



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Beiträge zur somatischen Embryogenese beim Süßholz
(*Glycyrrhiza glabra* L.)“

verfasst von / submitted by

Christine Kazianka

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. i.R. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp für das interessante Thema, die persönliche Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit in besonderem Maße bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die ausdauernde und kompetente Betreuung, Hilfe und Unterstützung während der Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Ing. Brigitte Grauwald für die Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken, ihre praktische Unterstützung und das nette Arbeitsklima.

An dieser Stelle möchte ich meiner Familie, allen voran meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester Barbara sowie meinen Freunden Martin, Katrin und Doris für ihre ausdauernde Unterstützung, Geduld und Motivation danken.

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Ad	Adeninsulfat
BAP	Benzylaminopurin
Gl	Glutamin
Gl-N	Glutamin mit reduziertem Stickstoffgehalt
Kin	Kinetin
TDZ	Thidiazuron
Z	Zeatin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 1 -
1.1. Glycyrrhiza glabra.....	- 1 -
1.2. Somatische Embryogenese.....	- 1 -
1.3. Problemstellung.....	- 2 -
2. Material und Methoden.....	- 4 -
2.1. Pflanzenmaterial.....	- 4 -
2.2. Oberflächensterilisation	- 4 -
2.3. Nährmedien	- 4 -
2.4. Versuchsansätze	- 9 -
2.4.1. Erste Versuchsreihe zur direkten Embryogenese	- 9 -
2.4.2. Zweite Versuchsreihe zur direkten Embryogenese.....	- 10 -
2.4.3. Erste Versuchsreihe zur indirekten Embryogenese	- 10 -
2.4.3.1. Erste Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels 2,4-D	- 10 -
2.4.3.2. Erste Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels TDZ	- 11 -
2.4.3.3. Erste Versuchsreihe zur Embryoinduktion.....	- 11 -
2.4.4. Zweite Versuchsreihe zur indirekten Embryogenese	- 12 -
2.4.4.1. Zweite Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels 2,4-D	- 12 -
2.4.4.2. Zweite Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels TDZ.....	- 13 -
2.4.4.3. Zweite Versuchsreihe zur Embryoinduktion	- 13 -
2.4.5. Dritte Versuchsreihe zur Embryoinduktion	- 14 -
2.5. Versuchsauswertung	- 14 -
3. Ergebnisse.....	- 17 -
3.1. Direkte somatische Embryogenese	- 17 -
3.1.1. Erster Versuch zur direkten Embryogenese.....	- 17 -
3.1.2. Zweiter Versuch zur direkten Embryogenese	- 17 -
3.2. Indirekte Embryogenese.....	- 23 -

3.2.1.	Ergebnisse zur Kallusinduktion	- 23 -
3.2.1.1.	Ergebnisse zur ersten Versuchsreihe mittels 2,4-D	- 24 -
3.2.1.2.	Ergebnisse zur ersten Versuchsreihe mittels TDZ	- 24 -
3.2.1.3.	Ergebnisse zur zweiten Versuchsreihe mittels 2,4-D	- 26 -
3.2.1.4.	Ergebnisse zur zweiten Versuchsreihe mittels TDZ	- 26 -
3.2.2.	Ergebnisse zur Embryoinduktion	- 28 -
3.2.2.1.	Embryoinduktion mittels Adeninsulfat	- 30 -
3.2.2.1.1.	Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion	- 32 -
3.2.2.1.2.	Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion	- 34 -
3.2.2.1.3.	Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion	- 34 -
3.2.2.1.4.	Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum	- 36 -
3.2.2.2.	Embryoinduktion mittels Benzylaminopurin	- 38 -
3.2.2.2.1.	Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion	- 41 -
3.2.2.2.2.	Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion	- 42 -
3.2.2.2.3.	Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion	- 42 -
3.2.2.2.4.	Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum	- 44 -
3.2.2.3.	Embryoinduktion mittels Kinetin	- 46 -
3.2.2.3.1.	Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion	- 48 -
3.2.2.3.2.	Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion	- 49 -
3.2.2.3.3.	Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion	- 50 -
3.2.2.3.4.	Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum	- 52 -
3.2.2.4.	Embryoinduktion mittels Zeatin	- 54 -
3.2.2.4.1.	Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion	- 56 -
3.2.2.4.2.	Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion	- 57 -
3.2.2.4.3.	Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion	- 58 -
3.2.2.4.4.	Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum	- 60 -
3.2.2.5.	Embryoinduktion mittels Glutamin	- 62 -
3.2.2.5.1.	Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion	- 64 -

3.2.2.5.2.	Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion.....	- 64 -
3.2.2.5.3.	Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion.....	- 65 -
3.2.2.5.4.	Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum	- 65 -
3.2.2.6.	Embryoinduktion mittels Glutamin unter Stickstoff-reduzierung .	- 68 -
3.2.2.6.1.	Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion	- 69 -
3.2.2.6.2.	Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion.....	- 70 -
3.2.2.6.3.	Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion.....	- 71 -
3.2.2.6.4.	Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum	- 73 -
4.	Diskussion	- 75 -
5.	Zusammenfassung	- 82 -
6.	Summary	- 83 -
7.	Literaturverzeichnis	- 84 -

1. Einleitung

1.1. *Glycyrrhiza glabra*

Glycyrrhiza glabra L. ist eine in Südrußland, Südasien, dem persischen Raum und dem Mittelmeergebiet beheimatete mehrjährige Staude (Hänsel et al., 2016; Hänsel und Sticher, 2007). Sie wird aufgrund ihrer Inhaltsstoffe medizinisch als Expectorans bei Bronchialkatharr und Husten sowie als Adjuvans bei Gastritis und Magengeschwüren verwendet. Die anti-inflammatorische und antiulcerative Wirkung beruht vor allem auf dem Inhaltsstoff Glycyrrhizin bzw. dessen Aglycon Glycyrrhetinsäure (Henry et al., 1991, Hänsel und Sticher, 2007). Die Flavonoide Isoliquiritigenin und Liquiritigenin sind für ihre Anwendung als Spasmolytikum verantwortlich (Sato et al., 2007, Hänsel und Sticher, 2007). In der Nahrungsmittelindustrie ist Liquiritiae radix ebenfalls von Bedeutung, da sie als Süßungsmittel dient und auch Lakritze aus ihr gewonnen wird.

1.2. Somatische Embryogenese

Die somatische Embryogenese beschreibt die Entstehung von Embryonen oder embryoähnlichen Strukturen (im Weiteren Embryoide genannt) aus somatischen Zellen, folglich aus Zellen des Pflanzenkörpers, die normalerweise nicht im Vermehrungsprozess involviert sind. Im Gegensatz dazu entsteht bei der natürlichen Embryogenese der Embryo aus der Zygote. Die Entwicklung erfolgt in beiden Fällen weitgehend nach dem gleichen Schema, lediglich die ersten Teilungsstadien unterscheiden sich. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Embryoide oder embryoide Strukturen verwendet, da empfohlen wird, eine klare sprachliche Abgrenzung zwischen somatischen und zygotischen Embryonen zu treffen (Heß, 1992).

Grundsätzlich wird zwischen direkter und indirekter Embryogenese unterschieden. Bei der direkten Embryogenese erfolgt die Bildung von Embryoiden am Ursprungsgewebe selbst, während die Zellen im Fall der indirekten Embryogenese zuerst eine Phase der Dedifferenzierung durchlaufen und Kallusgewebe (Stufe 1) gebildet wird. Erst im zweiten Schritt (Stufe 2) wird

die Embryoidbildung induziert, sodass diese Methode einerseits mehr Zeit benötigt als die direkte Embryogenese, durch die hohe Vermehrungsrate aber auch höhere Embryoidausbeuten zu erwarten sind. Allerdings scheint die direkte Embryogenese mit größerer genetischer und zytologischer Stabilität einherzugehen (Mandal et al., 2002).

1.3. Problemstellung

Aufgrund der unterschiedlichen Anwendungsgebiete und da bei längerer Anwendung von Süßholz und Süßholzzubereitungen Nebenwirkungen auftreten können, ist es von besonderem Interesse, Genotypen mit einem definierten Wirkstoffspektrum zu kultivieren. Durch ausgewählte Techniken wäre es möglich, entsprechende Klone zu vermehren, deren Inhaltsstoffe eine bestmögliche Wirkung bei maximal reduzierten Nebenwirkungen zulassen.

Die Vermehrung mittels somatischer Embryogenese erlaubt eine schnelle, genetisch einheitliche Vermehrung in großem Maßstab. Aus pflanzenbiotechnologischer Sicht liegt der Vorteil dieser Technik darin, dass man den sonst notwendigen Schritt der Bewurzelung nicht durchführen muss, da embryoide Strukturen analog den Entwicklungsstadien zygotischer Embryonen zu vollständigen Keimlingen konversieren.

Zur ersten Stufe der indirekten somatischen Embryogenese waren in einer vorangegangenen Arbeit (Lämmermeyer, 2007) Versuche zur Kallusinduktion und Vermehrung des Gewebes erfolgreich durchgeführt worden. Daher lag der Focus dieser Arbeit darauf, auf Basis der Vorgängerarbeit ein Protokoll zur Embryoinduktion (Stufe 2) zu entwickeln. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Medienzusätze auf ihre Eignung zur Embryoinduktion geprüft werden. Wichtige Faktoren sind dabei Phytohormone und Stickstoffgehalt des Nährmediums (Seitz et al., 1985). Meist werden Phytohormone aus der Gruppe der Auxine zur Induktion der somatischen Embryogenese eingesetzt - sehr häufig wird hier 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) gewählt, dieses starke Auxin wurde bereits von Lämmermeyer (2007) an *G. glabra* getestet. Im Rahmen unserer Arbeit sollten die Cytokinine Adeninsulfat, Benzylaminopurin, Kinetin und Zeatin auf ihre Eignung zur Embryoinduktion untersucht werden. Im

Gegensatz zur allgemein bekannten fördernden Wirkung der Auxine auf die Induktion der Embryogenese kann bei Vertretern der Cytokinine nicht von generellen diesbezüglichen Eigenschaften gesprochen werden (Jimenez, 2001). Jedoch werden in der Literatur oft Cytokinine im Zusammenhang mit somatischer Embryogenese erwähnt (Kim et al., 2004; Luo et al., 1999; Nomura und Komamine, 1985; Vargas et al., 2005), sodass in dieser Arbeit ihr Einfluss auf die Embryoinduktion untersucht werden sollte. Weiters wurden die Versuche zur Embryoinduktion aufgrund der ersten Testreihe mit modifiziertem Versuchsaufbau wiederholt und die zu testenden Stufe 2-Medien um ein Medium mit der Aminosäure Glutamin und ein Medium mit Glutamin-Zusatz und reduziertem Stickstoffgehalt erweitert. Die Wahl fiel auf die Aminosäure Glutamin, da davon ausgegangen wird, dass Aminosäuren in den Stickstoffwechsel der Gewebe eingreifen und so ebenfalls die Ausbildung embryoider Strukturen gefördert werden kann (George, 1993). Dies zeigte sich beispielsweise in einer Erhöhung der Embryoinduktionsrate (Singh und Chand, 2003) und in der Verbesserung der Maturation (Sahrawat und Chand, 2001).

Da sich in der Literatur (Iantcheva et al., 1999; Ipekci und Gozukirmizi, 2003; Murthy et al., 1995; Singh et al., 2003; Saxena et al., 1992; Zhang, 2001) viele Studien über direkte Embryogenese mittels Thidiazuron (TDZ) fanden und dieser Wuchsstoff auch bei ausdifferenzierten Geweben zum Erfolg führen kann (Lakshmanan und Taji, 2000), sollte ein entsprechender Versuch mit *G. glabra* durchgeführt werden. Thidiazuron stellt ein synthetisches Cytokinin dar, das jedoch sowohl den Cytokinin- als auch den Auxin-Haushalt der Pflanze beeinflussen kann. Da Auxine für die Induktion der somatischen Embryogenese essentiell zu sein scheinen und auch die Kombination mit Cytokinin oft eingesetzt werden kann (George, 1993), stellt TDZ eine erfolgversprechende Substanz dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte TDZ einerseits zur Induktion von direkter Embryogenese an Sämlingen von *G. glabra* eingesetzt werden. Andererseits wollten wir auf TDZ-hältigem Medium etablierten Kallus auf Eignung für die Induktion von somatischen Embryos testen.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Für die Versuche zur direkten Embryogenese kamen Samen einer Süßholz-Pflanze im Arzneipflanzengarten der Division für Pharmakognosie, Department für Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Wien, aus der Ernte von 2003 zum Einsatz. Bei den Experimenten zur indirekten somatischen Embryogenese wurden zur Kallusinduktion zusätzlich noch Samen aus der Ernte von 2006 eingesetzt. Als Ausgangsmaterial für die Versuche zur Embryoinduktion diente das in den Versuchen zur indirekten Embryogenese mittels 2,4-D und TDZ gewonnene Kallusgewebe. Weiters wurde auch Kallusgewebe aus den Versuchen zur direkten Embryogenese auf seine Eignung zur Embryoinduktion getestet.

2.2. Oberflächensterilisation

Die Samen wurden zusammen mit Glasperlen in Gazesäckchen verpackt, wobei die Glasperlen der Beschwerung dienten, sodass alle Samen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Zur Sterilisation wurden die Samen zunächst für 10 Minuten mit 30 % Ethanol behandelt, anschließend erfolgte eine Behandlung mit 20 % Natriumhypochloritlösung für 35 Minuten unter Rühren. Danach wurde vier Mal mit autoklaviertem destilliertem Wasser gespült, wobei das erste Spülwasser sofort verworfen wurde und die 3 weiteren Spülvorgänge unter Rühren für jeweils 10 Minuten erfolgten.

2.3. Nährmedien

Als Basismedium wurde in allen Experimenten das von Murashige und Skoog (1962) entwickelte MS-Medium verwendet. Es kam durchgängig halbfestes Medium mit 3g/l Gelrite® als Gelbildner zum Einsatz.

Die Herstellung der Medien erfolgte durch Vorlegen von etwa der Hälfte der benötigten Menge an destilliertem Wasser und Zugabe der Makro-, Mikronährstoffe und Vitamine in Form von Stammlösungen. Anschließend wurden Saccharose und Myo-Inositol sowie je nach Medium der entsprechende

Wachsstoff, ebenfalls als Stammlösung, beigelegt. Dann wurde mit destilliertem Wasser auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Der Gelbildner Gelrite® wurde aliquot in 1000 ml SCHOTT-Flaschen vorgelegt und das Medium zu je 500 ml in die Glasflaschen aufgeteilt. Der pH-Wert wurde mittels KOH und HCl auf $5,7 \pm 0,1$ eingestellt, anschließend erfolgte die Sterilisation im Autoklaven für 25 Minuten bei 121 °C und 1 bar. Nach einer kurzen Abkühlungsphase, bei der das Medium in einem Trockenschrank auf etwa 60 °C temperiert wurde, erfolgte unter sterilen Bedingungen das Ausgießen in Kunststoffpetrischalen der Größe 100 x 15 mm (30 ml Medium) bzw. der Größe 60 x 15 mm (15 ml Medium).

Zur Induktion der direkten Embryogenese wurde Thidiazuron in den Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM und 10 µM hinzugefügt (s. Tab. 1, S. 6), als Kontrolle diente ein Medium ohne Wachstoffsatz.

Die Samenkeimung erfolgte auf Medium 29 (s. Tab. 2, S. 6), welches ebenfalls auf dem Medium von Murashige und Skoog (1962) basierte, jedoch die Makroelemente in halber Konzentration und nur 1 % Saccharose enthält.

Bei den Versuchen zur indirekten Embryogenese kam für die Kallusinduktion basierend auf der Vorgängerarbeit (Lämmermeyer, 2007) ein Medium mit 5 µM 2,4-D zum Einsatz (s. Tab. 2, S. 6).

In einer parallel angesetzten Versuchsreihe wurden wiederum Samen auf Medium 29 zur Keimung gebracht und die Kallusbildung mittels Thidiazuron - Zusatz induziert (s. Tab. 3, S. 7).

In einer Wiederholung der Versuchsreihen wurden Erhaltungsmedien mit geringerer Wachstoffsatzkonzentration eingeführt (s. Tab. 4, S. 7 und Tab. 5, S. 8), um besseres Kalluswachstum erzielen zu können.

Zur Embryoinduktion wurden halbfeste Medien mit den Wuchsstoffen Adeninsulfat (Ad), Benzylaminopurin (BAP), Kinetin (Kin) und Zeatin (Z) in unterschiedlichen Konzentrationen gewählt (s. Tab. 6, S. 8). Im zweiten Versuchsansatz wurden diese Nährmedien im Vergleich zum ersten Versuchsansatz leicht verändert (s. Tab. 7, S. 9). Das Medium Z 10 wurde verworfen und nicht erneut angesetzt, dafür sollten Medien mit Aminosäurezusatz bei normaler und reduzierter Stickstoffkonzentration getestet werden.

Tab. 1: Überblick über Medien zur direkten Embryogenese

Bezeichnung	Mikro- / Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	Thidiazuron - Zusatz
TDZ 0 µM	MS	3 %	0
TDZ 0,5 µM	MS	3 %	0,5 µM
TDZ 1 µM	MS	3 %	1 µM
TDZ 2 µM	MS	3 %	2 µM
TDZ 5 µM	MS	3 %	5 µM
TDZ 10 µM	MS	3 %	10 µM

Tab. 2: Überblick über Medien zur Kallusinduktion mittels 2,4-D, 1. Versuchsreihe

Bezeichnung	Mikro-/Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	2,4-D - Zusatz
29	MS, 1/2 Makronährstoffe	1 %	0
2,4-D 5 µM	MS	3 %	5 µM

Tab. 3: Überblick über Medien zur Kallusinduktion mittels TDZ, 1. Versuchsreihe

Bezeichnung	Mikro-/Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	Thidiazuron-Zusatz
29	MS, ½ Makronährstoffe	1 %	0
TDZ 0 µM	MS	3 %	0 µM
TDZ 1 µM	MS	3 %	1 µM
TDZ 2,5 µM	MS	3 %	2,5 µM
TDZ 5 µM	MS	3 %	5 µM
TDZ 10 µM	MS	3 %	10 µM
TDZ 20 µM	MS	3 %	20 µM

Tab. 4: Überblick über Medien zur Kallusinduktion mittels 2,4-D, 2. Versuchsreihe

Bezeichnung	Mikro- / Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	Zusätze
29	MS, 1/2 Makronährstoffe	1 %	-
2,4-D 5 µM	MS	3 %	5 µM 2,4 D
2,4-D 5/1 µM	MS	3 %	1 µM 2,4 D

Tab 5: Überblick über Medien zur Kallusinduktion mittels TDZ, 2. Versuchsreihe

Bezeichnung	Mikro-/Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	Thidiazuron-Zusatz
29	MS	1 %	0
TDZ 0 µM	MS	3 %	0
TDZ 1 µM	MS	3 %	1 µM
TDZ 2,5 µM	MS	3 %	2,5 µM
TDZ 2,5/1 µM	MS	3 %	2,5 µM, nach 12 Wochen: 1 µM
TDZ 5 µM	MS	3 %	5 µM
TDZ 5/1 µM	MS	3 %	5 µM,nach 12 Wochen: 1 µM
TDZ 10 µM	MS	3 %	10 µM
TDZ 10/1 µM	MS	3 %	10 µM,nach 12 Wochen: 1 µM
TDZ 20 µM	MS	3 %	20 µM
TDZ 20/1 µM	MS	3 %	20µM,nach 12 Wochen: 1 µM

Tab. 6: Überblick über Nährmedien zur Embryoinduktion, 1. Versuchsreihe

Bezeichnung	Mikro-/Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	Wuchsstoffzusatz
Ad 50	MS	3 %	Adeninsulfat 50 µM
BAP 5	MS	3 %	BAP 5 µM
Kin 5	MS	3 %	Kinetin 5 µM
Z 5	MS	3 %	Zeatin 5 µM
Z 10	MS	3 %	Zeatin 10 µM

Tab. 7: Überblick über Nährmedien zur Embryoinduktion, 2. Versuchsreihe

Bezeichnung	Mikro-/Makro-nährstoffe, Vitamine	Saccharose	Wuchsstoff- / Aminosäurezusatz
Ad 50	MS	3 %	Adeninsulfat 50 µM
BAP 5	MS	3 %	BAP 5 µM
Kin 5	MS	3 %	Kinetin 5 µM
Z 5	MS	3 %	Zeatin 5 µM
Gl 10	MS	3 %	Glutamin 10 mM
Gl 10-N	MS, kein NH ₄ NO ₃	3 %	Glutamin 10 mM

2.4. Versuchsansätze

2.4.1. Erste Versuchsreihe zur direkten Embryogenese

Es wurden 240 sterilisierte Samen (s. Kap 2.2., S. 4) zur Keimung angesetzt. Dazu wurden je 10 sterile Petrischalen (Größe 100 x 15 mm) mit 30 ml eines autoklavierten Mediums der TDZ-Konzentrationsreihe (s. Tab. 1, S. 6) versetzt. Jede Petrischale wurde mit 4 Samen beimpft und mit Parafilm umwickelt, um einen zu großen Flüssigkeitsverlust zu verhindern und das Infektionsrisiko zu senken. Die Hälfte der Petrischalen wurde unter Lichtausschluss gehalten (24 °C, 50 % relative Luftfeuchtigkeit), die andere Hälfte unter einer Photoperiode von 16 Stunden Licht (Sylvania GroLux, 50 µM·m⁻²·s⁻¹) und 8 Stunden Dunkelheit (25 °C, 50 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach erfolgter Keimung wurden die Keimlinge auf dem TDZ-Medium der jeweiligen Konzentration belassen und unter den gleichen Lichtbedingungen 8 Wochen weiterkultiviert. Die Kulturen im Dunkeln wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als „TDZ-Sämlinge dunkel“ bzw. „TDZ-S dunkel“ bezeichnet, während die Kulturen unter Lichteinfluss als „TDZ-Sämlinge hell“ bzw. „TDZ-S hell“ geführt wurden.

2.4.2. Zweite Versuchsreihe zur direkten Embryogenese

Die Durchführung der zweiten Versuchsreihe erfolgte weitgehend analog zum ersten Versuchsprotokoll (s. Kap. 2.4.1), es wurde zusätzlich ein Erhaltungsmedium mit 1 μ M TDZ eingeführt, wodurch ein gutes Kalluswachstum erzielt werden sollte. Es wurden wiederum je 4 Samen pro Petrischale sterilisiert und angesetzt. Die Medien wurden in den gleichen Konzentrationen wie beim ersten Ansatz hergestellt (s. Tab 1, S. 6) und 4 Petrischalen für jedes Medium präpariert. Davon wurde jeweils die Hälfte der Schalen im Licht bzw. im Dunkeln unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach einer Kulturdauer von 8 Wochen erfolgte die Auswertung nach optischen Kriterien. Das Kallusgewebe wurde nach 10 Wochen entnommen und auf dem Erhaltungsmedium TDZ 1 μ M unter identen Bedingungen weiterkultiviert. Die Passage erfolgte alle 4 Wochen und nach 16 Wochen war genug Kallusmaterial vorhanden, um die Embryoinduktion zu starten (s. Kap. 2.4.4.3., S. 13).

2.4.3. Erste Versuchsreihe zur indirekten Embryogenese

2.4.3.1. Erste Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels 2,4-D

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 362 Samen aus der Ernte 2003 und 42 Samen aus der Ernte 2006 sterilisiert (s. Kap. 2.2., S. 4) und zur Keimung ausgebracht. Es wurden jeweils 10 Samen in eine Petrischale (100 x 15 mm) mit 30 ml Medium 29 aufgebracht und leicht angedrückt. Danach wurden die Samen 7 Tage bei einer Lichtperiode von 16 h, einer Temperatur von 25 °C und einer relativen Luftfeuchte von 50 % belassen, da Explantate aus Lichtkeimung signifikant mehr Kallusmasse bilden als nach Dunkelkeimung. (Lämmermeyer, 2007). Nach der Keimung wurden die Kotyledonen der 7 Tage alten Keimlinge zur Explantatgewinnung verwendet, da sie in der Vorgängerarbeit (Lämmermeyer, 2007) die größte Zunahme an Kallusmasse zeigten, während Explantate von Hypocotyl und Wurzeln signifikant schlechtere Ergebnisse lieferten. Zur Präparation wurde zunächst längs neben der Mittelrippe innen und am äußeren Blattrand geschnitten und danach quer zur Mittelrippe in viereckige Stücke unterteilt. So erhielt man je nach Größe der Kotyledonen jeweils 2-3

Explantate von rechteckiger oder quadratischer Form. Jedes dieser Explantate hatte auf allen vier Seiten eine Schnittkante, auf der die Bildung von Wundgewebe induziert werden kann. Diese wurden in Petrischalen (60 x 15 mm) auf Medium 2,4-D aufgebracht, wobei die 4 - 6 Explantate eines Keimlings jeweils die Hälfte einer Petrischale einnahmen. Die Petrischalen wurden stets mit Parafilm verschlossen, um einem Feuchtigkeitsverlust und Kontamination vorzubeugen. Die Kallusinduktion erfolgte unter völligem Lichtausschluss, da der negative Einfluss von Licht auf die Kallusbildung bekannt ist (George, 1993), bei 25 °C und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit. Alle 5 Wochen wurden sie auf neues Medium überimpft und über 4 Subkulturen hinweg kultiviert, um genug Material zur Embryoinduktion zu erhalten. Insgesamt wurden 257 Kalluskulturen angelegt. Diese Kulturen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als „2,4-D – Kallus“ bezeichnet.

2.4.3.2. Erste Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels TDZ

Es wurden 180 Samen sterilisiert (s. Kap. 2.2., S. 4) und auf Medium 29 aufgebracht. Nach 7 Tagen wurden aus den Keimlingen Kotyledonenexplantate präpariert (s. Kap. 2.4.3.1, S 10) und Petrischalen damit beimpft. Für jedes der 6 Medien der TDZ-Konzentrationsreihe wurden 10 Petrischalen angelegt. Es wurde unter Lichtausschluss bei 25 °C und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle 5 Wochen auf neues Medium transferiert. Diese Kulturen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als „TDZ – Kallus“ bezeichnet.

2.4.3.3. Erste Versuchsreihe zur Embryoinduktion

Von jedem Kallusinduktions-Medium wurden 5 Klone mit gutem Kalluswachstum ausgewählt und davon jeweils 5 Petrischalen mit Embryoinduktions-Medium beimpft. Dazu brachten wir 3-5 erbsengroße Kallusstücke auf die entsprechenden Nährmedien auf (s. Tab. 6, S. 8). Die Petrischalen wurden wiederum mit Parafilm verschlossen, um Flüssigkeitsverlust und Kontamination vorzubeugen. Insgesamt wurden so 25 Petrischalen pro Medium angesetzt. Alle 4 Wochen wurden die Explantate auf frisches Nährmedium passagiert, die Kultur erfolgte unter Lichtausschluss bei 25 °C und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.4.4. Zweite Versuchsreihe zur indirekten Embryogenese

2.4.4.1. Zweite Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels 2,4-D

Generell wurde der zweite Versuchsansatz im Vergleich zur ersten Versuchsreihe (s. Kap. 2.4.3.1, S. 10) modifiziert. Die Veränderungen betrafen die Einführung von Erhaltungsmedien nach einer 12wöchigen Induktionsphase, in welchen die Konzentration der Wachstumsstoffe (2,4-D bzw. TDZ) gesenkt war. Weiters wurden die Passagezeiten von 5 Wochen auf 4 Wochen verkürzt.

Die Samen wurden einer Oberflächensterilisation (s. Kap. 2.2, S. 4) unterzogen und zu 10 Stück je Petrischale auf Medium 29 ausgebracht. Die Kulturbedingungen entsprachen denen der 1. Versuchsreihe (s. Kap. 2.4.3.1, S. 10). Von den 7 Tage alten Keimlingen wurden 12 Keimlinge ausgewählt und Kotyledonenschnittpräparate hergestellt. Die Explantate wurden auf das Medium 2,4-D 5 μ M aufgebracht und unter den identen Bedingungen wie im ersten Versuchsansatz (s. Kap. 2.4.3.1., S. 10) kultiviert.

Die Petrischalen (100 x 15 mm) wurden in 2 Bereiche geteilt, so dass man 6 Petrischalen mit den Explantaten von jeweils 2 Klonen erhielt. Nach 4 Wochen erfolgte der Transfer in kleinere Petrischalen (60 x 15 mm) auf frisches Nährmedium. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Klone separiert und nur das neu gewachsene Kallusgewebe wurde subkultiviert: Das Kotyledonengewebe der ursprünglichen Explantate wurde abgetrennt und verworfen. Alle 4 Wochen wurde in der Folge auf neues Medium passagiert, und 12 Wochen nach Herstellung der Kotyledonenexplantate erfolgte eine Reduzierung des Wachstoffsgehaltes von 5 μ M 2,4-D auf 1 μ M 2,4-D.

Nach 4 weiteren Wochen stand genug Material zur Verfügung, um Versuche zur Embryoinduktion starten zu können. Im weiteren Kulturverlauf fand alle 4 Wochen ein Transfer auf neues Erhaltungsmedium 2,4-D 5/1 μ M statt.

2.4.4.2. Zweite Versuchsreihe zur Kallusinduktion mittels TDZ

Dieser Ansatz erfolgte analog dem ersten Versuch (s. Kap. 2.4.3.2., S. 11), jedoch mit den in Kap. 2.4.4.1. angegebenen Modifikationen. Es wurden die Samen nach dem Standardprotokoll (s. Kap. 2.2., S. 4) sterilisiert und zur Keimung ausgebracht. Nach 7 Tagen wurden aus den Keimlingen Kotyledonenexplantate präpariert. Für jedes Medium (s. Tab. 7, S. 9) wurden 5 Petrischalen mit je 2 Klonen angesetzt und alle 4 Wochen auf neues Medium transferiert. Bei der dritten Passage wurde die Hälfte der Kulturen auf Erhaltungsmedium mit 1 μM TDZ gesetzt und die andere Hälfte auf dem Medium mit der ursprünglichen TDZ-Konzentration weiterkultiviert. Nach zusätzlichen 4 Wochen wurde Material zur Embryoinduktion entnommen und die verbleibenden Kulturen alle 4 Wochen passagiert.

2.4.4.3. Zweite Versuchsreihe zur Embryoinduktion

Der zweite Versuch zur Embryobildung zeichnete sich durch kürzere Passagezeiten und dementsprechend ein Ausgangsmaterial jüngeren Alters aus. Dadurch sollte eine bessere Vitalität und höhere embryogene Kompetenz erreicht werden.

Zunächst wurden 5 vitale, gut wachsende Kalluslinien aus jedem der angesetzten Kallusmedien ausgewählt. Das Kallusgewebe wurde in erbsengroße Stücke unterteilt und jeweils 5 Stücke in einer Petrischale (60 x 15 mm) aufgebracht. 4 Petrischalen wurden für jeden Klon angesetzt und 5 Klone für jedes der 6 Medien (s. Tab. 7, S. 9) präpariert. Dadurch sollte für jedes der ursprünglichen Kallusmedien ein Umfang von 20 Petrischalen pro Embryoinduktions-Medium zur Verfügung stehen.

Allerdings war aufgrund gehäuft auftretender Infektionen nicht genügend Material verfügbar, so dass ein Ansatz von Kallusgewebe der Medien TDZ 10 μM bzw. TDZ 10/1 μM nicht möglich war. Aus Zeitmangel war eine Wiederholung der Kallusinduktion nicht machbar, daher stand auch von den Medien TDZ 5 μM , TDZ 5/1 μM , TDZ 20 μM , TDZ 20/1 μM und 2,4 D 5/1 μM

nicht genügend Kallus zur Verfügung, um die Versuchsreihe zur Embryoinduktion in vollem Umfang ansetzen zu können. Dieser Umstand wurde auch bei der Kulturauswertung berücksichtigt.

Die Kultur erfolgte unter Lichtausschluss bei 25 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit. Alle 4 Wochen wurde auf neues Medium transferiert und nach 2 Passagen mit der Auswertung begonnen.

