventieve scheuten bestaat, als men wel denkt.
De ontwikkeling van axillaire en de vorming van adventieve scheuten kan door overenten bewaard blijven of onderbroken worden door het weglaten van het

cytokinine uit het voedingsmedium.

De intensieve axillaire scheutvorming gaat gepaard met een bijzondere morfogenese. De groei van de scheuten is beperkt, de bladeren lijken helemaal op die van jonge kiemplantjes en de ontwikkeling van de bladschijf is beperkt.
Kennelijk bestaat er een incompatibiliteit tussen twee tegengestelde morfogenetische wegen: a. normale groei van scheuten met bladeren, die snel driebladig worden en kunnen bewortelen; b. intensieve vorming van een groot aantal scheutjes welke ten koste gaat van de groei.

1.1. Achtereenvolgende stadia van de in vitro vermeerdering.

De stadia van de in vitro vermeerdering van aardbei, zoals deze door Boxus (1974) zijn uitgewerkt, zijn schematisch voorgesteld in fig. 20. In een voorafgaand stadium worden door meristeemcultuur virusvrije klonen opgebouwd.

Toppen met bladprimordia worden ingezet op een voedingsmedium waaraan een cytokinine is toegevoegd, bijvoorbeeld 1 mg/l benzyladenine. Na de ontwikkeling van okselknoppen worden de bosjes scheuten opgedeeld, in welk stadium de in vitro vermeerdering plaatsvindt. We kunnen ook cultures in de kou bewaren bij 1 tot 5°C. Hervatting van de normale groei kan in principe op elk moment verkregen worden door de cytokinine weg te laten bij het overenten, of door een tekort aan cytokinine in het medium bij oude cultures.

In de praktijk is het de vraag of de behandeling met cytokininen in de gebruikte concentraties en de tijdelijke verandering in de ontwikkeling, niet een daaropvolgende wijziging van de normale morfogenese tot gevolg heeft.

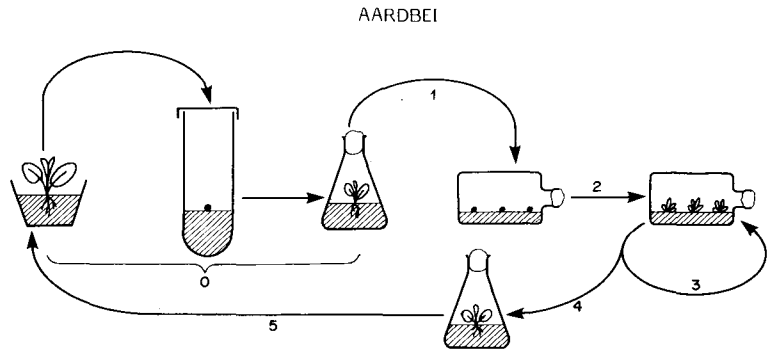


Fig. 20.

Fig. 20. Schema van de in vitro vermeerdering van aardbei door meristeemcultuur. Achtereenvolgende stadia van de cultuur:
0. Voorafgaande opkweek van gezonde plantjes door meristeemcultuur;
1. Inzetten van stengeltoppen met bladprimordia op een voedingsmedium met veel cytokinine;
2. Ontwikkeling van axillaire scheuten;
3. Voortzetting van de scheutvorming en in vitro vermeerdering door opdeling van de bosjes scheutjes;
4. Hervatting van de normale groei en beworteling op een bodem zonder cytokinine;
5. Oppotten in de kas.

1.2. Belang en beperkingen van de methode van in vitro vermeerdering door afsplitsing van axillaire scheuten

De methode zoals die voor de aardbei is beschreven, berust op de opheffing van de apicale dominantie door cytokininen. Het effect van cytokininen blijkt algemeen te zijn en de methode kan uitgebreid worden tot een groot aantal andere kruidachtige en eventueel ook houtige gewassen.

Door de mogelijkheid om de morfogenese te sturen in de richting van axillaire scheutvorming, door het kortstondig beperken van de groei, kan de vroegtijdige in vitro vermeerdering met een hoge vermeerderingssnelheid, zoals dit aanvankelijk door Morel bij orchideeën werd uitgevoerd, worden

uitgebreid tot gewassen, die geen bijzondere organogene structuur, zoals protocormen bezitten.

Het opmerkelijke feit dat de toepassing van de methode mogelijk maakt, is het tijdelijk maar nochthans spectaculair karakter van de verandering in de morfogenese gedurende de fase van intensieve scheutvorming.

Indien meristeemcultuur voorafgaat aan de scheutvermeerdering, wordt de intensieve vermeerdering bovendien uitgevoerd met gezonde klonen. De nadelen van de methode zijn enerzijds de betrekkelijk hoge kosten en anderzijds het risico van het optreden van 'varianten' bij bepaald materiaal en bij het weglaten van elementaire voorzorgsmaatregelen.

Algemeen gesproken is het risico van het optreden van 'varianten' veel geringer bij meristeemcutuur dan bij scheutvorming op een callus. Overigens gaan meristeemcultures vaak gepaard met zeer hoge cytokinineconcentraties, zelfs tot 10^{-5} M, die soms nodig zijn om scheutvorming bij lastig materiaal te verkrijgen. Men vergroot daardoor wellicht het risico van het optreden van 'varianten' en het is verstandig om de concentratie cytokinine in de verdere vermeerdering te verlagen, ook al zijn het waarschijnlijk vooral de auxinen en in het bijzonder 2,4-D, die de varianten veroorzaken.

2. Verschillende manieren van vegetatieve vermeerdering door meristeemcultuur

Wanneer het explantaat erg klein is, dus bij echte meristeemcultuur, wordt de vermeerdering in het algemeen uit fytosanitair oogpunt uitgevoerd en wel om virus te elimineren.

De cultuur van stengeltoppen van grotere afmetingen kan alleen maar voor vegetatieve vermeerdering worden toegepast, wanneer de besmetting met virussen geen belangrijk probleem vormt.

De proliferatie van axillaire meristemen is in veel gevallen verkregen met als doel de snelheid van de vermeerdering te vergroten.

In de praktijk wordt de vegetatieve vermeerdering door meristeemcultuur op verschillende manieren uitgevoerd.

a. Het explantaat is van zeer kleine afmetingen en omvat de meristeemkoepel met uitsluiting van de eerste bladprimordia. Voorbeeld: Coleus blumei (Smith en Murashige 1970). Dit uitzonderlijke geval betreft het onderzoek naar en niet de toepassing van de vermeerdering.

b. Het explantaat is een meristeem van ongeveer 200 tot 400 μm, inclusief de eerste bladprimordia. Het gaat dan om meristeemcultuur, die met een fytosanitair doel wordt uitgevoerd (zie Tabel pag. 143).

c. Het meristeem of de stengeltop ontwikkelt zich tot een plantje en vormt slechts een klein aantal axillaire scheuten. De snelheid van vermeerdering is dan betrekkelijk laag. Voorbeeld: anjer, in het beginonderzoek (Phillips, 1968), Ipomoea batatas (Elliot 1969; Mori 1971), rabarber (Walkey 1968), gladiool (Hussey 1977), enz.

d. De axillaire meristemen, die door de begintop worden gevormd zijn zeer talrijk en vormen bosjes scheutjes. Daarna vormen de meristemen van de eerste generatie weer volgende generaties.
Voorbeelden zijn aardbei (Adams 1972; Boxus 1974; Lee en De Fossard 1977), anjer (Hackett en Anderson 1967), Nerine (Pierik en Ippel 1977), Rhododendron sp. (Ma en Wang 1977), Vriesea (Mekers 1977), suikerbiet (Margara 1977a), koolzaad (Margara en Leydecker 1978), enz.

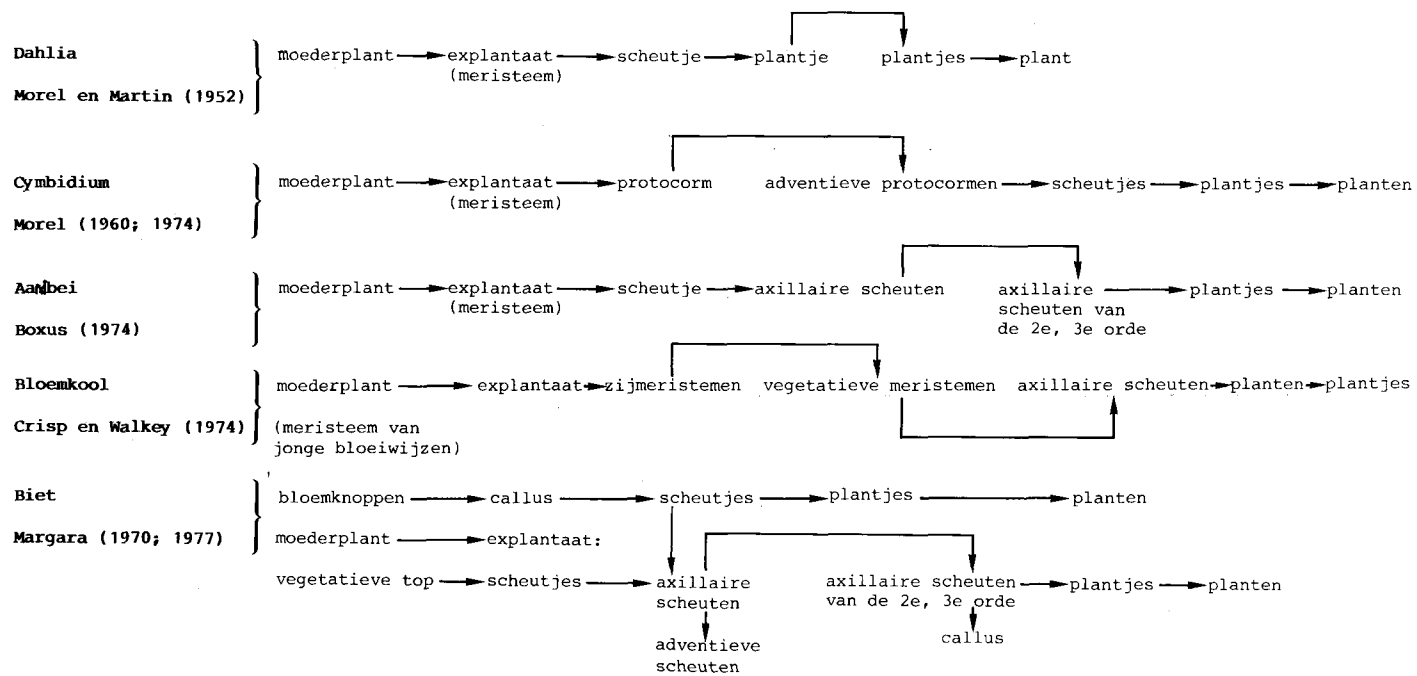
Het uitlopen van axillaire scheuten na het opheffen van de apicale dominantie door toevoeging van cytokinine aan het voedingsmedium kan bij een zeer groot aantal kruidachtige en houtige gewassen worden waargenomen. Dit proces kan beginnen met de ontwikkeling van axillaire scheuten en gevolgd worden door de vorming van adventieve scheuten op ongebruikelijke plaatsen. Het leidt uiteindelijk tot de vorming van bosjes scheutjes.

Omgekeerd kunnen scheuten op een callus secundair weer bosjes axillaire scheuten afsplitsen, die soms ook nog vermengd zijn met adventieve scheuten. Bij suikerbiet (Margara 1970, 1977) kan men uitgaan van bloemknoppen, om daarna scheutvorming op het basale callus te verkrijgen. Secundair vormen deze scheuten bosjes scheuten, die men uit elkaar kan halen en vermeerderen. Deze bosjes komen voort uit proliferatie van axillairen.

e. Vorming van adventieve scheuten door het begintopje, dus scheuten die niet in de oksel van een blad of bractee staan en gevormd worden op een plaats, waar normaal geen meristeem voorkomt.
De vorming van adventieve scheuten, uitgaande van meristeemcultuur kan zich op verschillende manieren manifesteren: de adventieve scheuten kunnen in een lege oksel verschijnen (aardbei), bij de (zijtak van een) vertakking van een jonge bloeiwijze (bloemkool) en op een callus (vele voorbeelden).

TABEL XI

Voorbeelden van verschillende ontwikkelingscycli in de meristeemcultuur



f. Vermeerdering uit meristemen van de bloeiwijze houdt een terugkeer naar de vegetatieve fase in.

Dit bijzondere geval zal in een volgend hoofdstuk behandeld worden.

In de praktijk kan de vermeerderingscyclus in vitro afhankelijk van de soort enigszins variëren (zie Tabel XI). We hebben maar enkele voorbeelden genoemd.

De lezer kan voor een groter aantal voorbeelden over orgaanvorming en vegetatieve vermeerdering de overzichtsartikelen raadplegen van Murashige (1974), Reinert en Bajaj (1977), David en Thomas (1979), Chaussat en Bigot (1980), Martin (1980), Vasil en Vasil (1980) en de belangrijke bibliografie van Pierik (1979).

E. TERUGKEER NÁAR DE JUVENIELE TOESTAND BIJ DE MERISTEEMCULTUUR

In de loop van de ontwikkeling vertoont een plant een opeenvolging van morfologische en fysiologische kenmerken, die afhangen van de leeftijd en de toestand van de ontwikkeling. Deze kenmerken hebben vooral betrekking op bladvorm, habitus en groeiwijze van de takken (b.v. orthotroop: rechtop, of plagiotroop: horizontaal). Op dezelfde plant zien we op een bepaald ogenblik knoppen in verschillende groeistadia (zoals actieve groei, vegetatieve rust en geïnduceerde rust), zowel bij vegetatieve scheuten als bij bloeiwijzen.

Wanneer meristemen van een bepaald morfogenetisch stadium in cultuur gebracht worden, dan zal het meristeem ofwel dezelfde morfogenese als op de moederplant handhaven, ofwel de morfogenese wijzigt zich. Eventueel keert de morfogenese terug naar de juveniele toestand, welke kenmerkend is voor een kiemplant.

1. Behoud van de aanvankelijke morfogenese in vitro

Soms maakt meristeemcultuur het mogelijk om een bijzonder type morfogenese te fixeren dat in de loop van de ontwikkeling op de moederplant verkregen is. Zo zien bij klimop, Hedera helix, de vegetatieve kruipende stengels en bloeiende takken er heel anders uit wat betreft bladvorm en habitus. Meristemen van deze twee typen geven sterk verschillende individuen, vooral wat betreft bladvorm; ook geven cambiumexplantaten van de twee soorten takken twee typen weefselkweek die in groeisnelheid verschillen (Stoutemeyer

en Britt 1965).

Een ander voorbeeld is Phyllanthus (Euphorbiaceae), welke door Bancilhon (1969) bestudeerd is. Bij P. odontadenius zijn twee typen takken aanwezig: de hoofdtak is orthotroop en de zijtakken zijn in het algemeen plagiotroop.

Het optreden van plagiotropie blijkt onder invloed te staan van het orthotrope eindmeristeem, dat dus de rol van 'organisator' speelt. Wanneer het eindmeristeem wordt weggenomen krijgt men inductie van orthotrope groei bij takken die normaliter plagiotroop zijn.

Wanneer de orthotrope groei eenmaal is ingetreden kan de scheiding van het meristeem van de moederplant en het in weefselkweek brengen al of niet de terugkeer naar de rechtopstaande groeiwijze met zich meebrengen, afhankelijk van de hoogte van de plaats van het meristeem aan de as.

2. Opnieuw optreden van juveniele morfologische kenmerken in vitro

Wanneer een meristeem afgescheiden wordt van de moederplant en in weefselkweek gebracht zien we vaak opnieuw morfologische kenmerken optreden die analoog of zelfs identiek aan die van een jong kiemplantje zijn.
Bij aardbei zijn de nieuwgevormde bladen enkelvoudig, terwijl de bladen van een oudere plant drietallig zijn. Dit juveniele kenmerk handhaaft zich echter niet; men ziet de vorming van drietallige bladen, zodra men stopt de morfogenese te sturen in de richting van vorming van nieuwe axillaire scheuten door frequent overzetten op een voedingsmedium met cytokinine. Bij Vitis (Nozeran en Bancilhon 1972) bestaan de juveniele morfologische kenmerken uit het ontbreken van hechtranken en ook uit de bladstand (verspreid met een divergentie van 2/5 bij kiemplantjes en afwisselend bij volwassen planten). Deze juveniele morfologische eigenschappen handhaven zich in de loop van verscheidene overentingen in vitro en zelfs nog enige tijd na het oppotten.

Terugkeer naar de juveniele morfologie is niet altijd gunstig. Zo vertonen bij de vermeerdering van verschillende Episcia-soorten (Gesneriaceae) met sierbladeren, zoals Episcia cupreata cv Silver Sheen, de scheuten, die op een callus gevormd worden, een langdurige juveniele fase met enkelvoudige bladeren van geringe sierwaarde. Bij andere cultivars, zoals 'Tropical Topas', zijn de morfologische kenmerken in de jeugd en de volwassen fase gelijk (Bilkey en Mac Cown 1979).

3. Opnieuw verschijnen van juveniele fysiologische eigenschappen in situ

Het opnieuw optreden van jeugdeigenschappen kan zich in een gewijzigde morfologie uiten, maar ook in een verandering van fysiologische eigenschappen, vooral in een groter vermogen tot beworteling. Het belang van verjongingsverschijnselen kan dus zeer groot zijn, vooral bij vermeerdering van houtige gewassen.

Het terugkrijgen van juveniele morfologische en fysiologische kenmerken door het meristeem blijkt te worden bevorderd door de volgende factoren:

a. verbreking van de 'fysiologische correlaties', d.w.z. de interacties tussen het meristeem en de verschillende organen van de moederplant;
b. kleine afmetingen van het explantaat en een klein aantal cellen, waaruit dit bestaat;
c. veelvuldig overenten.

In het uiterste geval kan de terugkeer naar de juveniele toestand leiden tot de vorming van een soort 'embryoïde', zoals bij het in weefselkweek brengen van de meristeemkoepel zonder bladprimordium bij tabak en Oost-Indische kers (Smith en Murashige 1970). Op de plant zelf kunnen we terugkeer naar de fysiologische juveniele toestand proberen te krijgen door verschillende technieken te gebruiken, zoals snoeien of het wegsnijden van knoppen. Deze techniek is vooral bij houtige gewassen, die zich moeilijk laten stekken, toegepast vanwege hun onvermogen tot beworteling (Franclet 1979). Door een combinatie van een dergelijke voorbereiding van de stekken en het verder experimenteren in de weefselkweek hebben Franclet et al. (1980) zo een verjonging van de stengelmeristemen van Pinus pinaster verkregen, waarbij de explantaten oorspronkelijk afkomstig waren van bomen van 11 jaar oud.

Het enten van meristemen van oude op jonge kiemplanten is eveneens gebruikt om verjonging te verkrijgen, met als resultaat een betere beworteling. Deze techniek wordt nu verder uitgebreid, vooral bij houtige gewassen.

Ook bij kruidachtige planten is geprobeerd het vermogen tot vorming van vegetatiepunten te induceren op weefsels, die aanvankelijk ongeschikt waren voor orgaanvorming. Dit deed men door weefselkweektechnieken te gebruiken die gunstig zijn voor verjonging. We noemen de suikerbiet als voorbeeld. Dit gewas heeft een betrekkelijk zwak vermogen tot in vitro orgaanvorming. Scheutvorming kan men krijgen op embryoculturen of jonge kiemplantjes (Butenko et al. 1972; Kirindonov en Atanasov 1971) en ook op het callus, dat

zich vormt aan de basis van bloemknoppen (Margara, 1970b, 1977a), maar scheutvorming wordt alleen in uitzonderingsgevallen waargenomen op vegetatieve weefsels (Hussey en Hepher 1978). Als men in vitro meristemen kweekt op een manier analoog aan die van Boxus bij aardbei, kan men op een medium met veel cytokininen een grote hoeveelheid axillaire scheuten krijgen. Na een bepaald aantal overentingen isoleert men stukjes bladsteel en brengt deze in cultuur op een voedingsbodem met kokosnootmelk en 2,4-D waardoor callusvorming bevorderd wordt. Onder deze omstandigheden ziet men dat het gevormde callus organen kan vormen en scheuten produceert die zich tot plantjes ontwikkelen (Margara 1977a). Onze waarnemingen lijken op die van Rogozinska en Goska (1978). Deze onderzoekers hebben in eerste instantie waargenomen, dat het callus van meeldraden organen kan vormen. De verkregen diploïde plantjes werden meerdere malen overgezet op een medium met cytokinine en auxine. In tweede instantie constateerden zij, dat bladexplantaten, die geïsoleerd waren van plantjes afkomstig van zes keer overgeënte bosjes scheuten, zelf ook tot scheutvorming in staat waren.

Suikerbiet is een goed voorbeeld van een plant, waarbij de volwassen weefsels een zeer zwak vermogen tot orgaanvorming bezitten. Het vermogen tot orgaanvorming kan op verschillende manieren geinduceerd worden, die alle het gebruik van meristematische of gededifferentieerde weefsels gemeen hebben.

F. EFFECT VAN DE HERKOMST VAN HET EXPLANTAAT OP DE IN VITRO ONTWIKKELING

De ontwikkeling van meristemen of stengeltopjes in de weefselkweek kan van de herkomst van dit materiaal afhangen. Op dezelfde plant komen axillaire en adventieve knoppen naast elkaar voor en deze meristemen kunnen belangrijke structurele en fysiologische verschillen vertonen. We noemen hier het geval van de asperge.
Asperge is een overblijvende kruidachtige plant met een 'klauw'. Deze klauw bestaat uit wortels, die op een rhizoom* staan ingeplant, waarvan de internodiën uiterst kort zijn. Op de klauw staan axillaire knoppen, die met schubben bedekt zijn. De eetbare scheuten zijn opgaande stengels die zich verlengen ('turions'). De bloemprimordia kunnen zich zeer vroegtijdig vormen aan de top van deze stengels, zelfs voordat deze de grond uit zijn gekomen. De topjes, die we in vitro cultuur kunnen brengen, kunnen uit deze stengels of uit de klauwen komen; de orgaanvormende mogelijkheden van deze twee typen meristemen zijn echter zeer verschillend.

De meristemen van de klauw zijn juveniel en in staat om wortels en een nieuwe klauw te vormen (Rivière en Muller 1974); daarentegen bewortelen de meristemen van opgaande stengels maar moeilijk. In dit geval hangt het succes van de weefselkweek af van de doordachte keuze van het type meristeem, dat wordt gebruikt (Bourgin et al. 1973).

Het is toch mogelijk gebleken om secundair in vitro de aanleg van een klauw te krijgen uit stekken van stengelstukken met een knoop. Het stengelmeristeem van de knoop produceert snel een stengel, die geen wortels vormt. Als de stengelgroei is voltooid, snijdt men de stengels in stukken en zet de basis van de oorspronkelijke scheut op een nieuw medium over. Nieuwe stengels ontwikkelen zich en in 20% van de gevallen vormt zich een korte, dikke slapende knop met schubben. De aanleg van deze knop wordt gevolgd door het uitgroeien van een primaire wortel (Doré 1975). De vorming van de klauw, die wezenlijk is voor de verdere ontwikkeling van de nieuwe plant blijkt dus nauw samen te hangen met de structuur en de fysiologische toestand van de scheut.

G. VERSNELLING VAN DE BLOEMAANLEG EN TERUGKEER NAAR DE VEGETATIEVE TOESTAND

In de meristeemcultuur kan men te maken krijgen met problemen die samenhangen met bloei-inductie en terugkeer naar de vegetatieve toestand. In de praktijk van de vegetatieve vermeerdering is het absoluut nodig zeker te zijn van het blijven voortbestaan van de vegetatieve toestand van het meristeem in de weefselkweek.

Ook al heeft het meristeem een typisch vegetatieve structuur en werking, toch kan niet worden uitgesloten, dat het meristeem in bepaalde gevallen onder invloed van daglengte of andere factoren reeds van te voren op bloei is geïnduceerd. Vooral als een vegetatief meristeem van een bloeiende stengel wordt afgenomen, moet men zich altijd afvragen of de mogelijkheden tot orgaanvorming wel dezelfde zijn als die van scheuten van volledig vegetatieve planten.

We kunnen nog verder gaan en veronderstellen, dat alleen al het feit dat een stengelmeristeem van een moederplant wordt losgemaakt, de eventuele eisen voor bloei wijzigt en in bepaalde gevallen de mogelijkheid biedt om zich in versneld tempo in de generatieve richting te ontwikkelen.

We kunnen voor de vermeerdering ook uitsluitend meristemen gebruiken, die al bezig zijn aan een ontwikkeling in de richting van een bloeiwijze. Het gaat er om of de terugkeer van het meristeem van deze bloeiwijze naar de vegetatieve toestand altijd mogelijk is of dat deze terugkeer daarentegen beperkt is tot bepaalde gewassen, bepaalde typen bloeiwijzen of tot bepaalde stadia in de ontwikkeling.

1. Bloemaanleg van meristemen in vitro

Indien we vegetatieve stengeltoppen in de weefselkweek brengen zien we, dat afhankelijk van het gewas, het verloop ervan in twee groepen kan worden ingedeeld:

a. De daglengtegevoeligheid van de geïsoleerde top blijft gelijk aan die van de volledige plant. Dit komt voor bij zowel lange dagplanten als Cichorium intybus (Nitsch 1967) als bij korte dagplanten, zoals Saccharum officinarum (Coleman en Nickell 1964), Pharbitis nil en Chrysanthemum morifolium (Harada 1967).
   Het plantje dat door de top wordt gevormd is vegetatief. Het is echter mogelijk om de ontwikkeling in de generatieve richting te sturen, maar

dan is het wel nodig om een voldoend aantal fotoperiodieke cycli te geven. Dit geval komt veel voor en vereenvoudigt in de praktijk de vegetatieve vermeerdering.

b. Het in weefselkweek brengen blijkt het meristeem vrij te maken van de normale daglengte-eisen van de plant. Dit is waargenomen bij zowel lange als korte dagplanten.
Zo kan het meristeem van de typische korte dagplant Perilla nankinensis bloemprimordia in lange dag aanleggen, indien het meristeem van de moederplant is gescheiden en in vitro wordt gekweekt (Raghavan en Jacobs 1961). Bij de lange dagplant witte mosterd, Sinapis alba zag Deltour (1970) bij korte dag in het fytotron te Luik bloemaanleg in de weefselkweek van geïsoleerde topjes. In de bestudeerde voorbeelden blijkt de bloemaanleg van de stengeltopjes altijd de toevoeging van betrekkelijk grote hoeveelheden suiker, b.v. 40 tot 50 g/l saccharose, te vereisen. Deze voorbeelden van versnelde groei van de stengeltop na het afscheiden van de moederplant en het in weefselkweek brengen suggereren het bestaan van een bloeiremming in de volledige plant die afhangt van de interacties van de organen.
Bij Scrophularia arguta (Miginiac 1971; Miginiac en Lacombe 1973) blijken de wortels een remmende invloed uit te oefenen op de bloei, waarbij de verantwoordelijke factor, die wellicht indirect werkt, een cytokinine schijnt te zijn, dat door de wortel wordt gesynthetiseerd. Merk wel op, dat het in deze proeven over de versnelling van de bloei vaak moeilijk is om onderscheid te maken tussen het opheffen van de remming na het isoleren van het meristeem en de eventuele veranderingen van de orgaanvormende mogelijkheden, die met de weefselkweek zelf samenhangen.

2. Terugkeer naar de vegetatieve toestand van meristemen in bloeiwijzen

Vegetatieve vermeerdering uit meristemen van bloeiwijzen of weefsels van bloeiwijzen vereist kennis van de factoren en omstandigheden, die zorgen voor terugkeer naar en het in stand blijven van de vegetatieve toestand. Terugkeer naar de vegetatieve toestand kan op verschillende manieren worden ingedeeld (zie Tabel XII). We bekijken hier alleen terugkeer met betrekking tot de activiteit van meristemen van bloeiwijzen; we zien dit bij bepaalde gewassen met een trosvormige bloeiwijze.

TABEL XII

Verschillende typen terugkeer naar de vegetatieve toestand

1. Terugkeer van de bloem in een laat stadium:
. Vergroening: vorming van bladachtige organen in plaats van bloemdelen.
. Vorming van vegetatieve scheuten op verschillende plaatsen van de bloem.

2. Terugkeer van de activiteit van meristemen van de bloeiwijzen:
. De bloeiwijze heeft vegetatieve knoppen aan de top. Voorbeelden: biet, violier, Chlorophytum, bloemkool in vitro.

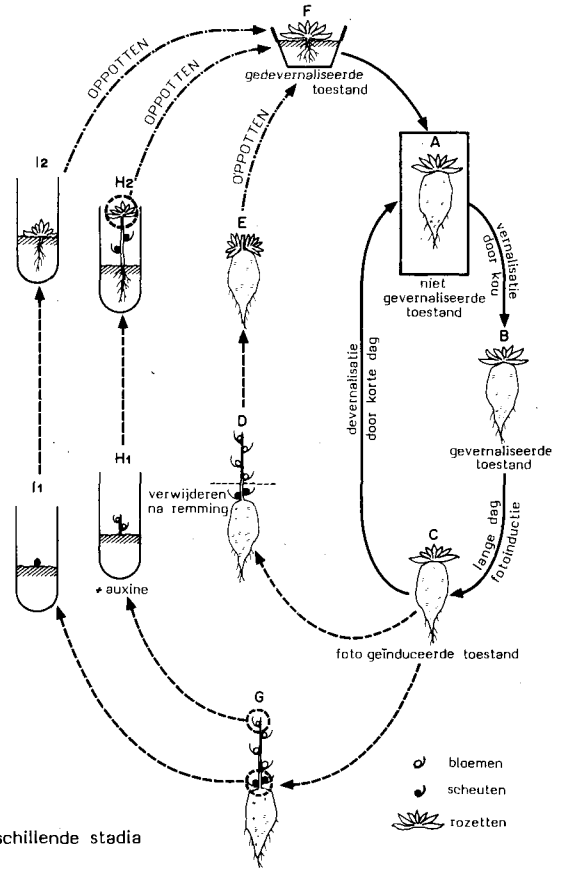
3. Terugkeer van de orgaanvormende mogelijkheden van weefsels van bloeiwijzen:
. De weefsels van bloeiwijzen, zoals bloemstengel, bloemsteeltje en bloembodem van bepaalde gewassen zoals tabak, witlof en begonia kunnen meristemen produceren die bloeiwijzen of bloemen vormen. Ze zijn dus voor bloei geïnduceerd. Onder bepaalde omstandigheden, zoals onder invloed van media met weinig suiker en veel auxine, maken ze alleen maar vegetatieve scheuten. Het gaat dus om een omslag van de mogelijkheden van orgaanvorming.

2.1. Omkeer van de volledige plant

Dit komt maar zelden spontaan en regelmatig voor. Een bekend voorbeeld van spontane omslag onder verschillende omstandigheden van temperatuur en daglengte is dat van Chlorophytum. Bepaalde cultivars vormen na de bloei bladrozetten, die aan het eind van bloemstengels zitten. Deze rozetjes ontstaan uit axillaire of adventieve knoppen van de bloeiwijze.

Bij biet (fig. 21) kan de terugkeer naar de vegetatieve toestand kunstmatig teweeggebracht worden onder invloed van korte dag en hoge temperatuur (Margara 1960). In dit geval schijnt het, dat de omslag het eindmeristeem van de bloeiwijze betreft, dat eerst zijwaarts bladprimordia afsplitst en daarna opnieuw een bladrozet vormt. Er is een continuïteit in de bladstand tussen de bracteeën van de bloemen en de bladen van het nieuwe rozet; alle morfologische tussenvormen tussen blad en bractee komen voor.

Fig. 21.



BETA VULGARIS
Devernalisatie in verschillende stadia van de ontwikkeling

Fig. 21. Schema van de verschillende mogelijkheden tot vegetatieve vermeerdering die samenhangen met de terugkeer naar de vegetatieve toestand bij biet.
De volwassen plant met een knolvormige wortel en een bladrozet is in niet gevernaliseerde toestand (A). *Vernalisatie door kou* (B) gevolgd door lange dag leidt tot de geïnduceerde fase (C). De plant vormt dan bij lange dag een bloemstengel (G), waarbij aan de basis enkele scheuten kennelijk vegetatief blijven (I). De plant kan worden opgepot (F) en zo weer een volwassen plant voorstellen (A).
Knoppen van de bloeiwijze, die vrij hoog van de bloemstengel worden weggenomen (G) kunnen als ze in de weefselkweek op een bodem met een auxine worden gebracht (H_1) een plantje vormen, dat boven aan de top een rozet maakt en tenslotte wortels vormt (H_2). Dit plantje of het gevormde rozet kunnen worden opgepot en tot een vegetatieve plant uitgroeien.
De vegetatieve scheuten aan de basis van de bloemstengel (D) kunnen zich tot bladrozet ontwikkelen (E) als men maar lang genoeg wacht voordat men ze van de bloemstengel afneemt. Deze bladrozetten kunnen gestekt worden.

Toch kan deze hypothese worden bestreden totdat een histologische studie heeft bewezen, dat het echt het eindmeristeem is en niet een okselmeristeem, waar het hier om gaat.

We merken eveneens op, dat de vorming van een bladrozet vaak gepaard gaat met knolvorming van dat deel van de stengel, dat daar onmiddellijk onder ligt. Dit doet duidelijk het bestaan vermoeden van stoffen voor knolvorming, die gesynthetiseerd worden door de bladeren van de vegetatieve plant en niet door de bracteeën of de bladeren van de bloemstengel.

2.2. Omslag in de weefselkweek

De weefselkweek maakt het mogelijk deze verschijnselen van omslag uit te breiden tot een groter aantal gewassen of in een grotere verscheidenheid van omstandigheden te bestuderen.

Bij tabak melden Martin et al. (1967) de mogelijkheid om van meristemen van bloeiwijzen uit te gaan om virusvrije planten te produceren. Na isolatie uit de moederplant keren de meristemen terug naar een typisch vegetatieve functie.

Bij biet is het mogelijk om het meristeem van jonge bloemstengels weer vegetatief te maken op een medium met een auxine, b.v. NAA 10^{-5} M, zelfs onder lange dag en desnoods onder continu licht. Er ontstaat een bladrozet aan het einde van het explantaat, dat secundair wortels kan vormen en kan worden opgepot in de kas. Het gaat in dit uitzonderlijke geval waarschijnlijk om een omslag van het eindmeristeem van de bloeiwijze. Veel vaker komt het voor, dat er oksel- (of adventieve) knoppen gevormd worden op plaatsen waar normaliter bloemknoppen moesten komen.

Bij prei (Allium porrum L.) veroorzaakt het in weefselkweek brengen van stukken van jonge bloeiwijzen op een eenvoudig voedingsmedium zonder groeistoffen vorming van talrijke vegetatieve scheuten op de plaats waar bloemknoppen behoren te zitten (Doré en Schweisguth 1980). Desondanks is de exacte herkomst van deze scheuten niet duidelijk.

Bij bloemkool beschouwen Crisp en Walkey (1974) de omslag van het meristeem in de bloemkool naar de vegetatieve toestand als een methode van vegetatieve vermeerdering. Factoren, die in de door de auteurs toegepaste methode deze omslag bevorderen, waren: kleine afmetingen van het explantaat, gebruik van een vloeibaar medium en het gebruik van tamelijk hoge concentraties auxine (8 mg/l IAA).

De overgang van het vegetatieve meristeem naar het meristeem van de bloeiwijze is bij bloemkool in een aantal stadia verdeeld, die scherp omschreven zijn door morfologische criteria (Margara en David 1978; en fig. 9). De aanleg van het meristeem van de bloeiwijze is in het begin gekenmerkt door de paarsgewijze vorming van bracteeën en meristemen. Daarna splitst het meristeem van elke hoofdtak direct laterale meristemen af zonder bijbehorende bractee; dit treedt korte tijd voor het stadium van de oogst van de bloemkool op.

