

wahrscheinlich gemacht werden. Der Primärprozeß ist vermutlich in allen Fällen der Stoß von Elektronen auf Neutralkomplexe. Bei sehr geringen Energien werden die Elektronen elastisch reflektiert, höhere Energien führen zur Anregung und Ionisierung der Moleküle. Bei genügend hohen Energien können die Reaktionen im Plasma also über angeregte Moleküle, Molekül-Ionen oder über durch Rekombination entstandene hochangeregte Moleküle bzw. die Zerfallsprodukte dieser drei möglichen Spezies verlaufen.

Sowohl bei den Kohlenwasserstoffen wie bei den Äthern und Halogenverbindungen ist es möglich, auf Grund der Reaktionsprodukte zwischen den verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten zu unterscheiden. Bei den Kohlenwasserstoffen ist das Auftreten von Benzylradikalen im Plasma spektroskopisch wahrscheinlich gemacht worden [11]. Auch die Reaktionsprodukte sprechen für ein intermediäres Auftreten von Radikalen, die dann mit Neutralkomplexen unter Abspaltung eines Protons oder eines Alkylrestes reagieren. Da jedoch im Plasma andere Produkte entstehen als bei der Photolyse, verläuft die Reaktion vermutlich nicht über ein angeregtes, sondern über ein durch Rekombination entstandenes hochangeregtes Molekül. Ein Reaktionsablauf über das Benzylkation ist wegen der beobachteten geringen Selektivität unwahrscheinlich.

Bei den aromatischen Äthern spricht die außerordentliche Selektivität bei der Wanderung der Alkylgruppe gegen einen radikalischen Mechanismus. Das alleinige Auftreten von para- und ortho-Alkylphenol läßt sich besser mit einem ionischen Mechanismus vereinbaren. Derartige Alkyläther-Alkylphenol-Umlagerungen sind in der flüssigen Phase bekannt und verlaufen bei sekundären Alkylgruppen unter Lewisäurekatalyse, bei tertiären schon beim Erwärmen. Primäre Alkylgruppen wandern nicht, doch erscheint unter den Bedingungen der Plasma-reaktion auch eine Wanderung primärer Alkylgruppen möglich. In Analogie zu den Umlagerungen in flüssiger Phase, die nach einem ionischen Mechanismus verlaufen, darf man annehmen, daß die Umlagerungen im Plasma am Molekülion erfolgen.

Bei der Umsetzung von Tetrachlorkohlenstoff zerfällt vermutlich das angeregte Molekül unter Abspaltung eines Chloratoms in das Trichlormethylradikal, das entweder zum Hexachloräthan dimerisiert oder unter erneuter Chlorabspaltung in Dichlormethylen über-

geht [12, 13]. Aus dem Hexachloräthan und dem durch Dimerisierung des Dichlormethylens gebildeten Tetrachloräthylen entstehen dann durch erneute Anregung oder durch Reaktion mit Dichlormethylen die anderen, nur in geringen Mengen auftretenden Reaktionsprodukte.

Obwohl alle Schlüsse auf den Reaktionsmechanismus mit größter Vorsicht gezogen werden müssen, machen die Reaktionsprodukte in einem Fall den Ablauf über ein hochangeregtes Molekül, im anderen über ein Molekülion und im dritten über ein angeregtes Molekül wahrscheinlich. Es ist daher nicht möglich, alle Plasmareaktionen nach dem gleichen Schema zu formulieren, vielmehr muß bei jeder Umsetzung untersucht werden, welches der möglichen instabilen Zwischenprodukte eine Schlüsselrolle spielt.

Die hier angeführten Plasmareaktionen zeigen alle relativ gute Ausbeuten, die durch Optimierung der Reaktionsbedingungen sicher oft noch verbessert werden können, und führen zu einheitlichen Produkten oder Mischungen aus wenigen Komponenten. Da die Umsetzungen im Plasma vielfach andere Verbindungen liefern als die Photolyse oder Pyrolyse und der apparative Aufwand nur gering ist, verdient die Plasmachemie auch präparatives Interesse und es ist anzunehmen, daß solche Umsetzungen in den kommenden Jahren als Synthesemöglichkeit in zunehmendem Maße an Bedeutung gewinnen werden.

Herrn Dr. W. RIEPE, Institut für Spektrochemie, Abt. Massenspektrometrie, Dortmund, danken wir für die Aufnahme und Deutung der Massenspektren, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung dieser Arbeiten.

- [1] SCHÜLER, H., u. M. STOCKBURGER: *Z. Naturforsch.* 14a, 229 (1959). — [2] COTTRELL, T. L.: *The Strength of Chemical Bonds*, 2nd. Ed. London: Butterworth 1958. — [3] BADGER, G. M., u. T. M. SPOTSWOOD: *J. Chem. Soc. (London)* 1960, 4420. — [4] HENTZ, R. R., u. M. BURTON: *J. Americ. chem. Soc.* 73, 532 (1951). — [5] KHARASH, M. S., et al.: *J. org. Chem.* 10, 401 (1945). — [6] STREITWIESER, A., u. H. R. WARD: *J. Americ. chem. Soc.* 84, 1065 (1962); 85, 539 (1963). — [7] OBOLENTSEV, R. D.: *J. Gen. Chem. (USSR)* 16, 1459 (1946); — C. A. 41, 5477 (1947). — [8] HOMER, J. B., et al., in: CALVERT, J. G., and J. N. PITTS, JR.: *Photochemistry*. New York: Wiley 1966. — [9] SCHMEISSER, M., et al.: *Chem. Ber.* 95, 1648 (1962). — [10] STEUDEL, R.: *Tetrahedron Letters* 19, 1845 (1967). — [11] SCHÜLER, H., u. A. MICHEL: *Z. Naturforsch.* 10a, 459 (1955). — [12] SWIFT, F., JR., et al.: *J. org. Chem.* 30, 3114 (1965). — [13] WESCOTT, L. D., u. P. S. SKELL: *J. Americ. chem. Soc.* 87, 1721 (1965).

