



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Vermehrung von Süßholz über somatische Embryogenese

angestrebter akademischer Grad
Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasserin: Marina Winter
Matrikel-Nummer: 0401757
Studienrichtung: Pharmazie
Betreuerin: Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp

Wien, am 17. April 2009

Danksagung

Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp möchte ich für das interessante Thema, die persönliche Betreuung und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die zuvorkommende und kompetente Betreuung während der Arbeit.

Weiters bedanke ich mich bei Frau Ing. Brigitte Grauwald für die hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Arbeit und das nette Arbeitsklima.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und für die persönliche Unterstützung während meiner Studienzeit herzlich danken.

ABKÜRZUNGEN

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AdS	Adeninsulfat
AK	Aktivkohle
BAP	6-Benzylaminopurin
EuAB	Europäisches Arzneibuch
F	Kultivierung in Flüssigmedium
H	Kultivierung auf halbfestem Medium
MS	Murashige und Skoog Nährmedium
NAA	α -Naphthylessigsäure
TDZ	Thidiazuron (<i>N</i> -Phenyl- <i>N</i> -1,2,3-Thidiazol-5-yl-Harnstoff)

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1. <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. – Süßholz	1
1.2. Somatische Embryogenese	4
1.3. Problemstellung	5
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1. Pflanzenmaterial	7
2.2. Nährmedien	9
2.3. Kulturgefäße	11
2.4. Kulturbedingungen.....	11
2.5. Kulturauswertung.....	12
3. ERGEBNISSE	18
3.1. Samenkeimung	18
3.2. Etablierung von Kalluskulturen.....	18
3.3. Versuche zur Induktion der Embryobildung	21
3.3.1. Einfluss von Adeninsulfat	22
3.3.1.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen	27
3.3.1.2. Einfluss der Lichtverhältnisse	30
3.3.1.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums.....	31
3.3.2. Einfluss von Aktivkohle	32
3.3.2.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen	36
3.3.2.2. Einfluss der Lichtverhältnisse	38
3.3.2.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums.....	39
3.3.3. Einfluss von 0,1 µM Thidiazuron	40
3.3.3.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen	43
3.3.3.2. Einfluss der Lichtverhältnisse	46
3.3.3.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums.....	47
3.3.4. Einfluss von 0,01 µM Thidiazuron	47
3.3.4.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen	50
3.3.4.2. Einfluss der Lichtverhältnisse	53
3.3.4.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums.....	54
3.3.5. Einfluss von Wuchsstoff-freiem Medium	55
3.3.5.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen	58

3.3.5.2. Einfluss der Lichtverhältnisse.....	60
3.3.5.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums	61
4. DISKUSSION	63
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6. SUMMARY	75
7. LITERATURVERZEICHNIS	77
LEBENS LAUF.....	81
ANHANG	82

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. *Glycyrrhiza glabra* L. – Süßholz

Pflanzenbeschreibung

Glycyrrhiza glabra L. gehört zur Familie der Fabaceen. Die 1-1,5 m hohe, mehrjährige Staude besitzt ein ausgedehntes Wurzelsystem. Aus den Blattachseln der unpaarig gefiederten, mit klebrigen Drüsenhaaren besetzten Blätter entspringen aufrechte Blütentrauben mit blasslila gefärbten Schmetterlingsblüten. Die Pflanze ist heimisch im Mittelmeergebiet, in Mittel- bis Südrussland und Kleinasien bis Persien (Wichtl et al., 2009; Sticher, 2007).

Droge und offizinelle Zubereitungen

Bis zum Erscheinen des 5. Nachtrags der 5. Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs (2005) verstand man unter *Liquiritiae radix* oder Süßholzwurzel die getrockneten, ungeschälten oder geschälten, ganzen oder geschnittenen Wurzeln und Ausläufer von *Glycyrrhiza glabra* L. Seit der Aktualisierung der Monographie im 5. Nachtrag sind zwei weitere Stammpflanzen, *Glycyrrhiza inflata* Bat. und *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., zugelassen. Es wird ein Mindestgehalt an Glycyrrhizinsäure von 4,0 %, berechnet auf die getrocknete Droge, gefordert (EuAB, 2005).

Weiters ist ein Fluidextrakt aus Süßholzwurzel offizinell. *Liquiritiae extractum fluidum ethanolicum normatum* soll einen Gehalt an Glycyrrhizinsäure von mindestens 3,0 % und höchstens 5,0 % aufweisen (EuAB, 2008).

Inhaltsstoffe von *Glycyrrhiza glabra* L.

