

...wat groeit en  
bloeit en altijd  
weer boeit...

door prof.dr. L.H.W. van der Plas

ONTVANGEN

29 NOV. 1991

ER. KARREK

Landbouwuniversiteit

664

**...WAT GROEIT EN BLOEIT  
-EN ALTJD WEER BOEIT...**

door prof.dr. L.H.W. van der Plas



**Inaugurale rede uitgesproken op 21 november 1991  
bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar in  
de Plantenfysiologie, aan de Landbouwniversiteit  
Wageningen**

## ...WAT GROEIT EN BLOEIT EN ALTIJD WEER BOEIT...

*Mijnheer de rector magnificus, dames en heren,*

In de jaren vijftig was ik een trouw luisteraar van de zondagochtend-praatjes van Dr. Fop I. Brouwer. In een korte uiteenzetting probeerde hij altijd een bepaald aspect van wat toen nog algemeen 'natuurlijke historie' heette toe te lichten, waarbij elk praatje eindigde met ...alles wat groeit en bloeit en altijd weer boeit... Mij is de volgende opbouw van deze radiopraatjes bijgebleven: eerst werd in beeldende taal een waarneming beschreven die hij (afhankelijk van het seizoen) wandelend door het bos of zittend voor het raam had gedaan. Vervolgens werd aan de hand van deze waarneming een biologisch probleem naar voren gebracht, waarbij er vaak op werd gewezen dat iets dat wij als 'normaal' beschouwen bij nader inzien eerder verwonderlijk dan vanzelfsprekend is. Tenslotte legde hij iets van de biologische achtergronden van het betreffende verschijnsel uit, daarmee de toehoorder er inderdaad van overtuigend hoe boeiend alles wat groeit en bloeit altijd weer is.

In deze drie stappen wordt de essentie samengevat van het werk van de biologisch onderzoeker: als startpunt de waarneming en de verwondering daarover; als volgende stap de analyse van de waargenomen verschijnselen resulterend in een toetsbare hypothese en vervolgens de opzet, uitvoering en interpretatie van experimenten waarmee deze hypothese kan worden getoetst. Graag wil ik even in de voetsporen van Dr. Fop I. Brouwer treden en bij U een aantal problemen uit de plantenfysiologie introduceren aan de hand van 'huiskamer'-waarnemingen die U allen regelmatig doet. Daartoe wil ik met U naar de bloemist gaan en een bos bloemen kopen. U verwacht dan niet anders dan dat deze afgesneden plantedelen zich niet alleen

uitstekend houden wanneer U ze thuis op water zet, maar zelfs dat ze hun ontwikkeling voortzetten. De bladeren behoren fris en groen te blijven en de soms nog groene onvolgroeide knoppen moeten zich volledig ontplooiën tot fraai gekleurde bloemen die minstens één tot twee weken goed blijven. De enige tegenprestatie die we daarbij bereid zijn te geven is af en toe het water bijvullen. Als we de bloemen wat langer op water laten staan, zien we soms dat er zich wortels vormen aan het stengelgedeelte dat in het water staat. Van dit verschijnsel maken we ook met opzet gebruik, als we planten 'stekken'.

Wellicht zonder het te beseffen maakt U in deze gevallen gebruik van een aantal eigenschappen die uniek zijn voor planten. Wanneer de schrijver Hugo Brandt Corstius in zijn boek "De reizen van pater Key" <sup>6</sup> zijn held laat arriveren in een land waar dierlijke (edele) delen voor de sier op tafel worden gezet vindt niet alleen hij, maar ook de lezer dat zeer ongewoon. Het gedurende twee weken op tafel zetten van dierlijke organen vinden we niet alleen onesthetisch en onsmakelijk; ook verwacht niemand dat dit dierlijke weefsel goed blijft, laat staan dat het doorgroeit of een verdere ontwikkeling vertoont. Bij nadere analyse van de boven beschreven waarnemingen aan onze vaas bloemen, stuiten we dan ook op een aantal belangrijke eigenschappen van de plant <sup>19</sup>, die onderwerp zijn van onderzoek binnen de plantenfysiologie:

- *groei en rust*: De in onze ogen normale uitgroei van de knoppen tot volledig uitgegroeide bloemen is bij nadere beschouwing toch niet zo vanzelfsprekend: knoppen, die zich aan een afgesneden tak van bijvoorbeeld kers of appel bevinden, ontwikkelen zich niet altijd tot de gewenste bloesem. Wanneer U

dergelijke takken in de herfst op water zet, is het resultaat teleurstellend: de gewenste bloesem ontwikkelt zich niet omdat de knoppen nog *in rust* zijn. U vindt deze takken dan ook nu niet bij de bloemist. Deze rust kan worden beschouwd als een aanpassing aan ons klimaat: daardoor wordt voorkomen dat de knoppen gedurende een zachte week in december uitlopen en vervolgens alsnog bevriezen. Pas als de zich ontwikkelende knop tegen het einde van de winter een redelijke kans heeft om te overleven, groeit hij uit. Pas dan ook biedt de bloemist bloesemtakken in knop te koop aan. De hierbij opkomende vraag (Hoe "weet" een plant dat rustknoppen bij een warme week in december niet mogen uitlopen?) leidt tot onderzoek naar de regulatie van de groei door uitwendige omstandigheden en naar de wijze waarop deze veranderingen in uitwendige omstandigheden worden waargenomen, worden 'vertaald' en aanleiding geven tot groeiverschillen. Hierbij blijken plantehormonen een belangrijke rol te spelen.

- *differentiatie*: Bij de zojuist geschetste knopgroei gaat het meestal om de voltooiing van een ontwikkeling die al veel eerder in gang is gezet: de meeste bloemdelen zijn al in aanleg in de knop aanwezig. Dit geldt niet voor de wortelaanleg bij het 'stekken': als wij de stengel niet hadden afgesneden zouden zich op die plaats nooit wortels hebben ontwikkeld. De differentiatie tot wortels is pas in gang gezet door het afsnijden en op water zetten van de stengels. Blijkbaar zijn de stengelcellen nog in staat om zich om te vormen tot wortelmeristemen; het afsnijden van de stengel zet dit omvormingsproces in gang. Uit nader onderzoek blijkt dat het plantehormoon auxine hierbij een belangrijke rol speelt: dit

wordt vanuit de stengeltop aangevoerd en hoopt zich op in de buurt van het snijvlak. We kunnen de natuur een handje helpen door wat extra auxine toe te voegen; 'stekpoeder', dat in vele vormen te koop is bevat dan ook als werkzaam bestanddeel een synthetisch auxine.

- *weefsel-specifieke produktvorming*: als we de uitgroei van een bloemknop wat nauwkeuriger bekijken, dan blijken de aanvankelijk vaak groene, gelijk-ogende cellen waaruit de verschillende bloemonderdelen zijn opgebouwd, in staat tot de vorming van een scala aan verschillende kleur- en geurstoffen. Voor de vorming van de voor de soort karakteristieke kleurpatronen is het noodzakelijk dat elke cel precies weet welke kleurstof hij in welke concentratie moet aanmaken. Daarnaast moeten de voor de soort kenmerkende combinaties van geurstoffen ook door de cellen uit het bloemweefsel worden aangemaakt, waarbij het voor de bestuiving en bevruchting (en dus voor het voortbestaan van de soort) essentieel is dat al deze stoffen op het juiste tijdstip worden gemaakt. Het lijkt onvoorstelbaar dat een dergelijke nauwkeurige coördinatie tussen deze verschillende synthesesmachinerieën steeds weer lukt. Niet alleen is de plant in staat tot de benodigde complexe syntheses, ook weet hij deze zo te sturen dat de juiste hoeveelheid van elke component wordt gemaakt in de juiste cellen op het juiste tijdstip.

Zoals U ziet levert de beschouwing van een vaas bloemen en het vervolgen van de ontwikkelingsprocessen die gedurende enkele weken optreden in dit biologisch systeem een heel scala aan interessante vragen op. Wanneer U op grond hiervan echter denkt dat een plantenfysiologisch laboratorium vol staat met

vazen bloemen, moet ik U teleurstellen. Ook daar zijn de bloemen in het algemeen beperkt tot verjaardagen en ieder die regelmatig een dergelijk laboratorium bezoekt, weet dat de verzorging van de betreffende bloemen en planten vaak niet in overeenstemming is met het hierboven geschetste belang van een dergelijk systeem voor het onderzoek.