Wanneer men explantaten van de bloemkool in weefselkweek brengt op een voedingsmedium met een auxine ziet men een voortschrijdende terugkeer naar de vegetatieve toestand van de eindmeristemen van de bloeiwijze (fig. 22). Op een medium met een sterke auxine, b.v. 2,4-D, kan men zelfs desorganisatie van de meristemen tot callus krijgen. De stadia van de omslag zijn in omgekeerde volgorde ongeveer dezelfde die we bij de normale ontwikkeling van de bloemkool waarnemen (David en Margara 1979). We benadrukken hier echter, dat het eindmeristeem van elke vertakking zelf niet in staat is om terug te keren naar een normale vegetatieve functie. Meestal vertoont het een gestoorde structuur en activiteit: de bladstand van de afgesplitste zijmeristemen is vaak abnormaal en veel meristemen zelf zijn abnormaal en waarschijnlijk niet levensvatbaar. De volledige omslag, die samengaat met een normale werking, zien we alleen maar bij zijmeristemen die gevormd zijn na het in weefselkweek brengen.

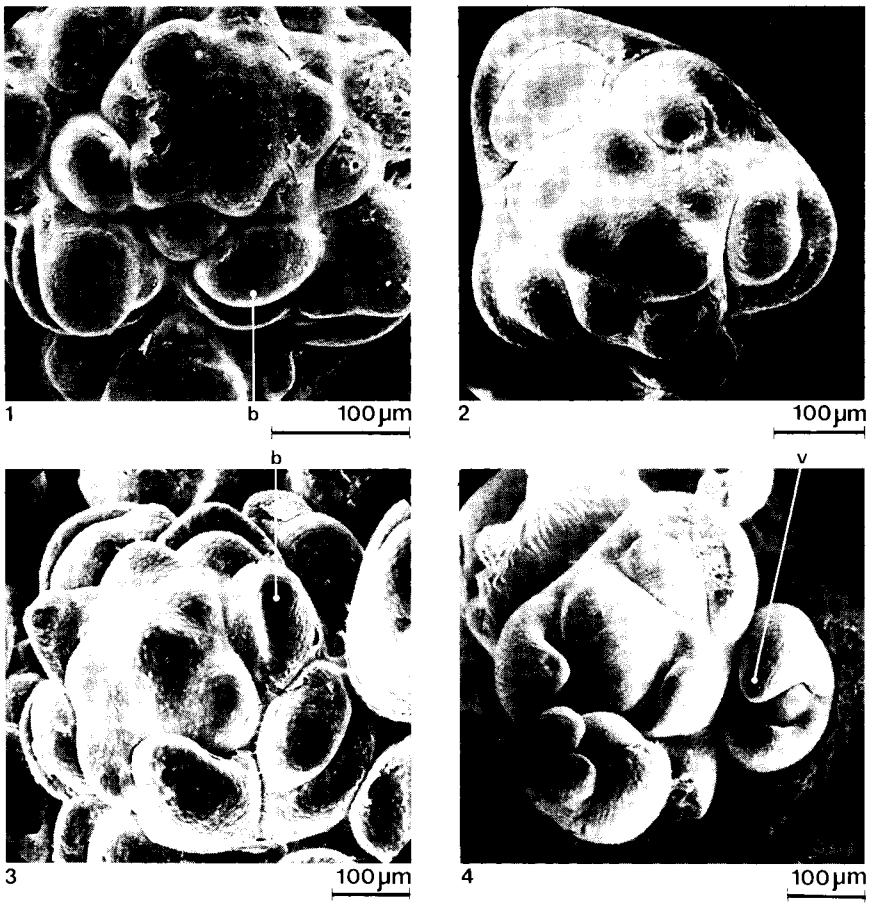


Fig. 22. De stadia van de terugkeer naar de vegetatieve funktie bij bloemkool, Brassica oleracea L. var. botrytis.
Explantaten van enkele mm zijn afgenomen van de buitenkant van een bloemkool in het stadium van de oogst en op een voedingsmedium met auxine gebracht. Onder deze omstandigheden kan men een voortschrijdende wijziging zien in de werking van de meristemen vóór het bloeistadium.

1. Vorming van bracteeën uit zijmeristemen (b). Dit is in eerste instantie een effect van het stoppen van de activiteit van het type meristeem vóór de bloei. (Verg. x230).
2. Paarsgewijze vorming van bracteeën en meristemen ter hoogte van de zijmeristemen. (Verg. x140).
3. Directe vorming van bracteeën zonder okselmeristeem (b). Merk op, dat de bladstand van de primordia in het centrale gebied verstoord is. (Vergr. x125).
4. Orgaanvorming van het normale vegetatieve type (v) ter hoogte van de zijmeristemen. (Vergr. x120).

3. Problemen bij het gebruik van organen van bloeiwijzen voor vegetatieve vermeerdering

Weefsels van bloeiwijzen tonen vaak een bijzonder vermogen tot orgaanvorming. Het gebruik van bloeiwijzen voor vegetatieve vermeerdering vereist echter het omkeren van orgaanvormende mogelijkheden van weefsels, die we als geïnduceerd mogen beschouwen.

Wanneer we als uitgangsexplantaat een stuk van een bloeiwijze gebruiken, komt het vaak voor, dat de meristemen die later verschijnen van verschillende aard zijn. De ontwikkeling in vegetatieve of generatieve richting van deze meristemen en hun reactie op verschillende groeistoffen kunnen afhangen van de herkomst.

3.1. Voorbeeld bloemkool (David en Margara 1980; en fig. 23).

Het oorspronkelijk explantaat wordt van een bloemkool afgenomen in het stadium van de oogst. We behandelen hier drie niveau's waarop meristemen kunnen worden geïsoleerd.

Niveau 1. Kleine explantaten van de oppervlakte van de bloemkool bevatten meristemen, die zich bij het in cultuur brengen in een stadium bevinden van vóór de bloeiwijze-inductie. Ze ontwikkelen zich in de weefselkweek nooit tot bloemen en vormen alleen vegetatieve scheuten vanaf zijmeristemen, die gevormd zijn nà het in cultuur brengen.

Niveau 2. Iets onder de top zien we de ontwikkeling van axillaire meristemen, die al aanwezig waren in de oksel van bracteeën. Er ontwikkelen zich ook adventieve scheuten, die niet in de oksel van bracteeën staan en in vitro direct zonder callusfase ontstaan.

De ontwikkeling van deze meristemen kan worden gestuurd door de keuze van de groeistoffen; auxinen bevorderen het optreden van de vegetatieve toestand, cytokininen daarentegen bevorderen de verlenging van de fase vóór de bloei; elk eindmeristeem van een hoofdtak gaat door met het vormen van zijmeristemen.

Niveau 3. Uit grotere of kleinere stukjes, die men op een lager niveau in de bloemkool weghaalt, krijgen we gemakkelijk scheutvorming op een callus. De callusfase blijkt het optreden van de vegetatieve toestand te bevorderen.

Het belang van dit voorbeeld is om aan te tonen, dat de effecten van dezelfde groeistof, zoals een cytokinine of een gibberelline, zeer kunnen

Fig. 23.

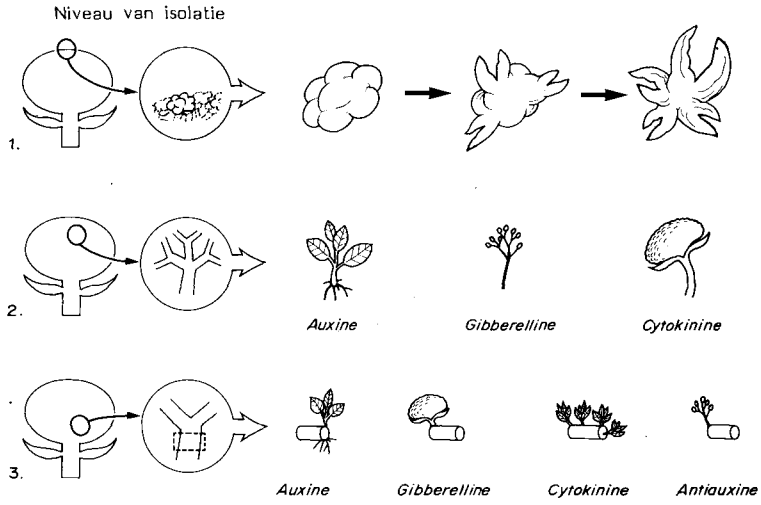


Fig. 23. Differentiërende effecten van verschillende groepen groeistoffen op verschillende typen meristemen van bloemkool in de weefselkweek.
De ontwikkeling in vegetatieve of generatieve richting van meristemen van bloemkool, die in vitro gekweekt zijn, hangt af van de aard en herkomst van de meristemen alsmede van de soort groeistof, die aan het medium wordt toegevoegd.

1. Eindmeristemen vóór de bloei, die al bestonden op het tijdstip van het in cultuur brengen, vormen uitsluitend vegetatieve scheuten op zijmeristemen, die gevormd worden na het in cultuur brengen; dit gebeurt onafhankelijk van de toegevoegde groeistof.
2. De adventieve knoppen ter hoogte van de vertakkingen van de bloeiwijze kunnen zich zonder callusgroei op verschillende manieren ontwikkelen. Vegetatieve ontwikkeling wordt bevorderd door auxinen, de lengtestrekking van de bloemtakken door gibberellinen en de ontwikkeling van de bloemkool door cytokininen.
3. De grote stukken van de stengel van de bloeiwijze vormen gemakkelijk een overvloedig callus. Scheuten, die op een dergelijk callus worden gevormd, zijn in het algemeen vegetatief.
   Auxinen bevorderen de gelijktijdige ontwikkeling van scheuten en wortels, cytokininen de vorming van talrijke vegetatieve scheuten met onderdrukking van beworteling, gibberellinen bevorderen bij uitzondering de vorming van eem bloemkool en anti-auxinen, zoals TIBA, de vorming van bloemtakken.

variëren, afhankelijk van de herkomst van het meristeem en de hoogte van het wegnemen.

3.2. Voorbeeld chrysant

Vegetatieve vermeerdering met jonge bloemhoofdjes is in de weefselkweek uitgevoerd bij pyrethrum, Chrysanthemum cinerariaefolium (Roest en Bokelmann 1973) en bij chrysant (Shu O Wang en Su Shien Ma 1978). Iizuka et al. (1973) kunnen uit jonge bloemhoofdjes van chrysant en cineraria (Senecio cruentus) buisbloempjes kweken.

De herkomst van vegetatieve scheuten is zeer verschillend. In het onderzoek van Iizuka et al. gaat het om scheuten, die zich vormen op het callus aan de basis van jonge bloempjes.
In de proeven van Roest en Bokelmann zouden volgens de auteurs de scheuten van adventieve herkomst zijn indien gevormd op de bloembodem en van axillaire herkomst wanneer ze gevormd zijn in de oksel van de bracteeën van het omwindsel.
De vegetatieve scheuten, die de Chinese onderzoekers in hun cultures van jonge bloemhoofdjes zagen zijn volgens deze auteurs van drie verschillende herkomsten:

a. Vorming op een basaal callus;
b. Vorming uit cellen van de bloembodem gelegen onder de epidermis;
c. Ontwikkeling van meristemen in de oksel van bloembekleedsels.

Onze eigen waarnemingen bij chrysant tonen duidelijk, afhankelijk van de proefomstandigheden, drie mogelijke herkomsten van de vegetatieve scheuten (figuur 24):

a. Vorming op een callus indien de samenstelling van het medium gunstig is voor callusvorming, nl. een hoge auxineconcentratie.
b. Directe vegetatieve ontwikkeling van meristemen van zeer-jonge bloemhoofdjes in de preflorale fase. Deze ontwikkeling zien we op voedingsmedia met geringe hoeveelheden groeistoffen, zoals IBA + BA 5.10^{-7} M en wanneer de bloemprimordia nog niet volledig zijn afgesplitst.
c. Late vorming (na meer dan een maand) van vegetatieve meristemen op de plaats van de preflorale meristemen, nadat deze volledig uit elkaar gevallen zijn en een nieuwe structuur hebben gevormd, die tenslotte met

een soort epidermis wordt bedekt. Het voorbeeld chrysant is bijzonder interessant, omdat hierbij praktisch alle typen vegetatieve morfogenese voorkomen uit structuren van vóór de bloeifase.

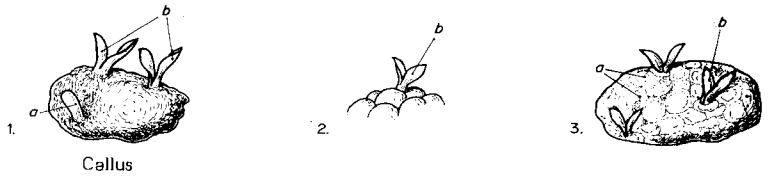


Fig. 24.

Fig. 24. Verscheidenheid aan herkomst van vegetatieve scheutjes die op een zeer jong bloemhoofdje van de chrysant zijn gevormd (waarnemingen van de auteur).
1. Vorming van stengelmeristemen op het callus aan de basis van de bloembodem.
   a. Los blad.
   b. Scheutje.
2. Directe vorming van een vegetatieve scheut op een prefloraal meristeem.
3. Late vorming van vegetatieve scheutjes op de plaats van preflorale meristemen, nadat deze uiteen zijn gevallen.
   a. Plaats van deze uiteengevallen meristemen is nog te zien.
   b. Nieuwe scheutjes.

Uit al deze waarnemingen mogen we concluderen, dat een meristeem in een bloeiwijze een overgangsstadium voorstelt. Het is niet onherroepelijk voorbestemd tot bloei, maar in dit stadium werkt het niet meer volgens het normale vegetatieve patroon. We mogen dus verwachten, dat het vermogen tot omslag niet algemeen voorkomt, maar afhankelijk is van het gewas.
De spontane omslag bij Chlorophytum, de kunstmatige omslag bij de gehele plant of in vitro bij eindmeristemen van de biet en de omslag, die alleen in vitro optreedt bij zijmeristemen van bloemkool komen overeen met een gradatie in de stabiliteit van het bloeiprogramma.

CONCLUSIES

CONCLUSIES

A. DE BELANGRIJKSTE ROL VAN MERISTEMEN BIJ DE VERMEERDERING VAN HOGERE PLANTEN

De anatomische complexiteit van vaatplanten heeft tot gevolg, dat er meristemen bestaan die een betrekkelijk ingewikkelde structuur bezitten.
De meristemen, die voor de bouw van de weefsels en organen zorgen, spelen een belangrijke rol tijdens de gehele ontwikkeling van de plant. Vermeerdering van het individu houdt tevens vermeerdering van zijn meristemen in. De fundamentele mogelijkheid om meristemen uit ongedifferentiëerde of gedifferentiëerde cellen te vormen, met als grensgeval de embryovorming, staat aan de basis van spontane en kunstmatige vegetatieve vermeerdering. Dankzij de techniek van de weefselkweek is het mogelijk geworden om bij een veel groter aantal gewassen vermeerdering te krijgen.

Dit fundamentele vermogen komt echter op een zeer verschillende manier tot uiting en hangt af van familie, soort, cultivar, orgaan of weefsel. Onze kennis over de werking van meristemen en de praktijk van toepassing zal afhangen van het fundamentele onderzoek over de oorzaken van deze variatie.

Het onderzoek over de vorming van meristemen en hun verdere ontwikkeling betreft echter niet uitsluitend de fysiologie en biochemie. Op het gebied van ontwikkeling van structuren en proeftechniek blijft er ook nog veel te leren. Het onderscheid tussen wortel- en stengelmeristeem is bijvoorbeeld duidelijk. Deze verschillen wezenlijk in structuur en functie en kunnen niet in elkaar overgaan. Toch is het niet uitgesloten, dat de meristemen bij bepaalde gewassen onder bepaalde omstandigheden in een zeer vroegtijdig ontwikkelingsstadium gedurende zeer korte tijd nog geen determinatie hebben.

Een ander geval van flexibiliteit bij meristemen, dat onderzoek vereist, is dat van meristemen van bloeiwijzen. Ze zijn niet typisch vegetatief, maar ook niet typisch generatief. Ze kunnen vooral bij bepaalde trosvormige bloeiwijzen een overgangsstadium vormen, waarbij ze bladdelen noch bloemdelen afsplitsen. Deze meristemen van bloeiwijzen zetten meristemen af, die niet noodzakelijkerwijze zijn voorbestemd, maar experimenteel gestuurd kunnen worden in één van de volgende richtingen: de vegetatieve, die van de bloeiwijze of die van de bloem.

Vorming van meristemen en productie van plantjes kan losse celcultuur

als uitgangspunt hebben voor somatische embryogenese. Ook kan een klein aantal embryonale of gededifferentiëerde cellen van het oorspronkelijke explantaat als uitgangspunt dienen voor scheutvorming, zonder tussenkomst van een callusfase, uit subepidermale cellen van de tabaksstengel of bloembladeren van begonia. De vorming van meristemen kan men vooral ook zien vanuit bijzondere orgaanvormende structuren. Het protocorm van orchideeën is het beste voorbeeld van een orgaanvormende structuur, die zich spontaan of onder proefomstandigheden vormt.

Bepaalde structuren, die men in proeven waarneemt en min of meer reproduceerbaar zijn bij verschllende planten, zoals Anthurium en Kalanchoë, hebben enige analogie met het protocorm, b.v. bedekking met een epidermis, aanwezigheid van rhizoïden en het vermogen tot regeneratie.
Vergelijkende studie, zoals inventarisatie van de mogelijkheden tot experimentele orgaanvorming bij verschillende families en soorten, mogen we niet als definitief afgesloten beschouwen.

B. DE PRAKTIJK VAN DE VEGETATIEVE VERMEERDERING IN DE WEEFSELKWEEK

1. Voordelen van de methode

De in vitro kweek van organen, weefsels en cellen biedt ontegenzeggelijk voordelen voor de praktijk van de vegetatieve vermeerdering.

a. Uitbreiding van vegetatieve vermeerdering tot een groter aantal gewassen, welke vaak moeilijk met de klassieke methoden te vermeerderen zijn;
b. Vermeerdering kan plaatsvinden met een hoge vermeerderingssnelheid in een vroegtijdig ontwikkelingsstadium;
c. In vitro vermeerdering gaat vaak samen met gewasbescherming. De planten zonder virussen, bacteriën of parasitaire schimmels vormen kwaliteitsmateriaal, dat betrekkelijk hoge kosten rechtvaardigt;
d. Cultures kunnen koud bewaard worden: dit vergemakkelijkt de oprichting van genenbanken.

De in vitro vermeerdering heeft twee doelstellingen:

a. Direct gebruik van de techniek door de tuinbouwer, boomkweker of bosbouwer;
b. Systematische toepassing van de techniek door de veredelaar.

Aanvankelijk trok de directe toepassing in de tuinbouw de aandacht van mensen uit de praktijk, vooral door het werk van Morel over orchideeën.

Wellicht kan de weefselkweek voor de veredeling nog wel de belangrijkste resultaten opleveren.

2. Beperkingen van de methode

De beperkingen van de in vitro vegetatieve vermeerdering hebben we al in de inleiding vermeld.

a. Eén van de belangrijkste nadelen is het risico van het optreden van 'varianten', die in morfologie en fysiologie van de moederplant afwijken. De variatie kan fenotypisch of genotypisch zijn, erfelijk of niet erfelijk en kan vermoedelijk verschillende oorzaken hebben.
Variatie blijkt duidelijk bevorderd te worden door het callusstadium en het gebruik van bepaalde groeistoffen in hoge concentratie.
Het vermogen tot wel of niet variëren blijkt weer van het plantemateriaal af te hangen. Bepaalde gewassen, zoals witlof, blijken merkwaardig stabiel te zijn, terwijl andere, zoals tabak en peen, daarentegen een bijzondere neiging tot vorming van afwijkingen vertonen.

b. De vegetatieve vermeerdering in vitro als ambitieus doel toepassing van de methode bij een zo groot mogelijk aantal gewassen en weefsels. Het is moeilijk te zeggen of dit ooit bereikt zal worden. Indrukwekkende lijsten van planten, waarbij de vermeerdering geslaagd is (Murashige 1974; Reinert en Bajaj 1977; Pierik 1979) moeten bij ons geen illusies wekken.
We moeten een goed onderscheid maken tussen gewassen, waarbij de techniek van de in vitro vermeerdering volledig is uitgewerkt, en gewassen, waarbij alleen maar proeven zijn uitgevoerd, die het bestaan van het vermogen tot regeneratie aantonen en die min of meer reproduceerbaar zijn, afhankelijk van het orgaan, weefsel of cultivar.
Bepaald plantemateriaal, dat makkelijk in topmeristeemcultuur te vermeerderen is, heeft echter maar een gering vermogen tot vorming van nieuwe meristemen. Somatische embryogenese wordt bij een groeiend aantal families en soorten gemeld. In veel gevallen gaat het om waarnemingen, die wel of niet gemakkelijk reproduceerbaar zijn, echter niet om een techniek die in de praktijk kan worden toegepast.

c. De noodzaak om bepaalde weefsels bij een bepaald gewas te gebruiken reflecteert een lacune in onze kennis over bepaalde groeistoffen of onbekende metabolieten, die een wezenlijke rol spelen in de orgaanvorming. Door onze onwetendheid moeten we onze toevlucht nemen tot weef-

sels, die al een natuurlijk vermogen hebben om deze stoffen te vormen. Sommige cellen kunnen meer of minder gschikt zijn om bepaalde belangrijke stoffen te maken. Ze kunnen ook meer of minder ontvankelijk zijn voor de werking van regulatoren die van elders komen.
De voortdurende vooruitgang in de toepasing van de in vitro cultuur bij de vegetatieve vermeerdering moet ons niet misleiden. Ze is het gevolg van het intensieve gebruik van een beperkte hoeveelheid hoofdzakelijk empirische (maar wel belangrijke) kennis, die gaat over de gezamenlijke werking van cytokininen en auxinen, voeding en het belang om systematisch het meest geschikte weefsel op te zoeken.
Indien het optimale toepassingsniveau van deze gegevens eenmaal is bereikt, zal verdere vooruitgang afhangen van nieuwe fundamentele ontdekkingen, vooral op het gebied van groeistoffen en mechanismen van de orgaanvorming.

C. ORGAANVORMING EN VEGETATIEVE VERMEERDERING

De vooruitgang die we mogen verwachten van de moderne technieken van genetische manipulatie, zoals protoplastenfusie, introductie in de cel van DNA of verschillende celorganellen dreigen in het algemeen beperkt te worden door de mogelijkheid om plantjes uit de cellen te vormen.

Uitbreiding van de vegetatieve vermeerdering hangt af van de vergroting van de kennis over orgaanvorming. De aanleg van organen is ongetwijfeld een zeer complex verschijnsel, waarbij interactie van factoren een rol speelt (zie het recente overzicht van Thorpe 1980).

Fundamenteel is orgaanvorming in vitro en in situ met elkaar vergelijkbaar, ofschoon soms in vitro verschillende veranderingen voorkomen vooral met betrekking tot de ontwikkelingssnelheid, zoals versnelling van de bloemaanleg met eventuele onderdrukking van bepaalde stadia. Toch bevorderen de omstandigheden van de weefselkweek vaak het tot uiting komen van mogelijkheden, die men zelden of nooit op de gehele plant tegenkomt, zoals scheutvorming en somatische embryogenese.

De meeste publicaties over orgaanvorming gaan over een empirische studie van factoren die aanleg beïnvloeden. Er bestaan helaas maar weinig publicaties over de biochemie of de cytochemie in relatie tot de orgaanvorming. Dit kan gedeeltelijk door de moeilijkheid van een dergelijk type onderzoek verklaard worden. Callus is vaak heterogeen én niet homogeen,

zoals men vaak aanneemt. Het kleine aantal cellen, dat betrokken is bij orgaanaanleg, is slechts een klein gedeelte van de celmassa vergeleken met het geheel aan calluscellen. Bovendien bevindt de scheutvorming vaak getrapt in de tijd plaats en een perfecte synchronisatie treedt maar zelden op.

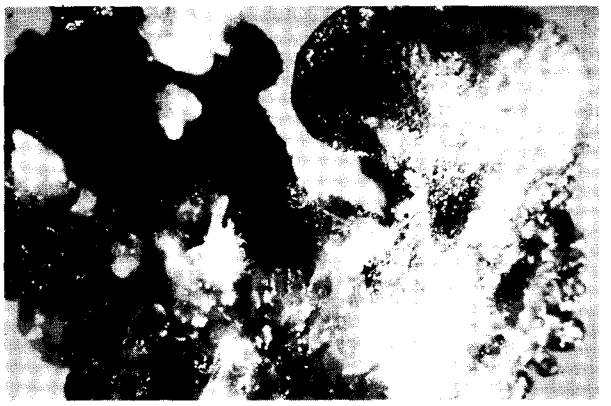
Het blijkt dus noodzakelijk om eerst de proefmodellen, waarover men beschikt te verbeteren en in aantal te vergroten. Het gebruik van dunne cellagen of van bepaalde weefsels, zoals bloembladen, waarop men versnelde vorming van meristemen kan waarnemen zonder een callusfase, vormt al een vooruitgang. Het centrale probleem blijft dedifferentiatie van de cel. Een idee, dat vaak geopperd wordt is dat maximale dedifferentiatie zou moeten leiden tot de vorming van somatische embryo's. Vorming van nieuwe stengel- of wortelmeristemen zou slechts met een gedeeltelijke dedifferentiatie overeenkomen.

Het is moeilijk om exact de graad van differentiatie of dedifferentiatie van de cel aan te geven. Het is niet zeker of de cytologische criteria wel voldoende zijn. Cellen die er identiek uitzien zouden wel eens verschillende fysiologische mogelijkheden kunnen hebben.

Feitelijk kennen we niet alle belangrijke mechanismen, die leiden tot de vorming van een embryo, wortel- of stengelmeristeem. We herinneren er alleen aan, dat sinds het begin van de geschiedenis van de plantaardige weefselkweek tot nu toe vooruitgang bereikt is door verbetering van de kennis over groeistoffen, die de verschijnselen van differentiatie en dedifferentiatie veroorzaken.

* * *

Vooruitgang in de kennis over orgaanvorming en vegetatieve vermeerdering houdt een intensivering van het onderzoek op de gebieden van cytologie, experimentele fysiologie en biochemie in. In een nabije toekomst mogen we nog veel verwachten van het onderzoek over groeistoffen (bekende èn onbekende) van hun interacties (onderling en met andere metabolieten) en van de volgorde van hun werking.
De praktische toepassing heeft het fundamentele onderzoek en het begrip van de verschijnselen van orgaanvorming voorbij gestreefd. Het onderzoek naar de diverse aspecten van de vegetatieve vermeerdering is nog lang niet uitgeput.



1

Oorspronkelijke
waarnemingen
Foto's J. Margara

2

Plaat II

VORMING VAN VEGETATIEVE
OF GENERATIEVE ORGANEN
OP BLOEMDELEN

1. Bloemblad van Saintpaulia (Saintpaulia ionantha cv Blue Lady).
   Het bloemblad is een bloemdeel zonder bladgroen, maar het vormt meristemen, die zich tot normale vegetatieve scheuten kunnen ontwikkelen.
2. Bloemblad van begonia (Begonia x elatior cv Schwabenland).
   Het bloemblad vormt bloembladachtige bloemdelen. Meerdere generaties bloembladen zijn te zien. Het gaat hier om een beperkte versnelling van de ontwikkeling in generatieve richting.
   Dit merkwaardige verschijnsel wordt bevorderd door het explantaat van de oorspronkelijke voedingsbodem met 2,4-D en een cytokinine over te zetten op een medium zonder groeistoffen, maar wel met veel saccharose.

Wanneer we deze twee voorbeelden tegenover elkaar plaatsen zien we, dat dedifferentiatie van cellen van de bloem, afhankelijk van het gewas en de omstandigheden van de cultuur, kan leiden tot de vorming van vegetatieve meristemen of bloemmeristemen waarvan de werking zowel normaal als abnormaal kan zijn.

AANHANGSEL I

WEEFSEL-KWEEK TECHNIEKEN

METHODOLOGISCHE BEGINSELEN

AANHANGSEL I

WEEFSEL-KWEEK TECHNIEKEN

METHODOLOGISCHE BEGINSELEN

De techniek van de in vitro cultuur van organen of weefsels van hogere planten kan als een uitbreiding van de microbiologische methodieken worden beschouwd. Weefselkweek in vitro moet steriel gebeuren. Dit betekent, dat weefsels eerst gesteriliseerd of steriel geïsoleerd moeten worden. Verder moeten de cultures onder steriele omstandigheden aangehouden worden om ze tegen herinfectie met bacteriën en schimmels te beschermen. Bovendien wordt men bij weefselkweek geconfronteerd met het probleem van de conditionering van klimaatruimten met betrekking tot luchtvochtigheid, temperatuur, lichtintensiteit en daglengte.

Helaas is het effect van milieu-omstandigheden bij weefselkweek onvoldoende bestudeerd. In de praktijk heeft men meestal niet de beschikking over een serie klimaatcellen, die een exacte aanpassing van milieu-omstandigheden aan ieder cultuurtype of het uitvoeren van opeenvolgende behandelingen met betrekking tot omgevingsfactoren mogelijk maakt.
Tenslotte is de keuze bij de samenstelling van de voedingsmedia essentieel: vloeibare of vaste media, macro- en micro-elementen, toevoeging van diverse organische stoffen en combinaties van groeistoffen.

A. ALGEMENE METHODEN

1. Glaswerk

Weefselkweek op agarmedium vindt vaak plaats in glazen buizen, maar ook in erlenmeyers, petrischalen, flessen en weckflessen. De afmetingen van het glaswerk zijn afhankelijk van de grootte en het aantal van de explantaten*. Meristemen of stengeltopjes worden in het algemeen eerst in kleine kweekbuisjes, b.v. hemolysebuisjes ingezet. Later kunnen ze in grotere kweekbuizen overgezet en doorgekweekt worden. De groei van groepjes scheuten op voedingsmedia met cytokinine vindt vaak plaats in glaswerk van grotere afmetingen, zoals erlenmeyers of weckflessen.
De uitwisseling tussen het weefsel in vitro en de inerte voedingsbodem is ingewikkeld en vindt in twee richtingen plaats: door het explantaat worden

water, minerale zouten en organische stoffen opgenomen, maar ook uitgescheiden.

Ervaring met suspensiecultuur leert, dat het nodig is om de cellen te voorzien van voedingsweefsel, of het oppervlak van een voedingsmedium met een voldoende aantal cellen te enten. Het is dus belangrijk om de hoeveelheid medium aan te passen aan de afmetingen van de weefsels.

Afsluiten van het glaswerk heeft uiteraard als doel de steriliteit te waarborgen, maar beïnvloedt ook de gasuitwisseling en de vochtigheidsgraad in het kweekvat. Meestal worden de kweekbuizen afgesloten met metalen of plastic doppen, die er losser of vaster omheen passen, afhankelijk van het model van de dop en de aard van het weefsel. Afsluiting met een wattenprop met daar overheen een polyethyleenfilm, zoals Morel gebruikt en door Gautheret (1959) beschreven is, biedt nog steeds voordelen als men een hoge luchtvochtigheid met voldoende gasuitwisseling wil aanhouden. We geven hier een voorbeeld van het belang van de wijze waarop cultuurbuizen afgesloten worden.

De scheuten, die op een wortelstukje van witlof (Cichorium intybus) worden gevormd, blijven vegetatief in een vloeibaar voedingsmedium en worden generatief op een agarmedium. De wijze van afsluiting kan invloed uitoefenen op het percentage scheuten, dat zich in de ene of in de andere richting ontwikkelt. Afsluiting met metalen dopppen, die los aansluiten bevordert bloemaanleg (Margara en Bouniols 1967).

Bij vloeistofcultuur op een roterend rad met b.v. 1 of 2 omwentelingen per minuut wordt vaak gebruik gemaakt van glaswerk, dat ook voor cultuur op vaste media toegepast wordt, zoals in buizen en erlenmeyers; ook wordt wel speciaal glaswerk gebruikt. Zo bleek in de eerste experimenten van Steward en Mears (1958) aan de somatische embryogenese, dat bij de peen het succes gedeeltelijk afhing van de kweek in de schudcultuur en van het gebruik van bijzonder glaswerk, waarbij de explantaten afwisselend wel en niet ondergedompeld werden.

2. Steriliteit (aseptie) en kiemvrij maken ('antiseptie')

2.1. Steriele omstandigheden

Het steriel overzetten van onbesmet materiaal eist slechts weinig

voorzorg. Het verkrijgen van steriele explantaten blijft daarentegen één van de hoofdproblemen bij de cultuur in vitro.

Het kiemvrij maken levert geen bijzondere moeilijkheden op indien het plantemateriaal weinig besmet is en de weefsels van het explantaat goed beschermd zijn. Dit is vaak het geval bij het inzetten van meristemen of stengeltopjes, die in de natuur door bladprimordia beschermd zijn. Bij meristemen uit de kool van een bloemkool ondervinden we ook geen bijzondere problemen, hoewel deze onbeschermd zijn. Daarentegen is het soms zeer moeilijk om niet te zeggen onmogelijk, om de bodembacteriën, die in grote aantallen aan de oppervlakte van wortels, knollen en rhizomen* voorkomen en vaak zelfs in het parenchym doordringen, volledig kwijt te raken. De beste methode is dan om betrekkelijk schoon uitgangsmateriaal te gebruiken, zoals kiemplantjes, die na ontsmetting van het zaad onder semi-steriele omstandigheden worden gekweekt, of om planten te nemen, die in de kas in hydrocultuur zijn gekweekt.

Het glaswerk wordt in een autoclaaf bij hoge luchtvochtigheid gesteriliseerd b.v. bij 120 °C gedurende 45 minuten. Instrumenten van grotere afmetingen, zoals tangen en messen, worden in een Bunsenbrander geflambeerd na onderdompeling in alcohol. Kleine instrumenten zoals naalden en scheermesjes worden eveneens ontsmet door onderdompeling in alcohol, gevolgd door afspoelen met steriel water.

De voedingsmedia worden gesteriliseerd door ze te autoclaveren b.v. bij 110 °C gedurende 20 minuten. Eén van de grootste bezwaren van het autoclaveren is de gedeeltelijke afbraak en inactivering van bepaalde thermolabiele verbindingen, zoals vitaminen.
Indien het niet om routinewerk, maar om belangrijk onderzoek gaat, kan het noodzakelijk zijn om stoffen, die geen verhitting verdragen, apart door microfiltratie te steriliseren en ze aan het basismedium na het autoclaveren toe te voegen.

Anderzijds is het ook weer niet uitgesloten, dat de activiteit van bepaalde verbindingen als kokosmelk en thiamine, die vóór de sterilisatie zijn toegevoegd, gedeeltelijk te danken is aan hun afbraakprodukten.

De ruimtelijke voorzieningen, die gebruikt worden voor het steriel in cultuur brengen, kunnen in drie typen onderscheiden worden: a. kleine entkamertjes met een UV-lamp, die ontsmettende ozon produceert; b. kleine, luchtdichte kasten van glas of plastic met schuifdeuren en eventueel een UV-

lamp, die op een tafel gezet kunnen worden; c. vaste of mobiele entkasten met een inrichting voor ventilatie van gefilterde lucht, waardoor een overdruk ontstaat, die het binnendringen van kiemen van buitenaf tegengaat.

2.2. Sterilisatie van het plantmateriaal

Ontsmetting van materiaal dat met bodembacteriën besmet is, is altijd moeilijk en niet steeds succesvol. Indien mogelijk is het beter om onder steriele omstandigheden te werken of om de besmetting te beperken.
Zo is bij verdikte wortels van witlof, biet en peen het verkrijgen van steriele cultures vaak erg moeilijk als het materiaal rechtstreeks uit het veld komt. We hebben ondervonden, dat als de wortels eerst in vermiculiet staan, hetgeen de ontwikkeling van micro-organismen tegengaat, er betrekkelijk schoon materiaal verkregen wordt, dat daarna met de gebruikelijke methoden ontsmet kan worden.

De methode, die Robbins (1922) beschreef voor zaden, welke door Gautheret (1942) is toegepast bij de weefselkweek, bestaat uit het kortstondig onderdompelen van de explantaten in alcohol, daarna in een oplossing van calcium-hypochloriet, en ze vervolgens enkele malen in steriel water af te spoelen.

In moeilijke gevallen heeft het gebruik van kwikchloride ($HgCl_2$) in 0,25 $^{o}/oo$ gedurende 6 uur of in 0,5 $^{o}/oo$ gedurende 1 tot 3 uur bij ons vaak betere resultaten opgeleverd dan calcium- of natriumhypochloriet.
Onderdompeling van het plantemateriaal in een oplossing van antibiotica, zoals een mengsel van penicilline en streptomycine van 1 mg/l gedurende 2 uur na de behandeling met hypochloriet, bleek soms effectief maar gaf wisselende resultaten.

