

Oreste Pellegrini

Problemi della rigenerazione e dinamica dell'organizzazione nelle cormofite (*).

SOMMARIO

Introduzione

I. Rigenerazione embrionale

a) La ricostituzione dell'organismo nel corso dell'embriogenesi.

b) La ricostituzione dei centri dello sviluppo embrionale nell'organismo adulto.

1. Apici radicali

2. Apici di germogli

3. Primordi fogliari

II. Processi di sostituzione

III. Problemi dell'organizzazione dedotti dalle ricerche sulla rigenerazione

IV. Conclusioni

Riassunto

Summary

Bibliografia.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Botanica dell'Università di Messina.

INTRODUZIONE

Il differenziamento e l'organizzazione del corno rappresentano il risultato di fenomeni morfogenetici molto interessanti ma, allo stesso tempo, molto complessi. La comprensione di tali fenomeni è senz'altro favorita dallo studio della rigenerazione, soprattutto se indotta sperimentalmente; soltanto in quest'ultimo caso, infatti, il processo rigenerativo è facilmente controllabile e seguibile in ogni suo stadio.

La rigenerazione nei vegetali superiori comprende una lunga serie di fatti che vanno inquadrati in due grandi categorie per il loro diverso significato e per i diversi ordini di problemi che scaturiscono dal loro studio. Ad una prima categoria si possono ascrivere tutti quei casi nei quali una regione embrionale — sia che si tratti di un giovane embrione, sia che si tratti di un centro di sviluppo di una pianta adulta — in seguito a processi traumatici di vario genere, reagisce con un meccanismo determinato riorganizzando la sua originaria struttura. Questo tipo di rigenerazione, che viene definito « *ricostituzione* » o « *rigenerazione embrionale* », è molto affine alla rigenerazione animale. In una seconda categoria, invece, devono essere considerati tutti quei processi, propri del mondo vegetale, detti di « *sostituzione* » o « *ristorazione* », nei quali l'attività di un centro embrionale asportato viene sostituita da quella che consecutivamente si stabilisce in una regione più o meno adiacente. Questa attività può semplicemente trasferirsi in un altro centro embrionale già organizzato ma allo stato quiescente, come accade in gemme laterali dormienti che vengono attivate in seguito alla rimozione o al danneggiamento della gemma apicale; oppure può insediarsi in una regione già adulta che, con un processo certamente più complesso, viene prima indotta a sdifferenziarsi in un centro meristematico organizzato. Un esempio di questo genere è quello della formazione di germogli a partire da cellule epidermiche dell'ipocotile decapitato di lino.

Fenomeni a mio avviso ricollegabili ai processi di sostituzione potrebbero essere quelli che si fanno rientrare nella cosiddetta « *rigenerazione riproduttiva* » (SINNOT, 1960). In questi casi

si ha rigenerazione naturale di un individuo completo a partire da regioni già differenziate, come ad esempio la formazione di « embrioni » sulle foglie di molte Crassulacee.

Nel presente lavoro verranno passati in rassegna i più significativi risultati ottenuti negli studi sulla rigenerazione delle corfite, allo scopo di analizzare e d'interpretare i fatti più salienti che accompagnano l'attuarsi dell'organizzazione nelle corfite. Per tale fine si riportano qui di seguito, come base per la discussione, soltanto alcuni esempi, tratti dalla letteratura altrui o nostra, scelti con il criterio di offrire un quadro il più possibile completo dei diversi casi riscontrati sia nell'uno che nell'altro tipo di rigenerazione.

I) RIGENERAZIONE EMBRIONALE

Le ricerche più estese sulla rigenerazione embrionale sono quelle compiute sui centri dell'accrescimento embrionale di un organismo adulto o in via di sviluppo, specialmente apici radicali o di germogli. Non mancano tuttavia osservazioni, alcune delle quali su base sperimentale, che dimostrano le capacità riorganizzative dell'embrione in stadi più o meno precoci del suo differenziamento, ancor prima che si siano formati gli abbozzi dei suddetti centri di sviluppo.

Sarà opportuno distinguere i processi di rigenerazione embrionale prima e dopo di tale evento. Il significato attribuibile alla rigenerazione dell'embrione nel corso del suo sviluppo intraseminale è, come si vedrà, diverso nei vari casi, in perfetta analogia con quanto si verifica per i centri morfogenetici della pianta adulta.

a) *La ricostituzione dell'organismo nel corso dell'embriogenesi.*

Le capacità ricostitutive dell'embrione nel corso del suo differenziamento sono chiaramente dimostrate dai numerosi esempi di biembrionia e di poliembrionia da scissione, diffusi specialmente nelle Gimnosperme (BUCHOLZ, 1920-1933; JOHANSEN, 1950; PELLEGRINI, 1958).

Tali fenomeni, com'è noto, sono dovuti alla divisione, per cause sotto molti aspetti ancora sconosciute, del proembrione in due o più unità, ciascuna delle quali è in grado di svilupparsi per proprio conto, per dare origine ad un embrione più o meno completo. Nella generalità dei casi soltanto uno di questi arriva a differenziarsi in un embrione pienamente maturo, benchè talvolta, come in alcune specie di *Pinus*, siano stati riscontrati semi con più di un embrione in grado di germinare. Esempi di poliembrionia per frammentazione embrionale sono piuttosto diffusi anche nelle Angiosperme, nelle quali è stata descritta una grande varietà di casi (v. LEBEGUE, 1952). Nei riguardi del processo rigenerativo, sarà opportuno distinguere quella poliembrionia originatasi dalla scissione di un corpo embrionale costituito da blastomeri indifferenziati ed equipotenti, da quella che si origina come una sorta di gemmazione in seno ad un proembrione già organizzato, col risultato che si formano embrioni soprannumerari a partire da elementi aventi un diverso valore prospettico; uno di questi casi è quello di embrioni soprannumerari che si originano da cellule a prospettiva già più o meno definita, come quelle del sospensore. E' chiaro che questo ultimo particolare tipo di poliembrionia, pur rappresentando un esempio di rigenerazione, va interpretato diversamente dalla vera ricostituzione, somigliando piuttosto ad un processo di neoformazione.

Un caso molto istruttivo di vera poliembrionia dovuta a bipartizione è quello piuttosto raro descritto da SWAMY (1942) in *Cymbidium bicolor*, in cui è addirittura lo zigote che dopo la prima segmentazione obliqua o verticale, dà origine a due blastomeri che si sviluppano in maniera indipendente ma affiancati dando origine ciascuno ad un embrione. Questa duplicità embrionale, così somigliante a quella tanto studiata in embriologia animale, dà una chiara dimostrazione delle proprietà regolative dello zigote delle piante superiori.

Talora si può avere soltanto una parziale scissione longitudinale del proembrione in stadi più o meno precoci del suo differenziamento; prendono così origine quei casi di duplicità parziali che sono abbastanza diffusi in natura e comuni anche in embriologia animale. In questo modo SHARMAN (1942) inter-

preta il caso di *Zea mais* nel quale due embrioni completi si presentano legati ad un solo scudetto parzialmente diviso e racchiuso in una sola cariosside con un'unica massa endospermica.

Esempi di un particolare tipo di poliembrionia da scissione sono quelli descritti in *Araucaria bidwilli* (PELLEGRINI, 1958).

La rigenerazione dell'embrione nel corso del suo sviluppo intraseminale è stata anche provocata sperimentalmente con lo indurre in esso, mediante tecniche diverse, processi traumatici di vario genere. Così STERLING (1949) coltivando giovani embrioni di Larice su differenti mezzi di coltura, riuscì a produrre fenomeni di scissione che egli interpretò come dovuti all'azione delle particolari condizioni fisiche ed alla composizione chimica dei diversi mezzi di coltura.