Dat de 'vaas met bloemen' toch niet zo geschikt is als experimenteel systeem heeft twee oorzaken:

- ook als we het zakje met plantevoeding dat we vaak van de bloemist krijgen, niet vergeten zijn toe te voegen aan het water, is de voeding van de planten nog minimaal en zijn langdurige experimenten niet goed mogelijk,

- aan de hand van de kwalijke lucht, die het bloemenwater vaak verspreidt wanneer we de uitgebloeide bloemen weggooien, kunnen we constateren dat in de vaas niet alleen de bloemen maar ook allerlei microorganismen zich graag ontwikkelen. De hierbij optredende rottingsverschijnselen zijn wellicht ook interessant, maar niet uit planten-fysiologisch oogpunt.

Dit betekent dat we voor een juiste bestudering van de boven beschreven plantenfysiologische verschijnselen gedurende langere tijd de afgesneden plantedelen van voeding zullen moeten voorzien en zullen moeten plaatsen in een *steriele* omgeving. Een dergelijk "in vitro"-systeem is ideaal voor de bestudering van vraagstukken rond de regulatie van groei en differentiatie en rond de produktie van secundaire plantestoffen, zoals kleur- en geurstoffen. In de resterende tijd wil ik U dan ook gaarne schetsen hoe de bestudering van dergelijke 'weefselkweek'-systemen kan bijdragen tot de oplossing van fundamentele problemen uit de fysiologie, maar daarnaast ook heeft

geleid en verder kan leiden tot toepassingen in de land- en tuinbouw en in de biotechnologie.

Een algemene definitie van plantaardige weefselkweek is: "Het in cultuur brengen van plantedelen in een volledig steriele, geconditioneerde omgeving op een kunstmatige voedingsbodem".

Dit in cultuur brengen kan op twee manieren <sup>14,15</sup> gebeuren:

1. In de eerste plaats kunnen *bestaande delingsweefsels (meristemen)* uit de plant worden gesneden en in weefselkweek worden gebracht.

Dit komt overeen met de *uitgroei van de al aangelegde knoppen* bij de bloemen op de vaas. Hierbij kunnen meristemen uit de *stengeltop* worden gebruikt; deze worden uitgerepareerd en zullen na plaatsing op een voedingsbodem hun delingsactiviteit voortzetten en zich verder ontwikkelen. Ook stukjes stengel met *okselknoppen* kunnen als uitgangsmateriaal worden gebruikt: op een voedingsbodem kunnen de normaal rustende okselknoppen tot uitlopen worden gebracht. De daarbij gevormde scheutjes kunnen dan als uitgangsmateriaal voor nieuwe planten worden gebruikt.

2. Planten vertonen echter de bijzondere eigenschap, dat ook *cellen uit reeds gedifferentieerde planteweefsels* (stengels, bladeren, wortels) weer tot deling kunnen worden gebracht en vervolgens weer uit kunnen groeien tot nieuwe organen of zelfs een nieuw organisme. Een voorbeeld hiervan is de bovengeschetste vorming van adventief wortels bij het 'stekken'. Het is vooral deze eigenschap van de plantecel, die tot een aantal belangrijke toepassingen



van de weefselkweek-techniek heeft geleid. In een organisme bevat elke cellkern de genetische informatie voor alle eigenschappen van het organisme. Toch komt in èèn bepaalde cel maar een beperkt aantal eigenschappen ook echt tot expressie, de overige eigenschappen zijn latent aanwezig: cellen vertonen *differentiatie*. Wanneer we de differentiatie van een bepaald plantedeel kunstmatig willen doorbreken en de cellen weer tot deling willen aanzetten, is behandeling met een plantehormoon van het auxine-type vrijwel steeds noodzakelijk. Wanneer een stukje weefsel wordt behandeld met een dergelijk auxine (vaak worden daarvoor synthetisch auxinen gebruikt, zoals 2,4-dichloorphenoxy-azijnzuur, 2,4-D of naftylazijnzuur, NAA), dan ontwikkelt zich veelal een tumorachtige celklomp, *callus* genoemd. Een dergelijk callus kan in principe ongelimiteerd doorgroeien als het tenminste wordt voorzien van de juiste voedingsstoffen; vaak is een zouten-mengsel en een eenvoudige energiebron in de vorm van glucose of saccharose voldoende. Daarnaast zijn kleine hoeveelheden van enkele vitamines en van een vertegenwoordiger van een tweede groep van plantehormonen, namelijk de cytokininen vaak gewenst. Bij het induceren van een dergelijk callus wordt de volgende algemene procedure gebruikt, die bij vele planten toegepast worden kan. Na uitwendige sterilisatie van het plantedeel (blad, stengel, wortel) worden hieruit weefselstukjes gesneden. Deze stukjes worden gesteriliseerd, gespoeld met steriel water en vervolgens geplaatst op een agar-voedingsbodem, die het bovengenoemde mengsel van zouten, enkele vitamines, suiker, auxine en cytokinine bevat. Door de aanwezigheid van het auxine worden de cellen aangezet tot deling, wat leidt tot het zichtbaar worden

van kleine 'plukjes' callusweefsel na ongeveer een week. Daarna zet de groei door tot een grote klomp callusweefsel is gevormd, waarin van het oorspronkelijke weefsel nauwelijks nog iets terug te vinden is. Wanneer er eenmaal een ongedifferentieerd callus is geïnduceerd, zijn er een aantal mogelijkheden. In de eerste plaats is het mogelijk om de stukjes regelmatig over te enten en zo een blijvende callusgroei tot stand te brengen: een 'oneindig' doorgaande, ongedifferentieerde groei is dan het resultaat. In de tweede plaats kunnen de callusstukjes overgebracht worden naar een erlenmeyer met vloeibaar medium. Wanneer deze erlenmeyers op een schudplateau worden geplaatst laten er cellen los van het callus en komen terecht in het medium. Wanneer met deze losse cellen verder gewerkt wordt, ontstaat een *celsuspensie*. Ook deze celsuspensie kan 'eindeloos' doorgekweekt worden door hem regelmatig over te enten in vers medium.

In de derde plaats is ook de weg terug weer mogelijk: door de samenstelling van het voedingsmedium te veranderen kunnen de aanvankelijk ongedifferentieerd groeiende cellen, weer tot differentiatie worden gebracht. Vaak kan deze differentiatie worden opgewekt, door de verhouding te veranderen tussen de in het medium aanwezige plantehormonen: wanneer een overmaat aan *cytokinine* wordt gegeven worden *scheuten* geïnduceerd, terwijl een relatief overschot aan *auxine* de *wortelvorming* bevordert: zo is *regeneratie van nieuwe planten* weer mogelijk. Hoewel er vaak soort-specifieke problemen optreden, die de regeneratie bemoeilijken, is deze toch voor vele planten mogelijk gebleken. Behalve regeneratie vanuit een callus of celsuspensie, is soms ook een snelle regeneratie mogelijk vrijwel direct uit de

lichaamscellen van de plant, zonder een callus-tussenfase. Ook in de natuur wordt een dergelijke regeneratie soms waargenomen, zoals bij bladstekken van Begonia.

De mogelijkheden om plantecellen in weefselkweek te brengen en er vervolgens ook weer plantjes uit te regenereren leken aanvankelijk een plantaardige extravagantie, die vooral wetenschappelijk interessant was: het schiep de mogelijkheid om allerlei processen uit de ontwikkelingsbiologie te bestuderen. Tegenwoordig wordt deze techniek echter ook op ruime schaal toegepast in verschillende velden van de 'toegepaste botanie' <sup>16</sup>.

Graag wil ik weer terugkomen op de plantenfysiologische probleemvelden, die ik in het begin heb geschetst en met behulp van een aantal voorbeelden weergeven hoe de kweek van planten(delen) in vitro kan worden gebruikt bij het oplossen van onderzoeksvragen op deze gebieden. Tevens wil ik hierbij de relaties weergeven tussen deze probleemvelden en de praktische toepassing van plantenweefselkweek.

### 1. *Groei in vitro en regeneratie*

Uitgroei van reeds bestaande meristemen in vitro komt het dichtst bij het huiskamerexperiment met de vaas met bloemen: stukjes stengel voorzien van een okselknop of van een bloemknop worden in een buis op een voedingsbodem gebracht waarna de knop zich verder ontwikkelt tot een scheut of bloem.

Een dergelijk systeem is zeer aantrekkelijk voor fysiologische experimenten: zo kunnen door aan de voedingsbodem of -oplossing stoffen toe te voegen of daaruit stoffen weg te laten de effecten van deze

stoffen worden vervolgd en kunnen conclusies worden getrokken over hun mogelijke rol in de plant. Bij intacte planten worden de meeste stoffen niet opgenomen, doordat de epidermis van stengel en wortel een natuurlijke barrière vormt die zeer selectief is ten aanzien van de opname van de meeste toegevoegde stoffen wat de bestudering van hun effecten op het metabolisme sterk bemoeilijkt.