2.3. Kweekruimten

De voornaamse fysische omgevingsfactoren bij de weefselkweek zijn luchtvochtigheid, temperatuur en licht.

a. <u>De luchtvochtigheid</u>

Over het algemeen zorgt de afsluiting van het glaswerk voor een voldoende luchtvochtigheid in de kweekbuis. Het is daarom niet nodig om voorzieningen te treffen met betrekking tot de luchtvochtigheid in de kweekruimte zelf.

b. <u>De temperatuur</u>

De temperatuur in veel kweekruimten ligt constant bij omstreeks 22 tot

25 °C. De optimale temperatuur kan bij tropische gewassen hoger liggen, bij 27 tot 28 °C of daarentegen veel lager bij andere gewassen. Zo blijkt orgaanvorming bij de 'Rieger" begonia door temperaturen omstreeks 18 tot 20 °C bevorderd te worden.
Het schijnt, dat in bepaalde gevallen temperatuurwisseling zoals van 23 °C overdag en 15 °C 's nachts gunstig kan werken. Het mogelijke effect van een koude-behandeling voorafgaande aan de orgaanvorming is nog onvoldoende onderzocht.
Wanneer de weefselkweek geconfronteerd wordt met problemen van knolvorming, opheffing van rust en inductie van de bloei bij koudebehoeftige planten, is plaatsing bij betrekkelijk lage temperaturen b.v. 5 tot 10 °C soms nuttig of nodig om de seizoenswisselingen op gebied van de temperatuur na te bootsen.

c. Licht

1. Lichtintensiteit. Kweekruimten worden in het algemeen verlicht met TL-buizen. Het in stand houden van de weefsels in vitro vindt vaak onder een betrekkelijk zwakke belichting van 2000 tot 5000 lux plaats. Het opwekken van organogenese*, zoals beworteling en scheutvorming, zien we in het algemeen bij een belichting van dezelfde of soms zelfs lagere lichtintensiteit. Bij bepaalde gewassen, zoals bloemkool, is voor scheutvorming licht vereist. Bij andere, zoals tulp, wordt dit juist in het donker bevorderd. Wanneer de plantjes voor het oppotten in de kas worden voorbereid, verdient het vaak aanbeveling om de lichtintensiteit te verhogen, b.v. tot 10.000 lux.
2. Daglengte. Over de invloed van daglengte op callusgroei of orgaanvorming is weinig bekend; in oude kweekcellen was dit vaak 12 uur. nu gebruikt men veelal lange dagbelichting gedurende 16 uur.
Bijzondere gevallen daargelaten, is orgaanvorming, indien dit in het licht plaatsvindt, vaak tamelijk onafhankelijk van de daglengte.
Het is duidelijk dat, wanneer de weefselkweek te maken krijgt met problemen als rust, knolvorming, bloei-inductie of terugkeer naar de vegetatieve toestand, de daglengte een grote invloed uitoefent.
Voor onderzoek naar morfogenese is dus een reeks klimaatscellen nodig met variabele omstandigheden van temperatuur, lichtintensiteit en daglengte.

B. HET KWEEKMEDIUM

1. Vast of vloeibaar

De zes macro-elementen N, P, S, K, Mg en Ca, die nodig zijn voor de groei, worden als ion opgenomen.
Bij landbouw in de volle grond houdt het colloïdale klei-humuscomplex de verschillende ionen in de grond meer of minder stevig vast. De landbouwkundige moet het ingewikkelde probleem oplossen van het evenwicht tussen de opname van water en ionen, de doorluchting en drainage van de grond en het behoud van een goede structuur. Evenwicht tussen water en lucht is bijzonder moeilijk tot stand te brengen: als de grond goed vochtig is, dreigt hij te weinig lucht te bevatten en omgekeerd.

Bij hydrocultuur loopt de minerale oplossing door een inert substraat, dat vaak uit mengsels van verschillende ingrediënten bestaat zoals zand, turf, vulkanische as, geëxpandeerde kleikorrels en vermiculiet. Het grootste voordeel is dat men een beter en constanter evenwicht krijgt tussen de minerale ionen, het water en de lucht. In de weefselkweek levert de fysieke versteviging van het medium bijzondere problemen op.

1.1. Agar

Het succes van en de ontwikkelingen in de weefselkweek hangen samen met het gebruik van agar, waardoor de voedingsbodem vast wordt en voor een colloïdaal complex zorgt, dat ionen slechts zwak bindt. Agar heeft ook nadelen. Hoofdzaak is de gebrekkige doorluchting, waardoor de groei van bepaalde weefsels wordt afgeremd. Verder is de samenstelling van de agar zelf wisselend en slecht gedefiniëerd. Agar kan trouwens ook organische of minerale stoffen, vooral spore-elementen, bevatten, die mogelijk groeibevorderend zijn.

De optimale agarconcentratie hangt af van de commerciële herkomst van de agar en het beoogde doel van de kweek. De meest gebruikte concentraties variëren tussen de 6 en 10 g/l. Bij de vorming van bloemscheuten uit wortelstukjes van witlof is de optimale agarconcentratie hoger, nl. 12 g/l of meer.

1.2. Bio-gels

Er worden soms ook polyacrylamide-gels gebruikt. De voedingsstoffen van het medium kunnen via de intergranulaire ruimten ('externe capillairen'), maar ook via de interne kanaaltjes van verschillende diameter binnen de

korrels ('interne capillairen') naar het explantaat migreren.

Het transport van de bestanddelen van de voedingsbodem hangt af van talrijke factoren zoals diameter van de interne poriën, afmetingen van de korrels, graad van imbibitie van de gel en het molecuulgewicht van de verschillende stoffen.

Het werk van Palmade et al. (1967) aan weefselkweek bij aardpeer geeft een illustratie van de methode. Weefselgroei is optimaal bij bepaalde gels in een bepaalde concentratie. Keuze van gel en concentratie geven de mogelijkheid om volledige beworteling te induceren of juist te verhinderen.

1.3. Vloeibaar medium

Het belangrijkste probleem bij de kweek in een vloeibaar medium is de doorluchting. Deze kan op verschillende manieren verzorgd worden, zoals door krachtig schudden, door gebruik van apparaten, die gefilterde, steriele lucht laten doorborrelen en ook door de weefsels regelmatig onder te dompelen.

Kweek op stilstaand vloeibaar medium wordt maar weinig uitgevoerd, wegens het gevaar van verstikking der weefsels. Toch tonen de protocormen van verschillende orchideeën zelfs in stilstaande, vloeibare bodems, vaak een goede groei. Homès et al. (1972) hebben aangetoond, dat zuurstofgebrek van protocormcultures van Cymbidium ten gevolge van volledige onderdompeling remming van de normale groei van scheuten veroorzaakte, hetgeen samenging met het prolifereren van de protocormen.

Als men een stilstaande vloeistofcultuur wil gebruiken en toch een goede doorluchting van de weefsels wil krijgen blijft de methode van Heller (1953) nog steeds het meest praktisch: het explantaat wordt op een bruggetje filtreerpapier gezet, dat in de voedingsoplossing steekt.

De meest toegepaste werkwijze bij het gebruik van vloeibaar medium, vooral voor suspensieculturen en de kweek van celaggregaten, is om het medium met verschillende apparaten mechanisch te schudden, b.v. op een roterend rad dat met een gering toerental van 1 tot 5 omwentelingen per minuut draait, of met behulp van schudmachines.

1.4. Toevoeging van actieve koolstof

In het bijzonder bij meristeemcultuur komt het nogal eens voor, dat stoffen zoals fenolen en tanninen door het uitgangsexplantaat worden uitgescheiden, waardoor een verbruining van de voedingsbodem en een remming van

de weefselgroei veroorzaakt wordt, die soms zelfs met afsterving gepaard kan gaan. Verscheidene auteurs hebben getracht dit te verhinderen door toevoeging van actieve koolstof in concentraties, die in het algemeen variëren tussen 0,5 tot 5 g/l (zie Carré et al. 1979). Koolstof in het medium bevordert vaak de weefselgroei vooral bij meristeemcultuur, maar ook bij antherencultuur.

Negatieve resultaten, die echter zelden gepubliceerd worden, komen ook tamelijk veel voor. Bij de perzikamandel wordt door toevoeging van actieve koolstof de beworteling geremd (Carré et al. 1979).
Tabel XIII toont in enkele voorbeelden de verscheidenheid van het effect van actieve koolstof op de groei in weefselkweek.

De meest gangbare hypothetische verklaringen zijn de volgende:

a. Gunstig effect op groei van wortels of rhizoïden door verduistering van de voedingsbodem (Proskauer en Berman 1970).
b. Gunstig effect op de groei door adsorptie van remstoffen, die door het explantaat worden uitgescheiden of door de voedingsbodem worden meegebracht (Anagnostakis 1974; Bajaj et al. 1976; Ernst 1974; Wang en Huang 1976).
c. Remmend effect op de groei door adsorptie van groeistoffen (auxinen, cytokininen) uit het voedingsmedium.

Meestal zijn fenolverbindingen de verdachte remstoffen. Fridborg (1978) heeft aangetoond, dat actieve koolstof vooral het parahydroxybenzoëzuur adsorbeert, dat bij peen de embryogenese remt. Weatherhead et al. (1978) stelden vast, dat actieve koolstof het groei-remmende 5-hydroxymethylfurfural adsorbeert, dat bij de afbraak van saccharose tijdens het autoclaveren gevormd wordt. Deze auteurs tonen eveneens aan, dat actieve koolstof de auxinen en cytokininen uit de voedingsbodem adsorbeert en deze zo onwerkzaam maakt.
Bij bloemkool (Margara 1978a) onderdrukt koolstof de vorming van necrosen, die vaak in rijke minerale voedingsmedia of bij trage groei optreedt. Tegelijkertijd echter remt het de orgaanvorming soms volledig. Het is moeilijk

TABEL XIII

Verscheidenheid van de invloeden van actieve koolstof op de groei van in vitro cultures

Gewas	Materiaal	Effect	Hypothetische werking	Literatuur
Funaria hygrometica	Protonema	Normaal verloop van de ontwikkeling van rhizoïden	Effect van verduistering	Proskauer en Berman 1970
-	-	Verandering van de ontwikkeling: gereduceerd protonema, versnelde stengelvorming	Adsorptie van morfogenese stoffen, die door het protonema worden uitgescheiden	Klein en Bopp 1971
Phoenix dactylifera	Scheuten	Groeiverbetering	Adsorptie van remstoffen, die door het explantaat worden uitgescheiden	Reuveni en Lilien-Kipnis 1974
Orchideeën	Protocormen en plantjes	Groeiverbetering	Adsorptie van remstoffen	Ernst 1974; Wang en Huang 1976
Nicotiana tabacum	Meeldraden (androgenese)	Toename van het aantal gevormde plantjes	Adsorptie van uitgescheiden stoffen of remstoffen uit de voedingsbodem	Anagnostakis 1974; Bajaj et al. 1976
-	-	Variabele effecten afhankelijk van de samenstelling van de bodem	Adsorptie van groeistoffen uit de voedingsbodem (auxinen, cytokininen) die de orgaanvorming stimuleren. Adsorptie van een remmend afbraakproduct van saccharose	Weathered et al. 1978

Gewas	Materiaal	Effect	Hypthetische werking	Literatuur
Daucus carota **Vicia faba** **Allium cepa**	Weefsel (orgaanvorming)	Activering van de orgaanvorming (embryogenese, stengelvorming, wortelvorming)	Adsorptie van remmende fenolverbindingen, die door het explantaat worden uitgescheiden	Fridborg 1978
Brassica oleracea, botrytis	Weefsel (orgaanvorming)	Onderdrukking van necrose met remming van de orgaanvorming	Adsorptie van de groeistoffen uit de voedingsbodem (auxinen, cytokininen). Adsorptie van een eventuele groeistof, die door het explantaat wordt uitgescheiden	Margara 1978
Rubus sp. (framboos)	Meristeem of stengeltopje	Normale groei en beworteling	Adsorptie van remstoffen, die door het explantaat worden uitgescheiden. Stimulerende werking van 'groeifactoren' van het type fenolamide	Carré et al. 1979

om deze werking uitsluitend aan de adsorptie van groeistoffen uit het medium toe te schrijven. Wanneer we nl. de auxineconcentratie verhogen, zien we een scherpe overgang van concentraties zonder effect op de orgaanvorming naar toxische concentraties. Als werkhypothese kan men in dit geval denken aan de werking van een hormoonachtige stof, die van het explantaat uitgaat en een interactie aangaat met de groeistoffen in de voedingsbodem. Een dergelijke hypothese is reeds geopperd door Klein en Bopp (1971).

In de praktijk blijkt dus, dat toevoeging van actieve koolstof in bepaalde gevallen van groot belang kan zijn, terwijl het in andere gevallen ongunstig werkt. De activiteit van koolstof, die vermoedelijk gewasafhankelijk is, vereist nader onderzoek.

2. Minerale samenstelling

2.1. Bijzondere voedingsproblemen bij de weefselkweek in vitro

Onder de voor de plant noodzakelijke elementen maken we in het algemeen onderscheid tussen macro-elementen en micro- of spore-elementen. Koolstof, zuurstof en waterstof vormen bijna 95% van de droge stof. De zes andere onmisbare macro-elementen zijn stikstof, fosfor, zwavel, kalium, magnesium en calcium. De eerste drie hiervan zijn belangrijke bouwstenen van planteweefsels, m.n. voor eiwitten en nucleïnezuren. De laatste drie spelen vooral een rol bij het handhaven van het evenwicht tussen kationen en anionen in de plant. Hun werking is echter meervoudig. De spore-elementen spelen een belangrijke rol in de enzymprocessen als activatoren of onderdelen van coënzymen. De belangrijkste zijn ijzer, koper, zink, mangaan, molybdeen en borium.

De voeding bij in vitro cultuur levert speciale problemen op. Door de geringe koolzuurassimilatie is toevoeging van koolstof in organische vorm als saccharose of glucose vereist.
Bij de intacte plant is de minerale voeding nauw verbonden met de interacties tussen weefsels en organen. Zo kan de samenstelling van de minerale voedingsoplossing aanzienlijk veranderen tengevolge van de absorptie in barrièreweefsel: calcium kan zich bijvoorbeeld bij de endodermis en ook in andere weefsels in de vorm van oxalaat ophopen. Bij het kweken van weefsels en organen zijn de fysiologische correlaties tot een minimum teruggebracht; in het grensgeval van een cultuur van vrije cellen kan men zich indenken, dat dit inlichtingen verschaft over de reële voedingsbehoeften op celniveau.

Grotendeels verstoken van de regelingsmechanismen in de intacte plant zijn geïsoleerde weefsels in vitro bijzonder gevoelig voor de invloed van minerale zouten. Deze gevoeligheid uit zich, zoals Heller (1953) heeft aangetoond, in het gemakkelijker optreden van gebreksverschijnselen of in verschijnselen van toxiciteit bij hoge concentraies.
Zo zien we bij Parthenocissus tricuspidata al groeiremming na de eerste overzetting in vloeibaar medium, waarin bepaalde elementen ontbreken. Dit komt algemeen voor als we één van de volgende zes elementen weglaten: N, P, K, S, Mg en Ca. Chloor en natrium daarentegen blijken niet nodig te zijn.

Rekening houdende met de geringe weefselmassa ten opzichte van het mediumvolume kan men verbaasd zijn over de grote hoeveelheden mineralen, die zich in de moderne voedingsmedia bevinden, zoals bij Murashige en Skoog (1962). Deze hoeveelheden liggen ongetwijfeld sterk boven de werkelijke behoeften van de weefsels. De problemen moeten meer op het vlak van ionendruk en ionenevenwichten liggen, dan op werkelijke voedingsbehoeften.

Het is duidelijk, dat de eisen afhangen van het gewas, de aard van het weefsel en fysiologische toestand ervan, maar ook van de kweekwijze en het type orgaanvorming dat men bestudeert. Gebleken is dat meristemen en in het algemeen weefsels met een hoge metabolische activiteit een grote behoefte aan kalium hebben.

Daarentegen zijn verouderende en traag groeiende weefsels vaak beter te kweken op bodems met meer calcium, dat zoals bekend antitoxisch werkt. Heller (1953) heeft aangetoond, dat fosfaationen al snel toxisch werken boven 2 μM na de derde maal overzetten. Uitgangsexplantaten kunnen echter goed groeien bij veel hogere concentraties (8 μM). Sommige traag groeiende weefsels groeien beter op media, die rijk zijn aan N en K, zoals het medium van Murashige en Skoog dan op arme media, zoals dat van Knop in halve concentratie, welk door Gautheret (1959) gebruikt wordt.

Anderzijds wordt weefselnecrose tijdens achtereenvolgende overzettingen bevorderd door media, die te rijk zijn aan stikstof (vooral aan ammoniumionen). Het veel voorkomende gebruik van media met veel totaal stikstof, ammonium en kalium, is het gevolg van de vaak stimulerende werking van deze stoffen op de orgaanvorming, vooral op de scheutvorming.

Kortom de minerale voeding in vitro is afhankelijk van de elementen in het inoculum en in de voedingsoplossing.
De voeding hangt dus samen met de afmetingen van het explantaat, de aard van de weefsels, de metabolische activiteit ervan, de frequentie van overzetten

en de samenstelilng van de voedingsbodem.

Het probleem van de keuze van het basismedium is bijzonder ingewikkeld. Bij hydrocultuur van volledige planten probeert men een optimale groei te verkrijgen door een evenwichtig milieu aan te bieden, dat voortdurend ververst wordt.

Bij weefselkweek op vaste voedingsbodems wordt het medium alleen maar bij het overzetten ververst. Tussen twee overzettingen in kan er veel in de samenstelling veranderen. Als men weefsel alleen in stand wil houden, probeert men eveneens goede groei op een evenwichtige en niet toxische voedingsbodem te verkrijgen. Bij orgaanvorming van zowel scheuten als wortels is het allerminst vanzelfsprekend, dat de bodems van het type Murashige en Skoog geschikt zijn omdat ze een evenwichtige samenstelling hebben. Het is mogelijk en zelfs waarschijnlijk, dat bepaalde macro-elementen en sporeelementen, zoals zink of mangaan, die in betrekkelijk hoge concentraties worden gegeven, werkzaam zijn door vooral bepaalde enzymsystemen te activeren.

Het is ook niet uitgesloten, dat het nu juist het ontbreken van het ionenevenwicht is (een overmaat aan ammonium of kalium) dat in bepaalde gevallen door nog onbekende mechanismen de orgaanvorming bevordert.

2.2. Studie van de minerale voeding in vitro

De keuze van een minerale voedingsoplossing aangepast aan een gegeven probleem vindt meestal empirisch plaats.

Soms verandert men na enkele voorlopige proeven de samenstelling van een klassieke voedingsbodem, al dan niet ingrijpend. Systematische studies over minerale voeding in vitro zijn erg schaars. Er bestaat trouwens geen algemene methode om dit type onderzoek uit te voeren.

Factorenproeven werden door Heller gekozen bij zijn klassiek geworden onderzoek aan de voeding van peenweefsel op een bruggetje filtreerpapier, dat in het vloeibare medium gestoken was.

Het hoofdprobleem van het onderzoek naar de minerale voeding komt voort uit het feit, dat kationen en anionen niet afzonderlijk toegediend kunnn worden. Wanneer men de concentratie van een bepaald kation laat variëren, terwijl de andere kationen constant blijven, moet men gelijktijdig de concentratie van het begeleidende anion veranderen. Men moet dus een gemeenschappelijk anion kiezen, dat samengaat met alle kationen en over een grote concentratiereeks gevariëerd kan worden zonder de cultuur zichtbaar te beïnvloeden. Dit anion

is chloor. Daartegenover wordt natrium als kation gebruikt in verbinding met die anionen, waarvan men achtereenvolgens de concentratie wil variëren.

Een studie van elk element afzonderlijk moet de optimale concentratie opleveren. Deze methode is ongetwijfeld zeer rationeel. Het nadeel ervan is echter, dat een lang vooronderzoek vereist is, dat steeds herhaald moet worden als men nieuw plantmateriaal of een nieuw probleem van orgaanvorming wil bestuderen.

Bovendien moet opgemerkt worden, dat we niet zeker weten of de betrekkelijk grote hoeveelheden chloor en natrium in het medium van Heller niet nadelig zijn voor andere planten dan de peen.
Welke ook de gebruikte methode is, het resultaat is alleen van toepassing op het betrokken materiaal onder de gegeven proefomstandigheden. Extrapolatie is altijd onbetrouwbaar.

2.3. Samenstelling van de minerale basismedia (macro-elementen)

Talrijke mineralen worden in de in vitro kweek van weefsels en organen gebruikt. Sommige voedingsbodems zijn voor heel specifieke doeleinden ontwikkeld, zoals het kweken van Lemna, kieming en kweek van protocormen van orchideeën, embryocultuur, bloemvorming en androgenese.

Sommige media, die voor een bepaald doel zijn ontwikkeld, zijn in feite voor veel meer doeleinden bruikbaar. Tabel XIV geeft b.v. de minerale samenstelling van enkele van deze voedingsbodems, ingedeeld naar hun oorspronkelijke doel. Dit betekent niet, dat het gebruik hiertoe is beperkt.
Om vergelijking te vergemakkelijken, is de samenstelling in milli-equivalenten per liter gegeven. [1] Door bestudering van de tabel kan men de geschiedenis van het gebruik van minerale basismedia in de weefselkweek leren kennen.

[1] We herinneren eraan, dat een equivalent per liter het molecuulgewicht gedeeld door de valentie is. Eén molecuul $CaCl_2$ kan één Ca^{++}-ion en twee Cl^--ionen opleveren. Er zijn 2 equ/l Cl en 2 equ/l Ca.

TABEL XIV

Minerale samenstelling van enkele voedingsbodems
(macro-elementen, in mequ/l)

	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	SO_4^{--}	Cl^-	K^+	Na^+	Mg^{++}	Ca^{++}	NH_4^+	Totaal N
Klassieke media:										
Sachs 1860 geciteerd door Heller	9,9	9,66	9,86	8,6	9,9	8,6	4,06	15,46	-	9,9
Pfeffer 1897 geciteerd door Heller	8,74	1,47	1,62	3,35	6,8	-	1,62	6,78	-	8,74
Knop 1865 geciteerd door Gautheret	10,96	1,84	2,04	-	4,32	-	2,04	8,48	-	10,96
Hoagland en Snyder 1933 geciteerd door Heller	15	1	2	-	6	-	2	10	-	15
Media voor kroosachtigen in vitro:										
Hutner 1953	5,5	4,6	4,06	3,57	8,17	-	4,06	3	2,5	8
Hillman 1961	25	5	4,06	-	20	-	4,06	10	-	25
Media voor hydrocultuur:										
Coic en Lesaint (neutraal milieu minnende planten) 1971	12	1,25	1,5	-	5,25	-	1,5	6	2	14
Coic en Lesaint (zuur milieu minnende planten) 1971	10	1,1	1,5	-	3,6	-	1	4	4	14
Media voor weefsels:										
Knop 1/2 (Gautheret 1959)	5,48	0,92	1,02	-	2,16	-	1,02	4,24	-	5,48
White 1934	3,24	0,14	8,8	0,9	1,7	2,94	6	2,44	-	3,24
Hildebrandt et al. 1946	8,36	0,96	7,26	1,74	3,32	2,36	5,86	6,78	-	8,36

	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	SO_4^{--}	Cl^-	K^+	Na^+	Mg^{++}	Ca^{++}	NH_4^+	Totaal N
Heller 1953	7,06	0,9	2,04	11,09	10,07	7,96	2,04	1,02	-	7,06
Nitsch en Nitsch 1956	19,8	1,81	2,04	20,47	39,93	1,81	2,04	0,34	-	19,8
Murashige en Skoog 1962	39,43	1,25	3	6	20,06	-	3	6	20,62	60,05
Linser en Neumann 1968	12,74	1,69	3,44	0,87	9,47	5,13	-	4,14	-	12,74
Tripathi 1970		14,12	1,81		2,04		4,48	-	15,93	2,04
4,08	-	14,12								
Schenk en Hildebrandt 1972	24,75	2,6	3,24	2,72	24,75	-	3,24	2,72	2,6	27,35
Tumorweefsels:										
Burkholder en Nickel 1949	8	8	2	10	12	-	4	12	-	8
Suspensiecultuur:										
Lamport 1964	2,49	0,13	5,74	0,87	1,66	2,95	2,92	1,7	-	2,49
Gamborg en Eveleigh 1968	9,9	1,07	5,06	6,06	13,92	1,07	2,04	2,04	3,02	12,92
Gamborg et al. 1968	29,7	1,09	6,08	2,04	29,7	1,09	4,06	2,04	2,02	31,72
Protocormen van Orchideeën:										
Knudson 1925 (Morel 1960)	7,36	1,84	4,92	3,05	6,06	1,71	2,04	4,24	3,12	10,48
Wimber 1963	3,38	4,28	6,58	OH^-	4,28	-	2,04	3,38	4,55	7,93
Homès et al. 1972	9,06	4,76	6,94	1,23	7,21	-	6,8	7,98	-	9,06
Bloemvorming:										
Margara et al. (Mf x 2) 1966	48	2	6	-	22	24	6	4	-	48
Androgenese:										
Nitsch en Nitsch 1969	18,4	0,5	1,5	2,26	9,9	-	1,5	2,26	9	27,4
Embryo's:										
Monnier 1968	29,12	1,25	3	16,68	24,76	-	3	11,98	10,31	39,43
Worteltoppen:										
Bonner en Devirian 1939	2,98	0,15	0,34	0,82	1,81	-	0,34	2,04	-	2,88
Stengeltoppen(*):										
Tendille 1974	11,2	0,6	1	1,6	10	0,2	1	1,2	2	13,2

a. De eerste voedingsmedia, die bij in vitro cultuur gebruikt werden voor het opzetten van een weefselkweek.

In de beginperiode van de weefselkweek is er geen speciale studie verricht naar de minerale samenstelling. Het doel waarnaar werd gestreefd was het in standhouden van weefselmateriaal, dat geen organen vormde maar onbeperkt kon worden overgezet.

De pioniers hebben voedingsmedia gebruikt, die daarvóór gebruikt werden voor de groei van planten of plantedelen onder niet steriele omstandigheden. Zo gebruikte Gautheret het medium van Knop in halve concentratie; White gebruikte een oplossing, die voor de groei van wortels ontwikkeld was. We zien echter (zie Tabel XIV), dat die media tamelijk arm waren, vergeleken met die welke voor hele planten worden gebruikt. Dit leverde een dubbel voordeel op. De eventuele toxiciteit van bepaalde ionen na herhaald overenten werd vermeden. Ook trad een te actieve weefselgroei niet op, die tot necrose zou hebben kunnen leiden.

b. Moderne voedingsmedia

Het medium van Murashige en Skoog.

Dit is ontwikkeld voor het onderzoek naar optimale callusgroei bij tabak. De auteurs hadden opgemerkt, dat het callus zich veel actiever ontwikkelde wanneer aan het medium een extract van tabaksbladeren toegevoegd werd. Het extract bleek hoofdzakelijk werkzaam te zijn door de minerale ionen, die het bevatte. Het nieuwe medium, dat vervolgens gemaakt werd, maakte een aanzienlijke toename van de callusgroei mogelijk.

Het medium van Murashige en Skoog is echter toch duidelijk beter gebleken dan de oude media, wegens het op gang brengen van orgaanvorming, met name de scheutvorming. Dit medium is niettemin zeer algemeen bruikbaar voor allerlei andere typen van weefselkweek. Gezegd mag worden, dat door het medium van Murashige en Skoog, samen met het gebruik van geschikte groeistofmengsels van cytokininen en auxinen, een grote reeks publicaties over orgaanvorming in de weefselkweek tot stand is kunnen komen.

Het medium van Murashige en Skoog is vooral gekenmerkt door een zeer hoog stikstofgehalte (ongeveer 60 mequ/l), waarvan 1/3 deel in gereduceerde vorm als ammonium, en door een eveneens hoge kaliumconcentratie.

Het schijnt, dat in enkele gevallen het gehalte aan bepaalde ionen

boven het optimum is. Verschillende auteurs gebruiken een tot de helft verdunde oplossing van macro-elementen van Murashige en Skoog, waarin de hoge verhouding van NH_4/N- totaal niet veranderd is.

Onderzoek naar voedingsbodems, die aangepast zijn aan de verschillende problemen van de weefselkweek.

De zorg om de samenstelling van de minerale basisoplossing meer aan te passen aan het gebruikte plantemateriaal en aan de soort cultuur (zoals suspensiecultuur, callusvorming, androgenese, scheutvorming, embryogenese) heeft geleid tot de publicatie van een zeer groot aantal verschillende media.

Tabel XIV geeft slechts enkele voorbeelden, die niettemin toch enig idee geven van de variatiebreedte in de concentratie van de verschillenden ionen. De kaliumconcentratie van het medium van Murashige en Skoog, die toch al hoog is, werd soms nog overschreden toen men probeerde om de delingsactiviteit van cellen te verhogen (zie de extreme gevallen van de media van Gamborg et al. 1968 en van Nitsch en Nitsch 1956). In bepaalde gevallen is de hoge NH_4/N-totaal verhouding van de bodem van Murashige en Skoog aangehouden bij een aanzienlijke verlaging van het gehalte aan N-totaal (medium van Nitsch en Nitsch 1969, voor androgenese bij tabak). Meestal is de NH_4/N-totaal verhouding teruggebracht, b.v. tot ongeveer 1/6 in de bodem van Tendille (1974) voor meristeemcultuur van asperge. Deze bodem, die rijker is aan kalium dan de oplossingen van Coic en Lesaint voor hydrocultuur van intacte planten, had enerzijds als doel een goede in vitro ontwikkeling te krijgen, en anderzijds ook om een bevredigende doorgroei van de cultures bij de overgang in grond onder normale kasomstandigheden te bewerkstelligen.

Studie van de tabel toont zowel de moderne tendensen als de twijfel over de keuze van de minerale samenstelling van voedingsoplossingen voor de weefselkweek.

Vergeleken met de eerste media ($^1/2$ geconcentreerd Knop en die van White) onderscheiden de voedingsoplossingen van de meeste auteurs zich door het hoge stikstofgehalte, de aanwezigheid van ammoniumionen en het omkeren van de verhouding Ca/K ten gunste van het kalium.

Door de gewasafhankelijkheid en de aard van de cultuur kan men niet a priori en zonder voorafgaande proeven de optimale concentratie aan met name stikstof en kalium bepalen.

TABEL XV

Samenstelling in mequ/l van een serie onderling vergelijkbare voedingsbodems (macro-elementen**)

Naam van de bodem	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	SO_4^{--}	Cl^-	K^+	Na^+	Mg^{++}	Ca^{++}	NH_4^+	Totaal N
N_5K	4	1	2	5	6,75	-	2	2,25	1	5
N_5Ca	4	1	2	5	3	-	2	6	1	5
$N_{15}K$	12	1	2	2	9	-	2	3	3	15
$N_{15}Ca$	12	1	2	2	4	-	2	8	3	15
$N_{30}K$	24	1	2	1	15	-	2	5	6	30
$N_{30}Ca$	24	1	2	1	10	-	2	10	6	30
$N_{30}NH_4$	20	1	2	5	12	-	2	4	10	30
$N_{45}K$	36	1	2	5	24	-	2	8	9	45
MS (N 60) (*)	40	1	3	6	21	-	3	6	20	60

(*) Het MS-medium is het iets gewijzigde medium van MURASHIGE en SKOOG, ter vergelijking.
(**) MARGARA (1978b).

TABEL XVI

Samenstelling in mg/l(*) van een serie onderling vergelijkbare voedingsbodems

Naam van de bodem	NH_4NO_3	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	KNO_3	$NaNO_3$	$MgSO_4.7H_2O$	KH_2PO_4	KCl	$CaCl_2$
N_5K	80	265,5	75,75	-	246	136	372,5	-
N_5Ca	101	354	-	-	246	136	149	320,5
$N_{15}K$	240	354	606	-	246	136	149	-
$N_{15}Ca$	240	944	101	-	246	136	149	-
$N_{30}K$	480	590	1313	-	246	136	74,5	-
$N_{30}Ca$	480	1180	808	-	246	136	74,5	-
$N_{30}NH_4$	800	472	606	-	246	136	372,5	
$N_{45}K$	720	944	1818	85	246	136	372,5	-

(*) MARGARA (1978b)

Tabellen XV en XVI geven de samenstelling in mequ/l en mg/l van een serie onderling vergelijkbare media, die wij ontwikkeld hebben (Margara 1978b). Bij het samenstellen van deze voedingsoplossingen werd van de volgende principes uitgegaan:
De stikstofconcentratie variëert van 5 tot 60 mequ/l, waarbij het medium van Murashige en Skoog met N = 60 als controle is beschouwd.
De naam van het medium geeft de stikstofsamenstelling aan. Zo bevatten de media N 15: 15 mequ/l stikstof. De verhouding NH_4/N-totaal is constant gehouden op 1/5 behalve in de bodems die NH_4 genoemd zijn. Hierin is de verhouding 1/3, zoals in het MS medium.
De concentraties SO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$ en Mg^{2+} zijn constant en betrekkelijk laag gehouden. Het chloorgehalte (chloor is een begeleidend ion) is variabel, maar nooit meer dan 5 mequ/l om eventuele toxiciteit te vermijden.
Als het stikstofgehalte toeneemt, nemen ook de kationen toe. De verhouding K/Ca blijft constant en gelijk aan 3 in de media, die we K genoemd hebben. De verhouding is kleiner (1 of 0,5) in de media, die we Ca noemen.
Het medium $N_{30}K$ bleek vaak beter dan het medium van Murashige en Skoog; de arme voedingsbodems (N_{15} en vooral N_5) kunnen beperkend zijn voor de orgaanvorming, maar geschikt voor het overzetten van weefsels, voor meristeemcultuur en voor herhaalde vermeerdering van Cymbidiumprotocormen.
De scheutvorming bij bloemkool (Margara 1978a) toont duidelijk, dat wanneer de combinatie van groeistoffen niet optimaal is de keuze van een aangepaste minerale oplossing van groot belang is.

2.4. Spore-elementen

Het probleem van het gebruik van spore-elementen in de weefselkweek is ingewikkeld. Systematisch onderzoek over dit onderwerp is wegens de moeilijkheidsgraad schaars. Een bepaald aantal spore-elementen is onmisbaar voor de groei. Ze spelen een rol als activator en ook als onderdeel van verschillende enzymen.

In de weefselkweek op agarmedium is de agar zelf al zo rijk aan spore-elementen, dat toevoeging vaak als overbodig kan worden beschouwd. Toch kunnen bij herhaalde overzetting van weefsels gebreksverschijnselen optreden; om orgaanvorming te verkrijgen zijn in bepaalde gevallen hoge concentraties van bepaalde spore-elementen noodzakelijk. Toevoeging van spore-elementen aan het medium kan om verschillende redenen plaatsvinden:

a. De spore-elementen worden alleen toegevoegd om elk mogelijk gebrek te voorkomen. Om eveneens elk risico van toxiciteit te vermijden is de concentratie van de oplossing van spore-elementen laag. Meestal wordt dan de oplossing van Heller gebruikt.

b. De spore-elementen worden soms in een aanzienlijk hogere concentraties toegevoegd in de hoop een activering van de groei te krijgen. Sommige spore-elementen, zoals koper en nikkel, worden al snel toxisch, zelfs in betrekkelijk lage concentraties, maar andere, zoals mangaan, zink en borium, kunnen in tamelijk hoge concentraties gebruikt worden zonder duidelijke toxiciteit. Dit heeft een rol gespeeld bij het samenstellen van de bodem van Murashige en Skoog (zie Tabel XVII).

Bij meristeemcultuur van Prunus hebben Boxus en Quoirin (1974) opgemerkt, dat de voedingsoplossing van Heller 100 maal geconcentreerd moest worden om een normale hervatting van de groei van het meristeem en beworteling te krijgen. Het beperkende element bleek in dit geval mangaan te zijn (Quoirin en Le Poivre, 1977).

Bij de vorming in vitro van bloeischeuten, op wortelstukken van witlof hebben Margara et al. (1967) aangetoond, dat toevoeging van zink in een betrekkelijk hoge concentratie van 10 mg/l $ZnSO_4$ gunstig was.