Eingegangen am 1. Februar 1968

Morphogenese in Gewebe- und Zellkulturen

J. REINERT

Pflanzenphysiologisches Institut der Freien Universität Berlin-Dahlem

Zellen höherer Pflanzen sind deshalb für morphogenetische Untersuchungen geeignet, weil sie — im Gegensatz zu den tierischen Zellen höherer Tiere — in der Lage sind, neue Organe oder sogar vollständige Pflanzen zu bilden, auch wenn sie in vitro kultiviert werden. Derartige Kulturen gestatten eine weitgehende Kontrolle äußerer Faktoren und

darüber hinaus können Korrelationen ausgeschaltet werden, welche bei intakten Pflanzen die Versuchsbedingungen sehr komplizieren können. Das gilt besonders für die apikale Dominanz, d. h. den Einfluß der embryonalen Gewebe in Sproß- und Wurzelspitze auf das Wachstum und die Differenzierung der basalen Teile.

Die Bedeutung von Zell- bzw. von Gewebekulturen für Untersuchungen über die Form und Gestalt von Pflanzen ist schon vor 65 Jahren von HABERLANDT [1] mit überraschender Sicherheit intuitiv erfaßt und klargestellt worden. HABERLANDT war damals aber nicht in der Lage, seine Voraussagen zu beweisen, weil er mit ungeeigneten Objekten und unter unzureichenden Voraussetzungen arbeitete. Er experimentierte mit spezialisierten, chlorophyllhaltigen Zellen, Objekten, deren Kultur auch jetzt noch Schwierigkeiten macht. Auch fehlten ihm Wachstumsfaktoren. Wenn man heute die unterschiedlichsten Gewebe aus höheren Pflanzen kultivieren kann, dann beruht das hauptsächlich auf der Verwendung von Explantaten mit embryonalen Zellen und auf der Tatsache, daß neben Auxinen noch andere Wachstumsfaktoren zur Verfügung stehen.

Nährmedien

Gewebe- und Zellkulturen aus Pflanzen wachsen in der Regel auf einfachen, chemisch eindeutig definierten Nährmedien, die Zucker, Nährsalze, Spurenelemente und Auxine enthalten, dazu können noch Hormone, Aminosäuren und Vitamine kommen. Es besteht also ein wesentlicher Unterschied zu den Zellen höherer Tiere, die in der Regel nur in Nährmedien kultiviert werden können, die komplexe Komponenten enthalten.

Die Regel, daß Gewebe und Zellen auf einfachen, synthetischen Nährböden wachsen, trifft allerdings nur für die zweikeimblättrigen Pflanzen zu. Gewebe und Zellen aus Monokotylen konnten bisher nur dann zeitlich unbegrenzt in Kultur gehalten werden, wenn die erwähnten einfachen Medien durch komplexe Komponenten, z.B. Kokosnußmilch, Malz- oder Hefeextrakt, ergänzt wurden [2].

Zelldifferenzierung und Histogenese

Die Gewebe und Zellen, die sich auf, oder im Falle von Suspensionen in den Nährmedien entwickeln, bestehen zum größten Teil aus parenchymatischen, vakuolisierten Zellen, zwischen denen häufig kleine embryonale Regionen oder größere, Kambium-ähnliche Zonen, in vielen Fällen aber auch weitgehend differenzierte Elemente liegen. Das können sowohl einzelne Tracheiden, wasserleitende Zellen mit verholzter Wand (Fig. 1), als auch regelrechte Bündel aus Phloemzellen, Elemente des Assimilattransportes, und Tracheiden sein. Die Kulturen können also aus sehr unterschiedlichen Zellen bestehen, für deren Differenzierung immer zwei Phasen benötigt werden. Zuerst kommt es zur Dedifferenzierung im ursprünglichen Explantat und zur Bildung teilungsfähiger Zellen, die sich nur durch ihre Vakuolen von denjenigen in den Meristemen intakter Pflanzen unterscheiden [3]. Dabei können praktisch alle lebenden Zellen, selbst so weitgehend spezialisierte Typen wie Collenchymzellen und schon teilweise verholzte Faserzellen wieder reembryonalisiert werden [4, 5]. Erst in der zweiten Phase entstehen durch erneute Differenzierung die spezialisierten Zelltypen. Viele Gewebekulturen sind also per se gute Beispiele für die weitgehende Erhaltung der Potenzen und für die Plastizität der Form von Pflanzenzellen. Es ist aber andererseits so, daß in den Kulturen bei weitem nicht die Variationsmöglichkeiten beobachtet werden, die für die Differenzierung der Zellen intakter Pflanzen bekannt sind.