Op ons laboratorium wordt, in samenwerking met het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse, de regulatie van de stengelgroei van de tulp op deze wijze onderzocht<sup>17</sup>. Tulpen hebben om een bloemstengel van de goede lengte te kunnen geven een langdurige koudebehandeling nodig: zo is bij bollen van de cultivar 'Apeldoorn' een bewaarperiode van 12 weken bij 5 °C gebruikelijk, voordat ze worden opgeplant. Wanneer de bollen deze koudebehandeling niet krijgen, blijven de stengels kort en blijft de bloem verstopt tussen de bladeren. Bij verschillende soorten planten is vastgesteld dat een plantehormoon van het gibberellinetype bij deze effecten van kou op de groei een rol speelt. Vermoed wordt dat dit ook geldt voor de tulp. Hierbij is het mogelijk dat de hoeveelheid gibberelline die in de tulp wordt gemaakt verandert onder invloed van koude of dat de gevoeligheid voor dit hormoon toeneemt. Een van de strategieën om deze vragen te beantwoorden bestaat uit het uitprepareren van de bloemknop uit al dan niet met koude behandelde bollen, waarna de knop wordt gesteriliseerd en wordt overgebracht naar een voedingsoplossing. Door aan het voedingsmedium een gibberelline toe te voegen kan worden getest of dit gibberelline de koudebehandeling kan vervangen; ook kan worden nagegaan welk van de gibberellinen het meest effectief is (er zijn meer dan 80 moleculaire

vormen beschreven), hoeveel (of liever hoe weinig) gibberelline nog effect heeft en of deze gevoeligheid voor gibberelline door de koudebehandeling verandert.

Ook in de praktijk van de tuinbouw worden zich in de buis ontwikkelende meristemen zeer uitgebreid toegepast: bij de vegetatieve vermeerdering via weefselkweek wordt vaak uitgegaan van een meristeem (geïsoleerd uit de top of de okselknop van een plant) dat in de gelegenheid wordt gesteld uit te groeien tot een scheut. Deze scheut wordt vervolgens in de gelegenheid gesteld om wortels te regenereren waarna het nieuwe plantje kan worden overgebracht naar de grond. Bij deze *vegetatieve vermeerdering via weefselkweek* kan het aantal exemplaren dat binnen korte tijd vanuit één individu kan worden verkregen zeer groot zijn, hetgeen commerciële toepassing van deze vermeerderingstechniek aantrekkelijk maakt. Wanneer wordt bekeken hoe in Nederland de ontwikkeling is geweest van deze commerciële toepassing van de vermeerdering via weefselkweek, dan zien we dat in de jaren tachtig de hoeveelheid in vitro vermeerderde plantjes vertienvoudigde tot meer dan 60 miljoen in 1988. Wanneer U in de winkel een Kaaps Viooltje koopt of een bloemstuk waarin Gerbera's zijn verwerkt, dan zijn deze planten waarschijnlijk via weefselkweek vermeerderd: alleen al in Nederland worden jaarlijks meer dan 10 miljoen Gerbera-plantjes "in de buis" gekweekt. Ook de populaire krulvaren en de lelie zijn goed voor vele miljoenen plantjes per jaar.

Maar tevens zien we dat het aantal soorten dat op deze wijze wordt vermeerderd maar beperkt is: deze drie soorten zijn samen goed voor meer dan twee derde van het totale aantal via weefselkweek

vermeerderde planten. De redenen voor deze toch nog beperkte toepassing van de eigenlijke weefselkweekvermeerdering op commerciële schaal zijn voor een deel van fysiologische aard: een goed 'recept' voor een snelle vermeerdering met hoge opbrengst en weinig uitval is nog lang niet voor alle plantesoorten bekend. Sommige planten zijn 'recalcitrant' en het mechanisme van de regeneratie behoeft dan ook nog veel onderzoek. Regeneratie via weefselkweek is een typisch voorbeeld van een gecompliceerd biologisch ontwikkelingsproces dat reeds wordt toegepast voordat men de fysiologische basis ervan goed kent: het plantaardig systeem blijft dan een "black box". Meer fundamentele kennis van deze processen is noodzakelijk voordat uitbreiding van deze toepassing van de weefselkweektechniek mogelijk is en het werk van de fundamenteel en toegepast onderzoeker gaat hierbij hand in hand. Twee voorbeelden van de fysiologische problemen die men bij de vermeerdering via weefselkweek kan tegenkomen en de wijze waarop wij via achtergrondonderzoek van de hierbij optredende fysiologische processen deze problemen proberen op te lossen, wil ik hierbij kort noemen. Het eerste heeft betrekking op het door mijn voorganger geïnitieerde onderzoek aan Kalanchoë. Het probleem is hier niet de regeneratie zelf: uitgaande van bladponsjes en gebruikmakend van de juiste voedingsmedia is het verkrijgen van 'dochterplantjes' binnen redelijke tijd geen probleem. Echter deze 'dochters' wijken soms in uiterlijk aanzienlijk af van de ouder waardoor het primaire doel van de vegetatieve vermeerdering (het verkrijgen van een groot aantal identieke nakomelingen) niet wordt bereikt. Met name opvallend is het optreden van fasciatie: vergroeide afgeplatte stengels

samengaan met afwijkingen in de bladstand <sup>3</sup>. Door een nadere analyse van het regeneratieproces binnen onze vakgroep door Huitema kon worden aangetoond dat met name het plantehormoon cytokinine (één van de bestanddelen van de voedingsmedia) hiervoor verantwoordelijk is. Met behulp van moleculair-biologische technieken kon dit op elegante wijze worden zichtbaar gemaakt: inbouw van een bacteriegen dat ervoor zorgt dat de bladponsjes zelf een grote hoeveelheid van dit hormoon gaan synthetiseren zorgt er niet alleen voor dat groei en regeneratie mogelijk worden zonder toevoeging van dit hormoon aan de voedingsbodem; ook neemt de hoeveelheid fasciatie in deze gemanipuleerde planten sterk toe. Onderzoek naar de fysiologische achtergrond van deze fasciatie levert dus enerzijds fundamentele kennis ten aanzien van de rol van dit hormoon in de regulatie van stengelgroei en -morfologie. Anderzijds leidt dit ook tot aanbevelingen met betrekking tot de wijze waarop Kalanchoë optimaal kan worden vermeerderd: wanneer men fasciatie wil vermijden, moet de hoeveelheid cytokinine in het medium zo gering mogelijk zijn en moet het zo kort mogelijk worden gegeven.

Het tweede voorbeeld heeft weer betrekking op de tulp. Hier is de problematiek ernstiger: vegetatieve vermeerdering van de tulp via weefselkweek vindt in de praktijk nog nauwelijks plaats. Dit in tegenstelling tot iris en lelie waarbij veel minder problemen optreden. Wanneer explantaten afkomstig van tulpebolrokken worden geplaatst op een voedingsbodem voorzien van de juiste voedingsstoffen en hormonen, is de ontwikkeling van nieuwe plantjes onregelmatig en onvoorspelbaar. Vaak sterven de explantaten af of vormen zich bladachtige structuren,

zonder groeipunt. Hoewel er zich af en toe goede plantjes ontwikkelen en ook hier regeneratie dus in principe mogelijk is, spelen blijkbaar een of meer nog onbekende factoren mede een rol <sup>13</sup>. Een analyse van de fysiologische veranderingen die in het explantaat optreden na het uitsnijden zal daarom in ons laboratorium worden uitgevoerd. Het afsterven van de tulpenexplantaten gaat gepaard met verbruining van het weefsel. Zijn deze bruine stoffen de oorzaak van het afsterven of zijn afsterven en verbruining beiden een gevolg van het lek worden van de membranen in de cellen van het explantaat en het daarmee gepaard gaande verlies aan celcompartimentatie? Zijn tulpenmembranen gevoeliger voor aantasting door luchtzuurstof (die bij het aansnijden van de bolrok vrij toegang krijgt) <sup>2</sup> dan de membranen van andere bolgewassen? Of keren de in de cellen aanwezige, voor de tulp specifieke, afweerstoffen tegen microorganismen zich tegen hun maker doordat ze bij het aansnijden in zulke grote hoeveelheden vrijkomen dat ze de tulpecellen laten afsterven? De antwoorden op deze en andere vragen zullen zowel het inzicht in het regeneratieproces bij planten in het algemeen vergroten als ook kunnen leiden tot het wegnemen van de belemmeringen bij het vermeerderen van de tulp via weefselkweek.