2.4.5. Dritte Versuchsreihe zur Embryoinduktion

Das in den zweiten Versuchen zur direkten Embryogenese (Kap. 2.4.2., S. 10) gewonnene Kallusgewebe „TDZ–S hell“ bzw. „TDZ-S dunkel“ wurde wie in Kap. 2.4.4.3. (S. 15) angegeben auf die sechs verschiedenen Stufe 2-Medien (s. Tab. 7, S. 9) aufgebracht und weiterhin die entsprechenden Kulturbedingungen beibehalten, wie in Kap. 2.4.2. (S. 10) beschrieben. Da durch einen technischen Defekt ein erheblicher Teil des Materials verloren ging, konnten nicht alle Kombinationen aus Kallus- und Embryoinduktionsmedium getestet werden: So war es nicht möglich, Kulturen zur Embryoinduktion aus Kallus von Medium TDZ 10/1 µM aus der Dunkelkultur anzusetzen. Diesem Umstand muss in der Interpretation der Ergebnisse Rechnung getragen werden.

2.5. Versuchsauswertung

Die Keimrate der Samen wurde nach 7 Tagen bestimmt. Dazu wurde der Quotient aus der Anzahl der gekeimten Samen und der Gesamtzahl der angesetzten Samen ermittelt und mit 100 multipliziert. Weiters wurde alle 7 Tage optisch auf die Existenz von embryoiden Strukturen geprüft und fotografiert.

Die Versuchsauswertung zur Kallusbildung erfolgte nach optischen Kriterien, wozu die Kulturen alle 7 Tage mit freiem Auge und Stereolupe begutachtet, dokumentiert und fotografiert wurden.

Während der Embryoinduktion erfolgte die Auswertung alle 7 Tage optisch mit freiem Auge und mittels Stereolupe. Das Auftreten embryoider Strukturen und Regenerate (z.B. Sprosse) bzw. Vitalität, Aussehen und Beschaffenheit des Kallus wurden kontrolliert und fotografiert. Die Einteilung des Kalluswachstum erfolgte in Gruppen (- = kein Wachstum, + = wenig Wachstum, ++ = mittleres Wachstum, +++ = starkes Wachstum; s. Abb. 1, S. 16).

Aufgrund des starken Kalluswachstums in manchen Kulturen war eine Trennung der ursprünglich eingesetzten Explantate oft nicht mehr möglich. Dieser Umstand war bei der Auswertung zu berücksichtigen. Daher wurde auf eine Auswertung pro Explantat verzichtet und die ganze Petrischale ausgewertet. Wir dokumentierten neben dem Wachstum und allgemeinen Eigenschaften wie Farbe, Oberflächenstruktur und Konsistenz auch das Auftreten von dunklen Knötchen im Gewebe des Kallus. Zusätzlich zum Auftreten embryoider Strukturen achteten wir auf das Auftreten von Regeneraten jeglicher Art sowie von sekundären Embryoiden bzw. Keimlingen. Die Auswertung der embryoiden Strukturen erfolgte analog dem Schema der Kallusauswertung: Sie wurden nach Häufigkeit des Auftretens pro Petrischale in Gruppen (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = starke Embryoidbildung) unterteilt.

Bei der statistischen Auswertung fiel eine Prüfung auf Normalverteilung negativ aus. Folglich konnte eine ANOVA oder Prüfung auf Signifikanzen mittels Duncan Test nicht durchgeführt werden. Alternativ wurde bei allen Versuchen der prozentuelle Anteil mittels Excel berechnet.

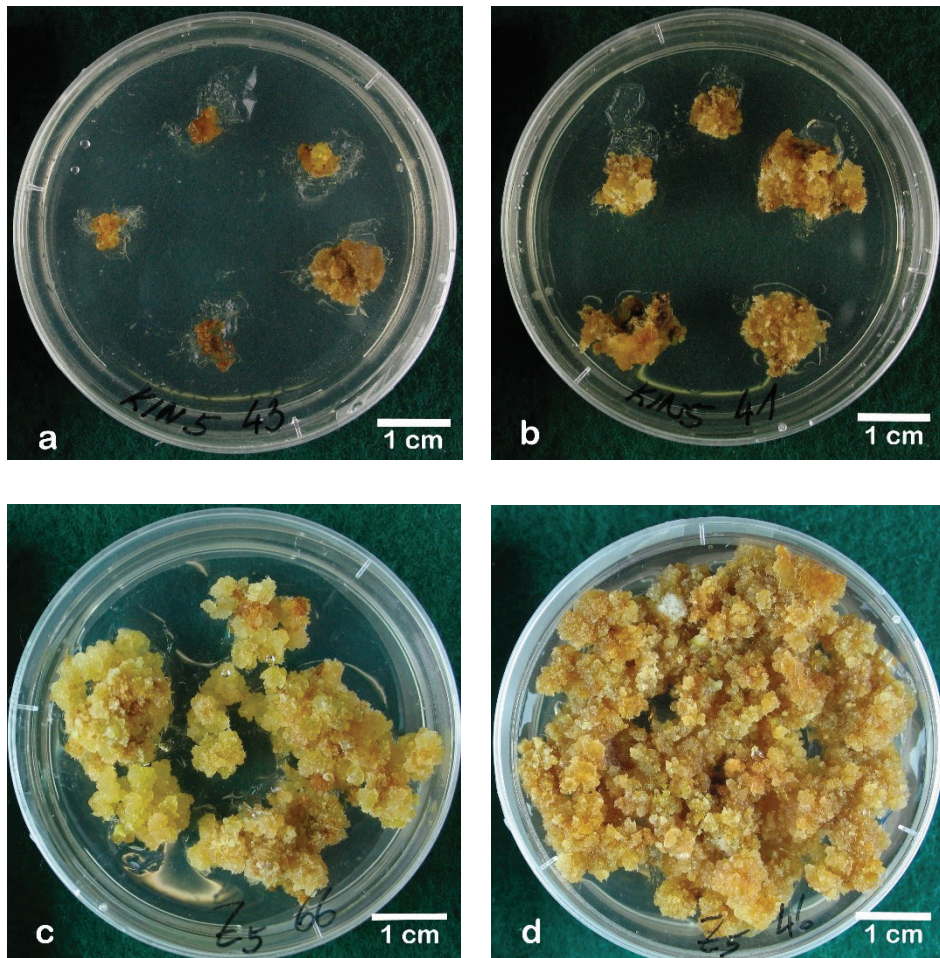


Abb. 1: Kalluswachstum nach Stärke unterteilt; a) - = kein Wachstum, b) + = wenig Wachstum, c) ++ = mittleres Wachstum, d) +++ = starkes Wachstum

3. Ergebnisse

3.1. Direkte somatische Embryogenese

3.1.1. Erster Versuch zur direkten Embryogenese

Die Samen wurden auf den Medien der TDZ-Konzentrationsreihe (s. Tab. 1, S. 6) zur Keimung ausgebracht und dort belassen. Die Keimrate betrug nach 7 Tagen 81,2 %. Es wurde 8 Wochen lang alle 7 Tage auf das Auftreten von embryoiden Strukturen geprüft. Die Hälfte der Kulturen wurde unter Lichtausschluss und die andere bei einer 16/8 h-Photoperiode kultiviert (s. Kap. 2.4.1., S. 9).

Es konnte zu keiner Zeit und in keiner der Kulturen eine direkte somatische Embryogenese beobachtet werden. Allerdings trat ab der zweiten Woche Kallusgewebe an Kotyledonen, Hypocotyl und Wurzeln der Keimlinge auf.

3.1.2. Zweiter Versuch zur direkten Embryogenese

Der Versuch wurde ein zweites Mal mit leicht modifiziertem Ansatz wiederholt, um das Ergebnis des ersten Versuchs zu bestätigen. Im Falle einer neuerlichen Kallusbildung sollte das Gewebe gewonnen und weitervermehrt werden, um damit Versuche zur Embryoinduktion durchzuführen. Dafür wurde ein Erhaltungsmedium (TDZ 1 μM) eingesetzt, um eine langfristige Kultur des Gewebes bei gleichzeitiger Vermehrung zu ermöglichen.

Die Morphologie der Sämlinge wies in beiden Versuchsreihen dieselben Anomalien auf. Auf den Medien ohne Wuchsstoff und unter Lichteinwirkung waren die Keimlinge normal entwickelt und zeigten keine besonderen Merkmale. (s. Abb. 2: a, b, S. 19). Die Keimlinge auf den TDZ-Medien zeigten starke Deformationen. Sie waren verdickt und von zwergenhaftem Wuchs. Die Sprosse waren gestaucht und die Blätter sehr klein und wenig entwickelt. Die Wurzelbildung war deutlich reduziert. Das Ausmaß der Deformationen stieg mit der Konzentration des Wuchsstoffes an, und im weiteren Kulturverlauf zeigten

die Keimlinge auf den Medien mit höherer TDZ-Konzentration Braunfärbung (s. Abb. 2: c - f, S. 19).

Die Keimlinge, die auf einem Medium ohne Wuchsstoff unter Lichtausschluss keimten, zeigten vor allem ein deutliches Streckungswachstum und fehlende Chlorophyllbildung (s. Abb. 3: a, b, S. 20) Die Kotyledonen blieben klein, und sofern sich Sprosse entwickelten, waren sie gestaucht und deformiert. Auf den Medien mit Wuchsstoff zeigten sie dieselben Anomalien wie unter Lichteinwirkung. (siehe Abb. 3: c - f, S. 20).

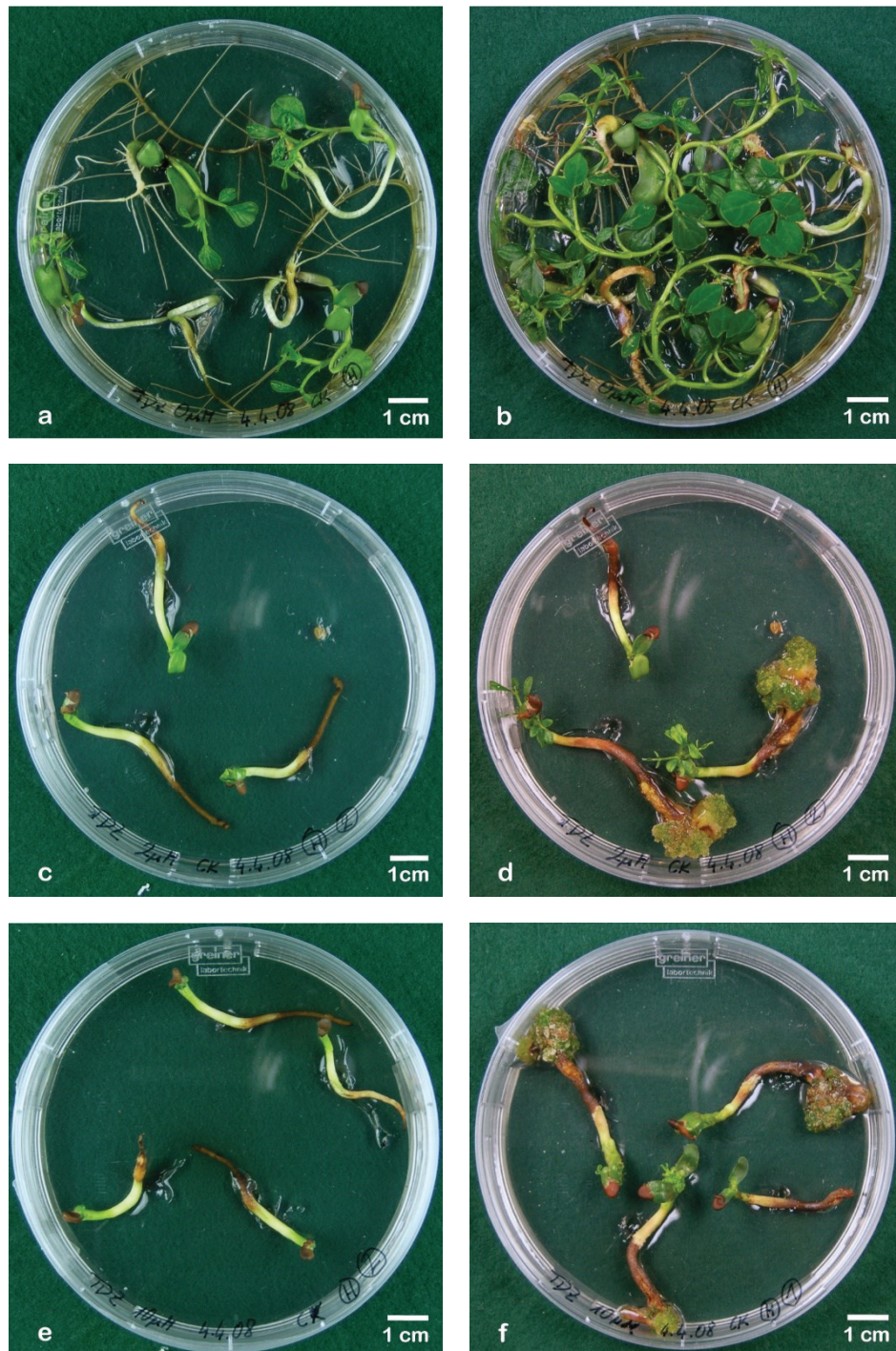


Abb.: 2: Sämlinge auf TDZ-hältigem Medien unter Lichtkultur: a) ohne Wuchsstoffe, Alter der Kultur 3 Wochen, b) ohne Wuchsstoffe, Alter der Kultur 8 Wochen, c) TDZ 2 μ M, Alter der Kultur 3 Wochen, d) TDZ 2 μ M, Alter der Kultur 8 Wochen, e) TDZ 10 μ M, Alter der Kultur 3 Wochen, f) TDZ 10 μ M, Alter der Kultur 8 Wochen

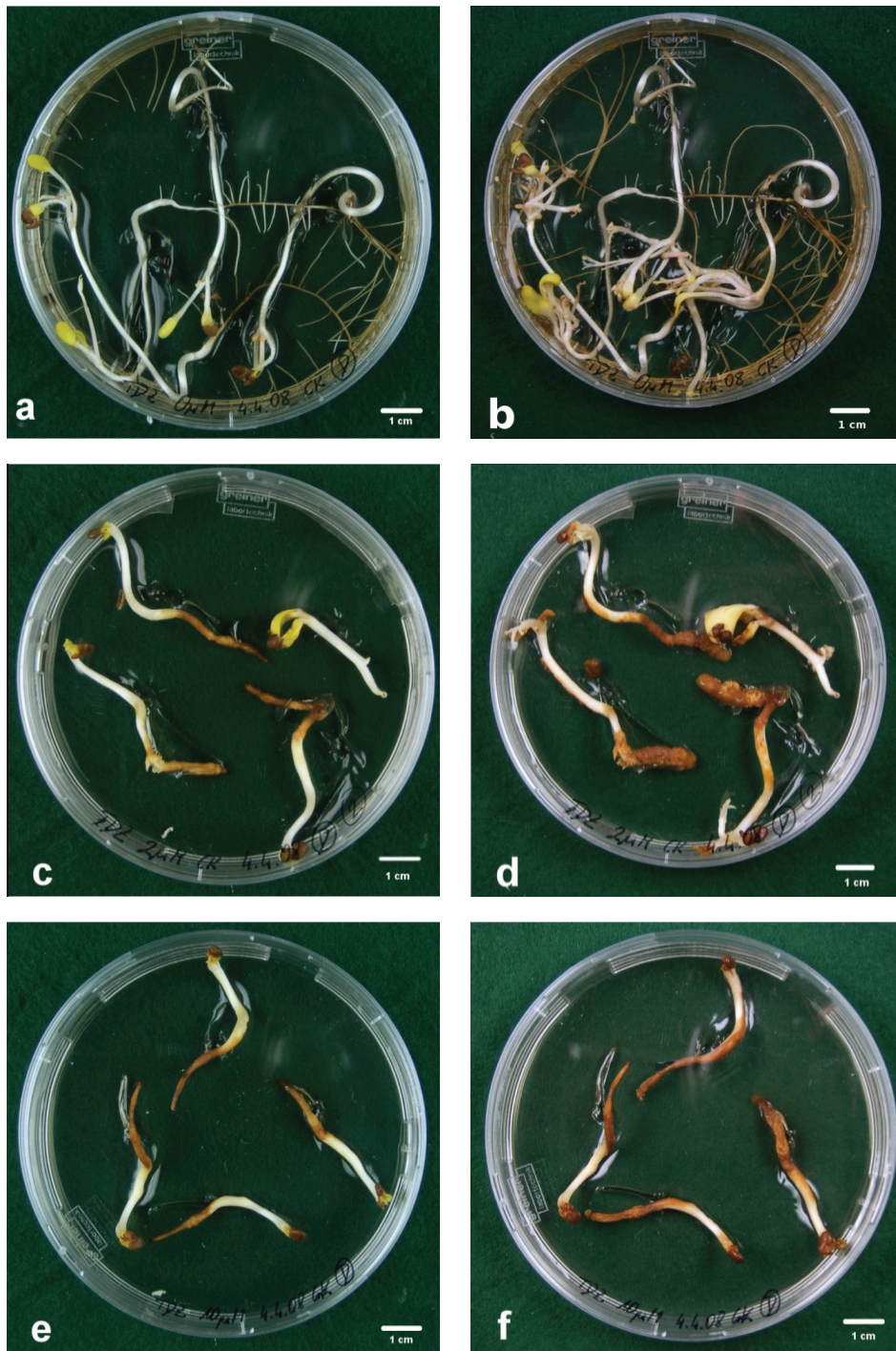
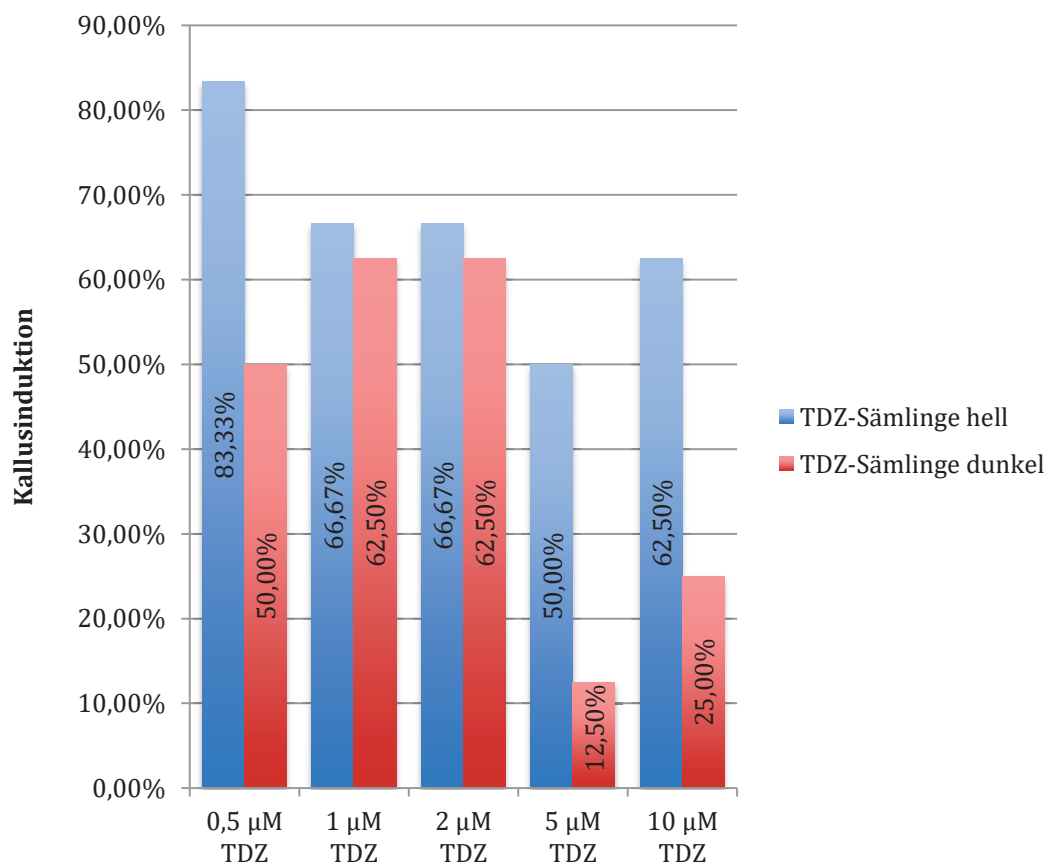


Abb.: 3: Sämlinge auf TDZ-hältigem Medien unter Lichtausschluss: a) ohne Wuchsstoffe, Alter 3 Wochen, b) ohne Wuchsstoffe, Alter 8 Wochen, c) TDZ 2 μ M, Alter 3 Wochen, d) TDZ 2 μ M, Alter 8 Wochen, e) TDZ 10 μ M, Alter 3 Wochen, f) TDZ 10 μ M, Alter 8 Wochen

Kallusinduktion

Es konnte keine direkte Embryogenese beobachtet werden, jedoch fand auf allen Medien Kallusbildung statt. Die Kallusinduktionsrate war zwischen den einzelnen Medien, den Kulturen im Dunkeln und auch unter Licht sehr unterschiedlich und folgte keinem eindeutigen Trend. Während bei den Lichtkulturen die Medien mit den niedrigen Wachstoffsstoffkonzentrationen gute Ergebnisse brachten und die Kallusbildung mit dem Anstieg der TDZ-Konzentration fiel, waren bei den Kulturen unter Lichtausschluss gerade die mittleren Wachstoffsstoffkonzentrationen besonders förderlich (s. Diagr. 1). Insgesamt konnte unter Licht eine Kallusinduktionsrate von 53 % erzielt werden, wohingegen unter Lichtausschluss nur 47 % erreicht werden konnten.



Diagr. 1: Kallusinduktion bei auf TDZ-Medien gekeimten Sämlingen nach 10 Wochen (Kulturen unter Lichteinfluss und Lichtausschluss)

Das entstandene Kallusgewebe wurde 10 Wochen nach dem Samenansatz vom Muttergewebe abgetrennt. Alle Kallusexplantate wurden auf einem einheitlichen Medium mit 1 μ M TDZ weiter kultiviert, da die Sämlinge bei der ersten Versuchsreihe bei höherer TDZ-Konzentration Braunfärbung zeigten. Bei der endgültigen Versuchsauswertung 42 Wochen nach dem Samenansatz zeigten alle Kalluskulturen ein gutes Wachstum. Lediglich älteres Gewebe färbte sich braun. Daraus kann geschlossen werden, dass das Erhaltungsmedium mit 1 μ M TDZ für eine längere Kultivierung geeignet ist.

In Bezug auf das Wachstum des Kallusgewebes konnte kein Unterschied zwischen den Kulturen im Dunkeln und den Kulturen im Licht festgestellt werden. Es gab hingegen deutliche Unterschiede, was die Morphologie der Kalli betraf. Bei Kultivierung im Dunklen war der Kallus von lockerer Konsistenz und zerfiel beim Überimpfen leicht in viele kleine Aggregate. Diese waren ocker bis bräunlich gefärbt und hatten eine weißliche Oberfläche. Bei der Auswertung aller Kulturen konnte nur ein einziges Regenerat gefunden werden, wobei es sich um ein Blattregenerat handelte, welches sich in einer Kultur von auf Medium TDZ 5 μ M induziertem Kallus entwickelte. Hingegen bildeten Kalli, die unter Lichteinfluss kultiviert wurden, fast durchgehend Regenerate (87,5 % der Kulturen). Es handelte sich allerdings auch hier nicht um embryoide Strukturen. Das Kallusgewebe war fest und zeigte keine Tendenz zu zerfallen. Das jüngere Gewebe färbte sich grün bis ocker, und mit zunehmendem Alter zeigte sich starke Braunfärbung. Allerdings brachten auch diese nekrotisch aussehenden Gewebestücke noch Regenerate hervor (s. Abb. 4, S. 23).

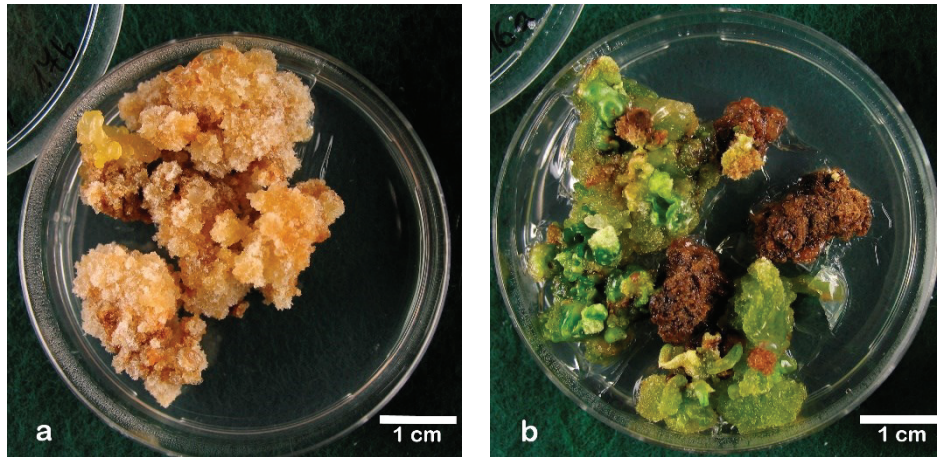


Abb. 4: a) Regenerat auf Kalluskultur (auf TDZ 1 μ M, ohne Licht kultiviert, 42 Wochen nach Start des Experiments), b) Kallusgewebe mit mehreren Regeneraten (auf TDZ 1 μ M, unter Lichteinfluss kultiviert, 42 Wochen nach Start des Experiments)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in diesem Experiment zwar keine direkte Embryogenese induziert werden konnte, Thidiazuron aber zur Kallusinduktion sehr gut geeignet ist. Es konnte bei jeder der verwendeten Wuchsstoffkonzentrationen Kalluswachstum an den Keimlingen induziert werden. Das weitere Kalluswachstum war auf dem Erhaltungsmedium mit 1 μ M TDZ gut und die Vitalität des Gewebes blieb über einen längeren Zeitraum erhalten. Ein Einfluss von Licht auf das Kalluswachstum konnte nicht nachgewiesen werden. 16 Wochen nach Abtrennen des Kallus vom Muttergewebe wurde ein Teil davon auf Embryoinduktionsmedien überimpft.

3.2. Indirekte Embryogenese

3.2.1. Ergebnisse zur Kallusinduktion

Die Induktion des Kallusgewebes erfolgte basierend auf den Ergebnissen von Lämmermeyer (2007) an Kotyledonenexplantaten von 7 Tagen alten Keimlingen (s. Abb.: 5; S 25). Da der Focus der vorliegenden Arbeit auf der 2. Stufe der Embryogenese, der Embryoinduktion, lag, wurde hier nur eine optische Beurteilung der entstandenen Kalli vorgenommen.

3.2.1.1. Ergebnisse zur ersten Versuchsreihe mittels 2,4-D

Lämmermeyer (2007) hatte in ihrer Arbeit bereits Versuche zu Kallusinduktion und -Wachstum mittels 5 μM 2,4-D durchgeführt, daher verzichteten wir hier auf eine genauere Auswertung.

Es war jedoch auffällig, dass das Wachstum des Kallusgewebes langsam verlief. Der ockerfarbene Kallus war meist von lockerer, nodularer Struktur. Seltener zeigte er eine eher weiche, matschige Struktur mit glatter Oberfläche und intensiverer Ockerfärbung.

3.2.1.2. Ergebnisse zur ersten Versuchsreihe mittels TDZ

Diese Versuchsreihe diente dazu, die aufgrund der Versuche zur direkten Embryogenese vermutete Eignung von TDZ zur Kallusinduktion zu bestätigen. Daher wurden ebenfalls Kotyledonenschnittexplantate auf Medien mit verschiedenen TDZ-Konzentrationen von 1 – 20 μM inkubiert (s. Tab. 3, S. 7). Zur Kontrolle wurde ein Ansatz auf MS-Medium ohne Wuchsstoff angelegt. Diese Explantate bildeten kein Kallusgewebe aus, wurden mit fortschreitender Kulturdauer braun und starben schließlich ab.

Die Explantate auf den Medien mit TDZ-Zusatz nahmen an Größe zu und bereits nach 2 Wochen zeigte sich Kallusgewebe an den Schnittflächen (s. Abb. 5, S. 25). Ähnliche Beobachtungen machten Rey et al. (2000) bei *Arachis pintoi*. Es konnte mit allen TDZ-Konzentrationen Kallusbildung erzielt werden. Als besonders geeignet erwies sich 1 μM TDZ, da hier alle Explantate Kallusgewebe ausbildeten, das gute Wachstumstendenzen zeigte. Auch Gewebe, das sich auf Medium TDZ 2,5 μM entwickelte, wirkte sehr vital und zeichnete sich durch eine gute Vermehrung aus. Ab einer Konzentration von 5 μM TDZ kam es vermehrt zur Braunfärbung und darauffolgendem Absterben von einigen Kotyledonenexplantaten, ohne dass Kallusbildung auftrat. Auch schien der Kallus auf den Medien TDZ 10 μM und TDZ 20 μM deutliche Tendenz zur Braunfärbung zu haben. Es konnte zwar eine Zunahme an Kallusgewebe bei diesen Medien verzeichnet werden, jedoch blieb sie hinter den Medien mit niedriger TDZ-Konzentration zurück, so dass die Medien TDZ 1 μM und TDZ 2,5 μM zur Kallusinduktion besser geeignet schienen.

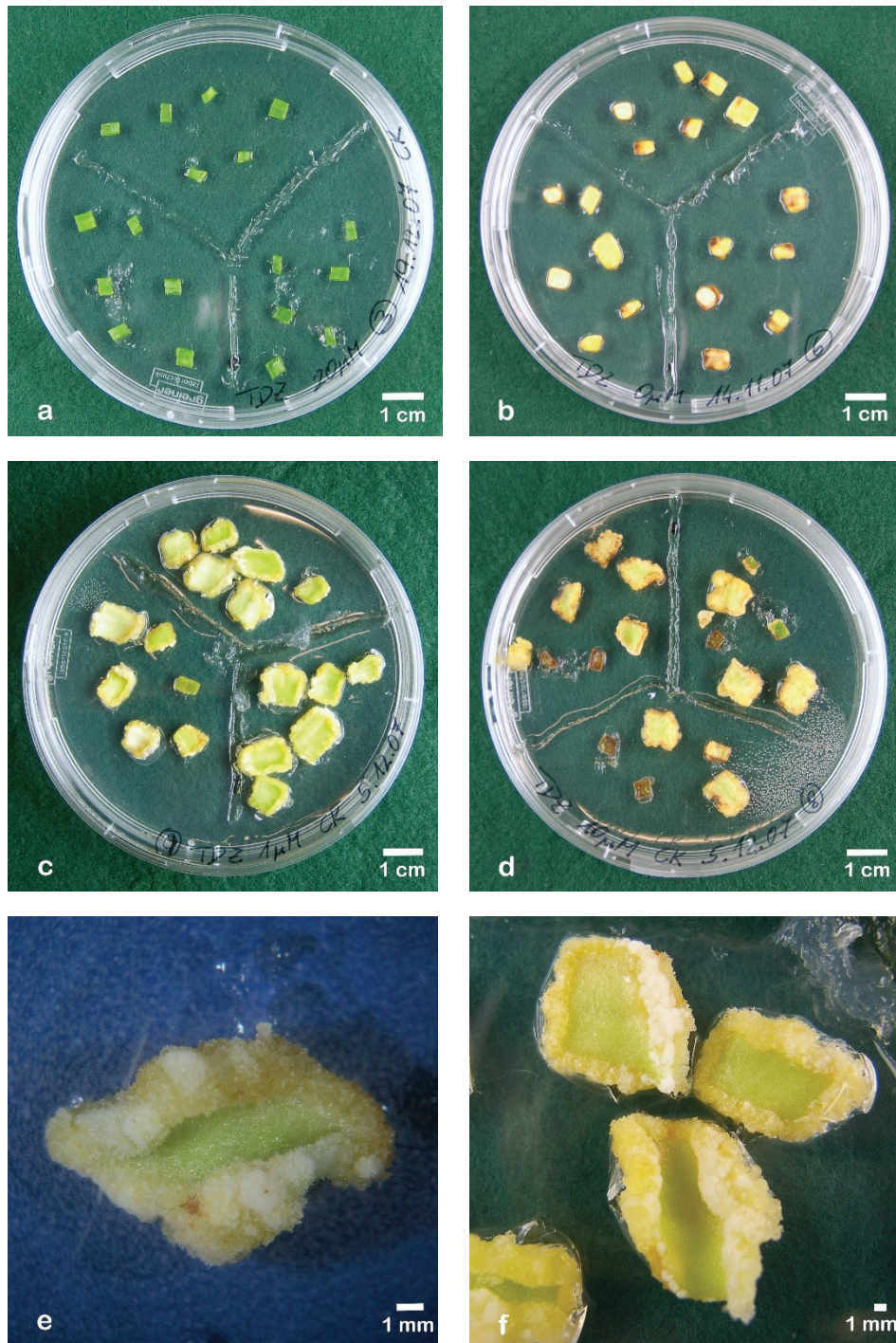


Abb. 5: Kotyledonenschnittexplantate auf TDZ-Medien, a) Explantate auf TDZ 20 μ M am Tag 0, b) Explantate auf MS ohne Wuchsstoff, Kulturdauer 3 Wochen, c) Explantate auf TDZ 1 μ M, Kulturdauer 3 Wochen, d) Explantate auf TDZ 10 μ M Alter 3 Wochen, e) Explantat in Großaufnahme, f) Explantat in Großaufnahme, Kulturdauer 4 Wochen

3.2.1.3. Ergebnisse zur zweiten Versuchsreihe mittels 2,4-D

Die erste Versuchsreihe zur Kallusinduktion zeigte vor allem langsames Kalluswachstum, daher wurden in der zweiten Versuchsreihe (s. Kap. 2.4.4.1., S. 12) die Passagezeiten verkürzt und ein Teil der Kulturen nach 12 Wochen auf ein Erhaltungsmedium mit 1 μM 2,4-D überimpft. Das Kalluswachstum konnte dadurch nur geringfügig gefördert werden, auch in Aussehen und Konsistenz glichen die Kalli den Kulturen der ersten Versuchsreihe.