Triterpensaponine (2-15 %): mit Glycyrrhizin, einem Gemisch von Kalium- und Calciumsalzen der Glycyrrhizinsäure als Hauptkomponente, durch Abspaltung von zwei Glucuronsäuremolekülen erhält man das Aglykon der Glycyrrhizinsäure, die Glycyrrhetinsäure;

Flavonoide (0,65-2 %): u.a. Isoliquiritin und Liquiritin mit den entsprechenden Aglyka Isoliquiritigenin und Liquiritigenin; ferner prenylierte Flavonoide und Isoflavonoide, z. B. Glabren, Glabridin und Licoricidin;

Polysaccharide (ca. 10 %): u.a. das saure Polysaccharid Glycyrrhizan GA; des Weiteren Sterole, Cumarine, flüchtige Aromastoffe, mineralische Bestandteile, Zucker und Stärke (Wichtl et al., 2009; Sticher, 2007);

Kondo et al. (2007) konnten durch Analyse von 117 Süßholz-Proben zeigen, dass die drei zugelassenen Stammpflanzen für *Liquiritiae radix* signifikante Unterschiede in ihrem Inhaltsstoffmuster aufweisen. Bei *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. beispielsweise konnten höhere Gehalte an Isoliquiritin, Liquiritin und Liquiritigenin als bei *Glycyrrhiza glabra* L. und *Glycyrrhiza inflata* Bat. nachgewiesen werden. Weiters wurden artspezifische Inhaltsstoffe identifiziert.

Wirkungen und Anwendungsgebiete

Von besonderer Bedeutung für die Phytotherapie sind sekretolytisch/expektorierende, antiulzerogene/antiphlogistische, antivirale und spasmolytische Wirkungen der Droge bzw. der Süßholzextrakte.

Die sekretolytisch/expektorierende Wirkung ist auf die Oberflächenaktivität der Saponine zurückzuführen. Darauf basiert die Anwendung als Expektorans bei Husten und Bronchialkatarrh.

Auch für die antiulzerogene/antiphlogistische Aktivität gelten die Saponine (bzw. Aglyka) Glycyrrhizinsäure und Glycyrrhetinsäure als Wirkstoffe. Süßholzwurzel bzw. daraus hergestellte Extrakte werden als Adjuvans zur Therapie von Magen- und Duodenalgeschwüren sowie von Gastritis eingesetzt.

Für die antivirale Aktivität steht vor allem die Wirkung der Glycyrrhizinsäure im Vordergrund.

Die spasmolytische Wirkung wird hauptsächlich durch die Aglyka der Flavonoide verursacht. Aufgrund dieser Wirkungskomponente ist der Einsatz als Spasmolytikum gerechtfertigt.

Es konnten noch zahlreiche weitere Wirkungen (z. B. östrogene, antihepatotoxische, antiproliferative, immunstimulierende) von Süßholzextrakten oder einzelner Inhaltsstoffe nachgewiesen werden (Somjen et al., 2004; Gumprich et al., 2005; Chin et al., 2007; Sticher, 2007).

Außerdem sei hier noch aufgrund des intensiv süßen Geschmacks die Anwendung als Geschmackskorrigens für Arzneimittel sowie in der Süßwarenindustrie erwähnt (Sticher, 2007).

Problematik bei der Anwendung von Süßholz und Süßholzpräparaten

Bei längerer Anwendung und höherer Dosierung (mehr als 50 g Droge bzw. entsprechende Zubereitung täglich) bewirken Glycyrrhizinsäure und Glycyrrhetinsäure eine Hemmung des Abbaus von Cortisol zu Cortison und eine verzögerte Ausscheidung von Cortisol und Aldosteron. Durch die Veränderung des Cortisolmetabolismus entsteht ein Pseudoaldosteronismus mit den Symptomen Hypokaliämie, Hybernatriämie, Ödemen, Hypertonie und Herzbeschwerden (Wichtl et al., 2009; Sticher, 2007).

Aufgrund dieser unangenehmen Nebenwirkungen wäre es sinnvoll, Genotypen mit unterschiedlichen Wirkstoffspektren einzusetzen.

Bei der Anwendung von Süßholz und Süßholzextrakten als Expektorans bzw. zur Ulcustherapie kämen Genotypen mit hohem Gehalt an expektorierend und antiulzerogen/antiphlogistisch wirkenden Triterpensaponinen zum Einsatz.