### *Embryogenese en kunstzaden*

Een fascinerende ontwikkeling in het toch al grote scala aan mogelijkheden dat de plant biedt op het terrein van de regeneratie is de zogenaamde *somatische embryogenese*. Hierbij wordt in zekere zin teruggegrepen op de door de natuur toegepaste methode: vermeerdering via het induceren van



embryo's. Normaal vinden we embryo's alleen als resultaat van de bevruchting en maken ze deel uit van het zich ontwikkelende zaad. Onder speciale condities kunnen dergelijke embryo's zich echter ook ontwikkelen uit 'gewone' (somatische) plantecellen, los van de generatieve processen. Deze soms massale vorming van somatische embryo's is vooral indrukwekkend bij celsuspensies van sommige planten<sup>1</sup>. Wanneer bijvoorbeeld celsuspensies van de peen (groeïend in een medium met een toegevoegd auxine) honderd maal worden verdund in een medium zonder auxine, treedt een synchrone inductie van embryoïden op, die kunnen uitgroeien tot "echte" embryo's. Deze zogenaamde 'somatische' embryo's kunnen vervolgens weer uitgroeien tot een gewone plant.

Deze techniek van het synchroon induceren van embryo's in een celsuspensie biedt de mogelijkheid om een aantal fysiologische processen te onderzoeken, die tot voor kort nauwelijks experimenteel konden worden aangepakt. Normale (zygotische) embryo's zitten vaak alleen of in kleine aantallen "verstopt" in de zaden van een zich ontwikkelende vrucht: hun specifieke eigenschappen en de regulatie van hun ontwikkeling zijn daardoor moeilijk te bestuderen. Wanneer embryogenese in een celsuspensie worden opgewekt, is het mogelijk miljoenen embryo's gelijk te laten ontwikkelen die 'bloot' in een voedingsmedium rondzweven. Embryogene celsuspensies worden daarom binnen onze vakgroep gebruikt als een modelsysteem voor de bestudering van differentiatie: zo zal o.a. worden nagegaan welke voedingsstoffen nodig zijn om de snelle ontwikkeling van de embryo's mogelijk te maken en hoe het suiker- en energie-metabolisme zich heeft aanpast aan de bijzondere eisen die een embryo in de verschillende fasen van

**zijn ontwikkeling stelt <sup>1</sup>.**

Embryo's in een zaad vertonen de bijzondere eigenschap dat ze een hoge uitdroogtolerantie bezitten. Is de ontwikkeling van een zaad eenmaal voltooid, dan gaat het meestal over in een rusttoestand waarbij het indroogt onder verlies van het grootste deel van het water. Op deze wijze kan een zaad vele jaren overleven. Wanneer het daarna weer in contact met water wordt gebracht, blijkt dit uitdroogproces volledig reversibel te zijn: de cellen nemen weer water op, het metabolisme wordt geactiveerd en de ontwikkeling van het embryo tot een nieuwe plant kan beginnen. Dit behoud van vitaliteit na uitdrogen stelt bijzondere eisen aan de cellen van het embryo: zo zijn de membranen van normale cellen niet in staat om uitdrogen te doorstaan omdat ze hetzij tijdens het indrogen hetzij tijdens de daarop volgende hydratatie lek worden. Bovendien kan het binnendringen van luchtzuurstof schade veroorzaken: de aantasting van membraanvetten door oxidatieprocessen kan ook weer leiden tot membraanschade en membraanlekkage <sup>2</sup>. De vervolgens optredende vermenging van de inhoud van de verschillende celcompartimenten is dodelijk. Zaadembryo's moeten een mechanisme hebben ontwikkeld om hun membranen tegen de nadelige gevolgen van indrogen en hydratatie en tegen de aantasting door luchtzuurstof te beschermen. Somatische embryo's die zich in een celsuspensie ontwikkelen zijn niet zonder meer bestand tegen uitdrogen; hiervoor zijn extra toevoegingen aan het voedingsmedium noodzakelijk, waarbij o.a. het plantehormoon abscisinezuur een rol speelt. De fysiologische eigenschappen van het mechanisme van de uitdroogtolerantie en de factoren waarvan deze afhankelijk is, worden binnen onze vakgroep

bestudeerd aan somatische embryo's door Hoekstra en Tetteroo<sup>11</sup>. In de eerste plaats wordt op deze wijze inzicht verkregen in de manier waarop droogte-tolerantie in planten wordt gerealiseerd; daarnaast is een volledig begrip van de fysiologie van het reversibel indrogen en weer water opnemen noodzakelijk voordat somatische embryogenese ook in de praktijk kan worden toegepast. Indien dergelijke embryo's namelijk kunnen worden ingedroogd en in rust gebracht (vergelijkbaar met de gang van zaken bij de normale zaadontwikkeling), en vervolgens een beschermende laag (een 'coating', die als kunstmatige zaadhuid dienst doet) wordt aangebracht, zouden ze kunnen worden gebruikt als *kunstzaden*. Hoewel deze praktische toepassing nu nog in de kinderschoenen staat, zou dit de mogelijkheid kunnen bieden om een vrijwel onbegrensd aantal nakomelingen van één, zeer gewenst genotype uit te zaaien.

### *Veredeling en weefselkweek*

Bij de praktische toepassing van de techniek van vermeerdering via weefselkweek kunnen twee typen toepassing worden onderscheiden: de *produktie van plantmateriaal* voor de eigenlijke teelt en de *produktie van basismateriaal*: alleen dit basismateriaal (bijvoorbeeld de eerste virusvrije planten, de eerste partij van een nieuwe variëteit etc.) wordt geleverd via de weefselkweek, de 'gewone' vermeerdering vindt daarna plaats via andere technieken. Vaak gaat het hier om de vermeerdering van plantmateriaal met bijzondere eigenschappen dat via veredeling is ontstaan.

In de laatste jaren wordt steeds meer getracht om via moleculair-biologische technieken direct de genetische

eigenschappen van een plantecel te manipuleren in de gewenste richting. Bij de verschillende vormen van moleculair-biologische manipulatie wordt uitgegaan van losse cellen, geïsoleerd uit de plant. Om profijt te hebben van deze gemodificeerde eigenschappen zullen uit de gemanipuleerde cellen weer complete planten moeten worden geregenereerd. Ook als de eigenlijke vermeerdering vervolgens via conventionele technieken kan plaatsvinden, zal er toch een eerste uitgangspunt noodzakelijk zijn, die als basis voor deze conventionele vermeerdering kan dienen. *De mogelijkheden om de gemanipuleerde cellen te regenereren tot planten is dan ook essentieel voor deze toepassing: de ontwikkelingen binnen de plantaardige weefselkweek hebben deze moleculair-biologische veredelingsstechnieken mogelijk gemaakt en onderzoek naar de achtergronden van het regeneratieproces, met als doel regeneratie van cel tot plant te doorgronden en te beheersen is dan ook onlosmakelijk verbonden met deze 'moleculaire veredeling'.*

## *2. Secundair metabolisme en de produktie van secundaire stoffen via weefselkweek*

Graag wil ik weer een moment met U terug naar de bos bloemen die we aan het begin hebben aangeschaft. Wanneer we bij de bloemist een keus moeten maken, dan valt dat ons vaak moeilijk door de grote variatie aan kleuren en geuren; als deze grote variatie er niet was zouden we ongetwijfeld minder vaak terugkomen om een nieuwe bos uit te zoeken. Kleur en geur worden veroorzaakt door vertegenwoordigers van een groep plantestoffen die wellicht wat denigrerend als secundaire plantestoffen wordt aangeduid. Toch is het

vermogen om dergelijke stoffen te maken een eigenschap die even uniek is als de (veel bekendere) fotosynthese: de mens is voor zijn voeding afhankelijk van de *primaire* produktie van plantaardige 'bulk'-grondstoffen in voldoende kwantiteit, maar een groot aantal aspecten van de kwaliteit van ons dagelijks leven wordt juist door deze *secundaire* stoffen bepaald: zij geven, zowel letterlijk als figuurlijk, kleur aan ons dagelijks leven, en dat niet alleen via de bos bloemen van de bloemist.