We hebben ook bij onderzoek naar de beworteling van stengelstukken van de bloeiwijze van bloemkool (ongepubliceerde waarnemingen) een stimulerende invloed van kobalt in een hoge concentratie van 1 tot 5 mg/l $CoCl_2$ waargenomen. Dit effekt zien we alleen in aanwezigheid van een auxine. Bij scheutvorming zijn alleen remmende effekten van kobalt waargenomen. Een stimulerende werking van kobalt is in diverse biologische toetsen door Miller (1952) en Thimann (1956) aangetoond.

c. Men heeft zich wel afgevraagd of de stimulerende invloed op de orgaanvorming van spore-elementen in hoge concentratie in bepaalde gevallen het gevolg is van hun toxiciteit en van het teweegbrengen van een evenwichtsverstoring.

Heller (1953) had die vraag gesteld naar aanleiding van de sitmulerende werking van aluminium, dat nooit als een noodzakelijk element beschouwd was.

Kortom, het blijkt duidelijk, dat verder onderzoek naar de rol van spore-elementen in de weefselkweek noodzakelijk is.

In de praktijk wordt de voedingsoplossing van Heller zeer algemeen gebruikt voor het in standhouden van weefsels. In het onderzoek over orgaanvorming

TABEL XVII

Minerale samenstelling van enkele voedingsmedia

(spore-elementen in mg/l*)

	Nitsch 1951	Heller 1953	Murashige en Skoog 1962	White 1963	Gamborg et al. 1968	Schenk en Hildebrandt 1972	Margara 1978 (ml)
$MnSO_4.4H_2O$	3	0,1	22,3	7	10	10	5
$ZnSO_4.7H_2O$	0,5	1	8,6	0,3	2	1	5
H_3BO_3	0,5	1	6,2	0,75	-	1	3
$CuSO_4.7H_2O$	0,025	0,03	0,025	-	0,025	0,2	0,01
Na_2MoO_4	0,025	-	0,025	-	0,25	0,1	0,05
KJ	0,5	0,01	0,83	1,5	3	5	0,01
$CoCl_2.6H_2O$	-	-	-	-	0,025	0,1	-
$NiCl_2.6H_2O$	-	0,03	-	-	-	-	-
$AlCl_3$	-	0,03	0,025	-	-	-	-

*Er is bij de samenstelling van deze oplossingen geen rekening gehouden met ijzer. Ijzer kan apart worden toegevoegd. Het medium van Murashige en Skoog bevat 27,85 mg/l $FeSO_4$-$7H_2O$ en 37,25 mg/l Na_2EDTA.
Ter vereenvoudiging voegen wij in onze media 30 mg/l $FeSO_4$ en 30 mg/l EDTA toe.

kan het nuttig zijn om een medium te gebruiken, dat extra mangaan en eventueel zink en borium bevat. Dit om het dubbele risico te vermijden van een beperkend werking door te lage concentraties of van een eventuele toxiciteit (zie Tabel XVII).

3. Organische verbindingen

3.1. Suikers

Weefsels, die in vitro worden gekweekt, zijn grotendeels koolstofheterotroof wegens het ontbreken of het onvoldoende werkzaam zijn van de koolzuurassimilatie. Het is dus in het algemeen noodzakelijk om suikers aan de voedingsbodem toe te voegen. Men kan hiervoor verschillende mono- of disaccharide suikers gebruiken. Gewoonlijk zijn dit saccharose en glucose.
Het is niet altijd makkelijk om de optimale suikerconcentratie voor weefselgroei te bepalen. In de proeven van Strauss en Larue aan de groei van maiskiemwit (geciteerd door Gautheret 1959) variëerde de optimale saccharoseconcentratie tussen 2 en 8% al naargelang de groei bepaald was naar het vers- of naar het drooggewicht.

Het nadeel van de bepaling naar versgewicht is, dat er grote hoeveelheden water in het weefsel aanwezig zijn, terwijl de bepaling van het drooggewicht betrekking heeft op reservestoffen, die niet noodzakelijk verband hoeven te houden met proliferaties.
Toevoeging van suiker heeft niet uitsluitend optimalisering van de weefselgroei tot doel. Het kan ook de orgaanvorming sturen. Het ontbreken van suikers is vaak een beperkende factor.
Spanjersberg en Gautheret (1963) hebben het belang van suikers, met name glucose, voor de beworteling van de aardpeer, topinambours cv Violet de Rennes, aangetoond.
Bij witlof is de toevoeging van suikers één van de factoren, die de bloemaanleg bevordert op scheuten, die in vitro op een wortelstukje ontstaan zijn. De optimale saccharose-concentratie voor bloemaanleg ligt hoger dan die voor de vorming van vegetatieve scheuten. Er blijkt dus een gradiënt te bestaan in de behoefte aan saccharose, afhankelijk van het type orgaanvorming, zelfs in de laatste fase van de aanleg van bloemprimordia wanneer de fotoperiodieke inductie al volledig heeft plaatsgevonden.

Het totaal ontbreken van suikers en stikstof in het medium waarop het van de plant met zijn reservestoffen geïsoleerde explantaat geplaatst is,

verhindert bloemaanleg en zorgt voor de handhaving van de vegetatieve toestand (Margara 1977e).
Bij Cymbidium hebben Homès et al. (1973a) aangetoond, dat sturing van de morfogenese gedeeltelijk afhankelijk was van de suikerconcentratie in de voedingsbodem.

Tenslotte noemen we nog de waarnemingen van Menon en Lal (1972) over de morfogenese van een mos (Physcomitrium pyriforme). Bij deze soort sturen lage suikerconcentraties van 0,5% samen met een lage lichtintensiteit van 50 tot 100 lux de ontwikkeling tot de vorming van apogame sporofyten, terwijl een hoge suikerconcentratie van 6% met een hogere lichtintensiteit van 5000 lux vorming van gametofyten oplevert. Dit effect wordt alleen maar met saccharose verkregen.

Het is verbazingwekkend, dat suikers een specifieke werking op de morfogenese kunnen uitoefenen. Talrijke onderzoekers zijn nagegaan of dè werking van suikers niet gebaseerd kon zijn op een verhoging van de osmotische waarde. Bij bijna alle proeven heeft mannitol, dat als vervanger van saccharose gebruikt wordt (omdat dit in het algemeen niet wordt gemetaboliseerd) geen enkele morfogene werking, maar soms wel een remmend effect wanneer het in hoge concentratie wordt toegediend. De onderzoekers concluderen daarom, dat saccharose zowel op het niveau van het metabolisme als de energie werkzaam is.
Brown, Leung en Thorpe (1978) hebben een interessante proef met tabakscallus gedaan. Saccharose in een concentratie van 3% bevordert de scheutvorming, die slechts sporadisch voorkomt in lagere concentraties.
Mannitol in een concentratie met een gelijke osmotische waarde als een saccharose-oplossing van 3% heeft geen effect. Als men de hoeveelheid saccharose tot 1/3 reduceert en men mannitol toevoegt tot men een osmotisce waarde heeft die gelijk is aan die van de controle, dan herstelt de scheutvorming zich weer. Het lijkt er hier dus op dat toevoeging van suiker zowel een metabolische als een osmotische functie heeft.

Om de specifieke werking van bepaalde suikers op de morfogenese te verklaren heeft men een hypothese opgesteld over een indirect effect ervan op het metabolisme van de endogene groeistoffen.
Ankler (1974) heeft aangetoond, dat galactose, lactose en raffinose de synthese van auxine in de kiemlobben van haver remmen op een wijze, die nog niet is opgehelderd.

Remmers van de auxinesynthese stimuleren de embryovorming uit embryogeen weefsel van Citrus sinensis cv (Kochba et al. 1978). Dit weefsel, dat geen spontane embryogenese vertoont, is auxine-autotroof. Galactose stimuleert op vergelijkbare wijze de embryogenese uit weefsel, dat nooit tevoren embryo's gevormd heeft. De auteurs veronderstellen, dat galactose de omzetting van indolaceetaldehyde in IAA remt.

3.2. Vitaminen

Verschillende vitaminen bevorderen de groei van de weefsels in vitro; het is niet uitgesloten, dat het ontbreken van bepaalde vitaminen een beperkende factor is bij de organogenese.
Toch is thiamine de enige vitamine, die vaak een duidelijk effect te zien geeft. Men dient het in het algemeen in een concentratie van 0,1 tot 1 mg/l toe. Soms worden vóór het autoclaveren veel grotere hoeveelheden toegevoegd (50 tot 100 mg/l). Het is dan niet uitgesloten, dat een deel van de waargenomen activiteit aan afbraakprodukten moet worden toegeschreven. Er worden af en toe ook effecten van nicotinezuur, pyridoxine en riboflavine op de groei van de cultures geconstateerd.

Soms worden nog ingewikkelder mengsels van vitaminen gebruikt (zie Gautheret 1959). Deze mengsels kunnen mogelijk van belang zijn, maar hun werking is nauwelijks aangetoond. Ze worden vooral uit voorzorg toegepast.
Een verbinding, die meestal aan de vitaminen wordt toegevoegd is meso-inositol. Het effect op de weefselproliferatie en ook wel op de activering van de orgaanvorming kan zeer duidelijk zijn. Het wordt in hoge concentraties van 50 tot 500 mg/l gebruikt.
Ascorbinezuur (1 tot 10 mg/l) eventueel in combinatie met citroenzuur (50 tot 100 mg/l) wordt soms ook gebruikt, echter niet als vitamine, maar als anti-oxydant om het verbruinen van bepaalde weefsels tegen te gaan. Sommige auteurs, zoals Broome en Zimmerman (1978), zien juist een verslechtering door deze behandeling optreden, zoals bij meristeemcultuur van de zwarte bes, en geven er de voorkeur aan om het voedingsmedium van de cultures na twee dagen te verversen.

3.3. Aminozuren en verschillende eiwitextracten

Hoewel planteweefsels stikstof-autotroof zijn en het vermogen bezitten om nitraat en soms ammoniumstikstof te gebruiken, heeft men toch waargenomen, dat toevoeging van aminozuren de callusgroei bevordert. Men heeft

aminozuren vooral gebruikt in het onderzoek naar orgaanvorming en bij de toepassing van vegetatieve vermeerdering in vitro.

Toch zijn de waarnemingen van verschillende auteurs nogal uiteenlopend en soms zelfs tegenstrijdig. Aminozuren worden soms toegediend in ingewikkelde mengsels, zoals door Constabel (1958) bij de weefselkweek van Juniperus of door Paris en Duhamet (1958) bij 'crowngall' van schorseneer. Wijzelf hebben een mengsel van aminozuren met een geamineerde suiker samengesteld. Dit voldeed bij de kweek van Cymbidium-protocormen beter dan caseïne-hydrolysaat of tryptamine. Het mengsel bevorderde in diverse gevallen de orgaanvorming, vooral bij bloemkool en biet[1].
Aminozuurmengels blijken synergistische effecten te kunnen geven, omdat ze in veel verschillende gevallen de callusgroei en de orgaanvorming stimuleren. Er zijn daarentege ook remmende effecten van aminozuurmengels bekend. Soms verdient het de voorkeur om een afzonderlijk aminozuur toe te dienen, dat in hoge concentratie stimulerend werkt, b.v. glutamine (250 mg/l) bij tumoren van Picea glauca (Risser en White 1964). In dit geval werkt toevoeging van verschillende andere aminozuren remmend.

In het onderzoek van Skoog (1957) naar de scheutvorming uit callus van mergweefsel van tabak, werken tyrosine en in mindere mate fenylalanine stimulerend in combinatie met kinetine.

De resultaten van het toevoegen van aminozuren blijken dus zeer variabel en afhankelijk van het gewas en het type morfogenese, dat men onderzoekt. Het is dus onmogelijk om algemene regels op te stellen.

3.4. Organische zuren

Organische zuren worden zelden als energiebron in voedingsbodems gebruikt, die in het algemeen saccharose of glucose bevatten.
Toch hebben Gamborg en Shylok (1970) waargenomen, dat sojacellen in suspensiecultuur zich konden ontwikkelen op een voedingsbodem met ammonium als enige stikstofbron, indien er tevens zuren uit de Krebs-cyclus aangeboden werden: citraat, malaat, fumaraat en succinaat. Daarentegen is de groei

---

1) Molaire samenstelling van het mengsel AA: glutamine 5.10^{-5}, glycine en asparagine 10^{-5}, proline, tyrosine, fenylalanine 10^{-6}, methionine, cysteïne 10^{-7}

nihil of gering op tartraat, acetaat en carbonaat.
Behrend en Mateles (1976) zien ook, dat de groei van tabakscellen optimaal is op media met ammoniumionen in afwezigheid van nitraat, als men succinaat toevoegt in een molaire verhouding ammonium/succinaat van 1/5.

3.5. Stimulerende stoffen van slecht gedefiniëerde samenstelling

Vaak worden ook talrijke produkten en natuurlijke extracten van slecht gedefiniëerde en variabele samenstelling gebruikt, veelal met resultaten van weinig betekenis. Het is duidelijk, dat het belangrijk is om deze slecht gedefiniëerde produkten zo mogelijk te vervangen door chemisch bekende stoffen. Slecht gedefiniëerd zijn b.v. gistextract (0,5 tot 1 g/l), caseïnehydrolysaat (0,5 tot 3 g/l), pepton, kokosmelk (5 tot 15%), het onrijpe kiemwit van mais, een extract van Aesculus hippocastanum, banaan, tomatesap, sinaasappelsap, extracten van verschillende schimmels, wijnsap en berkesap.
Kokosmelk verdient vooral onze aandacht wegens het veelvuldig gebruik en het onderzoek naar de samenstelling. Van Overbeek et al. (1941) kwamen op het idee het te gebruiken voor de kweek van embryo's van Datura om het jonge, geïsoleerde embryo door middel van dit vloeibaar kiemwit de noodzakelijke voedings- en groeistoffen te verschaffen. Met dezelfde bedoeling hebben Steward en Caplin (1954) het met succes gebruikt in het eerste onderzoek naar somatische embryogenese bij peen.
De combinatie van kokosmelk met 2,4-D blijkt vaak zeer waardevol om weerbarstig weefsel aan de groei te krijgen. Het werkt soms, samen met de cytokininen, bevorderend op de organogenese.
De samenstelling van kokosmelk is vooral bestudeerd door Shantz en Steward (1952). Het bevat verschillende fracties: a. vitaminen; b. aminozuren en hun amiden; c. verschillende suikers en zeswaardige alcoholen, waarvan de belangrijkste zijn: meso- en scyllo-inositol en sorbitol; d. endogene groeistoffen (auxine, cytokinine). Soms dacht men, dat gesubstitueerde ureumverbindingen, zoals 1,3 difenylureum, een belangrijke rol zouden spelen bij de activiteit van kokosmelk. Men beschouwt deze verbinding nu algemeen als niet-actief.
De activiteit van kokosmelk wordt overwegend toegeschreven aan de endogene groeistoffen en aan het merkwaardige evenwicht van de verschillende andere verbindingen. In de praktijk neemt het gebruik af.

4. Groeistoffen

De natuurlijke plantaardige groeistoffen, die men vaak fytohormonen of groeihormonen noemt, zijn niet exact homoloog met dierlijke hormonen. Ze kunnen in vijf groepen worden verdeeld: auxinen, gibberellinen, cytokininen, abscissinezuur en ethyleen.

Naast de natuurlijke groeistoffen worden talrijke synthetische groeistoffen in de weefselkweek gebruikt. Het begin van de weefselkweek-technieken en de hoge vlucht, die deze later genomen hebben, berusten voor een deel op de kennis en het gebruik van auxinen. De huidige uitbreiding van het onderzoek naar orgaanvorming en naar toepassing van vegetatieve vermeerdering hangt grotendeels samen met het gelijktijdig of achtereenvolgens gebruiken van auxinen en cytokininen. Het belang van gibberellinen in de weefselkweek blijkt veel geringer te zijn; ABA en de stoffen, die ethyleen vrijmaken worden slechts in uitzonderingsgevallen toegepast.
Hierbij dient opgemerkt te worden, dat de gebruikte verbindingen vaak synthetische groeistoffen zijn, die in hoge concentratie worden toegediend. Het is niet goed bekend in welke mate ze werkelijk het effect van de endogene hormonen nabootsen, of dat hun werking duidelijk anders is. Het is bv. zeer waarschijnlijk, dat de primaire werking van 2,4-D en IAA niet aan elkaar gelijk zijn.

4.1. Auxinen en anti-auxinen

a. Auxinen

De keuze van het auxine is, afhankelijk van het doel van de cultuur, van veel belang. β-Indolylazijnzuur (IAA), β-indolylpropionzuur (IPA) en β-indolylboterzuur (IBA) zijn betrekkelijk zwakke auxinen. Andere stoffen kunnen zich als zeer zwakke auxinen, zoals fenyl-azijnzuur, of als sterke auxinen, zoals NAA en naftoxyazijnzuur gedragen. 2,4-D is een zeer sterk auxine (fig. 25).
Picolinezuur (picloram) heeft wel een afwijkende chemische structuur, maar heeft soms morfogene effecten, die lijken op die van 2,4-D. Het moet in de zeer lage concentratie van 10^{-9} tot 10^{-7} M worden toegediend.

De eigenschappen van deze verschillende verbindingen zijn zeer uiteenlopend. IAA wordt vaak in bepaald fysiologisch onderzoek gebruikt wegens het voordeel, dat het een natuurlijke stof is. Maar juist om dezelfde reden is het gevoelig voor de enzymatische afbraaksystemen van auxine. Bovendien zijn de oplossingen labiel en oxyderen ze in het licht.

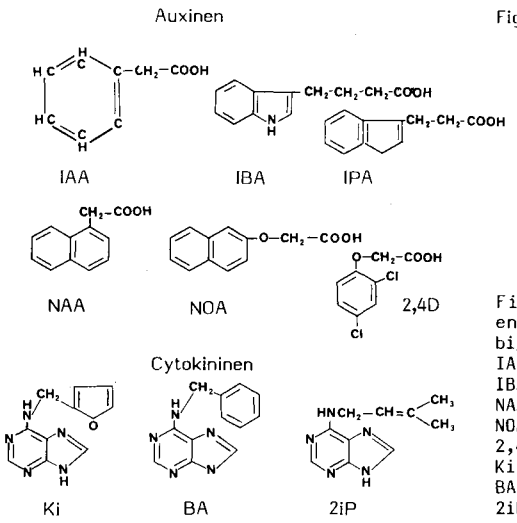


Fig. 25.

Fig. 25. Chemische structuur van enkele groeistoffen, die vaak bij weefselkweek gebruikt worden.
IAA : indolylazijnzuur
IBA : indolylboterzuur
NAA : naftylazijnzuur
NOA : 2-naftoxyazijnzuur
2,4-D: 2,4-dichloorfenoxyazijnzuur
Ki : kinetine (6-furfurylaminopurine)
BA : benzyladenine
2iP : 2-isopentenyladenine

In het meer toegepaste werk over vegetatieve vermeerdering wordt het IAA vaak met goed resultaat vervangen door IBA en IPA. NAA is een zeer stabiel, sterk auxine, dat vaak wordt gebruikt om beworteling te krijgen.
In de praktijk gebruikt men soms mengsels van IBA en NAA van 10^{-6} tot 10^{-5} M. 2,4-D is een zeer sterk auxine, dat in hoge concentratie snel toxisch wordt en een hyperhydrische reactie van het weefsel veroorzaakt. Het heeft weinig effect op orgaanvorming, maar is een krachtige activator van de cambiumwerking; het gebruik ervan, eventueel samen met cytokininen en kokosmelk, is van veel belang indien men uit weefsels losse celgroepen moet verkrijgen, en bij het onderzoek naar somatische embryogenese.
Norreel en Nitsch (1968) hebben het belang aangetoond van het gebruik van 2-naftoxyazijnzuur (NOA) i.p.v. 2,4-D bij de somatische embryogenese van peen. Gautheret (1959) meldt het gebruik van parachloorfenoxyazijnzuur als een krachtige activator van de cambiumwerking. Deze verbinding is minder toxisch dan 2,4-D.
Bij scheutvorming van bloemkool ziet Margara (1977b) dat, in afwezigheid van exogene cytokininen, een reeks auxineachtige verbindingen de orgaanvorming bevorderen. 2,4-D en fenylazijnzuur in concentraties van 5.10^{-7} M tot 5.10^{-5} M hebben weinig effect.

IAA stimuleert minder dan IPA, IBA en NAA. In dit geval is NAA in een zeer groot concentratiegebied werkzaam, terwijl het werkingsspectrum van IBA een veel smallere piek vertoont, en wel bij 5.10^{-6} M.

b. Antiauxinen

Bepaalde verbindingen kunnen competitief werken op auxine, zoals naftylsulfopropionzuur en N-1-naftylftaalzuur. Van andere verbindingen is bekend, dat ze het transport van endogeen auxine verstoren, zoals 2,3,5-trijoodbenzoëzuur of TIBA.
Deze verbindingen worden maar weinig in de weefselkweek gebruikt. Men zou ze kunnen gebruiken om de orgaanvorming te stimuleren als men reden heeft om te denken, dat een overmaat van endogeen auxine remmend kan werken (Feng en Link 1970; Newcomb en Wetherell 1979).

4.2. Cytokininen (fig. 25)

Cytokininen worden vaak in lage concentraties (10^{-7} tot 10^{-6} M) gebruikt om proliferatie van weefsels te stimuleren. In hogere concentraties (10^{-6} tot 10^{-5} M) worden ze veel toegepast om scheutvorming op callus te induceren. In zeer hoge concentraties (10^{-5} tot 10^{-4} M) worden ze gebruikt voor in vitro proliferatie van axillaire meristemen in meristeemcultuur en om groepjes van scheuten te verkrijgen, die later opgedeeld worden.

Wegens het remmend effect op de beworteling door cytokininen in het algemeen, worden ze niet of in zeer lage concentratie gebruikt in bewortelingsmedia. De meest gebruikte cytokininen zijn kinetine (6-furfuryl aminopurine), benzyladenine (6-benzylaminopurine), 2-isopentenyladenine (2iP) en zeatine.
Benzyladenine wordt vaak gebruikt wegens de grote activiteit en de lage kosten. Sommige onderzoekers geven de voorkeur aan zeatine, omdat het een natuurlijke groeistof is.

De mate van werkzaamheid van de verschillende cytokininen hangt af van het plantemateriaal, dat men onderzoekt. Meestal is het verschil in activiteit niet zodanig, dat vervanging van benzyladenine noodzakelijk is; hoewel de keuze van het cytokinine in bepaalde gevallen van belang kan zijn, is in het algemeen een systematische voorstudie niet zo dringend nodig als bij de auxinen.

4.3. Gibberellinen

Gibberellinen worden tamelijk weinig in de weefselkweek gebruikt. Men beweert, dat ze de orgaanvorming en vooral de beworteling remmen. Toch blijken de effecten van gibberellinen sterk te variëren, afhankelijk van de concentratie en het plantemateriaal.
Gautheret (1969) heeft interessante effekten van gibberellinezuur op de beworteling bij aardpeer, topinambour cv Violet de Rennes, waargenomen. In het licht remt gibberelline de wortelvorming, terwijl deze hierdoor samen met auxine in het donker gestimuleerd wordt.

Margara (1969) heeft een synergistisch effect van gibberelline (GA_3) met auxinen en cytokininen op de scheutvorming bij bloemkool waargenomen. Morel en Muller (1964) hebben gibberellinezuur gebruikt om de doorgroei van aardappelmeristemen in meristeemcultuur te bevorderen. In dit geval bleek de stimulerende werking van gibberelline plaats te vinden ter hoogte van de laterale zone van het meristeem, waar de bladprimordia worden afgezet, nl. de 'primaire meristeemring'. Terwijl bij andere gewassen en onder andere omstandigheden de gibberellinen de strekkingsgroei van de stengelinternodiën bevorderen (hetgeen een van de meest voorkomende fysiologische effecten is) werken deze nu ter hoogte van de subapicale meristematische zone. Ze veroorzaken een directe of indirecte stimulering van de apicale zone van het stengelmeristeem bij de bloei-inductie.

Bij de proliferatie van mergweefsel in tabak oefent gibbereline (GA_3), dat op zich geen effect heeft, met kinetine en auxine een syenrgistische werking uit. Deze werking is onderhavig aan een volgorde-effect. De optimaal werkzame volgorde is: gibberelline, cytokinine en auxine (Nitsch 1968).

4.4. Verschillende andere stoffen

Talrijke organische stoffen worden zo nu en dan in de weefselkweek gebruikt. Er bestaan verschillende structuuranalogen van auxinen en stoffen, die een auxineachtige werking kunnen uitoefenen, zoals picloram en isatine. We noemen hier de kankerverwekkende koolstofverbindingen, zoals methylcholantreen, dat door Levine (1950) bij de weefselkweek van peen gebruikt is, en traumatinezuur, dat hypertrofie van de cellen van de peul van de boon geeft (Bonner, geciteerd door Gautheret 1959) en een synergistische werking van auxinen vertoont bij de scheutvorming van bloemkool (Margara 1977b).

Kochar et al. (1971; 1977) melden het effect van een aantal kankerverwekkende koolstofverbindingen, zoals het benz-(a)-anthraceen op de scheut-

vorming uit haploïd tabakscallus. Deze stoffen zouden geen orgaanvormend effect hebben op diploïd callus. Benz-(a)-anthraceen gedraagt zich in experimenten als een cytokinine. Vandaar, dat een indirecte werking op het metabolisme van de cytokininen vermoed wordt. Dezelfde auteurs (1970) hebben een dergelijk effect op de scheutvorming waargenomen van een chelerende stof, het 1,3-diamino-2-hydroxypropaan N,N,N',N' tetra-azijnzuur in 10 mg/l.

Bepaalde verbindingen, die als onkruidbestrijdingsmiddel gebruikt worden, zijn wel eens aangewend om bij recalcitrante gramineeën, callus te induceren, dat secundair op andere voedingsbodems organen vormt. Dit is het geval met 2,4,5-T, dicamba en benazoline (Dudits et al. 1975).
We noemen nog het toevoegen van antibiotica, zoals penicilline, terramycine en streptomycine in 0,1 tot 10 ppm aan de voedingsbodems wegens hun bacteriedodende werking. Deze antibiotica vertonen soms een stimulerende werking op de groei (Nickell 1952).

De lijst van stoffen, die bij weefselkweek van belang zouden kunnen zijn, is lang niet volledig. Van de stoffen, die momenteel werkelijk een rol spelen, noemen we tenslotte de fenolverbindingen, die de synthese van endogeen auxine kunnen stimuleren door remming van de auxine-oxydasen (zoals chlorogeenzuur, cafeïnezuur, feruulzuur en rutinezuur) of daarentegen de synthese van endogeen auxine remmen (zoals para-hydroxy-benzoëzuur, paracoumaarzuur en vanillinezuur). Een voorbeeld van de werking van chlorogeenzuur in vitro is de stimulering van de bloemknopvorming bij witlof (Paulet en Nitsch 1964).
In de praktijk zijn chlorogeenzuur en cafeïnezuur (5.10^{-6} tot 5.10^{-5} M) in combinatie met de auxinen IBA en NAA vaak gebruikt om in moeilijke gevallen beworteling te krijgen.

In de toekomst kunnen fenolamiden van belang worden, vooral omdat ze de rol van endogene 'groeifactor' blijken te spelen. Deze stoffen bestaan uit een amideverbinding van één of twee fenolzuren uit de kaneelzuurreeks met een di- of polyamide, zoals putrescine.
De fenolamiden zijn geïdentificeerd als de belangrijkste fenolen in de voortplantingsorganen van een tamelijk groot aantal gewassen (Martin-Tanguy et al. 1978). Ze blijken met de bloei-inductie en met de reproductieve fase bij tabak verband te houden (Cabanne et al. 1977b). Bij zaden en embryo's van mais zien we een correlatie tussen het gehalte aan de amiden van hydroxykaneelzuur en de cytoplasmatische mannelijke steriliteit (Martin-Tanguy et al. 1979).

In de praktijk van de meristeemcultuur zou de vaak beslissende rol van actieve koolstof, die van plantaardige herkomst is, zoals we al bij framboos zagen, gedeeltelijk toegeschreven kunnen worden aan de invloed op het gehalte aan groeifactoren van het fenolamiden-type (Carré et al. 1979).

4.5. Keuze van de samenstelling van groeistoffen in het medium

De keuze van de concentratie, de combinatie en eventueel de volgorde van de groeistoffen is belangrijk voor het ontstaan en de regeling van de orgaanvorming.
Voor een bepaald type van plantemateriaal en type orgaanvorming moeten dan ook talrijke combinaties uitgeprobeerd worden.
Sommige auteurs hebben wel vijftig verschillende combinaties beproefd voordat ze met een nieuw onderzoeksobject begonnen.

TABEL XVIII

Globale voorbeelden van auxine- en cytokinineconcentraties

Inzetten van weefselstukjes:
- IAA, IBA of NAA 5.10^{-7} tot 5.10^{-6} M of 2,4-D 5.10^{-8} tot 10^{-6} M
- Ki of BA $0,10^{-7}$ tot 10^{-6} M

Meristeemcultuur of stengeltopcultuur:

1. Hervatting van de groei van het explantaat
   - IBA of NAA $0,10^{-7}$ tot 10^{-6} M
   - GA $0,10^{-7}$ tot 10^{-5} M
   - Ki of BA $0,10^{-7}$ tot 10^{-6} M
2. Profileratie van okselscheuten
   - BA 10^{-5} tot 10^{-4} M
3. Normale ontwikkeling van scheuten en vorming van wortels
   - IBA of NAA 5.10^{-6} tot 10^{-5} M

Scheutvorming op callus
- IBA of NAA $0,10^{-6}$ tot 5.10^{-6}
- Ki, BA, 2 iP of zeatine 10^{-7} tot 10^{-5} M

Bij de keuze van de verbindingen en hun concentraties kunnen we verwijzen naar eerdere overwegingen. In het kort en op een zeer schematische wijze hebben we in Tabel XVIII een aantal gangbare concentraties auxinen, cytokininen en gibberellinen voor enige typen van weefselkweek in vitro aangegeven.

5. Praktische opmerkingen over de keuze bij de samenstelling van het voedingsmedium

De vaste voedingsbodem bevat naast water ook agar, suiker, mineralen, eventueel een vitaminenmengsel en verschillende organische stoffen, en tenslotte de groeistoffen.

Het grote probleem bij de keuze van de voedingsbodem is, dat het praktisch onmogelijk is om na een factorenanalyse een keuze te maken, die alle combinaties van de gekozen factoren zou omvatten. We noemen als voorbeeld, dat voor het uittesten van een combinatie van vijf macro-elementen, met twee spore-elementen, met het al of niet aanwezig zijn van een vitaminenmengsel en van verschillend organische verbindingen en met zes combinaties van groeistoffen, al 240 verschillende behandelingen nodig zijn, terwijl het aantal variaties per element of per samenstelling dan waarschijnlijk nog te laag is.
De methode van De Fossard (1976) vereist 81 verschillende combinaties en is toch niet geheel bevredigend.

Men kan meestal tijd besparen door uit te gaan van een medium, dat al door andere auteurs bij hetzelfde plantemateriaal of in vergelijkbare gevallen gebruikt is, en dit nauwkeurig gaan verbeteren.
Als besluit van dit aanhangsel, dat de bedoeling heeft om een beknopt overzicht van gangbare gegevens en technieken te geven, herinneren we aan het empirische element van de praktijk van de weefselkweek. Elke plant en zelfs elk orgaan moet als een bijzonder geval worden beschouwd.

AANHANGSEL II

F.A. Hakkaart

I. GLAZIGHEID OF VITRIFICATIE

II. OVERDRACHT IN GROND

I. GLAZIGHEID OF VITRIFICATIE

F.A. Hakkaart

Dit verschijnsel komt in de weefselkweek bij meerdere gewassen voor, b.v. bij anjer, artisjok, biet, bloemkool, Ficus lyrata en Ficus benjamina, Forsythia intermedia, Malus spp., Pinus spp., Prunus spp., Raphanus sativus, selderij, Sequoia sempervirens en een aantal bolgewassen. Het begrip is echter niet scherp gedefinieerd en kan dus per gewas iets anders betekenen. Er bestaan daarom vele meningen over oorzaak en bestrijding. Gepubliceerd onderzoek hierover is in vergelijking met de ernst en omvang van het probleem echter schaars. We zullen proberen een beknopt overzicht van de huidige kennis van het verschijnsel glazigheid te geven.

Als term gebruiken we in Nederland het woord glazigheid of vitrificatie. In Vlaanderen wordt de term hyperhydrische transformatie gebruikt. De Franse term is 'vitrification' of état vitreux'. De Engelse term is 'non-glaucous' bij anjers en meer algemeen 'translucent', 'succulent' en ook wel 'glassiness'. In dit overzicht zullen we het probleem bij enkele gewassen behandelen.

Kassla

Buiten de weefselkweek wordt de term glazigheid ook gebruikt. Bij kassla komt in de herfst- en winterteelt op bepaalde grondsoorten en bij bepaalde cultivars een fysiologische afwijking voor, die gekenmerkt is door het voorkomen van scherp begrensde doorzichtige delen van de bladrand. De intercellulaire ruimten zijn geheel met water gevuld en op de lange duur kan dit leiden tot weefselnecrose. Extra stikstof bestrijdt het verschijnsel en op korte termijn wordt het tegengegaan d.m.v. een warmtestoot, waarbij de plant door de plotselinge verhoging van de bladtemperatuur gedwongen wordt veel water te verdampen, zodat de intercellulairen weer vrijkomen van water. Het is ons niet bekend of deze fysiologische achtergrond van glazigheid ook in de weefselkweek voorkomt.

Anjer

Glazigheid bij anjer is een van de best gedocumenteerde voorbeelden in de weefselkweek. In Nederland is men in het begin van de zestiger jaren

begonnen met de toepassing van meristeemcultuur bij alle nieuwe cultivars ten einde deze vrij te maken van het anjervlekkenvirus en later ook van het anjer-etsvirus. Glazigheid als probleem kwam toen nauwelijks voor. Meristeemcultuur was bovendien noodzakelijk, omdat de Raad voor het Kwekersrecht via wettelijke bescherming eist, dat de cultivars vrij zijn van deze virussen. Van sommige cultivars kon in het geheel geen materiaal zonder deze virussen verkregen worden. Vanaf 1977 begon er in de nieuwe cultivars veel glazigheid in de meristeemcultuur voor te komen, waardoor grote verliezen ontstonden en de situatie kritiek werd. Wel lukte het plantjes in de buis op te kweken, maar na overbrengen in de grond stierven ze af. Het probleem bleek sterk cultivarafhankelijk te zijn; sommige cultivars hebben er totaal geen last van. Dit kan verklaren, dat er in de zestiger jaren weinig problemen waren: het sortiment is immers de laatste jaren grondig gewijzigd.

Reeds in 1975 kregen Earle en Langhans in de Verenigde Staten met glazigheid bij anjers te maken, toen ze anjermeristemen na kweek op agarbodem in vloeibare media voortkweekten. Dit suggereert een verband met vochtigheid. Sutter en Langhans (1979) geven een duidelijk beeld van de ernst van de situatie: op vloeibare bodems kregen ze 100% glazigheid en op agarbodems 96-98%. Ze toonden aan dat er verschil is in de samenstelling van de epicuticulaire waslaag van verschillend plantmateriaal. Normaal gekweekte planten in de kas hebben opeengepakte wasstaafjes op het bladoppervlak, normale in vitro plantjes hebben wasplaten, maar bij glazige in vitro plantjes is aan de oppervlakte geen gestructureerde waslaag aanwezig. Ze verklaren het afsterven na overzetten in de grond als gevolg van uitdroging. Ook een met vocht verzadigde atmosfeer kan dit niet tegengaan.

Leshem (1983) heeft het verschijnsel nog iets verder geanalyseerd door onderscheid te maken tussen lichtgroene, langwerpige, doorschijnende bladeren zonder waslaag, die er waterig uitzien (translucent) en donkergroene, brede en dikkere bladeren, die in groepen aan de basis van het explantaat voorkomen (succulent). De meeste auteurs maken dit onderscheid niet. Beide typen sterven na overzetten in de grond af. Bij onderzoek van het succulente type van glazigheid bleek dat het apikale meristeem al afwijkt van een normaal meristeem. De tunica is minder duidelijk en omsluit grote cellen met grote vacuolen; ook ontbreken de procambiumstrengen. Blijkbaar is al in een vroeg stadium bepaald of er later succulente bladeren ontstaan.