Steht hingegen die Indikation Spasmolyse im Vordergrund, so sollten Genotypen, die reich an Flavonoiden sind, eingesetzt werden. Der Gehalt an Glycyrrhizinsäure bzw. Glycyrrhetinsäure sollte möglichst niedrig sein, da diese Wirkstoffe zur spasmolytischen Wirkung nicht beitragen.

Die in vitro-Kultivierung bietet die Möglichkeit, Pflanzen mit definierten Wirkstoffspektren rasch und genetisch einheitlich zu vermehren. Grundsätzlich kann die Mikrovermehrung von Pflanzen über Axillärknospen (Meristem-, Sprossspitzen-, und Nodienkultur) oder über Morphogenese (direkte oder indirekte Organogenese bzw. Embryogenese) erfolgen (George und Debergh, 2008).

Es wurden bereits Versuche zur Vermehrung von *Glycyrrhiza glabra* L. über Nodienkultur durchgeführt (Kohjyouma et al., 1995; Fursova, 2006). Weiters konnte von Kakutani et al. (1999) somatische Embryogenese bei *Glycyrrhiza echinata* L. und *Glycyrrhiza squamulosa* F., nicht aber bei *Glycyrrhiza glabra* L., induziert werden. Die Bildung von somatischen Embryos bei *Glycyrrhiza glabra* L. gelang in vorangegangenen Diplomarbeiten (Lämmermayer, 2007; Kazianka, in Vorbereitung). Die vorliegende Arbeit soll sich mit der Optimierung eines Vermehrungsprotokolls für *Glycyrrhiza glabra* L. über indirekte somatische Embryogenese befassen.

1.2. Somatische Embryogenese

Somatische Embryonen (Embryoide, Adventivembryonen) sind Embryonen oder embryo-ähnliche Bildungen, die auf vegetativem Weg entstehen. Im Gegensatz zu zygotischen Embryonen, die aus einer Zygote hervorgehen, werden Embryoide durch fortlaufende Teilungen von somatischen Einzelzellen oder Zellverbänden gebildet. Die Entwicklung von Embryoiden entspricht weitgehend der von zygotischen Embryonen. Ein Proembryo durchläuft charakteristische Entwicklungsstadien (globulärer, herzförmiger und torpedoförmiger Embryo), um schließlich zum reifen Embryo heranzuwachsen. Die Bildung von Adventivembryonen kann entweder direkt am Ausgangsexplantat (direkte somatische Embryogenese) oder über eine eingeschobene Kallusphase (indirekte somatische Embryogenese) erfolgen (Heß, 1992).

Indirekte somatische Embryogenese

Bei den meisten dikotylen Pflanzen erfolgt die Bildung von Embryoiden in zwei Stufen mit unterschiedlichen Kulturbedingungen. Die Wahl des geeigneten Wuchsstoffzusatzes zum Kulturmedium ist dabei von zentraler Bedeutung. In der ersten Phase (Stufe I), der Kallusinduktionsphase, erfolgt für gewöhnlich der Einsatz von hohen Auxinkonzentrationen. Ziel dieser Phase ist die Bildung von embryogenem Kallusgewebe. Da sich hohe Auxinkonzentrationen meist negativ auf eine weitere Differenzierung der Kalluszellen zu somatischen Embryonen

auswirken, erfolgt ein Transfer des gebildeten embryogenen Kallus auf Medium mit geringerem oder keinem Auxingehalt. In dieser zweiten Phase (Stufe II), der Embryoentwicklungsphase, können die Bildung und das Wachstum von Embryoiden beobachtet werden. Abgesehen von Auxinen werden auch Cytokinine, wenn auch wesentlich weniger häufig, eingesetzt.

Weiters können die Nährmedien durch beispielsweise Variation des Stickstoffgehalts, des pH-Wertes, oder durch Zusatz von Aminosäuren bzw. Aktivkohle optimiert werden (George 1993).

1.3. Problemstellung

Glycyrrhiza glabra L. ist eine wichtige Arzneipflanze mit vielfältigen Wirkungen und Anwendungsgebieten. Mit Hilfe von Methoden der in vitro-Kultivierung können Pflanzen mit definierten Wirkstoffspektren genetisch einheitlich und rasch vermehrt werden. Die Bereitstellung von Drogenmaterial gleichbleibender Qualität und spezifischer Inhaltsstoffmuster kann somit gewährleistet werden.

