

Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen

EXPERIMENTELLE BEEINFLUSSUNG DER ORGANBILDUNG
AN IN VITRO KULTIVierten BLATTSTÜCKEN
VON *BEGONIA REX*

Von

KLAUS WIRTH

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Oktober 1959)

Einleitung

Die Bildung von Sprossen und Wurzeln an abgetrennten Blättern und Blattstücken von *Begonia rex* ist eine schon lange bekannte und viel untersuchte Erscheinung. Trotzdem findet sich noch bei SACHS (1874) eine falsche Darstellung des Vorgangs: Er glaubte noch an endogene Entstehung der Sprosse. Erst REGEL (1876) wies die endogene Bildung der Wurzeln aus Zellen des Pericykels und die exogene Entstehung der Sprosse aus Epidermiszellen nach. HARTSEMA (1926) und PREVOT (1939) bringen keine wesentlichen neuen Ergebnisse mehr. Die ältere Literatur findet sich dort ausführlich besprochen, die neuere bei LENSKI (1958).

Da es sich bei der Organbildung an den Begonienblattstücken nicht um eine Entfaltung ruhender Anlagen handelt, sondern jede Epidermiszelle wieder embryonal werden kann und zur Bildung einer Adventivknospe fähig ist, wird vielfach die Bezeichnung „Regeneration“ für diesen Vorgang abgelehnt. Man spricht besser von „Neubildung“ (HARTSEMA). Auffällig ist, daß die Neubildungen am Blattstück stets am basalen Ende des Blattnerven entstehen. Das legt die Annahme nahe, daß bestimmte im Leitbündel vorhandene und geleitete Stoffe die Ursache für die Auslösung der Neubildung darstellen.

Es erschien deshalb zweckmäßig, die Neubildungsreaktion unter genau bekannten äußeren Bedingungen neu zu untersuchen. Genau definierte Einwirkung bestimmter Dosen von Wuchsstoffen und anderen Substanzen war möglich bei steriler Kultur der Blattstücke in vitro. Da bisher nur in wenigen Arbeiten Kultur von Blattstücken in vitro beschrieben wurde (TUREL und HOWES 1956, LENSKI 1958), mußte eine geeignete Methode erst erprobt werden. Die von GAUTHERET (1942) und WHITE (1953) ausgearbeiteten Methoden zur Kultur pflanzlicher Gewebe und Organstücke in vitro waren jedoch in der von MAYER (1956) abgewandelten Form auch für die Kultur von Blattstücken von *Begonia rex* sehr gut geeignet.

Material und Methode

Für die Kultur *in vitro* wurden etwa 1 cm² große Stückchen von Blättern einer silberblättrigen Varietät von *Begonia rex* verwendet, die im Botanischen Garten Erlangen kultiviert wird. Die Sortenbezeichnung war nicht mehr festzustellen. Alle verwendeten Pflanzen waren durch vegetative Vermehrung aus dem gleichen Blatt gezogen worden. Da sich diese Sorte als sehr widerstandsfähig gegen die unten aufgeführten Desinfektionsmethoden erwies, wurden fast alle Versuche mit ihr durchgeführt. Zur Kontrolle wurden noch einige Reihen mit den Sorten „Dekorateur“ und „Silberbraut“¹ angesetzt, die jedoch keine wesentlichen Abweichungen gegenüber der Standardsorte ergaben.

Die von MAYER (1956) beschriebene Methode zur Kultur von Stengel- und Knollensegmenten war wesentlich einfacher durchzuführen als die von LENSKI (1958) vorgeschlagene. Etwas abgewandelt war sie für eine Kultur von Blattstücken sehr gut geeignet.

Als Kulturgefäße verwendeten wir Reagensgläser 16/1,6 cm. Sie wurden mit heißem Prilwasser gespült, mit Aqua dest. nachgewaschen und bei 160° getrocknet. Nach Verschuß mit einem Wattepfropfen wurden sie zusammen mit der Nährlösung bei 1 atü 30 min sterilisiert. Hitzeempfindliche Substanzen wie Wachstumsstoffe usw. wurden erst danach zugegeben und dann in jedes Glas 10 cm³ der fertigen Nährlösung eingefüllt. Das Nachsterilisieren erfolgte nach STICHEL (1959) im Thermostaten bei 80° 30 min lang. Der Befall war nicht höher als nach Sterilisation im Autoklaven, doch wurden die hitzelablen Substanzen geschont. Voraussetzung dafür war allerdings, daß die Lösung möglichst heiß eingefüllt wurde. Bevor die Blattstücke eingelegt werden konnten, blieben die Gläser zum Abtrocknen noch 2 Tage im Zimmer stehen.

Die für die Versuche verwendeten Pflanzen wurden ohne jede Vorsichtsmaßnahme im Gewächshaus gehalten. Für die Ansätze verwendete Blätter wurden oberflächlich abgewaschen, nach Entfernung von Stiel und Blattgrund in größere Stücke zerschnitten und in einem großen Becherglas durch Übersichten mit dem Desinfektionsmittel keimfrei gemacht. Als Desinfektionsmittel wurden getestet Eau de Javelle und Sublimatlösung 0,01%. Die Blattstücke waren gegen beide Agentien außerordentlich widerstandsfähig; eine Desinfektionsdauer von 60 min wurde ohne merkliche Schädigung vertragen.

Der Befall wurde durch diese Behandlung bei Eau de Javelle auf 21%, bei Sublimat auf 10% herabgesetzt. Auch durch gemeinsame Anwendung dieser beiden Agentien konnte die Ausfallrate nicht mehr weiter reduziert werden. Der Prozentsatz der befallenen Kulturen war starken jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen; gleiches hatte schon STICHEL (1959) bei *Cyclamen* beobachtet. Die beste Ausbeute an keimfreien Kulturen wurde im Frühjahr erzielt.

Nach Abgießen des Desinfektionsmittels wurden die Blätter dreimal mit sterilisiertem Wasser nachgewaschen und anschließend zwischen zwei Bogen sterilisiertes Filtrierpapier gelegt und ohne direkte Berührung mit den Fingern in 1 cm² große Stücke geschnitten. Festgehalten wurden die Stücke beim Schneiden mit dem Filtrierpapier.

Die Stücke wurden nun mit einer Kante — der basalen (normal) oder der apikalen (invers) — in die Nährlösung etwa 1 mm tief eingesteckt, so daß der größte Teil der Spreite allseitigem Luftzutritt ausgesetzt war und schnell abtrocknen konnte. Flachliegende Stücke wurden nicht verwendet, da sie sehr starke Neigung zur Nekrose zeigten.

¹ Zur Verfügung gestellt von der Großgärtnerei Robert Mayer, Bamberg.

Das Schneiden der Blätter und das Einlegen der Stücke in die Kulturgefäße erfolgte in der Impfkabine wie bei MAYER beschrieben. Pinzette und Skalpell wurden sterilisiert, indem sie $\frac{1}{2}$ min in der Gasflamme erhitzt und anschließend in Aqua steril. abgekühlt wurden. Nach jeweils 25 Stücken wurden Skalpell und Pinzette neu sterilisiert.

Nach dem Einlegen der Stücke wurden die Gläser wieder mit den Wattestopfen verschlossen und die Kulturgefäße ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen in Gestellen zu 350 Stück im Gewächshaus aufgestellt. Die Beleuchtung war hell, aber diffus; direkte Sonnenbestrahlung schädigte die Stücke, bei Lichtmangel war das Wachstum sehr gehemmt. Die Temperatur lag durchschnittlich bei 25°, Schwankungen wirkten sich nicht nachteilig auf die Kulturen aus.

Mit der geschilderten Methode gelang es, bei Desinfektion mit Sublimat für die Dauer von 60 min, den Befall mit 10% ausgesprochen niedrig zu halten. Es ist erstaunlich, daß die Blattstücke diese Behandlung ohne jede Schädigung vertrugen. Auch durch Zugabe von 2,4-DNP (MAYER 1956) und Achromycin (STICHEL 1959) konnte keine weitere Verbesserung des Prozentsatzes der keimfreien Kulturen erzielt werden. Da besonders die Antibiotica sehr stark auf den Neubildungsprozeß einwirkten, war die Verwendung solcher Zusätze nicht möglich (s. S. 270). Auf eine Zugabe von Glucose konnte verzichtet werden, da die Stücke bei entsprechend heller Aufstellung sich selbst ernähren konnten. Auch war der Befall durch Bakterien und Pilze im glucosfreien Medium nur halb so groß wie im zuckerhaltigen.

Nun mußte noch versucht werden, in bezug auf die Organneubildung gleichwertige Blattstücke zu gewinnen. An größeren Stücken entstehen die Organe am basalen Ende des jeweils stärksten Nerven, bei kleineren von etwa 4 mm² — Größe der kleinsten noch ohne Schwierigkeit zu kultivierenden Stücke — wurden jedoch bei Abwesenheit größerer Nerven Neubildungen auch an makroskopisch nicht mehr sichtbaren feinsten Nervenenden angelegt. Wegen der kürzeren Reaktionszeit und der eindeutig polaren Anlage der Organe verwendeten wir nur solche Stücke, die an ihrer eingetauchten Kante nur eine einzige, mittelstarke Hauptnervenendigung aufwiesen. Das stärkste und schwächste Nervenende wurden verworfen. Am besten geeignet war eine Größe von 1 cm²; die Stücke reagierten gleichartig nach Zahl und Größe der Organe. Es wurden nur gesunde und voll ausgewachsene Blätter verwendet.

Die Ermittlung einer für die Kultur der Blattstücke geeigneten Nährlösung bot wegen der geringen Ansprüche der Stücke keine Schwierigkeiten. Getestet wurden die von SKOOG (1948) und HELLER (1953) vorgeschlagenen Nährlösungen, daneben Aqua dest. und Leitungswasser. Die entstandenen Organe waren auf allen vier Medien etwa gleich groß und in fast gleicher Zahl vorhanden. Es wurde schließlich der von HELLER vorgeschlagenen Nährlösung der Vorzug gegeben, da sie bei höheren Wuchsstoffgaben ein etwas besseres Wurzelwachstum ermöglicht. Durch Zugabe von 8 g/l Agar-Agar pulv. (Merck) erhielt der Nährboden die nötige Festigkeit.

Die durchschnittliche Laufzeit der Kulturen betrug 48 Tage; nach dieser Zeit wurden keine neuen Organe mehr angelegt, und die Reihen konnten ausgewertet werden. Dazu wurden die entstandenen Organe ausgezählt und auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Stücke bezogen, auch wenn nicht an allen Neubildungen entstanden waren. Die Zahl der pro Blattstück gebildeten Organe war der Maßstab für die Wirkung eines untersuchten Stoffes.

Die Blattstücke konnten ohne Schwierigkeit noch länger kultiviert werden. Auch nach 120 Tagen waren die Stücke noch frisch und die entstandenen Sprosse und Wurzeln kräftig gewachsen. Längere Laufzeit als 48 Tage ist eigens angegeben.