HACCIUS (1955) trattando con ormoni di crescita, come acido fenilborico o 2-4.D, semi immaturi di *Eranthis hiemalis*, quando gli embrioni non avevano ancora formato i cotiledoni, poté indurre varie aberrazioni nella struttura dell'embrione maturo. Fra le tante anomalie interessanti specialmente i cotiledoni, furono ottenuti alcuni casi di embrioni parzialmente sdoppiati e fusi per la regione radicale. HACCIUS interpreta queste anomalie come dovute al danneggiamento delle cellule apicali dell'embrione piriforme, progenitrici della piumetta. Tale danneggiamento rimuoverebbe la dominanza apicale posseduta da queste cellule, per cui sarebbe possibile la formazione di nuovi apici a partire dalle cellule che normalmente danno origine ai cotiledoni. E' però da considerare che nelle anomalie testè citate non si tratta di nuovi apici, come afferma HACCIUS, ma di nuovi corpi embrionali, ciascuno completo di piumetta e di regione cotiledonare. Per cui gli embrioni doppi fusi per la base ottenuti sperimentalmente da HACCIUS appaiono piuttosto come il risultato di un parziale sdoppiamento del corpo embrionale ancora indifferenziato, sdoppiamento dovuto al trauma subito dalle cellule apicali che non sono però quelle della piumetta, presumibilmente non ancora presenti al momento del trattamento. Il trauma avrebbe l'effetto di una costrizione o di una parziale fenditura provocata lungo una direzione longitudinale mediana. Questi casi di « twinning » sarebbero quindi una bella di-

mostrazione delle capacità riorganizzative possedute dal corpo embrionale.

Non esistono purtroppo ricerche sugli effetti della frammentazione provocata chirurgicamente su embrioni indifferenziati. La formazione di due plantule che può ottenersi in seguito alla bipartizione dell'embrione maturo rappresenta ovviamente un caso di rigenerazione embrionale che interessa i due centri morfogenetici dell'epicotile e della radichetta già determinatisi nel corso dell'embriogenesi.

b) *La rigenerazione dei centri dello sviluppo embrionale nell'organismo adulto.*

Le regioni embrionali più studiate nei riguardi del processo di ricostituzione sono, come si è già accennato, gli apici vegetativi dei germogli e della radice, sia di Pteridofite che di Spermatofite. Non mancano tuttavia ricerche sulla rigenerazione dei primordi fogliari, che bisogna considerare come altrettanti centri embrionali, seppure strettamente dipendenti e correlati a quello apicale.

Progressi notevoli in tali studi sono stati compiuti specialmente in questi ultimi trent'anni, grazie soprattutto alle perfezionate tecniche della microchirurgia ed a quelle delle colture in vitro.

Per quanto riguarda gli esperimenti di microchirurgia, le operazioni condotte sui centri dello sviluppo allo scopo di studiarne gli effetti rigenerativi, sono delle più varie: frammentazione a mezzo di tagli eseguiti con microscalpelli lungo determinate direzioni, soppressione parziale o totale a mezzo di rimozione o micropunture di certe regioni meristematiche, isolamenti vari di un centro embrionale da un altro, ecc.

I processi rigenerativi consecutivi a queste operazioni, sono stati seguiti specialmente sull'intero organismo, ma talora anche sui centri dello sviluppo isolati e coltivati in vitro.

I problemi che lo studio di tali processi rigenerativi comporta sono di diverso ordine e di varia complessità; essi ver-

ranno presi in considerazione man mano che si esamineranno i risultati delle ricerche nei singoli casi.

1. Apici radicali.

Le capacità rigenerative dei meristemi apicali, sia della radice che del germoglio erano note fin dal tempo di LOPRIORE (1895), il quale, sottoponendo gli apici vegetativi di parecchie specie di dicotiledoni a spacchi longitudinali mediani, poté ottenere sia radici che germogli doppi.

La ricostituzione degli apici radicali su base istologica è stata investigata a fondo da CLOWES (1953, 1954) con l'intento di dimostrare sperimentalmente la validità della sua teoria del «promeristema» o «centro citogenerativo pluricellulare» postulata in precedenza (1950 a, b).

Gli esperimenti compiuti da CLOWES dapprima su *Vicia faba* e su *Fagus silvatica* (1953), successivamente su *Triticum* e su *Zea mais* (1954) consistono nella asportazione di un determinato settore del meristema radicale, mediante incisioni variamente profonde. Gli effetti di tali operazioni sono diversi a seconda della profondità delle incisioni. Quando la rimozione è limitata ad una parte del meristema in modo da non compromettere la ricostituzione dell'apice, dalla parte del taglio si formano nuovi tessuti per l'attività meristemica delle cellule vicine alla superficie di ferita. La parte non danneggiata si rinnova normalmente e rigenera tessuto meristemico per rimpiazzare la parte escissa. Il nuovo tessuto si comporta come parte del meristema, ma le sue cellule mostrano per parecchio tempo dopo l'operazione caratteri diversi rispetto a quelle del lato non danneggiato, in quanto sono orientate in serie anticlinali, inizialmente continue dalla stele alla superficie. CLOWES osserva che tanto nelle incisioni che asportano parte del polo stelare, tanto in quelle che passano solo accanto ad esso, il nuovo apice mostra sempre sui due lati questo diverso assetto dei tessuti, uno normale, l'altro anormale. Anche nel caso in cui il polo stelare non viene toccato, le sue cellule in conseguenza dell'incisione vengono stimolate a dividersi e contribuiscono alla rigenerazione dell'apice.

Questi risultati parlano in favore della teoria di un ampio promeristema pluricellulare e dimostrano l'inconsistenza della idea di un promeristema formato da una sola cellula o da poche cellule iniziali, come rispettivamente ammesso da GUTTENBERG (1947) e da BRUMFIELD (1943). Se infatti queste teorie fossero vere, afferma CLOWES, l'iniziale unica o le poche iniziali, in seguito ai vari tipi di esperimenti, dovrebbero, nei casi estremi, o essere totalmente asportate o essere lasciate intatte, con risultati completamente diversi.

CLOWES afferma inoltre che il promeristema deve essere formato da un certo numero minimo di cellule per riprodurre i caratteri cellulari dell'apice radicale.

BALL (1956) ha studiato la rigenerazione dell'apice radicale nell'embrione maturo di *Gynkgo biloba*, incidendo l'estrema punta dell'ipocotile con un taglio longitudinale mediano. L'accrescimento in vitro dell'embrione produce da ciascuna metà dell'ipocotile diviso un nuovo apice radicale, sia nel caso che essa conteneva metà dell'originario gruppo di iniziali, sia nel caso che ne conteneva molto meno. BALL giunge inoltre alla conclusione che non vi è predeterminazione nel differenziamento degli elementi derivati dalle cellule iniziali e che il differenziamento di ciascuna di tali cellule è in rapporto con la posizione in cui esse si vengono a trovare. Egli osserva infatti che nella rigenerazione delle due mezze radichette l'originario procambio situato in prossimità della superficie di ferita sembra aver formato perenchima corticale, mentre nuovo procambio appare al centro di ciascuna radice.

In *Phaseolus vulgaris* (PELLEGRINI, 1957) è stato messo in evidenza che questi cambiamenti nelle prospettive morfogenetiche degli istogeni nella riorganizzazione dell'apice radicale sembrano indotti proprio dall'attività del promeristema. E' infatti in questa regione che s'instaura per prima un'attività segmentativa, che estendendosi poi in direzione acrofuga, determina tutto un rimaneggiamento nella struttura del meristema ed i cambiamenti di cui sopra.

L'importanza del promeristema nei processi di ricostituzione dell'apice radicale è stata recentemente confermata nelle colture in vitro (PELLEGRINI - GANGEMI, 1964).

2. Apici dei germogli.

La rigenerazione degli apici vegetativi dei germogli è stata oggetto di numerose ricerche per i molteplici problemi connessi al suo studio. Tale molteplicità di problemi è in rapporto alla più complessa organizzazione del germoglio rispetto a quella della radice, complessità conferitagli soprattutto dalla presenza delle foglie o di altri organi equivalenti, ad esso subordinati e distribuiti secondo un rigoroso ordine caratteristico della specie.