Diese Differenzierung kann durch verschiedene Faktoren kontrolliert werden. Tracheidale Zellen sind

z.B. durch die Pfropfung von Cichorienknospen auf Gewebekulturen aus dem Sproß der gleichen Pflanze induziert worden. Unter der Pfropfung stieg zuerst die Zahl der Mitosen an und erst dann entwickelten sich daraus Reihen tracheidaler Zellen [6]. Das gleiche ließ sich auch durch lokalisierte Zuführung von Auxin und Rohrzucker zu homogen parenchymatischen Kulturen aus Fliedersprossen erreichen [7]. Mit denselben Objekten ist später gezeigt worden, daß durch das Mengenverhältnis von Auxin und Rohrzucker auch festgelegt werden kann, ob Tracheiden- oder Phloemzellen entstehen. Unterschiedliche Auxin-Konzentrationen (0,05 mg/l, 1 mg/l) resultierten überdies in einer unterschiedlichen Lokalisierung der tracheidalen Zellen, d. h. diese entwickelten sich bei geringer

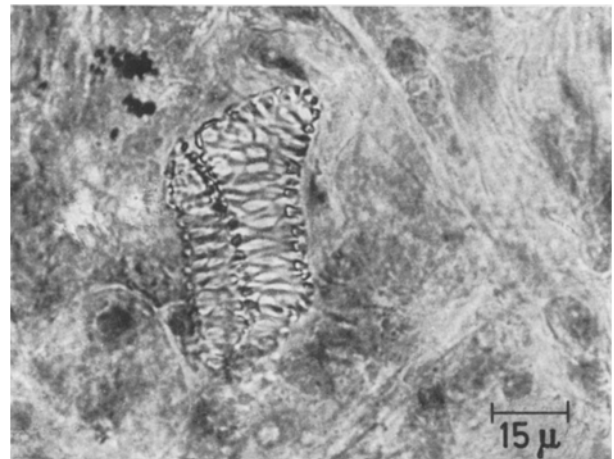


Fig. 1. Tracheidale Zellen im Parenchym von Kulturen aus Haplopappus-Keimlingen

Konzentration in unmittelbarer Nähe, bei der höheren dagegen in einiger Entfernung vom Ort der Zuführung [8]. Neben Auxinen und Rohrzucker hat sich an anderen Objekten, Karotten- [9] und Tabakgewebe [10], das Kinetin (6-Furfurylaminopurin) als determinierender Faktor erwiesen und zwar löste es in beiden Fällen eine Steigerung der Zahl lignifizierter Zellen aus. Andererseits konnte mit der gleichen Verbindung, genau so wie mit Auxin, aber auch die Bildung verholzter Zellen in Kulturen aus Tabakgeweben gehemmt werden [11]. Die Wirkung von Hormonen und von anderen Faktoren ist also variabel und trifft nicht für alle Kulturen in der gleichen Weise zu. Mit diesen Ergebnissen steht die Beeinflussung der Differenzierung durch diese Verbindungen fest, es ist aber bis jetzt kaum zu entscheiden, ob die Hormone dabei direkt oder nur mittelbar über die Induktion der Teilungsfähigkeit der Zellen wirksam werden [11, 12].

Organogenese

Sehr viel spektakulärer als die Differenzierung von einzelnen Zellen oder von Zellgruppen ist die Bildung von Organen und ganzen Pflanzen. Derartige Regenerationen sind — bedingt durch die Vorteile bei der Kultur — hauptsächlich an Kulturen aus dikotylen, aber nur in wenigen Fällen an Geweben aus mono-

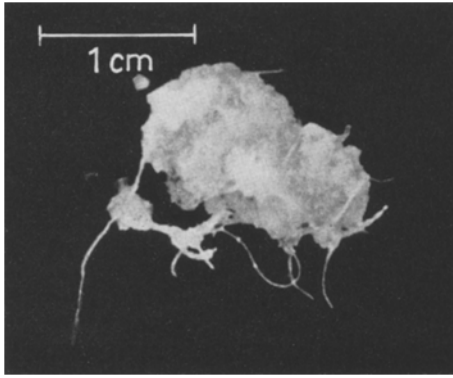


Fig. 2. Wurzeln an einer Karottenkultur

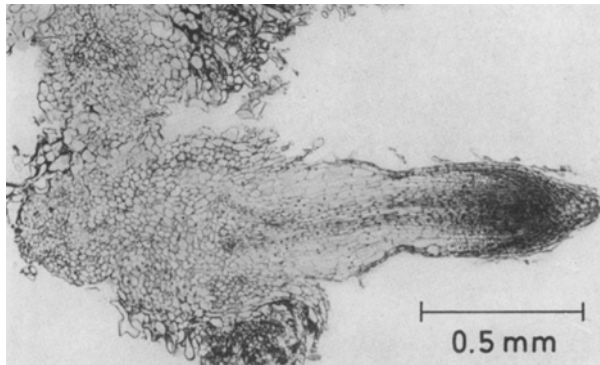


Fig. 3. Medianer Schnitt durch eine junge Wurzel an einer Gewebekultur aus Erbsenwurzeln

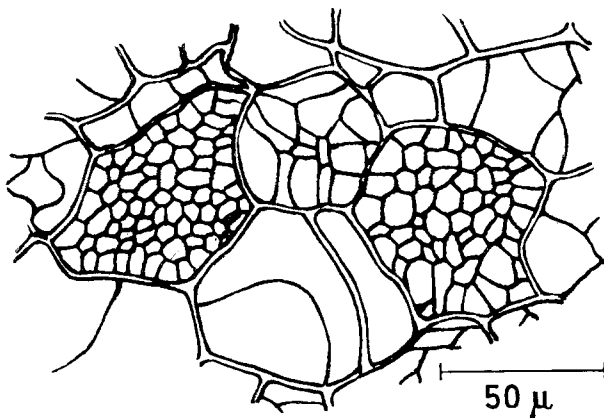


Fig. 4. Bildung meristematischer Zentren in Parenchymzellen von Karottenkulturen. Die begrenzten, embryonalen Zonen entwickeln sich später zu Wurzelmeristemen