Ergebnisse

I. Organbildung an normal eingesteckten Blattstücken

1. Kontrollen (Nährlösung HELLER ohne Zusätze)

Die Neubildungsreaktion erfolgt stets am Basalende des Blattnerven und ist in bezug auf Zahl und Größe der entstandenen Organe sehr gleichmäßig. Auch zeitlich stimmen die Stücke in ihrer Reaktion sehr gut überein. Nach etwa 12 Tagen ist das basale Nervenende leicht verdickt, was auf Callusbildung in den subepidermalen Schichten zurückzuführen ist. Die Verdickung wird stärker, und nach 16—18 Tagen brechen daraus kleine Wurzeln hervor. Nach etwa 20 Tagen sind

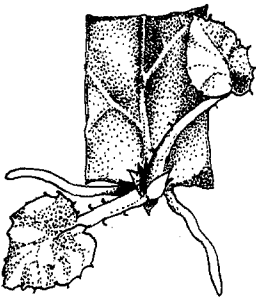


Abb. 1. Kontrollversuch, Blattstück normal eingesteckt

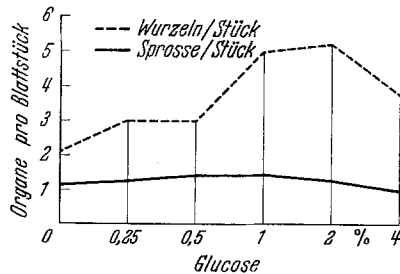


Abb. 2. Abhängigkeit der Organzahl von der Glucosekonzentration im Nährboden

Sprosse als kleine, höckerförmige Anlagen sichtbar. Nach 30 Tagen haben die Sprosse schon kleine Blätter mit einem Spreitendurchmesser von etwa 3 mm, nach 45 Tagen erfolgt nur noch weiteres Wachstum der bereits angelegten Organe, jedoch keine Neuanlage mehr. Nach einer Laufzeit von 48 Tagen wurde der Versuch ausgewertet. Ausgezählt wurden nur beblätterte Sprosse und aus dem Callushöcker des basalen Nervenendes hervorgebrochene Wurzeln, nicht ausgezählt dagegen Adventivwurzeln aus den neugebildeten Sprossen sowie unentwickelte, nicht sicher zu identifizierende Sproß- und Wurzelanlagen, die auch nach längerer Laufzeit nicht zur Entwicklung kamen. Im Durchschnitt waren an jedem Blattstück 1,12 Sprosse und 2,1 Wurzeln entstanden (Abb. 1).

2. Bedeutung der Nährstoffkonzentration für die Organbildung

GOEBEL (1908) und SIMON (1920) hielten den Einfluß der Nährstoffkonzentration auf die Organbildung für sehr bedeutend, wenn nicht überhaupt für ausschlaggebend. Zur Überprüfung dieser Annahme sowie zur Ermittlung optimaler Bedingungen für Neubildung und Wachstum der Organe wurden fünf Versuchsreihen mit Glucosegehalten der Nährlösung zwischen 0,25 und 4% angesetzt.

Die Stücke zeigten, wie zu erwarten war, besseres Wachstum und auch erhöhte Zahl der neugebildeten Organe gegenüber dem Kontrollnährboden. Die Zunahme der Organzahl dürfte auf ein Auswachsen von sonst unentwickelt bleibenden Organanlagen zurückzuführen sein. Den Einfluß der Glucosekonzentration auf die Zahl der angelegten Organe zeigt Abb. 2.

Die optimale Konzentration liegt bei 1% Glucose. Danach nimmt besonders die Sproßgröße wieder rasch ab, und bei 4% Glucose sind die Stücke bereits leicht geschädigt. Offenbar liegt der osmotische Wert der Lösung schon zu hoch, denn die Stücke zeigten Welkeerscheinungen.

Das Wachstum der Organe auf glucosereifen Nährböden war völlig ausreichend. Auf die geringe Wachstumsförderung durch Glucosegaben wurde verzichtet, da durch sie der Befall der Kulturen mit Pilzen und Bakterien auf das Doppelte erhöht wurde.

3. Dunkelkulturen

Um den Einfluß des Lichts auf den Neubildungsvorgang festzustellen, wurde eine Reihe von Kulturen wie üblich angesetzt, aber im Dunkeln gehalten. Im Gegensatz zu dem Befund von BEHRE (1929) an *Drosera* erfolgte keine Organneubildung. Während dort auch im Dunkeln gehaltene, hungernde Blätter regenerierten, waren hier nach 46 Tagen von 27 Blattstücken 22 abgestorben, die übrigen 5 stark vergilbt. Insgesamt war nur eine einzige, winzige Wurzelanlage entstanden, es hatte also praktisch keine Organneubildung stattgefunden.

Durch Wuchsstoffgaben (NES 0,08 und 0,5 mg/l) konnte die Wirkung des Lichtmangels nicht kompensiert werden. Organbildung wurde auch hier nicht beobachtet. Auf die verdunkelten Stücke wirkte NES in den beiden sonst gut vertragenen Konzentrationen rasch toxisch.

Fast vollständig kompensiert wurde jedoch die Wirkung des Lichtmangels durch Zugabe von 1% Glucose zum Nährboden. Mit 1 Sproß und 1,45 Wurzeln pro Stück wurde fast die gleiche Zahl von Neubildungen wie bei den Hellkulturen erreicht. Alle Stücke waren gut erhalten und frisch grün, die entstandenen Sprosse jedoch bleich und etioliert. Die auf Nährböden mit Zusätzen von 0,08 und 0,5 mg/l NES kultivierten Stücke zeigten wie üblich reichliche Wurzel- und Callusbildung (s. S. 272).

Von den Wirkungen des Lichts ist also für die Organneubildung an den Blattstücken nur die Kohlenhydratbildung durch Assimilation von Bedeutung. Alle Assimilationsprodukte können durch Glucose ersetzt werden.

4. Einfluß von Antibiotica

α) *Achromycin* (Lederle-Chemie). STICHEL (1959) erzielte bei seinen Gewebekulturen mit Knollensegmenten von *Cyclamen* eine starke

Minderung des Bakterienbefalls bei Zugabe von Achromycin zur Nährlösung. Es wurde versucht, auf diese Weise auch den Befall der Begonienblattstücke unter den bei der Desinfektion mit Sublimat erreichten Wert herabzusetzen. Verwendet wurden Zusätze von 10, 25 und 50 mg/l Achromycin. Eine Minderung des Befalls wurde nicht erzielt, er betrug wie bisher 10%. Dagegen war die Beeinflussung der Organneubildung an den Stücken überraschend (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Einfluß verschiedener Achromycinkonzentrationen auf den Neubildungsvorgang an normal eingesteckten Blattstücken*

Versuchsdauer Tage	Achromycin- konzentration mg/l	Reaktion
47	10	Kräftige Verdickung des basalen Nervenendes, Sproßanlagen kleiner als 3 mm, ohne fertig ausgebildete Blätter
	25	Keine Reaktion, Stücke jedoch frisch grün
	50	Keine Reaktion, Stücke nicht geschädigt
90	10	Am basalen Nervenende sind kräftige Wurzeln und Sprosse üblichen Aussehens entstanden
	25	Von 14 Stücken sind 9 noch frisch grün, die übrigen leicht gelblich. Zwei Stücke haben kleine Anlagen gebildet, die übrigen zeigen keine Reaktion
	50	Von 14 Stücken sind 6 gut erhalten, Organbildung ist in keinem Fall erfolgt
150	10	Weiteres Wachstum der gebildeten Organe
	25	Von 14 Stücken sind 4 abgestorben, 4 haben kleine Organanlagen gebildet, die übrigen zeigen keine Reaktion
	50	Alle Stücke sind abgestorben; in keinem Fall erfolgte vorher Organbildung

Während bei *Cyclamen* die Organbildung nicht beeinträchtigt wurde, erfährt sie bei *Begonia* bereits bei 10 mg/l eine beträchtliche Hemmung. Daß bei dieser Konzentration nach 90 Tagen doch noch kräftige Neubildungen auftreten, könnte auf einen inzwischen erfolgten Abbau des Achromycins zurückzuführen sein. Die teilweise bzw. vollständige Unterdrückung der Organneubildung bei höheren Achromycinkonzentrationen konnte auch durch Wuchsstoffgaben (NES) nicht aufgehoben werden. Bei längerer Einwirkung höherer Achromycingaben starben die Stücke fast sämtlich ab.

β) Streptomycin. Zur Kontrolle wurden noch Versuche mit den gleichen Konzentrationen eines anderen Antibioticums angesetzt, um festzustellen, ob Unterdrückung der Organbildung bei *Begonia rex* eine Eigenschaft aller Antibiotica ist. Die Wirkung des Streptomycins

ist jedoch von der des Achromycins völlig verschieden: Die Organbildung wird nicht unterdrückt. Doch werden die höheren Konzentrationen von den Stücken schlecht vertragen, denn die Organgröße nimmt ab. Außerdem nimmt in auffälliger Weise die Zahl der Sprosse zu, die der Wurzeln bis fast auf 0 ab.

Kontrollen	1,12 Sprosse	2,1 Wurzeln/Stück
Streptomycin 10 mg/l	2,15 Sprosse	1,85 Wurzeln/Stück
Streptomycin 25 mg/l	2,8 Sprosse	0,18 Wurzeln/Stück
Streptomycin 50 mg/l	5,5 Sprosse	0,1 Wurzeln/Stück

Versuche mit anderen Antibiotica wurden nicht angestellt. Wegen der nicht verbesserten Ausbeute an keimfreien Kulturen wurde bei den folgenden Reihen auf solche Zusätze verzichtet.

5. Einfluß von organbildenden Substanzen

Daß die Organbildung chemisch induziert werden kann, dürfte sicher sein (SKOOG und TSUI 1948, MAYER 1956, STICHEL 1959). Es ist die Induktion jedoch nicht nur eine Frage der Qualität, sondern in sehr starkem Maße auch der Quantität der verwendeten Agentien. Eine Untersuchung der Wirkung organbildender Stoffe in abgestuften Konzentrationen auf Blattgewebe steht noch aus. Sie wurde deshalb an den Begonienblattstücken durchgeführt. Verwendet wurden die Wachstoffsstoffe NES, IES und 2,4-D sowie die Purine Adenin und Guanin, deren Fähigkeit zur Organbildung an anderen Objekten schon nachgewiesen wurde.

Die angegebenen Kulturen waren je zur Hälfte im Frühjahr und Spätherbst 1958 angesetzt worden. Dabei ergaben sich gewisse Unterschiede in der Zahl und Größe der gebildeten Organe, vor allem wurden höhere Konzentrationen im Herbst wesentlich schlechter vertragen als im Frühjahr. Die Verträglichkeitsgrenze für Wachstoffsstoffe und Purine lag im Frühjahr bis zu 8mal höher als im Herbst. Die Organe waren im Herbst kleiner und weniger zahlreich als im Frühjahr, und zwar wurden die Unterschiede mit zunehmender Konzentration größer.

Wahrscheinlich ist dies eine Folge der verschlechterten Wachstumsbedingungen: Im Herbst war es wegen der geringeren Sonneneinstrahlung in dem Gewächshaus beträchtlich kühler und auch dunkler als im Frühjahr und Sommer. Eine Klimakammer stand für die Versuche leider nicht zur Verfügung. Um einen gewissen Mittelwert zu erhalten, wurden die Frühjahrs- und Herbstwerte addiert.

a) **Wachstoffsstoffe.** Wegen der sehr guten Wasserlöslichkeit des Kaliumsalzes und der Beständigkeit gegen Hitze und Licht war von den Wachstoffsstoffen für die Kultur in vitro NES am besten geeignet. Daneben wurde IES verwendet, da es den nativen Wachstoffsstoff darstellt und seine Reaktion deshalb besonders von Interesse ist. Schließlich wurde wegen seiner bei anderen Objekten beobachteten oft abweichenden Reaktion auch 2,4-D untersucht.

α) *α -Naphthyl-Essigsäure (NES)*. Die Stücke wurden auf Nährböden gezogen, die den Wachstoffsstoff in Konzentrationen von 0,01 bis 10 mg/l enthielten. Bis zu einer Dosis von 0,5 mg/l wurde NES gut vertragen. Von dieser Konzentration ab färbte sich ein immer größerer

Prozentsatz der Stücke gegen Ende der Versuchszeit gelb. Bei 5 mg/l wirkte NES teilweise, bei 10 mg/l vollständig toxisch. Die betroffenen Stücke waren nach 48 Tagen fast vollständig abgestorben. Die Organbildung wird von einem NES-Zusatz ab 0,02 mg/l deutlich beeinflusst. Die Änderung in der Zahl der angelegten Organe zeigt Abb. 3.