L'analisi morfo-istologica del processo rigenerativo è di estremo interesse perchè ci mette in grado di rispondere a molti quesiti posti dalla morfogenesi. Le modalità rigenerative sono ovviamente in rapporto alla natura del trauma provocato sul meristema apicale. Una semplice incisione longitudinale mediana ha un effetto analogo a quello già descritto per la radice, ma la ricostituzione del germoglio offre maggiori difficoltà di interpretazione. Questo tipo di operazione è stato eseguito da parecchi studiosi, sia su apici terminali che su gemme ascellari di numerose specie di Angiosperme.

La formazione sperimentale di germogli doppi era conosciuta fin dal tempo di LOPRIORE (1895), ma il primo ad averne studiata la rigenerazione su base istologica fu LINSBAUER (1917).

Questo Autore, sottoponendo a punture, a decapitazioni ed a spacchi longitudinali gli apici vegetativi dei germogli di *Phaseolus coccineus*, *Polygonatum officinale* ed *Helianthus annuus*, dimostrò che la rigenerazione non si compie mai direttamente dalla superficie di ferita, ma dalla regione non danneggiata del meristema che giace al disopra o fra i più giovani primordi fogliari. Questo risultato fu successivamente confermato da PILKINTON (1929) in *Vicia faba* ed in *Lupinus albus*. Di parere contrario è MIRSKAJA (1928) il quale afferma che ciascuna delle due metà della gemma ascellare divisa di *Tradescantia guianensis* riformerebbe la parte mancante direttamente, con procedimento analogo a quello della rigenerazione degli apici radicali.

Il territorio meristemato interessato nel processo rigenerativo ed i cambiamenti cito-istologici che in esso si verificano

possono dare utili indicazioni ai fini dell'interpretazione del normale funzionamento del meristema apicale, se si tengono naturalmente in debito conto gli inevitabili effetti secondari prodotti dal trauma.

BALL (1946a, 1948, 1950) nei suoi tentativi di trapianto della regione centrale dell'apice vegetativo di *Lupinus*, trovò che dai fianchi del meristema non danneggiato si rigeneravano due nuovi apici vegetativi a partire da nuove iniziali originatesi da segmentazioni periclinali dello strato interno della tunica. Questi nuovi apici si rigenerano quindi da regioni che normalmente avrebbero dato origine a primordi fogliari. BALL concluse che le cellule del meristema periferico sono morfogeneticamente equivalenti alle iniziali della regione centrale e che il loro sviluppo organizzato in apici indipendenti è normalmente inibito dalla dominanza apicale.

Successivamente BALL (1955) studia le segmentazioni che si verificano nell'apice di *Lupinus* in seguito ad un taglio longitudinale profondo 5-10 mm. Egli osserva che nelle prime ventiquattro ore dopo il taglio le sole segmentazioni sono quelle della regione interna del corpus e sono in rapporto con la rigenerazione dei due nuovi apici e non hanno niente a che fare con il periderma cicatriziale («wound cambium»), che incomincia a formarsi al secondo giorno. Le segmentazioni che danno origine al «wound cambium» avvengono nelle cellule immediatamente al disotto della superficie di ferita e si propagano secondo un gradiente basipeto.

LOISEAU (1959, 1960), in seguito ai suoi studi dei processi istocitologici consecutivi alla rigenerazione dell'apice caulinare di *Impatiens roylei*, perviene a conclusioni diverse da quelle di BALL, constatando uno «stretto legame fra i processi cicatriziali e la rigenerazione». Egli sopprime parzialmente o totalmente il meristema periferico dell'apice vegetativo, il cosiddetto *anneau initial*, la sola regione che secondo la scuola francese di PLANTEFOL avrebbe importanza nella morfogenesi del germoglio. La rigenerazione appare come una conseguenza dei processi cicatriziali. E' soprattutto quest'attività che permette il ristabilimento normale dell'apice. Le cellule peridermiche superiori

si sdifferenziano dopo 5-7 giorni dall'operazione e ricostituiscono l'*anneau initial*. L'attività è particolarmente importante nelle regioni laterali della tunica, proprio nel meristema periferico.

In *Phaseolus* (PELEGRINI, 1959) è stata sempre riscontrata un'indipendenza fra la formazione del periderma cicatriziale e la rigenerazione dell'apice. I due processi sono quasi simultanei ma sempre ben distinti. Talora potrebbero essere confusi in un solo processo per l'estendersi in profondità delle segmentazioni da ferita. Il sollevamento del nuovo meristema apicale ha origine dall'attività segmentativa che s'instaura precocemente in elementi della tunica e del corpus in una regione situata fra la ferita ed il meristema periferico. La nuova sommità apicale appare come un centro intorno al quale si organizza il nuovo apice vegetativo.

BALL (1946b, 1948, 1952) è riuscito a dividere l'apice del germoglio di *Lupinus* dapprima in quattro, poi in sei parti, ottenendo da ciascun frammento un piccolo germoglio normale. Egli conclude affermando che il meristema apicale è una regione autodeterminante e che la rigenerazione dipende dalla presenza di un certo numero minimo di cellule.

Quest'area minima capace di rigenerare un nuovo apice è variabile da specie a specie, in *Phaseolus* corrisponde presso a poco ad un quarto di quella originaria (PELEGRINI, 1959), in *Solanum tuberosum* ad un sesto (SUSSEX, 1952), e questa varia possibilità dipende da tanti fattori. Fra i più importanti bisogna certamente segnalare anche quelli nutritivi, perchè, come fa notare SUSSEX, in *Solanum* la rigenerazione dell'apice può realizzarsi a partire addirittura da un ventesimo della sua area originaria, qualora asportando le rimanenti parti del meristema, si annulli la forte competizione di carattere nutrizionale.

Lo studio della ricostituzione del germoglio trova inoltre interesse in tanti altri problemi connessi al particolare funzionamento del meristema apicale. Così l'analisi della successione dei primi abbozzi fogliari sui nuovi apici in via di rigenerazione insieme ai loro rapporti di posizione con le foglie del germoglio originario, possono aiutarci a comprendere le cause che determinano l'insorgere delle foglie nella loro normale distribuzione specifica.

Non è qui il caso di trattare il complesso problema della fillotassi per il quale si rimanda alle più recenti riviste sintetiche (SNOW, 1955; CUTTER, 1964; WARDLAW, 1965). Ci basterà riferire soltanto i risultati di qualcuno dei più significativi esperimenti microchirurgici che con questo problema ha attinenza.

In seguito ad incisioni di vario tipo eseguite sul meristema apicale del germoglio di specie aventi varia fillotassi, SNOW e SNOW (1931, 1933, 1935) riuscirono a modificare la posizione della foglia formatasi successivamente al taglio. Essi notarono che in tutti questi casi, venivano alterate anche le posizioni dei successivi primordi adiacenti a quello modificato. Con questo risultato SNOW e SNOW furono in grado di dimostrare la loro teoria fillotassica del « primo spazio disponibile ». Secondo questa teoria la posizione di un nuovo primordio fogliare è condizionata dalle posizioni dei primordi preesistenti. Esso si formerà in quello spazio che per primo diventa « disponibile » ossia raggiunge una certa minima ampiezza ed una certa minima distanza dalla sommità apicale. Lo spazio disponibile è condizionato dalle posizioni dei precedenti primordi fogliari che sono adiacenti ad esso. Così in *Lupinus*, isolando il primordio I_1 , con un taglio verticale tangente, SNOW e SNOW notarono un incremento notevole dell'angolo di divergenza compreso fra i successivi primordi I_2 e I_3 . Quest'angolo che normalmente è di circa 136° , in certi casi aumentava fino a superare i 200° . Quando superava i 180° si veniva a formare uno spazio « disponibile » per accogliere il successivo primordio I_4 , in una posizione opposta a quella normale, che è fra I_1 e I_2 . In questi casi i successivi primordi si distribuivano lungo una spirale che risultava invertita rispetto a quella normale.

Analoghe modificazioni fillotassiche sono state ottenute in molte altre specie, sia di Pteridofite (WARDLAW, 1949) che di Spermatofite (SOMA, 1958; PELLEGRINI, 1959).