3.2.1.4. Ergebnisse zur zweiten Versuchsreihe mittels TDZ

Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe (Kap. 2.4.4.2, S. 13) bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse aus dem ersten Versuchsansatz (s. Kap. 2.4.3.2., S. 11). Auf den Medien mit niedriger TDZ-Konzentration liessen sich gute Kallusinduktion und Kallusausbeuten erzielen (s. Abb. 6, S. 27). TDZ-Konzentrationen von 5 μM und höher führten zunehmend zu Verfärbung der Explantate und geringerem Kalluswachstum (s. Abb. 7, S. 28). Die Reduktion des Wuchsstoffes auf 1 μM nach 12 Wochen bei der Hälfte der Kulturen wirkte sich vor allem dann positiv auf Vermehrung und Vitalität aus, wenn zur Kallusinduktion höhere TDZ-Konzentrationen eingesetzt worden waren.

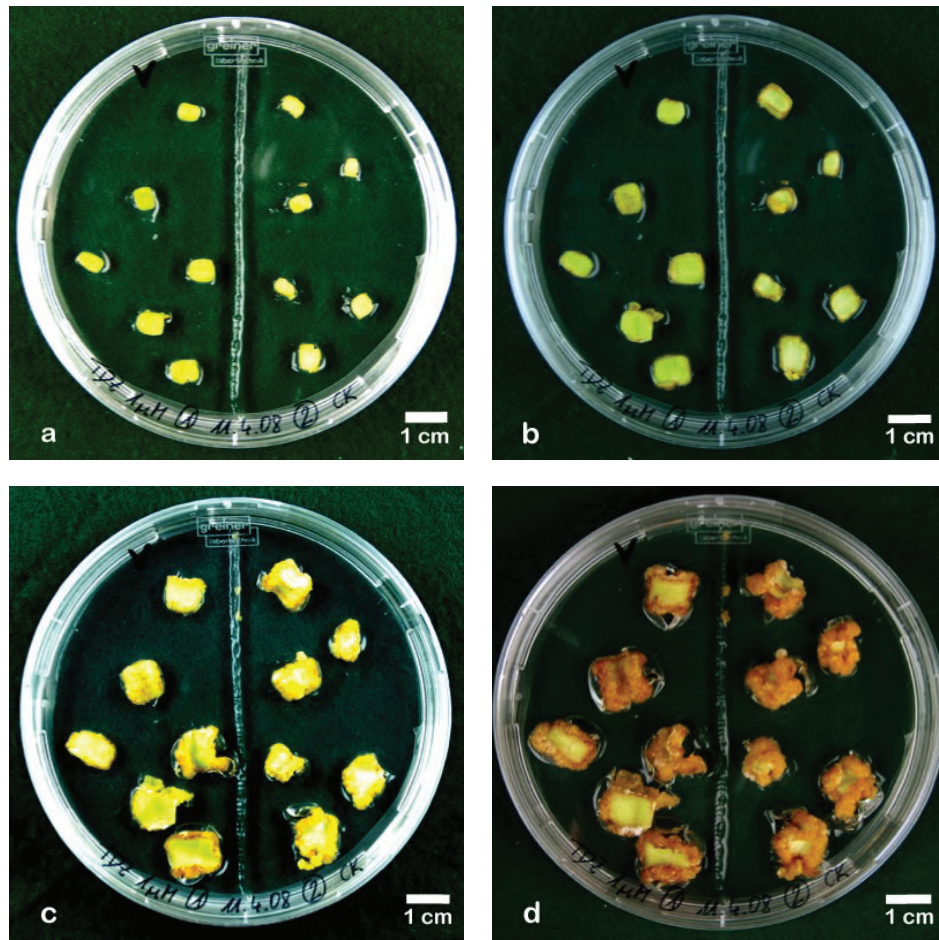


Abb. 6: Kotyledonenexplantate auf Medium TDZ 1, a) Kulturdauer 1 Woche, b) Kulturdauer 2 Wochen, c) Kulturdauer 3 Wochen, d) Kulturdauer 4 Wochen

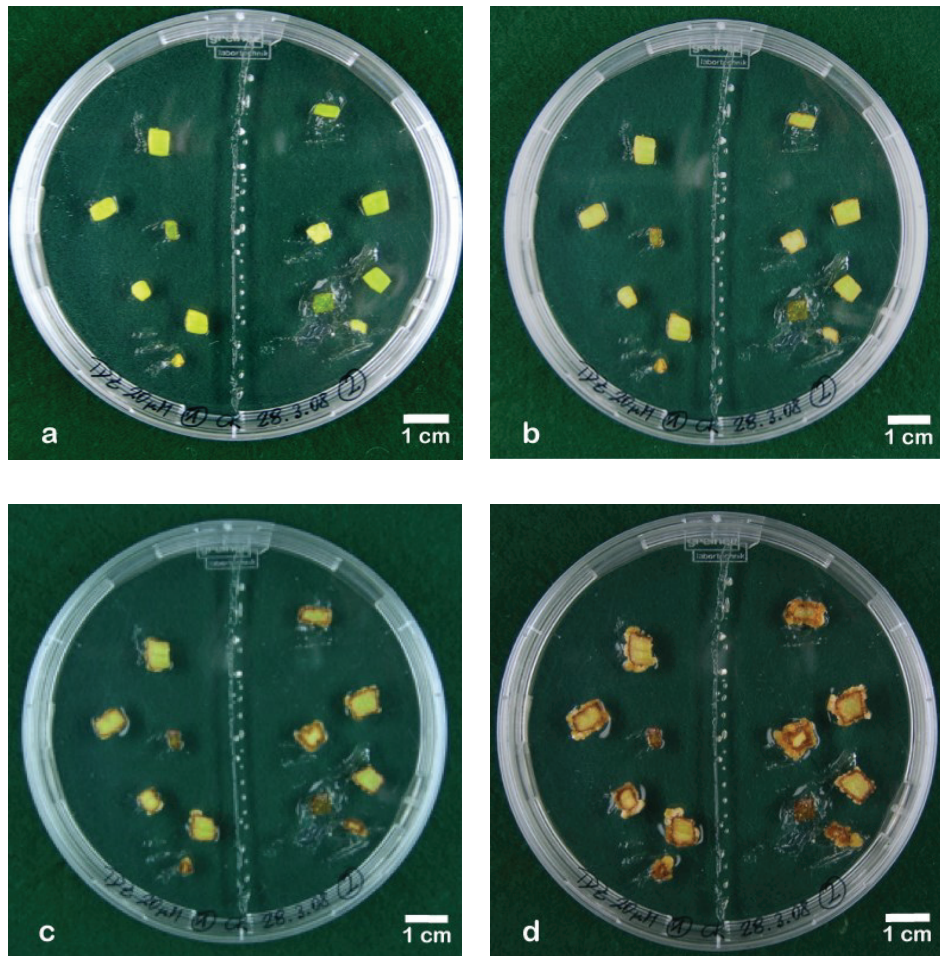


Abb. 7: Kotyledonenexplantate auf Medium TDZ 20, a) Kulturdauer 1 Woche, b) Kulturdauer 2 Wochen, c) Kulturdauer 3 Wochen, d) Kulturdauer 4 Wochen

3.2.2. Ergebnisse zur Embryoinduktion

Das Kallusmaterial, das für die Embryoinduktion zum Einsatz kam, wurde über 3 verschiedene Experimentreihen gewonnen. Zum einen wurden Samen direkt auf TDZ-hältigen Medien gekeimt und weiterkultiviert (s. Kap. 2.4.2., S. 10) und so Kallusbildung erzielt. Andererseits wurde Kallusmaterial über die Herstellung von Kotyledonenschnitten von 7 Tage alten Keimlingen gewonnen: Hier fanden Versuche mit 2,4-D- und TDZ-Konzentrationsreihen statt (s. Kap. 2.4.3, S. 10; Kap. 2.4.4, S. 12).

Aus dem gewonnenen Kallusgewebe wurden erbsengroße Explantate präpariert und auf den Medien zur Embryoinduktion aufgebracht. Die Auswertung erfolgte nach 16 Wochen.

Die Ergebnisse der ersten Versuche zur Embryoinduktion mittels Kallusgewebe von Kotyledonenschnitten auf TDZ- bzw. 2,4-D-hältigen Medien fielen in Bezug auf die Embryoinduktion negativ aus. Es war zwar ein Kalluswachstum vorhanden, jedoch konnten nur sehr wenige embryoiden Strukturen oder andere Arten von Regeneraten beobachtet werden (s. Abb. 8, S. 30). Daher musste davon ausgegangen werden, dass das Kallusgewebe nur noch sehr wenig embryogene Kompetenz besaß. Möglicherweise spielte hier die Kulturdauer des Kallusgewebes eine Rolle, da die Fähigkeit, embryoiden Strukturen zu bilden, mit der fortlaufenden Kulturdauer des Gewebes verloren gehen kann (George, 1993).

Alle Experimente wurden mit modifiziertem Versuchsaufbau ein zweites Mal durchgeführt. Als Konsequenz aus den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe wurde die Passagedauer auf 4 Wochen verkürzt und ein Erhaltungsmedium zur Kallusvermehrung mit einer Wachstoffsstoffkonzentration von 1 µM 2,4-D bzw. 1 µM TDZ eingeführt.

Nach 16 Wochen konnten die Versuche zur Embryoinduktion erneut angesetzt werden (s. Kap. 2.4.4.3., S. 13). Nachfolgend werden nun die Ergebnisse dieser 2. Versuchsreihe besprochen.

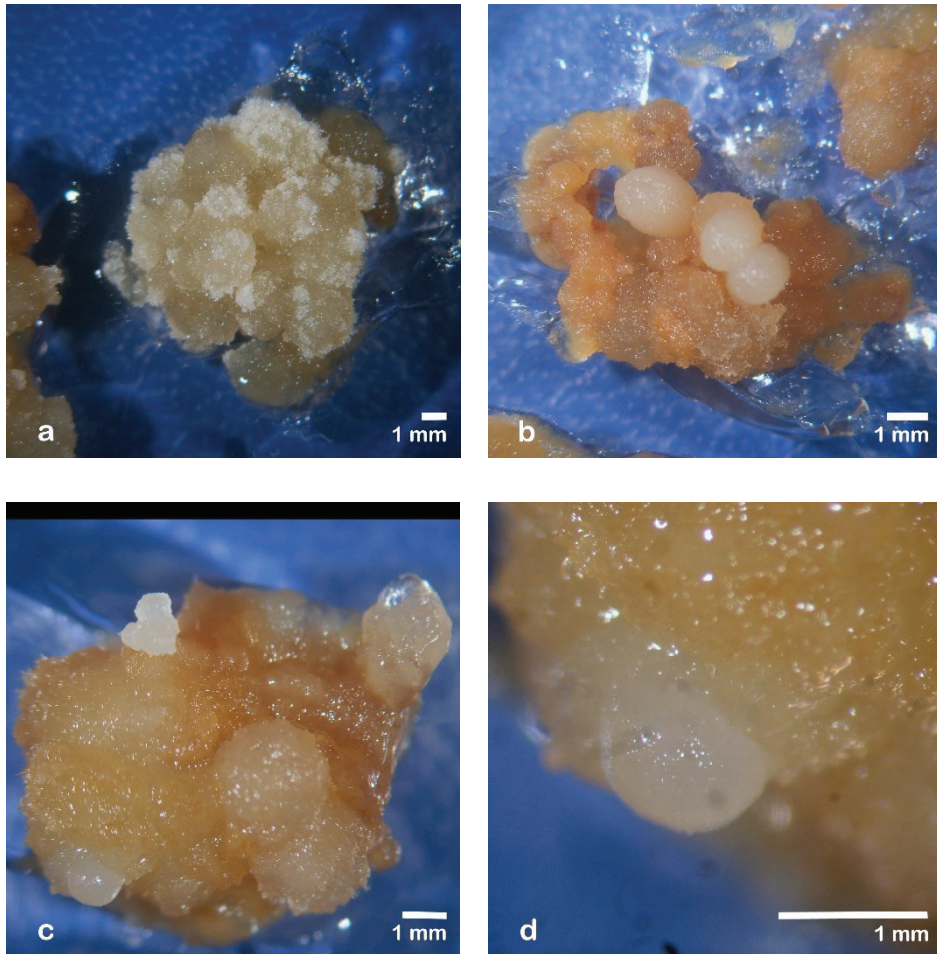
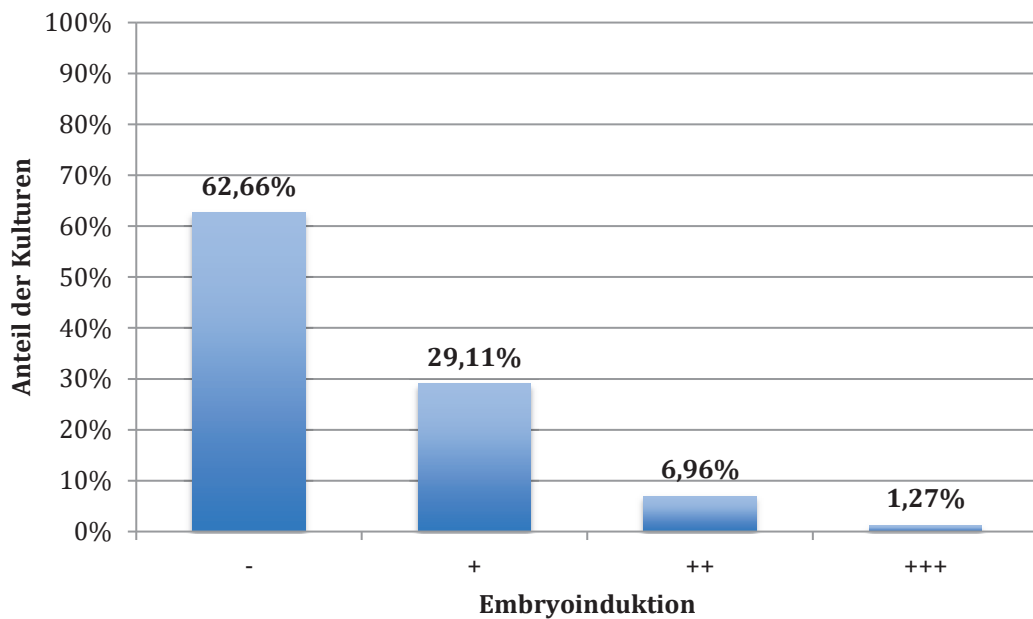


Abb. 8: Kallusgewebe und embryoiden Strukturen der 1. Versuchsreihe zur Embryoinduktion, Alter der Kulturen 6 Wochen: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D induziert, b) embryoiden Strukturen im kugelförmigen Entwicklungsstadium, c) Kallusgewebe mit embryoiden Strukturen im kugel- und herzförmigen Entwicklungsstadium, d) Nahaufnahme eines Embryoid im kugelförmigen Entwicklungsstadium

3.2.2.1. Embryoinduktion mittels Adeninsulfat

Das Phytohormon Adeninsulfat, ein Cytokinin, wurde dem Embryoinduktionsmedium in einer Konzentration von 50 μM zugesetzt. In einer übergreifenden Auswertung ohne Berücksichtigung der verschiedenen Kallusinduktionsmedien konnte gezeigt werden, dass 37,3 % aller Kulturen embryoiden Strukturen ausbildeten, wobei hier auch Kulturen mit mittlerer

(6,9 %) und hoher (1,3 %) Embryoidbildung gefunden werden konnten (s. Diagr. 2).



Diagr. 2: Einfluss von 50 μ M Adeninsulfat auf die Embryoidbildung. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

In 64,56 % der Kulturen konnten neben embryoiden Strukturen, die in verschiedenen Entwicklungsstadien (kugel-, herz-, torpedoförmig) auftraten, auch Adventivsprosse (59,5 %) gefunden werden. Weiters fiel die Entwicklung von Keimlingen in 8,9 % der Fälle auf, die meist sekundäre embryoiden Strukturen ausbildeten. So konnten in 8,2 % der Kulturen sekundäre embryoiden Formen nachgewiesen werden (s. Tab. 8).

Tab. 8: Häufigkeit der gebildeten Strukturen auf Medium Ad 50

Ad50	Häufigkeit
Embryoide	37,3 %
Regenerate	64,6 %
Adventivsprosse	59,5 %
Sekundäre Embryoide	8,2 %
Keimlinge	8,9 %

Auffällig war weiters, dass das Wurzelwachstum der Keimlinge vermindert zu sein schien. Dies ließ sich durch die entsprechende hemmende Wirkung von Cytokininen erklären. Abb. 9 zeigt embryoide Strukturen, die bei Adeninzusatz beobachtet werden konnten.

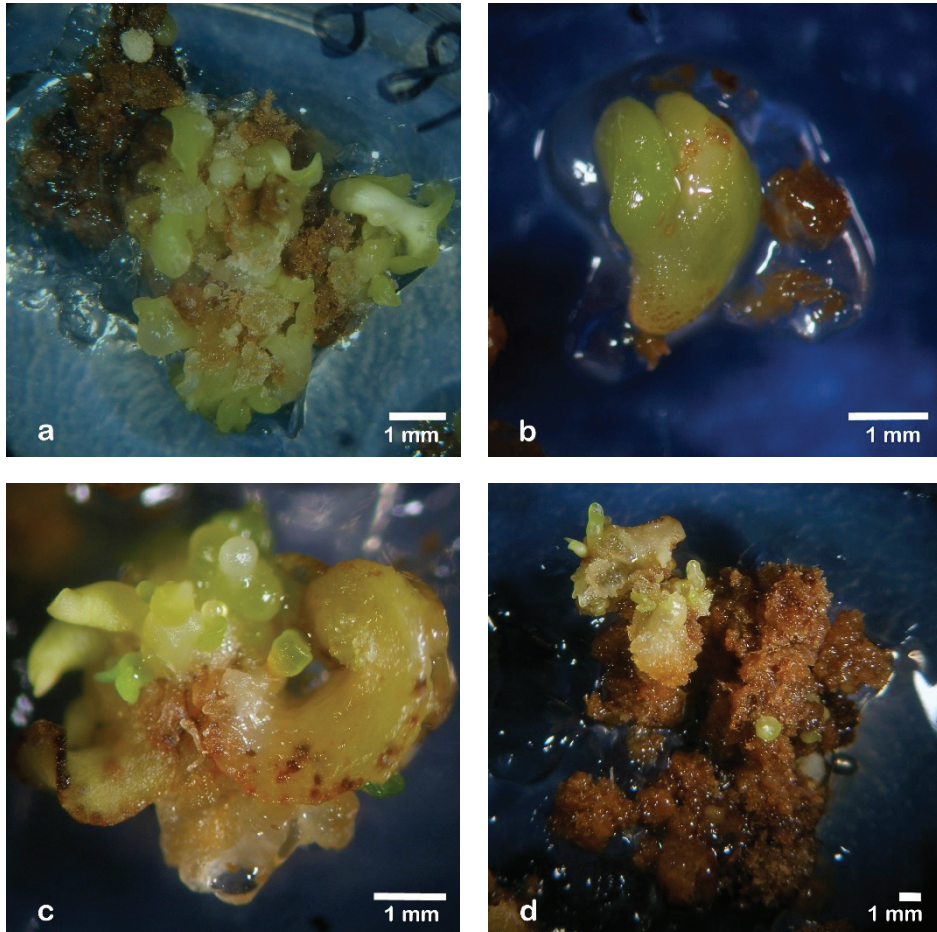


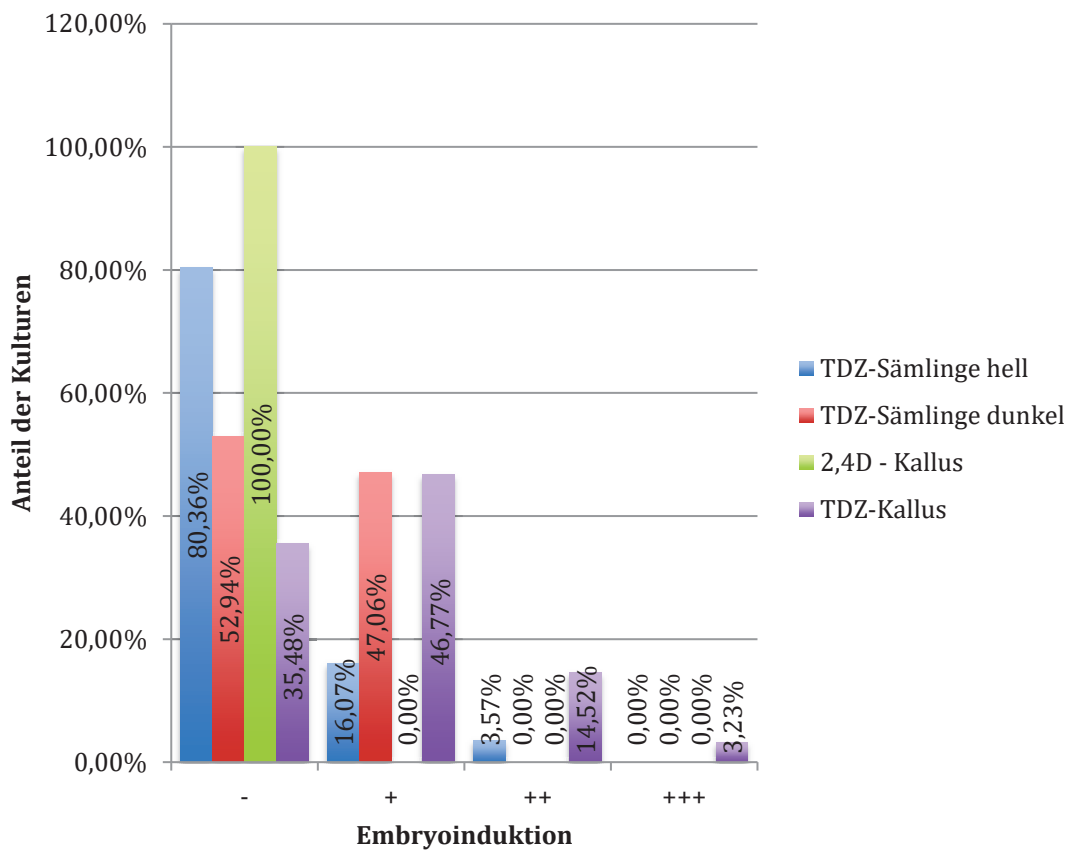
Abb. 9: Embryoide Strukturen auf Medium Ad 50 zum Zeitpunkt der Auswertung a) Kallus mit Embryoiden, b) Embryoid im herzförmigen Entwicklungsstadium, c) Keimling mit sekundären embryoiden Strukturen, d) Kallus mit Embryoid im kugelförmigen Entwicklungsstadium

3.2.2.1.1. Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion

Bei der Auswertung der Kulturen, die embryoide Strukturen bildeten, erfolgte eine Kategorisierung nach Herkunft des Kallusmaterials. Ziel war es, den Einfluss des Protokolls zur Kallusgewinnung auf eine nachfolgende Embryoinduktion festzustellen.

Wie aus Diagramm 3 ersichtlich wiesen die Kulturen von Kallusmaterial, das mittels Kotyledonenschnitten auf TDZ-hältigen Medien induziert worden war, die höchste Embryoinduktionsrate auf. In 46,8 % dieser Kulturen traten wenige embryoiden Strukturen auf, während 14,5 % eine mittlere und 3,2 % eine hohe Embryoidbildung aufwiesen.

In einer anderen Versuchsreihe war das Kallusmaterial von auf TDZ-hältigen Medien gekeimten Sämlingen gewonnen worden (s. Kap. 2.4.2., S. 10). 47,1 % der im Dunklen kultivierten Kulturen entwickelten wenige embryoiden Strukturen, unter Lichteinfluss war das nur bei 16,1 % der Kulturen feststellbar. Das mittels 2,4 D hergestellte Kallusgewebe zeigte auf Medium AD 50 keine embryoiden Strukturen.

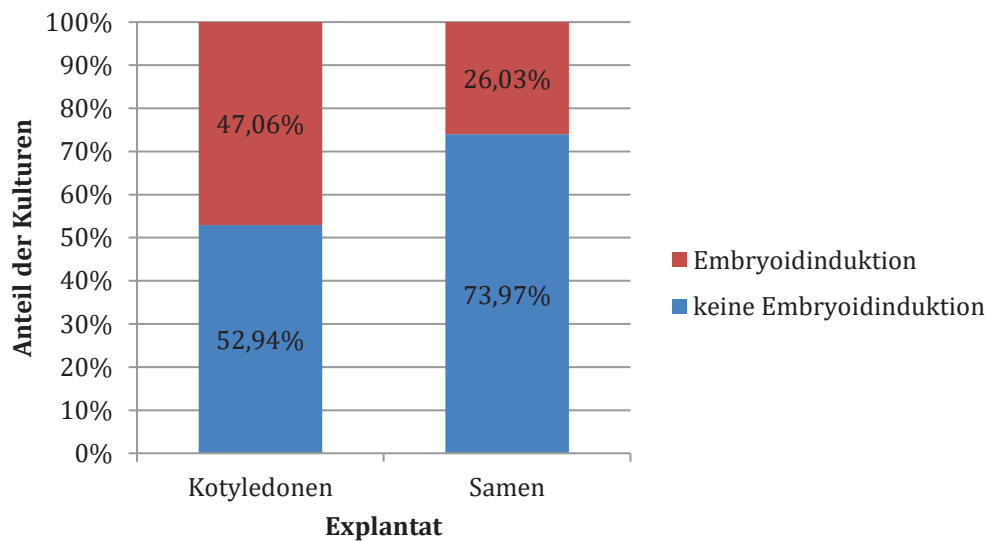


Diagr. 3: Häufigkeit der Induktion embryoider Strukturen auf Medium Ad 50, bezogen auf die Versuchsansätze zur Kallusinduktion. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

3.2.2.1.2. Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion

Das zur Embryoinduktion eingesetzte Kallusgewebe stammte einerseits von Schnittexplantaten der Kotyledonen von 7 Tage alten Keimlingen, andererseits wurde Kallus direkt an intakten Keimlingen induziert.

In Diagramm 4 ist ersichtlich, dass die Kalluskulturen, die über Schnittexplantate gewonnen wurden, öfter Embryoide (47,1 %) ausbildeten als Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen (26,0 %).



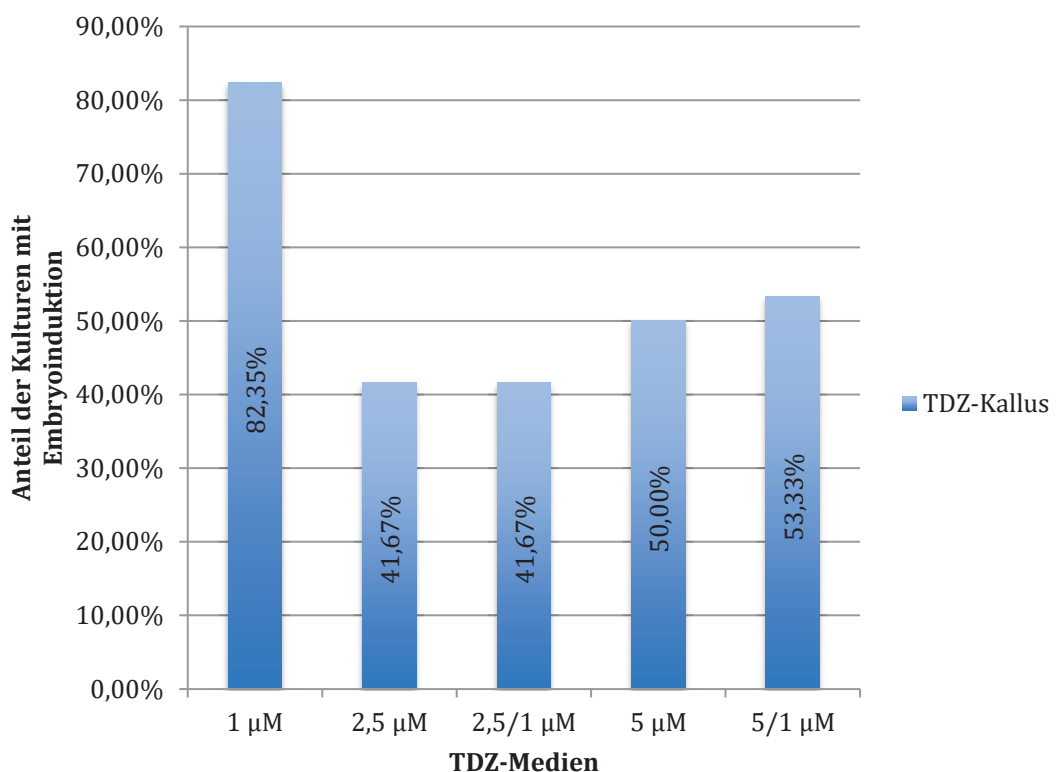
Diagr 4: Embryoidinduktion auf Medium Ad 50 in Abhängigkeit vom Explantattyp für die Kallusinduktion

3.2.2.1.3. Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion

Da in den Versuchen zur Kallusinduktion verschiedene Wachstumsstoffe zum Einsatz kamen, soll hier deren Einfluss auf die Embryoinduktion untersucht werden.

In den Versuchen zur Kallusinduktion wurde 2,4-D in zwei verschiedenen Konzentrationen (s. Tab 4, S. 7) eingesetzt. Da in der anschließenden Embryoinduktionsstufe keine Bildung embryoider Strukturen stattfand, scheint die Kombination mit Adeninsulfat nicht für die Vermehrung mittels somatischer Embryogenese geeignet zu sein.