Callusbildung. Schon bei den Kontrollen wurde Callusbildung (Verdickung des eingetauchten basalen Nervenendes, s. S. 268) beobachtet. Niedrige Wachstoffs-

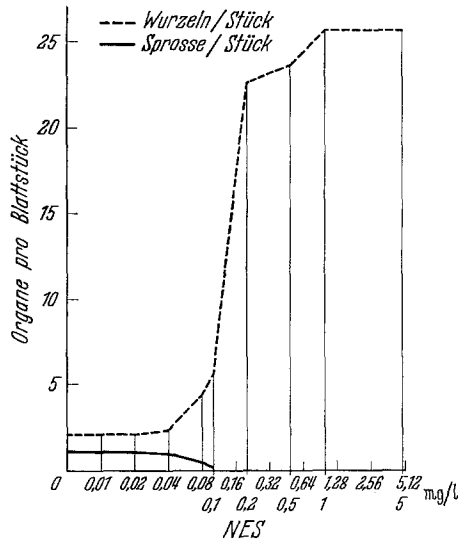


Abb. 3. Einfluß der NES auf die Organzahl am basalen Ende normal eingesteckter Stücke

gaben bis etwa 0,2 mg/l verstärkten diese Verdickung des basalen Nervenendes, das bis etwa Stecknadelkopfgröße anschwellen kann. Bei höheren NES-Gaben breitete sich die Verdickung über den ganzen eingetauchten Spreitenbezirk aus. Der Callus blieb bis 1 mg/l von der Epidermis bedeckt, erst bei noch höheren Gaben traten auch freie Callushäufchen auf, die die Epidermis durchbrochen hatten. Hier machte sich jedoch schon die schädigende Wirkung der NES geltend: Gegen Ende der Versuchszeit starb der Callus unter Braunfärbung ab.

Der bei diesen Versuchen gebildete Callus ist chlorophyllarm und seine Menge, verglichen mit der bei anderen Objekten erzielten, gering. Eine Förderung des Calluswachstums durch Glucosegaben war möglich, wurde aber nicht in größerem Umfang durchgeführt. Callusbildung war stets die zuerst zu beobachtende Reaktion der Blattstücke. Organbildung erfolgte nur an den Stellen, wo sich auch Callus — wenn auch oft nur in geringen Mengen — gebildet hatte.

Sproßbildung. Förderung des Wachstums oder Erhöhung der Zahl der angelegten Sprosse wurde in keinem Fall beobachtet. Ab 0,04 mg/l NES nehmen sowohl die Zahl der sproßbildenden Segmente als auch Zahl und Größe der angelegten Sprosse rasch ab (Abb. 3). Bei höheren NES-Gaben als 0,1 mg/l werden überhaupt keine Sprosse mehr angelegt.

Wurzelbildung. Bis 0,02 mg/l NES zeigt sich kein Unterschied gegenüber den Kontrollen. Bis 0,1 mg/l erfolgt langsame Zunahme der Wurzelzahl; es ist dies der gleiche Konzentrationsbereich, in dem die Sproßzahl langsam abnimmt. Über 0,1 mg/l nimmt die Zahl der

gebildeten Wurzeln schlagartig zu; die Sproßbildung ist nun völlig unterdrückt. Bereits bei 0,2 mg/l erfolgt Wurzelbildung aus der ganzen eingetauchten Kante (Abb. 4). Bei dieser NES-Konzentration erfolgt auch das beste Wachstum der Wurzeln. Bei noch höheren NES-Gaben werden zwar die gebildeten Wurzeln noch etwas zahlreicher, doch schon bei 1 mg/l läßt ihre Größe erheblich nach. Bei 5 mg/l wird eine Länge von 1 mm kaum mehr erreicht, die Schädigung durch den Wuchsstoff ist bereits zu stark

β) *β-Indolyl-Essigsäure (IES)*. SKOOG und TSUI (1951) stellten in der Wirkung von NES und IES nur quantitative Unterschiede fest. Auch hier reagierten beide

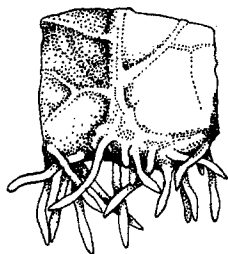


Abb. 4

Abb. 4. NES normal, 0,5 mg/l: Die Sproßbildung ist unterdrückt, zahlreiche Wurzeln sind entstanden

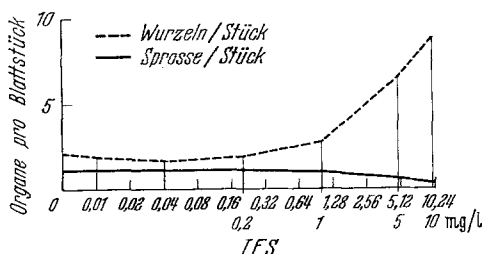


Abb. 5

Abb. 5. Einfluß der IES auf die Organzahl am basalen Ende normal eingesteckter Stücke

Wuchsstoffe durchaus ähnlich. Bei dem Vergleich der IES und NES in ihrer Wirkung auf die Begonienblattstücke muß jedoch die starke Photolyse des Heteroauxins berücksichtigt werden. Auf die Möglichkeit, diesen Abbau durch Zugabe von Ascorbinsäure zu hemmen (BRAUNER 1953), mußte jedoch verzichtet werden, da die Ascorbinsäure allein schon eine gewisse Abweichung von den Kontrollen hervorrief (leichte Erhöhung der Sproß- und Wurzelzahl). Um die Photolyse wenigstens in den Stammlösungen möglichst einzuschränken, wurden diese im Dunkeln angesetzt und aufbewahrt sowie stets nur ganz frisch verwendet.

Untersucht wurden Konzentrationen von 0,01—10 mg/l IES. In allen verwendeten Konzentrationen wurde IES sehr gut vertragen; die Blattstücke blieben bis zum Versuchsende frisch grün. Den Einfluß auf die Organbildung zeigt Abb. 5.

Callusbildung. Sie erfolgt in ganz ähnlicher Weise, aber in noch geringerer Menge als bei NES-Zusatz. Schon ab 0,04 mg/l IES beginnt die Verdickung vom basalen Nervenende auf die ganze eingetauchte Kante überzugreifen. In allen Fällen, sogar bei den höchsten IES-Gaben, ist die Menge des entstandenen Callus sehr gering.

Sproßbildung. Bis 0,2 mg/l IES erfolgte gegenüber den Kontrollen keine wesentliche Änderung in Zahl und Größe der angelegten Sprosse. Bei höheren Konzentrationen nimmt dann zuerst die Größe und ab 1 mg/l auch die Zahl der gebildeten Sprosse rasch ab, ohne daß es jedoch

zu völliger Unterdrückung der Sproßanlagen kommt. Auch bei 10 mg/l IES, der höchsten untersuchten Konzentration, bildete noch ein Teil der Blattstücke am basalen Nervenende kleine Sprosse aus.

Wurzelbildung. Erst bei Gaben über 0,2 mg/l IES erfolgte stärkere Beeinflussung der Wurzelbildung. Bis 1 mg/l IES steigt die Zahl der entstandenen Wurzeln langsam, darüber etwas rascher an. Die Wurzeln wachsen sehr viel schwächer als bei NES-Zugabe. Bei den höheren Konzentrationen werden sie wieder kleiner, bei 10 mg/l IES sind sie kaum größer als 1 mm.

Ähnlich wie bei NES ist auch bei IES im Bereich niedriger Wuchsstoffgaben fast keine Beeinflussung der Organbildung festzustellen. Darauf folgt langsame Zunahme der Wurzelzahl und Abnahme der Sproßzahl: Dieser Bereich liegt bei 0,02—0,1 mg/l NES und bei 0,04 bis 10 mg/l IES. Bei NES folgt nun ab 0,1 mg/l ein Bereich mit starker Erhöhung der Wurzelzahl und gleichzeitiger Unterdrückung der Sproßbildung, mit IES war diese Reaktion nicht zu erzielen.

Die Unterschiede in der Beeinflussung der Organbildung durch IES und NES könnten auf die Photolyse der IES zurückzuführen sein. Die Tatsache, daß im Bereich vergleichbarer Reaktion die IES-Konzentration beträchtlich höher als die der NES lag, legt diese Deutung nahe. Quantitativ war dieser IES-Abbau nicht zu erfassen; es konnte also jeweils nur die zugegebene, nicht aber die tatsächlich vorhandene Menge der IES angegeben werden. Für quantitative Vergleiche der Wirkung von IES und NES können die angegebenen Werte also nicht verwendet werden.

Wesentlich ist, daß die Wirkung beider Wuchsstoffe in allen untersuchten Konzentrationen auf die eingetauchten Spreitenbezirke beschränkt blieb.

γ) *2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)*. Als dritter Wuchsstoff wurde 2,4-D in Konzentrationen von 0,01—5 mg/l untersucht. Die Wirkung war sehr stark und charakteristisch, die Abwandlung der normalen Neubildungsreaktion zeigt Abb. 6. Bereits in geringerer Menge als NES schädigte 2,4-D die Stücke sehr stark. Bei 1 mg/l starben einige, bei 5 mg/l fast alle Stücke gegen Ende der Versuchszeit ab.

Callusbildung. Wie üblich erfolgt Verdickung des eingetauchten Nervenendes. Schon ab 0,04 mg/l wird der ganze eingetauchte Spreitenbereich durch Callusbildung leicht verdickt. Ab 0,2 mg/l steigt 2,4-D auch im Nerven hoch und ruft Zellteilungen und dadurch starke Anschwellung des Nerven auf der ganzen Länge hervor. Die Epidermis wird jedoch nicht durchbrochen; durch den darunterliegenden Callus zeigt sie leicht höckerförmige Struktur. Ab 1 mg/l tritt an der eingetauchten Kante auch freier Callus in lockeren Zellhäufchen auf, doch ist hier die toxische Wirkung der 2,4-D bereits so stark, daß gegen Versuchsende der Callus und die ganze eingetauchte Kante braun gefärbt und weitgehend abgestorben sind.

Charakteristisch für 2,4-D ist das Auftreten halbkugeliger, kompakter Gebilde auf dem eingetauchten Spreitenbezirk. Sie erreichen einen Durchmesser bis etwa $\frac{1}{2}$ mm und entstehen bei Konzentrationen über 0,04 mg/l 2,4-D. Ihre Zahl nimmt mit zunehmender Konzentration beträchtlich zu, so daß sie schließlich gehäuft auftreten.

Bei anatomischer Untersuchung zeigte sich ein beträchtlicher Unterschied zwischen dem bei NES und IES einerseits und dem bei 2,4-D gebildeten Callus. Dort ist der eingetauchte Teil der Spreite ziemlich gleichmäßig verdickt, hier dagegen ist der Callus ungleichmäßig stark, wodurch auf dem eingetauchten Spreitenteil Höcker entstehen. Wie bei NES entsteht der Callus sub-

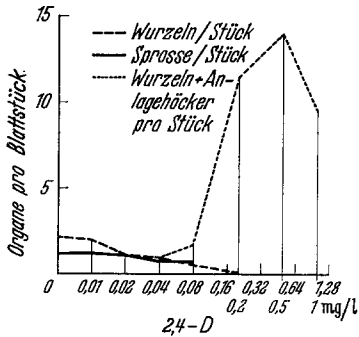


Abb. 6. Einfluß der 2,4-D auf die Organzahl am basalen Ende normal eingesteckter Stücke

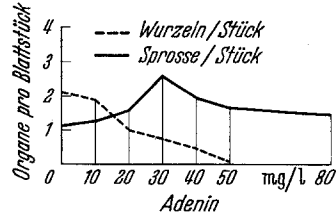


Abb. 7. Einfluß des Adenins auf die Organzahl am basalen Ende normal eingesteckter Stücke

epidermal, hier aber außerdem durch perikline Teilungen in der Epidermis. Es wurden beobachtet alle Übergänge zwischen normaler Blattstruktur über lokale Verdickung durch Callus aus 1—2 Zellschichten bis zu solcher aus 8—10 Schichten: Dort war dann bereits warzenartige lokale Verdickung der Spreite zu beobachten (Höckerbildung). Bei noch größeren Höckern waren in dem Callus schon unregelmäßig verteilte Gefäße vorhanden, bei vielen schon regelrechte Leitbündel. Eine klare Abgrenzung der einzelnen Stadien gegeneinander war nicht möglich.