Nelle Pteridofite WARDLAW interpreta queste modificazioni in termini di un'alterata attività dei « campi fisiologici » che avrebbero sede tanto nella regione apicale quanto in quella di ciascun primordio fogliare. In queste regioni verrebbero elaborati particolari fattori ad azione inibitrice che, diffondendo verso

il basso, determinerebbero tutt'intorno un campo inibitorio. I nuovi abbozzi fogliari potrebbero svilupparsi soltanto nelle aree del meristema apicale giacente al di fuori di tale sfera d'inibizione. Secondo WETMORE e WARDLAW (1951) i risultati di SNOW sarebbero perfettamente compatibili con il concetto dei campi fisiologici.

Gli effetti prodotti da alcune di queste incisioni sul meristema apicale del germoglio non consistono, come si vede, in una normale ricostituzione di un centro di sviluppo, ma vanno ugualmente inquadrati nella rigenerazione embrionale, perchè riguardano sempre delle modificazioni dell'attività organogenetica. Proprio per questo motivo il loro studio è oltremodo interessante perchè aiuta a comprendere molti fatti della normale organogenesi. In certi casi si tratta di un'attività rigenerativa consecutiva all'interruzione dei rapporti fra due territori meristemati a diversa prospettiva morfogenetica. Gli esperimenti di WARDLAW, CUTTER, WARDLAW-CUTTER (1949-1957) sullo sviluppo di gemme indotto in giovani primordi fogliari, chirurgicamente isolati dalla regione apicale del germoglio di *Dryopteris aristata*, possono essere considerati in tal senso. Essi sono di notevole interesse in quanto dimostrano l'importante ruolo esplicato dalla regione apicale del germoglio nel determinismo morfogenetico delle foglie e delle gemme. Gli esperimenti compiuti sull'apice del germoglio in *Solanum tuberosum* (SNOW e SNOW, 1953-1954; SUSSEX, 1951-1955), in *Nuphar lutea* (CUTTER, 1958), in *Phaseolus vulgaris* (PELLEGRINI, 1960-1963) riguardano tutti le cause del determinismo fogliare e gemmale nelle Spermatofite.

Altri interessanti esperimenti di microchirurgia, che mettono in evidenza le particolari correlazioni intercorrenti fra i diversi territori dell'apice del germoglio, sono l'isolamento chirurgico della regione apicale indifferenziata dal meristema periferico (WARDLAW, 1950a, BALL, 1952a). I risultati di queste ricerche compiute tanto nelle Pteridofite, quanto nelle Spermatofite, dimostrano le caratteristiche autodeterminanti della regione apicale nell'organizzazione del germoglio e le capacità induttive che l'apice presenta nei riguardi delle regioni sottostanti, specie per quel che riguarda il differenziamento del tessuto vascolare.

3. Primordi fogliari.

Le capacità riorganizzative dei primordi fogliari sono meno studiate di quelle degli altri centri di sviluppo. Lo sdoppiamento della lamina fogliare in seguito a tagli longitudinali mediani si ottiene facilmente nelle felci (BEYERINK in *Blechnum brasiliense*, 1886; GOEBEL in *Polypodium heracleum*, 1902; FIGDOR in *Scolopendrium scolopendrium*, 1906). Ciò dipende dal fatto che in queste specie la lamina fogliare conserva a lungo l'apice meristemato.

Recentemente è stato dimostrato che anche nelle Spermatofite è possibile promuovere la duplicità fogliare, purchè si operi dividendo in due un primordio fogliare molto giovane (PELLEGRINI, 1961a). Tali risultati permettono di concludere che i primordi fogliari, in una fase iniziale del loro differenziamento, sono dotati di proprietà regolative, analogamente a quelle che si attribuiscono al meristema apicale del germoglio e della radice.

II) PROCESSI DI « SOSTITUZIONE »

Come si è detto all'inizio, nei processi di sostituzione l'attività di un centro embrionale, soppressa in seguito a rimozione o danneggiamento, viene sostituita da quella che si stabilisce in una regione più o meno vicina, dove o un altro centro embrionale preesistente ma allo stato quiescente viene indotto a svilupparsi, o si ha formazione di un nuovo centro embrionale per sdifferenziamento di cellule adulte.

Tra i tanti casi uno dei più studiati è quello dello sviluppo di gemme laterali consecutivo alla rimozione della gemma terminale. Le gemme laterali che si sostituiscono a quella principale possono semplicemente svilupparsi da meristemi ascellari preesistenti ma allo stato quiescente, oppure possono formarsi ex novo per sdifferenziamento di tessuti definitivi.

Questi fatti che sono intimamente legati al fenomeno della *dominanza apicale* o *inibizione correlativa delle gemme laterali*, trovano la loro spiegazione in due diverse teorie: quella nutri-

zionale e quella ormonica. In base alla prima teoria, che è anche la più antica, la normale inibizione delle gemme laterali sarebbe determinata dalla competizione nutritiva che si stabilisce fra il meristema terminale e quelli laterali e nella quale questi ultimi si troverebbero in svantaggio per il flusso dei materiali plastici utilizzato di preferenza dal centro apicale più attivo. Secondo la teoria ormonica l'inibizione delle gemme laterali sarebbe dovuta all'influenza di fattori inibitori di natura ormonica normalmente presenti nella regione apicale e diffondenti lateralmente e verso il basso. Lo sviluppo di gemme laterali consecutivo all'asportazione della gemma terminale sarebbe quindi dovuto alla rimozione di tali fattori inibitori. E' dimostrato che questi fattori devono essere identificati con l'auxina in quanto se sulla superficie di ferita di un germoglio decapitato si applica acido indol-3-acetico in lanolina, la normale dominanza apicale viene ripristinata (THIMANN e SKOOG, 1934).

La rimozione della dominanza apicale deve esplicitarsi con un meccanismo certamente più complesso quando ha per effetto la formazione di gemme ascellari o avventizie in regioni assolutamente prive di meristemi organizzati.

E' frequente la formazione di gemme avventizie su ipocotili decapitati. In *Solanum nigrum* se oltre alla gemma terminale si asportano anche tutte quelle ascellari, sulla superficie di ferita distale si forma un callo meristemato da cui si originano un certo numero di germogli (WARDLAW, 1952).

LINK ed EGGERS (1946) ottennero gemme avventizie a partire da cellule epidermiche dell'ipocotile decapitato di *Linum usitatissimum*. Lo sviluppo di tali gemme veniva completamente e permanentemente inibito applicando acido indolacetico in lanolina all'1 o 3% sulla superficie di recisione. Concentrazioni inferiori possono solo ritardare lo sviluppo delle gemme. In questi casi l'effetto dell'auxina sarebbe quello di inibire il processo di sdifferenziamento delle cellule epidermiche. Contrariamente a questo effetto inibitorio, BEAL (1937) applicando AIA sui germogli decapitati di *Lilium harisii* indusse la formazione di gemme all'ascella delle foglie superiori, normalmente prive di abbozzi meristemati.

L'inibizione esercitata dall'AIA e da altre auxine sullo sviluppo delle gemme laterali non è che un aspetto del complesso fenomeno della dominanza apicale. Tale inibizione può infatti essere soppressa da altri fattori di crescita. WICKSON e THIMANN (1958) hanno infatti dimostrato che la kinetina e l'auxina hanno un'azione antagonista nella dominanza apicale. In tale processo i fattori ormonici esplicano un ruolo importantissimo ma non sono certamente i soli. E' stato infatti dimostrato che il loro effetto interferisce con quello di tanti altri fattori, in particolare con quelli nutrizionali (GREGORY e VEALE, 1957).

Non tutti gli Autori sono d'accordo sul meccanismo dell'inibizione auxinica. Alcuni ritengono che l'auxina agisca per via indiretta o stimolando la formazione di altri inibitori (SNOW, 1937) o promuovendo il trasporto dei fattori nutritivi verso i centri dell'accrescimento, luogo di sintesi dell'auxina (WENT, 1939). Recentemente però WICKSON e THIMANN (1960) applicando AIA con C^{14} sulla superficie di ferita apicale di segmenti caulinari di pisello, hanno potuto dimostrare che l'AIA raggiunge la gemma ascellare, riscontrando inoltre un rapporto lineare fra il contenuto dell'isotopo nei tessuti della gemma ed il grado d'inibizione in essa ristabilito dall'applicazione dell'AIA. L'auxina pertanto viene trasportata nella gemma ascellare ed è direttamente responsabile della sua inibizione.