Als remedie raden Hakkaart en Versluijs (1983) aan om de agarconcentratie te verhogen van 6 tot 12 g/l. Hierdoor wordt de glazigheid duidelijk

verminderd. Tegelijkertijd neemt echter ook de groei van het explantaat af. Als compromis wordt een concentratie van 8 of 10 g/l aangeraden. Als tweede effectieve maatregel wordt de aanpassing van de afsluiting van de buis genoemd. Losse afsluitingen zoals wattenproppen, metalen doppen en steristoppen gaven minder glazigheid dan dichtere afsluitingen, zoals aluminiumfolie en parafilm. Dit zal verband houden met de gaswisseling, waarbij we vooral denken aan waterdamp.

Onafhankelijk hiervan en nagenoeg gelijktijdig komen Ziv et al. (1983) in Israël ook tot de conclusie dat een hogere agarconcentratie de glazigheid bij anjer doet afnemen. Ze kunnen bewijzen dat dit met de luchtvochtigheid verband houdt. Indien ze met een desiccant de luchtvochtigheid in het cultuurvat verlaagden, verminderde de glazigheid. Ze concluderen dat de cruciale factor de beschikbaarheid van water voor de plant is. Wanneer de primordia ontstaan zijn onder omstandigheden die glazigheid bevorderen, kan dit niet meer omgekeerd worden Dat dit inderdaad vroegtijdig bepaald wordt blijkt ook uit een waarneming van Hakkaart en Versluijs (1983). Ze vonden dat er 3 tot 4 dagen na het isoleren van het meristeem een temperatuurgevoelige periode bstaat. Wanneer dan het meristeem bij verhoogde temperatuur van 26°C wordt gehouden, i.p.v. de normale 19 tot 20°C, zal dit het ontstaan van een normaal plantje bevorderen. De gevoelige periode duurt slechts kort.

Een effect van groeistoffen op glazigheid bij anjer hebben wij in eigen onderzoek niet kunnen vinden. Ook Lilien-Kiplis (geciteerd in Ziv et al., 1983) kon dit niet aantonen. Bij andere gewassen lijkt er wel een effect van groeistoffen te zijn.

Paludan en Thomsen (1981) kregen glazigheid bij een hoge zoutconcentratie (4530 mg macro-elementen) en niet bij 1400 mg macro-elementen per liter. Kinetine had geen effect.

Ook speciale stoffen kunnen glazigheid veroorzaken Zo kregen Kluge en Oertel (1978) glazige plantjes bij anjermeristemen na toevoeging van Virazol aan de bodem.

Het probleem van glazigheid bij anjers in Nederland is inmiddels minder geworden. Wanneer de drie maatregelen, aangeraden door Hakkaart en Versluijs (1983) worden uitgevoerd is het probleem weliswaar niet volledig verdwenen, maar tot aanvaardbare proporties teruggebracht (Schuuring, persoonlijke mededeling).

Bloemkool

Het glazigheidsprobleem bij dit gewas lijkt veel op dat van anjer. Ook hier is er sprake van een geringere vorming van gestructureerde was op de cuticula met eveneens als gevolg hiervan extreem waterverlies na overdracht in grond (Grout en Aston 1977). Het verschil met anjer is dat bij bloemkool herstel mogelijk is, indien het materiaal zorgvuldig wordt afgehard. Tijdens dit afhardingsproces produceren bladeren epicuticulaire was, dat niet op hetzelfde blad tijdens de weefselkweekfase aanwezig was. Bij anjers is het proces irreversibel: een eenmaal gevormd blad zonder epicuticulaire waslaag blijft zo en kan deze later niet meer vormen, ook niet onder omstandigheden van afharding. De auteurs menen dat al gedurende de weefselkweekfase zelf getracht moet worden de vochtigheid in de buis te verlagen.

Artisjok

Debergh et al. (1981) stuitten bij het ontwikkelen van een snelle in vitro vermeerderingsmethode op het glazigheidsprobleem, waardoor deze dreigde te mislukken. Bij artisjok worden bladschijf en bladsteel turgescent; deze turgescente bladeren vertonen een plotselinge lengtegroei en kunnen wel 5 of 6 keer zo lang worden als normale bladeren. Vervolgens worden de bladeren doorschijnend en daarna necrotisch. Microscopisch onderzoek wees uit dat het palissadeparenchym ontbrak: er was wel sponsparenchym aanwezig. De situatie is hier anatomisch kennelijk anders dan bij anjer en bloemkool, waar de epicuticulaire waslaag een duidelijke rol speelt. De auteurs komen na het controleren van een reeks hypothesen tot de conclusie dat alleen het verhogen van de agarconcentratie van 0,6 tot 1.1% het probleem oplost. Ook hier wordt evenals bij de anjer de groei door de hogere agarconcentratie geremd. Men zal dus tot een compromis moeten komen over de nog toelaatbare agarconcentratie.

De verklaring van het effect van de agarconcentratie zoeken de auteurs in de matrix potentiaal van het medium. Deze is de bijdrage van kolloiden, zoals agar, aan de totale waterpotentiaal. De matrix potentiaal wordt gedefinieerd als de vrije energie per mol water in een samengesteld systeem. De benodigde energie om water op te nemen stijgt; m.a.w. de plant groeit in een drogere omgeving. Dit bevordert de vorming van epicuticulaire was en verlaagt de glazigheid.

Debergh et al. (1981) bestudeerden ook het effect van groeistoffen. Indien 2 iP vervangen werd door BA nam de glazigheid zelfs toe tot 100%. Voorts had het anti-auxine TIBA geen effect of de glazigheid.

Biet

Bij biet definieert Miedema (1984) glazigheid als het optreden van korte, dikke bladeren. Bij bepaalde genotypen leidde toevoeging van BA tot glazigheid. Toevoeging van GA_3 gaf een duidelijke verbetering. De fysiologische achtergronden hiervan zijn niet opgehelderd.

Prunus en Malus spp.

Boxus et al. (geciteerd in Debergh et al., 1981) konden het optreden van glazigheid bij deze gewassen verminderen door de cultures 3 tot 4 weken bij een temperatuur van 3 tot 4°C te bewaren. Bij artisjok echter gaf dit volgens Debergh geen verbetering. In eigen onderzoek met anjer hielp dit evenmin.

Quoirin en Lepoivre (1977) konden eveneens bij Prunus glazigheid vermijden door de minerale samenstelling te veranderen. Dit werd bereikt door het weglaten van chloor. Ze menen dat dergelijke groeistoringen samenhangen met een hoge zoutconcentratie vooral aan chloor.

Bolgewassen

Bij deze groep gewassen komt eveneens glazigheid voor. Helaas zijn ons hierover geen gedocumenteerde gegevens bekend. Hopelijk zal meer onderzoek hier opheldering geven.

Conclusie

Glazigheid komt in de weefselkweek bij veel uiteenlopende gewassen voor. We moeten het als een algemene overkoepelende term beschouwen, want de verschijnselen verschillen per gewas en de remedie zal dus ook verschiillen. In bepaalde gevallen, zoals bij anjer en artisjok, bleek glazigheid zelfs een beperkende factor te worden bij de toepassing van de in vitro cultuur. Bij deze twee gewassen bestaat er reeds enig inzicht in de achtergrond van

dit verschijnsel, maar bij veel andere gewassen ontbreekt dit volledig. Verder onderzoek op dit gebied is zowel fundamenteel als uit praktisch oogpunt gewenst.

LITERATUUR

Debergh, P., Harbaoui, Y. and R. Lemeur, 1981. Mass propagation of globe artichoke (Cynara scolymus): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. **53:** 181-187.

Earle, E.D. and R.W. Langhans, 1975. Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. HortSciences **10:** 608-610.

Grout, B.W.W. and M.J. Aston, 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort. Res. **17:** 1-7.

Hakkaart, F.A. and Joke M.A. Versluijs, 1983. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. Neth. J. Pl. Path. **89:** 47-53.

Kluge, S. und C. Oertel, 1978. Prüfung von Virazol auf die Vermehrung des Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus) und des Nelkenscheckungs-Virus (carnation mottle virus). Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz **14:** 219-225.

Leshem, B., 1983. Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. Ann. Bot. **52:** 413-415.

Miedema, P., 1984. De invloed van groeiregulatoren op het optreden van glazigheid in spruitcultures van Beta vulgaris. Voordracht Voorjaarssymposium Ned. Ver. Plantecel- en Weefselkweek 9 maart, Wageningen.

Oijen, J. van 1978. Extra stikstof tegen glazigheid bij sla. Groenten en Fruit: 20 sept., p. 41, 43 en 45.

Paludan, N. and A. Thomson, 1981. Meristem-tip culture of carnation. Plant diseases and pests in Denmark. 98th Ann. Rep. Research Centre Plant Protection: 53.

Quoirin, M. et P. Lepoivre, 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus. Acta Hort. **78:** 437-442.

Sutter, E. and R.W. Langhans, 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **104:** 493-496.

Ziv, M., Meir, G. and A.H. Halevy, 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture **2:** 55-65.

II. OVERDRACHT IN GROND

F.A. Hakkaart

Inleiding

Aan de studie van deze toch belangrijke fase is in het onderzoek weinig aandacht besteed. We zullen proberen een kort overzicht van de problemen te geven.

Voor een aantal gewassen is overdracht van de buis naar de grond geen probleem. Als voorbeelden noemen we Ficus lyrata (Debergh en De Wael 1977), Spathiphyllum (Fonnesbech en Fonnesbech 1979), framboos (Rover et al., 1979) en Eucharis (Pierik en Sprenkels 1984). Uit eigen onderzoek noemen we Kalanchoë waar ook geen problemen bij de overdracht in de grond voorkomen.

Geheel anders reageert jojoba (Simmondsia chinensis), een woestijnplant met zaden die een vloeibare was bevatten, welke als vervanger kan dienen van spermaceti afkomstig van potvissen. Weefselkweek lukte wel, maar de overdracht in grond was een volledige mislukking. Deze fase werd de beperkende factor voor toepassing van weefselkweek op grote schaal (Rost en Hinchee, 1980).

In het volgende overzicht zullen we enkele aspecten van drie achtereenvolgende fasen bij de overdracht in grond behandelen.

A. Voorbereidig tijdens het in vitro stadium

De bewortelingsfase kan als een voorbereiding op het overbrengen in de grond beschouwd worden. We noemen alleen die typische elementen welke direct met het onderwerp te maken hebben.

1. Glazigheid

Dit onderwerp is in het vorige hoofdstuk behandeld. Tijdens de in vitro kweek moeten de omstandigheden zodanig worden aangepast dat glazigheid wordt vermeden. Enkele factoren die hierbij een rol spelen zijn in het voorgaande hoofdstuk vermeld.

2. Licht

Eenmaal overgebracht in grond moet het weefselkweekplantje zich normaal autotroof voeden. Het is daarom van veel belang om al in het stadium vóór

het overplanten geleidelijk de overgang van voeding via suiker naar de koolzuurassimilatie voor te bereiden. Verhoging van de lichtintensiteit kan van belang zijn. Hasegawa et al. (1973) vonden dat bij asperge een lichtintensiteit van 10.000 lux optimaal was in het stadium vóór overplanten. Dit mag zeker niet als algemeen worden beschouwd. Bij de meeste gewassen is dit niet noodzakelijk. Voor Anthurium en gerbera b.v. is 3.000 lux voldoende. In veel gevallen kan met lagere intensiteiten worden volstaan.

3. Temperatuur

Veel bolgewassen hebben in de normale teelt een koudeperiode nodig om uit de rust te komen. Men moet er rekening mee houden dat wanneer in vitro bolletjes worden geproduceerd een koudebehandeling noodzakelijk kan zijn om de bolletjes na overdracht in grond verder te laten groeien. De koudebehandeling wordt in de kweekbuis gegeven, maar ook daarna. Voor gladiool noemt Hussey (1977) 2 tot 3°C gedurende 4 weken. Het ligt voor de hand bij elk bolgewas te kijken naar de koudebehandeling, die normaliter in vivo plaatsvindt. Een koudebehandeling is ook nodig bij via weefselkweek geproduceerde bolletjes om ze in grond te laten doorgroeien.

4. Groeistoffen in de bodem

Het kan van belang zijn in het laatste in vitro stadium de in vivo fase voor te bereiden. Bij asperge vonden Hasegawa et al. (1973), dat het nodig was om in de laatste fase vlak voor het overzetten in grond de NAA weg te laten In het algemeen zijn auxinen gunstig voor wortelaanleg, maar juist nadelig voor worteluitgroei. Het kan daarom gunstig zijn in de allerlaatste fase auxinen weg te laten.

B. Het overzetten

Het is niet duidelijk hoe groot het verschil is tussen de wortelsystemen van weefselkweekplanten en van gewone planten. Vaak wordt vermeld dat de in vitro gevormde wortels na overdracht in grond afsterven en de plant opnieuw begint met vorming van wortels. Zeker is dat de omstandigheden in agar sterk verschillen van die in grond. Dit blijkt uit het feit dat men maar zelden wortelharen in de agar ziet ontstaan. Vorming hiervan komt meer voor indien de wortels boven de agar groeien. Voor Pelargonium voegden Abo el Nil en Hildebrandt (1971) zelfs een aparte fase op filtreerpapierbruggetjes in om wortelharen te laten ontstaan en zodoende de overgang naar de grond te

bevorderen. In elk geval overleven plantjes met wortels de overgang beter dan zonder wortels.

Bij Nephrolepis beklemtoont Leffring (1982) het belang van de wijze waarop de plantjes gesplitst worden. Indien er te veel en te grote snijwonden gemaakt worden bij het splitsen, heeft dit afsterving in de verspeenbak tot gevolg.

De aanwezigheid van callus op de plantjes is vaak ongewenst. Kahn (1976) ondervond geen moeite met het overzetten van aspergeplantjes in grond indien deze vrij waren van callus. Plantjes met callus overleefden het overzetten in grond in het algemeen niet. Ook Kunisaki (1975) had bij Cordyline grote moeite met de overdracht in grond van plantjes, die callus aan de basis hadden.

Slechte vaatverbindingen tussen wortel en stengel kunnen grote problemen geven bij de overdracht in grond. Slechte vaatverbinding was een van de oorzaken van problemen bij bloemkool (Grout en Aston 1977). Drie weken later waren er evenwel nieuwe vaatverbindingen ontstaan, die beter functioneerden.

Reuther (1975) probeerde bij Pelargonium bij het overplanten wortelbeschadiging te voorkomen door de ongewortelde scheutjes in vitro op een steenwolcylinder te plaatsen, die met voedingsoplossing doordrenkt werd. Na zes weken was de cylinder volledig doorgeworteld. Omdat deze methode tamelijk arbeidsintensief is, heeft dit nog geen grote praktische toepassing gevonden.

Veel onderzoekers spoelen de agar af voordat de plantjes in de grond gezet worden. Ook laat men wel de plantjes enige tijd in wat drijven om ongewenste stoffen af te spoelen. Opmerkelijk genoeg zijn er weinig feitelijke gegevens over nut of schade van de agar. Koevary et al. (1978) hebben een afwijkende opvatting: ze vonden dat bij sla de schok van de overdracht in grond juist minder werd, indien het plantje samen met het intacte agarmedium in gesteriliseerde vermiculiet geplaatst werd.

C. Acclimatisering

In vitro planten zijn in het algemeen slecht aangepast aan het klimaat buiten de kweekbuis. Ze moeten geleidelijk aan de nieuwe omstandigheden worden aangepast. Enkele factoren spelen een rol.

1. Vocht

Na het overzetten wordt eerst een hoge luchtvochtigheid aangehouden. Hiervoor kan een vernevelaar worden gebruikt (mist), maar de verspeenbakjes kunnen ook met plastic worden afgedekt of in geval van kleine aantallen afzonderlijk met plastic bekers worden bedekt. Bij Yucca daarentegen raden Pierik en Steegmans (1983) aan om de bewortelde plantjes juist bij lage luchtvochtigheid te zetten om uitval te voorkomen. Met het afharden kan vaak al 2 tot 3 dagen na het overplanten begonnen worden. Bij begonia halen we het plastic er meestal na een week volledig af. Indien de bakjes onder plastic staan hoeft in het begin helemaal niet te worden gegoten. In de loop van het afharden kan dan weer gegoten worden.

2. Licht

Het verspeende materiaal moet tegen direkt zonlicht worden beschermd, maar een zwaar scherm zal eerder kwaad dan goed doen. Bij Begonia x hiemalis vindt Moncousin (1979) een lichtintensiteit van 10.000 lux in dit stadium gunstig. Onze ervaring is dat in de wintermaanden veel planten in dit stadium gunstig reageren op bijbelichting met TL lampen.

3. Temperatuur

De juiste temperatuur zal per gewas sterk verschillen. Het is van veel belang om extreem hoge temperaturen te vermijden.

4. Grondsoort

Veel grondsoorten worden in de literatuur vermeld. Het zijn dezelfde grondsoorten die ook bij het stekken worden gebruikt; zand, bladgrond, veen, sphagnum, leem en mengsels hiervan in allerlei verhoudingen. Er worden ook kunstmatige substraten zoals vermiculiet en perlite en mengsels hiervan met natuurlijke substraten gebruikt. De minerale samenstelling kan het beste aan de arme kant zijn; gaan de plantjes groeien dan kan minerale voeding worden gegeven. Bij onderzoek van een nieuw gewas kan men het beste eerst die substraten proberen, die voor het betreffende gewas bij de conventionele vermeerdering het best voldoen.

5. Ontsmetting

Het substraat wordt niet altijd ontsmet. Indien niet ontsmette handelspotgrond wordt gebruikt kunnen hierin pathogene schimmels zoals Pythium

voorkomen, welke uitval kunnen veroorzaken. Mullin en Schlegel (1978) gebruikten chloorpicrine als ontsmettingsmiddel; dit heeft echter een beperkte werking en een wachttijd. Veelal wordt stomen toegepast. De werking is algemener, maar stomen geeft vooral bij grondsoorten met veel organisch materiaal structuurbederf, terwijl er na enige tijd stoomschimmels optreden; men zal het daarom vaak combineren met toepassing van een fungicide. Roest et al. (1981) voegden bij het overzetten van Begonia x hiemalis 4 gr. thiram toe aan een bakje grond van 2 liter. In eigen onderzoek met dit gewas worden de plantjes na overzetten in gestoomde grond geneveld met 1,5 gr/l TMTD. Dit is effectief tegen Botrytis en stoomschimmel. Ook andere fungiciden worden gebruikt ter bestrijding van wegvalschimmels, zoals benlate en difolaten.

Een aantrekkelijk alternatief is bestraling van de grond met gammastralen; Broertjes (1984) paste dit toe bij chrysant. De nadelen van het stomen, n.l. structuurbederf en stoomschimmels, blijven achterwege. Er blijft ook geen residu achter en de grond is onmiddellijk klaar voor gebruik. De grond moet wel naar de stalingsbron worden vervoerd. In Nederland liggen er twee stralingsbronnen in het centrum van het land, in Wageningen en in Ede; bij de bestralingskosten moeten dan ook nog transportkosten worden geteld.

6. Afmetingen van het plantje

Er bestaan vaak een optimale afmeting bij het overzetten in de grond; de afmeting kan een beslissende factor zijn. Bij Saintpaulia hadden Vazques et al. (1977) geen problemen met overzetten indien de plantjes 3 cm hoog waren, maar wel wanneer de hoogte slechts 1,5 cm bedroeg. Bij Begonia x hiemalis vonden wij een optimale afmeting die bij ongeveer 2 cm ligt. Grotere plantjes gaven problemen door het afbreken van de bladeren en kleinere plantjes stierven af. Het te vlug in de grond plaatsen van te kleine plantjes is nadelig.

Wat de wortels betreft kan men beter plantjes met weinig jonge wortels uitplanten dan plantjes met veel lange en oude wortels.

D. De overgangsfase

Vaak wordt niet direkt in grond verspeend maar voegt men een overgangsfase in. We beschrijven er twee van.

1. Overgangsfase met kunstmatig substraat en voedingsoplossing

Indien de overgang direkt van de buis in de grond te groot gevonden wordt, kan een tussenfase worden ingevoegd, waarbij het bewortelde materiaal in een kunstmatig substraat geplaatst en bevochtigd wordt met een voedingsoplossing.

Zo zetten Novak en Juvova (1983) hun bewortelde druivenplantjes eerst in flessen met perlite, dat verzadigd was met Hoagland's oplossing. Tabaksplantjes werden door Kochbar et al. (1971) eerst in vermiculiet geplaatst en voorzien van Hoagland's oplossing alvorens ze in grond werden overgebracht. Deze tussenfase zal wegens het extra werk slechts worden toegepast indien het echt noodzakelijk is.

2. Overgangsfase in natuurlijk substraat in de klimaatkamer

Veel onderzoekers zetten hun gewortelde plantjes over in een natuurlijk substraat, dekken dit af met plastic en brengen dit geheel in de klimaatkamer onder dezelfde omstandigheden, waarbij de laatste in vitro fase plaatsvond. Dit geeft een geleidelijke gewenning aan de nieuwe omstandigheden. Zo plaatsten Hendre et al. (1975) hun opgepotte suikerrietplantjes in de klimaatkamers; Snir (1983) deed dit met kers, Roest et al. (1981) met begonia en Coumans Gilles et al. (1981) met biet. Er zouden hiervan nog veel voorbeelden genoemd kunnen worden. Het is een zeer aantrekkelijke methode, indien er voldoende klimaatruimte aanwezig is om het verspeende materiaal in een aparte ruimte te plaatsen. Heeft men geen aparte ruimte en plaatst men bakken met grond in dezelfde klimaatkamer waar ook de in vitro cultures staan, dan zal uitgebreide infectie van deze cultures niet denkbeeldig zijn. In dit geval is het dan vaak beter de cultures toch maar in de kas te plaatsen.

E. Overdracht in grond met beworteling in vivo

Tot nu toe zijn we uitgegaan van bewortelde scheutjes en hebben we enkele factoren behandeld die voor het slagen van deze overdracht van belang zijn. Een andere benadering is om na te gaan of de beworteling in vitro overgeslagen kan worden en in vivo uit ongewortelde scheutjes kan plaatsvinden.

Dit onderwerp wordt door Debergh en Maene (1981) nader uitgewerkt en we ontlenen hieraan enkele gegevens. Beworteling in vitro is zeer arbeidsintensief omdat de scheutjes afzonderlijk worden gehanteerd. Een belangrijk deel van de kosten van de in vitro cultuur ligt juist in deze fase.

Verder vertonen veel in vitro plantjes groeiremming na overzetten in grond, waar vaak een nieuw wortelstelsel moet worden gevormd. Ten derde zijn de omstandigheden in de buis constant, terwijl auxinen vaak alleen nodig zijn voor wortelaanleg, maar nadelig voor wortelverlenging. Ook kunnen door overzetten de wortels beschadigd worden en de wonden daarvan een ingangspoort vormen voor pathogenen. Debergh en Maene stellen de volgende drie methoden voor:

1. Direkt overzetten in grond indien er luchtwortels aanwezig zijn, zoals bij sommige Araceae of andere wortels, zoals bij Cryptanthus spp.
2. Voorbehandeling van scheutjes in een waterige oplossing van auxine. De auteurs hebben ervaring met Begonia tuberhybrida, waarvan een aantal ongewortelde scheutjes in petrischalen wordt gelegd met een film van 2 mm dikte van een waterige oplossing van 2 mg/l IBA. Na 10 dagen worden deze scheutjes in grond verspeend. Het succes was 100%. In eigen onderzoek met Begonia x hiemalis was het resultaat minder en zijn we toch weer op het klassieke systeem teruggekomen.
3. Scheutjes in een kunstmatig substraat uitplanten, dat verzadigd is met een auxineoplossing. Steenwol bleek het gunstigste te zijn. Succes werd geboekt met Cordyline, Dracaena, Dieffenbachia, Ficus, Spathiphyllum en Manihot.

Omdat deze drie methoden niet meer steriel worden uitgevoerd zijn ze ook goedkoper. Wel zullen de gemakkelijker bewortelbare plantesoorten voor deze methoden het eerst in aanmerking komen. Bij Pelargonium b.v. is in vivo beworteling van weefselkweekscheutjes nooit gelukt. Bij de direkte in vivo beworteling zijn de eerder genoemde factoren, die een rol spelen bij het overzetten in grond van bewortelde plantjes, extra van belang.

LITERATUUR

Abo el Nil, M.M. and A.C. Hildebrandt, 1971. Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus. Plant Dis. Reptr. **55:** 1017-1020.

Broertjes, C. and C.A.M. Lock, 1984. The use of irradiated soil in establishing in vitro adventitious plantlets of Chrysanthemum morifolium Ram. cv. parliament. Acta Bot. Neerl. **33:** 375.

Coumans-Gilles, M.F., Kevers, C., Coumans, M., Ceulemans, E. and T. Gaspar, 1981. Vegetative multiplication of sugarbeet through in vitro culture of inflorescence pieces. Plant Cell Tissue Organ Culture **1:** 93-101.

Debergh, P. and L.J. Maene, 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae **14:** 335-345.

Debergh, P. and J. de Wael, 1977. Mass propagation of Ficus lyrata. Acta Horticulturae **78:** 361-364.

Fonnesbech, M. and A. Fonnesbech, 1979. In vitro propagation of Spathiphyllum. Scientia Horticulturae **10:** 21-25.

Grout, B.W.W. and M.J. Aston, 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort. Res. **17:** 1-7.

Hasegawa, P.M., Murashige, T. and F.H. Takatori, 1973. Propagation of Asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants and cyto-hystological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **98:** 143-148.

Hendre, R.R., Mascarenhas, A.F., Nadgir, A.L., Pathak, M. and V. Jagannathan, 1975. Growth of mosaic virus-free sugarcane plants from apical meristems. Indian Phytopathology **28:** 175-178.

Hussey, G., 1977. In vitro propagation of Gladiolus by precocious axillary shoot formation. Scientia Horticulturae **6:** 287-296.

Kahn, R.P., 1976. Aseptic plantlet culture to improve the phytosanitary aspects of plant introduction for Asparagus. Plant Dis. Reptr. **60:** 459-461.

Kochbar, T., Sabharwal, P. and J. Engelberg, 1971. Production of homozygous diploid plants by tissue culture technique. J. Heredity **62:** 59-61.

Koevary, K., Rappaport, L. and L.L. Morris, 1978. Tissue culture propagation of head lettuce. HortScience **13:** 39-41.

Kunisaki, J.T., 1975. In vitro propagation of Cordyline terminalis (L.) Kunth. HortScience **10:** 601-602.

Leffring, L., 1982. Moeilijkheden en mogelijkheden van Nephrolepis plantmateriaal vermeerderd via weefselkweek. Voordracht Bladplantenmiddag 10 febr., Aalsmeer.

Moncousin, C., 1979. Multiplication végétative accélérée et épuration bactëriologique de Begonia x hiemalis Fotsch. Revue Hort. Suisse **52:** 361-364.

Mullin, R.H. and D.E. Schlegel, 1978. Meristem-tip culture of dahlia infected with dahlia mosaic virus. Plant Dis. Reptr. **62:** 565-567.

Novak, F.J. and Z. Juvova, 1983. Clonal propagation of grapevine through in vitro axillary bud culture. Scientia Horticulturae **18:** 231-240.

Pierik, R.L.M. en P.A. Sprenkels, 1984. Eucharis veilig en snel in kweekbuizen te vermeerderen. Vakblad v.d. Bloemisterij **3:** 32.

Pierik, R.L.M. en H.H.M. Steegmans, 1983. Vegetatieve vermeerdering bonte Yucca in kweekbuizen. Vakblad v.d. Bloemisterij **1:** 32-33.

Reuther, G., 1975. Untersuchungen zur Vermehrung von Pelargonienvarietäten durch Gewebekultur. Gartenbauwissenschaft **4:** 181-187.

Roest, S., Berkel, M.A.E. van, Bokelmann, G.S. and C. Broertjes, 1981. The use of an in vitro adventitious bud technique for mutation breeding of Begonia x hiemalis. Euphytica **30:** 381-388.

Rost, T.L. and M.A.W. Hinchee, 1980. Preliminary report of the production of callus, organogenesis and regeneration of jojoba (Simmondsia chinensis Link, Schneid.) in tissue culture. J. Hort. Scie. **55:** 299-305.

Rover, A., Hedtrich, C.M. und W. Feucht, 1979. In vitro-kulturen von Himbeer-Triebspitzen unter dem Aspekt der Virusfreiheit. Erwerbsobstbau **2:** 28-30.

Snir, I., 1983. A micropropagation system for sour cherry. Scientia Horticulturae **19:** 85-90.

Vazquez, A.M., Davey, M.R. and K.C. Short, 1977. Organogenesis in cultures of Saintpaulia ionantha. Acta Horticulturae **78:** 249-258.

AANHANGSEL III

VERKLARENDE WOORDENLIJST

AANHANGSEL III

VERKLARENDE WOORDENLIJST

N.B.: De sterretjes in de tekst (*) verwijzen naar deze lijst.

Adventief. Heeft betrekking op een orgaan, dat op een ongewone plaats gevormd wordt. Adventieve wortels kunnen door de stengel, het blad en de bloeiwijze worden gevormd. Adventieve scheuten kunnen door de stengelinternodiën, het blad ('epifylle', scheuten), de wortel ('epirhize' scheuten), de bloeiwijze en de bloem worden gevormd.
De stengel- en wortelmeristemen, die in de weefselkweek op een callus worden gevormd (of op de weefsels van het oorspronkelijke explantaat) mogen beschouwd worden als een bijzonder geval van adventieve meristemen.
De adventieve meristemen ontstaan door een plaatselijke dedifferentiatie van de cellen. Ze zijn het tegenovergestelde van axillaire meristemen.

Androgenese (zie ook embryogenese). Vorming van een haploïd embryo (in de weefselkweek) uit pollenkorrels. Na spontane of kunstmatige verdubbeling van het chromosomenaantal kan het embryo voor alle genen diploid en homozygoot worden.
De androgenese is geen bijzonder geval van vegetatieve vermeerdering, omdat immers het genotype van de via androgenese verkregen planten niet identiek en ook niet homoloog is aan dat van de moederplant.

Apex of topje. Uiterste deel van een orgaan: wortel, stengel of blad. De term 'apex' wordt door histologen soms in de beperkte betekenis gebruikt van het uiterste apicale deel van het meristeem. De stengelapex is dan kleiner dan het meristeem zelf. In dit boek, evenals in het gangbare spraakgebruik over de vegetatieve vermeerdering, duidt het woord stengeltop ('apex caulinaire') daarentegen het geheel aan, dat gevormd wordt door het meristeem en de onderliggende weefsels zonder rekening te houden met de afmetingen ervan. Deze term wordt gebezigd om verkeerd gebruik van de uitdrukking 'meristeemcultuur' te vermijden; ze wordt soms toegepast op explantaten, die veel groter zijn dan het echte meristeem.

Apicaal. Hetgeen zich aan de uiterste punt bevindt. Voorbeeld: apicaal meristeem is synoniem met terminaal meristeem.

Apogamie (zie ook parasexualiteit). Bij de bedektzadigen: ontwikkeling van een embryo uit cellen van de embryozak anders dan de eicel. De cellen kunnen haploïd (synergiden of antipoden) of diploïd zijn. Dit is een bijzonder geval van apomixie.

Apomixie of apomixis (zie ook parasexualiteit). Vorming van een embryo zonder bevruchting uit andere cellen dan de eicel.

Autotomie. Spontane afsplitsing of losraken van een orgaan of een plantedeel.

Bollen. Meestal ondergrondse reserveorganen, die bestaan uit een korte opgezwollen stengel (bolschijf), welke eindigt in een knop die opgebouwd is uit vlezige of schubbige bladen.
Er bestaat een verscheidenheid aan bollen en de variatie heeft betrekking op anatomische en biologische kenmerken.
Gerokte bollen hebben vlezige bladen, die elkaar volledig omhullen en ingeplant staan op een betrekkelijk kleine bolschijf (voorbeeld: ui).
Geschubde bollen hebben smallere bladen (schubben), die ingeplant staan op een bepaald gedeelte van een grote bolschijf (voorbeeld: hyacinth, lelie).
Bollen komen voor bij tweejarige (ui) of overblijvende planten (tulp). De bol kan volledig vervangen worden door een okselknop, die een vervangingsbol vormt (tulp) of door meerdere kleine okselbolletjes of klisters (knoflook).

Bulbillen, broedbollen of toevallige bollen. Kleine axillaire bollen, die kunnen ontstaan in de oksel van vegetatieve bladeren of in plaats van bloemen (bv. bij verschillende Allium-soorten).

Callogenese. Vorming van callus.

Callus. Wondcallus is een in het algemeen homogeen wondweefsel, dat gevormd wordt door actief delende cellen. In de weefselkweek noemt men callus dat weefsel, welk gevormd wordt door het oorspronkelijke explantaat of als

gevolg van overentingen. De vorming is zowel het gevolg van het opheffen van de remming, die volgt op het afsplitsen van het explantaat als ook van de stimulerende werking van voedingsstoffen (mineralen, suikers) en groeistoffen (auxinen, cytokininen) van de voedingsbodem. Het callus kan voorkomen bij wonden of zich uitbreiden tot onbeschadigde delen van de plant. Callus kan door voortdurend overzetten onbeperkt doorgroeien. Het kan homogeen of heterogeen zijn. De heterogeniteit kan al in het begin aanwezig zijn, omdat het gevormd wordt uit heterogeen weefsel van het explantaat, maar de heterogeniteit kan ook secundair zijn. Het kan vaatbundelelementen of meristematische primordia vormen. Het callus kan actief of langzaam groeien, homogeen of met knobbels, meer of minder los of compact, kleurloos of soms met bladgroen of anthocyaan.

Cambium. In engere zin: zone, die bast en hout voortbrengt. In ruimere zin en in oneigenlijke betekenis wordt de term cambium wel eens gebruikt om er alle secundaire meristemen mee aan te duiden (cambium en kurkcambium).

Caulogenese: zie stengelvorming of scheutvorming.

Dedifferentiatie van de cel (zie ook differentiatie). Voortschrijdende terugkeer van gedifferentieerde cellen naar de meristematische toestand.
De gedifferentieerde cellen hebben net als de meristematische cellen in min of meerdere mate de cytologische kenmerken van embryonale cellen: kleine vacuole, hoge verhouding van kern tot cytoplasma, weinig gedifferentieerde plastiden of proplastiden. Ze herkrijgen het vermogen tot deling (mitotische activiteit). Ze kunnen eveneens de fundamentele 'totipotentie' van de cel tot uitdrukking gaan brengen door, als gevolg van achtereenvolgende delingen, embryoïden of promeristemen te vormen, die zich ontwikkelen tot primaire wortel- of stengelmeristemen. De dedifferentiatie doorloopt een reeks stadia, die bestudeerd zijn door Buvat (1945).
Kan in situ overal op de plant worden waargenomen, bv. tijdens de vorming van adventieve meristemen. Wordt vaak bevorderd door de omstandigheden van de weefselkweek.

Differentiatie van de cel (zie ook dedifferentiatie). Voortschrijdend verlies van cytologische en fysiologische kenmerken van embryonale cellen en verwerving van kenmerken van volwassen cellen, eventueel gepaard gaande met

specialisatie. De volwassen plantecel is in het algemeen gekenmerkt door zijn grote centrale vacuole en de lage verhouding van kern tot cytoplasma.
De differentiatie uit zich tegelijkertijd in het verlies van de vele mogelijkheden door embryonale cellen als ook in het optreden van gespecialiseerde kenmerken.
De differentiatie verloopt op verschillende niveaus: op moleculair niveau door het verwerven van het vermogen om bepaalde synthesen uit te voeren (biochemische differentiatie), op celniveau door de differentiatie van organellen (differentiatie van plastiden), op weefselniveau door de opbouw van gespecialiseerde weefsels (bedekkingsweefsels, transportweefsels en reserveweefsels).