Sproßbildung. Beeinflussung der Sproßbildung erfolgte in der gleichen Weise wie bei den anderen Wuchsstoffen. Bis 0,02 mg/l zeigte sich keine Veränderung gegenüber den Kontrollen. Bei höheren Gaben gingen Sproßzahl und -größe zurück, ab 0,2 mg/l wurden überhaupt keine Sprosse mehr angelegt. In bezug auf die Sproßbildung besteht also kein Unterschied gegenüber NES.

Wurzelbildung. Im Gegensatz zu dem Verhalten bei IES- und NES-Zugabe nimmt die Zahl der Wurzeln, die in Gestalt und Wachstum mit den bei den Kontrollen gebildeten übereinstimmen, mit zunehmender Konzentration ab, und zwar in gleicher Weise wie die Zahl der Sprosse (Abb. 6). Ab 0,2 mg/l 2,4-D traten auf dem eingetauchten Spreitenbezirk

nur noch die schon beschriebenen halbkugeligen Höcker auf. Es besteht jedoch Berechtigung, die größeren von ihnen als — abweichend gestaltete — Wurzeln aufzufassen, denn sie besitzen ein regelrechtes Leitbündel. Für diese Annahme spricht auch, daß außerhalb der Nährlösung entstandene Wurzeln beim Einwachsen in das 2,4-D-haltige Medium eine Umwandlung der Spitze zur gleichen halbkugeligen Form erfahren und ihr Wachstum einstellen.

Wenn die größeren dieser höckerförmigen Bildungen als Wurzelanlagen gewertet und zu den Wurzeln normalen Aussehens addiert werden, so stimmt die Abwandlung der Organbildung ungefähr mit der bei NES erfolgten überein (Abb. 6). Endgültige Aussagen hierüber können jedoch erst nach eingehenden anatomischen Untersuchungen gemacht werden.

b) Purine. Die organinduzierende Wirkung von Purinen ist beschrieben bei SKOOG und TSUI (1948 und 1951), bei MAYER (1956) und bei STICHEL (1959). Die Wirkung auf den Neubildungsvorgang bei *Begonia rex* wurde untersucht für Adenin und Guanin.

α) *Adenin.* Die Zugabe von Adenin (nicht Adeninsulfat) zur Nährlösung erfolgte in Konzentrationen von 10—80 mg/l. Schon 80 mg/l schädigen die Blattstücke sehr stark: Gegen Versuchsende ist fast die Hälfte der Kulturen ausgefallen. An den überlebenden sind Teile der Spreite abgestorben. Höhere Adeningaben wirkten rasch toxisch. Die Beeinflussung der Organzahl zeigt Abb. 7. Mit zunehmender Adeninkonzentration ging die Größe der angelegten Neubildungen zurück, das Adenin dürfte also eine ganz allgemein wachstumshemmende Wirkung haben.

Callusbildung. Callus entstand bei Adeninzugabe in Form starker knolliger Verdickungen am eingetauchten basalen Nervenende. Diese bestehen aus chloroplastenreichem Parenchym, das von Leitelementen unregelmäßig durchzogen ist und in das kleinzellige Bereiche eingeschaltet sind. Die Menge des Callus nimmt mit steigender Adeninkonzentration zu, bei den höchsten Gaben breitet er sich über die ganze eingetauchte Kante aus.

Sproßbildung. Die Zahl der angelegten Sprosse steigt bis zu einem Maximum bei 30 mg/l Adenin, um dann wieder abzunehmen. Ihre Entwicklung wird jedoch von steigenden Adeningaben zunehmend gehemmt; bei 40 mg/l sind sie schon fast durchwegs kleiner als 2 mm, bei 80 mg/l erreichen sie nicht einmal mehr die Größe von 1 mm. In allen Fällen entspringen die Sprosse aus dem basalen Nervenende oder aus dem Callus der eingetauchten Kante.

Wurzelbildung. Anlage und Wachstum von Wurzeln werden durch Adenin mit zunehmender Konzentration immer stärker gehemmt. Schon bei 50 mg/l ist die Wurzelbildung fast völlig unterdrückt.

Sehr charakteristisch für Adenin ist die Unterdrückung der Wurzelbildung. Es fehlt dem Adenin also nicht nur die Fähigkeit, Wurzelbildung zu induzieren, sondern es kann sogar normalerweise erfolgende Wurzelbildung unterdrücken. Die Zahl der angelegten Sprosse wird bis auf mehr als das Doppelte erhöht, das Wachstum aller gebildeten Organe ist durch Adenin aber in jedem Fall gehemmt. Der bei Adeninzugabe gebildete Callus ist ausgesprochen chlorophyllreich und weicht in seinem Aussehen von dem bleichen Callus der Wuchsstoffkulturen auffällig ab.

β) *Guanin*. Die Zugabe erfolgte wie bei MAYER (1956) durch Suspendieren des schwerlöslichen Guanins in der Nährlösung. Im Gegensatz zu dem Befund an *Cyclamen* konnte bei *Begonia rex* durch das Guanin keine stärkere Beeinflussung des Neubildungsvorgangs erreicht werden. Die Größe der gebildeten Organe war etwa die gleiche wie bei den Kontrollen, ihre Zahl nur ganz unbedeutend erhöht.

6. Die Einwirkung von Wuchsstoffantagonisten

Wuchsstoff wirkt in niedrigen Konzentrationen fördernd, in höheren hemmend auf das Wurzelwachstum ein. Beide Wirkungen werden durch Zugabe von Auxinantagonisten aufgehoben. Als solche wirken PCIB (LIBBERT 1957) und 2,4-DNP (POHL und OCHS 1953). Es schien uns interessant, festzustellen, ob auch die organinduzierende Wirkung des Wuchsstoffs auf die gleiche Weise aufgehoben werden konnte. Zu diesem Zweck wurden die beiden genannten Wuchsstoffantagonisten der Nährlösung zugesetzt und ihr Einfluß auf die Neubildungsreaktion beobachtet.

α) *α-Chlorphenoxyisobuttersäure (PCIB)*¹. LIBBERT (1957) hält PCIB für ein ideales Antiauxin. Es wurden Konzentrationen von 0,02 bis 20 mg/l untersucht. Niedrige Konzentrationen (0,02 und 0,2 mg/l) bewirkten schwache Wachstumshemmung: Die Organgröße war gegenüber den Kontrollen etwas zurückgeblieben. Bei 2 mg/l setzte die Reaktion verspätet ein, bei Versuchsende waren die hier gebildeten Organe kleiner als bei den Kontrollversuchen, und auch ihre Zahl war herabgesetzt. Diese Hemmung ist jedoch wahrscheinlich auf eine bereits bei dieser PCIB-Konzentration starke Schädigung zurückzuführen. Diese Annahme legt der Befund bei 20 mg/l nahe: Die Stücke bleiben ohne Neubildungen, große Spreitenabschnitte sind von der eingetauchten Kante her abgestorben. Höhere PCIB-Gaben wirkten rasch toxisch.

Das verspätete Einsetzen der Reaktion bei 0,2 und 2 mg/l PCIB legte die Vermutung nahe, daß die Reaktion erst nach Abbau der im Nährboden befindlichen PCIB einsetzt. Es wurden deshalb 2 Reihen mit diesen Konzentrationen angesetzt und die Blattstücke alle 10 Tage auf frischen Nährboden umgesteckt. Die Organbildung konnte jedoch auch auf diese Weise nicht unterdrückt werden. Es scheidet hier die Möglichkeit aus,

¹ Für die Übersendung der PCIB danke ich Herrn Prof. Dr. BURSTRÖM, Lund.

daß die PCIB im Nährboden bereits vor Versuchsende abgebaut wird. Die Wirkung der PCIB besteht also — neben der allgemeinen Schädigung der Blattstücke — in einer Hemmung der Neubildungsreaktion. Ob auch diese Hemmung nur eine Folge der allgemein schädigenden Wirkung der PCIB ist, kann nicht sicher gesagt werden.

Schließlich wurde noch PCIB (0,2 und 2 mg/l) kombiniert mit NES-Gaben bekannter Wirkung (0,08, 0,5 und 5 mg/l) gegeben. Es war jedoch keine eindeutige Minderung der aus den Wuchsstoffversuchen (s. S. 271) bekannten NES-Wirkung festzustellen. Die Wirkung der NES auf den Neubildungsvorgang wird also durch PCIB nicht kompensiert.

β) 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP). Nach POHL und OCHS (1953) hebt 2,4-DNP in Konzentrationen, in denen es — allein getestet — keine Wirkung zeigt, den Einfluß von Wuchsstoff auf das Wachstum von Kressewurzeln auf. Es wurden Zusätze von 0,02—20 mg/l untersucht. Bis 0,2 mg/l zeigte sich keine Beeinflussung der Neubildungsreaktion; bei 2 mg/l wurde zwar die Größe, nicht aber die Zahl der gebildeten Organe etwas herabgesetzt. Wahrscheinlich ist das aber die Folge beginnender Schädigung, die sich bei 20 und 200 mg/l zu teilweise bzw. vollständig toxischer Wirkung steigert.

Die Versuche mit PCIB und 2,4-DNP legen beide die gleiche Deutung nahe. Entweder ist der Wuchsstoff nicht an der Anlage der Neubildungen beteiligt, oder es sind die Methoden, durch die Wuchsstoffwirkung auf das Wurzelwachstum aufgehoben werden kann, bei dem ganz anderen Wirkungsschema der Organanlage nicht anwendbar. Eine eindeutige Aussage lassen die Befunde nicht zu.

II. Überprüfung der Polarität bei der Organanlage

Es war auffällig, daß die Neubildung von Organen stets nur am basalen Nervenende erfolgte. An invers eingestellten Blattstücken wurde nun untersucht, ob diese Polarität in der Neubildungsanlage in allen Fällen zuverlässig ausgeprägt war.

1. Invers eingestellte Stücke in Wasser

PREVOT (1939) gibt an, daß bei inversem Einstellen von Blattstücken in Wasser Organbildung auch am apikalen Nervenende zu beobachten ist, die Polarität also auf diese einfache Weise aufgehoben werden kann.

Zur Nachprüfung des Befundes wurden die desinfizierten Blattstücke (1 cm² Größe wie üblich) mit dem apikalen Nervenende nach unten in Präparategläser 12 mm \varnothing eingesetzt und bis etwa $\frac{1}{3}$ Blattstückhöhe sterilisiertes Wasser eingefüllt. Das Wasser verdunstete sehr rasch und mußte öfter nachgefüllt werden. Das konnte jedoch ohne

besondere Vorsichtsmaßnahmen geschehen, die Kulturen wurden deswegen nicht von Pilzen befallen.

Nach einer Laufzeit von wie üblich 48 Tagen waren bei allen Stücken kräftige Neubildungen am freien basalen Nervenende entstanden, die in ihrer Größe kaum gegenüber den an normal eingesteckten Stücken entstandenen zurückgeblieben waren. In keinem Fall wurde Neubildung am eingetauchten Apikalende beobachtet.

Da von PREVOT für den obenerwähnten Versuch größere Blattstücke verwendet worden waren, lag es nahe, den Unterschied der Ergebnisse auf die Blattstückgröße zurückzuführen. Der Versuch wurde deshalb wiederholt mit Blattstücken 20×40 mm, die in gleicher Weise in 1 cm hoch mit Wasser gefüllte Präparategläser eingestellt wurden. Angesetzt wurden 14 Kulturen, davon 7 im Frühjahr und 7 im Spätherbst. Sämtlich bildeten sie kräftige Sprosse und Wurzeln am freien Basalende. Darüber hinaus waren am eingetauchten Apikalende bei 3 Stücken kräftige Neubildungen entstanden, an 2 Stücken Organanlagen unter 1 mm Größe, während die übrigen Stücke dort keine Reaktion zeigten. Es ist also die Polarität in der Neubildungsanlage bei größeren Stücken nicht so zuverlässig ausgeprägt wie bei kleinen; eine sichere Erklärung dieser Tatsache kann noch nicht gegeben werden.