Altro importante fenomeno di correlazione che si mette in evidenza nei processi di sostituzione è quello della polarità, che si manifesta specialmente negli organi assili. Segmenti di fusto o di radice rigenerano nuovi germogli o nuove radici rispettivamente sempre al polo apicale ed al polo basale. Com'è dimostrato fin dalle classiche ricerche di WÖCHTING (1878-1906) anche piccolissimi frammenti di fusto manifestano questa polarità, per cui nella rigenerazione ogni livello dell'asse può indifferentemente dare origine ad un germoglio o ad una radice. Ciò dipende dalla nuova posizione che tale livello viene ad assumere rispetto al frammento e non rispetto alla sua posizione originaria sullo intero fusto.

Numerosi studi sono stati compiuti sull'origine istologica dei primordi delle gemme e delle radici nella rigenerazione. Essi pos-

sono anche svilupparsi ex novo sia da un callo meristemico che da tessuti normali dell'organo reciso.

Fra le varie teorie sorte per spiegare il meccanismo della polarità negli organi assili, sono classiche quelle di BOUILLENNE e WENT (1933) e di WENT (1938-1939) sul trasporto unidirezionale di particolari sostanze organoformatrici (« caline ») e sui loro rapporti con le auxine. Anche la teoria di GAUTHERET (1944) ammette una circolazione polarizzata di diversi presunti fitormoni ad azione organogena.

La presenza di sostanze organoformatrici non è stata peraltro mai dimostrata ed ancora oggi le cause che determinano la formazione di un germoglio piuttosto che di una radice restano da spiegare, anche se è fuor di dubbio che esse sono in rapporto con particolari condizioni biochimiche.

Una questione morfogenetica di notevole interesse è quella di sapere se un abbozzo meristemico è inizialmente in grado di dare origine ad una gemma o ad una radice, oppure se questo determinismo è fin dall'inizio rigidamente stabilito.

DORE (1955) studiando la rigenerazione in radici di *Armoracia rusticana* afferma che i nuovi meristemi organizzati formati in seno al fellogeno della radice principale, inizialmente sono capaci di svilupparsi sia in radici che in germogli. HAWARD (1938) trovò che in *Brassica oleracea* i fusti trattati con AIA all'1% producono radici e gemme da meristemi prodotti vicino ai fasci vascolari e, in alcuni casi, le gemme o parti di gemme si sviluppano come radici.

Le colture in vitro di tessuti isolati possono contribuire, forse in modo decisivo, a gettar luce su tale interessante problema morfogenetico.

La formazione di radici e di germogli è stata ottenuta da tessuti in coltura sia di origine radicale che caulinare. In colture provenienti da parenchima midollare di tabacco è stato in particolare dimostrato che la segmentazione e l'accrescimento che danno origine ad un primordio, procedono solo se al mezzo si aggiunge auxina e kinetina. Variando inoltre il rapporto fra la concentrazione di queste due sostanze si favorisce la formazione

della radice o del fusto. Così se questo rapporto è spostato verso l'auxina si formano di preferenza radici, se è spostato verso la kinetina si favorisce la formazione di germogli, fino ad impedire del tutto quella delle radici (SKOOG e MILLER, 1957).

Forse sotto questa luce deve essere interpretata la formazione di gemme e radici avventizie a partire da foglie isolate (STINGL, 1908; YARWOOD, 1946), da parti fiorali, come petali e perfino gametofiti femminei (LA RUE, 1942, 1954). La totipotenza della cellula vegetale nelle colture in vitro si manifesta in massimo grado nelle capacità rigenerative di singole cellule già differenziate, da cui si può ottenere lo sviluppo di una plantula completa, com'è stato dimostrato in espunti di tessuto di carota (STEWART, 1958; REINERT, 1959; PILET, 1961; BLAKELY e STEWART, 1964).

III) PROBLEMI DELL'ORGANIZZAZIONE DEDOTTI DALLE RICERCHE SULLA RIGENERAZIONE

I problemi morfogenetici che scaturiscono dallo studio dei processi rigenerativi delle cormofite riguardano tutti in definitiva le cause dello sviluppo di una forma organica. Mentre però nei processi riorganizzativi, che si esplicano a livello dei centri morfogenetici, questo sviluppo s'identifica con il *differenziamento*, secondo un determinato modello, di un meristema già organizzato, nei processi di sostituzione lo sviluppo si riferisce più propriamente alla *determinazione* di questi meristemi, nelle loro particolari sedi, secondo definite prospettive morfogenetiche (radici, germogli).

I fenomeni di ricostituzione e quindi di organizzazione possono essere interpretati sulla base di alcuni concetti presi a prestito dall'embriologia animale, ma ugualmente applicabili all'organogenesi vegetale. Le *proprietà regolative* sono possedute sia dall'intero organismo in una precoce fase dello sviluppo embrionale, sia dai centri dello sviluppo di un organismo adulto. Ciò è appunto dimostrato dalle capacità di completa ricostituzione manifestate da un qualunque centro della morfogenesi.

La regolazione del giovane embrione può essere desunta dalle proprietà riorganizzative possedute dal proembrione in tutti i casi di duplicazione e di poliembrionia da scissione osservati specialmente nelle Gimnosperme. Nelle Angiosperme una bella prova sperimentale può, a nostro avviso, essere rappresentata dai casi di sdoppiamento parziale ottenuti da HACCUS (1955) in embrioni di *Eranthis hiemalis* trattati con alcune sostanze di crescita. Un bell'esempio delle proprietà regolative dello zigote è fornito dal caso di biembrionia osservato da SWAMY in *Cymbidium bicolor*: lo zigote, già all'atto della sua prima divisione, sarebbe in grado di ripartire equamente nei primi due blastomeri le sue originarie prospettive morfogenetiche.

Per quanto riguarda la riorganizzazione dei centri dello sviluppo nella fase postembrionale, le due metà di un apice di germoglio o di radice spaccato longitudinalmente riformano ciascuno un apice completo e normale non come il risultato di una neoformazione, ma in seguito ad un processo di vera rigenerazione embrionale che interessa tutto il promeristema e che può essere paragonato alla rigenerazione animale.

DORE (1965) suggerisce che negli esperimenti di frammentazione dei germogli i nuovi apici si formerebbero dalle regioni presuntive dei più giovani primordi fogliari, in analogia con quanto ottenuto da WARDLAW e CUTTER (1954) in *Dryopteris aristata*, in seguito all'isolamento di questi primordi dalla regione apicale. E' invece da notare che i risultati di questi ultimi esperimenti hanno un significato profondamente diverso riguardando l'interruzione dei normali rapporti fra due centri morfogenetici e vanno quindi considerati sotto questa luce.

Recentemente è stato dimostrato che le proprietà regolative sono estensibili ai primordi fogliari, centri di sviluppo a prospettiva limitata e subordinati a quello del germoglio (PELLEGRINI, 1961). Un primordio fogliare avrebbe questa facoltà soltanto in una fase giovanile del suo differenziamento, quando il suo centro morfogenetico non è stato ancora determinato.

La regolazione fogliare è limitata ad una fase molto precoce del primordio nelle Angiosperme, dove il relativo centro

morfogenetico si determina molto per tempo, ma si mantiene molto più a lungo nelle felci, in rapporto al più tardivo determinismo fogliare. Le proprietà regolative si mantengono invece stabilmente nei meristemi apicali, centri di sviluppo permanentemente embrionali.

L'analisi istologica delle modalità riorganizzative di un apice vegetativo fornisce utili indicazioni ai fini dell'interpretazione del meccanismo regolativo. Le caratteristiche autodeterminanti del meristema apicale e le sue capacità di regolare il differenziamento delle strutture sottostanti, specialmente nei riguardi del tessuto vascolare, sono prove inequivocabili dell'intensa attività esplicata dalla regione apicale e delle sue proprietà induttive.