Planten zijn in staat tot de synthese van een onvoorstelbare diversiteit aan deze secundaire metabolieten, waarvan de chemische structuur zeer verschillend kan zijn: alkaloiden, flavonoïden, anthrachinonen, terpenen behoren allen tot deze groep. Hun complexe structuur is wellicht tegelijk aantrekkelijk (voor fytochemici) en afschrikwekkend (voor sommige biologen), maar roept in elk geval bewondering op voor de planten die in staat zijn deze stoffen te maken. Vaak is deze synthese dan nog beperkt tot speciale groepen cellen in een bepaalde fase van de levenscyclus: in een naburige groep cellen of op een ander tijdstip worden weer andere producten gemaakt. Hun voorkomen kan beperkt zijn tot enkele plantesoorten; anderzijds kan in één plantesoort een reeks van metabolieten (in vaak lage concentraties) voorkomen. Deze grote variatie aan verbindingen en daardoor aan syntheseroutes en de complexiteit van de uitgevoerde reacties zijn er de oorzaak van dat de wijze waarop de synthese van secundaire stoffen in de plant plaatsvindt en wordt gereguleerd vaak nog zeer slecht bekend is. Dit gebrek aan achtergrondkennis met betrekking tot het secundair metabolisme wordt des te meer gevoeld, nu de belangstelling voor de rol

van deze produkten en hun mogelijke toepassing steeds meer toeneemt.

Deze belangstelling was in eerste instantie een gevolg van het feit dat voor de toepassing van planten de erin aanwezige secundaire stoffen uiterst belangrijk zijn: van oudsher worden plantedelen als specerijen gebruikt vanwege de erin aanwezige geur- en smaakstoffen of worden er reukstoffen (voor bijvoorbeeld parfums) en kleurstoffen uit gewonnen. Daarnaast vormen planten een belangrijke bron van geneesmiddelen: hierbij betreft het zowel stoffen, die in grote hoeveelheden kunnen worden gewonnen (kinine, morfine etc.) als om produkten die in zeer lage concentraties voorkomen en waarvoor een uitgebreide opwerking nodig is (zoals de cytostatica vincristine en vinblastine). Ook is kennis over het voorkomen van secundaire stoffen belangrijk omdat een hoge concentratie in voedingsmidelen schadelijke effecten hebben kan (bijv. alkaloiden in aardappel en cyanogene glycosiden in cassave) Tenslotte behoren de meeste verdovende en hallucinogene stoffen ook tot de secundaire plantestoffen.

Het zoeken naar nieuwe toepassingen gaat samen met een vergrote belangstelling voor de functie van deze stoffen in de plant: ze ontleen hier hun betekenis aan hun rol in de bloembioïogie (bloemkleur- en geurstoffen) en vervullen daarnaast een rol als signaalstoffen (zowel voor insekten als bijvoorbeeld in de interactie met stikstoffixerende microorganismen) en als afweerstoffen tegen dieren (tegen vraat door grote herbivoren en insekten: "antifeedants") en microorganismen (fytoalexinen). Het streven naar toepassing van 'natuurlijke' insekticiden heeft de belangstelling voor fundamenteel onderzoek naar de oecologische rol van deze secundaire stoffen en de

wijze waarop bijvoorbeeld antifeedants en signaalstoffen insecten beïnvloeden doen toenemen.

*Fysiologisch onderzoek naar secundair metabolisme in weefselkweek*

Daarnaast maakt het feit dat vele secundaire stoffen voor de primaire levensfuncties van de plant niet direct noodzakelijk zijn, secundaire stofwisselingsroutes juist zeer geschikt om de fundamentele principes van regulatie op genetisch en fysiologisch niveau te onderzoeken: aan- en uitschakelen van bijvoorbeeld de eiwitsynthese heeft directe gevolgen voor het overleven van de cellen, aan- en uitschakelen van de synthese van een kleurstof niet. De expressie van de secundaire stofwisseling kan beperkt zijn tot bepaalde levensstadia (jonge vs. oude delen van de plant) of weefsels (kleurstoffen beperkt tot bijvoorbeeld bloemen, meeldraden of wortels). Ook treedt de produktie van sommige metaboliëten pas op na toediening van een bepaalde prikkel (fytoalexinen na infectie, flavonoiden na UV-bestraling). Dit maakt de aanschakeling van syntheseroutes van het secundair metabolisme tot een ideaal modelsysteem voor fundamenteel onderzoek naar bijvoorbeeld signaaltransductie of weefsel specifieke genexpressie. Wanneer we deze aanschakeling bestuderen in homogene celsuspensies uitgaande van ongedifferentieerde cellen hebben we een eenvoudig model voor differentiatie, dat ons veel kan leren over de complexe regulatieprocessen die er tijdens de ontwikkeling van een plant optreden. Zo kon met een dergelijk systeem door Hagendoorn<sup>10</sup> worden vastgesteld dat de plasmamembraan, en met name de pH-gradiënt over deze membraan een

belangrijke rol kan spelen bij de aanschakeling van een zeer algemeen voorkomende route uit het secundair metabolisme, de zog. fenypropanoidroute die leidt tot de synthese van lignine, één van de bestanddelen van hout. Wanneer bij celsuspensies van *Petunia* het transport van protonen over de membraan wordt geblokkeerd of door een verhoging van de medium-pH deze pH-gradiënt wordt verstoord, worden eerst de enzymen die de precursors leveren voor de vorming van lignine aangemaakt. Vervolgens wordt ook het lignine zelf aangetroffen: de cellen reageren op lignine-specifieke kleurstoffen en ook blijven ze kleiner, waarschijnlijk omdat het lignine de celwanden minder flexibel maakt en de cellen daardoor minder strekken. Het plantehormoon auxine blijkt deze ligninesynthese negatief te kunnen beïnvloeden. Normaal bevindt zich in het groei-medium van de *Petunia*-cellen auxine in een hoge concentratie; verlagen we deze concentratie dan neemt de synthese van lignine aanzienlijk toe. Van auxine is bekend dat het de protonen-uitstoot uit de cel kan verhogen; hierop berust waarschijnlijk het antagonistisch effect van auxine op de aanschakeling van de fenypropanoidroute.

Ook bij de regulatie van de synthese van andere secundaire stoffen kunnen auxinen een belangrijke rol spelen als signaal voor de start van de synthese. Een aantal plantenfamilies vormen in hun wortels kleurstoffen, die behoren tot de anthrachinonen; een bekend voorbeeld is de meekrap (*Rubia tinctorum*), waarvan de wortels rijk zijn aan het rode alizarine dat tot deze groep kleurstoffen behoort. Dit werd vroeger gewonnen om kleding te verven (het rood van de broeken van de franse soldatenuniformen uit de negentiende eeuw werd zo verkregen). Celsuspensies



kunnen ook worden aangezet tot de produktie van deze kleurstoffen <sup>21</sup>; bij èèn van de betreffende soorten (*Morinda citrifolia*) leidt een verandering in het type auxine waarmee de cellen worden gekweekt (een overgang van 2,4-D naar naftylazijnzuur) tot een aanzienlijke synthese. Of ook hier in eerste instantie het signaal aangrijpt op de plasmamembraan is nog onbekend en zal vanuit onze vakgroep nader worden onderzocht.

Het feit dat in deze gevallen een eenvoudige, manipuleerbare prikkel in een homogene populatie cellen een betrekkelijk eenvoudig differentiatie-proces op gang brengt, maakt dit tot een aantrekkelijk systeem om de regulatie van dit proces te bestuderen <sup>12</sup>.

### *Toepassing van weefselkweek voor produktie secundaire stoffen?*

Met in het achterhoofd de zoëven genoemde gekleurde celsuspensie, zou U zich af kunnen vragen of een dergelijk systeem ook niet in de praktijk zou kunnen worden gebruikt om op een industriële schaal secundaire stoffen te produceren met behulp van suspensies van plantecellen, op dezelfde wijze als bijvoorbeeld schimmelcultures worden gebruikt voor de produktie van antibiotica. In principe lijkt het mogelijk om in plaats van een akker of plantage een aantal kweekvaten van enkele kubieke meters te gebruiken en daarin cellen te kweken van het gewenste gewas. Nadat de 'fermentor' vol gegroeid is met cellen wordt de inhoud geoogst en op dezelfde wijze verwerkt als het gewas dat van het veld afkomstig is. Toch heeft de fabriek de akker nog niet vervangen; de reden daarvoor is zowel van economische als van biologische aard <sup>20</sup>. De langzame

groei van cellen in weefselkweek, de hoge eisen die aan de wijze van werken worden gesteld om de kweken vrij van infecties te houden en de relatief kostbare voedingsmedia zijn er allen oorzaak van dat de produktie van primaire produkten als zetmeel, olie en eiwit met behulp van celkweken nooit rendabel zal zijn. In vergelijking met deze 'primaire' plantestoffen zijn secundaire produkten veelal kostbaar (de kilo-prijs van sommige plantaardige geneesmiddelen, zoals de bovengenoemde cytostatica kan tot miljoenen guldens oplopen) en is een produktieproces via celkweken daardoor eerder economisch haalbaar. Verschillende biologische redenen kunnen hierbij mede een rol spelen:

- \* Soms komen de gezochte secundaire stoffen alleen voor in bepaalde organen of is het voorkomen beperkt tot de oudere delen van de plant.
- \* Lang niet alle planten waaruit secundaire stoffen worden gewonnen kunnen eenvoudig op akkers of plantages worden geteeld en men is aangewezen op het verzamelen in de vrije natuur.
- \* Het kan gaan om zeldzame planten, waarvan de voorraad in de natuur beperkt is.
- \* Kweek van plantecellen in de 'fabriek' zou de produktie onafhankelijk kunnen maken van klimaats- en weer-factoren.
- \* Bij dergelijke celkweken kan worden geprobeerd de produktie van de gewenste stoffen te manipuleren: als de concentraties in de plant laag zijn, moeten grote hoeveelheden plantaardig materiaal worden verwerkt voor een kleine hoeveelheid eindprodukt. Door gerichte sturing in celkweek kan deze opbrengst mogelijkerwijs worden verhoogd en worden gekanaliseerd naar het gewenste produkt, onder uitschakeling van zijsporen naar ongewenste produkten.

\* Misschien dat op deze wijze zelfs geheel nieuwe produkten kunnen worden verkregen, die alleen in weefselkweek worden aangetroffen, met nieuwe, onvermoede en zeer nuttige eigenschappen. Toch is de produktie van secundaire plantestoffen met behulp van plantecelkweken tot op heden nog nauwelijks van de grond gekomen en de reden hiervoor is in de eerste plaats ook een biologische: de cellen produceren de gewenste stoffen niet of nauwelijks. Dit kan eenvoudig worden geïllustreerd aan de hand van de produktie van bloemkleurstoffen, die in de plant vooral plaats vindt in de cellen van de bloemkroon, maar die niet is aangeschakeld in de meeste andere cellen van de plant. Microscopisch onderzoek van een celsuspensie laat weliswaar zien, dat er regelmatig gekleurde cellen worden aangetroffen, die in kleur vergelijkbaar zijn met de cellen uit de bloem, maar dat de meeste cellen kleurloos zijn, waardoor een celsuspensie vaak een gelige kleur heeft en niet de kleur van de bloemen van de betreffende plant. Een tweede voorbeeld hiervan wil ik U kort schetsen aan de hand van een onderzoeksproject op ons laboratorium rond het antifeedant polygodial<sup>9</sup>. Polygodial behoort tot de stoffen die sommige planten synthetiseren om de aantasting door insekten tegen te gaan. Dergelijke stoffen kunnen ook worden toegepast om bij andere planten insekten te weren. Steeds meer van dergelijke natuurlijke 'antifeedants' worden tegenwoordig bekend en toepassing ervan zou een interessant 'natuurlijk' alternatief kunnen zijn voor de nog steeds op grote schaal in gebruik zijnde klassieke 'gewasbeschermings'-middelen. Deze stoffen komen niet alleen voor in exotische gewassen: ook een eenvoudig Nederlands onkruid als de waterpeper (*Polygonum hydropiper*) is

in staat om grote hoeveelheden te produceren van een tot de sesquiterpenen behorende secundaire stof polygodial, waarvan de pepersmaak zowel voor mensen als voor insecten zeer scherp is. Deze scherpe smaak maakt het in Japan tot een geliefd specerij waarbij het in kleine hoeveelheden wordt toegepast bij allerlei visgerechten; insecten gaan liever naar een andere plant nadat ze er van geproefd hebben, hetgeen toepassing als antifeedant de moeite waard maakt. Omdat de chemische synthese van polygodial zeer gecompliceerd is en waterpeper niet eenvoudig als gewas te kweken is, lijkt produktie via celkweken een aantrekkelijk alternatief.

Het voorkomen van polygodial in de plant bevestigt zijn rol als afweermiddel tegen vraat door insecten: het komt overal voor in de bovengrondse delen en met name in de jonge bladeren en de bloemhoofdjes (die het meest bescherming behoeven). In de wortel ontbreekt het volledig. Anatomische analyse wijst erop dat het polygodial vooral voorkomt in klierachtige structuren die zich o.a. in het blad van de waterpeper bevinden. Op die wijze kan worden voorkomen dat het giftige en slecht wateroplosbare polygodial de plant schade doet. Celkweken van de waterpeper kunnen vrij eenvoudig worden opgewekt, maar deze produceren niet of nauwelijks polygodial.

Dit blijkt een algemeen beeld in celkweken: de produktie van secundaire stoffen is laag en blijkt zelfs verder te dalen bij voortgezette kweek van de cellen. Op een gegeven moment worden de concentraties dan zo laag dat winning überhaupt niet meer mogelijk is. Opheldering van de biologische principes die een rol spelen bij de aan- en uitschakeling van deze synthese is noodzakelijk, voordat een discussie over de economische haalbaarheid überhaupt zinvol is. Hierbij

moet een studie van deze regulatie in plantecelkweken hand in hand gaan met de bestudering van de stof in de plant:

- Wanneer de betreffende stof een functie heeft bij de afweer tegen microorganismen kan soms het toedienen van een vergelijkbare prikkel (bijvoorbeeld een celwandpreparaat van dit microorganisme) de synthese van het secundair metaboliet op gang brengen:

*elicitering*<sup>12</sup>. Wanneer de natuurlijke route voor de signaaltransductie bekend is, kan daarin ook direct worden ingegrepen; vergelijk de boven beschreven proeven waarbij een ingreep in de plasmamembraan leidde tot de produktie van secundaire stoffen.

- Ook kan het nuttig zijn om een gedeeltelijke *differentiatie* teweeg te brengen: gedifferentieerde plantecellen en weefsels kunnen soms in het groot worden gekweekt in kweekvaten, vergelijkbaar met de kweek van losse plantecellen. Zelfs organen kunnen zo worden vermeerderd<sup>5</sup>. Een voorbeeld hiervan vormen plantewortels. Reeds lang is bekend dat losse wortels in een voedingsoplossing lang door kunnen groeien, ook zonder dat er tegelijkertijd een 'scheut' aanwezig is. Tegenwoordig is het mogelijk om in een plantecel een specifiek stukje DNA in te bouwen (afkomstig uit een bacterie die een ziekte veroorzaakt, die bekend staat als "hairy root", haarwortelziekte) dat ervoor zorgt dat de cellen differentiëren tot worteltjes. Omdat dit DNA ook in de dochtercellen aanwezig blijft, ontstaan er tijdens de groei van een dergelijke omgevormde plantecel voortdurend nieuwe wortels, zodat een grote bos doorgroeiende wortels ontstaat. Deze wortels lijken in hun eigenschappen sterk op normale wortels, hetgeen betekent dat ook de plantaardige inhoudsstoffen vaak vergelijkbaar zijn: indien de normale wortels een bepaalde secundaire

stof produceren, doen de 'hairy-roots' dat ook <sup>7</sup>. Op een vergelijkbare wijze kunnen voor de produktie van stoffen die juist in de bovengrondse delen worden gemaakt (zoals polygodial), chloroplasthoudende celkweken of zelfs scheutcultures worden gemaakt. - Ook kan het nodig zijn om het produkt zo snel mogelijk uit de cellen te verwijderen. Sommige, vooral giftige secundaire stoffen, worden door de plant afgevoerd en opgeslagen in speciale cellen of celorganellen; vergelijk de klieren in de waterpeperplant. Indien deze opslag niet mogelijk is of wanneer deze opslagplaats vol is houdt de synthese op. Het continu onttrekken van de metabolieten (bijvoorbeeld door ze te laten oplossen in een organische fase die zo gekozen is dat hij niet giftig is voor de plantecellen <sup>4,5</sup> kan dan de cellen bewegen om door te gaan met de synthese.