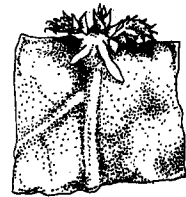


Abb. 8. Kontrollversuch, Blattstück invers eingesteckt

Um diese an größeren invers eingestellten Blattstücken unregelmäßig zu beobachtende Abweichung von den normalen Polaritätsverhältnissen auszuschalten, wurde für alle folgenden Versuche mit invers eingesteckten Blattstücken nur die Größe 10×10 mm verwendet, bei der in keinem Fall eine solche Unregelmäßigkeit beobachtet wurde.

2. Kontrollen auf Agarnährböden, Nährlösung Heller

Um Werte zu erhalten, die mit den an normal eingesteckten Stücken gewonnenen Ergebnissen vergleichbar sind, wurden alle folgenden Versuche mit invers eingesteckten Blattstücken auf Agarnährboden und unter den gleichen Bedingungen wie bei der Kultur normal eingesteckter Stücke ausgeführt.

Bei 61 Kulturen von invers eingesteckten Stücken zu 10×10 mm entstanden Neubildungen nur am freien Basalende, auch wenn die Laufzeit bis zu 100 Tagen verlängert wurde. In ihrem Aussehen wichen die hier gebildeten Organe stark von den am Basalende der normal eingesteckten Kontrollen gebildeten ab (Abb. 8). Die Länge sowohl der Sprosse als auch der Wurzeln überschritt nur selten 1 mm. Größere Blätter wurden normalerweise nicht ausgebildet. Die Anlagen entstanden in etwas größerer Zahl als am eingetauchten Basalende; ein klarer Unterschied zwischen ausgewachsenen und unentwickelten

Anlagen bestand bei den gehäuft stehenden Anlagen des freien Basalendes nicht.

Dieser Unterschied war jedoch nur auf die schlechtere Wasserversorgung der invers eingesteckten Stücke zurückzuführen. Sobald nämlich, was ab und zu vorkam, eine Wurzel des freien Endes in den Nährboden eingedrungen war, wuchsen die dortigen, stark zurückgebliebenen Organe rasch zu der Größe der bei den normal eingesteckten Kontrollen gebildeten heran. Bei den in Wasser invers kultivierten Stücken wuchsen die Anlagen des freien Basalendes wegen des höheren Wasserdampfgehaltes der Luft in den Präparatgläsern sofort aus.

Am freien Basalende werden mehr Organe gebildet als am eingetauchten. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß das Auswachsen eines Sprosses die neben ihm entstandenen Anlagen hemmt. Erfolgt nun kein stärkeres Wachstum der angelegten Organe, wie dies am freien Basalende der Fall ist, so fällt diese gegenseitige Hemmung der Anlagen weg, und sie bleiben alle auf etwa gleicher Entwicklungsstufe stehen. Für diese Annahme spricht, daß nach Eintreten besserer Wasserversorgung auch hier nur 1 Sproß und 2 Wurzeln/Segment wie bei den normal eingesteckten Kontrollen zu normaler Größe heranwachsen.

III. Beziehung zwischen Stofftransport im Siebteil und Organanlage

Schon HABERLANDT (1913) und LAMPRECHT (1918) beobachteten, daß nur dann Zellteilungen einsetzen, wenn das kultivierte Gewebestück Siebteilelemente enthält. Auch HARTSEMA (1926) stellte fest, daß die Teilungen direkt in der Nachbarschaft der Siebröhren einsetzen und erst dann bis zu den Zellen der Epidermis fortschreiten, was ebenfalls für die Diffusion eines Teilungsreizes aus dem Siebteil spricht. Daß dieser Teilungsreiz von einem im Siebteil geleiteten Stoff ausgehen muß, wiesen schließlich JABLONSKI und SKOOG (1954) nach, als sie feststellten, daß auch wäßriger Extrakt aus dem Leitgewebe sowie Cocosmilch und Malzextrakt im Markgewebe von *Nicotiana* Zellteilungen auslösen können.

Hier wie auch bei *Drimiopsis* (LENSKI 1958) erinnert die Polarität bei der Neubildungsanlage an die Verhältnisse bei *Begonia rex*. Die Annahme liegt nahe, daß diese Polarität auf den polaren Stofftransport im Siebteil zurückzuführen ist, der dann bei Unterbrechung der Leitung zur Stauung und damit zu einer Anreicherung der geleiteten Substanzen am basalen Nervenende führt. Diese Annahme konnte sehr leicht experimentell bewiesen werden.

1. Zerstörung des Siebteils durch Eosin

Eine Möglichkeit, den Siebteil ohne Zerstörung des Blattes außer Funktion zu setzen, bot die von SCHUMACHER (1930) angegebene Methode der Eosinbehandlung. In nur wenig abgeänderter Form war sie auch für *Begonia rex* sehr gut brauchbar.

Von einem ausgewachsenen Blatt wurde unter Wasser der Rand abgeschnitten, um die Leitbündel zu öffnen. Darauf wurde das Blatt, das während der ganzen Behandlung an der Pflanze verblieb, in einem verdunkelten Standzylinder mit Eosin 1:25000 überschichtet. Die Eosinbehandlung dauerte 48—72 Std, darauf

wurde das Blatt abgeschnitten und daraus wie üblich Blattstückkulturen hergestellt, die auf Kontrollnährboden gesetzt wurden. Der Siebteil der Stücke ist blockiert, und es findet keine Assimilatleitung mehr statt. Man kann das erkennen an der erheblichen Stärkespeicherung, die auf der ganzen Nervenlänge im leitbündel-nahen Parenchym erfolgt.

In diesen Stücken ohne Leitung im Siebteil werden die Neubildungen nicht mehr streng am basalen Nervenende angelegt, sondern Sprosse und Wurzeln entstehen regellos verteilt über die ganze Nervenlänge, teilweise bis zu 6 Sprosse hintereinander.

Das Eosin gelangt bei dieser Versuchsanordnung über die behandelten Blätter auch in die Leitungsbahnen des Sprosses und tritt nach etwa 40 Std in die Hauptnerven junger Blätter ein, was dort an Absterbeerscheinungen im Leitbündelbereich schon äußerlich zu erkennen ist. In keinem Fall wurde jedoch beobachtet, daß das Eosin in den Siebteil älterer, bereits ausgereifter Blätter gelangt wäre.

Das Eosin schädigt je nach dem Alter des Blattes, auf das es einwirkt, das Blattgewebe verschieden stark. Behandelt man ältere, ausgereifte Blätter mit Eosin, so ruft es nur ein Zusammenfallen der Siebröhren hervor, ohne die übrigen Blattgewebe entscheidend zu schädigen. Gelangt dagegen bei der Behandlung älterer Blätter Eosin auch in die Leitbündel junger Blätter, so tötet es dort die ganzen Leitbündel samt anliegendem Gewebe ab. Für die meisten ist die Schädigung zu stark, und sie fallen ab.

Es wurden aber immer wieder junge Blätter beobachtet, die zwar indirekt unter Eosineinfluß geraten waren und bei denen die Eosinbehandlung zu einem Absterben des Siebteils geführt hatte, die aber trotzdem noch an der Pflanze verblieben. Die Wasserleitung war bei

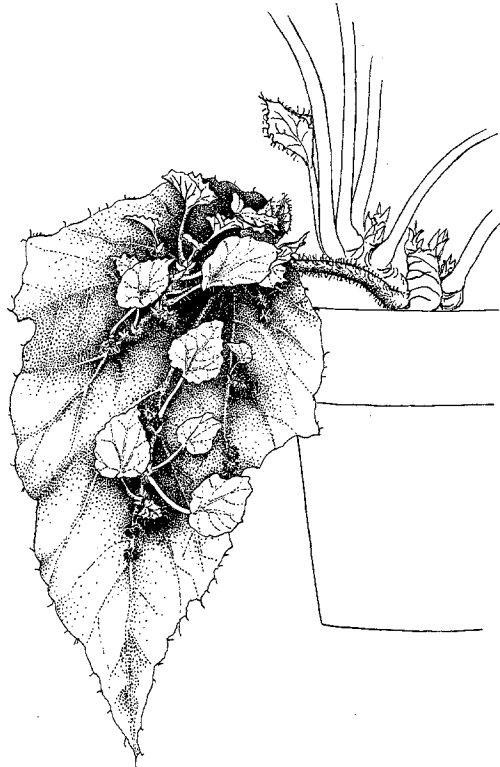


Abb. 9. Blatt mit Eosin 1:25000 behandelt und an der Pflanze belassen. Zustand nach 3 Monaten: Auf den Hauptnerven sind zahlreiche Sprosse entstanden

dieser Behandlung nicht beeinträchtigt worden, die Blätter blieben voll turgeszent, und sie wuchsen zu normaler Größe heran. Nach etwa 30 Tagen treten dann im Blattgrund Organanlagen auf, die Blattnerven verdicken sich, und auch hier treten Anlagehöcker auf. Bei genügender Luftfeuchtigkeit wachsen alle diese Anlagen zu normalen, beblätterten Sprossen aus (Abb. 9). Auch am Blattstiel können Adventivsprosse und -wurzeln entstehen; die Fähigkeit zur Organneubildung ist also nicht auf die Blattspreite beschränkt.

Noch an der Pflanze stehende Blätter, deren Siebteil durch die Eosinbehandlung zerstört ist, verhalten sich also genau so wie abgeschnittene Blätter mit mehrfach durchschnittenen Nerven. Daraus und aus der völlig unpolaren Neubildungsanlage an eosinbehandelten Blattstücken kann man mit Sicherheit schließen, daß die Ursache für die Auslösung der Neubildungsreaktion die Unterbrechung der apikal-basal gerichteten Siebteilleitung ist. Sie führt zu einem Stau der mit dem Assimilationsstrom geleiteten nativen organbildenden Substanzen am basalen Nervenende, worauf es dort zur Organneubildung kommt.

2. Beeinflussung der Leitung im Siebteil durch 2,3,5-Trijodbenzoesäure (TIBA) ¹

NIEDERGANZ-KAMIEN (1955) erzielte eine Änderung des polaren Auxintransports durch Behandlung von Pflanzen und herausgeschnittenen Pflanzenstücken mit verschiedenen Substanzen, unter denen eine der wirkungsvollsten TIBA war. LIBBERT (1958) beschreibt eine Blockierung der Leitung auch anderer Wirkstoffe nach Einwirkung von TIBA. KESSLER und MOSCICKI (1958) konnten zeigen, daß normalerweise vom Blatt nicht aufgenommene und nicht geleitete Stoffe nach Behandlung mit TIBA beschränkt aufgenommen und geleitet werden können.

Es war von Interesse festzustellen, welche Wirkung eine Behandlung mit TIBA, die ja offenbar die normale Stoffleitung im Siebteil stark beeinflusst, auf den Neubildungsvorgang der Begonienblattstücke hat.

TIBA wurde der Nährlösung in Konzentrationen von 0,1—500 mg/l zugegeben. Unter 1 mg/l zeigte sich außer einer leichten Abnahme der Größe der angelegten Organe keine Wirkung. 100 mg/l wirkten schon sehr stark schädigend: Teile der Spreite starben von der eingetauchten Kante her ab. Bei einer Konzentration von 500 mg/l wirkte TIBA sehr rasch völlig toxisch. Charakteristisch war jedoch die Wirkung auf die Organbildung bei 1 und 10 mg/l.