E' stato osservato che l'inizio della rigenerazione dell'apice radicale si identifica proprio con l'attività segmentativa che s'instaura nel promeristema, indipendentemente dall'attività cicatriziale che nelle colture in vitro è quasi inesistente. Questa attività segmentativa si estende in senso acrofugo lungo determinate direzioni inducendo le note modificazioni nelle prospettive morfogenetiche degli istogeni (PELLEGRINI, 1957; PELLEGRINI e GANGEMI, 1964).

Queste attitudini del meristema apicale lasciano pensare ad un ruolo *organizzatore* esplicato da questa regione sia nei processi di ricostituzione che in quelli della normale organogenesi. L'azione organizzante verrebbe esercitata da particolari fattori biochimici che diffondendo in senso acrofugo si manifesterebbe nella individuazione dei ben noti *gradienti*, relativi a determinate proprietà fisiche, chimiche, fisiologiche. L'induzione morfogenetica si esplicherebbe lungo questi gradienti, in un territorio avente una sua propria sfera d'azione: il *campo morfogenetico*.

Recentemente (PELLEGRINI, 1963) è stato prospettato che la bipartizione di un centro di sviluppo mediante un taglio longitudinale mediano possa identificarsi con la bipartizione del suo campo morfogenetico con relativo sdoppiamento del centro organizzatore. *L'azione regolatrice che si esplicherebbe in ciascuna delle due metà del centro di sviluppo potrebbe interpre-*

tarsi come un'azione modellatrice proveniente dal centro organizzatore parziale e diretta a ristabilire il sistema di gradienti alterato dal taglio, con conseguente formazione di un duplice campo morfogenetico.

SINNOT (1960) afferma che paragonare l'apice del germoglio ad un organizzatore, come ammesso per primo da BALL, non è rigorosamente esatto perchè l'organizzatore, così come concepito in embriologia animale, è parte dell'embrione che controlla lo sviluppo delle rimanenti parti, mentre l'apice del germoglio corrisponde ad un intero embrione e quindi all'organismo in miniatura. Ma se l'attributo di organizzatore, aggiungiamo noi, si restringe alla regione distale indifferenziata del germoglio, cioè al promeristema, capace di regolare l'attività organogenetica di territori sottostanti, tale concetto può benissimo essere adattato all'organogenesi vegetale. Ciò si accorda con i risultati delle ricerche di WARDLAW e CUTTER (1954), in base ai quali si desume che, per lo meno nelle Pteridofite, l'organizzazione di un primordio fogliare come organo a simmetria dorsoventrale è regolata dalla regione apicale.

La cessazione dell'attività apicale è causa dei processi di sostituzione, i quali possono anche coesistere con la vera rigenerazione quando questa attività subisce solo un'attenuazione o un arresto temporaneo, dovuti ad esempio ad un trauma. Un'incisione su un apice di germoglio che non ne comprometta la riorganizzazione, stimola inizialmente lo sviluppo delle più vicine gemme ascellari. Questo comportamento, che è stato sempre osservato da noi in *Phaseolus*, rappresenta solo un primo passo verso fenomeni più appariscenti del processo di sostituzione.

Il meccanismo che sta alla base del fenomeno della dominanza apicale, da quello che è stato detto nel capitolo precedente, è indubbiamente molto complesso, implicando fattori di diversa natura, principalmente ormonici e nutrizionali.

E' soprattutto la formazione di nuovi meristemi consecutiva alla rimozione della dominanza apicale, che comporta le maggiori difficoltà interpretative. Più che alla presenza di specifiche sostanze organoformatrici mai messe in evidenza, la

formazione di nuovi organi sembra attribuibile ad un complesso di sostanze ormoniche ad azione antagonista. Gli esperimenti sulle colture in vitro di tessuti isolati compiuti da SKOOG e collaboratori (1957) indicano che la formazione di radici o di germogli è condizionata dal rapporto quantitativo fra auxina da una parte e kinetina o adenina dall'altra.

La proliferazione dell'espianto non è seguita dalla formazione di meristemi organogeni se il rapporto AIA/kinetina si mantiene intorno ad un certo valore; se esso aumenta si ottiene la formazione di radici, se diminuisce si formano germogli.

Che la neoformazione di radici e germogli possa realmente essere condizionata da una tale situazione biochimica, è avallata dalla considerazione che nelle piante sono state rinvenute varie sostanze chimicamente affini alla kinetina ed aventi proprietà organogenetiche: le kinine.

VARDJAN e NITSCH (1961) negli studi sulla polarità della radice di cicoria, in accordo con i risultati di SKOOG e MILLER (1957) hanno dimostrato che la formazione di gemme nella regione fogliare e quella di radici nella regione radicale dipende proprio dalla distribuzione di auxine e kinine.

La formazione di un meristema organizzato secondo DORE (1965) si originerebbe come il risultato di una combinazione di questi complessi ormonici con la presenza dei fattori micronutritivi; l'effetto globale sarebbe quello di stimolare la sintesi di sostanze costruttrici e quindi lo sviluppo di un meristema.

IV) CONCLUSIONI

Lo studio della rigenerazione nelle cormofite permette di comprendere molti fatti della normale organizzazione.

La rigenerazione, tanto nei processi di riorganizzazione quanto in quelli di neoformazione, appare come una sorta di risposta ad un alterato equilibrio biochimico, quell'equilibrio che presiede ad ogni normale processo morfogenetico. Che si tratti di attività biochimica è avallato dalla considerazione che fenomeni analo-

ghi alla rigenerazione, come sdoppiamento di apici, possono essere indotti non solo con interventi meccanici, ma anche mediante somministrazione di particolari sostanze.

Questa risposta è quanto mai varia e complessa ed allo stato attuale ben poco si conosce sulla sua intima essenza. E' chiaro però che essa dipende sia dal grado di differenziamento, che dai rapporti di correlazione delle strutture implicate.

In elementi embrionali costituenti un centro morfogenetico, le reazioni visibili ad un trauma consistono in un'intensa attività cariocinetica che ha inizio nel promeristema e si estende successivamente in senso acrofuco, determinando la riorganizzazione del centro morfogenetico. Tanto si può osservare specialmente in apici vegetativi radicali frammentati longitudinalmente, sia in coltura che sull'organismo intero. E' presumibile che tale attività morfogenetica rappresenti il risultato di un modificato comportamento biochimico espresso da particolari complessi ad attività organizzativa, situati nella regione del promeristema, e che controllano la normale organogenesi. Nell'apice vegetativo del germoglio, un organizzatore primario, localizzato nella regione distale indifferenziata, controllando la formazione e la distribuzione di centri morfogenetici subordinati ed a prospettiva limitata (primordi fogliari), presiederebbe anche alla normale struttura e simmetria di tutto il complesso apicale. Il differenziamento del centro morfogenetico fogliare potrebbe a sua volta essere regolato da particolari organizzatori secondari, come si può desumere dalle proprietà regolative possedute dai giovani primordi fogliari.

L'arresto dell'attività biochimica dei meristemi primari, consecutiva ad un trauma troppo spinto che ne comprometta la riorganizzazione, comporta un'interruzione dei normali rapporti di correlazione fra questi meristemi e le rimanenti regioni della pianta. Questa interruzione di rapporti si traduce nella rimozione della ben nota inibizione apicale, la quale si ripercuote o nella stimolazione allo sviluppo di meristemi laterali già presenti, o, in mancanza di questi, nella formazione di nuovi meristemi, per sdifferenziamento di cellule adulte.

Due problemi di grande interesse si presentano all'attenzione degli studiosi: le cause che determinano la formazione ex novo di questi meristemi e quelle che promuovono il loro differenziamento secondo primordi gemmali o radicali nella loro particolare distribuzione.

Allo stato attuale si è ancora ben lontani dall'aver chiarito queste cause. Cionondimeno i risultati di questi ultimi anni sulle colture in vitro di tessuti isolati, hanno fornito chiare indicazioni che ciascuno dei due processi debba essere essenzialmente regolato da modificazioni quantitative di sostanze morfogeneticamente attive costituenti particolari complessi ormonici.