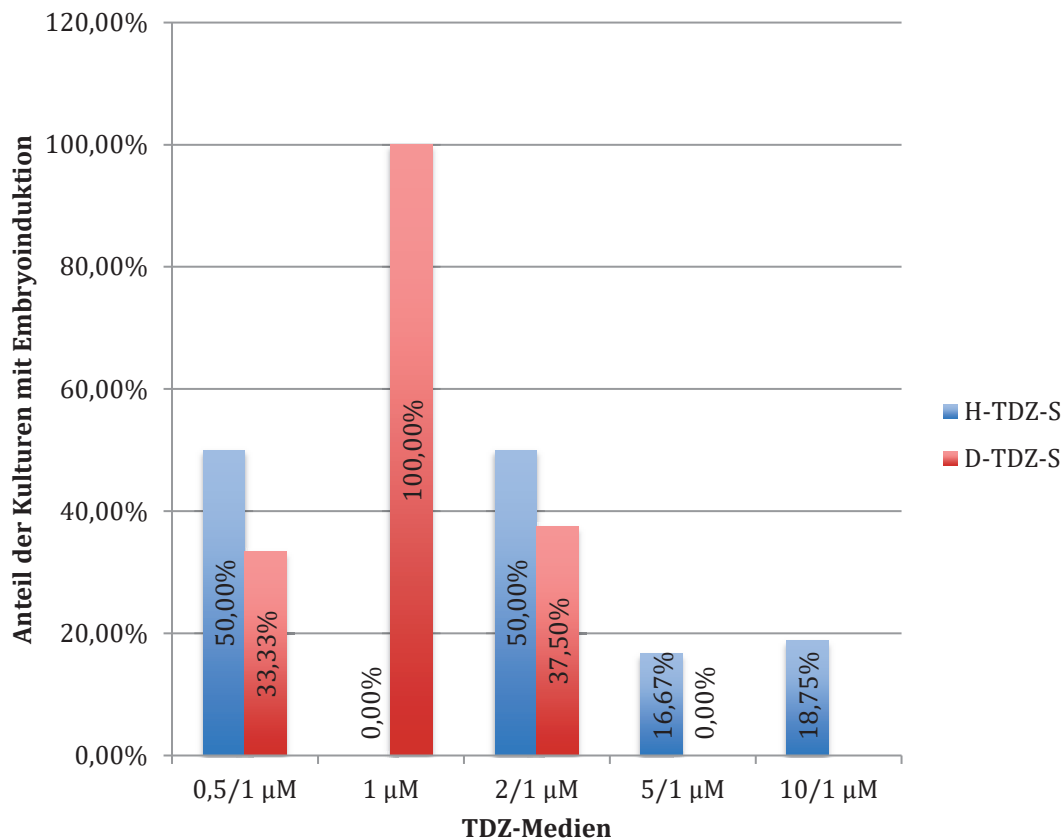
Bei den Kallusexplantaten, die mittels Kotyledonenschnitten auf TDZ-hältigen Medien gewonnen wurden, zeigten die Kalluskulturen, die sich auf einem Medium mit 1 μ M TDZ entwickelten, die höchste Embryoinduktionsrate. Die Einführung eines Erhaltungsmediums nach der Kallusinduktionsphase erhöhte die Embryoinduktion im Falle des Medium TDZ 5/1 gegenüber TDZ 5 leicht, spielte aber bei den Medien TDZ 2,5 und TDZ 2,5/1 keine Rolle (s. Diagr. 5). Der Kulturansatz auf Medium TDZ 20 konnte nicht zur Auswertung gebracht werden, da er aufgrund von Infektionen verworfen werden musste.



Diagr. 5: Häufigkeit der Embryoinduktion an TDZ-Kallusgeweben auf Medium Ad 50.

Die Kalluskulturen, die von intakten Keimlingen auf TDZ-Medien im Dunkeln stammten, zeigten bei 1 μ M TDZ die höchste Embryoinduktionsrate. Bei höheren Konzentrationen als TDZ 2/1 μ M fand unter Lichtausschluss keine Entwicklung von Embryoiden statt, während im Licht in geringem Ausmaß eine Bildung von embryoiden Strukturen festzustellen war. Auch bei Kallus von den

Medien TDZ 0,5/1 und TDZ 2/1 konnte eine erhöhte Induktion von Embryoiden unter Lichteinfluss beobachtet werden. (s. Diagr. 6)



Diagr. 6: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Sämlingen mit und ohne Lichteinfluss auf Medium Ad 50

3.2.2.1.4. Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum

Wachstum und Morphogenese des Kallusmaterials sind in Bezug auf die Induktion embryoider Strukturen von großem Interesse. Auch hier wurde nach der Herkunft des Kallusgewebes unterteilt.

Der mittels 2,4-D gewonnene Kallus zeigte allgemein wenig Wachstum, welches zum Zeitpunkt der Auswertung gänzlich aufgehört hatte. Die Kulturen, die auf das Erhaltungsmedium gesetzt worden waren, zeigten anfangs mehr Vitalität, stellten aber letztlich das Wachstum ebenso ein. Das Gewebe zeigte zum Zeitpunkt der Auswertung eine weiche, fast matschige Konsistenz, bei durchwegs glatter Oberfläche. Etwa ein Viertel der Explantate entwickelte einen

weißlichen, kristallartigen Überzug auf dem ockerfarbenen Kallusmaterial. In allen Kulturen konnte die Entstehung von dunklen kugelförmigen Knötchen beobachtet werden. (s. Abb. 10: a, S. 39)

Das über Kotyledonenschnitte und TDZ-hältige Medien hergestellte Kallusgewebe zeigte ein sehr gutes Wachstum in 93,5 % der Kulturen. Auch auf dem Embryoinduktionsmedium waren bei der Auswertung noch 61,3 % der Kulturen im Wachstumsprozess aktiv. In Bezug auf die Färbung konnte hier eine Tendenz zur Braunfärbung festgestellt werden. Von dem anfangs ockerfarbenen Kallus hatte sich bis zum Zeitpunkt der Auswertung mehr als die Hälfte der Kulturen braun verfärbt. 72,6 % der Kalluskulturen hatten die Eigenschaft, bei Berührung in kleinere Strukturen zu zerfallen. Lediglich 27,4 % zeigten eine feste Konsistenz. Die Oberfläche erschien rau oder nodular und war oft mit einem weißlichen, kristallartigen Überzug versehen. Auch hier konnte in 69,3 % der Kulturen die Bildung dunkler Knötchen beobachtet werden (s. Abb. 10: b, S. 38).

Bei dem über intakte Sämlinge auf TDZ-hältigen Medien gewonnenen Kallusmaterial muss zwischen Dunkel- und Lichtkultur unterschieden werden. In Bezug auf die Kulturen, bei denen Wachstum des Kallusgewebes stattfand, lieferte die Kultur im Dunklen deutlich bessere Ergebnisse (88,2 %) als jene unter Lichteinfluss (26,8 %). Jedoch wiesen letztere Kulturen eine deutlich höhere Vitalität auf: Zum Zeitpunkt der Auswertung befanden sich 91,1 % der Kulturen in einer aktiven Wachstumsphase, wohingegen das bei den Kulturen im Dunkeln nur zu 58,8 % der Fall war.

Optisch war auch hier eine eindeutige Tendenz zur Braunfärbung erkennbar. So waren die Kulturen im Licht zu 60,7 % braun verfärbt, bei überwiegend fester Konsistenz und meist rau aussehender Oberfläche. Etwa die Hälfte der Kulturen bildete schwarze, kugelige Strukturen aus. Die Kulturen im Dunklen zeigten zu 87,5 % Braunfärbung und waren immer von fester Struktur. In 70,6 % der Kulturen entwickelte sich eine raue Oberfläche und zu 29,4 % hatte sie eine nodulare Textur. Das Auftreten von runden, schwarzen Knötchen konnte in 88,2 % der Kulturen beobachtet werden (s. Abb. 10: c, d, S. 38).

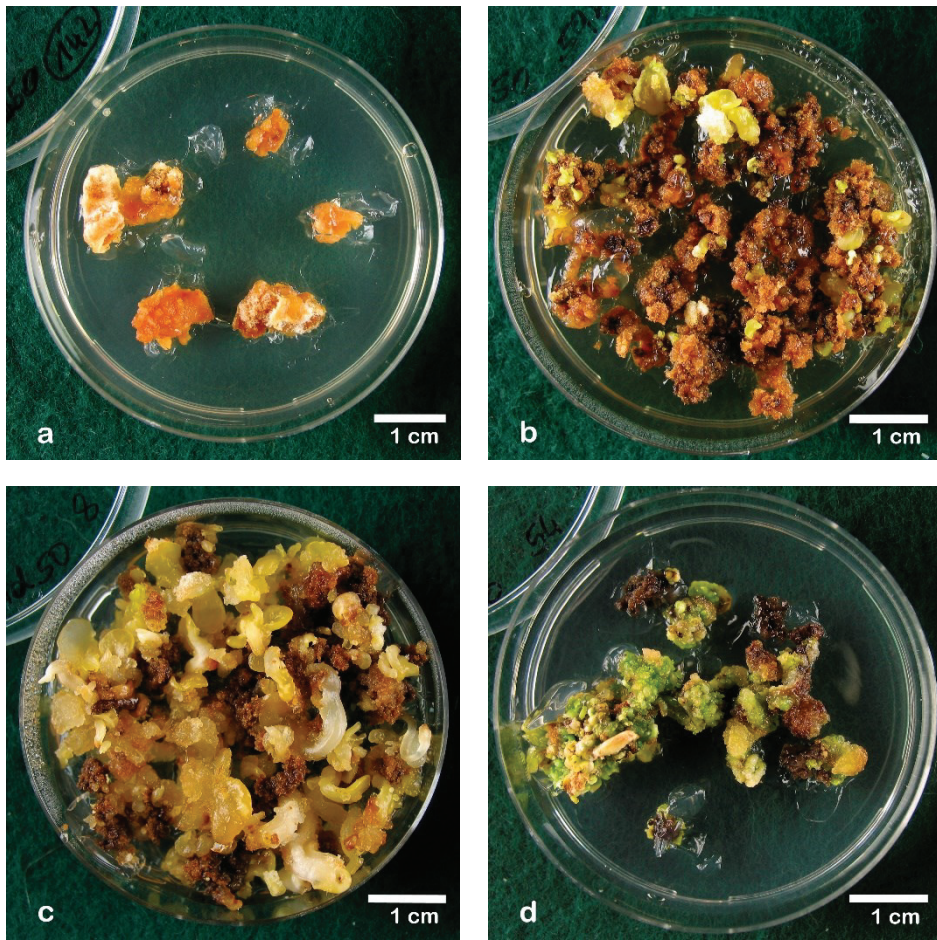
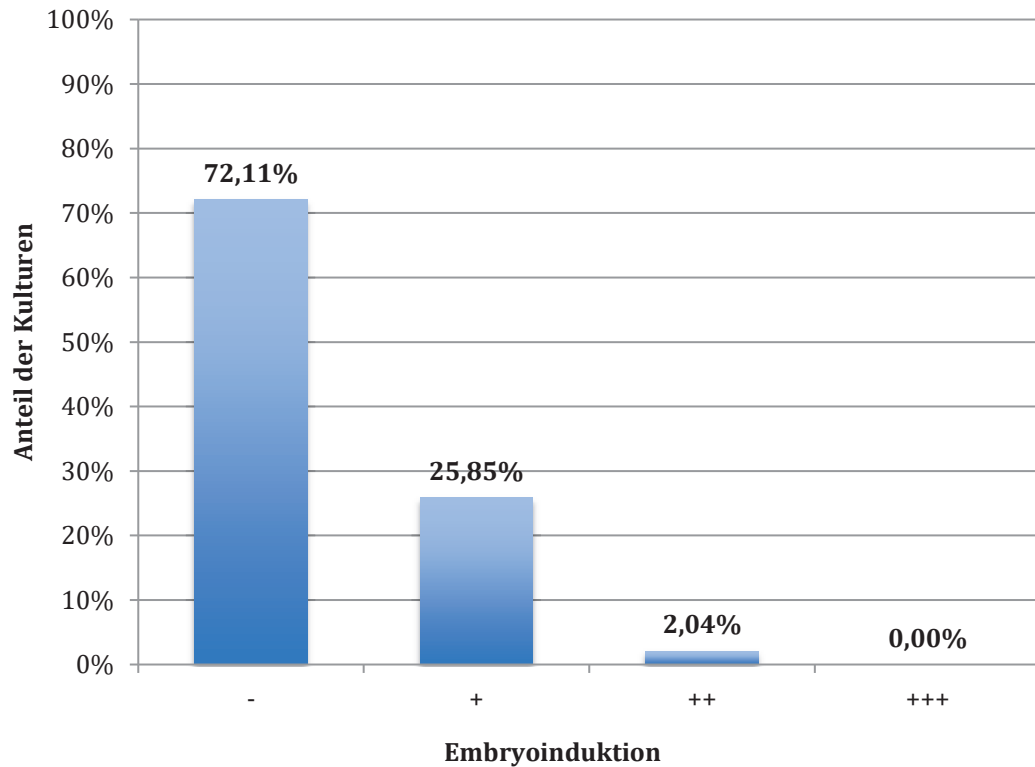


Abb. 10: Kallusgewebe unterschiedlicher Herkunft auf Medium Ad 50 zum Zeitpunkt der Auswertung: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D gewonnen, b) Kallusgewebe aus Kotyledonenschnitten mittels TDZ – hältigen Medien, c) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss, d) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichteinfluss

3.2.2.2. Embryoinduktion mittels Benzylaminopurin

Benzylaminopurin (BAP) ist ein synthetisches Cytokinin, welches in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt wurde. Bei Auswertung aller mit BAP behandelten Kulturen konnte eine gesamte Embryoinduktionsrate von 27,9 % errechnet werden. Allerdings konnte nur in 2,0 % der Kulturen eine mittlere Embryoinduktion erreicht werden (s. Diagr. 7, S. 39).



Diagr. 7: Einfluss von 5 μ M BAP auf die Embryoidbildung. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

Bei Einsatz von 5 μ M BAP konnte in 64,6 % der Kulturen die Bildung von Regeneraten beobachtet werden (Tab. 9). Besonders interessant war die Bildung von Blattregeneraten, die einen deformierten Wuchs zeigten. Auch wurden kleine Sprosse gebildet, die in ihrem Aussehen an Embryoide im Torpedostadium erinnerten, allerdings entweder nur ein oder mehrere Keimblätter besaßen (s. Abb. 11, S. 40).

Tab. 9: Häufigkeit der gebildeten Strukturen auf Medium BAP 5

BAP5	Häufigkeit
Embryoide	27,9 %
Regenerate	64,6 %
Adventivsprosse	69,4 %
Sekundäre Embryoide	3,4 %
Keimlinge	0,7 %

Häufig kam es zur Bildung von Adventivsprossen (69,4 %), wohingegen nur in 27,9 % der Fälle eine Embryoinduktion erreicht wurde. Hier konnten wiederum kugel-, herz- und torpedoförmige Entwicklungsstadien aufgefunden werden (s. Abb. 11). Sekundäre embryoide Strukturen konnten in 3,4 % der Fälle beobachtet werden, und das Auftreten von Keimlingen belief sich auf 0,7 % der Kulturen.

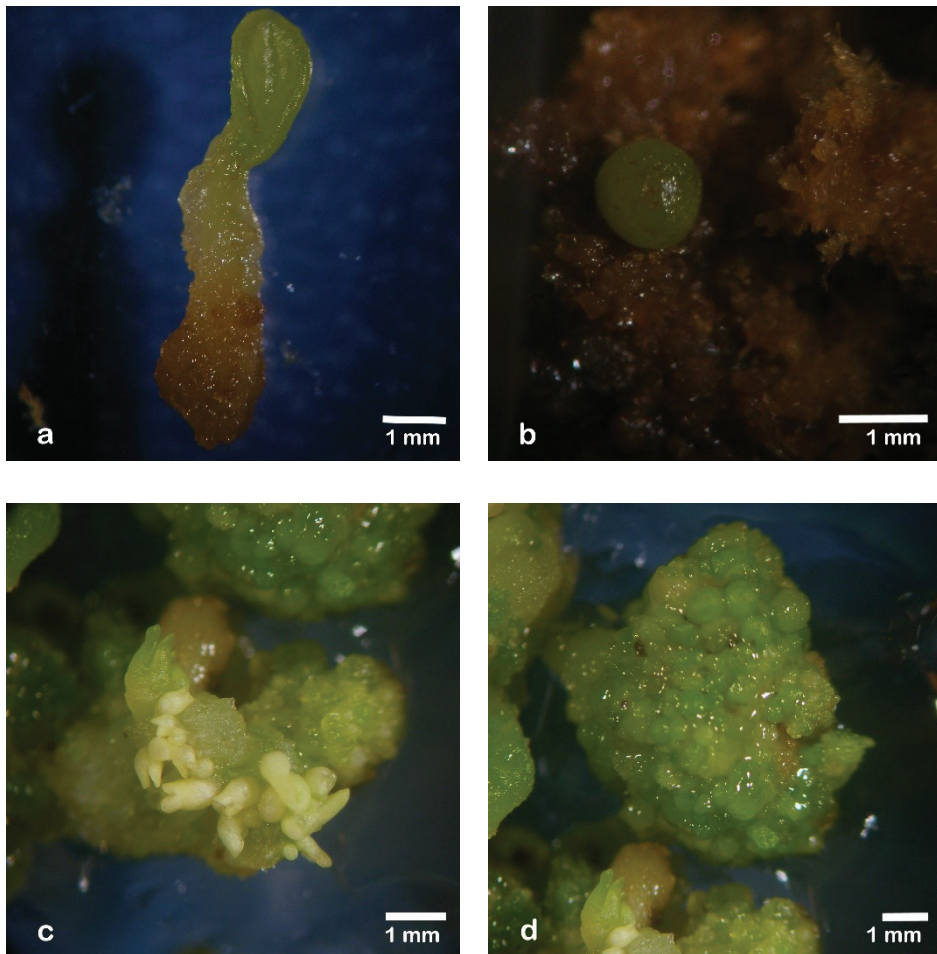
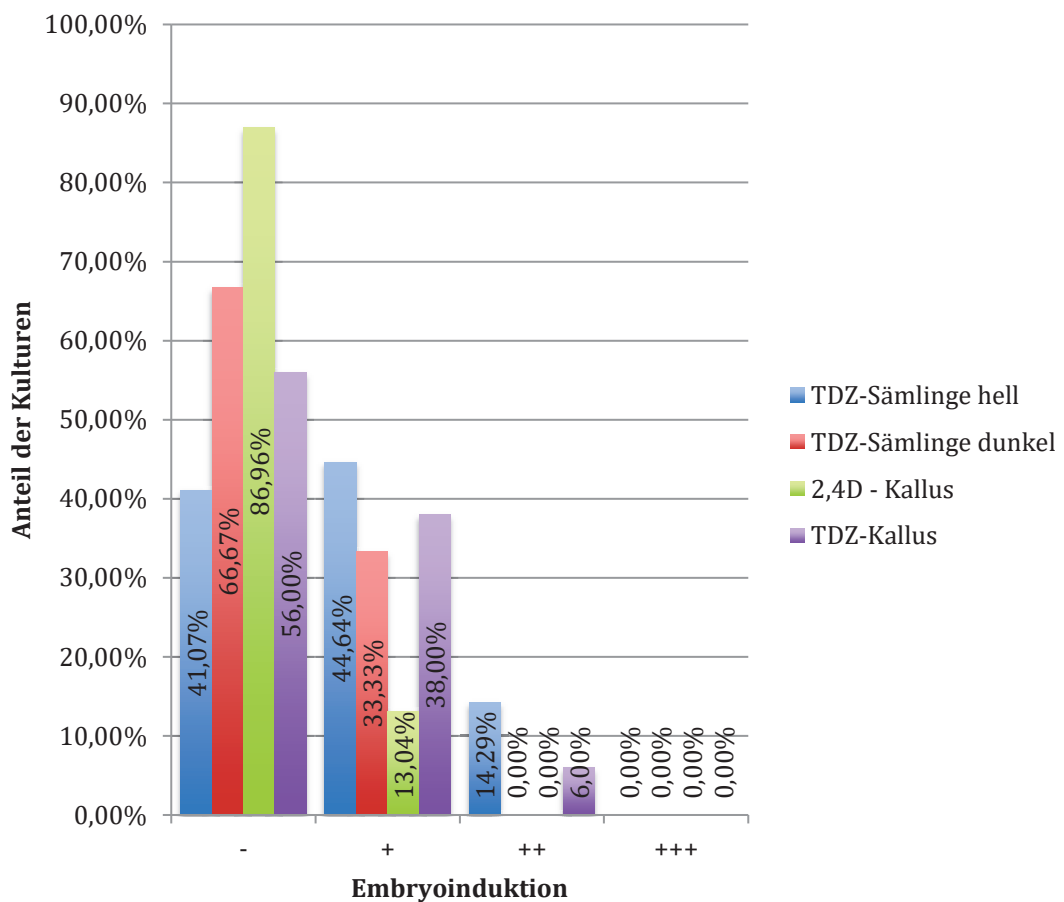


Abb. 11: Embryoide Strukturen auf Medium BAP 5 zum Zeitpunkt der Auswertung a) Keimling mit 1 Keimblatt und Kalluswachstum am Hypocotyl und Wurzelansatz, b) Kallus mit Embryoid im Kugelstadium, c) Kallus mit Embryoiden im Torpedostadium, d) Kallus mit nodularer Struktur und Embryoiden im Kugelstadium

3.2.2.2.1. Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion

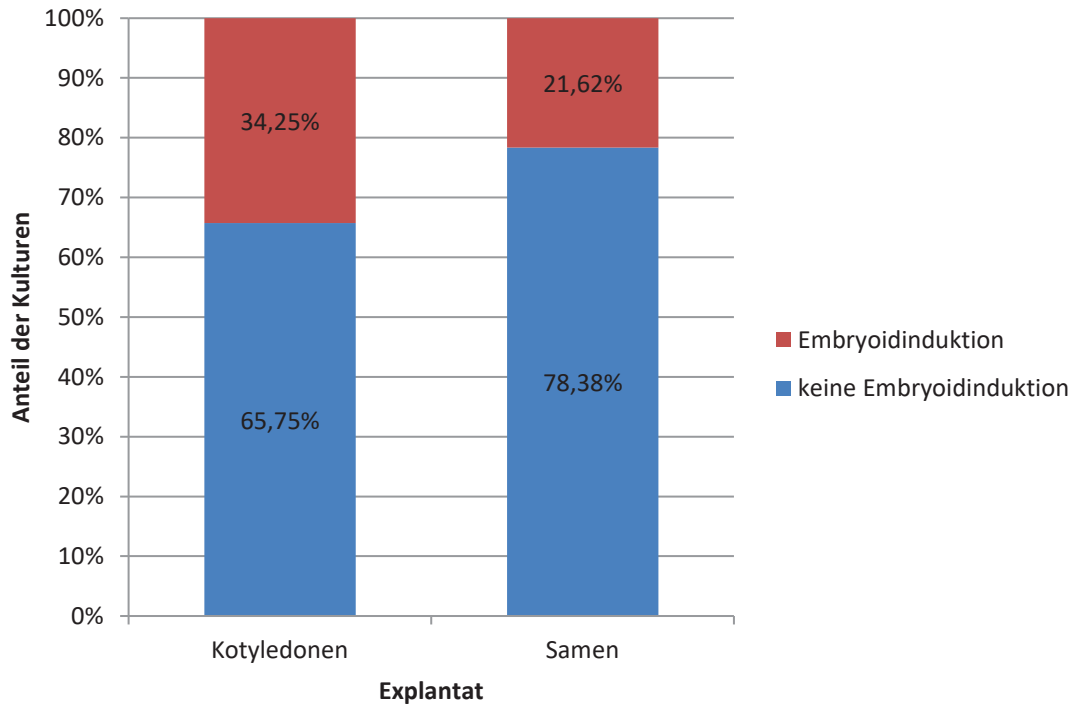
Die Induktion von Embryoiden mittels BAP zeigte den größten Erfolg, wenn Kallusmaterial verwendet wurde, das über TDZ-Sämlinge in Lichtkultur gewonnen wurde (s. Diagr. 8). Hier konnten Kulturen mit wenig und mittlerem Embryoidaufkommen beobachtet werden. Die schlechtesten Ergebnisse lieferte das mittels 2,4-D induzierte Kallusgewebe: in 13,0 % der Kulturen wurden wenige Embryos gebildet.



Diagr. 8: Häufigkeit der Induktion embryoider Strukturen auf Medium BAP 5 bezogen auf die Versuchsansätze zur Kallusinduktion. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

3.2.2.2.2. Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion

Kallusgewebe von Kotyledonenschnitten zeigte mit 34,2 % insgesamt eine höhere Induktionsrate von embryoiden Strukturen als Kallus von TDZ-Sämlingen (s. Diagr. 9).

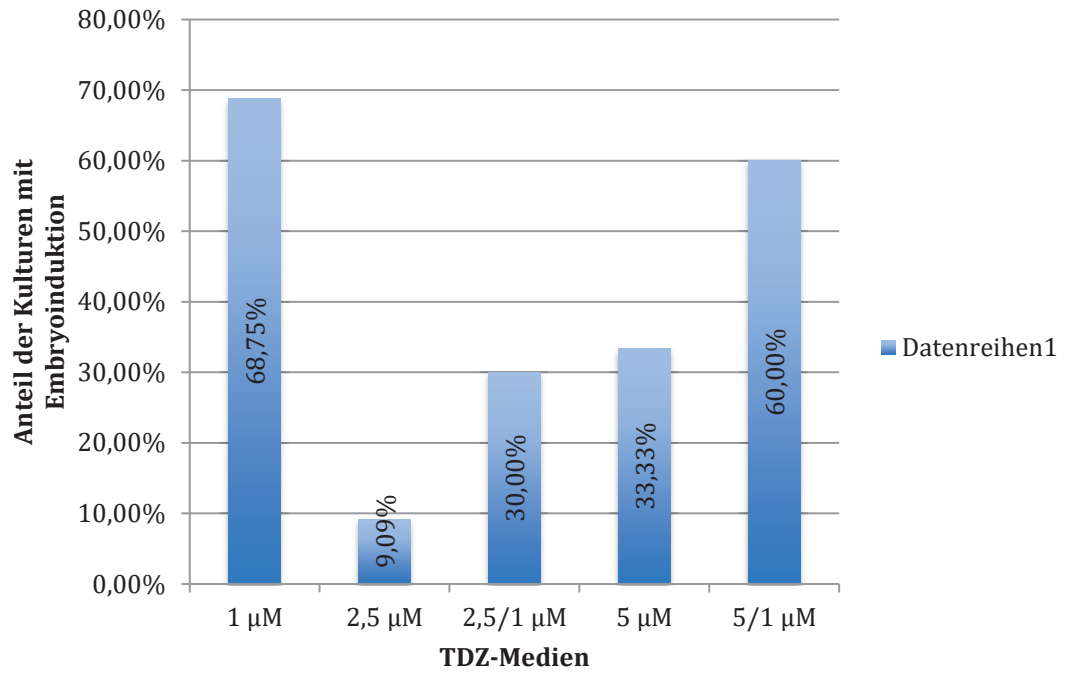


Diagr. 9: Embryoinduktion auf Medium BAP 5 abhängig vom Explantattyp

3.2.2.2.3. Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion

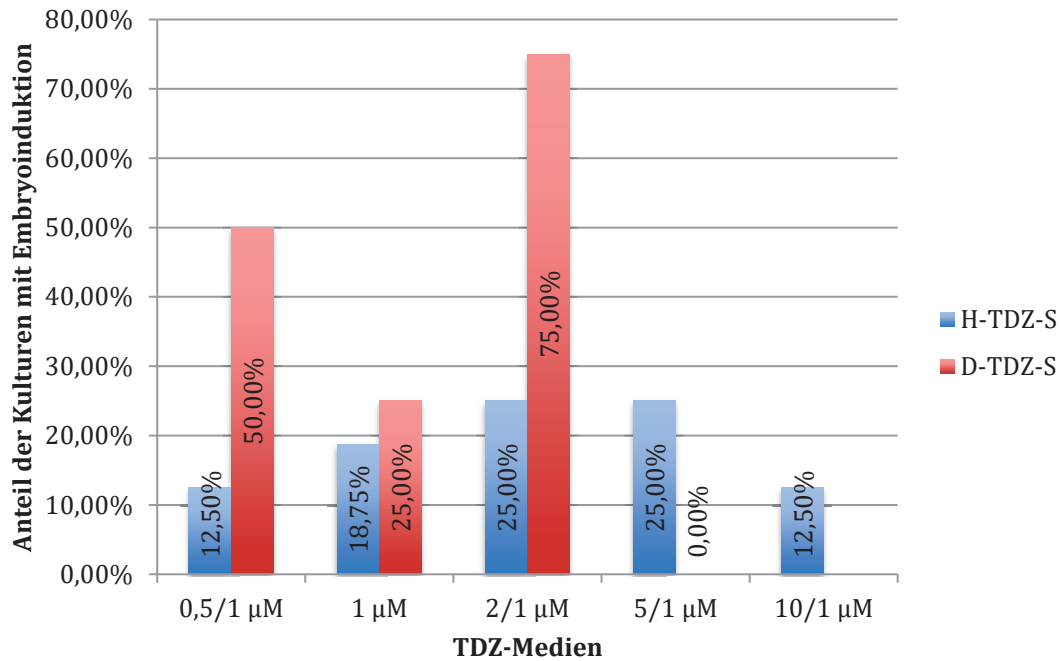
Der mittels 2,4-D entstandene Kallus bildete auf dem Stufe 2-Medium BAP 5 zu 11,1 % (5 μ M 2,4-D) bzw. zu 20,0 % (5/1 μ M 2,4-D) Embryoide aus.

Aus Diagramm 10 (S. 43) ist ersichtlich, dass Kallus von Stufe 1-Medium TDZ 1 auf dem Stufe 2 Medium BAP 5 in dem höchsten Anteil an Kulturen mit embryoiden Strukturen resultierte (68,7 %). Mit 60,0 % führte Kallus von Medium TDZ 5/1 zu ähnlich guten Werten.



Diagr. 10: Häufigkeit der Embryoinduktion in TDZ-Kallusgeweben auf Medium BAP 5

An Kallusgewebe der TDZ-Sämlinge konnten die besten Ergebnisse auf Medium BAP 5 (Embryoinduktion in 75,0 % der Kulturen) in Dunkelkultur mit Explantaten vom Stufe 1-Medium TDZ 2/1 erzielt werden. Die Embryoidbildung der Kulturen im Licht blieb weit (25,0 %) hinter den Ergebnissen der Kulturen unter Lichtausschluss zurück (s. Diagr. 11, S. 44).



Diagr. 11: Häufigkeit der Embryoinduktion auf Medium BAP 5 an Kallus von TDZ-Sämlingen mit und ohne Lichteinfluss

3.2.2.2.4. Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum

Das mittels 2,4-D gewonnene Kallusgewebe zeigte in 56,5 % der Kulturen kein Wachstum auf Medium BAP 5. Bei der Auswertung konnten lediglich in 33,3 % der Kulturen Wachstumstendenzen festgestellt werden. Der überragende Teil der Kulturen war von weicher, fast matschiger Konsistenz (78,3 %) mit glatter Oberfläche und oftmals einem weißlichen, kristallartigen Überzug. 87,0 % der ockerfarbenen Kalli war durchzogen von dunklen, fast schwarzen, knötchenartigen Strukturen. TDZ-Kallus zeigte ein sehr gutes Wachstum, wobei 88,0 % der wachsenden Kulturen mittleres und starkes Wachstum aufwiesen. In 43,1 % der Kulturen waren die Kalli von ocker - brauner Färbung, wobei sich eine Tendenz zu Ocker zeigte. Ein kleiner Teil der Kalli zeigte braunschwarze Verfärbungen. 64,0 % der Kalluskulturen besaßen eine lockere, zerbröselnde Konsistenz, während 34,0 % eine feste Struktur und 2,0 % eine weiche, fast matschige Konsistenz aufwiesen. Die Oberfläche war mehrheitlich (54,0 %) von weißlichem, kristallinen Aussehen, zumeist gepaart mit rauer Textur, nur 6 % wiesen eine nodulare Struktur auf. In 30,0 % der Kulturen konnte das Auftreten

kleiner, dunkler, knötchenartiger Strukturen beobachtet werden, die sich vom umgebenden Gewebe deutlich abgrenzten.