Fig. 5. Blüten und Blütenknospen an zwei Jahre alten Kulturen aus Blättern von *Crepis capillaris*

kotylen Pflanzen beobachtet worden. Am häufigsten kommt es zur Wurzelbildung; dabei ist es gleichgültig, ob das verwendete Explantat aus einer Wurzel oder aus einem Sproß stammt. Die meist regellos über die Oberfläche der Kulturen verteilten Wurzeln sind monopolar, d. h. ihre Basis endet blind im Parenchym der Kulturen (Fig. 2 und 3). Das Wurzelmeristem und die darunter liegenden Wachstums- und Differenzierungszone sind fast immer normal gebaut und unterscheiden sich kaum von denjenigen intakter Pflanzen.

Seltener als Wurzeln entstehen Knospen, Blätter oder unbewurzelte Sprosse an Gewebekulturen. Es liegen deshalb auch weniger sichere Beobachtungen über ihre morphologischen und anatomischen Eigenschaften vor. An mehreren Objekten, Kulturen aus Tabakpflanzen [13] und aus jungen Sequoiastämmchen [14], sind aber monopolare Sprosse mit normaler Struktur nachgewiesen worden. Daneben können allerdings auch an anderen Kallusgeweben, z. B. aus den Blättern von Agaven oder aus dem Parenchym von Tabakstengeln, Strukturen gebildet werden, die nur noch als knospenartig bzw. als blattartig bezeichnet werden können [15, 16]. In wenigen Fällen, z. B. an Kulturen aus Convolvulus-Wurzeln [17] und aus Karotten [18] sind Wurzeln und Sprosse am gleichen Objekt festgestellt worden.

Alle diese Organe entstehen nur selten aus präexistierenden Anlagen, ihre Primordien werden also de novo gebildet. Bei ihrer Entstehung kommt es genau so zuerst zur Dedifferenzierung und dann zur Re-embryonalisierung von Gruppen reifer Zellen, wie es schon für die tracheidalen Elemente beschrieben worden ist, und es entstehen kleinere Meristeme (Fig. 4), deren Zellen stark protoplasmahaltig sind und auffallend große Kerne haben [3, 17]. Vermutlich wird erst danach determiniert, ob Wurzel- oder Sproßanlagen aus diesen Zellgruppen entstehen. Erst einige Zeit nach der Anlage der Meristeme zeigt sich auch die Polarität der Längsachsen dieser, sich organisierenden Primordien; sie deckt sich mit der Richtung der Spindelfasern der Mitosen.

Wurzeln und Sprosse entstehen oft spontan an Gewebekulturen, auch wenn diese auf den einfachen, basalen Medien nach WHITE oder GAUTHERET wachsen. Das gleiche trifft aber nicht für die Bildung von Blüten bzw. von Adventivembryonen zu, sie benötigen andere Bedingungen. Die Entstehung von Blütenprimordien in vitro und deren Weiterentwicklung zu vollständigen Blüten (Fig. 5) ist erst vor relativ kurzer Zeit zum ersten Mal an Segmenten aus Tabakstengeln beobachtet worden [19, 20]. Bei diesen Untersuchungen entstanden Blüten nur an älteren Segmenten, die blühreif waren, aber noch keine Primordien hatten. An Geweben aus jüngeren Teilen entwickelten sich jedoch nur vegetative Knospen. Über die Entwicklungsgeschichte dieser Blütenanlagen liegen noch keine exakten Befunde vor, es ist aber anzunehmen, daß sie ähnlich verläuft wie die anderer monopolarer Regenerate. Blütenbildung in vitro ist neuerdings auch an Kulturen aus anderen Kurztags- und Langtags-, sowie aus kältebedürftigen Pflanzen beobachtet worden. Dabei ist es gelungen, Blütenprimordien durch Kälteperioden [21] bzw. durch geeignete Lichtzyklen [22] zu induzieren.

Embryogenese

Die Bildung von Adventivembryonen in somatischen Zellen von Gewebekulturen beginnt ebenfalls mit der Dedifferenzierung und Reembryonalisierung parenchymatischer Zellen, danach verläuft sie aber anders als die Entwicklung der monopolen Organe. Am bekanntesten ist das Verhalten der Zellen aus Karottenwurzeln, in denen Embryonen entstehen, deren Entwicklungsstadien in frappierender Weise denjenigen ähneln, die nach der Befruchtung von Eizellen gebildet werden [23—25]. Diese Form der Embryogenese läuft nicht nur in Karottenzellen ab, sondern sie ist jetzt für Arten aus verschiedenen Gattungen nachgewiesen worden [26]. Die Fähigkeit zur Embryobildung, die sich in besonders starkem Maße in Kulturen aus Embryonen von Wildkarotten ausprägt [24], dürfte also eine weitverbreitete, vielleicht sogar eine fundamentale Eigenschaft somatischer Pflanzenzellen sein. Mit diesen Befunden ist auch eines der weitgehendsten Postulate HABERLANDTS [1] zur Totipotenz in vitro kultivierter Zellen verifiziert worden, nämlich „die künstliche Erzeugung von Embryonen in vegetativen Zellen“.

