(Aus dem Institut für Pflanzenbau und Grünland der Universität Hohenheim)

Möglichkeiten zur Erstellung eines *In-vitro*-Vermehrungssystems für *Miscanthus* „Giganteus" durch Nutzung verschiedener Pflanzenteile als Spendergewebe

Von I. Lewandowski und G. Kahnt

(Mit 6 Abbildungen)

Zusammenfassung

Zur Erstellung eines *In-vitro*-Vermehrungssystems für *Miscanthus* „Giganteus" wurde die Kallusbildung an verschiedenen Pflanzenteilen untersucht. Unreife Infloreszenzen sind geeigneter als Sproßspitzen und Blattprimordien, da sie weniger verbraunende Substanzen an das Medium abgeben und eine höhere Vermehrungsrate haben. Je Infloreszenz konnten bis zu 1830 Pflanzen erzeugt werden. Da die Pflanzenregeneration bei *Miscanthus* über Somatische Embryogenese stattfindet, sind die biologischen Voraussetzungen zur Massenvermehrung durch *In-vitro*-Kultur gegeben.

Schlüsselwörter: *Miscanthus*, *In-vitro*-Vermehrung, unreife Infloreszenzen, Regenerationsrate, Somatische Embryogenese.

Possibilities for the establishment of an *In-vitro*-propagationsystem for *Miscanthus* "Giganteus" by using different parts of the plant as donor-tissue

Summary

To establish an *In-vitro*-propagation system for *Miscanthus* "Giganteus" the forming of callus from different parts of the plant was examined. Parts from unemerged inflorescences emitted less browning substances and had a higher rate of reproduction than shoot tips or leaf primordia. 1830 plants were produced by one unemerged inflorescence. The biological prerequisite for a mass propagation by *In-vitro*-culture is given because the plants regenerate by somatic embryogenesis.

Key-words: *Miscanthus*, *in-vitro*-propagation, inflorescences, reproduction-rate, somatic embryogenesis.

1. Einleitung

Miscanthus ist eine C_4-Pflanze aus dem ostasiatischen Raum. Auch in Deutschland, wo die Möglichkeiten zur Nutzung von *Miscanthus* als nachwachsender Rohstoff, z. B. zur Energiegewinnung, geprüft werden, sind Erträge von bis zu 36 t atro/ha möglich (KAHNT et al. 1992). Wie eigene Versuche bestätigen, entwickeln sich unter den gegebenen Verhältnissen keine keimfähigen Samen. Da die Kosten für die aus Rhizomteilung gewonnenen Tochterpflanzen sehr hoch liegen, erhofft man sich die Erstellung billigen Pflanzgutes über die Mikrovermehrung. Neben einer höheren Vermehrungsrate bietet die Mikrovermehrung im Vergleich zur Rhizomvermehrung, bei der Krankheitskeime über das Rhizom weitergegeben werden können, die Möglichkeit, gesünderes Pflanzgut zu erzeugen.

Die Mikrovermehrung erfolgt entweder durch direkte Regeneration von Achselknospen oder Sproßspitzen zu Pflanzen oder durch Kallusinduktion an meristematischem Pflanzengewebe und anschließender Pflanzenregeneration am Kallus oder von somatischen Embryoiden, die sich im oder am Kallus bilden.

Das Ziel unserer Untersuchungen war die Erstellung eines *In-vitro*-Vermehrungssystems mit Kallusinduktion und anschließender Pflanzenregeneration über somatische Embryogenese. Da noch keine Ergebnisse über die *In-vitro*-Vermehrung von *Miscanthus* „Giganteus" vorlagen, mußte zuerst nach geeigneten Pflanzenteilen und Nährmedien für eine Kalluskultur gesucht werden.

2. Material und Methoden[1]

2.1 Anzucht der Spenderpflanzen und Gewinnung der Explantate

Die Spenderpflanzen für unreife Infloreszenzen wurden im Gewächshaus angezogen und zur Blüteninduktion von 7 bis 21 Uhr mit 30.000 Lux beleuchtet. Sproßspitzen und Blattprimordien wurden bis zu einer Stengellänge von 1 m von Gewächshauspflanzen und ab einer Länge von 1 m von Freilandpflanzen entnommen.