Die Kalli der TDZ-Sämlinge in Lichtkultur zeigten zu 59,8 % teils gutes Wachstum, wurden aber von den Kulturen unter Lichtausschluss übertroffen, da dort jede Kultur Wachstumstendenzen zeigte. Die Vitalität sank zum Zeitpunkt der Auswertung jedoch deutlich ab, sodass von den Kulturen im Dunkeln am Ende keine mehr wuchs. Bei den Kulturen im Licht zeigten immerhin noch 1,8 % ein Wachstum an. Die Färbung der Kulturen im Dunkeln zeigte eine sehr deutliche Tendenz zu Braun (66,7 %), während die Kulturen im Licht sogar noch eine Nuance dunkler waren und mehrheitlich braun/schwarze Färbung zeigten. Im Hellen konnten ausschließlich Kulturen mit fester Struktur aufgefunden werden, im Gegensatz dazu führte die Kultur unter Lichtausschluss zu einer lockeren, nodularen Struktur, die bei Berührung leicht zerfiel. Die Oberfläche stellte sich bei den Lichtkulturen in annähernd gleichem Maße rau (42,9 %) wie knotig (44,6 %) dar und war in 67,9 % der Fälle von dunklen Knötchen durchdrungen (s. Abb. 12, S. 46), während sich bei den Kulturen im Dunklen ein eindeutiger Trend zu einer rauen Oberfläche (72,2 %) zeigte und in 88,2 % der Kulturen das Auftreten von dunklen Knötchen beobachtet werden konnte.

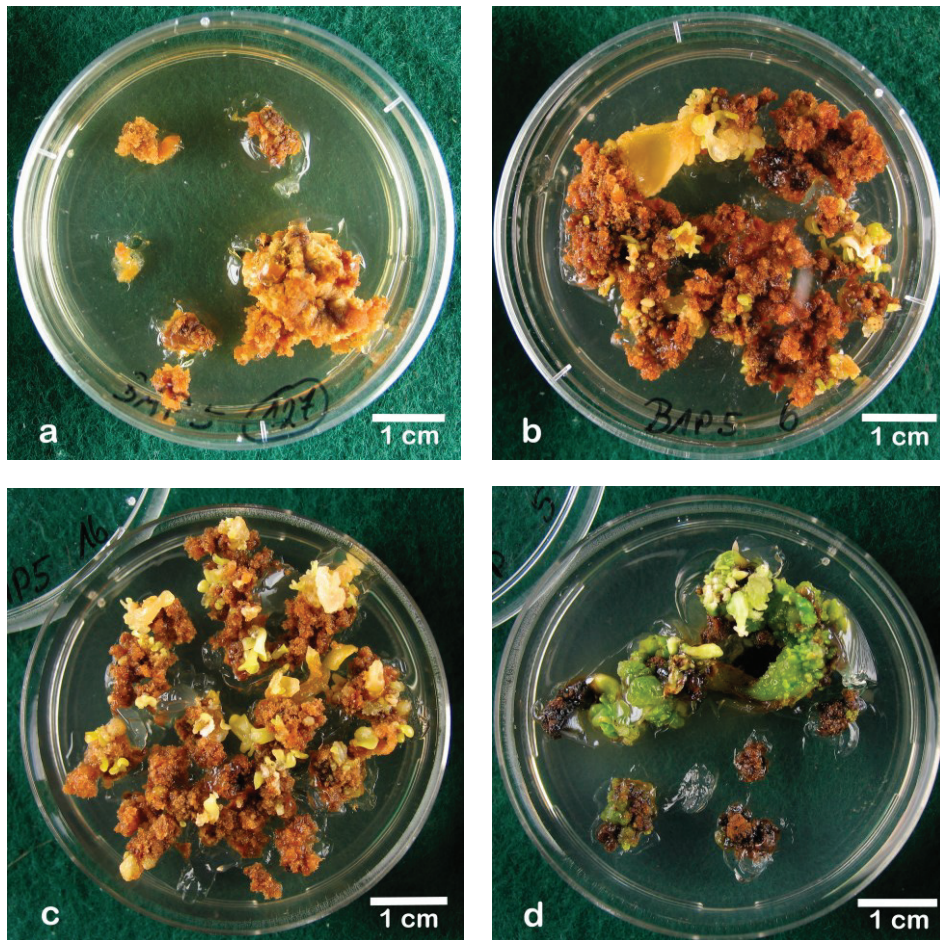
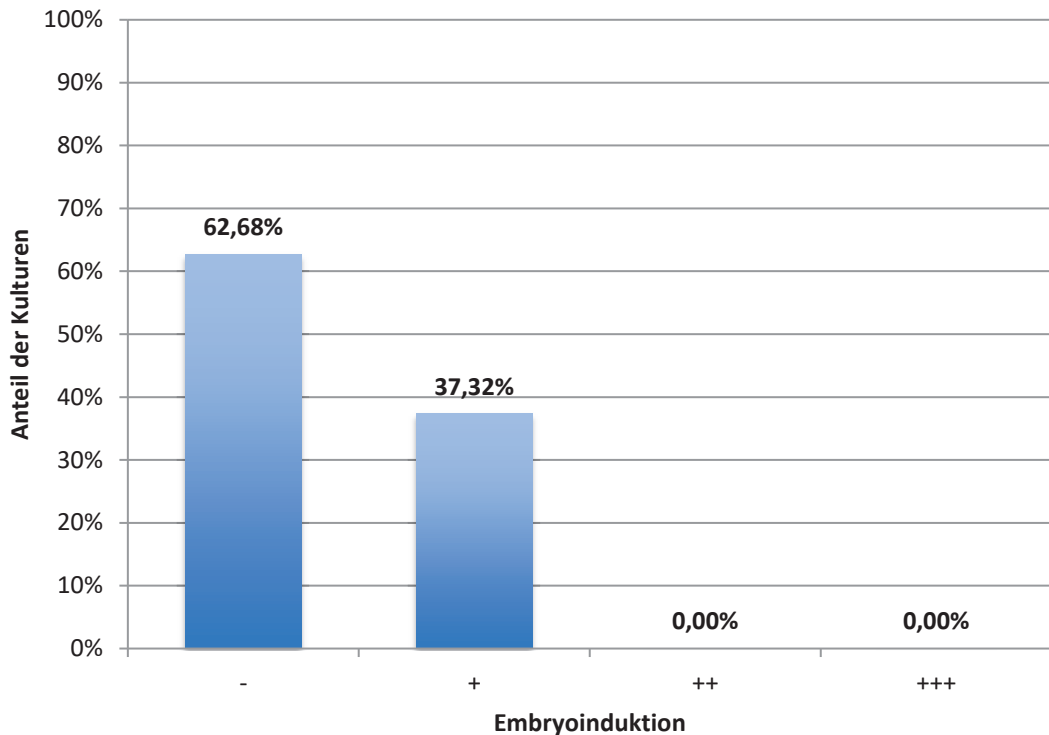


Abb. 12: Kallusgewebe unterschiedlicher Herkunft auf Medium BAP 5 zum Zeitpunkt der Auswertung: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D gewonnen, b) Kallusgewebe aus Kotyledonenschnitten auf TDZ-hältigen Medien, c) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss, d) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichteinfluss

3.2.2.3. Embryoinduktion mittels Kinetin

Im Stufe 2-Medium wurde auch Kinetin, ebenfalls ein weit verbreitetes synthetisches Cytokinin, in einer Konzentration von 5 μM verwendet. Das führte zu einer Embryoinduktionsrate von 37,3 % (s. Diagr. 12, S. 47). Auch hier konnten die verschiedenen Entwicklungsstadien von Kugel-, Herz- und Torpediform aufgefunden werden. Mit 64,0 % konnte weiters eine hohe



Diagr. 12: Einfluss von 5 μ M Kin auf die Embryoidbildung. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

Ausbeute an Regeneraten beobachtet werden. Es wurden auch Strukturen gefunden, vermutlich Keimlinge, die in 7,0 % der Kulturen sekundäre Embryoide ausbildeten (s. Tab. 10). An Hypocotyl und Wurzelbasis der Keimlinge kam es oft zur Bildung von Kallusgewebe (s. Abb.: 13, S. 48), und es war auch eine variierende Anzahl an Keimblättern zu beobachten. Eine Hemmung des Wurzelwachstums konnte nicht beobachtet werden.

Tab. 10: Häufigkeit der gebildeten Strukturen auf Medium Kin 5

Kin5	Häufigkeit
Embryoide	37,3 %
Regenerate	64,1 %
Adventivsprosse	58,4 %
Sekundäre Embryoide	7,0 %
Keimlinge	2,1 %

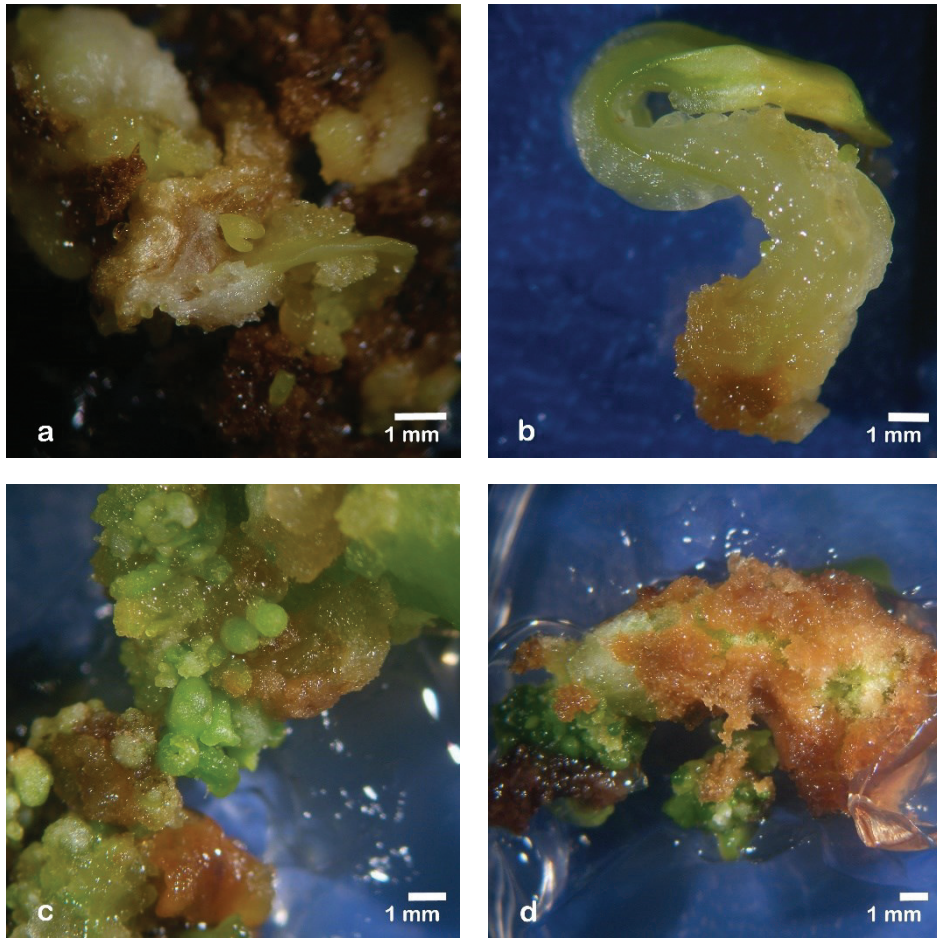
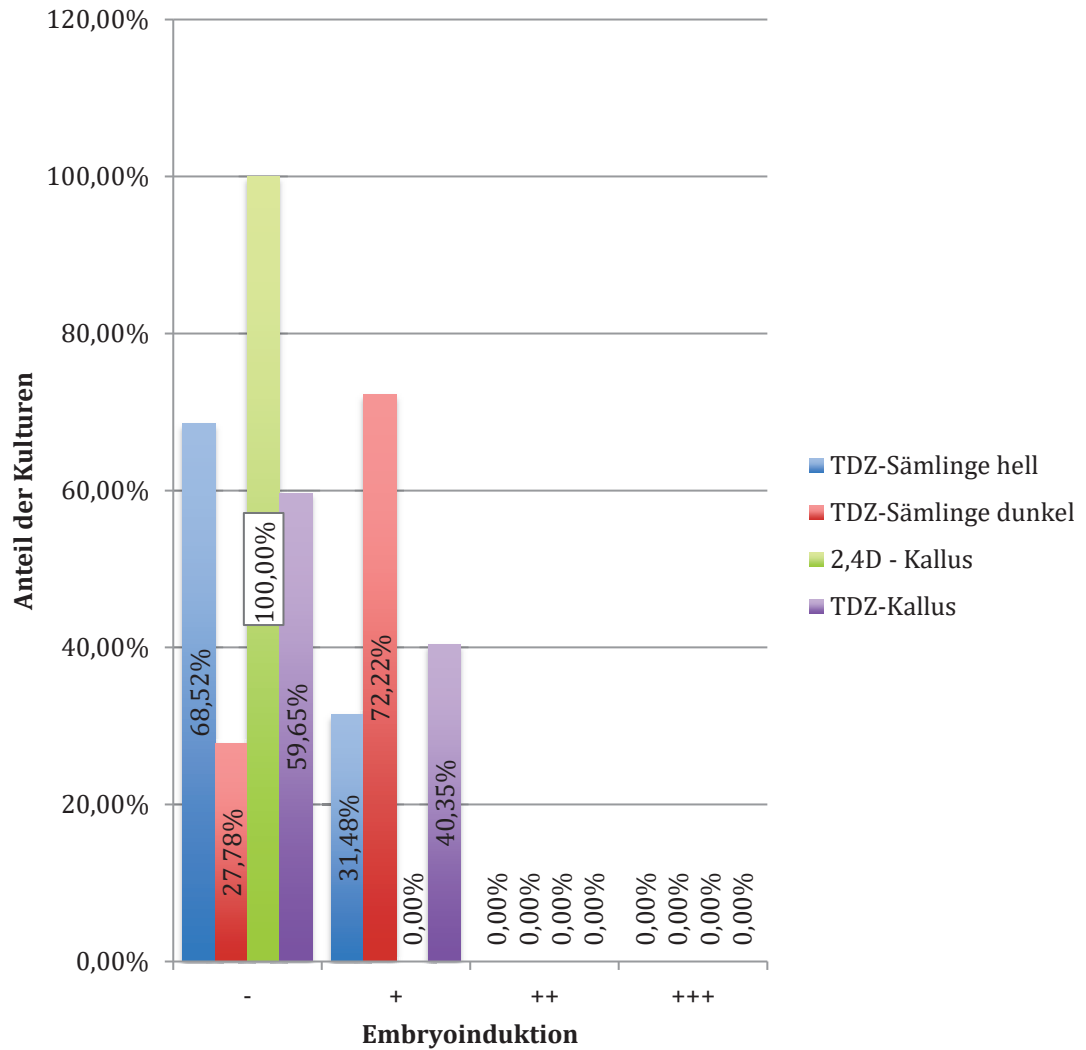


Abb. 13: Embryoide Strukturen zum Zeitpunkt der Auswertung auf Medium Kin 5 a) Kallus mit Regeneraten und Embryoid im herzförmigen Stadium, b) Keimling mit beginnendem Kalluswachstum am Wurzelansatz, c) Keimling mit sekundären Embryoiden, d) Keimling mit Kalluswachstum an Hypocotyl und Wurzelansatz und sekundären embryoiden Strukturen

3.2.2.3.1. Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion

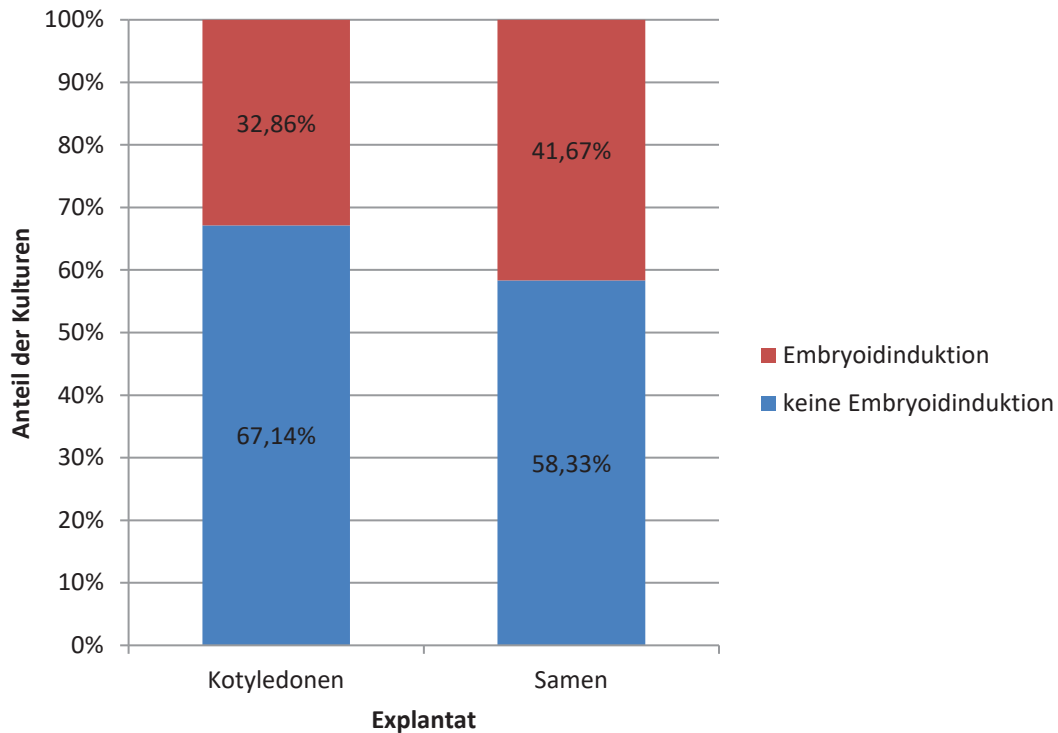
Durch die Kombination von 2,4-D-Kallus mit Kinetin konnten in der vorliegenden Arbeit keine embryoiden Strukturen induziert werden. Die höchste Ausbeute an Embryoiden konnte in der Kombination mit Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen in Dunkelkultur (72,2 %) gewonnen werden (s. Diagr. 13, S. 49). Die Embryoinduktion bei den Kallusgeweben von TDZ-Kallus (40,3 %) bzw. TDZ-Sämlingen in Lichtkultur (31,5 %) blieb deutlich dahinter zurück.



Diagr. 13: Häufigkeit der Induktion embryoider Strukturen auf Medium Kin 5 bezogen auf die Versuchsansätze zur Kallusinduktion. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

3.2.2.3.2. Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion

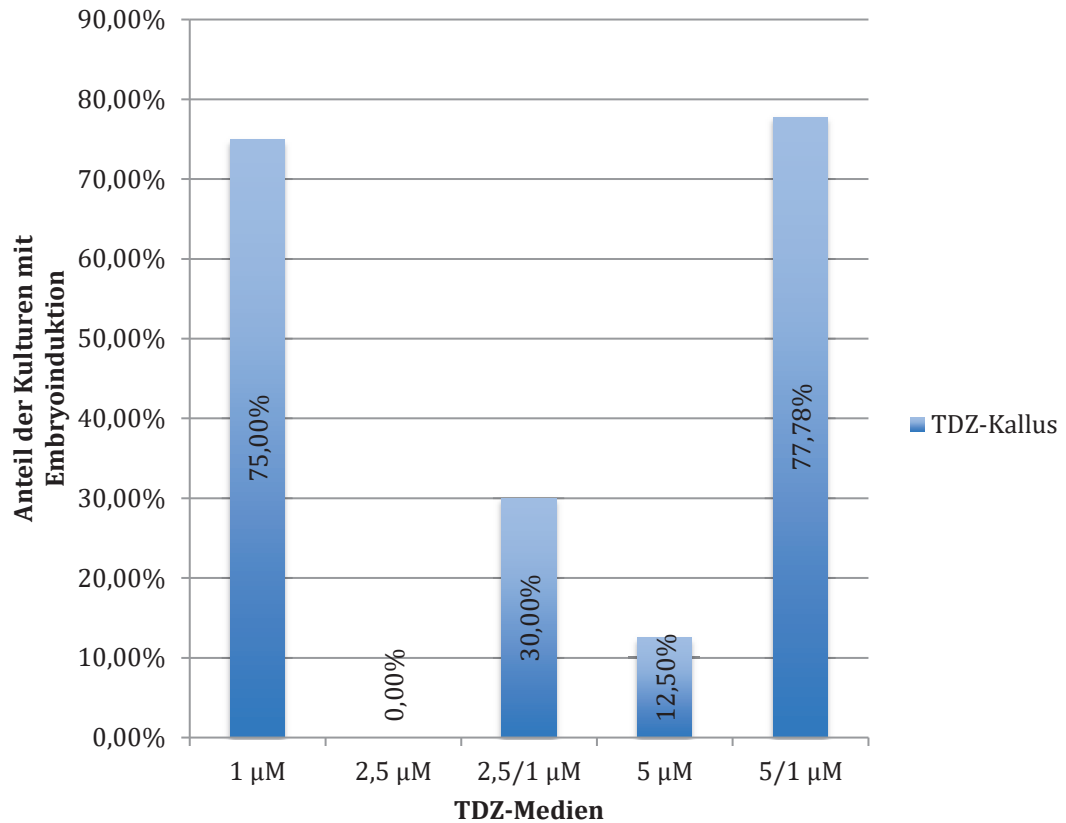
Auf Medium Kin 5 zeigte Kallusgewebe von Kotyledonenschnitten mit 32,9 % eine niedrigere Induktion von embryoiden Strukturen als Kallus von TDZ-Sämlingen (41,7 %; s. Diagr. 14, S. 50).



Diagr. 14: Embryoidinduktion auf Medium Kin 5 abhängig vom Explantattyp

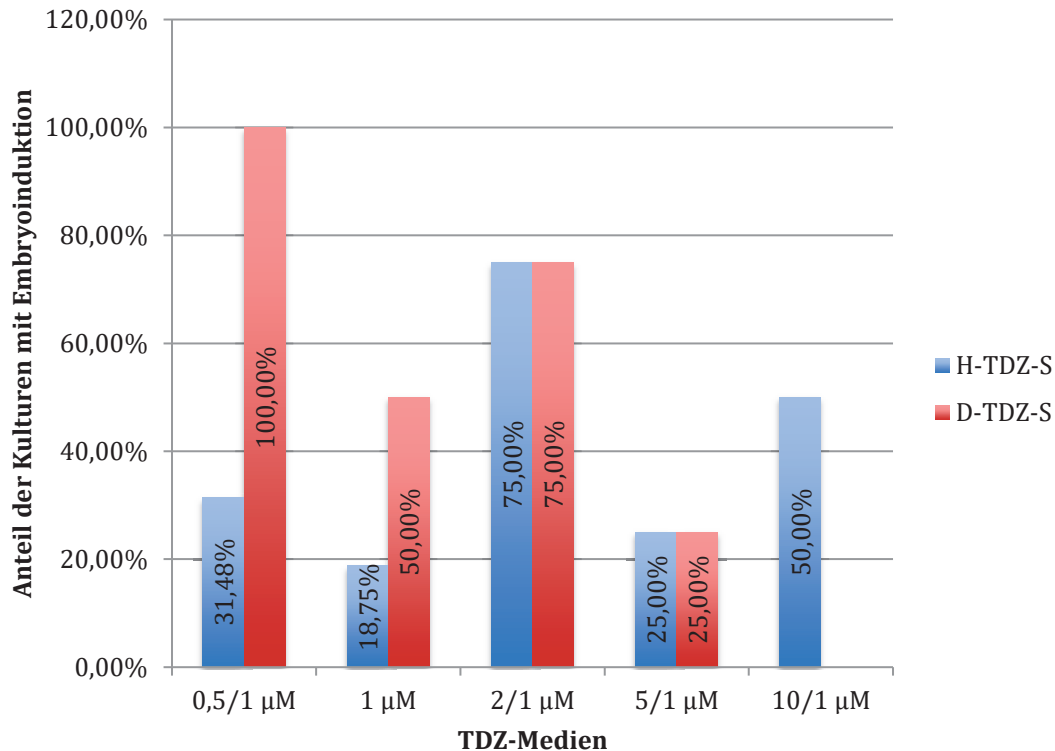
3.2.2.3.3. Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion

Für die Stufe 1-Medien 2,4-D 5 und 2,4-D 5/1 wurde keine eigene Graphik erstellt, da bei diesen Medien keine Embryoinduktion stattfand. Das TDZ-Kallusgewebe von den Kotyledonenexplantaten zeigte die höchste Embryoinduktionsrate, wenn es von den Stufe 1-Medien TDZ 5/1 (77,8 %) und TDZ 1 (78,0 %) stammte. Kallus von den anderen Medien folgte keinem ersichtlichen Trend. Diejenigen Kulturen, die nach der Kallusinduktionsphase auf ein Erhaltungsmedium mit 1 μ M TDZ transferiert worden waren, zeigten bezüglich der Embryoinduktion bessere Ergebnisse als die Kulturen ohne Wechsel auf Erhaltungsmedium, sodass sich die Einführung des Erhaltungsmediums hier als sinnvoll erwiesen hat (s. Diagr. 15, S. 51).



Diagr. 15: Häufigkeit der Embryoinduktion an TDZ-Kallusgeweben auf Medium Kin 5

In Bezug auf die Stufe 1-Medien der TDZ-Sämlinge muss Medium TDZ 0,5/1 bei den Kulturen unter Lichtausschluss hervorgehoben werden. Hier konnte in jeder Kultur Embryoinduktion beobachtet werden (s. Diagr. 16, S. 52). Das Stufe 1-Medium TDZ 2/1 führte unter beiden Lichtbedingungen zu guten Ergebnissen (Embryoinduktion in 75 % der Kulturen), während mit Kallus von Medium TDZ 1 bessere Resultate unter Lichtausschluss (50,0 %) erzielt werden konnten.



Diagr. 16: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Sämlingen mit und ohne Lichteinfluss auf Medium Kin 5

3.2.2.3.4. Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum

Das mittels 2,4-D induzierte Kallusgewebe bildete auf Medium Kin 5 keine embryoiden Strukturen aus und zeigte in 76,9 % der Kulturen keinerlei Wachstum. In allen Kulturen zeigten die Zellmassen Ockerfärbung bei fast ausschließlicher weicher, matschiger Konsistenz (s. Abb. 14, S. 54). In 69,2 % der Kulturen wiesen sie eine glatte Oberfläche auf, in den restlichen Kulturen zeigten die Kallusaggregate einen weißlich kristallinen Überzug. Das Auftreten dunkler, nodularer Strukturen konnte in 76,9 % der Kulturen beobachtet werden.

Bei TDZ-Kalli konnte ein außerordentlich gutes Wachstum beobachtet werden. So konnten 54,4 % der Kulturen der Kategorie mit dem höchsten Zuwachs an Biomasse zugeordnet werden. Lediglich bei 3,1 % blieb das Wachstum aus. Zu Ende des Experiments hatten 49,1 % der Kulturen das Wachstum eingestellt, in 35,1 % konnten wir mittleres Kalluswachstum feststellen. Bei 47,4 % der

ursprünglich ockerfarbenen Kalli war zum Zeitpunkt der Auswertung eine braune Verfärbung aufgetreten. In 68,2 % der Kulturen zeigten die Kallusaggregate eine feste Konsistenz, in 29,8 % konnte eine lockere, zerbröselnde Struktur beobachtet werden. In 61,4 % konnte ein weißlich kristalliner Überzug auf den Zellmassen festgestellt werden. 19,3 % zeigten eine nodulare Struktur und bei 17,5 % trat eine raue Oberfläche auf, nur bei 1,7 % der Kulturen hatten die Kallusmassen eine glatte Oberfläche. Nodulare, dunklen Strukturen konnten bei 98,2 % der Kulturen nachgewiesen werden.

Die über TDZ-Sämlinge gewonnenen Kulturen zeigten in der Lichtkultur zu 33,3 % Wachstum, während 88,9 % der Kulturen unter Lichtausschluss sehr gut wuchsen. 33,3 % dieser Kalli zeigten mittleres Wachstum und 5,6 % sogar sehr gutes Wachstum. Auch zum Zeitpunkt der Auswertung war das Kalluswachstum bei den Kulturen unter Lichtausschluss besser, da hier lediglich 66,7 % das Wachstum eingestellt hatten. Hingegen zeigten bei den Kulturen im Licht 93,0 % kein aktives Wachstum mehr. Die Tendenz zur Braunfärbung war unter beiden Kulturbedingungen gleich. Bei den Kalli unter Lichteinwirkung konnte in 63,0 % der Kulturen eine braune Verfärbung der Kallusmassen beobachtet werden, bei den Kulturen unter Lichtausschluss waren es 61,1 %. Die Konsistenz der Kalli bei den im Licht gehaltenen Kulturen war zu 53,7 % fest und zu 38,9 % locker zerbröselnd. Die Kulturen im Dunkeln waren mehrheitlich von lockerer, zerbröselnder Konsistenz (55,6 %). In beiden Fällen wiesen die Kallusaggregate in mehr als die Hälfte der Kulturen eine raue Oberfläche auf. Das Auftreten der dunklen Knötchen stellte den größten Unterschied dar: Während 57,4 % der Kulturen unter Licht keine dunklen Knötchen ausbildete, konnten nur in 5,6 % der Kulturen im Dunkeln keine derartigen Strukturen gefunden werden.

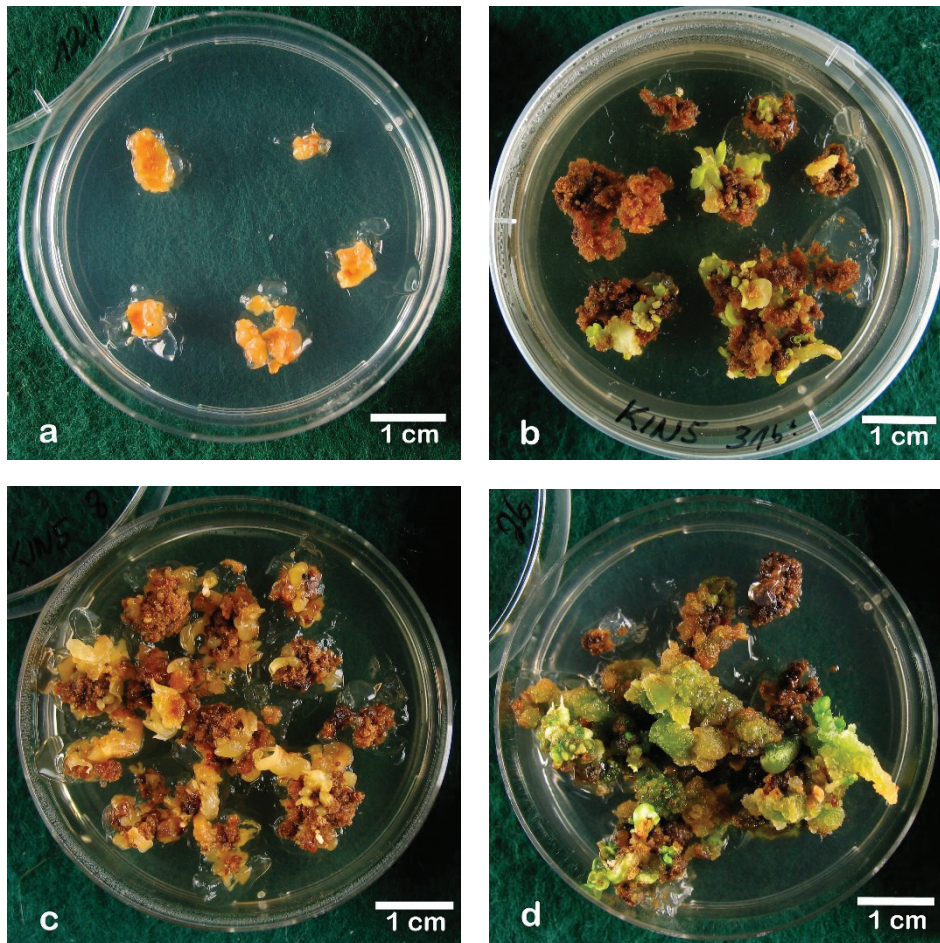
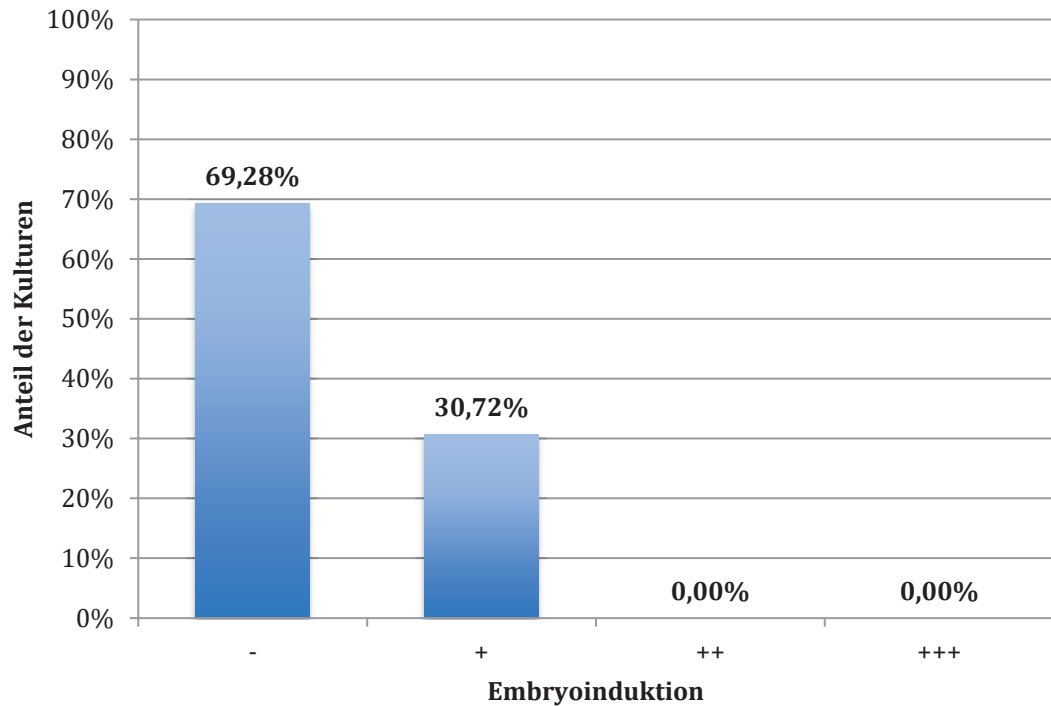


Abb. 14: Kallusgewebe unterschiedlicher Herkunft auf Medium Kin 5 zum Zeitpunkt der Auswertung: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D gewonnen, b) Kallusgewebe aus Kotyledonenschnitten von TDZ-hältigen Medien, c) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss, d) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichteinfluss

3.2.2.4. Embryoinduktion mittels Zeatin

Beim Einsatz von Zeatin im Stufe 2-Medium lag die Embryoinduktionsrate mit 30,7 % durchaus im Bereich der anderen Cytokinine. Es konnten jedoch nur Kulturschalen mit wenig Embryoinduktion gefunden werden (s. Diagr. 17, S. 55).