RIASSUNTO

Allo scopo di analizzare e d'interpretare i principali fatti che accompagnano l'attuarsi dell'organizzazione nelle cormofite, sono stati passati in rassegna i più significativi risultati sperimentali ottenuti negli studi sulla rigenerazione.

Sono stati illustrati vari aspetti della *ricostituzione*, tanto nell'intero organismo nel corso dell'embriogenesi, quanto nei centri morfogenetici della pianta adulta (apici vegetativi, primordi fogliari), per tentare di chiarire i meccanismi che presiedono alla normale dinamica dello sviluppo.

I processi di *sostituzione* consecutivi alla cessazione dell'attività dei centri morfogenetici primari, sono stati illustrati, discutendo le probabili cause che determinano la formazione dei nuovi meristemi e quelle che ne promuovono il differenziamento secondo primordi radicali o gemmali nella loro particolare distribuzione.

Tanto la riorganizzazione quanto i processi di sostituzione sono apparsi come il risultato di un alterato equilibrio biochimico: quell'equilibrio che presiede ad ogni normale processo morfogenetico.

SUMMARY

The most significant experimental results on the regeneration of the cormophytes are reviewed, to analyse and interpret the main facts of the normal organization.

Various aspects of *reconstitution* are illustrated, both in the embryogenetic phases and in the morphogenetic centres of the adult plant (vegetative apices, foliar primordia) in the attempt of explain the mechanisms controlling the normal dynamics of the growth.

The process of *substitution* following the cessation of the morphogenetic activity of primary meristems are illustrated. The probable causes determining the formation of new meristems and those promoting the differentiation of such meristems as bud or root primordia in its particular distribution are discussed.

The process of regeneration, both reorganization and substitution are regarded as the result of an altered biochemical balance: that balance controlling each normal morphogenetic process.

BIBLIOGRAFIA

- BALL, E., 1946a. *Attempted transplants in the shoot apex*. Amer. Jour. Bot. **33**: 216.
- , 1946b. *Segmentation of the shoot apex*. Amer. Jour. Bot., **33**: 817.
- , 1948. *Differentiation in the primary shoots of Lupinus albus L. and of Tropaeolum majus L.* Symposia Soc. Exp. Biol., **2**: 246-262.
- , 1950. *Isolation, removal and attempted transplants of the central portion of the shoot apex of Lupinus albus L.* Amer. Jour. Bot., **37**: 117-136.
- , 1952a. *Morphogenesis of shoots after isolation of the shoot apex of Lupinus albus L.* Amer. Jour. Bot., **39**: 167-191.
- , 1952b. *Experimental division of the shoot apex of Lupinus albus L.* Growth., **16**: 151-174.
- , 1955. *On certain gradients in the shoot tip of Lupinus albus L.* Amer. Jour. Bot., **42**: 509-521.
- , 1956. *Growth of the embryo of Ginkgo biloba under experimental conditions. II. Effects of a longitudinal split in the tip of the hypocotyl.* Amer. Jour. Bot., **43**: 802-810.
- BEAL, J. M., 1937. *Histological responses of three species of Liliium to indole - acetic acid.* Bot. Gaz., **99**: 907.
- BEYERINCK, M. W., 1886. *Over regeneratie Verschijnseten van genspleten vegetatienpunten van stengels en over bekerworming.* Ned. Kruidk. Arch., Ser. II, Deel IV, Stuck. I (in LOPRIORE G., *Note sulla biologia dei processi di rigenerazione delle cormofite determinati da stimoli traumatici.* Atti Acc. Gioenia di Sc. Nat. in Catania. 1906, **19**: 1-28).
- BLAKELY, L. M. & F. C. STEWARD, 1964. *Growth and organized development of cultured cells. V. The growth of colonies from free cells on nutrient agar.* Amer. Jour. Bot., **51**: 780-791.
- BOUILLENNE, R. & F. WENT, 1933. *Récherches expérimentales sur la néoformation des racines dans les plantules et les boutures des plantes supérieures.* Ann. Jard. bot. Buitenz., **43**: 52-202.
- BRUMFIELD, R. T., 1943. *Cell-lineage studies in root meristems by means of chromosome rearrangements induced by X-rays.* Amer. Jour. bot., **30**: 101-109.
- BUCHOLZ, J. T., 1920. *Embryo development and polyembryony in relation to the phylogeny of conifers.* Amer. Jour. Bot., **7**: 125.

- BUCHOLZ, J. T., 1926. *Origin of cleavage polyembryony in conifers*. Bot. Gaz., **81**: 55.
- , 1933. *Determinate cleavage polyembryony with special reference to Dacrydium*. Bot. Gaz., **94**: 579.
- CLOWES, F. A. L., 1950a. *Root apical meristems of Fagus silvatica*. New Phytol., **49**: 284-68.
- , 1950b. *The promeristems of roots*. Proc. VII Internat. bot. Congress, 357-358.
- , 1953. *The cytogenenerative centre in roots with broad columellas*. New Phytol., **52**: 48-57.
- , 1954. *The promeristem and the minimal constructional centre in grass root apices*. New Phytol., **53**: 108-116.
- CUTTER, E. G., 1954. *Experimental induction of buds from fern leaf primordia*. Nature, **173**: 440-441.
- , 1956. *Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XXXIII. The experimental induction of buds from leaf primordia in Dryopteris aristata Druce*. Ann. bot., **20**: 143-168.
- , 1958. *Studies of morphogenesis in the Nymphaeaceae. III Surgical experiments on leaf and bud formation*. Phytomorphology, **8**: 74-95.
- , 1964. *Phyllotaxis and apical growth*. New Phytol., **63**: 39-46.
- DORE, J., 1955. *Studies in the regeneration of horseradish. I. A re-examination of the morphology and anatomy of regeneration*. Ann. Bot., **19**: 127-137.
- , 1965. *Physiology of regeneration in cormophytes*. Handb. der pflanzenph., **15** (1): 1-91.
- FIGDOR, W., 1906. *Ueber regeneration der Blattspreite bei Scolopendrium scolopendrium*. Ber. Deut. Bot. Ges.: 13-16.
- GAUTHERET, R., 1944. *Recherches sur la polarité des tissus végétaux*. Rev. Cyt. et cytophysiol. végét., **7**: 45-215.
- GOEBEL, K., 1902. *Ueber Regeneration im Pflanzenreich*. Biol. Centr., **22**: 481-505.
- GREGORY, F. G. & J. A. VEALE, 1957. *A reassessment of the problem of the apical dominance*. Symp. Soc. exp. Biol., **11**: 1-20.
- GUTTENBERG, H. VON, 1947. *Studien über die Entwicklung des Wurzelvegetationspunktes der Dikotyledonen*. Planta, **35**: 360-396.
- HACCIUS, B., 1955. *Experimentally induced twinning in plants*. Nature (London), **176**: 355-356.