Die Oberflächensterilisation des Stengelabschnitts, der das entsprechende Pflanzenteil enthielt, erfolgte für drei sec. in 70%igem Ethanol, danach für fünf min. in 15%igem Natriumhypochlorit und durch anschließendes Spülen in autoklaviertem aqua dest.

Sproßspitzen und Blattprimordien wurden unter dem Mikroskop auf eine Größe von mindestens 2×2 mm und maximal 5×5 mm herauspräpariert. Infloreszenzen wurden vor dem Auflegen in Stücke von 7 mm Länge geschnitten.

Alle präparierten Pflanzenteile wurden vor dem Auflegen für eine Stunde in eine sterile Lösung von 100 mg/l Cystein gegeben, um eine Verbraunung des Mediums durch die Explantate zu vermindern.

2.2 Kallusinduktion

Die Kallusinduktion erfolgte im Dunkeln bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchte von 65 %. Die verwendeten Kulturgefäße und Medien sind in Tabelle 1 angegeben. In Versuch A bis D wurde je ein Explantat, in Versuch E wurden

[1] **Abkürzungen**: MS = Murashige und Skoog-Medium, B5 = Gamborg-Medium, BAP = Benzylaminopurin, 2,4-D = 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, 2,4,5-T = 2,4,5-Trichlorophenoxyessigsäure, Kin = Kinetin, Zea = Zeatin.

differenzen wurden über einen multiplen Mittelwertvergleich mit dem LSD-Test für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Art der Kallusbildung und Pflanzenregeneration

Alle Explantate gaben ab dem dritten bis vierten Tag nach dem Explantieren Substanzen ab, die zur Verbraunung des Mediums führten. Ohne ein zweiwöchiges Umsetzen der Sproßspitzen und Blattprimordien innerhalb der Petrischale kam es nicht zur Kallusbildung und häufig zum Absterben der Explantate.

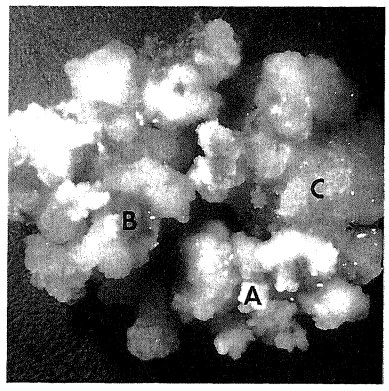


Abb. 1: Kallus, gebildet an einer unreifen Inforeszenz, mit embryogenen Zonen (A), Embryoiden (B) und nichtembryogenen Zonen (C), Vergrößerung 4×

Abb. 2: Embryoid, Vergrößerung 10×

Abb. 3: Embryoid, Vergrößerung 20×

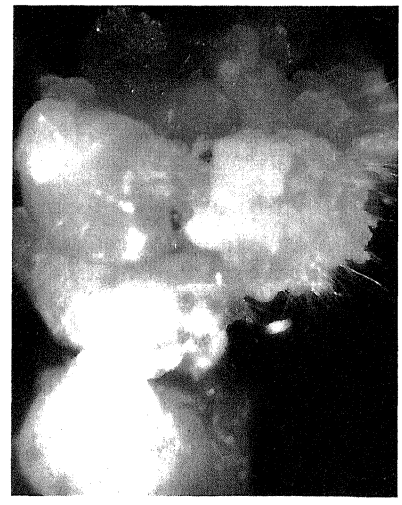


Abb. 4: Embryogene Struktur, die sich zu einem Bündel von Sprossen und Wurzeln entwickelt, Vergrößerung 10×

Die Infloreszenzteile bildeten auch ohne Umsetzen oder Medienwechsel embryogenen Kallus aus, da die Verbraunung des Mediums durch sie sehr viel geringer war als durch Sproßspitzen und Blattprimordien.