Diagr. 17: Einfluss von 5 μ M Zeatin auf die Embryoidbildung. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

Mit 72,7 % war eine hohe Rate an Regeneraten zu verzeichnen (s. Tab. 11). Auch hier konnten kugelige, herz- und torpedoförmige embryoide Strukturen gefunden werden. Weiters traten in 5,2 % der Kulturen sekundäre Embryoide auf, die oft auf Keimlingen oder primären Regeneraten zu finden waren (s. Abb. 15, S. 56).

Tab. 11: Häufigkeit der gebildeten Strukturen auf Medium Z 5

Z5	Häufigkeit
Embryoide	30,7 %
Regenerate	72,7 %
Adventivsprosse	67,8 %
Sekundäre Embryoide	5,2 %
Keimlinge	3,3 %

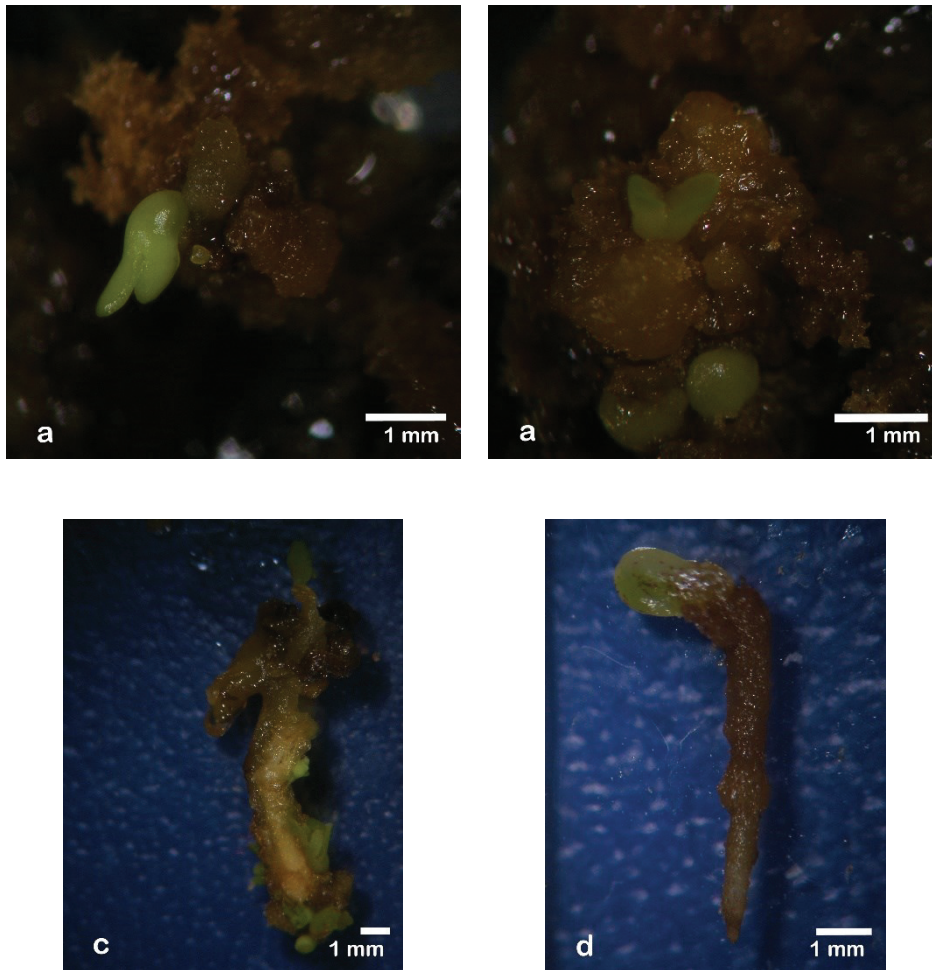
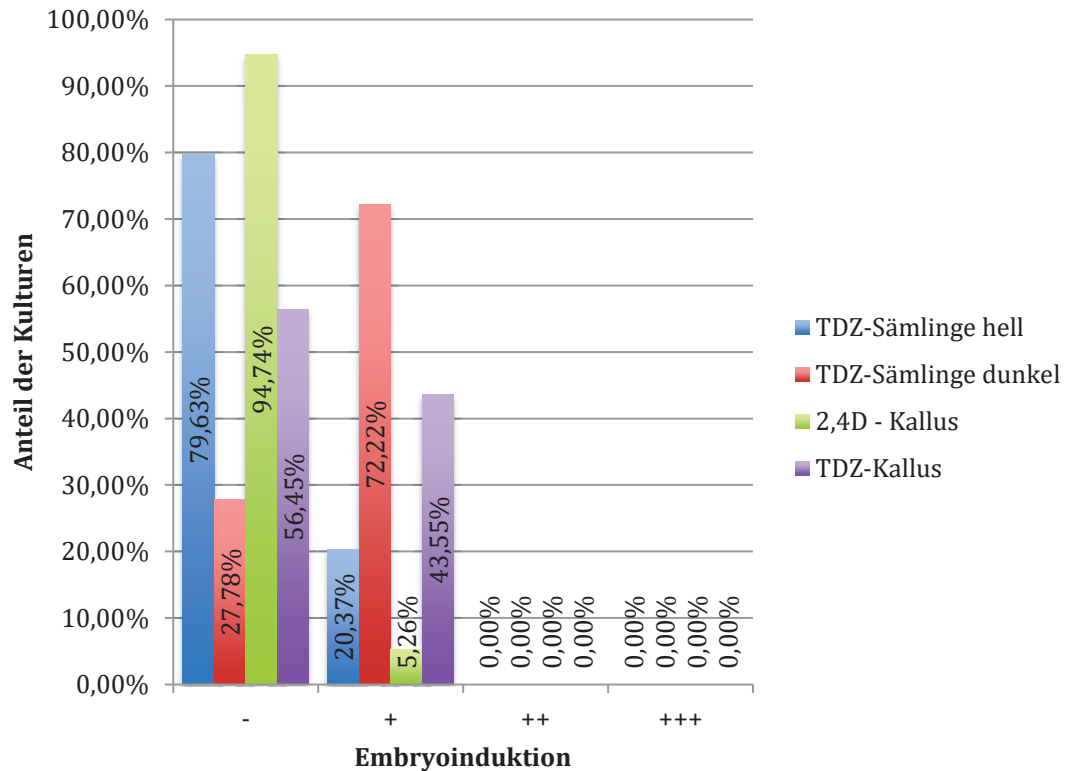


Abb. 15: Embryoide Strukturen auf Medium Z5; a) Embryoid in torpedoförm. Entwicklungsstadium, b) Embryoide in kugel- und torpedoförmigem Entwicklungsstadium, c) Keimling mit sekundären embryoideen Strukturen, d) Keimling

3.2.2.4.1. Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion

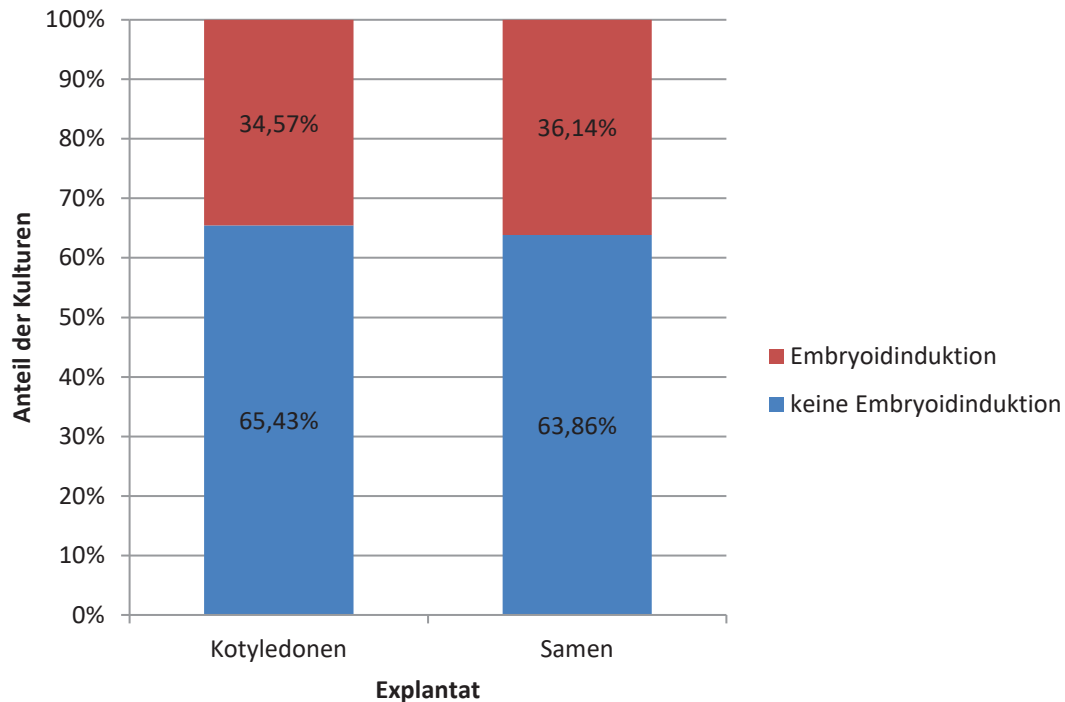
In Diagramm 18 (S. 57) ist ersichtlich, dass bei den 2,4 D-Kalli in 5,3 % der Kulturen die Bildung von Embryoiden beobachtet werden konnte, wohingegen sich in 43,5 % der Kulturen von Kallus aus TDZ-Kotyledonen Embryoide entwickelten. Das beste Ergebnis konnte hier mit dem Kallusgewebe aus TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss erzielt werden: Hier kam es in 72,2 % der Kulturen zur Ausbildung von Embryoiden, bei den TDZ-Sämlingen unter Lichteinwirkung konnten jedoch nur in 20,4 % der Kulturen Embryoide aufgefunden werden.



Diagr. 18: Häufigkeit der Induktion embryoider Strukturen auf Medium Z 5 bezogen auf die Versuchsansätze zur Kallusinduktion (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

3.2.2.4.2. Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion

Ein Einfluss des Explantats konnte hier nicht festgestellt werden, da die Embryoinduktion bei Kotyledonenexplantaten und bei Kallus von auf TDZ gekeimten Samen ähnlich hoch war (s. Diagr.19, S. 58).



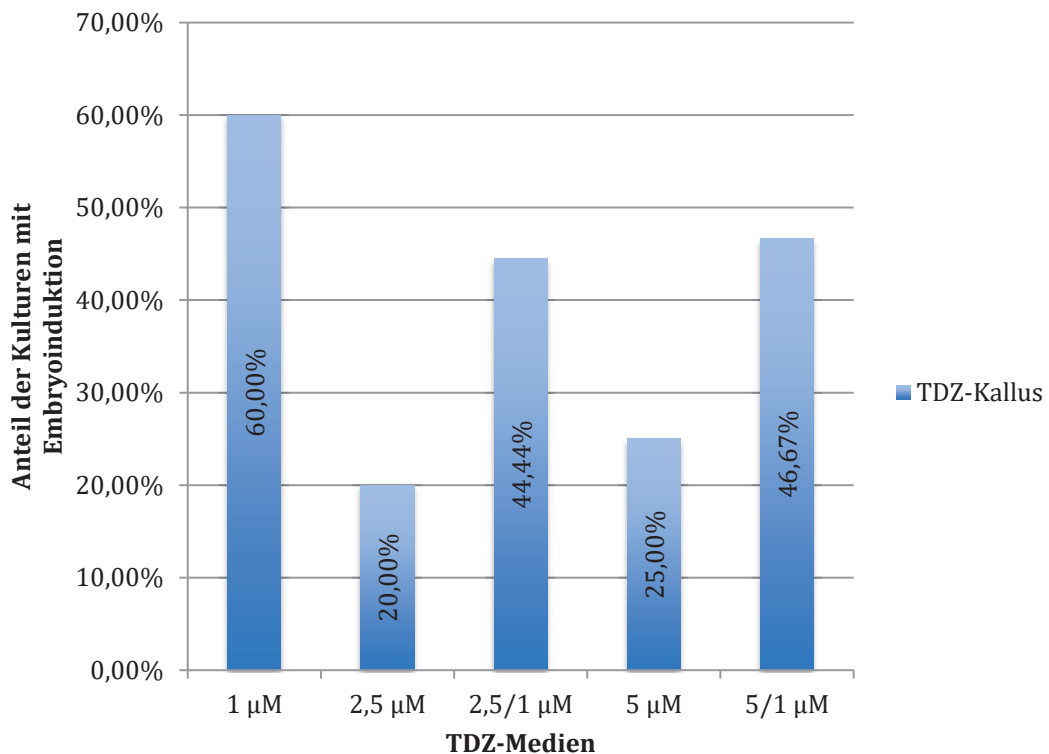
Diagr. 19: Embryoidinduktion auf Medium Z 5 abhängig vom Explantattyp

3.2.2.4.3. Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoidinduktion

Um den Einfluss der Stufe 1-Medien auf die nachfolgende Stufe 2 (Embryoidinduktion) festzustellen, wurde auch hier eine Aufgliederung nach entsprechenden Stufe 1-Medien vorgenommen. Im Fall des mittels 2,4-D hergestellten Kallus wurde darauf verzichtet, ein Diagramm zu erstellen, da hier lediglich in einer einzigen Kultur des Mediums 2,4-D 5/1 die Entwicklung von wenigen embryoiden Strukturen erreicht werden konnte.

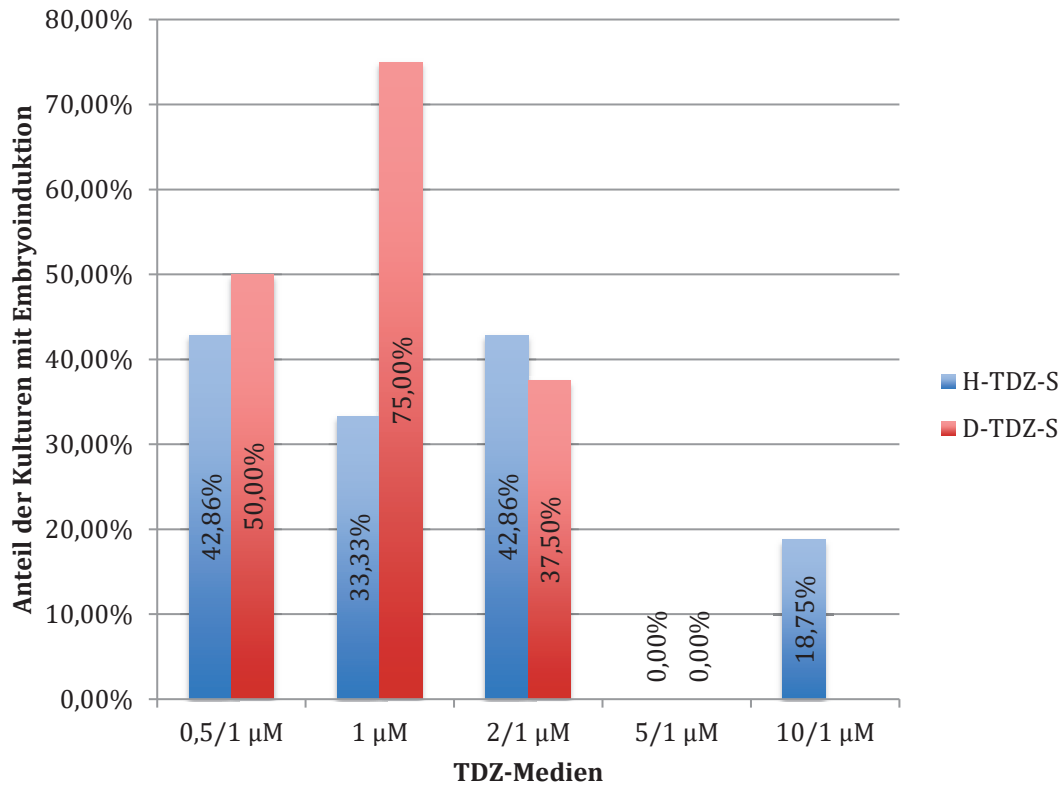
Bei dem TDZ-Kallus konnte hingegen eine gute Embryoidinduktionsrate erzielt werden, bei Kallus von Medium TDZ 1 betrug sie 60,0 %. Auch das zunächst mit 5 μ M TDZ induzierte und dann auf Medium mit 1 μ M TDZ weiterkultivierte Gewebe (Medium TDZ 5/1) zeigte auf Medium Z 5 in 46,7 % der Kulturen die Bildung von Embryoiden. Generell ließen sich mit Kalli, die nach der Kallusinduktionsphase auf einem Erhaltungsmedium mit 1 μ M TDZ weiterkultiviert wurden, stets bessere Ergebnisse erzielen als mit solchen, die

auf den Medien mit den ursprünglichen, höheren TDZ-Konzentrationen belassen wurden (s. Diagr. 20).



Diagr. 20: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Kallus auf Medium Z 5

Mit Kalli, die aus intakten TDZ-Sämlingen entstanden waren, konnten in der Kombination von Stufe 1-Medium TDZ 1 und 5 µM Zeatin ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden. Die Kultur im Dunklen war hier von wesentlichem Vorteil, da eine Embryoinduktion in 75,0 % der Kulturen möglich war (s. Diagr. 21, S. 60). Bei den Kulturen unter Lichteinfluss konnten hier deutlich schlechtere Ergebnisse (33,3 %) beobachtet werden. Bei Kallus vom Stufe 1-Medium 0,5/1 konnte im Dunkeln in der Hälfte der Kulturen das Auftreten von Embryoiden registriert werden, während es unter Lichtkultur 42,9 % waren.



Diagr. 21: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Sämlingen mit und ohne Lichteinfluss auf Medium Z 5

3.2.2.4.4. Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum

Die 2,4-D-Kalli zeigten in 47,4 % der Fälle kein Wachstum, 15,2 % der Kulturen wiesen wenig Kalluswachstum auf, 10,5 % mittleres und 26,3 % der Kulturen gutes Kalluswachstum. Zum Zeitpunkt der Auswertung befanden sich noch 42,1 % der Kulturen in einem schwachen Wachstumsprozess. Alle Explantate waren ockerfarben und mehr als die Hälfte (63,2 %) zeigten eine weiche, matschige Konsistenz. Der andere Teil der Kulturen war von lockerer, zerbröselnder (21,5 %) und fester (15,8 %) Struktur. In 52,6 % konnte eine glatte Oberfläche der Kallusaggregate beobachtet werden, und in 47,4 % der Kulturen war ein weißlicher, kristalliner Überzug der Zellmassen zu verzeichnen. Alle Kulturen wiesen dunkle, nodulare Strukturen auf (s. Abb. 16, S. 62).

Die Kalli aus TDZ-Kotyledonenschnitten wuchsen ausgesprochen gut, lediglich 3,2 % zeigten kein Wachstum; 74,2 % der Kulturen konnten sogar der höchsten

Wachstums-kategorie zugeordnet werden und 16,1 % zeigten immerhin noch mittleres Wachstum. Die Vitalität nahm mit Fortdauer des Experiments ab, so dass zum Zeitpunkt der Auswertung 54,8 % der Kulturen das Wachstum eingestellt hatten. Bezüglich der Farbe zeigte sich hier eine annähernd gleichmäßige Verteilung von ockerfarbenem (32,3 %), ocker/braunem (37,1 %) und braunem (30,6 %) Gewebe. Die Mehrheit der Kalli war von lockerer, zerbröselnder Struktur (72,6 %), gefolgt von Kalli mit fester Konsistenz (22,9 %). In 43,5 % der Kulturen konnte eine raue Oberfläche der Kallusaggregate beobachtet werden, in 25,8 % waren die Zellhaufen mit einem weißlichen, kristallartigen Überzug versehen, und in 17,7 % der Fälle zeigte sich eine nodulare Struktur.

Bei den TDZ-Sämlingen im Dunkeln zeigten alle Kulturen Wachstum (27,8 % sehr gutes und 44,4 % mittleres Wachstum). Die Kulturen unter Lichteinfluss wuchsen in deutlich geringerem Ausmaß: In 38,9 % der Kulturen konnten keine Wachstumsprozesse beobachtet werden, 53,7 % zeigten wenig und 3,7 % mittleres und sehr gutes Wachstum. Bei Ende des Experiments befand sich die Hälfte der Kulturen unter Lichtausschluss in schwachem Wachstum. Die Kulturen unter Licht zeigten in 59,3 % der Fälle kein Wachstum mehr. Unter Zeatineinfluss konnte bei den Kulturen im Licht eine deutliche Tendenz zu brauner Verfärbung festgestellt werden (79,6 %), im Dunkeln war dies bei 50,0 % der Kulturen der Fall. Die Konsistenz war bei diesen Explantaten überwiegend locker zerbröselnd (88,9 %), in den restlichen Kulturen lagen feste Kallusmassen vor. Bei den Kulturen unter Lichteinwirkung war etwa die Hälfte (53,7 %) von fester, 38,9 % von lockerer, zerbröselnder, und 7,4 % von knötchenförmiger Struktur. Die Kallusaggregate im Licht wiesen zu 51,8 % eine raue Oberfläche auf, während 29,6 % eine kristallähnliche Struktur besaßen. 18,52 % zeigten eine nodulare Oberfläche und in etwa der Hälfte der Kulturen konnte das Auftreten nodularer, dunkler Strukturen festgestellt werden. Die Kulturen, die unter Lichtausschluss kultiviert wurden, zeigten zu 55,5 % eine raue Oberfläche, zu 38,9 % konnte eine nodulare Struktur beobachtet werden und bei 5,6 % war ein weißlicher, kristalliner Überzug zu bemerken. In allen diesen Kulturen konnten dunkle Knötchen aufgefunden werden.

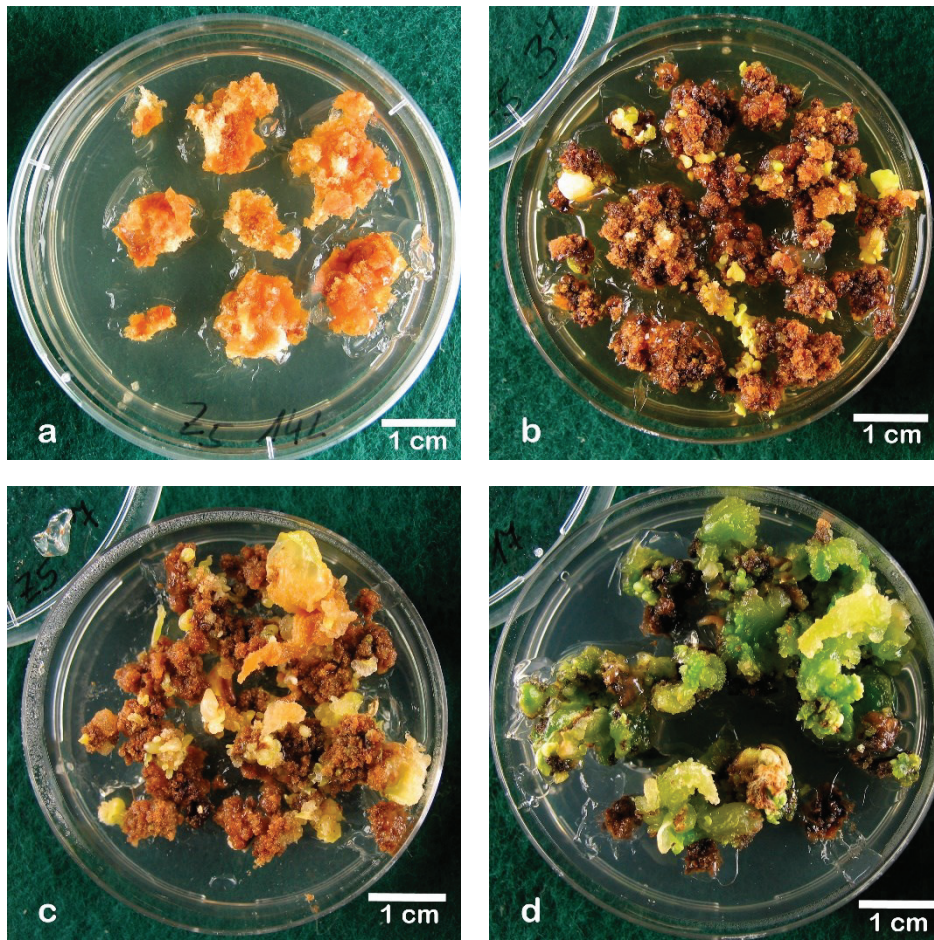
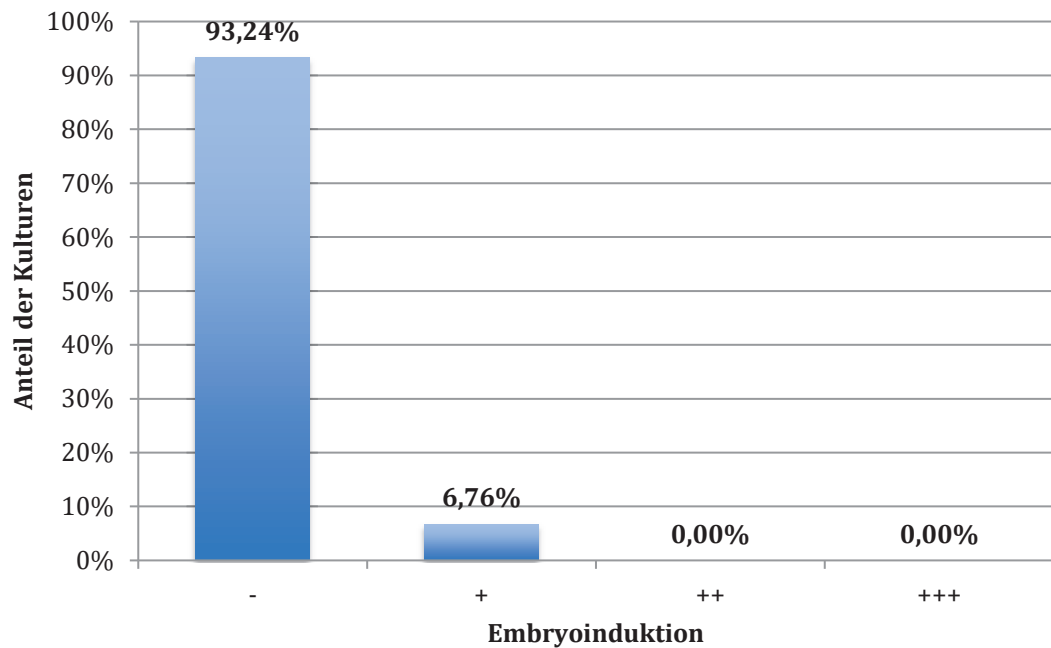


Abb. 16: Kallusgewebe unterschiedlicher Herkunft auf Medium Z 5 zum Zeitpunkt der Auswertung: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D gewonnen, b) Kallusgewebe aus Kotyledonenschnitten von TDZ-hältigen Medien, c) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss, d) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichteinfluss

3.2.2.5. Embryoinduktion mittels Glutamin

Die Aminosäure Glutamin ist in den Stickstoffwechsel der Pflanze involviert und stellt der Pflanze zusätzlichen Stickstoff zur Verfügung. In vielen Fällen führt der Zusatz von Aminosäuren zu einer Verbesserung der Embryogenese oder ist sogar essentiell (George 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde Glutamin in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Grundsätzlich zeigte sich eine niedrige Embryoinduktionsrate von 6,7 % (s. Diagr. 22, S. 63).



Diagr. 22: Einfluss von 10 mM Glutamin auf die Embryoidbildung. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

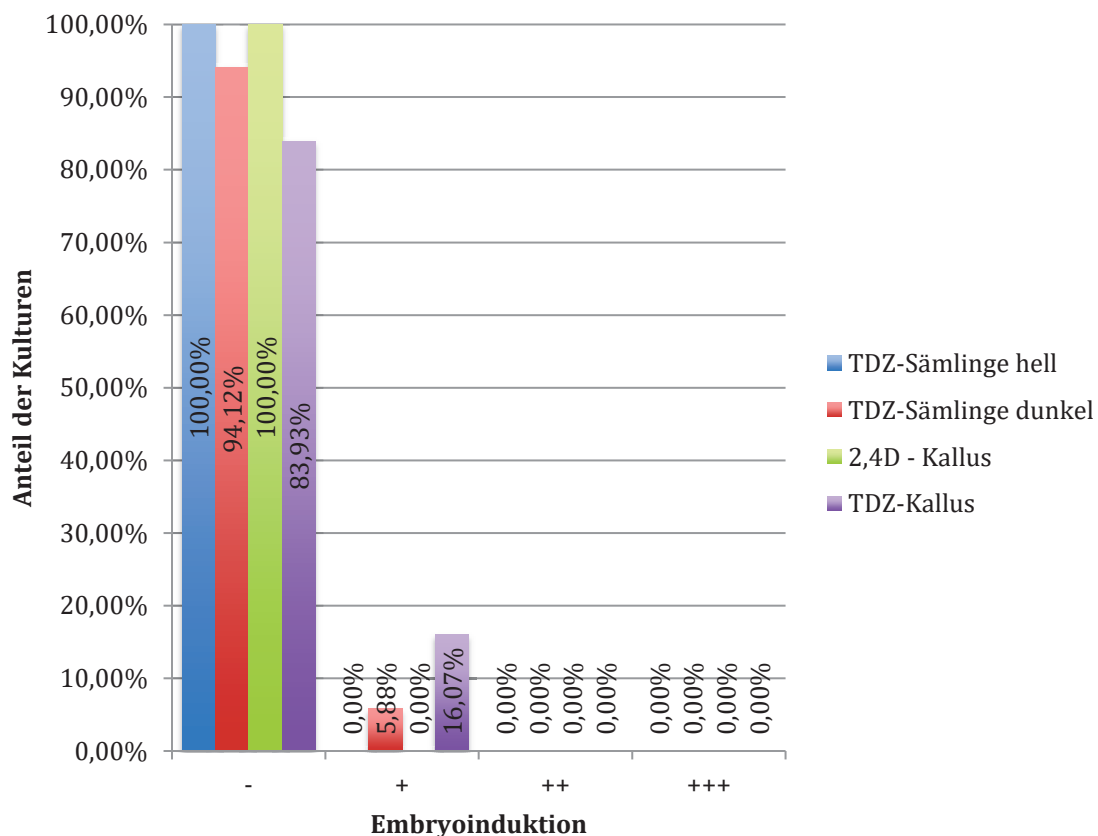
Die Anzahl der Regenerate belief sich auf etwa 23 % (s. Tab. 12). Sekundäre Strukturen und Keimlinge kamen gar nur in 0,7 % der Kulturen vor. Daher scheint dieses Stufe 2-Medium zur Embryoinduktion nicht geeignet.