In vorangegangenen Diplomarbeiten zur indirekten somatischen Embryogenese von *Glycyrrhiza glabra* L. (Lämmermayer, 2007; Kazianka, in Vorbereitung) wurden bereits Versuche mit dem Auxin 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) und der Aminosäure Glutamin durchgeführt. Weiters wurde das Cytokinin TDZ (Thidiazuron) in der Kallusinduktionsphase und die Cytokinine Adeninsulfat, BAP (6-Benzylaminopurin), Kinetin und Zeatin in der Embryoentwicklungsphase eingesetzt. Kotyledonenexplantate wurden als ideales Ausgangsmaterial für die Induktion eines embryogenen Kallus identifiziert. Die Verwendung von 1 µM TDZ in Stufe I-Medien und der Zusatz von 50 µM Adeninsulfat zu Stufe II-Nährmedien zeigten besonders gute Ergebnisse. Der effektive Einsatz des Cytokinins Thidiazuron anstatt von Auxinen zur Kallusinduktion lässt sich durch die besondere Eigenschaft dieses Wuchsstoffes, sowohl den Cytokinin- als auch den Auxinmetabolismus in Pflanzen beeinflussen zu können, erklären (Lakshmanan und Taji, 2000).

Um auf den bereits durchgeführten Arbeiten aufzubauen, sollte im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit auf MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962) mit

1 μM TDZ eine embryogene Kalluskultur von *Glycyrrhiza glabra* L. aus Kotyledonenexplantaten etabliert werden.

Bei den Medien zur Embryoentwicklung sollten 5 verschiedene Nährmedienzusammensetzungen getestet werden.

Beim Einsatz von 50 μM Adeninsulfat in Stufe II-Medien konnte eine Unterdrückung des Wurzelwachstums der gebildeten Embryonen beobachtet werden (Kazińska, in Vorbereitung). Dieser Effekt kam vermutlich durch zu hohe Cytokininkonzentrationen zustande, weshalb in der vorliegenden Arbeit ein Versuch mit halbiertes Adeninsulfatmenge von 25 μM durchgeführt werden sollte.

Der Zusatz von Aktivkohle zum Nährmedium kann durch Adsorption von Wuchsstoffen bzw. inhibitorischer Stoffwechselprodukte die Embryoentwicklung fördern (George, 1993). Daher sollte MS-Medium, das mit 1 % Aktivkohle versetzt war, getestet werden.

Wie bereits erwähnt, ist die Reduktion der zur Kallusinduktion verwendeten Wuchsstoffkonzentration eine gängige Methode, das Auswachsen von Embryonen zu ermöglichen. Aus diesem Grund sollten sowohl Wuchsstoff-freies MS-Medium als auch Medien mit 0,01 μM TDZ bzw. 0,1 μM TDZ eingesetzt werden.

Des Weiteren sollten die Kalli jeweils auf halbfesten und in flüssigen Stufe II-Medien kultiviert werden. Das Wachstum erfolgt in der Regel bei Suspensionskulturen gegenüber der Kalluskultur auf halbfesten Medien aufgrund der besseren Nährstoffversorgung wesentlich schneller (Heß, 1992).

Als zusätzlicher Faktor für die Entwicklung von Embryonen sollte der Einfluss von Licht in der zweiten Phase der somatischen Embryogenese getestet werden.

Zusammenfassend war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von unterschiedlichen Nährmedienzusammensetzungen, der Konsistenz des Mediums und unterschiedlicher Lichtverhältnisse in der Embryoentwicklungsphase im Rahmen der indirekten somatischen Embryogenese von *Glycyrrhiza glabra* L. zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

Das Ausgangsmaterial für die Versuche zur indirekten somatischen Embryogenese lieferten Kotyledonenexplantate von 7 Tage alten, unter sterilen Bedingungen gekeimten Sämlingen von *Glycyrrhiza glabra* L.

Die verwendeten Samen wurden im Jahr 2003 von einer Staude aus dem Arzneigarten des Departments für Pharmakognosie, Universität Wien, geerntet.

Oberflächensterilisation der Samen

Zuerst erfolgte eine zehnmütige Behandlung mit 30 proz. Ethanol. Nach Abgießen der Ethanollösung wurden die Samen mit einer 20 proz. Natriumhypochloritlösung (W. Neuber's Enkel GmbH, ca. 14% aktiver Chlorgehalt der konzentrierten Lösung), der 1 Tropfen Tween 20 als Netzmittel hinzugefügt worden war, versetzt. Das Kunststoffbecherglas wurde auf einem Magnetrührer in die sterile Werkbank gestellt und für 35 min gerührt. Danach wurden die Samen mehrmals mit autoklaviertem Wasser gespült (zuerst 1 min, dann 3-mal jeweils 10 min lang).