TIBA 1 mg/l. Von 25 Stücken war bei Versuchsende eines abgestorben, 1 Stück ohne Reaktion geblieben. Bei 13 Stücken erfolgte Neubildung wie üblich am eingetauchten Basalende, jedoch war die Organgröße gegenüber den Kontrollen zurückgegangen. Bei 8 Stücken wurden daneben auch Sprosse und Wurzeln oberhalb der Eintauchstelle angelegt, bei 2 Stücken sogar am apikalen Nervenende.

¹ Die TIBA wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen hergestellt.

TIBA 10 mg/l. Von 25 Stücken waren 2 abgestorben, eines ohne Reaktion geblieben. Nur noch 4 Stücke hatten wie üblich Organe — weiter vermindert Größe — am eingetauchten Basalende gebildet. Bei den übrigen 18 Stücken erfolgte dagegen Anlage von Sprossen und Wurzeln nur noch am freien Apikalende. In dieser Konzentration hat also *TIBA* die Polarität der Neubildungsanlage fast völlig umgekehrt (Abb. 10).

Dieses Ergebnis legt folgende Deutung nahe: Einerseits hemmt *TIBA* die Stoffleitung im Siebteil, die Konzentration der sonst dort geleiteten organbildenden Substanzen ist folglich nun auf der ganzen Nervenlänge gleich groß. Andererseits hemmt *TIBA* aber auch das Wachstum der Organanlagen, was aus den Befunden bei der Anwendung niedriger Konzentrationen zu entnehmen ist. Die Bedingungen für die Entstehung von Neubildungen sind also dort am günstigsten, wo die *TIBA*-Konzentration wegen der größtmöglichen Entfernung von dem *TIBA*-haltigen Nährboden am kleinsten ist, also am freien apikalen Nervenende.



Abb. 10. *TIBA* normal, 10 mg/l: Organbildung nur am apikalen Nervenende (Apikalende aus der Nervenverzweigung zu erkennen)

IV. Experimentelle Induktion der Organbildung am apikalen Nervenende

Die beiden Kontrollversuche mit invers eingestellten Blattstücken zeigen, daß die Polarität in der Neubildungsanlage bei Stücken 10×10 mm zuverlässig ausgeprägt ist. Ob die Stücke in Wasser oder auf Agar-Nährboden eingestellt werden, die Organe entstehen stets nur am basalen Ende des Nerven.

Die unter III beschriebenen Versuche legen die Ansicht nahe, daß die polare Leitung von Stoffen durch den Nerven vom apikalen zum basalen Ende des Blattstücks die Ursache dafür ist, daß auch die für die Organneubildung verantwortlichen Substanzen dabei am basalen Nervenende angehäuft werden und so den Anstoß zur Neubildungsreaktion geben. Es wurde nun versucht, an unbehandelten Blattstücken die Organbildung am apikalen Nervenende experimentell zu induzieren. Stoffe, von denen eine Auslösung oder Beeinflussung des Organbildungsvorgangs erwartet werden konnte, wurden dem Nährboden zugegeben. Die Blattstücke wurden invers eingesteckt kultiviert, so daß das apikale Nervenende unter den Einfluß dieser Stoffe kam. Durch einen positiven Ausfall solcher Versuche war dann auch ein Schluß auf die Natur der für den normalen Neubildungsvorgang verantwortlichen Stoffe möglich.

1. Kultur auf glucosehaltigem Nährboden

Es lag nahe, als erstes die bereits von GOEBEL (1903, 1908) geäußerte Vermutung nachzuprüfen, daß eine Anhäufung von „Baumaterialien“ (Kohlenhydraten) der auslösende Reiz für die Neubildungsreaktion ist.

Untersucht wurde der von den Blattstücken ohne größere Schädigung vertragene Konzentrationsbereich von 0,25—4% Glucose. In keinem Fall konnte jedoch auf diese Weise Organbildung am apikalen Nervenende erzielt werden. Die Organbildung am freien Basalende erfolgte dabei fast unverändert.

Bei den Dunkelkulturen konnte gezeigt werden, daß alle Assimilationsprodukte in ihrer Wirkung durch Glucose ersetzt werden können (s. S. 269). Wenn also durch keine der von *Begonia rex* vertragenen Glucosekonzentrationen Induktion von Organbildung am apikalen Nervenende möglich war, so ist damit nachgewiesen, daß die Glucose zwar verantwortlich ist für das Wachstum der gebildeten Organe, aber nicht für die Auslösung der Neubildungsreaktion.

2. Experimentelle Induktion von Organbildung durch Wuchsstoffe

Schon CHOUARD (1938) und PREVOT (1939) beobachteten das Auftreten von Sprossen am apikalen Nervenende bei invers in Heteroauxinlösungen eingestellten Blattstücken bzw. bei Applikation einer Wuchsstoffpaste am Apikalende des Nerven. Genauere, vor allem quantitative Untersuchungen der Wuchsstoffwirkung wurden jedoch bisher nicht durchgeführt.

Für die chemische Induktion der Organbildung wurden die schon im I. Teil untersuchten Wuchsstoffe NES, IES und 2,4-D in den gleichen Konzentrationen wie dort verwendet. Für alle folgenden Versuchsreihen gilt, daß Organbildung am apikalen Nervenende nie bei allen Stücken einer Reihe, sondern stets nur bei einem Teil davon erfolgte. Die Stärke der Wuchsstoffwirkung zeigte sich also einerseits in dem Prozentsatz der Stücke mit Organbildung am Apikalende, andererseits in der Zahl der gebildeten Organe. Organbildung am basalen Nervenende fand ebenfalls statt; sie wird weiter unten beschrieben.

α) *α-Naphthyl-Essigsäure* (NES). Verwendet wurden die gleichen Konzentrationen wie bei I, 5a, nämlich 0,01—10 mg/l. Die Verträglichkeit der NES war die gleiche wie dort. Die Zahl der angelegten Organe pro Blattstück zeigt Abb. 11.

Callusbildung. Wie schon bei den normal in wuchsstoffhaltige Nährböden eingestellten Stücken wurde nur wenig Callus gebildet. Bei niedrigen Gaben bis 0,02 mg/l beschränkte er sich fast ausschließlich auf die leichte Verdickung des freien basalen Nervenendes. Bei höheren Konzentrationen bis 0,2 mg/l traten dann auch stärkere, knollige Verdickungen durch Callusbildungen an den eingetauchten apikalen Nervenenden auf (Abb. 12). Bei Gaben ab 0,5 mg/l wurde der Wuchsstoff durch

den Hauptnerven geleitet und rief auf dessen ganzer Länge starke Verdickung durch Callusbildung hervor. Meistens war der Callus noch von der Epidermis bedeckt, teilweise wurde diese jedoch durchbrochen, und es traten dann auf der ganzen Nervenlänge stellenweise kleine Häufchen von freiem Callus auf.

Sproßbildung. Bei Zugabe von 0,01 mg/l NES kam es überhaupt nur an einem einzigen Blattstück zu Organbildung am Apikalende des Nerven. Bei Erhöhung des NES-Zusatzes stieg die Zahl der angelegten Sprosse langsam an bis zu ihrem Maximum bei 0,04 mg/l; dort wurden fast so viele Sprosse gebildet wie

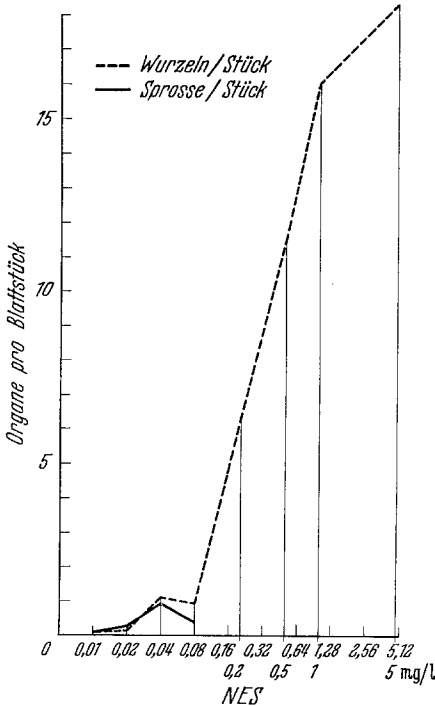


Abb. 11. Zahl der durch NES am apikalen Ende invers eingesteckter Stücke induzierten Organe

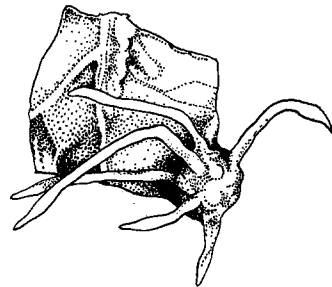


Abb. 12. NES invers, 0,2 mg/l: Organbildung am freien Basalende unterdrückt, am Apikalende zahlreiche Wurzeln

bei den Kontrollen am eingetauchten Basalende. Bei noch höheren NES-Gaben nahm die Zahl der Sprosse wieder ab, von 0,2 mg/l an wurden überhaupt keine Sprosse mehr angelegt.

Wurzelbildung. Im Bereich niedriger NES-Konzentrationen bis 0,08 mg/l besteht ungefähre Übereinstimmung zwischen Sproß- und Wurzelzahl. Gaben über 0,08 mg/l NES, die Sproßbildung unterdrückten, führten zu einer raschen und erheblichen Erhöhung der Zahl der gebildeten Wurzeln. Die meisten Wurzeln wurden bei 5 mg/l angelegt, das beste Wachstum erfolgte allerdings bei 0,5 mg/l NES. Die höheren NES-Gaben wirken hemmend auf das Wurzelwachstum, bei 10 mg/l schädigt die NES die Stücke so stark, daß bis Versuchsende fast alle Stücke abgestorben waren und der Versuch nicht ausgewertet werden konnte.

β) β -Indolyl-Essigsäure (IES). Es wurden IES-Gaben von 0,01—10 mg/l untersucht. In allen Konzentrationen wurde der Wuchsstoff gut vertragen. Die Zahl der am eingetauchten Apikalende jeweils entstandenen Organe zeigt Abb. 13.

Callusbildung. Sie ist noch schwächer als bei den NES-Kulturen, erfolgt aber grundsätzlich in gleicher Weise.

Sproßbildung. Sie beginnt am eingetauchten Apikalende ganz schwach bei 0,04 mg/l IES und erreicht bei 1 mg/l mit 0,63 Sprossen/Stück ihr Maximum (Abb. 14). Bei noch höheren IES-Gaben geht zwar die Sproßbildung wieder zurück, wird aber auch bei den höchsten untersuchten Gaben nicht vollständig unterdrückt. Möglicherweise ist dies zurückzuführen auf eine Zersetzung der IES bei höheren Konzen-

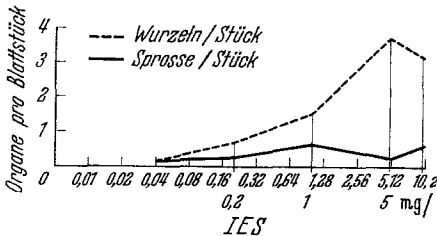


Abb. 13

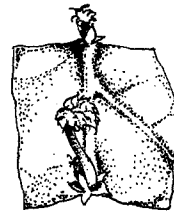


Abb. 14

Abb. 13. Zahl der durch IES am apikalen Ende invers eingesteckter Stücke induzierten Organe

Abb. 14. IES invers 1 mg/l: Die Organanlagen des freien Basalendes sind zurückgeblieben, am Apikalende ist ein Sproß entstanden

trationen, so daß der tatsächliche IES-Gehalt des Nährbodens einen gewissen Wert nicht übersteigt (s. S. 274).

Wurzelbildung. Die Zahl der wurzelbildenden Stücke sowie die Zahl der gebildeten Wurzeln steigen gleichmäßig bis zur Optimalkonzentration von 5 mg/l IES an, um dann ganz leicht abzunehmen. Die Wurzelgröße wird von allen IES-Gaben nicht wesentlich beeinflusst.