Tab. 12: Häufigkeit der gebildeten Strukturen auf Medium GI 10

GI10	Häufigkeit
Embryoide	6,76 %
Regenerate	22,97 %
Adventivsprosse	17,57 %
Sekundäre Embryoide	0,68 %
Keimlinge	0,68 %

3.2.2.5.1. Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion

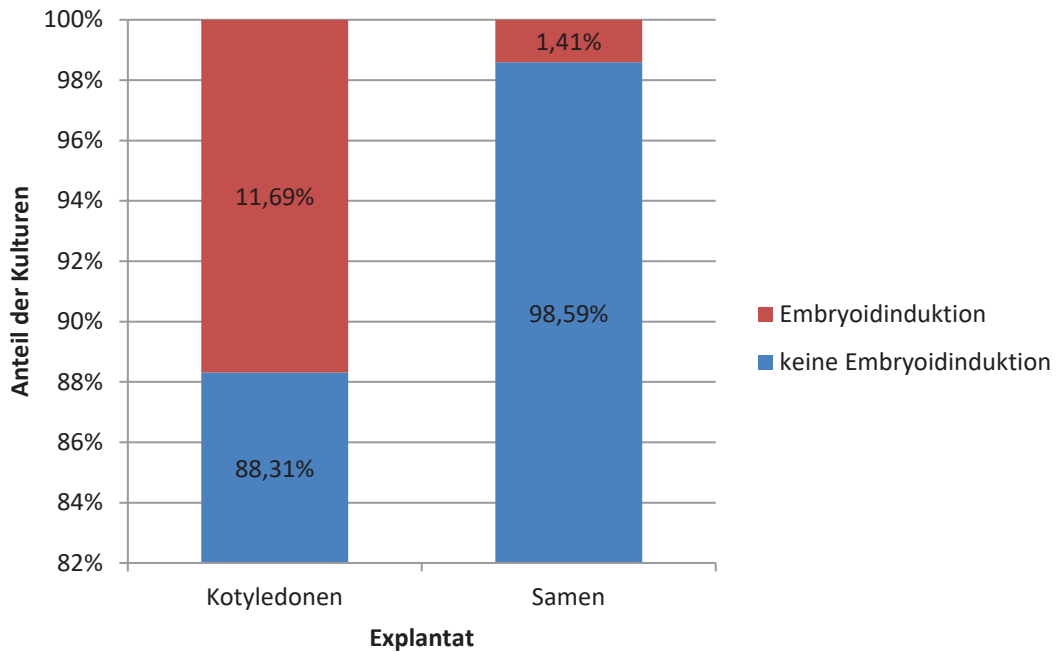
In Diagramm 23 wird die geringe Embryoinduktionsrate deutlich. Mit 2,4-D-Kallusgewebe konnte keine Bildung von embryoiden Strukturen erreicht werden. Im Fall des TDZ-Kallus konnten nur in 16,1 % der Kulturen Embryoide nachgewiesen werden, und bei den TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss war dies bei 5,9 % der Kulturen der Fall. Bei Kultivierung im Licht erfolgte keine Entwicklung von Embryoide.



Diagr. 23: Häufigkeit der Induktion embryoider Strukturen auf Medium GI 10 bezogen auf die Versuchsansätze zur Kallusinduktion. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

3.2.2.5.2. Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion

Die Explantate aus Kotyledonen zeigten hier deutlich bessere Ergebnisse (s. Diagr. 24, S. 65), die Ausbeuten an Embryoide waren jedoch insgesamt sehr gering.



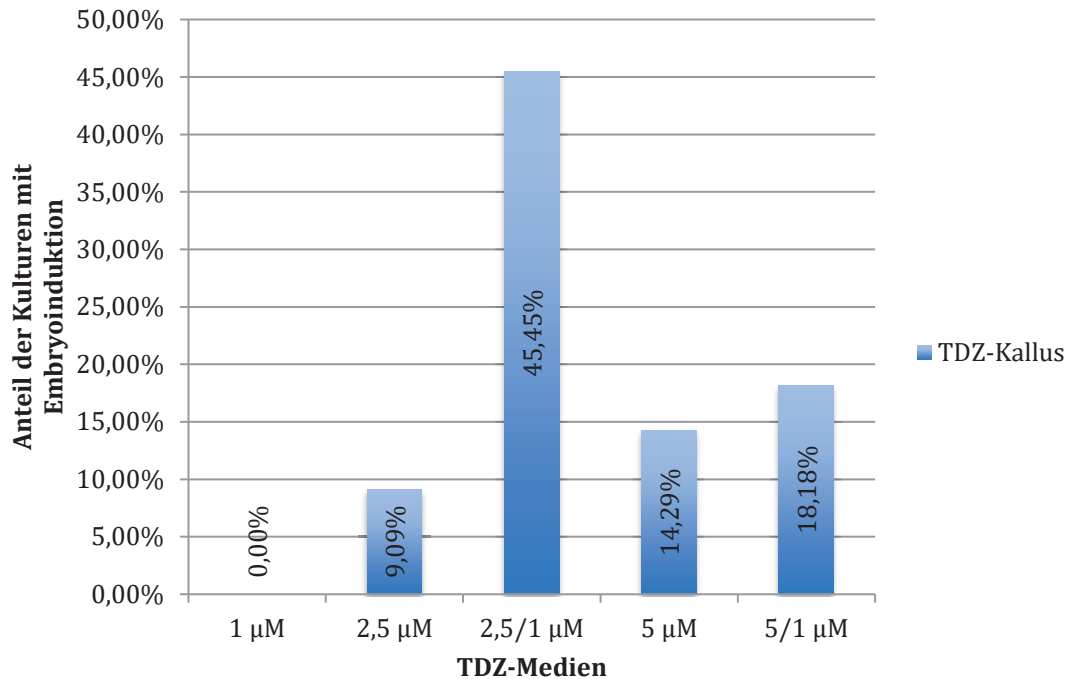
Diagr. 24: Embryoinduktion auf Medium GI 10 abhängig vom Explantattyp

3.2.2.5.3. Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion

Bei den mittels 2,4-D gewonnenen Kalli konnte keine Embryoinduktion erwirkt werden, beim Kallus aus TDZ-Sämlingen fand die Entstehung vom Embryoiden nur in einer Kultur auf dem Medium TDZ 5/1 unter Lichtausschluss statt. Bei den TDZ-Kalli muss das Stufe 1-Medium TDZ 2,5/1 hervorgehoben werden, da hier in 45,4 % der Kulturen Embryoide ausgebildet wurden, die Stufe 1 Medien TDZ 5 und TDZ 5/1 lagen mit 14,3 % und 18,2 % deutlich darunter. Auch hier steigerte die Einführung des Erhaltungsmediums mit 1 μ M TDZ die Embryoinduktion (s. Diagr. 25, S. 66).

3.2.2.5.4. Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum

Bei 2,4-D-Kalli fand während der gesamten Zeitspanne des Experiments nur in 11,1 % der Kulturen Kalluswachstum statt, zum Zeitpunkt der Auswertung waren es nur noch 5,6 %. Die Gewebe waren in 94,4 % der Kulturen ockerfarben und von weicher, fast matschiger Konsistenz In 88,89 % hatten die



Diagr. 25: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Kallus auf Medium GI 10

Explantate eine glatte Oberfläche, ansonsten wiesen sie einen weißlichen, kristallinen Überzug auf (s. Abb. 17., S. 67). In etwa der Hälfte der Kulturen (55,6 %) konnten dunkle Knötchen beobachtet werden.

Im Fall des TDZ-Kallus konnte ein deutlich besseres Wachstum festgestellt werden. So war in 45,8 % der Kulturen wenig, in 13,6 % mittleres und in 11,9 % sehr gutes Kalluswachstum sichtbar. Zu Ende des Experimentes konnte nur in 18,6 % der Petrischalen wenig Kalluswachstum festgestellt werden. Die Zellmassen waren in 45,8 % der Fälle ocker/braun gefärbt, in 30,5 % ocker und in 23,7 % braun. Die Struktur war in etwa der Hälfte der Kulturen (55,9 %) fest, 32,2 % zeigten weiche, matschige Struktur und in 11,9 % konnte eine lockere, zerbröselnde Konsistenz beobachtet werden. Die Oberfläche der Kallusaggregate war zu 30,5 % rau, bei 30,5 % von nodularer Struktur und bei 18,6 % weißlich kristallartig bzw. glatt. Die Entstehung kleiner dunkler Knötchen konnte in 98,3 % der Kulturen beobachtet werden.

Das Kallusgewebe der TZD-Sämlinge ließ weder im Dunklen noch im Licht Wachstum erkennen. Die Explantate zeigten eine deutliche Tendenz zur

Braunfärbung, die im Licht mit 79,9 % ausgeprägter war als bei Kultur im Dunkeln (50,0 %). Während die Kulturen im Licht vorwiegend feste Strukturen (53,7 %) ausbildeten, gefolgt von lockeren, zerbröselnden Explantaten (38,9 %) und nodularen Strukturen (7,4 %), kamen bei den Kulturen im Dunkeln ausschließlich feste Strukturen vor. Die Oberfläche war in beiden Fällen überwiegend rau (Dunkelkultur 88,2 %, Lichtkultur 79,6 %) und in allen Kulturen konnte das Auftreten dunkler Knötchen beobachtet werden.

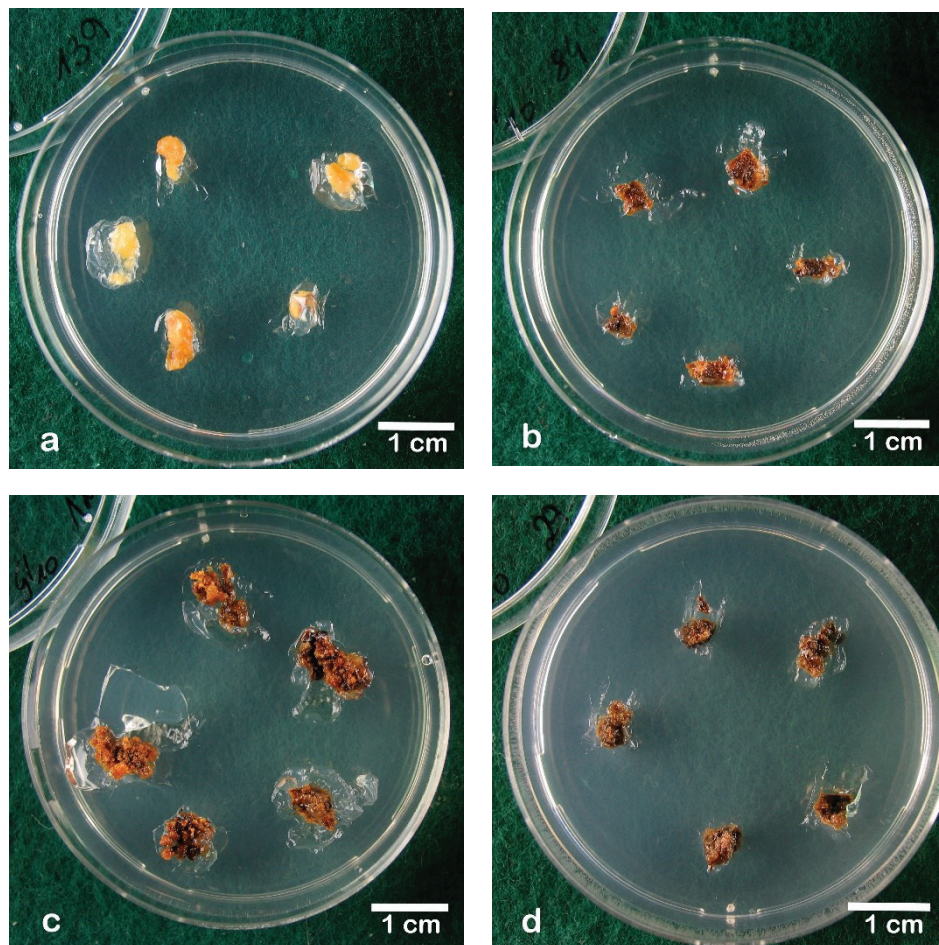
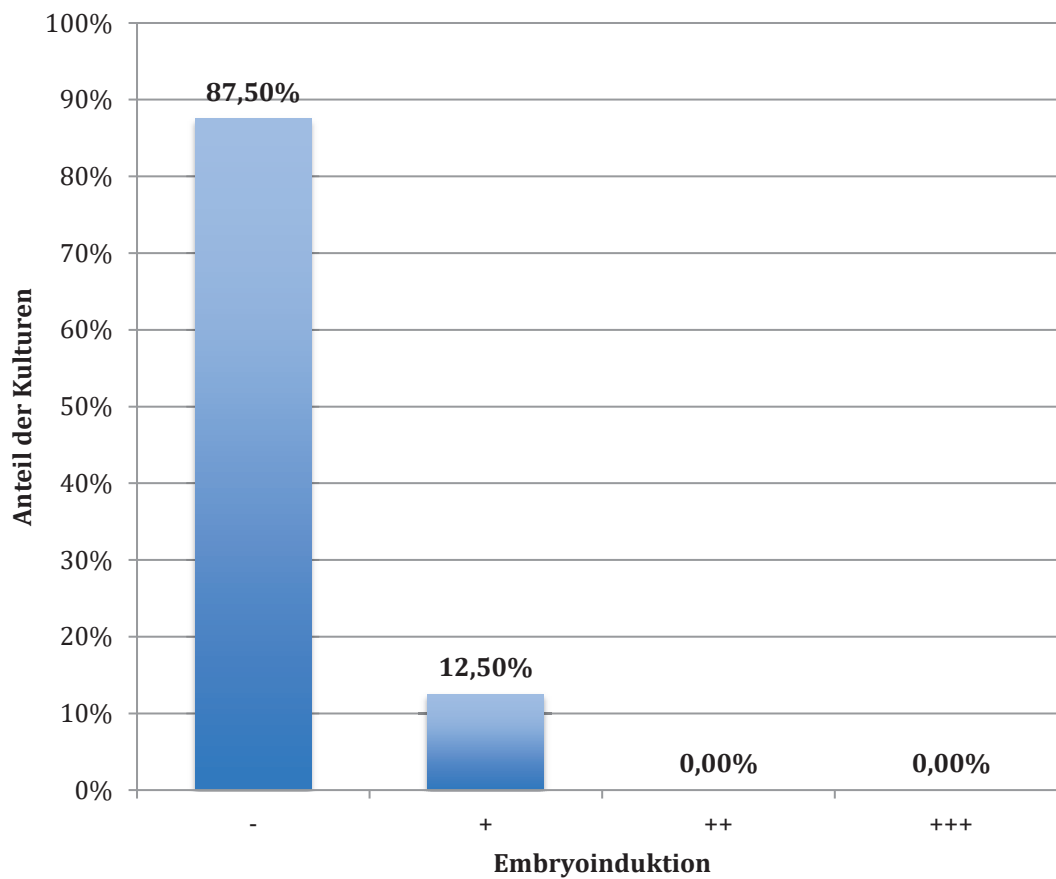


Abb. 17: Kallusgewebe unterschiedlicher Herkunft auf Medium GI 10 zum Zeitpunkt der Auswertung: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D gewonnen, b) Kallusgewebe von Kotyledonenschnitten auf TDZ-hältigen Medien, c) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss, d) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichteinfluss

3.2.2.6. Embryoinduktion mittels Glutamins unter Stickstoff-reduzierung

Da Glutamin als zusätzliche Stickstoffquelle den Stickstoffmetabolismus der Pflanzen beeinflusst, wurde in Medium G10-N der Stickstoffgehalt reduziert. Eine Variation des Verhältnisses von Ammonium- und Nitrat-Ionen kann Einfluss auf die Embryoidbildung haben (George 1993). In unserer Arbeit setzten wir Glutamin in einer Konzentration von 10 mM ein und reduzierten den Stickstoffgehalt, indem der Makronährstoff Ammoniumnitrat dem Medium nicht zugesetzt wurde. In dieser Kombination konnte eine Embryoinduktionsrate von 12,5 % erreicht werden (s. Diagr. 26).



Diagr. 26: Einfluss von Medium G10-N auf die Embryoidbildung. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

Es wurden weiters in 30,6 % der Kulturen Regenerate gebildet. Sekundäre embryoide Gebilde konnten in 2,8 % der Petrischalen beobachtet werden, und

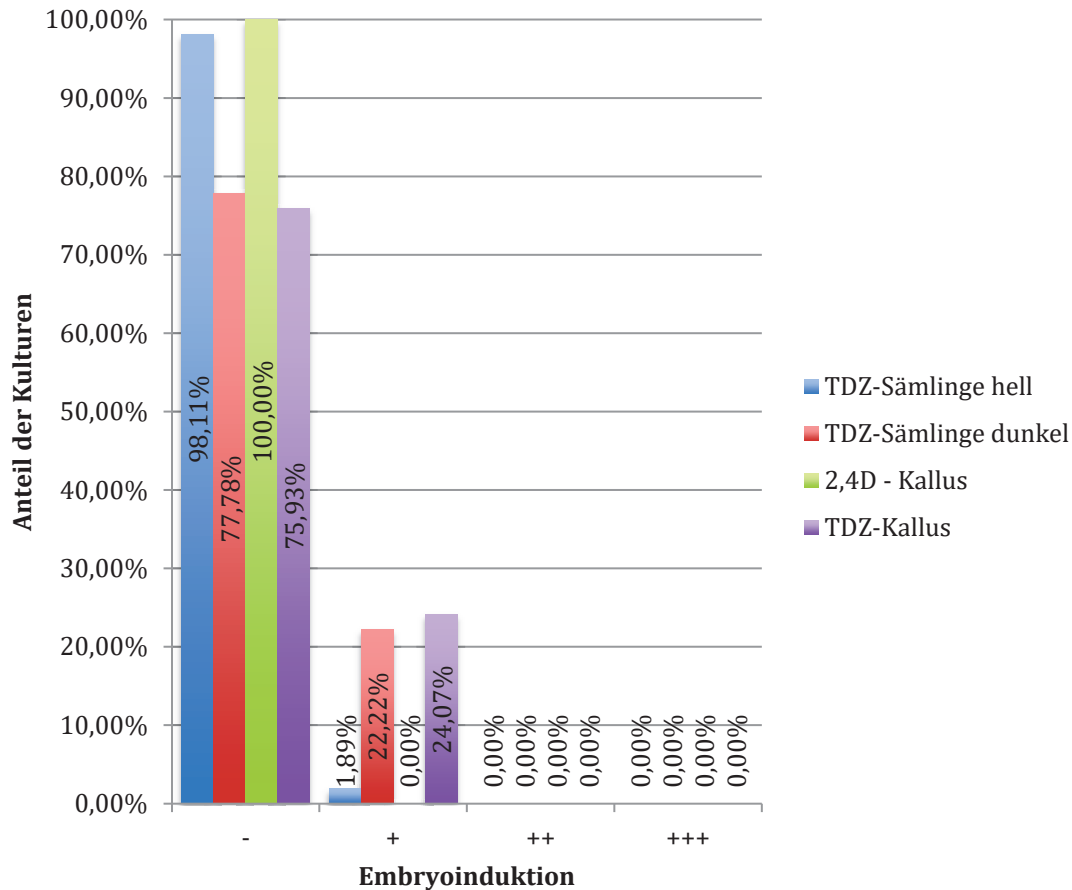
in 0,7 % der Fälle wurde das Auftreten von Keimlingen registriert (s. Tab. 13). Letztlich bleiben die Ergebnisse aber hinter denen, der mittels Cytokinen, erzielten zurück.

Tab. 13: Häufigkeit der gebildeten Strukturen auf Medium GI10-N

GI10-N	Häufigkeit
Embryoide	12,5 %
Regenerate	30,56 %
Adventivsprosse	22,22 %
Sekundäre Embryoide	2,78 %
Keimlinge	0,69 %

3.2.2.6.1. Einfluss des Kallusmaterials auf die Embryoinduktion

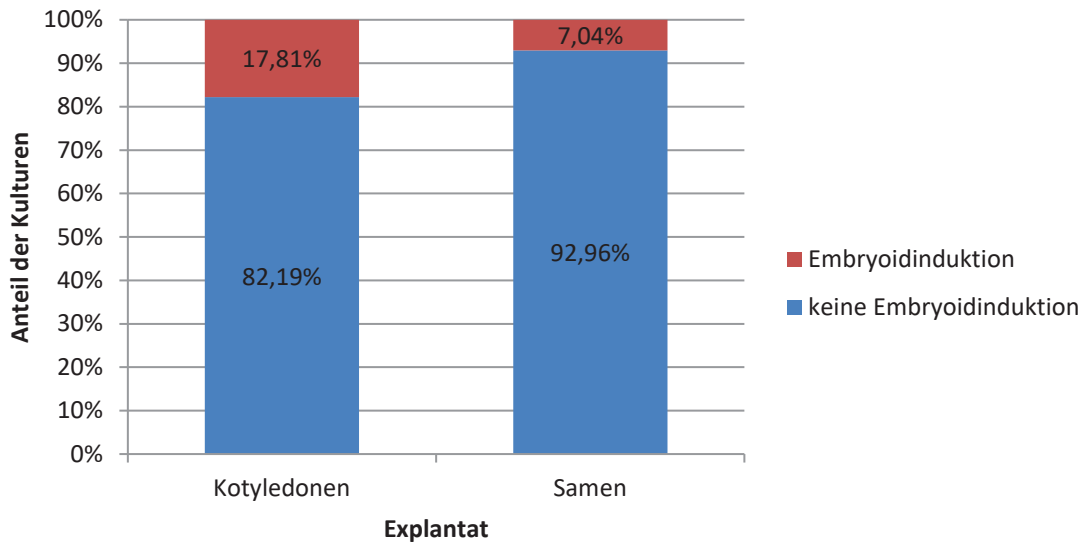
Auch in Diagramm 27 (S. 70) wird ersichtlich, dass der überwiegende Teil der Kulturen keine Embryoide hervorbrachte. Lediglich in 24,1 % der Kulturen von TDZ-Kallus und in 22,2 % der Kulturen von Kallus aus TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss konnte somatische Embryogenese induziert werden. Bei Kallus von TDZ-Sämlingen in Lichtkultur wurden in 1,9 % der Kulturen wenig embryoide Strukturen gebildet.



Diagr. 27: Häufigkeit der Induktion embryoider Strukturen auf Medium GI10-N bezogen auf die Versuchsansätze zur Kallusinduktion. Einteilung der Embryoide in Gruppen nach Häufigkeit des Auftretens (- = keine Embryoidbildung, + = wenig Embryoidbildung, ++ = mittlere Embryoidbildung, +++ = hohe Embryoidbildung).

3.2.2.6.2. Einfluss des Explantats auf die Embryoinduktion

Auf dem Stufe 2-Medium GI10-N bildeten 17,8 % der von Kotyledonenschnitten gewonnenen Explantate Embryoide aus. Bei den auf TDZ-Medien gekeimten Samen konnte nur in 7,0 % der Kulturen somatische Embryogenese induziert werden (s. Diagr. 28, S. 71). Daher ist in Kombination mit diesem Stufe 2-Medium die Kallusgewinnung mittels Kotyledonenschnitten zu präferieren.

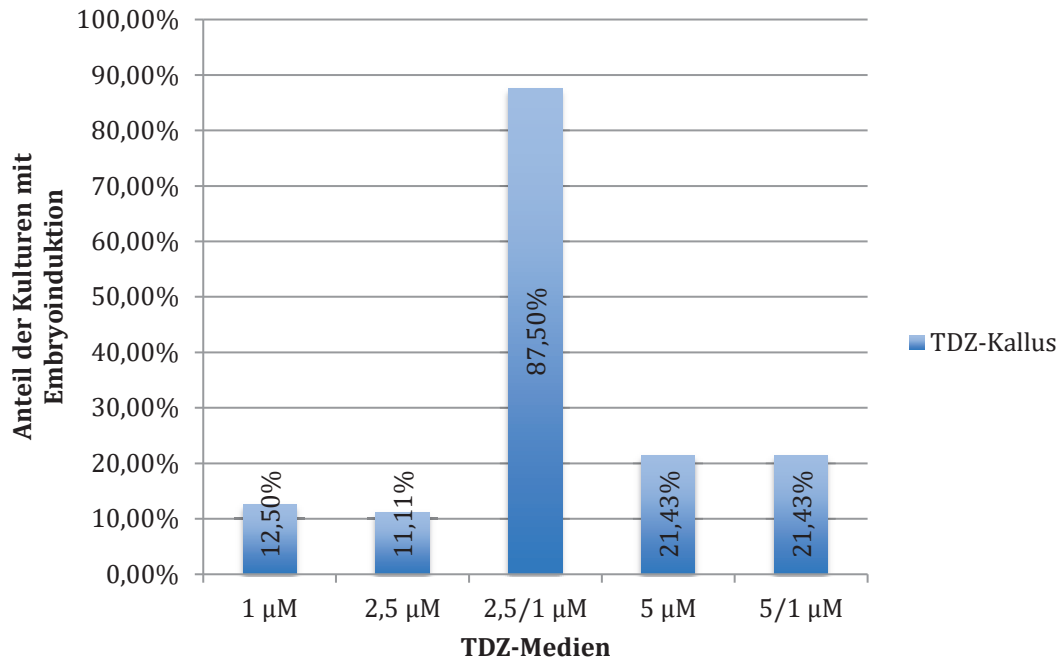


Diagr. 28: Embryoinduktion auf Medium GI10-N abhängig vom Explantattyp

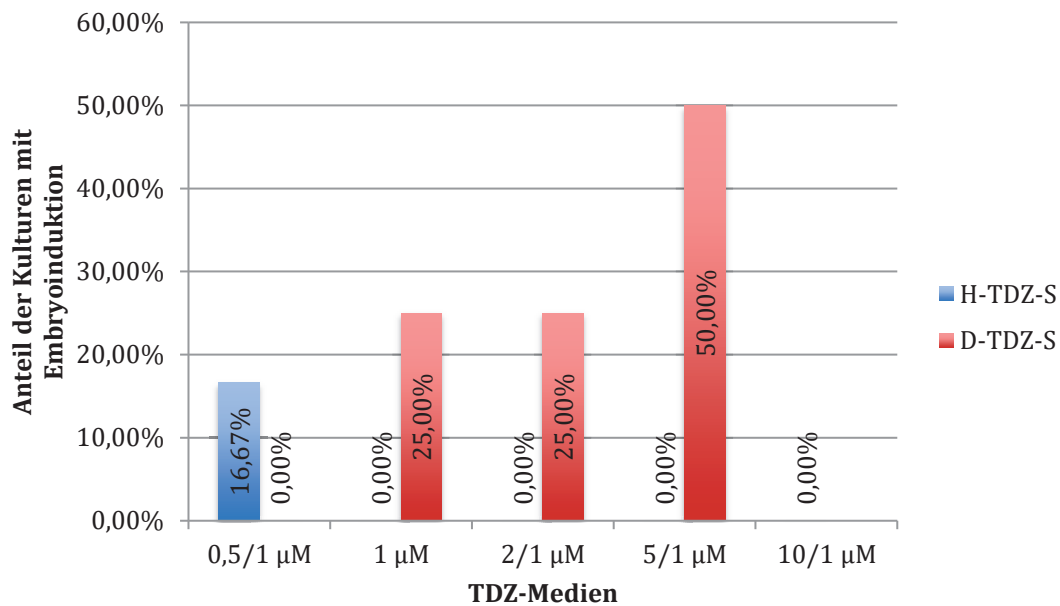
3.2.2.6.3. Einfluss der Stufe 1-Medien auf die Embryoinduktion

2,4-D-Kallusgewebe bildete auf dem Stufe 2-Medium GI10-N keine Embryoide aus, daher konnte hier keine Auswertung vorgenommen werden. Die beste Embryoinduktion an TZD-Kallus trat mit 87,5 % bei Kallus von Medium TDZ 2,5/1 auf. Allerdings war die Embryoinduktionsrate auf dem Stufe 2-Medium GI10-N generell sehr niedrig, sodass dieses Medium zur Embryoinduktion nicht geeignet zu sein scheint (s. Diagr. 29, S. 72).

Die Kulturen von Kallus der TDZ-Sämlinge zeigten die besten Ergebnisse bei dem Stufe 1-Medium TDZ 5/1 unter Lichtausschluss. Im Licht kam es nur bei 16,67 % der Kalli von Medium TDZ 0,5/1 zu Embryoinduktion. Alle anderen Stufe 1-Medien waren in Kombination mit Medium GI10-N nicht für die somatische Embryogenese geeignet (s. Diagr. 30, S. 72).



Diagr. 29: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Kallus auf Medium Gl10-N



Diagr. 30: Häufigkeit der Embryoinduktion bei TDZ-Sämlingen auf Gl10-N – hältigem Medium

3.2.2.6.4. Einfluss des Stufe 2-Mediums auf das Kalluswachstum

Insgesamt wirkte das Kallusgewebe der Kulturen auf dem Stufe 2-Medium GI10-N nicht sehr vital. Das Wachstum war jedoch im Vergleich zu dem Stufe 2-Medium GI10 deutlich besser, sodass die Reduktion des Stickstoffgehalts hier eindeutig von Vorteil war.

Das mittels 2,4-D induzierte Kallusgewebe zeigte in 31,4 % der Kulturen wenig Wachstum, in 10,5 % der Kulturen konnte mittleres und sehr gutes Kalluswachstum beobachtet werden. Bei Beendigung des Experiments hatten 84,2 % das Wachstum eingestellt und lediglich 15,8 % der Kulturen ließen geringes Kalluswachstum erkennen. Alle Kulturen waren ocker gefärbt und zeigten eine weiche, matschige Konsistenz. In 63,2 % der Kulturen hatten die Kallusaggregate eine glatte Oberfläche, während 36,8 % einen weißlichen, kristallartigen Überzug aufwiesen. Bei allen Kulturen konnte das Auftreten der dunklen nodularen Strukturen beobachtet werden (s. Abb. 18; S. 74).

Die TDZ-Kalli zeigten gutes Wachstum: So konnte in 20,4 % der Kulturen wenig Kalluswachstum beobachtet werden, während in 22,2 % mittleres und in 25,9 % sehr gutes Wachstum registriert werden konnte. Zum Zeitpunkt der Auswertung zeigten 64,8 % der Kulturen kein, 29,6 % wenig und 5,6 % mittleres Wachstum. Die Färbung des Kallus war mehrheitlich ocker/braun (61,1 %), es fanden sich jedoch auch Kulturen mit ockerfarbener (24,1 %) und brauner Färbung (14,8 %). Die Hälfte der Kulturen (51,8 %) zeigten eine feste Struktur, 31,5 % waren von weicher, fast matschiger Konsistenz und 16,7 % wiesen lockere, zerbröselnde Zellmassen auf. Auch die Oberfläche dieser Kalli war unterschiedlich ausgestaltet. So reichte sie von rauer Textur (46,3 %) über weißliche, kristallartige Überzüge (22,2 %) bis zu glatter (11,1 %) Beschaffenheit. Auch hier konnte in allen Kulturen das Vorhandensein von dunklen, nodularen Strukturen beobachtet werden.