Die Kallusbildung setzte an Sproßspitzen und Blattprimordien in der fünften, an Infloreszenzen in der vierten Woche nach dem Explantieren ein. An allen Explantaten entstand neben glasigem Kallus von schmutzig-grauer Farbe, der keine Pflanzen hervorbrachte, auch kompakter, weißer, embryogener Kallus (siehe Abb. 1). An diesem bildeten sich Embryoide, die nach Umsetzen auf Regenerationsmedium Sproß und Wurzel entwickelten.

Daneben bildete sich an den Explantaten unreifer Infloreszenzen auch hellgrüner Kallus, dessen Oberfläche von ausdifferenzierten Embryoiden bedeckt war, sowie glasiger, farbloser Kallus mit kristalliner Oberfläche. In letzterem entstanden häufig embryogene Strukturen, die sich auf Regenerationsmedium zu vollständigen Pflanzen entwickelten.

Bei der Pflanzenregeneration an Kalli von unreifen Infloreszenzen wurden unterschiedliche Erscheinungsformen von Embryoiden beobachtet (siehe Abb. 2—4). Am häufigsten traten solche auf, die generativ erzeugten Embryonen glichen. Sie bestanden aus Scutellum, Koleoptile und Koleorrhiza (siehe Abb. 2).

3.2 Kulturerfolge mit Sproßspitzen und Blattprimordien

Die Kulturerfolge mit Sproßspitzen und Blattprimordien hingen wesentlich von dem Entwicklungsstadium der Spenderpflanze ab. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der durchschnittlichen Anzahl der Regenerate je explantiertem Sproßmeristem oder Blattprimordium bei verschiedenen Sproßlängen der Spenderpflanze. Aufgeführt sind die Wachstumsregler, bei deren Einsatz im Kallusinduktionsmedium die besten Kulturerfolge erzielt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Petrischalengrößen und Medienkonsistenzen sind die Versuche untereinander jedoch nur bedingt vergleichbar.

Tabelle 2

Anzahl Regenerate je Sproßspitze (Sproßsp.) und je Blattprimordium (Blattp.) bei Nutzung von Spenderpflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien

Stengellänge	Versuch	Wachstumsregler Kallusinduktionsmedium	Regenerationsrate Sproßsp.	Blattp.
2—5 cm	A	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	0	n. v.
		10 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP	0,3	n. v.
20—40 cm	A	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	1,0	0
		10 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP	1,4	0
60—100 cm	B	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	0	2,0
		3,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	12,6	3,6
		5 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP	0	7,8
100—125 cm	C	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	2,3	0
		8 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	1,3	1,0
250 cm	D	2,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	5,0	n. v.
		5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP	1,8	n. v.

Bei Entnahme der Explantate aus 2 bis 5 cm langen Rhizomsprossen wurden nur geringe Regenerationsraten von 0,3 Pflanzen je explantierter Sproßspitze beobachtet. 12 % dieser Kulturen waren mit Bakterien kontaminiert. Bei Nutzung von 60 bis 100 cm langen Sprossen wurde mit 12,6 die höchste Anzahl von Regeneraten je Sproßspitze erreicht. Bei einer Sproßlänge von 250 cm konnten bis zu fünf Regenerate je Sproßspitze gewonnen werden. Der Anteil der mit Bakterien kontaminierten Kulturen betrug bei Sproßspitzen 1 bis 7 %. Aus Blattpri-

mordien von 60 bis 125 cm langen Sprossen konnten regenerierbare Kulturen angelegt werden. Die Regenerationsrate war bei einer Stengellänge von 60 bis 100 cm mit 7,8 Regeneraten je Explantat am höchsten. Die Kontaminationsrate bei Kulturen mit Blattprimordien betrug 9 bis 12 %.

In Versuch D wurden vollständige, mit der Spitze nach oben explantierte mit längs halbierten, mit der Schnittseite zum Medium hin explantierten Sproßspitzen verglichen. An den halbierten Sproßspitzen bildete sich mehr Kallus und eine höhere Anzahl von Regeneraten. Bei einem Wachstumsreglergehalt des Mediums von 5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP regenerierten durchschnittlich 11,3 Pflanzen je halber Sproßspitze.