In ihrem Aussehen stimmten die mit NES und IES am apikalen Nervenende induzierten Organe völlig mit den bei den normal eingesteckten Kontrollen gebildeten überein. Werden die Blattstücke auf Erde ausgepflanzt, so wachsen die Sprosse im Gewächshaus zu völlig normalen Pflanzen heran.

γ) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Wie schon am Basalende normal eingesteckter Blattstücke zeigte 2,4-D auch hier am apikalen Nervenende starke Wuchsstoffwirkung. Die Abweichungen gegenüber der Wirkung von NES und IES waren beträchtlich. Untersucht wurden Konzentrationen von 0,01—1 mg/l 2,4-D. Schon bei 1 mg/l wurden die Blattstücke stark geschädigt, 5 mg/l wirkten vollständig toxisch. Die Zahl der jeweils entstandenen Organe zeigt Abb. 15.

Callusbildung. Es wird mehr Callus als bei NES- und IES-Zugabe gebildet. Schon bei niedrigen Konzentrationen schwillt der ganze eingetauchte Spreitenbezirk leicht an, die Epidermis wird jedoch nicht durchbrochen. Bei höheren Gaben ab 0,2 mg/l nimmt die Anschwellung zu, teilweise platzt auch die Epidermis auf. Es treten deshalb zwischen den Wurzelanlagen auch kleine Häufchen von freiem (nicht von Epidermis bedecktem) Callus auf.

Sproßbildung. Wie auch bei NES und IES beginnt sie bei 0,01 mg/l und steigt langsam und gleichmäßig an bis zu einem Maximum bei 0,08 mg/l 2,4-D. Bei dieser Konzentration wird fast die gleiche Sproßzahl wie bei den normal eingesteckten Kontrollen erreicht. Auch die Größe der Sprosse ist etwa die gleiche wie dort. Bei 0,2 mg/l sind

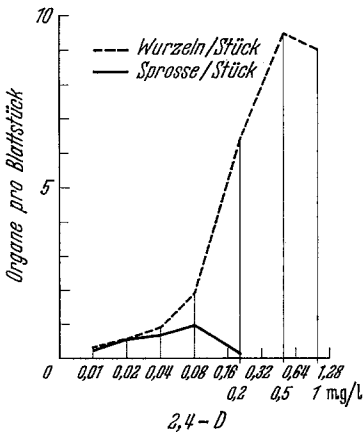


Abb. 15. Zahl der durch 2,4-D am apikalen Ende invers eingesteckter Stücke entstandenen Organe

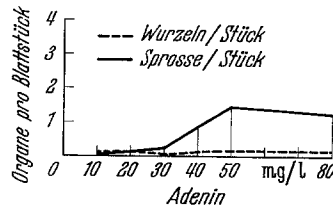


Abb. 16. Zahl der durch Adenin am apikalen Ende invers eingesteckter Stücke induzierten Organe

sie in Zahl und Größe schon stark zurückgegangen, bei noch höheren Konzentrationen fehlt jede Sproßanlage.

Wurzelbildung. Bis 0,08 mg/l 2,4-D steigt die Zahl der Wurzeln langsam an; bei dieser Konzentration werden gleich viele und gleich große Wurzeln wie bei den Normalkontrollen erreicht. Bei höheren Gaben nimmt die Zahl der Wurzeln rasch zu, wobei sie jedoch immer kleiner werden. Schon bei 0,5 mg/l haben sie sämtlich die auf S. 275 beschriebene Höckerform.

3. Induktion von Organbildung durch Purine

Nachdem sich an den normal eingetauchten Stücken der starke Einfluß des Adenins auf den Neubildungsvorgang gezeigt hatte, war es naheliegend, auch seine Wirkung auf das apikale Nervenende zu untersuchen. Daneben wurden noch Guanin und Adenosin verwendet.

α) Adenin. Es wurden Adeninkonzentrationen von 10—80 mg/l untersucht. Die Verträglichkeit war die gleiche wie bei den normal eingesteckten Stücken (s. S. 276). Die erzielte Organbildung zeigt Abb. 16.

Callusbildung. Es treten am eingetauchten Nervenende die gleichen kompakten grünen knollenartigen Callusverdickungen auf, wie sie schon für die normal eingesteckten Stücke beschrieben wurden. Eine stärkere Verdickung über den ganzen eingetauchten Spreitenbezirk wurde nicht beobachtet. Eine Wirkung des Adenins auf das freie basale Nervenende wurde nicht erzielt.

Sproßbildung. Bei niederen Adeningaben bis 30 mg/l sind die Zahl der sproßbildenden Blattstücke und die Sproßzahl noch sehr gering. Danach nimmt die Sproßzahl rasch zu, um bei 50 mg/l ihr Maximum zu erreichen. Die Größe der Sprosse ist jedoch bei dieser Konzentration schon stark zurückgegangen. Bei 80 mg/l sind zwar noch zahlreiche Sproßanlagen entstanden, doch überschreitet ihre Größe hier kaum mehr 1 mm.

Wurzelbildung. Wie bei anderen Objekten ist es auch bei *Begonia rex* nicht möglich, mit Adenin in größerem Umfang Wurzelbildung zu induzieren. Die Zahl der Wurzeln bleibt stets unter 0,2 pro Blattstück und hängt nicht von der Adeninkonzentration ab. Immerhin fällt auf, daß gegenüber den invers eingesteckten Kontrollen doch Wurzeln am apikalen Nervenende gebildet werden — wenn auch in sehr geringer Zahl.

β) Adenosin. Es wurden untersucht die Konzentrationen von 10, 20, 40 und 80 mg/l Adenosin. Am eingetauchten Apikalende des Nerven wurden weder Callus- noch Organbildung beobachtet. Die Organbildung am basalen Nervenende erfolgte wie üblich.

γ) Guanin. Es wurde das schwerlösliche Guanin verwendet, das in der Nährlösung suspendiert wurde (s. S. 277). Organbildung am eingetauchten Apikalende des Nerven konnte durch Guanin nicht induziert werden. Das basale Nervenende zeigte wie üblich Neubildungen.

4. *Beeinflussung der Organbildung am basalen Nervenende bei invers eingesteckten Blattstücken*

Bei den Versuchen mit normal eingesteckten Stücken auf wuchsstoff- und adeninhaltigen Nährböden hatte sich — abgesehen von dem abweichenden Verhalten der 2,4-D (s. S. 274) — in keinem Fall eine Wirkung dieser Substanzen auf nicht eingetauchte Spreitenbezirke gezeigt. Sie sind also nicht in der Lage, in Richtung basal—apikal in den Nerven bzw. in das Blatt einzuwandern.

Es war nun von Interesse, die Wanderung dieser Stoffe in invers eingestellten Blattstücken zu verfolgen. Dies ist leicht möglich, da ihre Wirkung auf die Anlagen des freien Basalendes gut festgestellt werden kann. Auch am Nerven zeigt sich die Wirkung höherer Wuchsstoffgaben als Callus- und Wurzelbildung. Als Beispiel sollen die Ergebnisse bei NES angeführt werden, IES verhielt sich grundsätzlich gleich.

Bei den Kontrollen entstehen Neubildungen nur am freien Basalende des Nerven (Abb. 8). Sproß- und Wurzelanlagen werden nebeneinander in größerer Zahl als bei den Normalkontrollen gebildet, sie wachsen aber sehr langsam. Von steigenden NES-Gaben werden die Organanlagen des freien Basalendes fortlaufend stärker gehemmt. Schon bei 0,2 mg/l (Abb. 12) sind sie ganz winzig und nur unter dem Binokular deutlich zu erkennen. Bei noch höheren NES-Gaben fehlt die Organbildung am freien Basalende des Nerven völlig.

Der Callus beschränkt sich bis 0,08 mg/l auf zunehmende Verdickung des freien Basalendes, bei höheren Gaben breitet er sich über den Nerven zum eingetauchten Apikalende hin aus (Abb. 12). Bei noch höheren NES-Konzentrationen ruft der Wuchsstoff auf der ganzen Nervenlänge starke Verdickung durch Callusbildung hervor.

Diese Versuche zeigen, daß Leitung der NES im Blattnerven in Richtung apikal—basal erfolgt. Aus der schlechten Wasserversorgung der am freien Basalende invers eingesteckter Stücke entstandenen Anlagen kann geschlossen werden, daß Wasserleitung im Holzteil nur in Richtung basal—apikal in stärkerem Maße stattfindet.

Aus dieser Tatsache und daraus, daß eine NES-Wanderung in Richtung basal—apikal nie beobachtet wurde (s. S. 274), können wir schließen, daß die Wuchsstoffleitung im Siebteil der Leitbündel stattfindet.

Weniger deutlich ist diese polare Wanderung bei Adenin zu erkennen. Auch hier werden jedoch bei den höheren Konzentrationen die Anlagen des freien Basalendes, vor allem die Wurzelanlagen gehemmt.

Besprechung der Ergebnisse

Über die Ursachen für die Auslösung der Organneubildung an isolierten Blattstücken von *Begonia rex* finden sich in der Literatur im wesentlichen drei Ansichten vertreten. SACHS (1880) glaubt, daß die Organbildung durch gewisse, damals noch hypothetische, „organbildende“ Substanzen ausgelöst wird. GOEBEL (1908) hält für die entscheidende Ursache der Neubildungen, daß die im intakten Blatt dauernd in den Sproß abgeleiteten Kohlenhydrate nach Abtrennung des Blattes und Zerschneiden der Nerven am basalen Nervenende sich anreichern. PREVOT (1939) schließlich glaubt, daß die Neubildung von Organen durch Hemmstoffe, die aus der Pflanze ins Blatt geleitet werden, blockiert wird. Trennt man das Blatt ab, so hört die Hemmstoffzufuhr auf, und es kommt zur Organbildung.

Was zunächst die Vermutung von GOEBEL betrifft, so konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Kohlenhydrate zwar als Baustoffe für die Neubildungsvorgänge von Bedeutung sind, nicht aber für deren Induktion. Wurden nämlich Blattstücke mit dem apikalen Ende in zuckerhaltige Nährlösungen wechselnder Konzentration eingesteckt,

soweit diese überhaupt von der Pflanze noch vertragen werden konnten, dann zeigte sich in keinem Falle Organbildung. Der Einwand, es könnte wegen der ständigen basal gerichteten Ableitung zu keiner Anreicherung von Zuckern am apikalen Nervenende kommen, wird durch die anschließend zu besprechenden Versuche mit Wuchsstoffen widerlegt, bei denen eine Organinduktion gelungen ist.

Um die Bedeutung der Wuchsstoffe und Purine, die von zahlreichen anderen Objekten her als organbildende Substanzen bekannt sind, auch für die Neubildungsvorgänge bei *Begonia rex* zu erfassen, wurde als erstes der Einfluß dieser Stoffe auf den normalen Neubildungsvorgang am basalen Nervenende untersucht. Die Wuchsstoffe und Purine wurden dabei in abgestuften Konzentrationen den Nährböden zugegeben, auf denen die Blattstücke kultiviert wurden.

Die verwendeten Wuchsstoffe (NES, IES, 2,4-D) haben, abgesehen von quantitativen Unterschieden, auf die Neubildungsvorgänge im einzelnen folgenden Einfluß: Die Callusbildung wird in steigendem Maße verstärkt und erstreckt sich vom Nervenende aus fortschreitend über den ganzen eingetauchten Bereich des Blattstücks. Die Zahl der entstehenden Wurzeln nimmt mit steigender Wuchsstoffkonzentration beträchtlich zu, die Sproßbildung dagegen wird im gleichen Maße immer mehr unterdrückt, bis von einer bestimmten Konzentration an überhaupt keine Sprosse mehr gebildet werden.