Keimung

Die sterilisierten Samen wurden auf das Keimungsmedium M29 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) aufgebracht. Jede Petrischale wurde mit 10 Samen beimpft.

In einer vorangegangenen Diplomarbeit (Lämmermayer, 2007) konnte gezeigt werden, dass es bei der Keimung von Samen von *Glycyrrhiza glabra* L. unter völligem Lichtausschluss zur Ausbildung von langen Hypokotylen und kleinen Kotyledonen kommt. Hingegen bildeten Sämlinge aus der Keimung im Licht (16 h-Photoperiode) kürzere Hypokotyle und größere Kotyledonen aus. Um Kotyledonenexplantate zu erhalten erweist sich daher eine Keimung der Samen im Licht als günstiger, da unter diesen Bedingungen mehr Explantate erhalten werden können. Deshalb erfolgte die Keimung der Süßholzsamen im Licht (16 h-Photoperiode) für 7 Tage.

Ausgangsmaterial für die embryogene Kalluskultur

Die 7 Tage alten Sämlinge wurden zur Gewinnung von Kotyledonenexplantaten herangezogen. Dazu wurden die Kotyledonen durch Schnitte quer zur Mittelrippe in etwa gleich große Stücke (3x4 mm) zerteilt. Da es sich bei Kallusgewebe um eine Art Wundgewebe handelt (Heß, 1992), wurden, um die Entwicklung des Kalluswachstums zu fördern, die rechteckigen Explantate an allen 4 Seiten geschnitten. Je nach Größe der Keimblätter konnten auf diese Weise 4 bis 6 Explantate pro Sämling erhalten werden. Die Kotyledonenexplantate wurden mit der Blattunterseite auf Kallusinduktionsmedium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) gelegt. Dazu wurde jede Petrischale (100x15 mm) in 3 Kreissektoren eingeteilt und jeder dieser Sektoren mit den Explantaten eines Sämlings (Genotypen, Klons) beimpft.

Ausgangsmaterial für die Versuche zur Embryobildung

Nachdem genügend Kallusmaterial auf Medium TDZ1 vermehrt worden war, erfolgte ein Transfer der Kalli auf unterschiedliche Medien zur Embryobildung (vgl. Kap. 2.2., S. 9). Dabei kamen sowohl halb feste als auch flüssige Nährmedien zum Einsatz.

Zur Etablierung der Kulturen auf halbfesten Medien wurden je Versuchsanordnung 4 Petrischalen mit je 5 Explantaten pro verwendeten Genotyp inkubiert. Insgesamt wurden 8 verschiedene Genotypen auf halbfesten Medien zur Embryoentwicklung kultiviert.

Bei den Flüssigkulturen wurden zu Beginn der Kulturperiode 3 Kolben pro Versuchsanordnung und Genotyp mit jeweils 5 Explantaten beimpft. Es wurden ebenfalls 8 verschiedene Genotypen getestet.

2.2. Nährmedien

Als Basalmedium diente in allen Versuchen MS-Medium M0 nach Murashige und Skoog (1962).

Zur Herstellung der Medien wurden zunächst Myo-Inositol und Saccharose in $\frac{2}{3}$ des Endvolumens an destilliertem Wasser am Magnetrührer gelöst. Dann erfolgte die Zugabe der Stammlösungen der Makroelemente, Vitamine, Spurenelemente und Wachststoffe. Nach dem Auffüllen auf das gewünschte Volumen mit destilliertem Wasser wurde der pH-Wert mit KOH bzw. HCl auf pH 5,7 eingestellt.

Im Rahmen der Arbeit kamen sowohl Flüssigmedien als auch mit Gelrite[®] (3g/l Gelrite[®], Carl Roth GmbH + Co. KG) verfestigte Medien zum Einsatz.

Bei der Herstellung der Flüssigmedien wurde das Medium vor dem Autoklavieren in die Kulturgefäße abgefüllt und bei 121°C und 1 bar für 20 min sterilisiert.

Erfolgte der Zusatz von Gelrite[®], so wurde der Gelbildner in einer 1000 ml SCHOTT DURAN[®]-Flasche vorgelegt und mit jeweils 500 ml Nährmedium befüllt. Die Sterilisationszeit im Autoklaven bei 121°C verlängerte sich durch das größere Volumen von 20 min auf 30 min. Danach erfolgte in der sterilen Werkbank das Gießen des noch flüssigen Mediums in die entsprechenden Petrischalen.

Zur Samenkeimung kam das Medium M29 (vgl. Tab. 2, S. 10) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um ein modifiziertes MS-Medium mit halbkonzentrierten Makroelementen, 1 % Saccharose und 3g/l Gelrite[®].