Auf Grund des Verlaufes der Entwicklungsgeschichte der Embryonen ist postuliert worden, daß sie aus einzelnen Zellen in den Karottenkulturen entstehen. Entscheidend für diese Annahme war das Muster der Zellteilung bei der Embryoentwicklung — es deckte sich weitgehend mit dem Verlauf der Zellteilung bei der Entwicklung von befruchteten Eizellen — und die Tatsache, daß proembryonale Stadien, genau so wie die Ei-ähnlichen Zellen, aus denen sie sich mit großer Wahrscheinlichkeit entwickelt haben, von einer verstärkten Zellwand umschlossen waren [23, 27] (Fig. 6—9).

Sehr viel weitergehende Folgerungen sind aus Beobachtungen an Suspensionen gezogen worden, die aus Einzelzellen und Zellaggregaten bestanden [28]. Danach entwickeln sich isolierte Einzelzellen unmittelbar durch Segmentierung ohne Kallusbildung zu

embryo-ähnlichen Gebilden und diese dann weiter zu normalen Pflänzchen; also ein direkter Weg der Entwicklung einer Pflanze aus einer isolierten Einzelzelle ohne die Beteiligung anderer Zellen. Nachdem auf Mängel bei der Beweisführung für diese Annahme hingewiesen worden ist — die Einzelzellen in den Suspensionen teilen sich in der Regel nicht [29] —

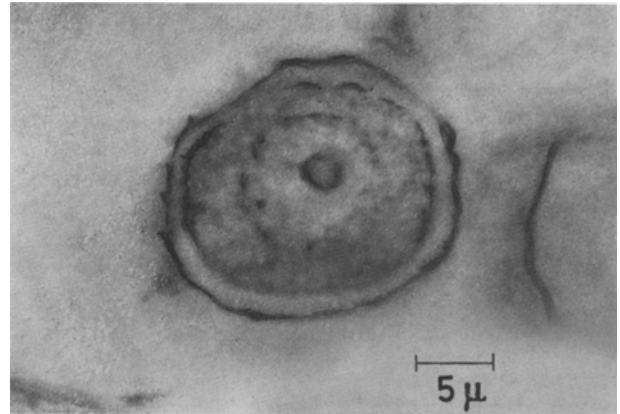


Fig. 6. Ei-ähnliche, embryonale Zelle mit verdickter Zellwand aus Karottenkulturen mit Embryonen

ist neuerdings auch festgestellt worden, daß Embryonen nicht aus isolierten Einzelzellen, sondern offenbar nur in Zellaggregaten gebildet werden [30]. Mit diesen Resultaten bleibt die Hypothese unbewiesen, nach der die physiologische Isolierung von Einzelzellen die Voraussetzung für das Freiwerden ihrer Potenzen und damit für die Embryogenese in vitro ist [24].

Faktoren der Morphogenese

Trotz der Vielzahl der Beobachtungen über die Organogenese, lassen sich wenige Regeln daraus ableiten. Meistens sind nur frisch isolierte bzw. kurzfristig



Fig. 7. Proembryo mit verdickten, peripheren Zellwänden im Parenchym einer Karottenkultur

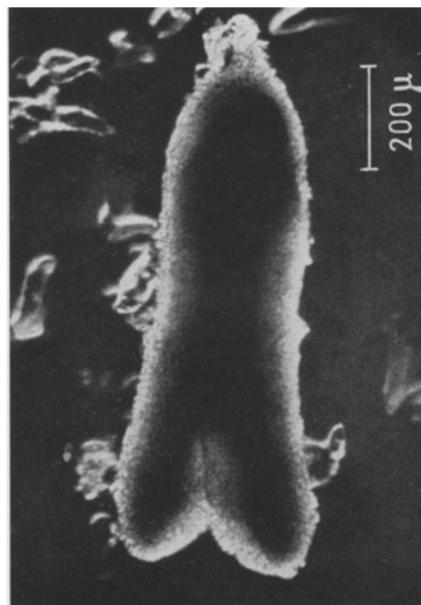


Fig. 8. Vollentwickelter Embryo aus einer Karottenkultur. Diese Embryonen aus somatischen Zellen sind normal gebaut

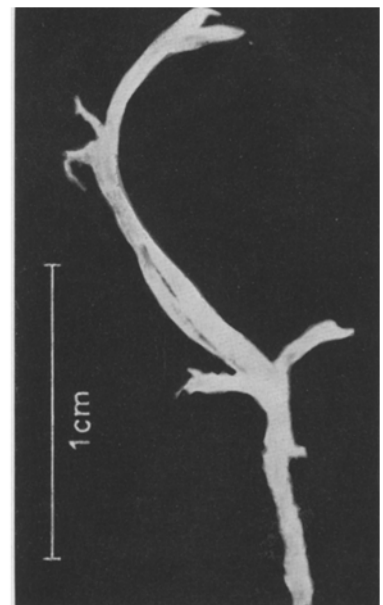


Fig. 9. Junges Karottenpflänzchen mit Primärblättern, Kotyledonen und etwas verdickter Hauptwurzel aus einer Karottenkultur