Ganz anders verhält sich Adenin. Es hemmt die Wurzelbildung und erhöht die Zahl der an den Blattstücken gebildeten Sprosse. Auffallend ist auch der Einfluß auf die Callusbildung. Der bei Adeningaben entstehende Callus weicht, vor allem auch durch seine Ergrünung, erheblich von dem durch Wuchsstoffe hervorgerufenen Callus ab.

Diese Versuche zeigen, daß Wuchsstoffe und Adenin die normale Organbildung am basalen Nervenende von Blattstücken außerordentlich stark modifizieren können. Wegen der strengen Polarität in der Anlage der Neubildungen läßt sich nun zeigen, daß diese Stoffe nicht nur bereits induzierte Organanlagen modifizieren, sondern auch eine Anlage von Organen selbst auslösen können. Im Gegensatz zum basalen Ende entstehen nämlich am apikalen Nervenende auch bei inverser Einstellung niemals Neubildungen. Eine Organbildung läßt sich aber auch am apikalen Ende in jeder gewünschten Richtung induzieren durch Zugabe von Wuchsstoffen und Adenin: Zugabe von Wuchsstoffen zur Nährlösung führt in niederen Konzentrationen zur Anlage von Sprossen und Wurzeln; bei höheren Konzentrationen ist die Sproßbildung unterdrückt, und es entstehen nur zahlreiche Wurzeln. Umgekehrt gelingt durch Adenin eine Wurzelinduktion nur in unbedeutendem Umfang, während beträchtlich Sprosse gebildet werden.

Damit ist aber eindeutig gezeigt, daß durch Wuchsstoffe und Adenin bei Blattstücken von *Begonia rex* auch dort in willkürlich bestimmbarer Weise Organbildung induziert werden kann, wo ohne diese Stoffe niemals Organbildung erfolgt. Der Schluß ist naheliegend, daß auch die natürliche Organbildung am basalen Nervenende, die ja durch Wuchsstoff und Adenin in jeder Richtung modifizierbar ist, durch Stoffe induziert wird, die diesen Verbindungen zum mindesten nahestehen. Die Untersuchung dieser Frage lag nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit; sie ist einer gesonderten Untersuchung vorbehalten.

Mit diesem Ergebnis ist dann aber gleichzeitig auch das zweite Problem einer Lösung nahegebracht, das bei der Neubildung an Blattstücken von *Begonia rex* vorliegt, nämlich die Polarität in der Anlegung der Organe. Sie ist ohne weiteres verständlich durch die jetzt naheliegende Annahme, daß die organinduzierenden Stoffe (vom Charakter der Wuchsstoffe oder des Adenins) im Blatt gebildet und von da durch die Siebteile basipetal abgeleitet werden. Bei mechanischer Unterbrechung dieser Leitung kommt es nach ihrer Anreicherung am basalen Nervenende zur Organbildung. Diese Vermutung ist leicht experimentell zu überprüfen durch eine Beeinflussung der Stoffleitung im Siebteil. Wird nämlich durch Eosinbehandlung die Siebröhrenleitung unterbrochen, so entstehen jetzt die Neubildungen an den Blattstücken nicht mehr nur am basalen Ende des Nerven, sondern über die ganze Länge des Nerven verteilt, vermutlich wohl an den Stellen, wo aus nicht-blockierten Seitennerven die organbildenden Stoffe angereichert werden. Das gleiche gilt auch für eosinbehandelte intakte Blätter, die die Behandlung, ohne abzufallen, überleben; jetzt entstehen auf der ganzen Länge der größeren Nerven des noch an der Pflanze befindlichen Blattes die Neubildungen. Die gleiche Wirkung wie durch Eosinbehandlung läßt sich bei isolierten Blattstücken auch durch Behandlung mit leitungshemmenden Stoffen wie TIBA erzielen.

Alle in der vorliegenden Arbeit besprochenen Versuche legen also folgende einfache Erklärung der Neubildungsvorgänge an Blattstücken von *Begonia rex* nahe: Im Blatt gebildete organinduzierende Stoffe vom Charakter der Wuchsstoffe, vielleicht in Verbindung mit Purinen, die im intakten, an der Pflanze befindlichen Blatt streng basipetal in den Sproß abgeleitet werden, reichern sich bei Unterbrechung der Stoffleitung an der Unterbrechungsstelle an, bis sie den zur Organinduktion notwendigen Schwellenwert überschreiten.

Für die Existenz eines aus dem Sproß akropetal wandernden Hemmstoffs (PREVOT) liegen keinerlei experimentellen Hinweise vor. Nach den bisher vorliegenden Befunden ist die Annahme eines solchen Hemmstoffs völlig überflüssig.

Zusammenfassung

1. Nach Desinfektion mit 0,01 % Sublimat für die Dauer von 60 min gelingt es leicht, 1 cm² große Blattstücke von *Begonia rex* auf festen Nährböden steril in vitro zu kultivieren und den Neubildungsvorgang unter genau definierten Bedingungen zu untersuchen.

2. Die bei normal eingesteckten Blattstücken ausschließlich am basalen Nervenende erfolgende Neubildungsreaktion läßt sich durch Wuchsstoffzugabe weitgehend abwandeln. Niedrige Wuchsstoffgaben erhöhen die Wurzelzahl und setzen die Sproßzahl herab, bei höheren Gaben wird die Sproßbildung völlig unterdrückt, die Wurzelzahl sehr stark erhöht.

3. Adenin erhöht die Zahl der angelegten Sprosse und setzt die Wurzelzahl herab. Bei den höchsten vertragenen Konzentrationen ist die Wurzelbildung völlig unterdrückt.

4. Durch gut vertragene Gaben von Auxinantagonisten wie PCIB und 2,4-DNP konnte die Neubildungsreaktion nicht unterdrückt werden. In höheren Konzentrationen wirken diese Stoffe stark toxisch.

5. Bei inverser Einstellung der Blattstücke konnte experimentell auch am apikalen Nervenende eine Organbildung durch Wuchsstoffe und Adenin ausgelöst werden. Wuchsstoffe induzierten in niedrigen Gaben Sproß- und Wurzelbildung, in höheren nur Wurzelbildung. Durch Adenin war in größerem Umfang nur Induktion von Sproßbildung möglich.

6. Durch Glucose konnte mit keiner vertragenen Konzentration Organbildung ausgelöst werden.

7. Zerstört man durch Eosinbehandlung den Siebteil von Blättern, die sich noch an der Pflanze befinden, so wird die Neubildung entlang den Hauptnerven des Blattes in der gleichen Weise ausgelöst, wie wenn das Blatt abgetrennt und seine Nerven zerschnitten worden wären.

8. An Blattstücken mit eosinzerstörtem Siebteil werden die Neubildungen nicht mehr polar nur am basalen Nervenende angelegt. Sie entstehen auf der ganzen Länge des Nerven.

9. TIBA hemmt die Stoffleitung im Siebteil. Wird sie dem Nährboden zugegeben, auf dem die Blattstücke normal eingesteckt kultiviert werden, so entstehen die Neubildungen ebenfalls nicht mehr ausschließlich am basalen Nervenende, sondern teilweise sogar am apikalen.

10. Zur Erklärung der Organinduktion und deren polarer Anlegung wird angenommen, daß im Blatt gebildete, streng basipetal geleitete organinduzierende Stoffe, wie Wuchsstoff und Adenin, bei Unterbrechung der Siebteilleitung an der Unterbrechungsstelle angereichert werden und deshalb dort zur Organbildung führen.

Herrn Privatdozent Dr. E. HAUSTEIN danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für seine stete und hilfsbereite Aufmerksamkeit, mit der er den Gang der Untersuchung verfolgte. Herrn Prof. Dr. J. SCHWEMMLE danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Botanischen Institut Erlangen. Für die

Anfertigung der Zeichnungen danke ich Herrn cand. rer. nat. H. BRIELMAYER
Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur

- BEHRE, K.: Physiologische und cytologische Untersuchungen über *Drosera*. *Planta* (Berl.) 7, 208—306 (1929). — BRAUNER, L.: Über den Mechanismus der Photolyse des Heteroauxins. *Naturwiss.* 40, 23 (1953). — CHOUARD, P.: Production expérimentale de bourgeons sous l'effet des hétéroauxines. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 206, 1401—1404 (1938). — GAUTHERET, R. J.: *Manual technique de culture des tissus végétaux*. Paris: Masson & Cie. 1942. — GOEBEL, K.: Weitere Studien über Regeneration. *Flora* (Jena) 92, 132—146 (1903). — Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen. Leipzig: Teubner 1908. — HABERLANDT, G.: Zur Physiologie der Zellteilung. *S.-B. Akad. Wiss. Berlin*, 1. Halbbd., 318—345 (1913). — HARTSEMA, A.: Anatomische und experimentelle Untersuchungen über das Auftreten von Neubildungen an Blättern von *Begonia rex*. *Rec. Trav. bot. néerl.* 23, 305—361 (1926). — HELLER, R.: Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sci. natur., Bot. Sér. XI* 14, 1—223 (1953). — JABLONSKI, J. R., and F. SKOOG: Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plantarum* (Cph.) 7, 16—24 (1954). — KESSLER, B., and Z. M. MOSCICKI: Effect of triiodobenzoic acid and maleic hydrazide upon the transport of foliar applied calcium and iron. *Plant Physiol.* 33, 70—72 (1958). — LAMPRECHT, W.: Über die Kultur und die Transplantation kleinerer Blattstückchen. *Beitr. allg. Bot.* 1, 353—398 (1918). — LENSKI, I.: Über die Brutzwiebelbildung auf den Blättern von *Drimyopsis kirkii*. *Planta* (Berl.) 50, 579—621 (1958). — LIBBERT, E.: Regulation des Wurzelwachstums durch synthetische und endogene Inhibitoren. *Planta* (Berl.) 50, 25—40 (1957). — Einfluß der Trijodbenzoesäure (TIBA) auf die Wirkstoffleitung im Pflanzenstengel. *Naturwiss.* 45, 20 (1958). — MAYER, L.: Wachstum und Organbildung an in vitro kultivierten Segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*. *Planta* (Berl.) 47, 401—446 (1956). — NIEDERGANZ-KAMIEN, E.: Chemical alterations of auxin transport. *Plant Physiol.* 30, Suppl. V (1955). — POHL, R., u. G. OCHS: Über die Wuchsstoffwirkung beim Streckungswachstum der Wurzel. *Naturwiss.* 40, 24—25 (1953). — PREVOT, P. C.: La néoformation des bourgeons chez les végétaux. *Mém. Soc. roy. Sci. Liège, Sér. IV* 3, 173—342 (1939). — REGEL, F.: Die Vermehrung der Begoniaceen aus ihren Blättern. *Jena. Z. Naturw.* 10, 447—492 (1876). — SACHS, J.: *Lehrbuch der Botanik*, 4. Aufl. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1874. — Stoff und Form der Pflanzenorgane. *Arb. bot. Inst. Würzburg* 2, 452—488 (1880). — SCHUMACHER, W.: Untersuchungen über die Lokalisation der Stoffwanderung in den Leitbündeln höherer Pflanzen. *Jb. wiss. Bot.* 73, 770—823 (1930). — SIMON, S. V.: Über die Beziehungen zwischen Stoffstauung und Neubildungsvorgängen in isolierten Blättern. *Z. Bot.* 12, 593—634 (1920). — SKOOG, F., and CH. TSUI: Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *Amer. J. Bot.* 35, 782—787 (1948). — Growth substances and the formation of buds in plant tissues. In: *Plant growth substances*. Wisconsin: University Wisconsin Press 1951. — STICHEL, E.: Gleichzeitige Induktion von Sprossen und Wurzeln an in vitro kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*. *Planta* (Berl.) 53, 293—317 (1959). — TUREL, F., and M. M. HOWES: Safflower leaf tissue culture. *Canad. J. Bot.* 34, 825—829 (1956). — WHITE, P. R.: *A handbook of plant tissue culture*. New York: J. Catell Press 1943.

Dr. KLAUS WIRTH,

Erlangen, Botanisches Institut der Universität, Schloßgarten 4