Die Induktion eines embryogenen Kallus erfolgte auf MS-Medium mit 3 % Saccharose, 3g/l Gelrite[®] und 1 µM Thidiazuron.

Um eine Embryobildung bzw. Embryoentwicklung zu erzielen, wurden 5 unterschiedliche Nährmedien jeweils in flüssiger und halbfester Form getestet. Das im Rahmen der Kallusinduktionsphase erhaltene Kallusmaterial wurde einerseits auf MS-Basalmedium M0 und auf Medium M0, das mit 1 % Aktivkohle versetzt worden war, subkultiviert. Weiters wurde der Einfluss des Zusatzes von Wachststoffen zum Medium M0 in unterschiedlichen Konzentrationen getestet

(25 µM Adeninsulfat, 0,1 µM bzw. 0,01 µM Thidiazuron). Die Angaben über Abkürzungen und Hersteller der verwendeten Wuchsstoffe bzw. Nährmedienzusätze sind in folgender Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Überblick über die verwendeten Wuchsstoffe bzw. Zusätze

Verwendete Wuchsstoffe bzw. Zusätze			
Abkürzung	Chem. Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
AK	Aktivkohle zur Analyse	Merck	102186
Wuchsstoffe			
AdS	Adeninsulfat	Sigma	A3159
TDZ	Thidiazuron <i>N</i> -Phenyl- <i>N</i> -1,2,3-Thidiazol-5-yl-Harnstoff	Fluka	45686

Tabelle 2 und Tabelle 3 (S. 11) zeigen einen Überblick der verwendeten halbfesten Nährmedien und Flüssigmedien.

Tab. 2: Überblick über die verwendeten halbfesten Nährmedien

Halbfeste Medien				
Bezeichnung	Verwendung	Salze	Saccharose (%)	Zusätze
M29	Keimung	½ MS	1	-
TDZ1	Kallusinduktion	MS	3	1 µM Thidiazuron
TDZ0,1H	Embryoentwicklung	MS	3	0,1 µM Thidiazuron
TDZ0,01H	Embryoentwicklung	MS	3	0,01 µM Thidiazuron
M0H	Embryoentwicklung	MS	3	-
AdS25H	Embryoentwicklung	MS	3	25 µM Adeninsulfat
AK1%H	Embryoentwicklung	MS	3	1% Aktivkohle

Tab. 3: Überblick über die verwendeten Flüssigmedien

Flüssigmedien				
Bezeichnung	Verwendung	Salze	Saccharose (%)	Zusätze
TDZ0,1F	Embryoentwicklung	MS	3	0,1 µM Thidiazuron
TDZ0,01F	Embryoentwicklung	MS	3	0,01 µM Thidiazuron
MOF	Embryoentwicklung	MS	3	-
AdS25F	Embryoentwicklung	MS	3	25 µM Adeninsulfat
AK1%F	Embryoentwicklung	MS	3	1% Aktivkohle

2.3. Kulturgefäße

Die Samenkeimung erfolgte in sterilen Kunststoffpetrischalen (100x15 mm) mit je 30 ml Medium.

Für die Induktion von Kallusbildung wurden ebenfalls Petrischalen mit den Abmessungen 100x15 mm verwendet. Die darauffolgenden 2 Subkulturen zur Vermehrung des induzierten Kallus und die Versuche zur Embryoentwicklung wurden in kleineren Kunststoffpetrischalen (60x15 mm) mit je 15 ml Nährmedium durchgeführt. Alle Petrischalen wurden mit Parafilm[®]M verschlossen.

Die Kultivierung in Flüssigmedien erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit je 20 ml Medium. Die Kolben wurden mit Zellstoffstopfen verschlossen.

2.4. Kulturbedingungen

Alle Kulturen wurden bei einer Temperatur von $25 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % gehalten.

Die Keimung der Samen erfolgte bei einer 16/8 h (Licht/Dunkel) Photoperiode (Leuchtstoffröhren, SYLVANIA Gro-Lux) mit einer Lichtintensität von $50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Kulturdauer auf Keimungsmedium M29 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) betrug 7 Tage.

Es ist bekannt, dass die Bildung von Kallusgewebe durch die Kultivierung in Dunkelheit bzw. in Licht mit geringer Strahlungsintensität begünstigt wird (George, 1993). Daher fand die 9-wöchige Kallusinduktionsphase unter völligem Lichtausschluss statt.