3.3 Kulturerfolge mit unreifen Infloreszenzen

Eine Länge von 7 mm erwies sich als optimale Explantatgröße für unreife Infloreszenzen. In Versuch E wurden die Medien Gamborg B5 (Gamborg und Shyluk 1981), Anderson (Anderson und Haner 1978), Jensen (Jensen 1983) und MS (Murashige und Skoog 1962) in ihrer Wirkung auf das Kalluswachstum und die Pflanzenbildung an unreifen Infloreszenzen von *Miscanthus* verglichen. Die Menge an gebildetem Kallus sowie die Kallusqualität, bestimmt nach dem Anteil an embryogenem Kallus, nahm in der Reihenfolge B5-, Anderson-, Jensen und MS-Medium zu. Im Mittel über alle Wachstumsreglerbehandlungen reichten die Kallusinduktionsraten von 43 % auf Jensen-Medium bis zu 57 % auf Anderson-Medium. Die Menge an je Explantat gebildetem Kallus nahm, im Schnitt über alle Wachstumsreglerbehandlungen, von 21 mg bei B5- auf 67 mg bei MS-Medium zu. Abbildung 5 zeigt die Regenerationsraten bei Einsatz der vier Medien sowie verschiedener Konzentrationen von 2,4-D mit BAP oder Kinetin.

Die Anzahl der Regenerate je Explantat lag im Schnitt über alle Wachstumsreglerkonzentrationen, entsprechend der gebildeten Kallusmenge und -qualität, auf MS-Medium am höchsten. Auf MS-Medium konnten bei Zugabe von 5 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP zum Kallusinduktionsmedium durchschnittlich 2,6 Pflanzen je explantiertem Infloreszenzteil produziert werden, auf Jensen-Medium 1,4 Pflanzen bei Zugabe von 6,5 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP. Die Regenerationsraten auf B5 und Anderson-Medium schwankten, je nach Wachstumsreglerkonzentration, zwischen 0,0 und 0,23 Regeneraten je Explantat und lagen damit sehr viel niedriger als auf den Vergleichsmedien. Auf Medien, die 2,4-D und Kinetin

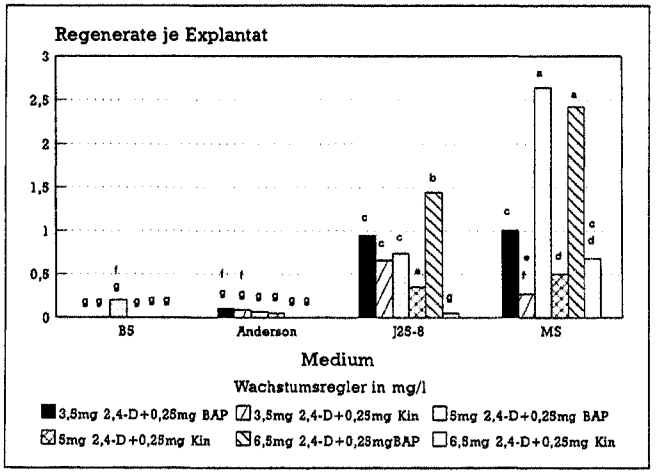
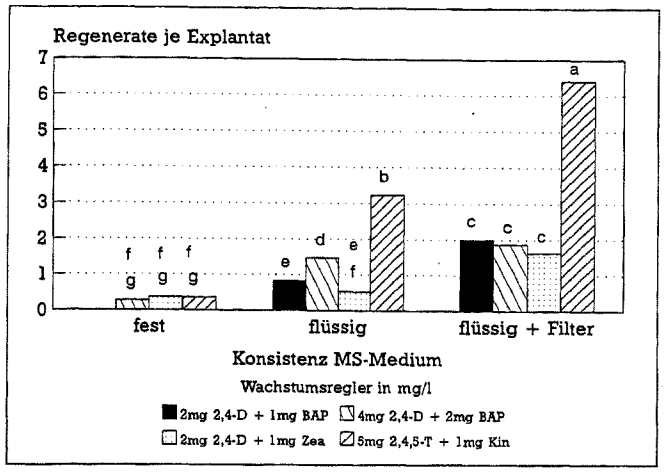