kultivierte Zellen in der Lage, Organe oder ganze Pflanzen zu bilden, mit zunehmender Kulturdauer nimmt diese Fähigkeit ab. Für die Embryobildung in bestimmten Stämmen von Karottengeweben — um nur ein Beispiel zu nennen — tritt das nach rund 30 Wochen ein [31]. Daneben gibt es aber andere Kulturen z.B. aus *Amorphophallus*, deren Fähigkeit zur Formation von Organen offenbar zeitlich unbegrenzt ist [32]. Aber auch das Gegenteil ist möglich, das sind die gar nicht seltenen Kulturen, die ohne jede Organisation wachsen. Auch das kann sich im Verlauf einer mehrjährigen Kultur ändern. An Kulturen aus Kronengallen von Schwarzwurzeln kam es z.B. erst zur Bildung von Wurzeln und Sprossen, nachdem sie jahrelang völlig undifferenziert gewachsen waren [33]. Etwas Ähnliches ist an Virus-induzierten Tumorgeweben beobachtet worden [34]. Diesem Verhalten der Kulturen, das vorläufig nicht befriedigend erklärt werden kann, entspricht die Instabilität des Genoms der Zellen der meisten Gewebekulturen. Das hat sich schon bei älteren cytologischen Untersuchungen über den unterschiedlichen Ploidiegrad von normalen und Tumorgeweben gezeigt, besonders eindeutig sind aber neuere Ergebnisse. Kallusgewebe aus dem Meristem von Erbsenwurzeln mit doppeltem Chromosomensatz (2n) bestehen z.B. schon wenige Wochen nach der Isolierung vorwiegend aus tetraploiden (4n) und z. T. sogar schon aus octoploiden (8n) Zellen [35]. Ähnlich verhalten sich Kulturen aus Haplopappussprossen [36], haploiden Pollenkörnern des GinkgoBaumes [37], aus dem Markparenchym von Tabakstengeln [38] und viele andere Gewebe [vgl. 39]. Wie häufig dieses Phänomen auftritt, das geht am besten daraus hervor, daß wenige Objekte, nämlich Kulturen aus Knollen von *Helianthus tuberosus* [39], aus *Crepis capillaris*-Blättern [40] und *Medicago sativa* [41] bekannt sind, die nur den normalen, diploiden Chromosomensatz enthalten.

In einigen Fällen sind auch Parallelen zwischen Veränderungen des Genoms und der Fähigkeit zur Organogenese festgestellt worden. Kallus aus Erbsenwurzeln, der über eine längere Periode Wurzeln mit diploiden Meristemen gebildet hatte, verlor diese Fähigkeit, nachdem er nur noch aus polyploiden Zellen bestand [42]. Ähnlich verhielten sich Karottenkulturen, an denen nur Regenerate mit diploiden Meristemen festgestellt werden konnten [43]. Die Annahme eines kausalen Zusammenhanges zwischen der Eliminierung von diploiden Zellen und dem Verlust der Fähigkeit zur Bildung von Organen, hat sich aber als falsch erwiesen. Der klarste Gegenbeweis ist die Tatsache, daß unter vergleichbaren Bedingungen auch Wurzelanlagen mit polyploiden Meristemen entstehen [35]. Gewebekulturen verhalten sich also genau so, wie intakte Pflanzen, d.h. Endomitosen und die damit verbundene Polyploidie müssen kein Hindernis für die Auslösung und den Ablauf morphogenetischer Prozesse sein [44]. Damit ist natürlich eine Blockierung durch andere Veränderungen des Erbgutes, z.B. eine in manchen Fällen nachgewiesene hochgradige Aneuploidie [35, 39] oder auch durch somatische Mutationen nicht ausgeschlossen. Überaus wichtig ist auch der Befund, daß der Verlust der Fähigkeit der Kulturen zur Organbildung reversibel sein kann [33, 34]. Offenbar sind Kulturbedingungen und andere, nicht-genetische Faktoren von Einfluß, durch

die ebenfalls die Manifestierung genetischer Informationen verhindert werden könnte.

Aus den labilen Eigenschaften in vitro kultivierter Zellen und Gewebe haben sich natürlich Schwierigkeiten für Untersuchungen über die Kontrolle der Morphogenese ergeben. Es ist — abgesehen von wenigen Ausnahmen — nicht möglich, mit dem gleichen System über längere Perioden zu arbeiten; aus diesem Grunde sind auch meistens frisch isolierte oder relativ kurzfristig kultivierte Gewebe verwendet worden. Die Suche nach Kulturen, deren Eigenschaften über Monate oder über Jahre stabil bleiben, gehört deshalb noch immer zu den wesentlichen Aufgaben auf diesem Gebiet.

Effekte *physikalischer Faktoren* auf die Differenzierung und die Organogenese sind bisher nur wenig untersucht worden. Es steht aber fest, daß Licht für die Auslösung und die Entwicklung von Blüten in Gewebekulturen aus photoperiodisch reagierenden Pflanzen notwendig ist [20]. Das gleiche gilt auch für die Blühinduktion an Kulturen aus kältebedürftigen Objekten durch Perioden mit niedriger Temperatur [21]. Licht kann außerdem — zumindest bei bestimmten Objekten — neben Zuckern und Auxin die Rhizogenese wesentlich fördern [45]. Auch ein Wechsel in der Konsistenz des Nährmediums kann drastische Folgen haben, das hat sich mit Kulturen aus genetisch bedingten Tumoren von Tabakbastarden (*Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*) herausgestellt. Diese Kulturen wachsen auf einfachen synthetischen Agarnährböden als undifferenzierter Kallus, während sie untergetaucht, in einem flüssigen Medium der gleichen Zusammensetzung, reichlich Knospen und Sprosse bilden [46]. Schwaches Licht und Temperaturen unter 25 °C verstärken die Wirkung des flüssigen Mediums, höhere Lichtintensitäten und höhere Temperaturen hemmen [47].