Hoewel industriële produktie met behulp van celcultures nog nauwelijks in de praktijk voorkomt, is het bij celcultures afkomstig van een aantal soorten planten mogelijk gebleken om de produktie van secundaire stoffen in stand te houden en zelfs om aanzienlijk hogere gehalten te bereiken dan in de uitgangsplant. Het schoolvoorbeeld hiervan is de produktie van de rode kleurstof *shikonine* met behulp van celkweken in Japan. Shikonine is een kleurstof die in de natuur alleen wordt aangetroffen in de wortels van een soort parelzaad, *Lithospermum erythrorhizon*, een overjarige plant. Het wordt pas geproduceerd als de wortels 5-7 jaar oud zijn en dan nog in een vrij bescheiden hoeveelheid. Bovendien is de betreffende plant vrij zeldzaam en moeten de wortels worden ingevoerd, o.a. uit China en Korea. De kleurstof wordt gebruikt om zijde te verven; deels heeft het

gebruik ervan een rituele betekenis. De rode cirkel in de officiële japanse vlag is aangebracht met deze kleurstof. Ongetwijfeld heeft de wens om voor deze kleurstof (aan het gebruik waarvan duidelijk emotionele kanten zitten) niet meer afhankelijk te hoeven zijn van de import, het onderzoek naar de mogelijkheden om deze stof via weefselkweek te produceren een grote impuls gegeven. Na veel trial-and-error-onderzoek naar de juiste media die nodig zijn om deze cellen eerst te laten groeien en vervolgens te laten produceren, is het gelukt een rendabel produktieproces op te zetten, waarbij de produktie plaatsvond in kweekvaten van honderden liters en waarbij uiteindelijk meer dan 20 % van het gewicht van de cellen uit de kleurstof bestond. De produktie kon zo sterk worden opgevoerd, dat naar andere toepassingen werd uitgekeken voor deze aanvankelijk zeldzame kleurstof. Deze toepassing werd gevonden in de cosmetica: het resultaat was een lippenstift met deze kleurstof erin.

Toch zal de toepassing van weefselkweken voor dit soort produktie nog zeer bescheiden zijn, zo lang niet meer basale kennis van de produktieprocessen in de plant en de plantecel voorhanden is, met name van de regulatie ervan. Pas wanneer hierover meer informatie beschikbaar is, is gerichte manipulatie van celkweken met als doel ze tot een hoog produktiepeil te brengen, wellicht mogelijk. Tot die tijd zullen de planten zelf de belangrijkste bron blijven voor deze natuurprodukten.

## *Weefselkweek in de botanie: perspectieven*

*Dames en heren,*

Ik hoop U met deze uiteenzetting een indruk te hebben gegeven van de fascinerende mogelijkheden die het gebruik van plantecellen in vitro biedt aan de fysioloog en hoe de hier opgedane kennis ook kan worden toegepast, zowel in de land- en tuinbouw als in de biotechnologie.

Weefselkweek van planten speelt een onmisbare rol bij een aantal nieuwe ontwikkelingen in de botanie. Door het gebruik van weefselkweek worden een aantal dingen mogelijk in de nabije (of soms wat verdere) toekomst, waar tien jaar geleden nog geen sprake van was. Zonder direct in te gaan op de wenselijkheid van alle mogelijkheden die deze toepassingen ons bieden, wil ik samenvattend de volgende punten noemen:

- op basis van één plant, binnen een relatief korte tijd een groot aantal nakomelingen produceren maakt het mogelijk om bijvoorbeeld zeldzame, bijna verdwenen soorten planten weer te vermeerderen, maar ook om snel plantevariëteiten te vermeerderen, die vanuit milieu-oogpunt geschikte eigenschappen hebben: planten, die resistent zijn (of gemaakt zijn) tegen ziekten en plagen, waardoor minder bespuiting met milieu-onvriendelijke stoffen nodig is.

Gedacht kan ook worden aan planten, die geselecteerd zijn op droogte-, vorst- en zoutresistentie en daardoor in staat zijn om te groeien onder minder gunstige milieu-condities: optimale groei bij een lagere temperatuur maakt bijvoorbeeld een lagere kastemperatuur en daardoor energie-besparing mogelijk. Maar anderzijds kan selectie op optimale groei in een sterk vervuilde omgeving juist er toe



leiden dat de milieubelasting niet afneemt: de plant wordt dan aangepast aan het vervuilde milieu, niet het milieu ontlast. Een vergelijkbaar probleem doet zich voor bij de selectie van planten, resistent tegen (hoge) concentraties herbiciden: het beschikbaar komen van dergelijke planten kan zelfs bevorderend werken op het gebruik van herbiciden.

Een verdere toepassing van de vegetatieve vermeerdering zou er na enige tijd ook toe kunnen leiden dat van een bepaalde, veel geteelde plantensoort bijna alle exemplaren verwant zijn: niet alleen zou dat een directe 'esthetische' verarming kunnen zijn (als bijvoorbeeld alle laanbomen sprekend op elkaar lijken) maar ook gevaarlijk: bij een 'nieuwe' ziekte worden ze allemaal aangetast. Er moet gezorgd worden voor de 'broodnodige variatie'.

- Voor de toepassing van planteweefselkweken als bron voor secundaire stoffen geldt dat dit zou kunnen leiden tot nieuwe, farmaceutisch belangwekkende produkten en tot een gerichte produktie van zeldzame stoffen zonder daarvoor een aanslag te doen op de natuurlijke bronnen (waarvan vaak veel verwerkt moet worden voordat voldoende produkt kan worden verkregen). Maar voordat dit mogelijk wordt, zal eerst de wijze van synthese en de regulatie ervan nauwkeurig bekend moeten zijn: zonder deze kennis kan een aanzienlijke produktie door celkweken niet worden verwacht.

In dit opzicht zou belangstelling voor "met uitsterven bedreigde metaboliëten" op zijn plaats zijn: het verlies aan diversiteit dat dreigt bij het uitsterven van plantesoorten heeft als neveneffect dat bepaalde typen secundaire stoffen compleet met de bijbehorende syntheseroutes en enzymen verloren kunnen gaan. Er is dan ook alle reden om zuinig te zijn op de

natuurlijke bronnen van deze stoffen: niet alleen om er deze stoffen uit te winnen, maar ook om van de plant te leren hoe hij de gecompliceerde reacties uitvoert die bij deze syntheses een rol spelen.

Aan het eind wil ik nog eenmaal terug naar het begin van mijn verhaal: de verwondering over de reacties waartoe de plant in staat is, een verwondering die in de plaats kwam van de vanzelfsprekendheid waarmee we alles accepteren waaraan we gewend zijn geraakt. Het is deze verwondering over de natuur en de bewondering voor de aanpassing van de plant aan zijn omgeving, die aan de basis staan van elk onderzoek en die de onderzoeker ertoe brengt te willen weten "hoe de plant werkt" en "hoe de plant in elkaar zit". Om deze behoefte te kunnen bevredigen is het noodzakelijk om gegevens uit allerlei vakgebieden, van fysiologie, anatomie en oecologie tot ontwikkelingsbiologie en moleculaire biologie te integreren en is een nauwe samenwerking tussen onderzoekers uit deze vakgebieden noodzakelijk. Door het grote aantal onderzoeksgroepen dat zich in Wageningen binnen en buiten de Landbouwuniversiteit bezighoudt met het functioneren van de plant, is deze Universiteit in mijn ogen de ideale plaats om de vele fascinerende vragen op dit terrein op te lossen.

*Geachte leden van het College van Bestuur en leden van de Universiteitsraad,*

Bij de voorbereiding van een benoeming tot hoogleraar is het aan de Landbouwuniversiteit de gewoonte om betrokkene te vragen zijn visie op het vakgebied op papier te zetten. Ik heb dat toen gedaan in een stuk dat als titel had: "Plantenfysiologie aan de

Landbouwniversiteit: een bijzondere combinatie ?". Gedurende de anderhalf jaar dat ik hier nu werkzaam ben, heb ik met eigen ogen kunnen zien hoe bijzonder goed deze combinatie is. De mogelijkheden om op deze universiteit zowel samen te werken met de vakgroepen uit de moleculaire en biotechnologische richtingen als met de verschillende 'teelt'-vakgroepen maken het werken hier bijzonder inspirerend. Ik verheug me er zeer op deze plaats van de Plantenfysiologie binnen de Landbouwniversiteit verder te kunnen uitbouwen in de komende jaren. Ik ben erg blij dat U me hiertoe in de gelegenheid hebt gesteld.

*Geachte leden van de vakgroepen Plantenfysiologie en Plantenfysiologisch Onderzoek,*

Ik dank U allen zeer voor de uiterst plezierige wijze waarop U mij als "Amsterdammer" in uw midden hebt opgenomen. Ondanks de lange periode dat ik nog heen en weer reisde, heb ik me hier toch snel thuisgevoeld. Ook al kwam ik al van een 'bijzondere universiteit', de structuur van de Landbouwniversiteit heeft ook vele bijzondere trekken. Met uw steun was het mogelijk om snel de weg te leren in de Wageningse structuren en afkortingen.