Embryogenese. Geheel van de stadia, die tot de vorming van een embryo leiden. Het onderzoek in de weefselkweek heeft geleid tot een uitbreiding van het begrip embryogenese.
Zygotische of normale embryogenese heeft als uitgangspunt de zygote (met 2n chromosomen), die het resultaat is van de versmelting van de mannelijke en vrouwelijke gameten (met n chromosomen), welke op hun beurt ontstaan zijn na de meiose.
Polyembryonie, die spontaan bij bepaalde Citrus-soorten voorkomt, is een voorbeeld van spontane somatische embryogenese.
Somatische embryogenese, die experimenteel in de weefselkweek voorkomt voltrekt zich uit gewone diploïde, somatische cellen. Ontstaan door mitosen.
Androgenese s.str. is de vorming van haploïde embryo's uit stuifmeelkorrels.
Gynogenese s.str. is de vorming van embryo's uit haploïde cellen van de embryozak.

Embryoïde. Structuur, die analoog is aan een zygotisch embryo, dat na bevruchting is ontstaan.
Het embryoïde kan voortkomen uit diploïde cellen ('somatische embryo') of haploïde pollencellen ('androgenetisch embryo') of haploïde cellen van de embryozak van het ovulum ('gynogenetisch embryo'). Het wordt altijd gekenmerkt door een bipolaire structuur, terwijl de twee meristematische polen respectievelijk een scheut en een wortel voortbrengen. De term embryoïde (in het Engels 'embryoid') is algemener dan 'somatisch embryo' en heeft de voorkeur gekregen boven de Franse en Engelse synoniemen 'pseudo-embryon' en 'embryo-like structure'.

Epiphylle knop. Knop voortkomend uit een blad, bv. ter hoogte van een vertakking van de nerven, of bij insnijding van de bladrand.

Explantaat. Afgesneden deel van een organisme (top, orgaan, deel van een orgaan of weefsel), dat in weefselkweek wordt gebracht.
De term implantaat, welke in dezelfde betekenis gebruikt wordt, is onjuist als het explantaat van de moederplant afgesplitst wordt en de kweekbodem, waarop men het overzet, inert is (zie implantaat).

Fibonacci. Reeks van Fibonacci. Deze bestaat uit een reeks getallen zoals 1, 2, 3, 5, 8 en 13, waarvan elk de som is van de twee voorafgaande. De aantallen parastichen (of bladspiralen), die men in een verspreide bladstand aantreft, zijn altijd 2 achtereenvolgende cijfers uit de reeks van Fibonacci, bv.: 3 in de ene richting en 5 in de andere.
Hoek van Fibonacci. Deze bedraagt bij benadering $137^{o}30'28''$ (ongeveer $137,5^{o}$). In het geometrische model van Thornley (1975), die de top gelijkstelt met een schijf, waarbinnen een interactie plaatsvindt van remstoffen, die vanuit reeds gevormde primordia diffunderen, valt de theoretisch berekende divergentiehoek samen met de hoek van Fibonacci.

Histogeen. Weefselvormend. Het cambium, dat xyleem (hout) en floëem (bast) vormt, is histogeen.

Histogenese. Vorming van weefsels.

Implantaat. Afgesneden deel van een organismen dat op een ander organisme of op een weefsel geënt wordt.
Terwille van de duidelijkheid hebben we deze term gereserveerd voor het beperkte begrip van inplanting op een levende onderstam, en vermeden deze term te gebruiken in de zin van een overplanting op een inerte voedingsbodem; we hebben daarvoor de term explantaat (zie aldaar) gebruikt.

In vitro. In zeer algemene zin wordt de uitdrukking in vitro toegepast op het onder steriele omstandigheden kweken van organismen, organen, weefsels, cellen in glas in het laboratorium, maar ook op het maken van celextracten (organellen, enzympreparaten).
De kweek in vitro staat tegenover de proef of de waarneming in situ

Klisters. Bolletjes, die ontstaan in de oksels van bladeren of schubben binnen in een bol (sjalot, knoflook). Klisters kunnen ontstaan in de oksels van de buitenste bladeren en dan in een krans staan (vogelmelk). Ze kunnen zich ook binnen in de bol dicht bij de top van de bol ontwikkelen (narcis).

Kloon. Geheel van genetisch identieke individuen, dat voortkomt uit de vegetatieve vermeerdering van één moederplant of van meerdere individuen van een reeds bestaande kloon. De vorming van een kloon kan het gevolg zijn van spontane vegetatieve vermeerdering, van kunstmatige vermeerdering volgens de traditionele tuinbouwkundige methoden (delen, scheuren, marcotteren, stekken, enten) of volgens de methoden van vermeerdering in vitro.

Knol (Cormus). Knollen bestaan uit een opgezwollen stengel, die omgeven is door de vliezige bases van dunne bladen (gladiool, crocus, herfsttijloos). Knollen worden vaak genoemd als een bijzonder geval van bollen, maar men zou ze ook als een bijzonder geval van rhizomen kunnen beschouwen.

Meristeem. Groep van delende cellen, die weefsels of organen afzetten. De primaire meristemen (van de stengel of de wortel) zijn orgaanvormend. De secundaire meristemen (cambium, kurkcambium) en de intercalaire meristemen (van de stengel bij gramineeën, bij de bloemstengel van waterlelie) zijn slechts histogeen.

Meristemoïde. De term 'meristemoïde' is voor het eerst gebruikt door Torrey (1966) en door meerdere auteurs overgenomen om de meristematische primordia aan te geven, die nog geen structuur en misschien nog geen bestemming hebben. We hebben de term 'meristemoïde' gebruikt in de zin van een structuur, die vergelijkbaar is met een meristeem, maar dan vormeloos en vaak abnormaal. Zo neemt men bv. op bloembladen van Begonia x elatior of op de bloembodem van Kalanchoë blossfeldiana op een voedingsbodem met 2,4-D meristemoïden waar, die zich tot stengel- of wortelmeristemen ontwikkelen, maar die zich ook vroegtijdig tot groepen kunnen vermeerderen of zelfs terugkeren tot callus door met elkaar te versmelten.
Deze structuren kunnen eveneens abnormaal functioneren door een blad, een bractee of meerdere bloembladen te vormen zonder voorafgaande vorming van een gestructureerd stengelmeristeem (waarnemingen van de auteur).

Neotenie. Versnelde bloei (in de dierbiologie: ontstaan van voortplantingsorganen tijdens het larvenstadium).

Nieuwvorming. Vorming van nieuwe structuren: weefsels, meristemen en embryoïden. Nieuwvorming is het eindpunt van dedifferentiatie.

Organogeen. Organen vormend of in staat deze te vormen.

Organogenese. Vorming van organen. De vegetatieve organogenese vindt vooral plaats bij meristemen.

Organogenetisch. Heeft betrekking op de orgaanvorming.

Parasexualiteit. Omvat verscheidene afwijkingen en verschijnselen van degradatie van de sexualiteit. Ze vormen de overgang tussen de geslachtelijke voortplanting en de vegetatieve vermeerdering. Zie: apogamie, apomixie, parthenogenese en pseudomixie.

Parastichen. Bladspiralen (volgens de terminologie van Church 1920).

Parthenogenese. Letterlijk, de ontwikkeling van een embryo uit de onbevruchte eicel. Zie: parasexualiteit.

Plastochroon. Het tijdsinterval, dat ligt tussen het verschijnen van twee opeenvolgende primordia. Onder bepaalde omstandigheden is het plastochroon betrekkelijk constant. Bij de biet bv. wordt het door ontbladering op grote schaal niet veranderd, hoewel dit wel een sterke invloed uitoefent op de afmeting van de nieuwe bladen (waarnemingen van de auteur).

Polyembryonie. Zie: embryogenese.

Promeristeem. Jong stadium van een stengel- of wortelmeristeem dat nog niet gestructureerd is en uiteindelijk nog geen bestemming heeft.

Propagulum. Wordt soms op oneigenlijke wijze gebruikt om er in het algemeen de structuren in dienst van de vegetatieve vermeerdering mee aan te duiden. In strikte zin, organen voor de vegetatieve vermeerdering van mossen, die

ontstaan door het losraken van celdraden en zo voor de vermeerdering zorgen.

Protoplast. Geïsoleerde cel zonder pectine- en cellulosebevattende wand.

Pseudomixie. Fusie van haploïde prothalliumcellen bij bepaalde varens. Zie: parasexualiteit.

Rhizogenese. Vorming van wortels.

Rhizoom. Ondergrondse overblijvende stengel, die adventieve wortels en opgaande luchtstengels vormt.
Er bestaat een grote verscheidenheid aan rhizomen. Ze zijn dikwijls opgezwollen en voorzien van reservestoffen (Salomonszegel) maar niet altijd (Hondstand). Ze kunnen plagiotroop zijn met horizontale groei (Lelietje-der-dalen) of orthotroop met vertikale groei (Sleutelbloem).
Rhizomen lijken soms op wortels. Ze kunnen aan de grondoppervlakte groeien (Iris).

Scheutvorming of stengelvorming. De term caulogenese (stengelvorm) betekent etymologisch vorming van een stengel. Deze term wordt algemeen gebruikt om de vorming van scheuten aan de basis van bebladerde stengels aan te geven. In geval van orgaanvorming in vitro wordt de term vaak gebruikt als synoniem van scheutvorming.

Sobolen. Luchtbulbillen, die gevormd worden op de plaats van de ovariën of de eicellen zonder tussenkomst van geslachtelijke processen. Voorbeeld: Crocus soboliferus.

Stengelknol ('Tubercule'). Opgezwollen (in het algemeen ondergronds) reserve-orgaan van de stengel, het rhizoom of het hypocotyl.
Voorbeeld: de knollen van de aardpeer ontstaan aan het uiteinde van ondergrondse stolonen. De knol van de knolraap is een opzwelling van de bovengrondse stengel.
Er bestaan ook wortelknollen. De dahliaknollen ontstaan uit bundelvormige wortels. In de knol van Orchis zijn meerdere wortels met elkaar vergroeid. De zeer ingewikkelde knol van knolselderij omvat tegelijkertijd het hypocotyl, een deel van de hoofdwortel en het epicotyl, dat overblijfsels van

bladlittekens draagt. Bij een biet cv Egyptische Platronde wordt de knol gevormd door een hypertrofie van het hypocotyl. Bij de suikerbiet, die diep in de grond zit, bestaat de knol hoofdzakelijk uit de wortel.
De knollen zijn reserve-organen van tweejarige of overblijvende planten. Ze spelen vaak een rol in de vegetatieve vermeerdering (stengelknollen), maar dit hoeft niet altijd zo te zijn.

Stengeltop. Zie: apex.

Stolonen. Veranderde plagiotrope stengels met lange internodiën en gereduceerde bladen. Stolonen zijn in het algemeen bovengronds en kruipend, geschikt voor marcotteren door beworteling van de knoppen. Voorbeeld: uitlopers van aardbei. Ze kunnen ondergronds zijn (aardappel, aardpeer), maar men geeft in deze gevallen niettemin de voorkeur aan de naam stolonen boven rhizomen wegens hun bijzondere morfologie.

Totipotentie van de cel. Vermogen van cellen om het geheel van mogelijkheden van het genoom tot uitdrukking te brengen. Dit vermogen uit zich bij somatische embryogenese.

Uitloper. Kan in beperkte zin omschreven worden als een stengel, die ontstaat uit adventieve knoppen aan een wortel of een pol. Ze worden vaak door houtige gewassen gevormd (populier, framboos). In ruime zin (Chouard) zijn het ondergrondse stengels, die voor vermeerdering zorgen. De definitie van uitloper omvat dus gedeeltelijk die van rhizoom, maar bij uitlopers is dit begrip altijd nauw verbonden met de vegetatieve vermeerdering.

Variant. Individu met fenotypische of genotypische, al of niet erfelijke eigenschappen, die verschillen van die van andere individuen van de kloon, waartoe deze behoort. De term 'variatie' is opzettelijk uiterst algemeen en gaat voorbij aan de aard van de variatie in tegenstelling tot 'mutatie', die een structurele verandering van een gen aangeeft.
Variatie kan liggen aan afwijkingen in de structuur of het aantal (polyploïdie, aneuploïdie) van de chromosomen of aan onbekende oorzaken, die misschien in het cytoplasma of in de organellen liggen. In de weefselkweek blijkt de vorming van varianten bevorderd te worden door de callusfase en door de toevoeging van hoge concentraties groeistoffen, vooral van 2,4-D,

aan het voedingsmedium.

Variatie. Zeer algemene term, die elke genetische of epigenetische verandering van een al of niet bekende oorzaak aangeeft en geen mutatie is. Zie: variant.

Vegetatieve vermeerdering. Synoniem met ongeslachtelijke voortplanting. Leidt tot vorming van homogene klonen.
Gespecialiseerde organen voor de vegetatieve vermeerdering: zie: bollen, bulbillen, klisters, knol, rhizoom, sobolen, stolonen, stengel- en wortelknol, uitloper, winterknop.

Winterknop (Hibernaculum). Scheut of korte stengel, die zich los kan maken en bijwterplanten voor de verspreiding zorgt. Voorbeelden: Elodea, Potamogeton.

Wortelvorming. Zie: rhizogenese.

LITERATUURLIJST

LITERATUURLIJST

Adams A., 1972. - An improved medium for strawberry meristem culture. J. Hortic. Sci., **47**, 263-264.

Adams, A., 1975 - Elimination of viruses from the hop (Humulus lupulus) by heat therapy and meristem culture. J. Hortic. Sci., **50**, 151-160.

Aghion-Prat D., 1965. - Néoformation de fleurs in vitro chez Nicotiana tabacum L. Physiol. Vég. **3**, 229-303.

Allen T., 1974. - Production of virus free lilies. Acta Hortic. **36**, 235-239.

Alskieff J., 1977. - Sur le greffage in vitro d'apex sur des plantules décapitées du Pêcher (Prunus persica, Batsch). C.R. Acad. Sci., Sér. D, **284**, 2499-2502.

Alskieff J. & Villemur P., 1978. - Greffage in vitro d'apex sur des plantules décapitées de Pommier. C.R. Acad. Sci., Sér. D., 1115-1118.

Ammirato P., 1974. - The effects of abscissic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway. Bot. Gaz. **135**, 328-337.

Ammirato P., 1978. - Somatic cell embryogenesis in suspension cultures of the medicinal yam, Dioscorea floribunda. 4th Int. Congr. Pl. tiss. cell cult. Calgary, Abstr. 1708.

Anagnostakis S.L., 1974. - Haploïd plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal. Planta, **115**, 281-283.

Aneja S. & Atal C., 1969. - Plantlet formation in tissue cultures from lignotubers of Eucalyptus citriodora Hook. Curr. Sci., **38**, 69.

Ankler L., 1974. - Auxin synthesis inhibition by sugars notably by galactose. Acta Bot. Neerl., **23**, 705-714.

Asjes C., Bunt M., & Van Slogteren D., 1974. - The freeing of hyacinths from hyacinth mosaïc virus and of lilies from symptomless virus by means of meristem culture. Acta Hortic., **36**, 223-228.

Astié M., & Coquen C., 1972. - Obtention de plants sains de

Lilium candidum L. (inflorescences normales ou anormales) à partir de cultures de pièces florales isolées. Actes 97e congr. Soc. Sav. Nantes, Sciences, **4**, 187-204.

Atanasov A. & Kirindonov T., 1972. - Organogenesis of sugar beet cultures in vitro compared with other species. Genet. Sel., **5**, 399-407.

Bajaj P.S., Reinert J. & Heberle E., 1976. - Factors enhancing in vitro production of haploïd plants in anthers and isolated microspores. In: Gautheret ed. Travaux à la mémoire de G. Morel, Paris Masson, 47-58.

Bajaj Y., 1977. - Protoplast isolation, culture and somatic hybridization. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. (Ed. Reinert et Bajaj), Springer-Verlag, New York, 467-496.

Ball E., 1946. - Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of Tropaeolum majus L. and Lupinus albus L. Am. J. Bot., **33**, 301-318.

Ball E., 1960. - Cell divisions in living shoot apices. Phytomorphology, **10**, 377-396.

Ball E. & Joshi P., 1966. - Adventive embryos in a callus culture of Didiscus coerulea. Am. J. Bot., **53**, 612.

Ballade P., 1970. - Précisions nouvelles sur la caulogenèse apicale des racines axillaires de Cresson. Planta, **92**, 138-145.

Bancilhon L., 1969. - Etude expérimentale de la morphogenèse et plus spécialement de la floraison d'un groupe de Phyllanthus (Euphoribacées) à rameaux dimorphes. Ann. Sci. nat., Bot. Biol. Vég. 12e sér., **10**, 127-224.

Bancilhon F., 1974. - Premiers essais de multiplication végétative de culture in vitro chez Tulipa gesneriana L., variétéPaul Richter (Liliacées). C.R. Acad. Sci. Sér. D., **279**, 983-986.

Beauchesne G., 1974. - Obtention de clone de Pelargonium en culture in vitro à partir de méristèmes. Abstr. Proc. Int. Congr. Varsovie, **64**.

Beauchesne G., 1980. - Intérêt de la culture in vitro pour la multiplication végétative. C.R. Acad. Agr. Fr., **66**, 638-649.

Behrend J. & Mateles R., 1976. - Nitrogen metabolism in plant

cell suspension cultures. II. Role of orgaic acids during growth on ammonia. Plant Physiol., **58**, 510-512.

Belkengren R. & Miller P., 1962. - Culture of apical meristems of Fragaria vesca strawberry plants as a method of excluding latent A virus. Plant Dis. Rep., **46**, 119-121.

Ben Badis A., 1973. - Analyse des aptitudes emryogènes des divers types de cellules isolées de Daucus carota L. Bull. Soc. Bot. Fr., Mém. Colloque Morphologie, 223-234.

Berg L. & Bustamante M., 1974. - Heat treatment and meristem culture for the production of virs-free bananas. Phytopathology, **64**, 320-322.

Bernard N., 1909. - L'évolution dans la symbiose. Les Orchidées et leurs champignons commensaux. Ann. Sci. Bot., **9**, 1-196.

Bernier G., 1964. - Étude histophysiologique et histochimique de l'évolution du méristème apical de Sinapis alba L. cultivé en milieu conditionné et en diverses durées de jours favorables ou défavorables à la mise à fleurs. Mém. Acad. R. Belg. Cl. Sci., 4e, **16**, 1-149.

Bhojwani S., 1966. - Morphogenetic behaviour of mature endosperm of Croton bonplandianum Baill. in culture. Phytomorphology, **16**, 349-353.

Bigot C., 1965. - Mise en évidence d'une polarité de morphogenèse dans le bouturage de fragments foliaires isolés. Aspects divers de cette morphogenèse. Ann. Physiol. Vég. INRA, **7**, 295-333.

Bigot C., 1970. - Stimulation du bourgeonnement sur des réceptacles floraux isolés de Lilium x Enchantment. Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., **117**, 66-72.

Bigot C., 1972. - Contrôle multiple de l'expression de l'aptitude à la néoformation de bourgeons épphylles chez un clone de Begonia rex Putz. Bull. Soc. Bot. Fr. Mém., 173-190.

Bigot C., 1975. - Multiplication végétative de Gloxinia hybrida à partir d'organes cultivés in vitro. Ann. Amélior. Plant., **25**, 337-351.

Bigot C. & Chlyah A., 1970. - Stimulation précoce du bourgeonnement par la benzyladénine sur des explantats foliaires de Begonia rex Putz. Bull. Soc. Bot. Fr. Mém., **117**, 48-65.

Bigot C. & Nitsch J.P., 1968. - Effet du moment de l'application d'acide gibbérelliqu ou de 2,6-diaminopurien sur la néoformation des bourgeons chez Begonia rex Putz. Acad. Sci., **267**, 619-621.

Bilkey P. & Mac Cown B., 1979. - In vitro culture and propagation of Episcia sp. (flame violet). J. Am. Soc. Hortic. Sci., USA, **104**, 109-114.

Bonner J. & Devirian P., 1939. - Growth factor requirements of four species of isolated roots. Am. J. Bot., **26**, 661-665.

Bouillenne R., 1950. - La rhizogenèse. Année Biol., **26**, 597-628.

Bouillene R., 1964. - Aspects physiologiques de la formation des racines. Bull. Soc. R. Bot. Belg., **95**, 193-204.

Bourgin J.P., Muller J.F. & Morel G., 1973. - La multiplication végétative de l'Asperge (Asparagus officinalis L.). Actes 96e Congr. Soc. Sav., **4**, 107-112.

Bouriquet R. & Vasseur J., 1973. - Croissance et bourgeonnement des tissues de feuilles d'Endive en fonction de l'âge et du lieu de prélèvement des explantats. Bull. Soc. Bot. Fr., **120**, 27-32.

Boxus P., 1974. - The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. J. Hortic. Sci., **49**, 209-210.

Boxus P. & Quoirin M., 1974. - La culture des méristèmes apicaux de quelques espèces de Prunus. Bull. Soc. R. Bot. Belg., **107**, 91-101.

Brants D. & Vermeulen H., 1965. - Production of virus-free freesias by means of meristem culture. Neth. J. Plant Pathol., **71**, 25-27.

Broertjes C., Roest S. & Bokelmann G., 1976. - Mutation breeding of Chrysanthemum morifoium Ram. using in vivo and in vitro adventitions but techniques. Euphytica, **25**, 11-19.

Broome D. & Zimmerman R., 1978. - In vitro propagation of blackberry. Hortic. Sci., **13**, 151-153.

Brown D., Leung D., & Thorpe T., 1978. - Role of sucrose as an osmotic agent during shoot formation in tobacco callus. Congr. Calgary, abstr, 141.

Bui Dang Ha D., 1974. - Regeneration of complete plants of Asparagus from protoplast cultures. 3rd Intern. Congr. Plant Tissue

cull culture Leicester, Abstr., 261.

Burkholder P. & Nickell L., 1949. - Atypical growth of plants. I. Cultivation of virus tumors of Rumex on nutrient agar. Bot. Gaz., **110**, 426-437.

Butenko R., Atanasov A. & Urmantseva W., 1972. - Some features of the sugar beet tissue culture. Phytomorphology, **22**, 140-143.

Butenko, R., Grushvitskii R. & Slepyan L., 1968. - Organogenesis and somatic embryogenesis in a tissue callus of ginseng (Panax ginseng) and other Panax L. species. Bot. Zh., **53**, 906-911.

Button J., Kochba J. & Borman C., 1974. - Fine structures of and embryoid development from embryogenic ovular callus of shamonti orange (Citrus sinensis). J. Exp. Bot., **25**, 446-457.

Buvat R., 1944. - Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. I. Plantes entières et boutures. Ann. Sci. Nat., 11e sér. Bot. et Biol. Vég., **5**, 1-130.

Buvat R., 1945. - Recherches sur la différenciation des cellules végétales. II. Cultures de tissues et tumeurs. Ann. Sci. Nat., 11e sér. Bot. et Biol. Vég., **6**, 1-119.

Buvat R., 1952. - Structure, évolution et fonctionnement du méristème apical de quelques dicotylédones. Ann. Sci. Nat. Bot., 11e sér., **13**, 199-300.

Buvat R., 1955. - Le méristème apical de la tige. Année Biol., **31**, 596-656.

Cabanne F., 1980. - Etude de nouveaux dérivés hydroxycinnamiques au cours du développement de Nicotiana tabacum L. var. Xanthi. Thèse Dijon, 191 p.

Cabanne F., Martin-Tanguy J. & Martin C., 1977a. - Phénolamines associées à l'induction florale et à l'état reproducteur du Nicotiana tabacum var. Xanthi. Physiol. Vég., **15**, 429-443.

Cabanne F., Paynot M., Javelle F., Martin-Tanguy J. & Martin C., 1977b. - Activité phénylamine ammoniac lyase et état floral du Nicotiana tabacum var. Xanthi. Physiol. Vég., **15**, 445-451.

Camus G., 1945. - Action différenciatrice des bourgeons se développant sur des tissues vasculaires d'Endive, cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., **221**, 457-476.

Camus G., 1949. - Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèse. Rev. Cytol. Biol. Vég., **9**, 1-199.

Caramiello R., 1970. - Coltura in vitro di cellule differenziate di Triticum vulgare Vill. Giorn. Bot. Ital., **104**, 49-59.

Carlier A. & Van Hove C., 1964. - Influences of a naphtaleneacetic acid on growth, respiration and $^{14}CO_2$ production from glucose 1 ^{14}C and glucose 6 ^{14}C. Nature, **201**, 677-679.

Carré M., Martin-Tanguy J., Mussillon P. & Martin C., 1979. - La culture de mérestèmes et la multiplication végétative in vitro au service de la pépinièew. Publ. INRA, ANPPF, INVUFLEC, Bull. petits fruits, **14**, 8-65.

Carter U., Yamada Y. & Takahashi E., 1967. - Tissue culture of oats. Nature, **214**, 1029-1030.

Champagnat M., 1971. - Recherches sur la multiplication végétative de Neottia nidusavis. Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég., 12e sér., **12**, 209-247.

Champagnat M., 1977. - Culture de bourgeons et multiplication végetative des Orchidées. In: Travaux dédiés à la mémoire de G. Morel. Masson, Paris, 238-253.

Champagnat M., Ballade P. & Porte J., 1967. - Introduction à l'étude expérimentale de l'organogenèse axillaire du Cresson (Nasturtium officinale). Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., **110**, 122-138.

Champagnat M., More G., Chabut P. & Cognet A., 1966. - Recherches morphologiques et histologiques sur la multiplication végétative de quelques Orchidées du genre Cymbidium. Rev. Gen. Bot., **73**, 706-746.

Champagnat M. & Morel G., 1969. - Multiplication végétative des Cattleya à partir de bourgeons cultivés in vitro. Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., **116**, 111-132.

Champagnat M., Morel G. & Mounetou B., 1970. - La multiplication végétative des Cattleya à partir de jeunes feuilles cultivées aseptiquement in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Vég., **11**, 87-114.

Chaussat R. & Bigot C., 1980. - La multiplication végétative des plantes supérieures. Gauthier-Villars, Paris, 277 p.

Chen C. & Holden D., 1972. - Organogenesis in day lily callus. Proceed. S.D., Acad. Sci., **51**, 146-149.

Chen T. & Smith H., 1975. - Organogenesis from callus culture of Hordeum vulgare. Planta, **123**, 307-310.

Chlyah A. & Tran Thanh Van M., 1975. - Differential reactivity in epidermal cells of Begonia rex excised and gron in vitro. Physiol. Plant., **35**, 16-20.

Chouard P., 1934. - La multiplication végétative et le bourgeonnement chez les plantes vasculaires. Bull. Soc. Natl. Acclim., 17-132.

Chouard P & Aghion D., 1961. - Modalités de la formation de bourgeons floraux sur des cultures de segmens de tige de Tabac. C.R. Acad. Sci., Série D., **252**, 3864-3866.

Church A., 1920. - On problems of phyllotaxis. Oxford, Bot. Mém., **6**, 1-58.

Churchill M., Arditi J. & Ball E., 1971. - Clonal propagation of orchids from leaf tips. Am. Orchid Soc. Bull., **40**, 109-113.

Churchill M., Ball E. & Arditi J., 1973. - Tissue culture of Orchids. I. Methods for leaf tips. New Phytol., **72**, 161-166.

Clowes F., 1959. - Apical meristems of roots. Biol. Rev., **34**, 501-529.

Clowes F., 1961. - Apical meristems. Blackwell Oxford, 217 p.

Coic Y. & Lesaint C., 1971. - Comment assurer une bonne nutrition en eau et en ions minéraux en Horticulture. L'horticulture francaise.

Coleman R. & Nickell L., 1964. - Stability of the flowering stimulus. I. Isolated stem tips of sugar cane. Nature, **201**, 941-942.

Constabel F., 1958. - La culture des tissues de Juniperus communis. Rev. Géné. Bot., **65**, 390-396.

Coquen C. & Astié M., 1977. - Ontogenèse de bulbilles végétatives obtenues par culture de pièces florales isolées chez le Lilium candidum L. Bull. Soc. Bot. Fr., **124**, 51-59.

Crisp P. & Walkey D., 1974. - The use of aseptic meristem culture in cauliflower breeding. Euphytica, **23**, 305-313.

Cutter E., 1965. - Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. Bot. Rev., **31**, 7-113.

Cutter E., 1971. - Plant anatomy: experiment and interpretation, part 2. Organs, Addison-Esley Publishing C., Reading U.S.A., 343 p.

David A., David H., Faye M. & Isemukali K., 1979. - Culture

in vitro et micropropagation du Pin maritime. AFOCEL, Etudes et Recherches, **12**, 33-40.

David A. & Thomas M., 1979. - Organogenèse et multiplication végétative in vitro chez les Gymnospermes. Année Biol., **18**, 381-416.

David C. & Margara J., 1979. - L'évolution en culture in vitro des méristèmes de Chou-fleur, Brassica oleracea L. var. botrytis. C.R. Acad. Sci., Sér. D, **288**, 1529-1532.

De Bergh P., 1975. - Intensified vegetative multiplication of Dracaena deremensis. Acta Hortic., **54**, 83-92.

De Bergh P. & Standaert de Metsenaere R., 1976. - Néoformation of bulbils in Allium porrum cultured in vitro. Scientia Hortic., **5**, 11-12.

De Bruijne et al., 1974. - Actions of hormons and embryoid formation in callus cultures of Carica papaya. Med. Fac. Landbouww. Gent., **39**, 637-645.

De Fossard, 1976. - Tissue culture from plant propagators. Univ. New England Pritnery, Armidale, 409 p.

Deltour R., 1970. - Induction florale in vitro des plantes régénérées à partir d'apex embryonnaires de Sinapis albis In: Cellular and molecular aspects of floral induction. Symp. Liège, 416-430.

Diomaiuto-Bonnant J., 1975. - Evolution du méristème apical de la Giroflée (Cheiranthus cheiri L.) soumise à des températures favorables ou défavorables au fonctionnement reproducteur: étude des réversions à l'état végétatif. C.R. Acad. Sci., **280**, 1365-1368.

Doré C., 1975. - La multiplication clonale de l'Asperge (Asparagus officinalis L.) par culture in vitro: son utilisation en sélection. Ann. Amélior. Plant., **25**, 201-224.

Doré C. & Schweisguth B., 1980. - Multiplication végétative du Poireau pour la production de semences. In: Application de la culture in vitro à l'amélioration des plantes potagères. Réunin Eucarpia, Versailles, 54-57.

Dorion N., Chupeau Y. & Bourgin J.P., 1975. - Isolation, culture and regeneration into plants of Ranunculus sceleratus L. leaf protoplasts. Plant Sci. Lett., **5**, 325-331.

Dudits D., Nemet G. & Haydu Z., 1975. - Study of callus growth and organ formation in wheat (Triticum aestivum) tissue cultures. Can. J. Bot., **53**, 957-963.

Durzan D., Chafe S. & Lopushanski S., 1973. - Effects of environmental changes on sugars tannins and organized growth in suspension cultures of white Spruce. Planta, **113**, 241-249.

Earle E. & Langhans R., 1974. - Propagation of Chrysanthemum in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. J. Am. Soc. Hortic. Sci., **99**, 352-358.

Earle E. & Torrey J., 1965. - Morphogenesis in cell colonies grown from Convolvulus cell suspensions plated on synthetic media. Am. J. Bot., **52**, 891-899.

Elliott R., 1969. - Growth of excised meristem of Kumura Ipomoea batatas (Linn.) Poir axenic culture. N.Z.J. Bot., **7**, 158-166.

Emberger L., 1960. - Les végétaux vasculaires. Masson Paris, 1539 p.

Ernst R., 1974. - The use of activate charcoal in a symbiotic seedling culture of Paphiopedilum. Am. Orchid. Soc. Bull., **43**, 35-38.

Esau K., 1965. - Vascular differenciation in plants. Holt, Rinehart & Winston, New York, 160 p.

Favre J.M., 1977. - La rhizogenèse. Asepcts divers d'un processus d'organogenèse végétale. Ann. U. Abidjan, Sér. C., 1-100.

Fellenberg G., 1969. - Veränderungen des Nucleoproteids von Erbsenepikotylen durch synthetische Auxine bei Induktion der Wurzelneubildung. Planta, **84**, 195-198.

Feng K. & Linka A., 1970. - Effects of N-1-naphtylphtalamic acid on the growth and bud formation of tobacco callus grown, in vitro. Plant Cell Physiol., **11**, 589-598.

Fisher J., 1977. - Callus, cell suspensions and organogenesis in tissue cultures of purple nutsedge (Cyperus rotundus). Bot. Gaz., **138**, 291-297.

Fonnesbech M., 1972. - Growth hormones and propagation of Cymbidium in vitro. Physiol. Plant., **27**, 310-316.

Fonnesbech M., 1974. - Temperature effects on shoot and root development from Begonia x Cheimantha petiole segments grown

in vitro. Physiol. Plant., **32**, 282-286.

Foster A., 1938. - Structure and growth of the shoot apex in Ginkgo biloba. Bull. Torrey Bot. Club., 65, 531-556.

Franclet A., 1975. - Production de boutures racinées de Noyers. AFOCEL-ARMEF Informations-Forêt, **3**, 5-12.

Franclet A., 1979. - Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. In: micropropagation d'arbres forestiers. AFOCEL, **12**, 3-18.

Franclet A., David A., David H. & Boulay M., 1980. - Première mise en évidence morphologique d'un rajeunissement de méristèmes primaires caulinaires de Pin maritime âge (Pinus pinaster Sol.). C.R. Acad. Sci., Série D, **290**, 927-930.

Fridborg G., 1978. - Effects of activated charcoal on morphogenesis implant tissue cultures. 4th Intern. Congr. Pl. Tiss. cell. Cult., Calgary Abstr., 132.

Galzy R., 1969. - Remarques sur la croissance de Vitis rupestris cultivée in vitro sur différents milieux nutritifs. Vitis, **8**, 191-205.

Galzy R., 1972. - La culture in vitro des apex de Vitis rupestris. C.R. Acad. Sci., Sér. D, **274**, 210-213.

Gamborg O., Constabel F., Miller R., 1970. - Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of Bromus inermis. Planta, **95**, 355-358.

Gamborg O. & Eveleigh D., 1968. - Culture methods and detection of glucanases in suspension of wheat and barley. Can. J. Biochem., **46**, 417-421.

Gamborg O., Miller R. & Ojima K., 1968. - Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res., **50**, 151-158.

Gamborg O. & Shylok J.P., 1970. - The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. Plant Physiol, **45**, 598-600.

Gaspar T., Smith D. & Thorpe T., 1977. - Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogenèse. C.R. Acad. Sci., Sér. D, **285**, 327-330.

Gautheret R., 1942. - Le bourgeonnement des tissues végétaux en

culture. Sciences, **40**, 95-128.

Gautheret R., 1954. - Catalogue des cultures de tissues végétaux. Rev. Gén. Bot., **61**, 672-702.

Gautheret R., 1959. - La culture des tissus végétaux. Masson Paris, 863 p.

Gautheret R., 1969. - Investigations on the root formation in the tissues of Helianthus tuberosus cultured in vitro. Am. J. Bot., **56**, 702-717.

Gifford E., 1954. - The shoot apex in Angiosperms. Bot. Rev., **20**, 477-529.

Gifford E., 1964. - Developmental studies of vegetative and floral meristems. Brookhaven Symp., **16**, 126-137.

Gifford E. & Tepper H., 1962. - Histochemical and autoradiographic studies of floral induction in Chenopodium album. Am. J. Bot., **49**, 706-714.

Goh C., 1973. - Meristem culture of Aranda Deborah. Orchid Rev., **12**, 9-12.

Grambow H., Kao K., Miller R. & Gamborg O., 1972. - Cell division and plant development of protoplasts of carrot cell suspension cultures. Planta, **103**, 348-355.

Green C. & Phillips R., 1975. - Plant regeneration from tissue culture of maize. Crop Sci., **15**, 417-421.

Gregoire V., 1938. - La morphogenèse et l'autonomie morphologique de l'appareil floral. I. Le carpelle. Cellule, **17**, 287-452.

Grewal S. & Atal C., 1976. - Plantlet formation in callus cultures of Dioscorea deltoïdea Wall. Indian J. Exp. Bot., **14**, 352-353.

Groenewald 1975. - Callus formation and plant regeneration from seed tissue of Aloe pretoriensis Pole Evans. Z. Pflanzenphysiol., **75**, 270-272.

Haberlandt G., 1902. - Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Silzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat. Classe, 111, Abt., **1**, 69-92.

Haccius B., 1973. - Les premiers stades des embryons végétaux zygotiques et somatiques sont-ils differents ou non? Soc. Bot. Fr. Mém., Colloque morphologie, 201-205.