Abb. 5: Anzahl Regenerate je Explantat in Versuch E bei Einsatz von Gamborgs B5-, Anderson-, Jensen- und MS-Medium mit verschiedenen Wachstumsreglergehalten

Abb. 6: Anzahl Regenerate je Explantat in Versuch F bei Einsatz von festem und flüssigem MS-Medium ohne oder mit Filtereinlage als Kallusinduktionsmedium sowie bei verschiedenen Wachstumsreglergehalten



enthielten, wurde meist mehr Kallus gebildet als auf Medien mit 2,4-D+BAP. Auf Regenerationsmedium bildeten sich jedoch an den Kalli, die auf BAP-haltigem Medium induziert worden waren, mehr Pflanzen als an Kalli, die mit der gleichen Konzentration von Kinetin induziert wurden.

Zur Ermittlung der optimalen Medienkonsistenz wurde die Kallusbildung in Versuch F auf Festmedium, Flüssigmedium sowie Flüssigmedium mit einer Filtereinlage in der Petrischale verglichen. In den Kulturen mit flüssigem Medium wurden höhere Kallusgewichte und mehr embryogener Kallus gebildet als auf Festmedium. Da die anschließende Pflanzenregeneration bei allen Varianten in Petrischalen mit Flüssigmedium und einer Filtereinlage stattfand, können die beobachteten Unterschiede allein auf die Wirkung der Medienkonsistenz und Wachstumsregler im Kallusinduktionsmedium zurückgeführt werden.

Abbildung 6 zeigt, daß die höchsten Regenerationsraten bei Kallusinduktion in Flüssigmedium, in dem das Explantat auf einer Filtereinlage im Medium lag, erreicht wurde. Die höchste Regenerationsrate von 6,4 wurde beim Einsatz von 5 mg/l 2,4,5-T+1 mg/l Kinetin im Kallusinduktionsmedium beobachtet. Der Anteil der mit Bakterien kontaminierten Kulturen betrug bei Versuch E 1,7 %, bei Versuch F 0,9 %.

Während der Pflanzenentwicklung *in vitro* wurde, unabhängig von Auxinform oder -konzentration, bei 1 % der Regenerate Albinismus beobachtet.

Die visuelle Bonitur der nach dem Umpflanzen in Erde überlebenden Regenerate im Gewächshaus zeigte keine Variabilität im Habitus.

Eine stichprobenartige zytologische Analyse der Regenerate ergab, daß sie die gleiche Ploidiestufe aufwiesen wie die Spenderpflanzen, denen die Infloreszenzen entnommen wurden.

4. Diskussion

Die Versuche A, B, C und D zeigten, daß die Kulturerfolge mit Sproßspitzen und Blattprimordien und ihre Wachstumsregleransprüche von dem Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflußt wurden. Vasil und Vasil (1986) führten dies auf Unterschiede im endogenen Gehalt an Wachstumsreglern sowie den physiologischen oder morphologischen Zustand des Pflanzenteils zurück. Nach den vorliegenden Versuchsergebnissen können Sproßspitzen von 20 bis 250 cm lan-

gen Sprossen erfolgreich kultiviert werden, wobei die Regenerationsraten von Sproßspitzen aus Sprossen mit einer Länge unter 60 cm geringer waren als die von längeren Sprossen. Zur Nutzung der Blattprimoriden waren ebenfalls 60 bis 100 cm lange Sprosse am geeignetsten.

Durch die Halbierung der Sproßspitzen wurde ein direkter Kontakt der meristematischen Zellen mit dem Medium erreicht. Da nach DALE (1977) zu kleine Explantate absterben wurden die Sproßspitzen zum Halbieren auf eine Größe von 5 × 5 mm herauspräpariert. Dies erwies sich als ausreichend für das Überleben der Sproßspitzen.