Bei den Versuchen zur Embryobildung wurden die Kulturen sowohl unter Lichtausschluss als auch unter den oben genannten Lichtbedingungen für 6 Wochen gehalten. Die Flüssigkulturen wurden auf Rundschüttlern mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 90 U/min bewegt.

Sowohl bei der Kallusinduktion als auch in der Embryoentwicklungsphase wurden die Kalli auf halbfesten Medien alle 3 Wochen auf frisches Medium überimpft. Die Erneuerung des Nährmediums bei den Flüssigkulturen erfolgte ebenfalls nach 3 Wochen. Die Explantate, mit denen die Kolben zu Beginn der Kulturperiode zur Embryoentwicklung beimpft worden waren, nahmen während der gesamten Kulturdauer lediglich an Größe zu und zerfielen teilweise in kleinere Aggregate. Suspensionskulturen wurden hingegen nicht gebildet. Um altes durch frisches Flüssigmedium zu ersetzen, wurde daher das Nährmedium nach 10 min Stehenlassen der Kolben vorsichtig abdekantiert und die Kulturen mit 20 ml frischem Medium versetzt.

2.5. Kulturauswertung

Samenkeimung

Um die Keimungsrate der Samen zu erhalten, wurde der Quotient aus der Anzahl der gekeimten Samen und der Gesamtzahl der inkubierten Samen gebildet und mit 100 multipliziert.

Kallusinduktion

Das Ziel der Kallusinduktionsphase bestand darin, genügend Kallusmaterial für die Embryoentwicklungsphase zu erhalten. Um den Wachstumsverlauf der Kalli zu dokumentieren, wurden in wöchentlichen Abständen Fotos aufgenommen. Bei der

ersten Passage der Kulturen auf frisches Nährmedium erfolgte die Bestimmung der Anzahl jener Sämlinge, deren Kotyledonenexplantate ein Kalluswachstum aufwiesen. Um die Kallusinduktion zu beschreiben, wurde diese ermittelte Zahl durch die Anzahl der gekeimten Samen dividiert und das Ergebnis mit 100 multipliziert.

Auswertung der Kulturen auf halbfesten Medien zur Embryoentwicklung

Bei der Erhebung der Daten zu halbfesten Medien erfolgte die Auswertung pro Explantat.

Die Anzahl an gebildeten somatischen Embryos bzw. Adventivsprossen pro Explantat bzw. pro g Animpfgewicht wurde ermittelt. Bei der Zählung der Embryos erfolgte eine Unterscheidung zwischen globulären Embryos und somatischen Embryos, die sich über das globuläre Stadium hinaus entwickelt hatten.

Die Beurteilung des Kalluswachstums erfolgte durch Einteilung anhand optischer Kriterien in vier Kategorien (+++ = sehr gutes Wachstum, ++ = gutes Wachstum, + = wenig Wachstum, - = kein Wachstum). Weiters wurde das Gewicht der Kalli am Beginn und am Ende der Kulturperiode zur Embryoentwicklung bestimmt, um genauere Aussagen über die Biomassenzunahme treffen zu können. Das jeweilige Gewicht pro Explantat wurde ermittelt, indem sowohl das Animpfgewicht als auch das Endgewicht von je 5 Explantaten bestimmt und dann durch 5 dividiert wurde. Die Biomassenzunahme in % errechnete sich aus dem Quotienten aus Endgewicht und Startgewicht, multipliziert mit 100. So entspricht z. B. eine Biomassenzunahme von 700 % einer Vermehrung des Kallusmaterials inklusive gebildeter Embryos und Sprosse um das 7-fache.

Des Weiteren fand eine Charakterisierung der Kalli aufgrund ihrer Farbe statt. So wurde zwischen den Farben grün, weißlich, gelblich, hellbraun und dunkelbraun unterschieden. Die Abbildungen 1 bis 3 sowie die Abbildungen 4 und 5 (S. 15) zeigen typische Vertreter der aufgetretenen Farben.