Schon die Zahl und die unterschiedlichen Eigenschaften der wirksamen Faktoren sind ein Hinweis, daß die Reaktionen der Gewebe auf der Beeinflussung eines komplexen Systems beruhen, in dem verschiedene, sich gegenseitig beeinflussende Faktoren wirksam werden können. Das jetzt schon klassische Beispiel dafür sind Erfahrungen mit Kulturen aus dem Markparenchym von Tabakspollen [48], die bei einem bestimmten Verhältnis der Konzentration des Auxins (3-Indol-essigsäure, 2 mg/l) zum Kinetin (6-Furfurylamino-purin, 0,1 mg/l) als undifferenzierter Kallus wachsen. Durch minimale Veränderungen im Mengenverhältnis beider Verbindungen läßt es sich bestimmen, ob und zu welchem Typ der Organogenese es kommt. Bei höherer Konzentration des Purinderivates (0,5 mg/l) entstehen Knospen und bei geringerer (0,02 mg/l) Wurzeln. In diesem Falle haben sich ebenfalls andere Verbindungen als wirksam erwiesen; Adenin, Tyrosin und hohe Phosphatkonzentrationen verstärken den sproßbildenden Effekt des Kinetins und hemmen die Förderung der Wurzelbildung durch das Auxin.

Der gleiche Mechanismus, bei dem Verschiebungen des Konzentrationsverhältnisses zwischen Auxin und Kinetin über die Organogenese entscheiden, ist jetzt schon für eine Anzahl weiterer Objekte nachgewiesen worden und anscheinend spielt das Auxin/Cytokinin-System auch in der normalen Entwicklung eine Rolle, denn in Chicoréewurzeln enthält die Zone, die Knospen regeneriert, relativ viel natives Cytokinin und

in der Region der Wurzelbildung überwiegt das Auxin [49].

Ob dieses Prinzip der Steuerung der Morphogenese aber generell gültig ist, ist eine noch offene Frage. Zumindest kann das nicht ohne weiteres aus den Resultaten über andere, *in vitro* ablaufende Prozesse — die Embryobildung und die Formation von Blüten *in vitro* — abgeleitet werden. Als wesentlich für die Auslösung der Blütenbildung haben sich neben dem Licht, ein relativ hoher Zuckergehalt, Cytokinin und verschiedene Konstituenten von Nucleinsäuren (Adenin, Orotsäure) erwiesen. Auxine, Gibberelline und Stickstoffverbindungen mit Ausnahme von Harnstoff, hemmten dagegen [20, 22]. Ähnliche quantitative Relationen wie im Falle der Tabakgewebe, sind für diese Verbindungen aber nicht nachgewiesen worden. Die Systeme für die Knospen- und Wurzelbildung bzw. die Formation von Blüten sind also möglicherweise nicht identisch, obwohl sie die gleichen Komponenten enthalten.

Das gleiche dürfte auch für die Embryogenese *in vitro* zutreffen. Der erste, eindeutige Nachweis der Induktion und Entwicklung von Embryonen in Karottengeweben ist durch mehrere sukzessive Veränderungen der Nährmedien erreicht worden. Entscheidend war dabei der Wechsel zwischen auxinhaltigen und auxinfreien Medien und die Zuführung von Stickstoff in Form von Aminosäuren [23]. Diese Befunde waren lange umstritten, sie haben sich aber später bestätigt [25, 31]. Dabei hat sich auch die Annahme, für die Embryogenese *in vitro* müsse Ammoniumnitrat in den Nährmedien vorliegen [50], als genau so unrichtig erwiesen, wie die Bedeutung, die der Kokosnußmilch für diesen Prozeß zugeschrieben worden ist [24]. Ammoniumnitrat konnte nicht nur durch andere anorganische Stickstoffverbindungen [51] sondern auch durch Aminosäuren ersetzt werden [52]. Gegen eine besondere Rolle der Kokosnußmilch spricht die Tatsache der Embryobildung auf einfachen, synthetischen Medien ohne diese Komponente [23, 51, 53]. Kokosnußmilch kann sogar die Entwicklung von Embryonen in Gewebekulturen hemmen [23, 49]. Förderungen löst sie offenbar erst dann aus, wenn ältere Embryostadien austreiben [23]. Dieser Effekt kann übrigens auch durch Kinetin erreicht werden [50].

Ausblick

Zum Schluß stellt sich die Frage, wo und wie äußere und innere Faktoren, besonders aber die Phytohormone in die Steuerung der Morphogenese eingreifen. Wir wissen bis jetzt nicht, ob durch sie nur das Wachstum eines Systems in Gang gehalten wird und dadurch mittelbar die Möglichkeit zum Ablauf eines „Entwicklungsprogrammes“ gegeben ist, oder ob die Hormone selbst genuine Teile der Maschinerie für die Differenzierung sind und möglicherweise un-

mittelbar das Muster der Genaktivierung bzw. ihrer Repression bestimmen. Für die Lösung dieser Fragen dürften vor allem Untersuchungen mit Zellkulturen wichtig werden.