De vakgroep Plantenfysiologie zal ingrijpend veranderen als de nieuwbouw eenmaal voltooid is en de huidige vakgroepen PF en PFO als èèn vakgroep Plantenfysiologie de 'banaan' zullen betrekken. Ik beschouw het daarmee samenhangende integratieproces als een inspirerende uitdaging en zie dit nieuwe tijdperk voor de Wageningse plantenfysiologie met veel vertrouwen tegemoet.

*Hooggeleerde Karssen, beste Cees,*

Jou wil ik in het bijzonder bedanken voor de wijze waarop je mij hebt geholpen met Wageningen vertrouwd te raken. Zonder de vaak door jou verstrekte 'inside information' was mij dat niet mogelijk geweest. Zowel jouw visie op de plaats van de Plantenfysiologie binnen de Biologie en de Landbouwwetenschappen, als het belang dat je hecht aan het functioneren van universitaire medewerkers ook buiten de vakgroepgrenzen, hebben mij steeds zeer aangesproken.

*Geachte medewerkers van de faculteit Biologie aan de Vrije Universiteit, in het bijzonder van de werkgroep Plantenfysiologie,*

Na bijna 25 jaar in verschillende functies verbonden te zijn geweest aan de (sub)faculteit biologie van de VU, kwam mijn verhuizing naar de Wageningse Universiteit voor velen wellicht als verrassing. Pas in de laatste maanden is het zover dat "bij ons" niet meer automatisch betekent "aan de VU". Het belang van het feit dat mijn 'wortels' in de VU liggen, behoeft ik aan een bioloog niet uit te leggen. Ik kan U verzekeren dat ik nog steeds met zeer veel plezier terugdenk aan mijn Amsterdamse tijd en dat ik de goede contacten met U allen graag wil handhaven. In het bijzonder wil ik hier mijn leermeester in de plantenfysiologie, professor Verleur, noemen. Ik betreurt het zeer dat hij deze dag niet meer heeft kunnen meemaken.

*Geachte collega's op het terrein van de Experimentele Plantenwetenschappen,*

Wetenschap is niet iets wat op een eiland wordt bedreven. Goede samenwerkingsverbanden met andere onderzoekers, die zich in brede zin bezighouden met de (experimentele) plantenwetenschappen zijn voor de voortgang van het onderzoek essentieel. Voor deze samenwerking vormt de onderzoeksschool in oprichting "Experimentele Plantenwetenschappen" een uitstekende voedingsbodem.

*Beste familie en vrienden,*

Een promotie en een oratie behoren tot de weinige gelegenheden waarbij een onderzoeker ook 'optreedt' voor familie en vrienden. Het doet mij veel genoegen dat jullie vandaag gekomen zijn om dit optreden mee te maken.

*Geachte studenten,*

Een universiteit is in de eerste plaats een onderwijsinstelling. Mijn eerste bezigheden aan deze Universiteit bestonden dan ook uit het voorbereiden van het basiscollege Plantenfysiologie dat in het tweede jaar wordt gegeven aan studenten uit een groot aantal studierichtingen. De reactie van èèn van de studenten naar aanleiding van deze collegecyclus: "als ik nu buiten loop, begrijp ik hoe de planten in elkaar zitten" lijkt aan te geven dat het onderwijs aan zijn doel heeft beantwoord. Ik hoop dat mijn verhaal van vandaag duidelijk heeft gemaakt dat er nog genoeg vragen onbeantwoord zijn gebleven om ons te blijven verwonderen over "alles wat groeit en bloeit en altijd weer boeit".

*Mijnheer de rector, dames en heren,*

Ik dank U voor uw aandacht.

## *Referenties*

- <sup>1</sup> Ammirato, P.V. & D.J. Styer, 1985. Strategies for large-scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In: M.Zaitlin, P.Day & A. Hollander (eds): *Biotechnology in Plant Science*, Academic Press San Diego, p. 161-178.
- <sup>2</sup> Benson, E.E. 1988. Free radical damage in stored plant germplasm. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 128 pp.
- <sup>3</sup> Bruinsma, J., J.B.M. Huitema & A. Varga, 1989. Epigenetic variation in vitro: a case study with *Kalanchoe blossfeldiana* poelln., c.v. Yucatan. *Plant, Cell and Environment* 12: 83-91.
- <sup>4</sup> Buitelaar, R.M., I. Sasaeta & J. Tramper, 1990. Application of the liquid-impelled loop reactor for the production of anthraquinones by plant cell cultures. In: H.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas & J. van Aartrijk (eds): *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 696-699.
- <sup>5</sup> Buitelaar, R.M., A.A.M. Langenhoff, R. Heidstra & J. Tramper 1991. Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid phase bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.*, 13: 487-494.
- <sup>6</sup> Chapkis, R., 1966. De reizen van pater Key. Querido, 73 pp.
- <sup>7</sup> Croes, A.F., A.J.R. van den Berg, M. Bosveld,

H. Breteler & G.J. Wullems, 1989. Thiophene accumulation in relation to morphology in roots of *Tagetes patula*:. Effects of auxin and transformation by *Agrobacterium*. *Planta* 179: 43-50.

<sup>8</sup> Dijkema, C., S.C. de Vries, H. Booij, Tj.J. Schaafsma & A. van Kammen, 1988. Substrate utilization by suspension cultures and somatic embryos of *Daucus carota* L. measured by <sup>13</sup>C NMR. *Plant Phys.* 88: 1332-1337.

<sup>9</sup> Geelen, T.A.M., N.M. van Dam, A. Varga & T.A. van Beek. 1990. Production of the antifeedant polygodial by plants and callus of *Polygonum hydropiper* L. In: H. Breteler, R.F. Beudeker & K. Ch.A.M. Luyben (eds.). *Proc. 3rd Neth. Biotechn. Congr.* p. 244-245.

<sup>10</sup> Hagendoorn, M.J.M., A.M. Poortinga, H.W. Wong Fong Sang, L.H.W. van der Plas & H.S. van Walraven, 1991. Effect of elicitors on the plasma membrane of *Petunia hybrida* cell suspensions: role of  $\Delta$ pH in signal transduction. *Plant Phys.* 96: 1261-1267.

<sup>11</sup> Hoekstra, F.A., M.C. Verberne, I.G. Nieboer, T. van Roekel & F.A.A. Tetteroo, 1991. Effects of ABA on somatic embryos of *Daucus carota*. *Abstr. 14th Int. Conf. Plant Growth Subst., Amsterdam*, p. 132.

<sup>12</sup> Holden, M.A., P.R. Holden & M.M. Yeoman, 1988. Elicitation of cell cultures. In: R.J. Robins & M.J.C. Rhodes (eds.), *Manipulating secondary metabolism in culture*. Cambridge University Press, p. 57-65.

- <sup>13</sup> Koster, J. 1990. Shoot regeneration on bulb scale explants of tulip. In: Abstr. VIIth Int. Congr. Plant Tiss. Cult., Amsterdam, p. 110.
- <sup>14</sup> Margara, J. 1987. Grondslagen van de vegetatieve vermeerdering. Nederlandse Vereniging voor Plantecel en Weefselkweek, Lisse, 296 pp.
- <sup>15</sup> Pierik, R.L.M. 1985. Plantenteelt in kweekbuizen. (2e druk), Ponsen & Looyen, Wageningen, 202 pp.
- <sup>16</sup> Plas, L.H.W. van der, 1991. Mogelijkheden met weefselkweek. In: C.M. Karssen & H.M. van Emden (red.): Planten in gebruik. Biol. Raad, Amsterdam, p. 79-106.
- <sup>17</sup> Rebers, M., E. Vermeer, E. Knecht & L.H.W. van der Plas. 1991. The role of gibberellins in the cold requirement of tulip. Abstr. 14th Int. Conf. Pl. Growth Subst., Amsterdam, p. 86.
- <sup>18</sup> Tabata, M. & Y. Fujita, 1985. Production of shikonin by plant cell cultures. In: M. Zaitlin, P. Day & A. Hollander (eds): Biotechnology in Plant Science. Academic Press San Diego. p. 207-218.
- <sup>19</sup> Taiz, L. & E. Zeiger, 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 559 pp.



<sup>20</sup> Veltkamp, E., H. Breteler, H. Huizing & M. A. Bertola, 1985. Plantebiotechnologie in Nederland - Industriële toepassing van plantecellen: voorwaarden en mogelijkheden. Studierapport 14g, Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek, 's Gravenhage, 76 pp.

<sup>21</sup> Zenk, M.H., H. El Shagi & U Schulte, 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, Suppl., 79-101.