Bei Halbierung der Sproßspitzen und Nutzung der Blattprimordien lassen sich fünf Explantate je Stengel gewinnen. Mit diesen könnten, bei Annahme maximaler Regenerationsraten von 7,8 Pflanzen je Blattprimordium und 11,25 je halbierter Sproßspitze 46 Tochterpflanzen je Stengel erzeugt werden. Eine 10 cm lange Infloreszenz, die sich in 20 Rispenarme aufteilt, ermöglichte dagegen bei einer Schnittgröße von 7 mm die Gewinnung von 286 Explantaten. Bei einer Regenerationsrate von 6,4 Pflanzen je Explantat könnten 1830 Tochterpflanzen je Infloreszenz gewonnen werden.

Unreife Infloreszenzen erwiesen sich als das geeignetste der verglichenen Pflanzenteile, da sie nur wenig mit Bakterien kontaminiert waren, die geringste Menge an verbraunenden Substanzen an das Medium abgaben und zudem das höchste Vermehrungspotential bieten. Deshalb wurden sie zur optimalen Mediumbeschaffenheit und den benötigten Wachstumsreglerzusätzen intensiver untersucht.

Der Vergleich der vier Standardmedien zeigte, daß für die Kultivierung unreifer Infloreszenzen von *Miscanthus* stickstoffreiche Medien wie das MS- oder Jensen-Medium unerläßlich sind. Stickstoff fördert nach REINERT et al. (1967) die Embryoidbildung.

Miscanthus-Explantate geben in starkem Maße verbraunende, das Kalluswachstum behindernde Substanzen ab. Während sich diese in der Matrix des, dem zur Verfestigung des Medium beigegebenen Agars festsetzen und um das Explantat herum akkumulieren, können sie sich in flüssigem Medium verteilen. Hierauf ist vornehmlich das bessere Kalluswachstum in flüssigem Medium zurückzuführen. Außerdem ist in Flüssigmedium ein größerer Oberflächenkontakt des Explantats mit dem Medium gegeben, was zu einer effizienteren Aufnahme der Inhaltsstoffe und zu schnellerem Kalluswachstum führen kann (GEORGE und SHERRINGTON 1984).

Für die Regeneration der Embryoide zu Pflanzen erwies es sich als notwendig, Filtereinlagen in das Flüssigmedium zu geben, auf denen die Kalli auflagen.

Die Versuchsergebnisse zeigten, daß zur Induktion von embryogenem Kallus an Sproßspitzen und Blattprimordien eine Zugabe von 2,5 bis 5 mg/l 2,4-D mit 0,5 mg/l BAP optimal waren. Unreife Infloreszenzen reagierten positiv auf die Wachstumsreglerkombination von 2,4-D + BAP und 2,4,5-T + Kinetin. Bei einer Auxinkonzentration von 2 bis 10 mg/l und einer Cytokininkonzentration von 0,25 bis 2 mg/l konnte embryogener Kallus gebildet werden. Im Gegensatz zu unreifen Infloreszenzen anderer Gramineen wie z. B. Mais (PAREDDY und PETOLINO 1990), Gerste (THOMAS und SCOTT 1985) und Weizen (TABAEIZADEH et al. 1990) konnten bei *Miscanthus* aus den Kalli, die auf reinem Auxinmedium ohne Cytokininzugabe induziert wurden, meist keine Pflanzen regenerieren. Dies deutet darauf hin, daß *Miscanthus* zur Induktion von regenerierbarem Kallus eine Wachstumsreglerkombination von Auxin und Cytokinin im Kallusinduktionsmedium benötigt.

Ein Regenerationsmedium ohne Wachstumsreglerzusätze oder mit einer Gabe von 0,1 mg/l BAP erwies sich als optimal.