- [1] HABERLANDT, G.: Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl. 111, 62 (1902). — [2] GAUTHERET, R. J.: La culture des tissus végétaux, Techniques et Réalisations. Paris: Masson 1959. — [3] BUVAT, R.: Ann. Sci. Nat. 6, 1 (1945). — [4] TOPONI, M.: Compt. Rend. Acad. Sci. 253, 1482 (1961). — [5] PAUPARDIN, C.: Compt. Rend. Acad. Sci. 259, 3345 (1964). — [6] CAMUS, G.: Rev. Cytol. Biol. Végétales 11, 1 (1949). — [7] WETMORE, R. H., and S. SOROKIN: J. Arnold Arbor 36, 305 (1955). — [8] WETMORE, R. H., and J. P. RIER: Amer. J. Bot. 50, 418 (1963). — [9] KOB-LITZ, H.: Faserforsch. Textiltech. 13, 231 (1962). — [10] BERGMANN, L.: Planta 62, 221 (1964). — [11] FOSKET, D. E., and L. W. ROBERTS: Amer. J. Bot. 51, 19 (1964). — [12] CLUTTER, M. E.: Science 132, 548 (1960). — [13] STERLING, C.: Amer. J. Bot. 38, 761 (1951). — [14] BALL, E.: Growth 14, 295 (1956). — [15] NICKELL, L. G., and R. J. GAUTHERET: Rev. gén. Bot. 64, 532 (1957). — [16] BRAUN, A. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 45, 932 (1959). — [17] EARLE, E. D., and J. G. TORREY: Amer. J. Bot. 52, 891 (1965). — [18] STEWARD, F. C., M. O. MAPES, and K. MEARS: Amer. J. Bot. 45, 705 (1958). — [19] CHOUARD, P., et D. AGHION: Compt. Rend. Acad. Sci. 252, 3864 (1961). — [20] AGHION-PRAT, D.: Physiol. végét. 3, 229 (1965). — [21] PIERIK, R. L. M.: Mededel. Landbouwhogesch. Wageningen 67, 6 (1967). — [22] NITSCH, C., u. J. P. NITSCH: Planta 72, 371 (1967). — [23] REINERT, J.: Planta 53, 318 (1959). — [24] STEWARD, F. C., M. O. MAPES, A. E. KENT, and R. D. HOLSTEN: Science 143, 20 (1964). — [25] HALPERIN, W., and D. F. WETHERELL: Amer. J. Bot. 51, 274 (1964). — [26] REINERT, J.: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 78, (1) (1965). — [27] REINERT, J.: Abstr. 10th Internat. Botan. Congr. Edinburgh 1964, 209. — [28] STEWARD, F. C.: Totipotency and variation in cultured cells: some metabolic and morphogenetic manifestations. In: Plant Tissue and Organ Culture. Symp. Intern. Soc. Plant Morphol. Delhi 1963. — [29] STREET, H. E.: Growth and differentiation in plant cultures. In: Cells and Tissues in Culture. New York: Acad. Press London 1966, 631. — [30] BLAKELY, L. M., and F. C. STEWARD: Amer. J. Bot. 51, 780 (1964). — [31] REINERT, J.: Factors of embryo formation in plant tissues cultivated *in vitro*. In: Colloque natl. de C. N. R. S. sur les cultures de tissus de plantes. Strasbourg, 1967 (im Druck). — [32] MOREL, G., and R. H. WETMORE: Amer. J. Bot. 38, 138 (1951). — [33] DÉMÉTRIADÈS, S. D.: Ann. Phytopathol. Benaki 8, 103 (1954). — [34] NICKELL, L. G.: Année biol. 31, 107 (1955). — [35] TORREY, J. G.: Physiol. Plantarum 20, 265 (1967). — [36] REINERT, J., u. J. G. TORREY: Naturwissenschaften 48, 132 (1961). — [37] TULECKE, W.: Amer. J. Bot. 44, 602 (1957). — [38] FOX, J. E.: Physiol. Plantarum 16, 793 (1963). — [39] PARTANEN, C. R.: Internat. Rev. Cytol. 15, 215 (1963). — [40] REINERT, J., u. H.-J. KÜSTER: Z. Pflanzenphysiol. 54, 213 (1966). — [41] CLEMENT, W. M.: Amer. J. Bot. 51, 670 (1964). — [42] TORREY, J. G.: Experimental modification of development in the root. In: Cell, Organism and Milieu. New York: Ronald Press 1959, 189. — [43] MITRA, J., and F. C. STEWARD: Amer. J. Bot. 48, 351 (1961). — [44] D'AMATO, F.: Caryologia 4, 11 (1950). — [45] GAUTHERET, R. J.: Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. In: Cell Differentiation and Morphogenesis. North Holland Publ. Company 1966, 55. — [46] WHITE, P. R.: Bull. Torrey Bot. Club 66, 507 (1939). — [47] SKOOG, F.: Amer. J. Bot. 31, 19 (1944). — [48] SKOOG, P., and C. O. MILLER: Symp. Soc. exp. Biol. 11, 118 (1957). — [49] VARDJAN, M., et J. P. NITSCH: Bull. Soc. Bot. France 108, 363 (1961). — [50] HALPERIN, W., and D. F. WETHERELL: Nature 205, 519 (1965). — [51] REINERT, J., D. BACKS u. M. KROESING: Planta 68, 375 (1966). — [52] REINERT, J., M. TAZAWA, and S. SEMENOFF: Nature 216, 1215 (1967). — [53] KATO, H., and M. TAKEUCHI: Sci. Papers College Gen. Educ. Univ. Tokyo 16, 245 (1966).

Eingegangen am 17. Oktober 1967