Haccius B. & Laksmanan K., 1965. - Adventive embryony in callus

culture of Nicotiana under high light intensity. Planta, **65**, 102-104.

Hackett W. & Anderson J., 1967. - Aseptic multipliation and maintenance of differential carnation shoot tissue derived from shoot apices. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., **90**, 365-369.

Haight T. & Kuehnert C., 1969. - Developmental potentialities of leaf primordia of Osmunda cinnamomea V. Toward greater understanding of the final morphogenetic expression of isolated set I Cinnamon fern leaf primordia. Can. J. Bot., **47**, 481-488.

Hakkaart F., Maat D. & Quak F., 1975. - Viruses and meristem culture of Nerine. Acta Hortic., **47**, 51-53.

Hakkaart F. & Quak F., 1964. - Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysanthemums from virus B by means of meristem culture. Neth. J. Plant Pathol., **70**, 154-157.

Halparin W., 1966. - Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Am. J. Bot., **53**, 443-453.

Halparin W., 1967. - Population density effects in embryogenesis in carrot cell cultures. Exp. Cell. Res., **48**, 170-173.

Halparin W., 1978. - Organogenesis at the shoot apex. In: Annu. Rev. Plant Physiol., **29**, 239-262.

Halparin W. & Wetherell D., 1964. - Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, Daucus carota. Am. J. Bot., **51**, 274-283.

Halparin W. & Wethereel D., 1965. - Ammonium requirements of embryogenesis in vitro. Nature, **205**, 519-520.

Handro W., Rao P. & Haraa H., 1972. - Contrôle hormonal de la formation de cals, bourgeons, racines et embryons sur des explantats de feuilles et de tiges de Petunia cultivés in - vitro. C.R. Acad. Sci., **275**, 2861-2863.

Harada H., 1967. - Flower induction in excised shoot apices of Pharbitis and Chrysanthemum cultured in vitro. Nature, **214**, 1027-1028.

Hartman R., 1974. - Dasheen mosaic virus and other phytopathogens eliminated from Caladium, Taro and Cocoyam by culture of shoot tips. Phytopathology, **64**, 237-240.

Havranek P. & Novak F., 1973. - The bud formation in the callus cultures of Allium sativum. Z. Pflanzenphysiol., **68**, 308-318.

Heinz D., Mee F., 1969. - Plant differenciation from callus tissue of Saccharum species. Crop. Sci., **9**, 346-348.

Heller R., 1953. - Recherches sur la nutrition minérale des tissues végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég., **14**, 1-223.

Hemberg T., 1953. - The effect of vitamin K and vitamin H_1 on the root formation in cuttings of Phasoleus vulgaris L. Physiol. Plant., **6**, 17-20.

Heslop-Harrison J., 1964. - Sex expression in flowering plants. Brookhaven Symp. Biol., **16**, 109-125.

Hess C., 1962. - Characterization of the rooting cofactors extracted from Hedera helix L. and Hibiscus rosa-sinensis L. 16e Int. Hortic. Congr., Brussels, **4**, 382-388.

Hess C., 1964. - Naturally occuring substances which stimulate root initiation. In: J.P. Nitsch ed. Régulateurs naturels de la croissance végétale. CNRS, Paris, p. 517-527.

Hicks G. & Steeves T., 1969. - In vitro morphogenesis in Osmunda cinnamomea. The role of the apex in early leaf development. Can. J. Bot., **47**, 575-580.

Hildebrandt A., Riker A. & Duggar B., 1946. - The influence of the composition of the medium on growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue cultures. Am. J. Bot., **33**, 591-597.

Hill G., 1967. - Morphogenesis in stem callus cultures of Convolvulus arvensis. Ann. Bot., **31**, 437-444.

Hillman W., 1961. - Experimental control of flowering in Lemna. III A relationship between medium composition and the opposite photoperiodic responses of L. perpusilla 6746 and L. gibba G3. Am. J. Bot., **48**, 413-419.

Hirsch A.M. & Bligny-Fortune D., 1979 - Organogenèse dans les cultures de tissues de deux plantes appartenant au genre Actinidia chinensis et Actinidia polygama. Relations entre organogenèse et peroxydases. C.R. Acad. Sci., Sér. D., **288**, 1159-1162.

Hollings M., 1965. - Disease control through virus-free stock. Ann. Rev. Phytopathol., **3**, 367-397.

Hollings M., 1971. - Annual Report 1971. Glasshouse crops. Re-

search Inst. Rustington Littlehampton Sussex.

Homès J. & Guillaume M., 1967. - Phénomènes d'organogenèse dans des cultures in vitro de tissus de carotte Daucus carota. Bull. Soc. R. Bot. Belg., **100**, 239-258.

Homès J., Freson R. & Vermylen M., 1973. - Développement de protocormes d'Orchidées cultivés in vitro en conditions anoxiques. Bull. Soc. R. Bot. Belg., **106**, 123-128.

Homès J. & Vanseveren-van Espen N., 1973. - Effets du saccharose et de la lumière sur le développement et la morphologie de protocormes d'Orchidées cultivées in vitro. Bull. Soc. R. Bot. Belg., **106**, 89s-106.

Hu C., 1978. - Further observations on Ilex embryoid production. Pflanzzenphysiol., **89**, 41-49.

Hu C. & Sussex I., 1971. - In vitro development of embryoids on cotyledons of Ilex aquifolium. Phytomorphology,**21**, 103-107.

Hunault G., 1976. - Obtention de nouvelles souches de tissues à partir de diverses espèces de Liliacées. C.R. Acad. Sci., **283**, 1401-1404.

Hunault G., 1978. - Contributions à l'étude du comportement des fragmens d'organes et de tissues de quelques Monocotylédones cultivés in vitro. Thèse, Paris, 218 p.

Hussey G., 1975. - Totipotency of tissue explants and callus of some members of the Liliacées, Iridacées and Amaryllidacées. J. Exp. Bot., **26**, 253-262.

Hussey G., 1977. - In vitro propagation of Gladiolus by precocious axillary shoot formation. Scientia Hortic., **6**, 287-296.

Hussey G. & Hepher A., 1978. - Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of polyploids by tissue culture. Ann. Bot., **42**, 477-479.

Huth W. & Bode O., 1970. - Befreiung völlig infizierter Kartoffelsorten von Infektionen des Kartoffel S Virus durch Meristem Kultur. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz dienstes, **22**, 37-39.

Hutner S., 1953. - Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. In: Growth and differenciation in plants, 417, Ed. Loomis, Iowa State College Press.

Iizuka M., Matsumoto E., Doi A., Madrigal R. & Fukushima A.,

1973. - Tubular florets culture of Chrysanthemum and Cineraria in vitro. Jpn. J. Genet., **48**, 79-87.

Intuwong O. & Sagawa Y., 1973. - Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture. Am. Orch. Soc. Bull., **43**, 893-895.

Isikawa H., Yazawa S., Hanawa J., 1973. - Some cytological observations on a cultured callus of Pinus strobus. Trans. 74th Meet. Jpn. For. Soc., 227-229.

Jacquiot C., 1951. - Action du mésoinositol et de l'adénine sur la néoformation de bourgeons par le tissue cambial d'Ulmus - campestris cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., **233**, 815-817.

Jacquoit C., 1955. - Formation d'organes par le tissu cambial de l'Ulmus campestris L. et de Betula verrucosa G. cultivés in-vitro. C.R. Acad. Sci., **240**, 557-558.

Jelaska S., 1974. - Embryogenesis and organogenesis in Pumpkin explants. Physiol. Plant., **31**, 257.

Johri B. & Bajaj Y., 1965. - Growth responses of globular proembryos of Dendrophtoe falcata in culture. Phytomorphology, **15**, 292-300.

Johri B.M. & Sehgal C.B., 1966. - Growth responses of ovaries of Anethum, Foeniculum and Trachyspermum. Phytomorphology, **16**, 364-378.

Jones O. & Vine S., 1968. - The culture of gooseberry shoot tips for eliminating virus. J. Hortic. Sci., **43**, 289-292.

Julliard B., 1963. - Influence du bourgeon sur la rhizogenèse des boutures de Vigne. C.R. Acad. Sci., **257**, 3200-3203.

Julliard B., 1973. - Etude physiologique de la rhizogenèse et des conditions de réussite du greffage de la Vigne. Thèse, Paris, 155 p.

Jullien M., 1973. - Division et croissance in vitro de cellules séparées du parenchyme foliaire d'Asparagus officinalis L. Z. Pflanzenphysiol., **69**, 129-141.

Jullien M., 1974. - La culture in vitro de cellules du tissue foliaire d'Asparagus officinalis L.: obtention de souches à embryogenèse permanente et régénération de plantes entières. C.R. Acad. Sci., **279**, 747-750.

Kao K. & Michaylor M., 1980. - Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol., **96**, 135-141.

Kartha K., Gamborg O. & Constabel F., 1974. - In vitro formation from stem explant of rape (Brassica napus cv Zéphyr). Physiol. Plant., **31**, 217-220.

Kartha K. & Gamborg O., 1975. - Elimination of Cassava mosaic disease by meristem culture. Phytopathology, **65**, 826-828.

Kassanis B., 1965. - Therapy of virus infected plants. J.R. Agric. Soc. Engl., **126**, 105-114.

Kassanis B., 1967. - Plant tissue culture. In: Methods in Virology (Maramorosch & Koppowski ed.). Acad. Press. New York. **1**, 537-566.

Kato H. & Takeuchi M., 1963. - Morphogenesis in vitro starting from single cells of carrot roots. Plant Cell Physiol., **4**, 234-235.

Kaul K. & Sabharwal P., 1970. - In vitro induction of vegetative buds on inflorescence segments of Haworthia. Experientia, **26**, 433-434.

Kavathekar A., Ganapathy P. & Johri B., 1978. - In vitro responses of embryoids of Eschsholzia california. Biol. Plant., **20**, 98-106.

Khanna P. & Staba E., 1970. - In vitro physiology and morphogenesis of Cheiranthus cheiri. Bot. Gaz., **131**, 1-5.

Kirindonov T. & Atanasov A., 1971. - Obtention in vitro de cultures de tissus à partir de divers organes de Beta vulgaris L. C.R. Acad. Sci., Agric., Bulg., **4**, 75-83.

Klein B. & Bopp M., 1971. - Effect of activated charcoal in agar on the culture of lower plants. Nature, **230**, 474.

Knudson L., 1925. - Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz., **79**, 345-379.

Knudson L., 1946. - A new nutreint solution for the germination of orchid seeds. Am. Orchid. Soc. Bull., **15**, 214-217.

Kochar T., Bhalla P. & Sabharval P., 1970. - Formation de bourgeons végétatifs par des cals de Tabac sous l'influence d'un agent de chélation: l'acide 1,3 diamino 2 hydroxypropane NNN'N' tétracétique (DMPTA). C.R. Acad. Sci., **271**, 1619-1622.

Kochar T., Bhalla P. & Sabharval P., 1971. - Effect of Tobacco smoke. Components of organogenesis in plant tissus. Plant Cell Physiol., **12**, 603-608.

Kochar T. & Sabharval P., 1977. - Morphogenetic effects of indole 3 acetic acid and benz (a) anthracene on tobacco callus. Physiol. Plant., **40**, 169-171.

Kochba J. & Button J., 1974. - The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the Shamonti orange (Citrus sinensis) as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzenphysiol., **73**, 415-421.

Kochba J., Spiegel-Roy P., Saad S. & Neumann H., 1978. - Stimulation of emryogenesis in Citrus tissue culture by galactose. Naturwissenschaften, **65**, 216-262.

Kohlenbach H., 1965. - Über organisierte Bildungen aus Macleaya - cordata Kallus. Planta, **64**, 37-40.

Komissarov D. 1969. - Biological basis for the propagation of woody plants by cuttings. Israël program for scientific translation, Jerusalem, 250 p.

Konar R. & Konar A., 1966. - Plantlet and flower formation in callus cultures of Phlox drumondii. Phytomorphology, **16**, 379-382.

Konar R. & Nataraja K., 1965. - Differenciation of embryoids in tissue cultures of the floral buds of Ranunculus sceleratus. Naturwissenschaften, **52**, 140-141.

Konar R. & Nataraja K., 1970. - Morphogenesis of isolated floral buds of Ranunculus sceleratus L. in vitro. Acta Bot. Neerl., **18**, 680-699.

Konar R. & Oberoi Y.P., 1965. - In vitro development of embryoids on the cotyledons of Biota orientalis. Phytomorphology, **15**, 137-140.

Konar R., Thomas E. & Street H., 1972. - The diversity of morphogenesis in suspension cultures of Atropa belladonna. Ann. Bot., **36**, 249-258.

Konstantinova T., Bavrina T., Aksenova N. & Golyanovskaya S., 1972. - Effect of glucose on morphogenesis of stem calluses in photoperiodically trapezoid tobacco. Fiziol. Rast., **19**, 89-98.

Kowalska A., 1974. - Study on the freeing of carnation plants from viruses by means of meristem tip cultures. Phytopathology, **79**, 301-309.

Kukulczanska K. & Suszynska G., 1972. - Regenerative properties

of Saintpaulia ionantha Wendl. Leaves cultured in vitro. Acta Soc. Bot. Pol., **41**, 503-509.

Kulescha Z., 1952. - Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les tissues végétaux. Rev. Gén. Bot., **59**, 92-111.

Lamport D., 1964. - Cell suspension cultures of higher plants isolation and growth energetics. Exp. Cell. Res., **33**, 195-206.

Lance A., 1957. - Recherches cytologiques sur l'évolution de quelques méristèmes apicaux et sur ses variations provoquées par des traitements photopériodiques. Ann. Sci. Nat. Bot., Sér. 11, **18**, 91-421.

Larson P., 1975. - Development and organization of the primary vascular system in Populus deltoides according to phyllotaxy. Am. J. Bot., **62**, 1084-1099.

Larson P., 1977. - Phyllotactic transitions in the vascular system of Populus deltodeis Bartr. as determined by 14C labeling. Planta, **134**, 241-249.

Lee E. & De Fossard R., 1977. - Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (x Fragaria ananassa Duchesne) in vitro. Acta Hortic., **78**, 187-196.

Lee T. & Skoog F., 1965. - Effects of substituated phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., **18**, 386-402.

Legrand B., 1972. - Influence des conditions initiales d'éclairement sur le bourgeonnement et la polarité de tissus de feuilles d'endive cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., **275**, 31-32.

Leroux R., 1973. - Contribution à l'étude de la rhizogenèse de fragments de tiges de Pois (Pisum sativum) cultivés in vitro. Rev. Cytol. et Biol. Vég., **36**, 1-132.

Leu L., 197. - Freeing sugar cane from mosaic virus by apical meristem culture and tissue culture. Rep. Taiwan Sugar Exp. Sta., **57**, 57-63.

Levine M., 1950. - The growth of normal plant tissue in vitro as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. Am. J. Bot., **37**, 445-458.

Levine M., 1951. - The effects of growth substances and chemical carcinogens on fibrous roots of carrot tissue grown in vitro.

Am. J. Bot., **38**, 132-138.

Libbert E, 1956a. - Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. I. Die Wirkungsweise einiger Komponenten des Rhizocalincomplexes. Flora, **144**, 121-150.

Libbert E., 1956b. - II. Die Korrelative Be-einflussung der Adventivwurzelbildung durch andere Organe, ins besondere durch die Wurzel. Planta, **48**, 157-189.

Liebert J. & Tran Thanh Van M., 1972. - Progrès de la multiplication clonale intense chez les plantes cultivées: cas de l'Endive. C.R. Acad. Agric. Fr., **58**, 472-479.

Limasset P. & Cornuet P., 1949. - Recherche de virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes des plantes infectées. C.R. Acad. Sci., **228**, 1971-1972.

Linser H. & Neumann K., 1968. - Untersuchungen über Beziehungen zwischen Zellteilung und Morphogenese bei Gewebekulturen von Daucus carota. Physiol. Plant., **21**, 487-499.

Loh C., Rao A. & Goh C., 1975. - Clonal propagation from leaves in the Orchid Aranda. Singapore Natl. Acad. Sci., **4**, 97-99.

Lutz A., 1971. - Aptitudes morphogénétiques des cultures de tissus d'origine unicellulaire. Colloq. CNRS, **193**, 163-168.

Loiseau J., 1959. - Observations et expérimentation sur la phyllotaxie et le fonctionnement du sommet végétatif chez quelques Balsaminacées. Ann. Sci. Nat. Bot., Série 11, **20**, 1-214.

Ma & Wang, 1977. - Clonal multiplication of Azaleas through tissue culture. Acta Hortic., **78**, 209-215.

Mc Donald D., 1973. - Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varies from virus X and S. Potato Res., 263-269.

Mc William A., Smith S. & Street H., 1974. - The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (Daucus carota). Ann. Bot., **38**, 243-250.

Maheswari S. & Gupta R., 1965. - Production of adventitious embryoids in vitro from stem callus of CFoeniculum vulgare. Planta, **67**, 384-386.

Maheswari P. & Rangaswamy N., 1958. - Polyembryony and in vitro culture of embryos of Citrus and Mangifera. Indian J. Hortic., **15**, 275-282.

Maheswari P. & Sachar R., 1963. - Polyembryony. In: Recent advances in the embryology of Angiosperms. Maheshwari Ed. Int. Soc. Pl. Morphologists. Delhi, 265-296.

Mahlstede J. & Haber E., 1966. - Plant propagation. 5e Ed. John Wiley and Sons Ed. New York, 413 p.

Maia E., Beck D. & Gaggelli G., 1969. - Obtention de clones d'oeillets méditerranéens indemnes de virus. Ann. Phytopathol., **1**, 311-319.

Maia E., Bettachini B., Beck D. & Marais A., 1973. - Régénération de renoncules par culture d'apex in vitro. Ann. Phytopathol., **5**, 125-129.

Margara J., 1960. - Recherches sur le déterminisme de l'élongation et de la floraison dans le genre Beta. Ann. Amélior. Plant. INRA, **10**, 361-471.

Margara J., 1965. - Sur la néoformation in vitro chez certaines lignées précoces d'Endive (Cichorium intybus L.) en l'absence de toute vernalisation de bourgeons inflorescentiels anormaux à partir d'explantats de racine. Bull. Soc. Bot. Fr., **112**, 113-118.

Margara J., 1969. - Etude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture in vitro chez le Chou-fleur, Brassica - oleracea L. var. botrytis. Ann. Physiol. Vég., INRA, **11**, 95-112.

Margara J., 1970a. - Sur l'aptitude des tissus au bourgeonnement et à l'initiation florale in vitro. C.R. Acad. Sci., **268**, 803-805.

Margara J., 1970b. - Néoformation de bourgeons en culture in - vitro chez Beta vulgaris L. C.R. Acad. Sci., **270**, 698-701.

Margara J., 1974. - Sur les conditions de l'évolution végétative ou inflorescentielle, des bourgeons néoformés à partir de fragments de hampe florale de Cichorium intybus L. C.R. Acad. Sci., Ser. D, **278**, 1s195-1198.

Margara J., 1977a. - La multiplication végétative de la Betterave (Beta vulgaris L.) en culture in vitro. C.R. Acad. Sci. Sér. D, **285**, 1041-1044.

Margara J., 1977b. - Effets d'auxines et d'antiauxines sur la néoformation de bourgeons in vitro chez le Chou-fleur (Brassi-

ca oleracea L. var. botrytis). C.R. Acad. Sci., **284**, 1883-1885.

Margara J., 1977c. - Schéma du développement en culture in vitro de Cichorium intybus L. Exemple type de plante bisannuelle de jour long à besoin de vernalisation. Bull. Soc. Bot. Fr., **124**, 491-501.

Margara J., 1977d. - Effets de régulateurs de croissance associés à différents cycles photopériodiques sur l'induction florale in vitro de bourgeons néoformés de Cichoriumintybus L. C.R. Acad. Sci., **284**, 1991-1994.

Margara J., 1978a. - L'organogenèse chez le Chou-fleur (Brassica oleracea L. var. botrytis) en culture in vitro. Actes 103e Congr. Soc. Sav., **103**, 41-53.

Margara J., 1978b. Mise au point d'une gamme de milieux pour les conditions de la culture in vitro. C.R. Acad. Agr. Fr., 654-661.

Margara J. & Bouniols A., 1967. - Comparaison in vitro de l'influence du milieu liquide ou gélosé, sur l'initiation florale chez Cichorium intybus L. C.R. Acad. Sci., **264**, 1166-1168.

Margara J. & David C., 1978. - Les étapes morphologiques du développement du méristème de Chou-fleur, Brassica oleracea L. var. botrytis. C.R. Acad. Sci. Sér. D., **287**, 1369-1372.

Margara J. & Leydecker M.Th., 1978. - Différents types d'organogenèse observés chez le Colza, Brassica napus L. var. oleifera Metzg. Application à la multiplication végétative in vitro. C.R. Acad. Sci., Sér. D, **287**, 17-20.

Margara J., Rancillac M. & Bouniols A., 1966. - Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs in vitro à partir d'explantats d'Endive, Cichorium intybus L. III. Etude critique de la méthode. Ann. Physiol. Vég., INRA, **8**, 285-305.

Margara J., Rancillac M. & Bouniols A., 1967. - La néoformation in vitro de bourgeons inflroescentiels chez Cichorium intybus L. Etude méthodologique. Colloq. CNRS., **167**, 71-82.

Martin C., 1980. - La multiplication végétative in vitro: une technique de pointe au service de l'agriculture. C.R. Acad. Fr., **66**, 629-637.

Martin C., Dulieu H. & Carré M., 1967. - Sur la possibilitié de rendre des plantes virosées indemnes de virus par la culture de méristèmes inflorescentiels et floraux. C.R. Acad. Sci., **264**, 1994-1996.

Martin-Tanguy J., Cabanne F., Perdrizet E. & Martin C., 1978. - The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. Phytochemistry, **17**, 1927-1928.

Martin-Tanguy J., Deshayes A., Perdrizet E. & Martin C., 1979. - Hydroxycinnamic acid amides in Zea mays. FEBS letters, **108**, 76-178.

Mehra A. & Mehra P., 1972. - Differenciation in callus culture of Mesembryanthemum floribundum. Phytomorphology, **22**, 171-176.

Mehra A. & Mehra P., 1974. - Organogenesis and plantlet formation in vitro in almond (Prunus amygdalus (Tourn. L.)). Bot. Gaz., **135**, 61-73.

Mekers O., 1977. - In vitro propagation of some Tillandsioidea (Bromeliaceae). Acta Hortic., **78**, 311-317.

Mellor F. & Stace-Smith R., 1971. - Heat stable strains of potato leaf roll virus. Phytopathology, **61**, 246-247.

Mellor F. & Stache-Smith R., 1977. - Virus-free potatoes by tissue culture. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture (Reinert & Bajaj, ed.), 616-635. Springer-Verlag, New York.

Menon M. & Lal M., 1972. - Influence of sucrose on the differenciation of cells with zygote like potentialities in a Moss. Naturwissenschaften, **59**, 514.

Miginiac E., 1971. - Influence des racines sur le développement végétatif ou floral des bourgeons cotylédonaires chez le Scrofularia arguta: rôle possible des cytokinines. Physiol. Plant., **25**, 234-239.

Miginiac E. & Lacombe N., 1973. - Influence des phénomènes d'antagonisme entre organes et entre régulateurs sur le développement floral de bourgeons cotylédonaires chez Scrofularia arguta. Can J. Bot., **51**, 465-473.

Miller C., 1952. - Relatinschip of the cobalt and light effects on expansion of etiolated bean leaf disks. Plant Physiol., **27**, 408-412.

Miller P. & Belkengren R., 1963. - Elimination of yellow edge, crinkle and vein-banding virus and certain other virus complexes from strawberries by excision and culturing of apical meristem. Plant Dis. Rep., **47**, 298-300.

Mitra G. & Chaturvedi H., 1972. - Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vivo grown emasculated flower buds of Citrus sp. Bull. Torrey Bot. Club., **99**, 184-189.

Moham Ram H. & Wadhi M., 1965. Culture of excised leaves and leaf explants of Kalanchoë pinnata per. In: Tissue culture (Ramakrisnan ed.) 274-282. Ed. W. Junk. The Hague.

Monnier M., 1968. - Comparaison du développement des embryons immatures de Capsella bursa-pastoris in vitro et in situ. Bull. Soc. Bot. Fr., **115**, 15-29.

Montezuma de Carvalho J. & Guimaraes M., 1974. - Production of buds and plantlets from the stamen's filament of Lilium regale cultivated in vitro. Biol. Plant., **16**, 472-473.

Morel G., 1960. - Producing virus-free Cymbidiums. Am. Orchid. Soc. Bull., **29**, 495-497.

Morel G., 1963. - La culture in vitro du méristème apical de certaines Orchidées. C.R. Acad. Sci., **256**, 4955-4957.

Morel G., 1970. - Neues auf dem Gebiet der Meristem Forschung. Die Orchidee, **21**, 433-443.

Morel G., 1974. - Clonal multiplication of Orchids. In: The Orchids Sci. Studies. John Wiley et Sons Inc., 169-222.

Morel G. & Martin C., 1952. - Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci., **235**, 1324-1325.

Morel G. & Martin C., 1955. - Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. C.R Acad. Agr. Fr., **41**, 472-475.

Morel G., Martin C. & Muller J.F., 1968. - La guérison des pommes de terre attaintes de maladies à virus. Ann. Physiol. Veg. INRA **10**, 113-139.

Morel G. & Muller J.F., 1964. - La culture in vitro du méristème apical de la Pomme de terre. C.R., **258**, 5250-5252.

Mori K., 1971. - Production of virus-free plants by means of meristem culture. Jpn Agric. Res. Quant., **6**, 1-7.

Mori Y., Hasegawa A. & Kano K., 1975. - Studies on the clonal

propagation by meristem culture in Freesia. J. Jpn Soc. Hortic. Sci., **44**, 294-302.

Mori K. & Hosokawa D., 1977. - Localization of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem tissue. Acta Hortic., **78**, 389-402.

Mosella L. & Macheix J., 1979. - In vitro development of the Peach tree (Prunus persica Batsch.). Influence of certain phenolic compounds. C.R. Acad. Sci., Série D., **289**, 567-570.

Moureau J., 1941. - Rhizogenèse chez Coleus sous l'influence de l'hétéro-auxine. Histologie et physiologie du phénomène. Bull. Soc. Bot. Belg., **73**, 142-199.

Mullin R. & Schlegel D., 1975. - Pathogen free storage of strawberry meristem plantlets. Proc. Am. Phytopathol. Soc., **2**, 116.

Mullin R., Smith S., Frazier N., Schlegel D., & McCall S., 1974. - Meristem culture free strawberries of mild yellow edge, pallidosis and mottle diseases. Phytopathology, **64**, 1425-1429.

Mullins M. & Srinavasa C., 1976. - Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine by apomixis in vitro. J. Exp. Bot., **27**, 100, 1022-1030.

Murashige T., 1965. - Effects of stem elongation retardants and gibberellin in callus growth and organ formation in tobacco tissue culture. Physiol. Plant., **18**, 665-673.

Murashige T., 1974. - Plant propagation by tissue cultures. Annu. Rev. Plant. Physiol., **25**, 135-166.

Murashige T. & Nakano R., 1967. - Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. Am. J. Bot., **54**, 963-970.

Murashige T. & Skoog F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., **15**, 473-497.

Nagl W. & Rucker W., 1972. - Beziehungen zwischen Morphogenese und nuklearem DNS Gehalt bei aseptischen Kulturen von Cymbidium nach Wuchsstoff-Behandlung. Z. Pflanzenphysiol., **67**, 120-134.

Nakano H. & Maeda E., 1974. - Histology of development and root differenciation in rice callus. Proc. Crop. Sci. Soc. Jpn., **43**, 345-353.

Nakano H., Tashiro T. & Maeda E., 1975. - Plant differenciation in callus tissue induced from immature endosperm of Oryza sativa L. Z. Pflanzenphysiol., **76**, 444-449.

Navarro L., Roistacher C. & Murashige T., 1975. - Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free Citrus. J. Am. Soc. Hortic. Sci., **100**, 471-479.

Nebel B. & Nayler A., 1968. - Light, temperature and carbohydrates requirements for shoot-bud initiation from protonemata in the moss Physcomitrium turbinatum. Am. J. Bot., **55**, 38-44.

Né meth G., 1980. - Benzyladenine stimulated rooting in fruit-tree roots stocks cultured in vitro. Z. Pflanzenphysiol., **95**, 389-396.

Netien G. & Raynaud J., 1972. - The formation of embryos in in vitro calluses of Conium maculatum L. tissues. Bull. mens. Soc. Linn. Lyon, **41**, 49-51.

Newcomb W. & Wetherell D., 1970. - The effect of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. Bot. Gaz., **131**, 242-245.

Nickell L., 1952. - Stimulation of plant growth by antibiotics. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **80**, 615-617.

Nickell L., 1964. - Tissue and cell culture of sugar cane. Another research tool. Hawaian Planters'record., **57**, 223-229.

Nishi T. Yamada Y. & Takahashi E., 1973. - The role of auxins in differenciation of rice tissues cultured in vitro. Bot. Mag., **86**, 183-188.

Nishizawa T. & Nishi Y., 1966. - Studies of the production of virus-free lily plants by means of meristem culture. Bull. Kyuschu Agr. Exp. Sta., **12**, 139-157.

Nitsch C., 1968. - Effects of growth substances on the induction of flowering of a short day plant in vitro. In: Biochemistry and Physiology of plant growth substances (Wightman & Setterfield, ed.) Runge Press, Ottawa, 1385-1398.

Nitsch C., 1972. - The role of growth regulators in flowering as demonstrated by in vitro techniques. Proc. Adv. Study Izmir Inst., 413-421.

Nitsch J.P., 1951. - Growth and development in vitro of excised ovaries. Am. J. Bot., **38**, 566-577.

Nitsch J.P., 1967. - L'induction de la floraison in vitro. Résultats et perspectives. Mém. Soc. Bot. Fr., 185-200.

Nitsch J.P., 1968. - Studies on the mode of action of auxins, cytokinins and gibberellins at the subcellular level. In: Biochem. and Physiol. of plant growth substances. (Wightman & Setterfield, ed.) Runge Press Ottawa, p. 564-580.

Nitsch J.P. & Nitsch C., 1956. - Auxin-dependent growth of excised Helianthus tuberosus tissue. Am. J. Bot., **43**, 839.

Nitsch J.P. & Nitsch C., 1969. - Haploid plants from pollen grains. Science, **163**, 85-87.

Nobécourt P., 1946. - Production de nature caulinaire et foliaire sur des cultures de racines de carotte en milieu synthétique. C.R. Soc. Biol., **140**, 944-953.

Norreel B. & Nitsch J.P., 1970. - Embryologie expérimentale. II. Production d'embryons à partir de tissues végétatifs. Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., **117**, 30-39.

Norris D., 1953. - The effect of virus X on yield of potatoes. J. Austr. Inst. Agr. Sci., **19**, 251-256.

Norstog K. & Rhamstine E., 1967. - Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. Phytomorphology, **17**, 374-381.

Nougarède A., 1965. - Organisation et fonctionnement du méristème apical des végétaux vasculaires. Dr. Travaux dédiés à L. Plantefol. 171-340. Masson Paris.

Nozeran R. & bancilhon L., 1972. - les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche des problèmes posés par l'Amélioration des plantes. Ann. Amélior. Plant., **22**, 167-185.

Ohki S., 1976. - Variabilité des capacités au bourgeonnement in vitro de plusieurs lignées de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.): transmission de ces capacités au cours d'un croisement. Thèse, Paris, 153 p.

Ohyama K. & Oka S., 1978. - Bud an droot formation in hypocotyl segments of Broussonetia Kazinoki in vitro. 4th Intern. Congr. of plant tissue and cell culture, Calgary, Abstr., 116.

Padmanabhan V., Paddock E. & Sharp W., 1974. - Hormonal control of organogenesis in Lycopersicon esculentum Mill. leaf callus. 3rd Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture, Leicester. Abstr.

66.

Palmade LM., Ambid C., Fallot J. & Zalta J.P., 1967. - Influence des supports de bio-gels sur la croissance et la rhizogenèse de tissus de Topinambours cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., Sér. D., **265**, 1683-1686.

Pareek L. & Chandra N., 1978. - Somatic embryogenesis in leaf callus from cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis). Plant Sci. Lett., **11**, 311-316.

Paris D. & Duhamet L., 1958. - Sur un cas de sensibilité des tissus de crowngall de Scorsonèra à l'acide indoleacétique. C.R. Acad. Sci., **246**, 2023-2026.

Paulet P. & Nitsch J.P., 1964. - La néformation de fleurs sur cultures in vitro de racines de Cichorium intybus L. Étude physiologique. Ann. Phys. Vég., **6**, 333-345.

Paupardin C., 1969. - Sur le moment d'action de l'acide caféique dans la rhizogenèse de fragments de tubercules de Topinambours cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., Sér. D., **269**, 1532-1534.

Paupardin C., 1972. - Contribution à l'étude du rôle des composés phénoliques dans les phénomènes de morphogenèse manifestés par quelques tissues végétaux. Ann. Sci. Nat. Bot., 2e Série, **13**, 141-210.

Pennazio S. & Redolfi P., 1974. - Potato virus X eradication in cultured potato meristem tips. Potato Res., **17**, 333-335.

Phillips D., 1968. - Carnation shoot tip culture. Colorado State Univ. Sta., Fort Collins, Techn. Bull., 102.

Phillips G. & Collins G., 1980. - Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. Crop Sci., **20**, 323-326.

Pierik R., 1965. - Regulation of morphogenesis by growth regulators and temperature treatment in isolated tissues of Lunaria annua L. Koninkl. Ned. Akad. van Wetensch., Sér. C., **68**, 324-332.

Pierik R., 1966. - The induction and initiation of flower buds in vitro in tissues of Lunaria annua L. Naturwissensch., **53**, 45.

Pierik R., 1967. - Regeneration, vernalization and flowering in Lunaria annua L. in vivo and in vitro. Meded. Landbouwhogesch. Wageningen, **67**, 1-71.

Pierik R. 1979. - In vitro culture of higher plants. Bibliographie Kniphorst Sci. Bookshop, Wageningen, 149 p.

Pierik R. & Ippel B., 1977. - Plantlet formation from excised bulb scale segments of Nerine. Acta Hortic., **78**, 197-202.

Pierik R. & Steegmans H. - Vegetative propagation of Anthurium-scherzerianum Sch. through callus cultures. Scientia Hortic., **4**, 291-292.

Pierik R., Steegmans H. & Marelis J., 1973. - Gerbera plantlets from in vitro cultivated capitulum explants. Sci. Hortic., **1**, 117-119.

Pillai S. & Hildebrandt A., 1968. - In vitro differenciation of Geranium (Pelargonium hortorum Bailey) plants from apical meristems. Phyton., **25**, 81-87.

Pillai S. & Hildebrandt A., 1969. - Induced differenciation of geranium plants from undifferentiated callus in vitro. Am. J. Bot., **50**, 52-58.

Plantefol L., 1948a. - Fondements d'une thérie nouvelle. Ontogénie de la fleur. Ann. Sci. Bot., 11e série, **9**, 35-182.

Plantefol L., 1948b. - La théorie des hélices foliaires multiples. Masson Paris, 157 p.

Poessel J., Martinez J., Macheix J. & Jonard R., 1980. - Variations saisonnières de l'aptitude au greffage in vitro de Pêcher (Prunus persica, Batsch). Relations avec les teneurs en composés phénoliques endogènes et les activités peroxydasiques et polyphénoloxydasiques. Physiol. Vég., **18**, 665-675.

Poirier-Hamon S., Rao P. & Harada H., 1974. - Culture of mesophyll protoplasts and stem segments of Antirrhinum majus (snap dragon): growth and organization of embryoids. J. Exp. Bot., **25**, 752-760.

Popham R., 1951. - Principal types of vegetative shoot apex organization in vascular plants. Ohio. J. Sci., **51**, 249-270.

Prabhudesai V. & Narayanaswamy S., 1973. - Differenciation of cytokinin induced shoot buds and embryoids on excised petioles of Nicotiana tabacum. Phytomorphology, **23**, 133-137.

Prabhudesai V. & Narayanaswamy S., 1974. - Organogenesis in tissue culture of certain Asclepiads. Z. Pflanzenphysiol., **71**, 181-185.