Die von TDZ-Sämlingen erhaltenen Kalli zeigten insgesamt sehr schlechtes Wachstum. Die im Dunkeln kultivierten Explantate wuchsen auf Medium GI10-N überhaupt nicht, und die unter Lichteinfluss kultivierten Kalli wiesen nur in 1,9 % der Kulturen wenig Wachstum auf. Wir konnten eine deutliche Tendenz

zur Braunfärbung feststellen, welche bei den im Licht kultivierten Kalli in 79,2 % der Kulturen besonders ausgeprägt war. Die Braunfärbung trat in den unter Lichtausschluss kultivierten Geweben weniger häufig auf (44,4 %). Generell war der Kallus fast ausschließlich von fester Konsistenz, bei den Kulturen im Licht wies die Oberfläche zu 96,2 % eine raue Textur auf. Dies war bei 66,7 % der Kulturen im Dunkeln der Fall. Die Entstehung dunkler Knötchen konnte im Licht bei 58,5 % der Kulturen beobachtet werden, während sie bei den Kulturen im Dunkeln immer auftraten (Abb. 18).

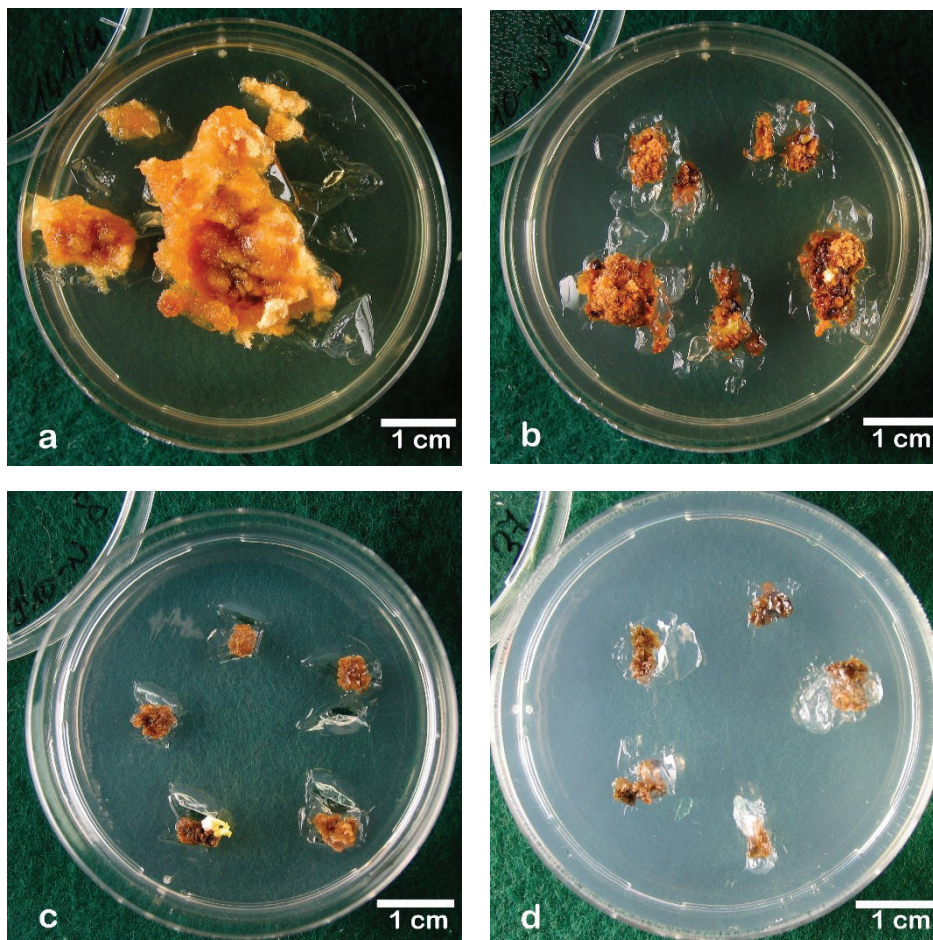


Abb. 18: Kallusgewebe unterschiedlicher Herkunft auf Medium GI10-N zum Zeitpunkt der Auswertung: a) Kallusgewebe mittels 2,4-D gewonnen, b) Kallusgewebe von Kotyledonenschnitten auf TDZ-hältigen Medien, c) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichtausschluss, d) Kallusgewebe von TDZ-Sämlingen unter Lichteinfluss

4. Diskussion

Die Droge *Liquiritiae Radix* stammt heutzutage ausschliesslich aus dem Anbau (Hensel et al., 2016), sodass der schnellen Vermehrung der Pflanze besondere Bedeutung zukommt. Aufgrund der unterschiedlichen Inhaltsstoffe (insbesondere Glycyrrhetinsäure und Flavonoide) und der entsprechenden Anwendungen würde sich die Kultivierung selektionierter Genotypen mit definiertem Gehalt an gewünschtem Inhaltsstoff anbieten. Im kommerziellen Anbau erfolgt die Vermehrung des Süßholzes über Samen sowie vegetativ über Stecklinge (Karkanis et al., 2018). Letztere Methode liefert genetisch einheitliche Pflanzen, jedoch ist die konventionelle Stecklingsvermehrung arbeitsintensiv und langsam. Die in vitro-Vermehrung mittels somatischer Embryogenese stellt eine effiziente Technik dar, um Pflanzen rasch und in großem Maßstab zu vermehren (Von Arnold et al., 2001). Genotypen mit definiertem Wirkungsspektrum lassen sich schnell in grossen Mengen genetisch einheitlich vermehren, was die gezielte Produktion von definiertem Drogenmaterial ermöglicht.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag in fortführenden Untersuchungen zur indirekten somatischen Embryogenese, aufbauend auf der Arbeit von Lämmermeyer (2007), welche die Kallusinduktion mittels des Auxins 2,4-D untersuchte. Die endogenen und exogenen Auxinkonzentrationen scheinen eine essentielle Bedeutung für die Induktion der somatischen Embryogenese zu haben. Der Grund dafür dürfte in einer geänderten Genexpression liegen (George, 1993). Aufgrund der Eigenschaft der Auxine, die Umwandlung von somatischen Zellen in embryogene Zellen auszulösen, kommen sie vor allem in der Kallusinduktionsphase (Stufe 1 der somatischen Embryogenese) zum Einsatz. Das meistverwendete Auxin diesbezüglich stellt die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) dar (Jimenez, 2001). Auch Kombinationen von 2,4-D mit Cytokinin werden häufig zur Induktion verwendet (Singh und Chand, 2003). Embryogene Strukturen können sich jedoch nur dann entwickeln (Stufe 2 der somatischen Embryogenese), wenn die Konzentration des Auxins gesenkt wird bzw. auf gänzlich auxinfreiem Medium. Wird eine hohe Auxinkonzentration beibehalten, kommt es zu erneuter Bildung von

embryogenem Gewebe bzw. Kallus an den bereits vorhandenen embryogenen Strukturen, in manchen Fällen auch zu sekundären Embryoiden (George, 1993). Bei Lämmermeyer (2007) zeigte sich, dass Konzentrationen von 5, 10 und 20 μM 2,4-D zur Induktion von embryogenem Kallusgewebe an Kotyledonenexplantaten von *G. glabra* geeignet waren. In der vorliegenden Arbeit sollten nun Versuche zur zweiten Stufe (Embryoinduktion) der indirekten somatischen Embryogenese unternommen werden. Dazu wurde zunächst die Bildung von Kallusgewebe mit einer Konzentration von 5 μM 2,4-D induziert. Als Kohlenstoffquelle kam Saccharose in einer Konzentration von 3 % zum Einsatz: Bei *Vigna unguiculata* zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass Saccharose in dieser Konzentration die embryogene Kompetenz des Kallus fördert und im Vergleich zu Maltose und Mannitol die beste Kohlenstoffquelle für die Kallusinduktion darstellt (Ramakrishnan et al., 2005). In der ersten diesbezüglichen Versuchsreihe konnten wir ockerfarbenes Kallusgewebe mit überwiegend lockerer, nodularer Struktur und glatter, manchmal mit weißlichem, kristallartigem Überzug versehener Oberfläche gewinnen. Ein kleiner Teil der Kulturen zeigte eine weiche, matschige Konsistenz. In beinahe allen Kulturen konnte das Auftreten von dunkelbraunen nodularen Strukturen beobachtet werden, die sich vom umgebenden Gewebe abzugrenzen schienen. Das Wachstum der Kalluskulturen war zögerlich und bei nachfolgender Embryoinduktion konnte nur eine sehr geringe Anzahl an embryoiden Strukturen beobachtet werden (siehe unten). Es ist bekannt, dass es bei längerer Subkultur des Kallusgewebes auf dem Kallusinduktionsmedium zu einem Verlust der embryogenen Kompetenz kommen kann (George 1993, Jimenez 2001). Daher wurde in der Folge ein neuerlicher Versuch mit auf 4 Wochen verkürzter Passagezeit und einem Erhaltungsmedium mit 1 μM 2,4-D angesetzt.

Dass eine Reduktion der 2,4-D-Konzentration zu einer deutlich gesteigerten Embryoinduktion führen kann (Ramakrishnan et al., 2005), konnte in der zweiten Versuchsreihe bestätigt werden, wo die Hälfte der Kulturen nach 12 Wochen auf Erhaltungsmedium passagiert wurde. Durch die Kombination des Erhaltungsmediums mit der verkürzten Passagedauer konnten auch Vitalität und Wachstum des Kallus zumindest leicht verbessert werden. Allerdings

waren die anschliessenden Experimente zur Embryoinduktion an diesem Kallus nur mässig erfolgreich. So konnte beispielsweise bei Einsatz von Adeninsulfat, Kinetin, Glutamin und Glutamin in Abwesenheit von Ammoniumnitrat in den von uns gewählten Konzentrationen keine Embryoinduktion beobachtet werden. Mit den Cytokinin BAP und Zeatin war immerhin in einem geringen Rahmen (BAP: 13 %, Zeatin: 5 % der Kulturen) die Induktion von Embryoiden zu beobachten. In beiden Fällen konnte die höhere Embryoinduktion mit demjenigen Kallusgewebe erzielt werden, das auf dem Erhaltungsmedium weiterkultiviert worden war. Generell scheint jedoch mittels 2,4-D gewonnenes Kallusgewebe von *G. glabra* nicht zur Embryoinduktion auf den in dieser Arbeit untersuchten Stufe 2-Medien geeignet zu sein, da entweder keine oder nur eine sehr geringe Menge an embryoiden Strukturen beobachtet werden konnten.

Thidiazuron (TDZ) stellt ein synthetisches Cytokinin dar, das ursprünglich als Entlaubungsmittel bei der Ernte von Baumwolle diente. Eine grundlegende Eigenschaft der Substanz ist ein Einfluss sowohl auf den Cytokinin- als auch auf den Auxin-Metabolismus der Pflanze (Jones et al., 2007; Visser et al., 1992). Da Wuchsstoffkombinationen von Auxinen und Cytokinin erfolgreich bei der somatischen Embryogenese eingesetzt wurden (Visser et al., 1992), kommt auch TDZ, welches sozusagen beide Wuchsstoffklassen in sich vereint, des Öfteren zum Einsatz (Visser et al., 1992; Kahn et al., 2006, Saxena et al., 1992). In der Literatur sind Konzentrationsbereiche von 0,2 bis 20 μM TDZ zu finden (Visser et al., 1992; Singh et al., 2003). Weiters wurde berichtet, dass bei niedrigeren TDZ-Konzentrationen vermehrt Organogenese auftritt und erst bei höheren Konzentrationen somatische Embryogenese beobachtet werden konnte (Mithila et al., 2003). TDZ kann mit guten Erfolgen auch für die direkte Embryogenese (d.h. die Bildung der Embryoide erfolgt ohne Kallusstufe direkt am Explantat) eingesetzt werden (Iantcheva et al. 1999; Ipekci und Gozukirmizi, 2003; Murthy et al., 1995; Singh et al., 2003; Zhang, 2001). Dabei besteht auch die Möglichkeit, Samen direkt auf TDZ-hältigem Medium zu keimen: So konnten Saxena et al. (1992) direkte Embryogenese an Sämlingen von *Arachis hypogaea* nach Keimung auf Nährmedium mit 10 μM TDZ erzielen. Diese Vorgangsweise sollte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit an *G. glabra* erprobt werden.

Es wurden folglich Samen direkt auf TDZ-hältigen Medien zur Keimung gebracht. Hierzu wurden mehrere Konzentrationen des Wuchsstoffes in einem Bereich von 0,5 μM bis 10 μM gewählt. Die Hälfte der Samen wurde unter Lichtausschluss gekeimt, während die andere bei einem 16 h-Tag inkubiert wurden. Aufgrund des Lichtmangels zeigten die Keimlinge der Dunkelkultur starkes Streckungswachstum und fehlende Chlorophyllbildung, weiters zeigten die Keimlinge deutliche Stresssymptome wie vermindertes Wurzelwachstum, die mit steigender TDZ-Konzentration zunahmen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Gairi und Rashid (2004) bei *Azadirachta indica*. Wir konnten jedoch auf diesem Weg keine direkte somatische Embryogenese erzielt werden, da sich auch bei einer Wiederholung des Experiments keine embryoiden Strukturen entwickelten. Allerdings wurde das Auftreten von Kallusbildung auf allen eingesetzten TDZ-Medien beobachtet. In der Folge inkubierten wir Kotyledonenexplantate von 7 Tage alten Keimlingen auf Medien mit 0,5-20 μM TDZ. Es konnte auf allen getesteten Medien die Bildung von Kallusgewebe beobachtet werden. Als besonders gut geeignet erwies sich eine Wuchsstoffkonzentration von 1 μM , da hier alle angesetzten Explantate Kallus bildeten. Visser et al. (1992) konnten beobachten, dass der Einsatz von mehr als 1 μM TDZ für Hypocotyl-Explantate von *Geranium* toxisch war und zur Braunfärbung führten. Das konnte in unseren Experimenten insofern bestätigt werden, als die Explantate bzw. der gebildete Kallus ab einer Wuchsstoffmenge von 5 μM vermehrt Tendenzen zur Braunfärbung zeigten. Vor allem 1 und 2,5 μM TDZ resultierten in gutem Kalluswachstum und nachfolgend erfolgreicher Embryoinduktion. Jones et al. (2007) beobachteten bei Blattexplantaten von *Purpurea echinacea* auf TDZ-hältigen Medien die Bildung von embryogenem Kallus, aber auch differenziertes Wachstum: Somatische Embryogenese und Organogenese fanden gleichzeitig statt. Auch bei *Glycyrrhiza glabra* konnten wir einen hohen Anteil an Regeneraten finden, meist konnten Organogenese und Embryogenese nebeneinander beobachtet werden. So ließ sich mittels 1 μM TDZ neben der Bildung von vitalem Kallusgewebe auch die höchste Embryoinduktion erzielen.

Auch die Wahl des Ausgangsgewebes ist von großer Bedeutung. Murphy et al. (1995) berichteten, dass bei der Embryogenese von *Arachidis hypogaea* die

Sämlinge umso bessere Ergebnisse lieferten, je jünger sie waren. Bei *Capsicum annuum* wiederum waren Sprossachsensegmente besser geeignet als Sprossspitzen (Khan et al., 2005). In dieser Arbeit wurden einerseits Kotyledonenexplantate von 7 Tagen alten Keimlingen verwendet, andererseits wurde Kallus an intakten Sämlingen von direkt auf TDZ-Medien zur Keimung ausgebrachten Samen eingesetzt. In vier von sechs Versuchen zeigten die mittels Kotyledonenexplantaten induzierten Kallusgewebe eine bessere Embryoinduktion als die Kalli von TDZ-Sämlingen. Zu diesem Zweck wurden die Kalli auf verschiedene Stufe 2-Medien aufgebracht. Oft wird die Embryobildung mittels einer Reduktion oder dem Entzug des zur Kallusinduktion verwendeten Auxins induziert (Jimenez, 2001). Hohe Auxinkonzentrationen hemmen die weitere Entwicklung von Embryoiden. Daher sind auxinfreie Medien erfolgreich für die zweite Stufe der Embryogenese eingesetzt worden (George, 1993; Jimenez, 2001). Auch mittels einer Kombination von Auxinen und Cytokininen kann die Embryoinduktion gefördert werden (Kim et al., 2004; Luo et al., 1999; Nomura und Komamine, 1985; Sahrawat und Chand, 2001; Vargas et al., 2005). Beispielsweise führte die Kombination von 2,4-D und Kinetin bei *Dalbergia sisso* zu guten Ergebnissen (Singh und Chand, 2003). Zur alleinigen Anwendung von Cytokininen kann keine allgemeine Aussage getroffen werden. Auch wird berichtet, dass der Zusatz von Cytokininen eine hemmende Wirkung auf die somatische Embryogenese ausüben kann - hierzu finden sich unterschiedliche Berichte (George 1993). Daher galt es, die Eignung von Vertretern der Cytokinine auf die Embryoinduktion bei *G. glabra* zu testen.

Die Cytokinine Adeninsulfat, Benzylaminopurin, Kinetin und Zeatin waren mit einer Embryoinduktionsrate zwischen 27,9 und 37,3 % ähnlich effizient. Bei Zusatz von Glutamin kam es bei lediglich 6,7 % der Kulturen zu Embryoinduktion. Die Reduktion des Stickstoffs bei gleichzeitiger Glutamingabe zeigte wiederum einen deutlichen Anstieg der Bildung von Embryoiden im Vergleich zu alleinigem Glutaminzusatz. Die Zugabe von Adeninsulfat führte im Vergleich zu den anderen Stufe 2-Medien zur besten Embryoinduktion, da hier die meisten Kulturen mit mittlerer und starker Embryoidbildung auftraten (s. Diag. 2, S. 31). In 8,9 % der Kulturen machten die Embryoide eine Konversion

zu Keimlingen durch und in 8,2 % konnten sekundäre embryoide Strukturen beobachtet werden – auch diesbezüglich konnten mittels Adeninsulfat die besten Ergebnisse erzielt werden. Auffällig war jedoch, dass das Wurzelwachstum der Keimlinge vermindert schien. Es liegt der Schluss nahe, dass dieser Umstand möglicherweise an einer zu hohen Konzentration von Adeninsulfat lag, da die Hemmung des Wurzelwachstums eine grundlegende Eigenschaft der Cytokinine darstellt. Das beste Ergebnis konnte mit Adenin in Kombination mit Kallus von Stufe 1-Medium mit 1 μM TDZ erzielt werden. (s. Diagr. 5, S. 35).

Yasuda et al. (1985) konnte in *Coffea arabica* somatische Embryogenese mittels eines Wuchsstoffzusatzes von 5 μM BAP induzieren und über einen längeren Zeitraum subkultivieren, ohne das embryogene Potential des Gewebes einzubüßen. Bei *G. glabra* lag die Embryoinduktionsrate auf BAP-hältigem Medium mit 27,9 % hinter den anderen Cytokinin zurück. Es wurde ebenfalls eine hohe Rate an Regeneraten registriert. In Bezug auf das Kallusgewebe konnte eine proliferative Wirkung verzeichnet werden. So zeigte ein großer Anteil der Kalluskulturen eine starke Wachstumstendenz und gute Vitalität. Es konnten jedoch auch viele abnorme Strukturen beobachtet werden: Meist erinnerten sie optisch an Blattregenerate, jedoch mit deformiertem Wuchs. Auch Keimlinge mit abnormer Kotyledonenanzahl traten auf. Sekundäre Strukturen konnten nur in 0,7 % der Kulturen registriert werden. BAP in der hier gewählten Konzentration von 5 μM kann daher nur bedingt zur Embryoinduktion empfohlen werden.

Bei Zusatz von Kinetin kam es ebenfalls zur Ausbildung von abnormen Strukturen wie zum Beispiel Keimlingen mit abnormer Kotyledonenanzahl. Die Embryoinduktionsrate war mit 37,3 % der mit Adeninsulfat erzielten ähnlich. Bei Kinetin-Exposition fiel vor allem der hohe Anteil an sekundären Strukturen auf, während der Anteil an intakten Keimlingen sehr gering war. Viele der entstandenen Keimlinge bildeten bei Verbleib auf dem Induktionsmedium ihrerseits an Hypocotyl und Wurzelansatz Kallusgewebe und sekundäre Embryoide aus. Es konnte ebenfalls, so wie bei allen Cytokinin-Medien in dieser Arbeit, eine hohe Rate an Organogenese beobachtet werden.

Mittels Zeatin konnte ebenfalls noch eine zufriedenstellende Embryoinduktion erzielt werden, und in 3,3 % der Kulturen fand eine Konversion der Embryoide zu Keimlingen statt. Eine Hemmung des Wurzelwachstums konnte nicht festgestellt werden. Auch sekundäre Embryoide konnten sich entwickeln und es wurden auch hier abnorme Regenerate beobachtet. Die Ergebnisse mit Zeatin blieben insgesamt jedoch hinter den mit Adeninsulfat erzielten zurück.

Die Embryoinduktionsrate durch Glutamin-Zusatz war mit 6,8 % recht niedrig. Es ist bekannt, dass der Zusatz von Aminosäuren eine stimulierende Wirkung auf die somatische Embryogenese ausüben kann, da dem Gewebe hier reduzierter Stickstoff zur Verfügung gestellt wird (George, 1993). Auch bei der Leguminose *Dalbergia sisso Roxb.* konnte mittels eines Glutamin-Gehalts von 0,68 mM im Nährmedium ein Anstieg der Häufigkeit des Auftretens von somatischen Embryos von 55 % auf 66 % erzielt werden (Singh und Chand, 2003). Andererseits wird berichtet, dass eine höhere Konzentration von Glutamin auch eine Hemmung der somatischen Embryogenese bewirken kann. Bei *G. glabra* hatte die gewählte Konzentration von 10 mM Glutamin in Bezug auf die Embryogenese keinen positiven Effekt: Die Bildung von Embryoiden konnte nur in einem geringen Anteil der Kulturen beobachtet werden. Auch die Anzahl von Regeneraten, sekundären embryoiden Strukturen und Keimlingen war im Vergleich zu den Medien mit Cytokinin-Zusatz gering. Der Gehalt an Glutamin im Medium hatte außerdem keine positive Wirkung auf die Vitalität des Kallusmaterials, welches mehrheitlich das Wachstum einstellte.

Wenn der reduzierte Stickstoff mittels Aminosäure zugeführt wird, ist ein Zusatz von Ammoniumionen in der Regel nicht erforderlich (George, 1993), sodass in einem weiteren Versuch ein Medium mit Glutamin-Zusatz unter Abwesenheit von Ammoniumnitrat auf seine Eignung zur Embryoinduktion getestet wurde. Mit dieser konnten Kamada und Harada (1979) gute Erfolge bei *Daucus carota* erzielen. Im Vergleich zu dem Medium mit Glutamin-Zusatz alleine ließ sich die Embryoinduktionsrate zwar verbessern, mit 12,5 % war sie aber deutlich niedriger als bei Einsatz von Cytokinin, sodass auch dieses Medium zur Auslösung der Embryoidbildung nicht geeignet erscheint.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Studien zur direkten und indirekten somatischen Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L., wozu die Eignung verschiedener pflanzlicher Wuchsstoffe untersucht wurde. Mit Thidiazuron (TDZ) in Konzentrationen von 0,5-10 μM konnte keine direkte somatische Embryogenese induziert werden, dieser Wuchsstoff eignete sich aber sehr gut zur Kallusinduktion. Die besten Ergebnisse konnten diesbezüglich mit 1 μM TDZ erzielt werden, da hier eine gute Balance zwischen der Wirkung des Wuchsstoffes und möglichst geringer Schädigung des Gewebes festgestellt werden konnte. Konzentrationen ab 5 μM führten zunehmend zur Braunfärbung des Gewebes. Weiters zeigte sich, dass bei der Wahl des Explantats Kotyledonenschnitte den direkt auf TDZ-hältigen Medien gekeimten Sämlingen vorzuziehen sind. Vielfach wird zur Induktion der somatischen Embryogenese 2,4-D angewandt, da es vor allem zur Kallusbildung sehr geeignet ist. Dies konnte jedoch bei *G. glabra* nicht bestätigt werden, da das entstandene Gewebe nur langsam wuchs und in weiterer Folge nur wenige embryoide Strukturen induziert werden konnten. Von allen getesteten Stufe 2-Medien konnte nur bei Zusatz von BAP bzw. Zeatin das Auftreten von Embryoiden in einem kleinen Anteil der angesetzten Kulturen registriert werden. Die Einführung eines Erhaltungsmediums für den Kallus mit einer Konzentration von 1 μM 2,4-D wirkte sich positiv aus, konnte die Ergebnisse bezüglich der Embryoinduktion jedoch nicht deutlich verbessern. In der 2. Stufe der Embryogenese wurden die Cytokinine Adeninsulfat, Benzyladeninpurin, Kinetin und Zeatin und die Aminosäure Glutamin mit normalem und reduziertem Stickstoffgehalt auf ihre Eignung zur Embryoinduktion hin untersucht. Die Cytokinine lieferten eine gute Embryoinduktionsrate und zeichneten sich durch mittleres bis starkes Kalluswachstum aus. Die Anzahl der Regenerate war hoch und es konnte auch Organogenese beobachtet werden, jedoch zeigten sich auf Medien mit BAP oder Kinetin vermehrt abnorme Regenerate. Mittels Adeninsulfat konnte die höchste Zahl an Embryoiden und sekundären Strukturen induziert werden, und dieses Cytokinin lieferte in Kombination mit dem Stufe 1-Medium mit 1 μM TDZ die besten Ergebnisse. Jedoch konnte eine Hemmung des Wurzelwachstums

beobachtet werden, die möglicherweise auf einer zu hohen Konzentration des Phytohormones beruht. Dies sollte in fortführenden Arbeiten abgeklärt werden.

6. Summary

The present thesis deals with investigations on direct and indirect somatic embryogenesis in *Glycyrrhiza glabra* L. For this purpose, various plant growth regulators were studied. Thidiazuron (TDZ) at concentrations from 0.5 to 10 μM was not effective in inducing direct somatic embryogenesis, but it proved to promote callus formation. With 1 μM TDZ a good balance between callus formation and tissue damage was observed. Concentrations higher than 5 μM led to increased browning of the tissue. Cotyledonary explants proved to be superior to seedlings obtained directly on TDZ containing media. Another common way of producing embryogenic callus is through the auxin 2,4-D. However, this was not the case for *G. glabra* as the callus showed slow growth and only few embryoid structures could subsequently be induced. Of all tested stage 2 media only with BAP and zeatin a small number of cultures could develop embryos. The introduction of a new maintenance medium with a reduced content of 1 μM 2,4-D had some positive effect, although embryo induction could not be improved. For stage 2 of embryogenesis we tested adenine sulfate, benzylaminopurine, kinetin, zeatin, glutamine and glutamine combined with lower nitrate content of the medium. Media supplemented with one of these cytokinins could induce good rates of somatic embryogenesis together with average to fast callus growth. Beside a high number of regenerates, organogenesis also occurred. However, abnormal structures developed on media containing BAP or kinetin. Adenine sulfate seemed to inhibit root growth but in fact was most efficient with callus obtained on stage 1 medium with 1 μM TDZ. Possibly, the concentration of adenine sulfate had been chosen too high. This should be clarified in future investigations.

7. Literaturverzeichnis

Gairi A., Rashid A. (2004), Direct differentiation of somatic embryos on different regions of intact seedlings of *Azadirachta* in response to thidiazuron, J. Plant Physiol. **161**: 1073-1077

George E.F. (1993), Plant Propagation by Tissue Culture Part 2, 2. Auflage, Exegetics Ltd., Edington, Wilts, S. 619-635

Hänsel R., Sticher O. (2007), Pharmakognosie – Phytopharmazie, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 956-961

Henry M., Edy A., Desmarest P., Du Manoir J. (1991), *Glycyrrhiza glabra* L. (Licorice): Cell culture, regeneration and the production of glycyrrhizin, in Bajaj Y.P.S. (Hrsg.), Biotechnology in agriculture and forestry 15, Medicinal and aromatic plants III, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 270-282

Hensel A., Wichtl M., Willuhn G., Loew D. (2016), Liquiritiae Radix, in Blaschek W. (Hrsg.), Wichtl – Teedrogen und Phytopharmaka, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 382-385

Heß D. (1992), Biotechnologie der Pflanzen, 1. Auflage, UTB Ulmer

Iantcheva A., Vlahova M., Bakalova E., Kondorosi E., Elliott M.C., Atanassov A. (1999), Regeneration of diploid annual medics via direct somatic embryogenesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine, Plant Cell Rep. **18**: 904-910

Ipekci Z., Gozukirmizi N. (2003), Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*, Plant Cell Rep. **22**: 16-24

Jimenez V. (2001), Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones, Rev. Bras. Veg. **13**: 196-223

Jones M.P.A., Cao J., O'Brien R. (2007), The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L., Plant Cell Rep. **26**: 1481-1490

Khan H., Siddique I., Anis M. (2006), Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annum*, Biol. Plant. **50**: 789-792

Kamada H., Harada H. (1979), Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures II. Effects of the amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis, Z. Pflanzenphysiol. **91**: 453-463

Karkanis A., Martins N., Petropoulos S.A., Ferreira I.C.F.R. (2018), Phytochemical composition, health effects, and crop management of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.): A medicinal plant, Food Rev. Int. **34**: 182-203

Kim Y.-S., Kim M.-Y., Yang M.-S. (2004), Effect of growth regulators on plant regeneration through somatic embryogenesis of *Medicago sativa* L., J. Plant Biotechnol. **6**: 87-90

Lakshmanan P., Taji A. (2000), Somatic embryogenesis in leguminous plants, Plant Biol. **2**: 136-148

Lämmermeyer K. (2007), Untersuchungen zur somatischen Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L., Diplomarbeit, Universität Wien

Luo J.-P., Jia J.-F., Gu Y.-H., Liu J. (1999), High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall., Plant Sci. **143**: 93-99

Mandal A.K.A., Gupta S.D. (2002), Direct somatic embryogenesis of safflower – a scanning electron microscopic study, Curr. Sci. **83**: 1138-1140

Mithila J., Hall J. C., Victor J. M. R., Saxena P.K. (2003), Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.), Plant Cell Rep. **21**: 408-414

Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue, Physiol. Plant. **15**: 473-497

Murthy B.N.S., Murch S.J., Saxena P.K. (1995), Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons, Physiol. Plant. **94**: 268-276

Murthy B.N.S., Victor J., Singh R.P., Fletcher R.A., Saxena P.K. (1996), In vitro regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron, Plant Growth Regul. **19**: 233-240

Nomura K., Komamine A. (1985), Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture, *Physiol. Plant* **79**: 988-991

Rey H.Y., Scocchi A.M., Gonzalez A.M., Mroginski L.A. (2000), Plant regeneration in *Arachis pinto* (Leguminosae) through leaf culture, *Plant Cell Rep.* **19**: 856-862

Ramakrishnan K., Gnanam R., Sivakumar P., Manickam A. (2005), In vitro somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), *Plant Cell Rep.* **24**: 449-461

Sahrawat A.K., Chand S. (2001), Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant, *Curr. Sci.* **81**:1328-1331

Sato Y., He J.X., Nagai H., Tani T., Akao T. (2007), Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza uralensis* roots, acts in the lower part of intestine, *Biol. Pharm. Bull.* **30**:145-149

Saxena P.K., Malik, K.A., Gill R. (1992), Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut, *Planta* **187**: 421-424

Seitz H.U., Seitz U., Alfermann W. (1985), Pflanzliche Gewebekultur, Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York 1985, S. 40

Singh A.K., Chand S. (2003), Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sisso* Roxb., J. Plant Physiol. **160**: 415-421

Singh N.D., Sahoo L., Sarin N.B., Jaiwal P.K. (2003), The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp), Plant Sci. **164**: 341-347

Vargas T.E., De Garcia E., Oropeza M. (2005), Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns, J. Plant Physiol. **162**: 449-456

Visser C., Qureshi J.A., Gill R., Saxena P. (1992), Morphoregulatory role of thidiazuron, Plant Physiol. **99**: 1704-1707

Von Arnold S, Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J, Filonova L (2002), Developmental pathways of somatic embryogenesis, Plant Cell Tissue Organ Cult. **69**: 233-249

Yasuda T., Fujii Y., Yamaguchi T. (1985), Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explant by benzyladenine, Plant Cell Physiol. **26**: 595-597

Zhang C., Chen D., Malcolm E., Slater A. (2001), Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant **37**: 305-310