Die Pflanzenregeneration in Kalluskulturen von *Miscanthus* findet über somatische Embryogenese statt. Diese ist nach VASIL (1991) die effizienteste und wirtschaftlichste Methode der Mikrovermehrung der Pflanzen. Gegenüber der Organogenese, bei der sich Sprosse bilden, die in einem zusätzlichen Arbeitsgang bewurzelt werden müssen, hat sie den Vorteil, daß eine höhere Anzahl von Pflanzen gebildet wird und die morphogene Kapazität der embryogenen Kulturen über einen längeren Zeitraum erhalten werden kann, als die von nichtembryogenen (NABORS et al. 1983). Kalluskulturen, induziert an Infloreszenzteilen von *Miscanthus*, blieben bei zweimonatigem Mediumwechsel ein Jahr lang regenerationsfähig. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß bei *Miscanthus* die biologischen Voraussetzungen zur Massenvermehrung über *In-vitro*-Kultur gegeben sind.

Danksagung

Dr. Astrid GLAND von der Landessaatzuchtanstalt danken wir für ihre Hilfsbereitschaft und Ratschläge während der Erstellung dieser Arbeit.

Christine ARNOLD gilt unser Dank für die Hilfe bei der technischen Durchführung dieser Versuche.

Die zytologischen Untersuchungen wurden dankenswerterweise von Dipl.-Biol. Thomas GÜNTHER vom Institut für Genetik der Universität Hohenheim durchgeführt.

5. Literatur

ANDERSON, W. C. and G. HANER, 1978: Strawberry Tissue Culture Formula Wash. State University; N. W. Wash. Res. Unit, Mount Vernon, Wash.

DALE, P. J., 1977: Meristem Tip Culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. Plant Science Letters *9*, 333—338.

GAMBORG, O. L. and J. P. SHYLUK, 1981: Nutrition, Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures; In: THORPE, T. A. (ed): Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, 21—44.

GEORGE, E. F. and P. D. SHERRINGTON, 1984: Factors affecting Growth and Morphogenesis; In: Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd, Eversley Basingstoke, England, 125—183.

JENSEN, C. J., 1983: Producing Haploid Plants by Chromosome Elimination In: Cell and Tissue Culture techniques for Cereal Crop improvement; Scienic Press, Beijing China, 55—79.

KAHNT, G., K. EGHBAL, J. DIEDRICH und G. GRONBACH, 1992: Zuckerhirse kontra Chinaschilf. Landwirtschaftliches Wochenblatt Baden-Württemberg *4*, 21—23.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tabacco Tissue Cultures. Physio. Plant. *15*, 473—497.

NABORS, M. W., W. H. JAMES and A. D. THOMAS, 1983: Long-Duration, High-Frequency Plant Regeneration from Cereal Tissue Cultures. Planta *157*, 385—391.

PAREDDY, D. R. and J. F. PETOLINO, 1990: Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Inflorescences of Several Elite Inbreds of Maize. Plant Science *67*, 211—219.

REINERT, J., M. TAZAWA and S. SEMENOFF, 1967: Nitrogen Compounds as Factors of Embryogenesis *in vitro*. Nature *216*, 1215—1216.

TABAEIZADEH, Z., A. PLOURDE and A. COMEAU, 1990: Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Triticum aestivum* × *Leymus angustus* F_1-Hybrids and the Parental Lines. Plant Cell Reports *9*, 204—206.

THOMAS, M. R. and K. J. SCOTT, 1985: Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Callus Initiated from Immature Embryos and Immature Inflorescences of *Hordeum vulgare*. J. Plant Physiol. *121*, 159—169.

VASIL, I. K., 1991: Rationale for the Scale-Up and Automation of Plant Propagation In: VASIL, I. K. (Ed.): Scale-Up and Automation in Plant Propagation. Academis Press, Inc. 1—6.

VASIL, I. K. and V. VASIL, 1986: Regeneration in Cereal and other Grass Species. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants 3—86, 121—150.

(Manuskript eingelangt am 27. März 1993, angenommen am 12. Mai 1993)

Anschrift der Verfasser:

Dr. Iris LEWANDOWSKI und Prof. Dr. Günther KAHNT, Lehrstuhl für Allgemeinen Pflanzenbau (340), Universität Hohenheim, Postfach 700562, D-7000 Stuttgart 70