Prévot P., 1948. - Contribution á l'histologie des phénomènes de néoformation chez Begonia rex Putz. Rev. Sci., **87**, 275-285.

Proskauer J. & Berman R., 1970. - Agar culture medium modified to approximate soil conditions. Nature, **227**, 1161.

Putz C., 1971. - Obtention de framboisiers (var. Bois blanc) sans virus par la technique des cultures de méristèmes. Ann. Phytopathol., **3**, 493-501.

Quak F., 1957. - Meristeem cultuur, gecombineerd met warmtebehandeling voor het verkrijgen van virusvrije anjers. Tijdschr. Pl. Ziekten., **63**, 13-14.

Quak F., 1961. - Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus free-plants. Adv. Hortic. Sci. Appl., **1**, 144-148.

Quak F., 1964. - Het aardbeiras Glasa virusvrij. Mededel. Dir. Tuinbouw., **27**, 545.

Quak F., 1977. - Meristem culture and virus-free plants. In: Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture (Reinert & Bajaj, ed.), 598-615. Springer-Verlag, New York.

Quoirin M. & Lepoivre P., 1977. - Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus. Acta Hortic., **78**, 437-442.

Rabéchault H. & Martin J.P., 1976. - Multiplication végétative du Palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. C.R. Acad. Sci., Sér. D., **283**, 1735-1737.

Raghavan V. & Jacobs W., 1961. - Studies on the floral histogenesis and physiology of Perilla. II. Floral induction in cultured apical buds of P. frutescens. J. Bot., **48** 751-750.

Raman K. & Greyson R., 1974. - In vitro induction of embryoids in tissue cultures of Nigella damascena L. Can. J. Bot., **52**, 1988-1989.

Rancillac M., 1973a. - Etude histophysiologique de l'ontogenèse du méristème néoformé chez Cichorium intybus l. Actes 96e Congr. Soc. Sav. Sci., **4**, 61-69.

Rancillac M., 1973b. - Néoformation de bourgeons et induction florale en culture de tissues: étude histophysiologique. Thèse Paris, 97 p.

Rancillac M., 1979. - Mise au point d'une méthode de multiplica-

tion végétative in vitro du Pin maritime (Pinus pinaster Sol.) pour la constitution de clones à partir de semences. AFOCEL, Etudes et Recherches, **12**, 41-56.

Rangan T., 1974. - Morphogenic investigations on tissue cultures of Panicum miliaceum. Z. Pflanzenphysiol., **72**, 456-459.

Rangan T., 1976. - Growth and plantlet regenration in tissue culture of some indian millet: Paspalum scrobiculatum L., Eleusine coracana Gaertn and Pennisetum typhoideum Pers. Z. Pflanzenphysiol., **78**, 208-216.

Rangaswamy N.S., 1961. - Experimental studies on female reproductive structures of Citrus microcarpa Bunge. Phytomorphology, **11**, 109-127.

Rangaswamy N. & Promila A., 1972. - Morphogenesis of the adult embryo of Azadirachta indica A. Z. Pflanzenphysiol., **20**, 367-374.

Rao A., 1969. - Tissue culture from bulbil of Discorea sansibarensis. Can. J. Bot., **47**, 565-566.

Rao A., 1977. - Tissue culture in the orchid industry. In: Plant cell, tissue and organ culture. Ed. Reinert and Bajaj, 18-69.

Rao P., Handro S. & Harada H., 1973. - Hormonal control of differenciation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of Petunia inflata and Petunia hybrida. Physiol. Plant., **28**, 458-463.

Rao P., Handro W., & Harada H., 1973. - Bud formation and embryo differenciation in in vitro cultures of Petunia. Z. Pflanzenphysiol., **69**, 87-90.

Rao P.,& Narayanaswamy B., 1970. - Differenciation ex ovulo of embryos and plantlets in stem tissue cultures of Tylophora indica. Physiol. Plant., **23**, 140-144.

Rao P.S., 1965. - In vitro induction of embryonal proliferation in Santalum album L. Phytomorphology, **15**, 175-180.

Ratnamba S. & Chopra R., 1974. - In-vitro induction of embryoids hypocotyls and cotyledons of Anethum graveolens seedlings. Z. Pflanzenphysiol., **73**, 452-455.

Reinert J., 1958. - Morphogenese und ihren Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. Naturwissenschaften, **45**, 344-345.

Reinert J., 1968. - Factors of embryo formation in plant itssues

cultivated in vitro. In: Les cultures de tissues de platnes. Colloq. CNRS., **920**, 33-39.

Reinert J., Backs D. & Krösing M., 1966. - Faktoren der Embryogenese aus Umbelliferen. Planta, **68**, 375-378.

Reinert J., Backs-Hüsemann J. & Zerban H., 1971. - Determination of embryo and root formation in tissue cultures of Daucus carota. In: Les cultures de tissues de plantes. Colloq. Int. CNRS., **193**, 261-268.

Reinert J. & Bajaj Y., 1977. - Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, New York, 803 p.

Reuveni O., Bar-Akiva A. & Sagiv J., 1977. - Organic acids and potassium requirements of callus tissue derived from organe peel. Acta Hortic., **78**, 123.

Reuveni O. & Lilien-Kipnis, 1974. - Studies of the in vitro culture of data palm (Phoenix deutylifera L.) tissues and organ. Agric. Res. Org. Volcani Center, Pamphlet no. 145, 40 p.

Richards F., 1948. The geometry of phyllotaxis and origin. In: Growth and differenciation in relation to differenciation and morphogenesis. Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge, U. Press., 217-245.

Ringe F. & Nitsch J.P., 1968. - Conditions leaing to flower formation on excised Begonia fragments cultured in vitro. Plant Cell Physiol., **9**, 639-652.

Risser P. & White P., 1964. - Nutritional requirements of spruce tumor cells in vitro. Physiol. Plant., **17**, 3, 620-635.

Rivière S. & Muller J.F., 1974. - Résultats obtenus par la multiplication végétative in vitro des bourgeons souterrains de l'Asparagus officinalis L. C.R. Acad. Sci., Sér. D., **279**, 899-902.

Robbins W., 1922. - Cultivation of excised root tips and stem tip under sterile conditions. Bot. Gaz., **73**, 376-390.

Roest S. & Bokelmann G., 1973. - Vegetative propagation of Chrysanthemum cinerariaefolium in vitro. Scientia Hortic., **1**, 120-122.

Rogozinska J. & Goska M., 1978. - Induction of differenciation

and plant formation in isolated sugar beet leaves. Bull. Acad. Pol. Sci., **26**, 343-345.

Rossini L., 1970. - Induction de la floraison chez les fragments de feuilles cultivés in vitro. In: Cellular and molecular aspects of floral induction. Symp. Liège., 1967. 383-395.

Rutkowski E., 1971. - How meristems multiply. Am. Orch. Soc. Bull., **40**, 616-622.

Sacristan M. & Melchers G., 1969. - The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. Mol. Gen. Genet., **105**, 317-333.

Sagawa Y., 1961. - Vegetative propagation of Phalaenopsis by stem cuttings. Am. Orchid. Soc., Bull., **30**, 808s-809.

Sagawa Y. & Sehgal O., 1967. - Aspetic stem propagation of Vanda Miss Joaquim. Pacific Orchid. Soc. Bull., **25**, 17-18.

Sagawa Y. & Shoji T., 1971. - Clonal propagation of Dendrobiums through shoot meristem culture. Am. Orchid. Soc. Bull., **36**, 856-859.

Sangwan R. & Harada H., 1975. - Chemical regulation of callus growth, organogenesis, plant regeneration and somatic embryogenesis in Antirrhium majus tissue and cell culture. J. Exp. Bot., **26**, 869-881.

Sangwan R. & Harada H., 1977. - Cellular totipotency in Chrysanthemum tissues cultured in vitro. Acta Hortic., **78**, 237-248.

Sastri R., 1963. - Morphogenesis in plant tissue cultures. In: Plant tissue and organ culture. Symp. (Maheshwari et Rangaswamy ed.&, 105-107.

Schenk R. & Hildebrandt A., 1972. - Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., **50**, 199-204.

Schoute J., 1913. - Beitrage zur Blattstellungslehre. I. Die Theorie. Rec. Trav. Bot. Neerl., **10**, 153-325.

Schroeder C., 1968. - Adventive embryogenesis in fruit pericarp tissue in vitro. Bot. Gaz., **129**, 374-376.

Schroeder C., Kay E. & Davis L., 1962. - Totipotency of cells from fruit pericarp tissue in vitro. Science, **138**, 595-596.

Schwabe W., 1959. - Some effects of environmental and hormone treatment on reproductive morphogenesis in the Chrysanthemum.

J. Linn. Soc., (Bot&, **56**, 254-261.

Scully R., 1966. - Stem propagation of Phalaenopsis. Am. Orch. Soc. Bull., **35**, 40-42.

Seabrook I., Cumming B. & Dionne L., 1976. - The in vitro induction of adventitious shoot and root apices on Narcissus cultivar tissue. Can. J. Bot., **54**, 814-820.

Sehgal O., 1972. - In-vitro induction of polyembryony in Ammimajus. Curr. Sci., **41**, 263-264.

Shanthz E. & Steward F., 1952. - Coconut milk factor: the growth promoting substances in coconut milk. J. Am. Chem. Soc., **74**, 6133-6135.

Sharp W., Caldas L., Crocomo O., Monaco L. & Carvalho A., 1973. - Production of Coffea arabica callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. Phyton, **31**, 67-74.

Sheridan W., 1968. - Tissue culture of the monocot Lilium. Planta, **82**, 189-199.

Shimada T., Sasakuma T. & Tsunewaki K., 1969. - In vitro culture of wheat tissues. I. Callus formation organ redifferenciation and single cell culture. Can. J. Genet. Cytol., **11**, 294-304.

Singh H. & Sagawa Y., 1972. - Vegetative propagation of Dendrobium by flower stalk cuttings. Cité par RAO A, 1977. Tissue culture in the orchid industry. In: Plant cell, tissue and organ culture, Springer-Verlag, 44-65.

Sinnott E., 1960. - Plant morphogenesis. McGraw Hill Book Cy, Inc. London, 550 p.

Sita L., Singh R. & Iyer C., 1974. - Plantlets through shoot tip cultures in pineapple. Curr. Sci., **43**, 724-725.

Skoog F., 1944. - Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Am. J. Bot., **31**, 19-24.

Skoog F., 1957. - Conference on tissue culture. J. Nat. Cancer Inst., **19**, 578-579.

Skoog F., 1971. - Aspects of growth factors interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. In: Les cultures de tissus de plantes. Colloq. Int. CNRS, **193**, 115-136.

Skoog F. & Miller C., 1956. - Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., **9**, 118-131.

Skoog F. & Tsui, 1948. - Chemical control of growth and bud formation on tobacco stem and callus cultured in vitro. Am. J. Bot., **35**, 782-787.

Smith R. & Murashige T., 1970. - In vitro development of the isolated shoot apical meristem of Angiosperms. Am. J. Bot., **57**, 562-568.

Smith S. & Street H., 1974. - The decline of embyogenic potential of callus and suspension cultures of carrot are serially subcultured. Ann. Bot., **38**, 223-241.

Snow M. & Snow R., 1947. - On the determination of leaves. New Phytol., **46**, 5-19.

Sommer H., Brown C. & Kormanik P., 1975. - Differenciation of plantlets in long leaf pine, Pinus palustris Mill, tissue cultured in vitro. Bot. Gaz., **136**, 196-200.

Sö ndahl M.R. & Sharp W.R., 1977. - High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explans of Coffea arabica L. Z. Pflanzenphysiol., **81**, 395-408.

Spanjersberg G. & Gautheret R., 1963. - Sur les facteurs de la néoformation des racines par les tissus de Topinambours cultivés in vitro. Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., **110**, 47-66.

Stace-Smith R. & Mellor F., 1970. - Eradication of potato spindle tuber by thermotherapy and axillary buds culture. Phytopathology, **60**, 1857-1858.

Staritsky G., 1970. - Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neerl., **19**, 509-514.

Steeves T., 1961. - A study of the developmental potentialities of excised leaf primordia in sterile culture. Phytomorphology, **11**, 346-359.

Steeves T., 1962. - Morphogenesis in isolated fern leaves. In: Regeneration 20th Growth Sympos. Ed. Rudnick, 117-151. Ronald, New York.

Steeves T., Nicks M., Naylor J. & Rennie P., 1969. - Analytical studies on the shoot apex of Helianthus annuus. Can. J. Bot., **47**, 1367-1375.

Steward F., Ammirato P. & Mapes M., 1970. - Growth and development of totipotent cells. Some problems, procedures and perspectives. Ann. Bot., **34**, 761-787.

Steward F. & Caplin S., 1954. - The growth of carrot tissue explants and its relation on to the growth factors present in coconut milk. Ann. Biol., **30**, 385-398.

Steward F., Kent A. & Mapes M., 1966. - Growth and organization in cultured cells: sequential and synergistic effects of growth regulating substances. Ann. N.Y. Acad. Sci., **144**, 326-334.

Steward kF. & Mapes M., 1963. - The totipotency of cultured carrot cells. Evidence in interpretation from successive cycles of growth from phloem cells. J. Indian Bot. Soc., **424**, 237-247.

Steward F. & Mapes M., 1971a. - Morphogenesis in aseptic cell cultures of Cymbidium. Bot. Gaz., **132**, 65-79.

Steward F. & Mapes M., 1971b. - Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of Asparagus. Bot. Gaz., **132**, 70-79.

Stone O., 1963. - Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apcies. Ann. Appl. Biol., **52** 199-209.

Stone O., 1968. - The elimination of four viruses from carnation and sweet William by meristem tip culture. Ann. Appl. Biol., **62**, 119-122.

Stoutemeyer V. & Britt O., 1965. - The behaviour of tissue culture from english and algerian ivy in different growth phases. Am. J. Bot., **52**, 805-810.

Street H., 1979. - Embryogenesis and chemically induced organogenesis. In: Plant cell and tissue culture. (Sharp, Larsen, Paddock, Raghavan Ed.), Ohio U. Press. 123-152.

Sussex I., 1972. - Somatic embryos in long term carrot tissue cultures: histology cytology and development. Phytomorphology, **22**, 50-58.

Sussex I. & Frei K., 1968. - Embryoid development in long term tissue cultures of carrot. Phytomorphology, **18**, 339-349.

Takatori F., Furashige T. & Stillman J., 1968. - Vegetative propagation of asparagus through tissue culture. Hortic. Sci., **3**, 20-22.

Taylor R., 1967. - The foliar embryos of Malaxis paludosa. Can. J. Bot., **45**, 1553-1556.

Tendille C., 1974. - La multiplication végétative de l'KAsperge

Asparagus officinalis L. Influence de divers facteurs, en particulier de la nutrition minérale sur le développement des méristèmes d'Asperge et sur l'obtention d'Asperges adultes issues de ces méristèmes. C.R. Acad. Agric. Fr., 1172-1180.

Ten Houten J., Quak F. & Van der Meer, F., 1968. - Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free plant material. Neth. J. Plant Pathol., **74**, 17-24.

Tepfer S., 1953. - Floral anatomy and ontogeny in Aquilegia formosa var. truncata and Ranunculus repens. Univ. Calif. Publ. Bot., **25**, 513-648.

Thimann K., 1956. - Studies on the growth and inhibition of isolated plants parts. V. The effects of cobalt and other metals. Am. J. Bot., **43**, 241-250.

Thomas E., Hoffmann F., Potrykos I. & Wenzel G., 1976. - Protoplast regneration and stem embryogenesis of haploid androgenetic rape. Mol. Gen. Genet., **145**, 245-247.

Thomas E., Konar R. & Street H., 1972. - The fine structure of the embryogenic callus of Ranunculus sceleratus. J. Cell. Sci., **11**, 95-109.

Thomas E. & Street H., 1972. - Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of Atropa belladonna. Ann. Bot., **36**, 239-247.

Thomas E. & Vazart J., 1978. - In vitro induction and differenciation of adventitions buds on Biota orientalis (Cupressaceae). 4th Intern. Congrès of Plant tissue and cell culture. Calgary, Abstr. 110.

Thornley J., 1975. - Phyllotaxis. A mechanistic model. Ann. Bot., **39**, 491-507.

Thorpe T., 1980. - Organogenesis in vitro: structural, physiological and biochemical aspects. Int. Rev. Cytol., suppl. 11a, 71-111.

Tokin B., 1964. - Regeneration and somatic embryogenesis. In: Regeneration and wound healing. Akad. Kiado Budapest, 9-46.

Torrey J., 1950. - The induction of lateral roots by indolacetic acid and root decapitation. Am. J. Bot., **37**, 257-264.

Torrey J., 1956. - Chemical factors limiting lateral root formation in isolated Pea roots. Physiol. Plant., **9**, 370-388.

Torrey J., 1966. - The initiation of organized development in plants. In: Adv. Morphog. Acad. Press, New York, **5**, 39-91.

Tran Thanh Van M., 1965. - La vernalisation du Geum urbanum L. Étude expérimentale de la mise à fleur chez une plante vivace en rosette exigeant le froid vernalisant poir fleurir. Thèse Paris, Masson Éd., 593 p.

Tran Thanh Van M. & Chlyah A., 1974. - Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of Nicotiana tabacum L. Planta, **119**, 149-159.

Tran Thanh Van M. & Drira A., 1971. - Definition of a simple experimental system of directed organogenesis de novo: organ neoformation form epidermal tissue of Nautilocalys lynchei. Colloq. init. CNRS., **193**, 169-176.

Tripathi B., 1970 - Études sur la nutrition minérale et la néoformation de racines par les tissus de Topinambours cultivés in vitro. Colloque CNRS.**193**, les cultures de tissus de plantes, 201-213.

Tripathi B. & Saussay R., 1980. Sur la multiplication végétative de l'Actinidia chinensis Planchon. C.R. Acad. Sci., Sér. D., **291**, 1067-1069.

Vajrabhaya T., 1975. - Induction of haploidy by colchicine treatment. First Asean Orchid Conf. Bangkok, 10-15.

Van den Heede A., revu par Lecourt M., 1964. - L'art de bouturer, 8e éd., La Maison Rustique, Paris, 159 p.

Van Overbeek J., Conklin M. & Blakeslee A., 1941. - Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos. Science, **94**, 350-351.

Van Overbeek J., Conklin M. & Blakeslee A., 1942. - Cultivation in vitro of small Datua embryos. Am. J. Bot., **29**, 472-477.

Van Slogteren G., 1966. - Weefselkweek van topmeristeem van hyacint ter verkrijging van virusvrij materiaal. Ann. Rep. Lab. Flower Bulb Res., Lisse, 1967, 26.

Vardjan M. & Nitsch J.P., 1961. - La régénération chez Cichorium endivia. 1. Étude des auxines et des kinines endogènes. Bull. Soc. Bot. Fr., **108**, 363-374.

Vasil I., Hildebrandt A. & Riker A., 1964. - Endive plantlets from freely suspended cells and cells group grown in vitro.

Science, **146**, 76-77.

Vasil I. & Hildebrandt A., 1966. - VAriations of morphogenetic behaviour in plants tissue cultures. II. Petroselinum hortense. Am. J. Bot., **53**, 869-874.

Vasil I. & Vasil V., 1980. - Clonal propagation. Int. Rev. Cytol., suppl. 11A, 145-173.

Vasquez A., Davey M. & Short K., 1977. - Organogenesis in cultures of Saintpaulia ionantha. Acta Hortic., **78**, 249-258.

Veda H. & Torikata H., 1969. - Organogenesis in the meristem cultures of Cymbidium. III. Histological studies on the shoot formation at teh rhizome tips of Cymbidium goeringii Reiehb. Cultured in vitro. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., **38**, 56-60.

Vine S., 1968. - Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. J. Hortic. Sci., **43**, 293-297.

Vine S. & Jones O., 1969. - The culture of shoot tips of hop (Humulus lupulus L.) to eliminate viruses. J. Hortic. Sci., **44**, 281-284.

Wadhi M. & Mohan Ram H., 1964. - Morphogenesis in the leaf callus of Kalanchoë pinnata Pers. Phyton, **21**, 143-147.

Walkey D., 1968. - The production of virus-free rhubard by apical tip-culture. J. Hortic. Sci., **43**, 283-287.

Walkey D., Cooper V. & Crips P., 1974. - The production of virus free cauliflower by tissue culture. J. Hortic. Sci., **49**, 273-275.

Wang P. & Huang L., 1976. - Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ culture. In vitro, **12**, 260-262.

Wang S.O. & Ma S.S., 1978. - Clonal multiplication of Chrysanthum in vitro. J. Agric. Assoc. China, **101**, 64-73.

Wardell W. & Skoog F., 1969. - Flower formation in excised tobacco stem segments. I. Methodology and effects of plant hormones. Plant Physiol., **44**, 1402-1406.

Wardlaw C., 1949. - Experiments of organogenesis in ferns. Growth, **13**, 93-131.

Wardlaw C., 1961. - Growth and development of the inflorescence and flower. In: Growth in living systems. Zarrow Ed., Basic Books Inc., New York, 491-523.

Wardlaw C., 1968. - Morphogenesis in plants. A contemporary study. Methuen London, 451 p.

Wardlaw C. & Cutter E., 1956. - The effect of shallow incisions on organogenesis in Dryopteris aristata Druce. Ann. Bot., NS, **20**, 39-56.

Weathered M., Burdow J. & Henshaw I., 1978. - Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol., **89**, 141-147.

Wernicke N. & Brettell R., 1980. - Somatic embryogenesis from Sorghum bicolor leaves. Nature, **287**, 138.

Wetmore R., 1956. - The use of in vitro cultures in the investigation of growth and differenciation in vascular plants. Brookhaven Symp. Biol., **6**, 22-40.

Wetmore R. & Morel G., 1949. - Growth and development of Adiantum pedatum L. on nutrient agar. Am. J. Bot., **36**, 805-806.

Whitcomb C. & Davis L., 1970. - Anti-transpirants, a better way to root cuttings? Am. Nursery, **132**, 100-101.

White P., 1934. - Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaic on growing excised tomato roots Phytopathology, **24**, 1003-1011.

White P., 1951. - Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. Am. Rev. Plant. Physiol., **2**, 231-244.

White P., 1963. - The cultivation of animal and plant cells. Sec. ed. Ronald Press, New York, pp. 277.

Wiggans S., 1954. - Growth and organ formation in callus tissues derived from Daucus carota. Am. J. Bot., **41**, 321.

Williams R., 1975. - The shoot apex and leaf growth. Cambridge U. Press, 256 p.

Wilmar C. & Hellendoorn M., 1968. - Growth and morphogenesis of Asparagus cells cultured in vitro. Nature, **217**, 369-370.

Wimber D., 1963. - Clonal multiplication of Cymbidium through tissue culture of the shoot meristem. Am. Orchid. Soc. Bull., **32**, 105-107.

Wimber D., 1965. - Additional observations on clonal multiplication of Cymbidium through culture of shoot meristems. Cymbidium Soc. News, **20**, 7-10.

Wimber D. & Van Colt A., 1966. - Artificially induced polyploidy

in Cymbidiums. Proceed. 5th World Orchid Conf. Long Beach, California, 27-32.

Wochok Z. & Sussex I., 1975. - Morphogenesis in Selaginella. III. Meristem determination and cell differenciation. Dev. Biol., **47**, 376-383.

Wochok Z. & Sussex I., 1976. - Redetermination of cultured root tips to leafy shoots in Selaginella willdonovii. Plant Sci. Lett., **6**, 185-192.

Wright K. & Northcote D., 1973. - Differences of ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non differentiating sycamore calluses. J. Cell Sci., **12**, 37-53.

Yakuwa T., Harada T., Saga K. & Shiga Y., 1971. - Studies on the morphogenesis of Asparagus. I. Callus formation originating in the pith tissue of Asparagus spears in tissue culture. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. **40**, 230-236.

Yamada T., Nakagawa H. & Sinoto Y., 1967. - Studies on the differenciation in cultured cells. I. Embryogenesis in three strains of Solanum callus. Bot. Mag. Tokyo, **80**, 68-74.

Yamada T., Tanaka K. & Takahashi L., 1967. - Callus induction in rice, Oryza sativa. SProc. Jpn. Acad., **43**, 156-160.

Yamaguchi T. & Nakajima T., 1974. - Effect of abscissid acid on adventitions bud formation in cultured tissues derived from root tubers of sweet potato and from stem tubers of potato. 3rd Int. Congr. Plant tissue cell cult. Leicester, Abstr. 65.

Ziv M., Halévy A. & Shilo R., 1970. - Organs and plantlet regeneration of Gladiolus though tissue culture. Ann. Bot., **34**, 671-676.

Ziv M., Kanterovitz R. & Halévy A., 1973. - Vegetative propagation of Alstroemeria in vitro. Scientia Hortic., **1**, 271-277.

TREFWOORDENREGISTER

abscissinezuur 214
actieve koolstof 192, 194, 196
adventief 240
adventieve scheuten 27, 43, 240
aminozuren 211
androgenese 95, 119, 240
antiauxinen 216
antibiotica 189, 218
apex 240
apicale dominantie 36, 156
apogamie 32, 241
apomixie 32, 241
aseptie 187
autotomie 39, 42, 62, 241
auxine 83, 92, 214
axillaire scheuten 43, 71
bladmeristemen 28
bladspiralen 59, 60, 246
bladstand (phyllotaxie) 57, 61
bloemaanleg 68, 165
bollen 36, 40, 241
bulbillen 40, 241
callus 25, 26, 241
cambium 28, 29, 242
cormus (knol) 36, 245
corpus 55
cytokininen 92, 214, 216
dedifferentiatie 25, 26, 242
differentiatie 23, 242
embryogenese 243
embryoïde 47, 121, 243
enten 44
epifyl 38, 42
epifylle scheuten 38, 244
explantaat 186, 244
fellogeen 28, 29
fenolen 85, 90, 218
fibonacci 59, 244
gibberellinen 214, 217
groeilagen 53
groeistoffen 214
histogenen (van Hanstein) 53
implantaat 244
intercalaire meristemen 27, 28
juveniel 160
kankerverwekkend 84, 217
kloon 32, 137, 245
kokosnootmelk 124, 213
kunstmatige vegetatieve vermeerdering 44
marcotteren 43, 44
meristeemcultuur 45, 62, 135, 138, 159
meristemoïde 65, 245
microchirurgie 61
micro-enten 47
mineraal 196, 200, 204, 208
neotenie 112, 246
omkeerbaarheid 64, 167
orgaanvorming 25, 182, 190, 202, 246
organische verbindingen 209
organische zuren 212
orthotroop 36, 39, 160
parasexualiteit 32, 246
parastichen 59, 60, 246
parthenogenese 32, 246
plagiotroop 36, 39, 160
plastochroon 246
polyembryonie 19, 41, 42, 120, 246
primordium 63
promeristemen 26, 65, 246
propagulum 36, 246
protocorm 145, 149
protoplast 130, 247
pseudomixie 32, 247
rhizocaline 83
rhizomen 40, 188, 247
sobolen 42, 247
somatische embryogenese 18, 44, 46, 125, 128
spontane vegetatieve vermeerdering 18, 42
stekken 44
stengelknollen 247
stengelmeristemen 29, 36, 54, 135
stengelvorming 91, 247
sterilisatie 187
stolonen 36, 39, 248
thiamine 188, 211
totipotentie van de cel 47, 125, 248
tunica 55, 223
uitgangscel 55
uitloper 37, 248
variant 30, 33, 181, 248
variatie 32, 33, 249
vegetatiepunten 29, 36
vitaminen 188, 211
vitrificatie 222
vitro (in) 18, 244
winterknoppen 36, 249
wortelmeristemen 27, 29, 30, 53, 65
wortelvorming 79, 83, 249

REGISTER VAN PLANTENAMEN

Aardappel: zie Solanum tuberosum -
Aardbei: zie Fragaria -
Aardnoot: zie Arachis hypogaea -
Aardpeer: zie Helianthus tuberosus -
Actinidia chinensis 105
Adelaarsvaren: zie Pteridium aquilinum -
Adiantum 136
Agrobacterium tumefaciens 38
Ajuga reptans 39
Allium porrum 102, 169
Allium sativum 192, 143
Allium sp. 38, 241
Aloe pretoriensis 102
Alstroemeria sp. 101
Ammi majus 127
Ananas sativus 41, 143
Anthum graveolens 127
Anjer: zie Dianthus -
Anthurium scherzerianum 153, 230
Antirrhinum majus 127
Apium graveolens 127
Aquilegia sp. 56
Arabidopsis thaliana 110, 118
Arachis hypogaea 27
Armoracia rusticana 92
Asparagus officinalis 103, 126, 130, 203
Asperge: zie Asparagus officinalis -
Atropa belladonna 127
Aubergine: zie Solanum melongena -
Avena sativa 102
Azadirachta indica 103
Azalea: zie Rhododendron sp. 158
Begonia x elatior, ras 'Rieger' 65, 153, 184, 245
Begonia rex 97, 101
Begonia sp. 232
Beta vulgaris 26, 117, 163, 212
Biet: zie Beta vulgaris -
Biota orientalis 126
Bloemkool: zie Brassica oleracea botrytis -
Braam: zie Rubus sp. -
Brassica napus oleifera 102, 126, 129
Brassica oleracea botrytis 68, 93, 169, 172, 225
Brassica sp. 38
Bromus inermis 126
Bryophyllum daigremontianum 42
Caladium hortulanum 143
Calocasia esculenta 143
Carica papaya 101, 126
Carum carvi 94, 127
Cattleya sp. 151
Cheiranthus cheiri 126
Chlorophytum 41, 167
Chrysanthemum cinerariaefolium 174
Chrysanthemum morifolium 97, 101, 165, 230
Chrysanthemum sp. 143
Cichorium endivia 126
Cichorium intybus 71, 74, 113, 187, 209
Cineraria: zie Senecio cruentus -
Citrus microcarpa 42, 120, 126
Citrus sinensis 127, 211
Citrus sp. 41, 127
Coffea arabica 126
Coffea canephora 126
Coleus blumei 88, 157
Conium maculatum 127, 130
Convolvulus arvensis 101
Coriandrum sativum 127
Crassula sp. 101
Crocus soboliferus 42
Croton bonplandianum 126
Cucurbita pepo 102, 126, 129
Cymbidium sp. 96, 136, 148, 192, 210, 212
Cyperus sp. 102
Dahlia sp. 136, 143
Datura sp. 213
Daucus carota 43, 80, 122, 125, 215
Dendrobium sp. 151
Dendrophtoe falcata 129
Dianthus caryophyllus 143
Dianthus sp. 141, 158, 222
Didiscus coeruleus 127
Dioscorea floribunda 126
Dioscorea sansibarensis 102
Dracaena sp. 101
Dryopteris dilatata 63
Elaeis guineensis 126
Eleusine sp. 102
Elodea canadensis 39, 249
Epidendrum 151
Episcia 161
Eschscholtzia california 126
Eucalyptus camaldulensis 48
Eucalyptus citriodora 103
Eugenia 120
Foeniculum vulgare 127
Fragaria sp. 21, 39, 144, 154, 158
Framboos: zie Rubus idaeus -
Freesia sp. 143
Funaria hygrometica 194
Gerbera: zie Chrysanthemum morifolium -
Gerst: zie Hordeum vulgare
Geum urbanum 74
Ginkgo biloba 56
Gladiolus sp. 88, 143, 158, 230
Gladiool: zie Gladiolus -
Haver: zie Avena sativa -
Haworthia sp. 103

Hedera helix 85, 160
Helianthus annuus 57
Helianthus tuberosus 45, 217
Hemerocallis sp. 103
Hordeum vulgare 102
Humulus lupulus 143
Hyancinthus sp. 143
Hydrocharis morsus-ranae 42
Iep: zie Ulmus campestris -
Ilex aquifolia 126
Impatiens balsamina 85
Ipomoea batatas 158
Isatis tinctoria 38
Juniperus 212
Kalanchoë blossfeldiana 65, 129, 153, 245
Kalanchoë pinnata 126, 129
Klimop: zie Hedera helix -
Komijn: zie Carum carvi -
Koolzaad: zie Brassica napu oleifera -
Kroos: zie Lemna -
Kruipend zenegroen: zie Ajuga reptans -
Laeliocattleya sp. 151
Lemna 31, 35, 199
Lilium candidum 103, 110
Lilium regale 103
Lilium sp. 103, 143
Linum usitatissimum 37, 80
Lithospermum sp. 39
Lunaria annua 102, 110, 188
Lupine: zie Lupinus albus -
Lupinus albus 62
Lycaste sp. 151
Lycopersicon esculentum 93
Macleaya cordata 126, 129
Mais: zie Zea mays -
Malaxis paludosa 120
Mammillaria sp. 55
Mangifera indica 120
Mango: zie Mangifera indica -
Medicago sativa 126
Mesembryanthemum floribundum 126, 129
Miltonia sp. 151
Musa sp. 143
Muscari sp. 103
Nagelkruid: zie Geum urbanum -
Narcissus sp. 103
Nasturtium officinale 65, 82
Neostylis sp. 151
Nerine sp. 143, 158
Nicotiana tabacum 62, 95, 103, 109, 113, 16
Nigella damascena 113, 126, 129
Nymphaea sp. 27
Odontioda sp. 151
Odontoglossum sp. 151
Oliepalm: zie Elaeis guineensis -
Oost-Indische Kers: zie Tropaeolum majus -
Orchis sp. 151
Oryza sativa 102
Osmunda cinnamomea 63, 136
Panax ginseng 126
Panicum miliaceum 102
Paphiopedilum 151
Parthenocissus tricuspidata 197
Peen: zie Daucus carota -
Pelargonium sp. 97, 142, 230
Peperomia 99
Pergularia minor 126
Perilla nankinensis 74, 138, 166
Peterselie: zie Petroselinum hortense -
Petroselinum hortense 127
Petunia hybrida 127
Petunia inflata 127
Petunia sp. 144
Phaïus sp. 151
Phalaenopsis sp. 151
Pharbitis nil 165
Phoenix dactylifera 194
Phlox drummondii 103
Phyllanthus sp. 161
Physcomitrium pyriforme 210
Physcomitrium turbinatum 97
Picea glauca 126, 212
Pinus palustris 101
Pinus pinaster 101, 162
Pinus strobus 126
Plumbago indica 111, 118
Populus deltoïdes 62
Potamogeton sp. 39, 42, 249
Prunus amygdalus 103
Prunus sp. 48, 144, 207, 222
Pteridium aquilinum 31
Pyrethrum: zie Chrysanthemum cinerariaefolium -
Rabarber: zie Rheum rhaponticum -
Ranunculus asiaticus 143
Ranunculus sceleratus 126, 130
Rheum rhaponticum 143, 158
Rhododendron sp. 158
Ribes grossularia 144
Rijst: zie Oryza sativa -
Rubus idaeus 43, 144, 195, 219
Rubus sp. 38, 42
Saccharum officinarum 102, 143, 165, 234
Saintpaulia ionantha 21, 105, 184, 233
Sansevieria trifasciata 101
Saxifraga sarmentosa 40
Schorseneer: zie Scorzonera hispanica -
Scilla verna 38
Scorzonera hispanica 212
Scrophularia arguta 166

Sedum sp. 39, 42
Selaginella 66, 136
Sempervivum 40
Senecio cruentus 174
Sinapis alba 138, 166
Sium suave 127
Solanum melongena 127, 129
Solanum tuberosum 94, 136, 141, 217
Sorghum bicolor 126
Streptocarpus nobilis 111
Streptocarpus wendlandii
Suikerriet: zie Saccharum officinarum -
Tabak: zie Nicotiana tabacum -
Tarwe: zie Triticum aestivum -
Tectaria bulbifera ´ 38
Tomaat: zie Lycopersicon esculentum -
Trifolium pratense 126
Triticum sp. 102
Tropaeolum majus 62, 162
Tulipa 190
Tylophora indica 126
Ulmus campestris 103
Vallisneria spiralis 40
Vanda 151
Veldkers: zie Nasturtium officinale -
Venkel: zie Foeniculum vulgare -
Vicia faba 195
Vitis 144, 161
Vlas: zie Linum usitatissimum -
Vriesea 158
Waterlelie: zie Nymphaea -
Witlof: zie Cichorium intybus -
Witte mosterd: zie Sinapis alba -
Xanthosoma brasiliense 143
Zamia integrifolia 126
Zea mays 102, 107, 218
Zonnebloem: zie Helianthus annuus -