- HOWARD, H. W., 1938. *Possible action of phytohormones as root determiners*. Ann. Bot., **2**: 933-942.
- JOHANSEN, D. A., 1950. *Plant Embryology*. The Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts (U.S.A.).
- LA RUE, C. D., 1942. *The rooting of flowers in sterile culture*. Bull. Torrey Bot. Club., **69**: 332-341.
- , 1954. *Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms*. Brookhaven Symposia in Biol., **6**: 187-207.
- LEBÈGUE, A., 1952. *La polyembryonie chez les Angiospermes*. Bull. Soc. Bot. Fr., **99** (7-8): 329-367.
- LINK, G. K. K. & V. EGGERS, 1946a. *Mode, site, and time of initiation of hypocotyledonary bud primordia in Linum usitatissimum L.* Bot. Gaz., **107**: 441-454.
- , 1946b. *The effect of indoleacetic acid upon initiation and development of hypocotyledonary bud primordia in flax*. Bot. Gaz., **108**: 114-129.
- LINSBAUER, K., 1917. *Studien über die Regeneration des Sprossvegetationspunktes*. Denkschr. kaiserl. Akad. der Wiss. in Wien. Math. - Nat. Klasse, **93**: 107.
- LOISEAU, J. E., 1959. *Observations et expérimentation sur la phyllotaxie et le fonctionnement du sommet végétatif chez quelques Balsaminacées*. Thèse Paris et Ann. Sc. Bot., **20**: 1-214.
- , 1960. *Application des techniques de microchirurgie à l'étude expérimentale des méristèmes caulinaires*. Ann. Biol., **36** (5-6): 249-304.
- LOPRIORE, G. 1895. *Vorläufige Mitteilung über die Regeneration gespaltener Stammspitzen*. Ber. dtsc. bot. Ges., **13**: 410-414.
- MIRSKAJA, L., 1928. *Über Regenerationvorgänge an Vegetationspunkten von Tradescantia guianensis*. Planta, **8**: 27-35.
- PELLEGRINI, O., 1957. *Esperimenti chirurgici sul comportamento del meristema radicale di Phaseolus vulgaris L.* Delpinoa, **10**: 187-199.
- , 1958. *Studio sulla poliembryonia di Araucaria bidwillii Hook.* Delpinoa, **10**: 261-286.
- , 1959. *Esperimenti microchirurgici sul funzionamento del meristema apicale del germoglio di Phaseolus vulgaris L.* Delpinoa, n. s., **1**: 205-230.

- PELLEGRINI, O., 1961a. *Frammentazione sperimentale dei primordi fogliari e loro « proprietà regolative » nella morfogenesi della foglia*. Delpinoa, n. s., **3**: 239-244.
- , 1961b. *Modificazione delle prospettive morfogenetiche in primordi fogliari chirurgicamente isolati dal meristema apicale del germoglio*. Delpinoa, n. s., **3**: 1-12.
- , 1963a. *Fenomeni di regolazione nei meristemi apicali*. Giornale bot. Italiano, **70** (5-6): 603-608.
- , 1963b. *Esperimenti sul determinismo morfogenetico della gemma ascellare in Phaseolus vulgaris L.* Delpinoa, n. s., **5**: 25-42.
- , & G. GANGEMI, 1964. *Esperimenti sulle capacità organizzative del centro morfogenetico radicale frammentato e coltivato in vitro*. Delpinoa, n. s., **6**: 35-39.
- PILET, P. E., 1961. *Culture in vitro de tissus de Carotte et organogénèse*. Bull. Soc. Bot. Suisse, **71**: 189-208.
- PILKINGTON, M., 1929. *The regeneration of the stem apex*. New Phyt., **28**: 37-53.
- REINERT, J., 1959. *Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten*. Planta, **53**: 318-333.
- ROBBINS, W. J., BARTLEY, M. & V. B. WHITE, 1936. *Growth of fragments of excised root tips*. Bot. Gaz., **97**: 554-579.
- SHARMAN, B. C., 1942. *A twin seedling in Zea Mays L. twinning in the Gramineae*. The New Phyt., **41**: 125-129.
- SINNOT, E. W., 1960. *Plant morphogenesis*. Mc Graw-Hill Book Comp. (London).
- SNOW, R., 1937. *On the nature of correlative inhibition*. New Phytol. **36**: 283-300.
- , 1955. *Problems of phyllotaxis and leaf determination*. Endeavour, **14**: 190-199.
- , & M. SNOW, 1931. *Experiments on phyllotaxis. I. The effect of isolating a primordium*. Philos. Trans. Roy. Soc. (Lond.) **221**: 1-43.
- & —, 1933. *Experiments on phyllotaxis. II. The effect of displacing a primordium*. Philos. Trans. Roy. Soc. (Lond.) **222**: 353-400.
- & —, 1935. *Experiments on phyllotaxis. III. Diagonal splits through decussate apices*. Philos. Trans. Roy. Soc. (Lond.) **225**: 63-94.

- SNOW, R., & M. SNOW, 1953. *Regeneration of the potato shoot apex*. Nature, **171**: 224.
- & —, 1954. *Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves*. Nature, **174**: 352-353.
- SKOOG, F. & C. O. MILLER, 1957. *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*. Symp. Soc. exp. biol., **11**: 118-131.
- SOMA, K., 1958. *Morphogenesis in the shoot apex of Euphorbia lathyris L.* Jour. Fasc. Sci. Tokyo Univ. III, **7**: 199-256.
- STERLING, C., 1949. *Preliminary attempts in Larch embryo culture*. The Bot. Gaz., **111**: 90.
- STEWART, F. C., 1958. *Interpretations of the growth from free cell to carrot plant*. Amer. Jour. Bot., **45**: 709-713.
- STINGL, G., 1908. *Über regenerative Neubildungen an isolierten Blättern phanerogamer Pflanzen*. Flora, **99**: 178-192.
- SUSSEX, I. M., 1951. *Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves*. Nature, **167**: 651-652.
- , 1952. *Regeneration on the potato shoot apex* Nature, **170**: 755-757.
- , 1953. *Regeneration of the potato shoot apex*. Nature, **171**: 224-225.
- , 1954. *Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves*. Nature, **174**: 351-352.
- , 1955. *Morphogenesis in Solanum tuberosum L.: experimental investigation of leaf dorsiventrality and orientation in the juvenile shoot*. Phytomorph., **5**: 286-300.
- SWAMY, B. G. L., 1942. *Female gametophyte and embryogeny in Cymbidium bicolor Lindl.* Proc. Indian Acad. Sc. **15**: 194-201.
- THIMANN, K. V. & K. SKOOG, 1934. *On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in Vicia faba*. Proc. Roy. Soc. London, **114**: 317-339.
- & —, 1960. *The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. II. The transport of IAA in Pea stems in relation to apical dominance*. Physiol. plant., **13**: 359-554.
- VARDJAN, M. & J. P. NITSCH, 1961. *La régénération chez Cichorium endivia L.: étude des auxines e des "kinines" endogènes*. Bull. Soc. Bot. France. **108**: 363-374.
- VÖCHTING, H., 1878. *Über organbildung im Pflanzenreich. I.* Bonn..

- WÖCHTING, H., 1906. *Über regeneration und Polarität bei höhern Pflanzen.* Bot. Zeit. **64**: 101-148.
- WARDLAW, C. W., 1949a. *Experimental and analytical studies of pteridophytes XIV. Leaf formation and phyllotaxis in Dryopteris aristata Druce.* Ann. Bot., **13**: 163-198.
- , 1949b. *Experiments on organogenesis in ferns.* Growth (suppl.) **13**: 93-131.
- , 1950a. *The comparative investigation of apices of vascular plants by experimental methods.* Phyl. Trans. B. **234**: 583-604.
- , 1950b. *Experimental and analytical studies of pteridophytes. XVI. The induction of leaves and buds in Dryopteris aristata Druce,* Ann. bot., **14**: 435-455.
- , 1952. *Phylogeny and morphogenesis.* 536 pp. MacMillan, London.
- , 1956. *A note on the effect of isolating the fern shoot apex by shallow incision.* Phytomorph., **6**: 55-63.
- , 1965. *The organization of the shoot apex.* Handbuch der pflanzenphys., **15** (1): 966-1076.
- & E. CUTTER, 1954. *Effect of deep and shallow incisions on organogenesis at the fern apex.* Nature, **174**: 734-735.
- WENT, F. W., 1938. *Specific factors other than auxin affecting growth and root formation.* Plant Physiol., **13**: 55-80.
- , 1939. *The dual effect of auxin on root formation.* Amer. Jour. Bot. **26**: 24-29.
- WETMORE R. H. & C. W. WARDLAW, 1951. *Experimental morphogenesis in vascular plants.* Ann. Rev. Plant. Physiol., **2**: 269-292.
- WICKSON, M. & K. V. THIMANN, 1958. *The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance.* Physiol. plant., **11**: 62-74.
- & —, 1960. *The antagonism of auxin and Kinetin in apical dominance. II. The transport of IAA in Pea Stems in Relation to Apical Dominance.* Physiol. plant., **13**: 539-554.
- YARWOOD, C. E., 1946. *Detached leaf culture.* Bot. Rev., **12**: 1-56.