Abb. 1: Beispiel für einen grünen Kallus, beobachtet auf Medium AK1%H im Licht (vgl. Tab. 2, S. 10), Balken = 0,2 cm

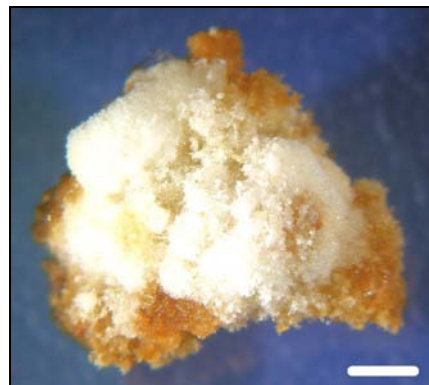


Abb. 2: Beispiel für einen weißlichen Kallus, gebildet auf Medium M0H im Dunkeln (vgl. Tab. 2, S. 10), Balken = 0,2 cm



Abb. 3: Beispiel für einen gelblichen Kallus, kultiviert auf Medium TDZ0,1H im Dunkeln (vgl. Tab. 2, S. 10), Balken = 0,2 cm

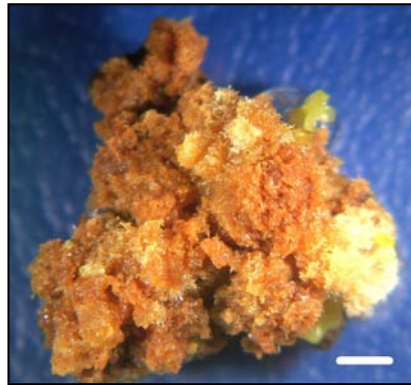


Abb. 4: Typisches Beispiel für einen hellbraunen Kallus, beobachtet auf Medium TDZ0,01H im Dunkeln (vgl. Tab. 2, S. 10), Balken = 0,2 cm



Abb. 5: Beispiel für einen dunkelbraunen Kallus mit knotiger Oberflächenstruktur, kultiviert in Medium MOF im Licht (vgl. Tab. 3, S. 11), Balken = 0,2 cm

Die Konsistenz des Kallusmaterials (kompakter oder zerbrechlicher Kallus) und auffällige Oberflächenstrukturen (pelzige oder knotige Oberfläche) wurden ebenfalls beurteilt. Die beobachteten Oberflächenstrukturen sollen in den Abbildungen 5 bzw. 6 und 7 (S. 16) näher erläutert werden.



Abb. 6: Typische knotige Oberflächenstruktur, der Kallus stammt aus der Kultur auf Medium TDZ0,1H im Licht (vgl. Tab. 2, S. 10), Balken = 0,3 cm

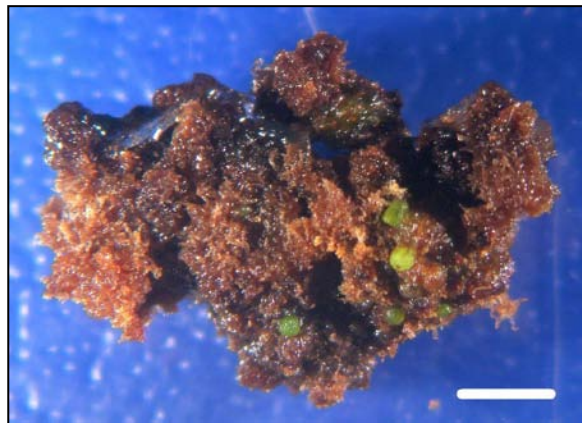


Abb. 7: Pelzige Oberflächenstruktur eines Kallus kultiviert auf Medium MOH im Licht (vgl. Tab. 2, S. 10), Balken = 0,2 cm

Auswertung der Kulturen in Flüssigmedien

Alle bei den Flüssigmedien gewonnenen Daten wurden pro Kolben erhoben.

Die Anzahl der gebildeten globulären Embryos, entwickelten Embryos und Sprosse wurde bestimmt. Um die ermittelten Werte mit denen der halbfesten Medien vergleichen zu können, erfolgte eine Umrechnung auf die Anzahl der gebildeten Strukturen pro g Animpfgewicht.

Wie bereits in Kapitel 2.4. (S. 11) erwähnt, blieb die Bildung von Suspensionskulturen während der gesamten Kulturperiode in Flüssigmedien zur

Embryoentwicklung aus. Daher konnten gängige Methoden zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens wie z. B. die Ermittlung des gepackten Zellvolumens bzw. der Zellzahl oder die Bestimmung der Vitalität der Kulturen durch den Fluoresceindiaceetat-Test nicht durchgeführt werden (Seitz et al., 1985).

Die Einschätzung des Wachstums der Kallusklumpen durch Einteilung in vier Kategorien und die Berechnung der Biomassenzunahme in % wurden analog zu den halbfesten Kulturen durchgeführt (vgl. S. 13). Als Startgewicht der Kalli für die Flüssigkulturen wurde der Mittelwert aller Einwaagen der halbfesten Kulturen herangezogen. Das Gewicht am Ende der Kulturperiode wurde ermittelt, indem zuerst das Flüssigmedium unter Verwendung einer Porzellannutsche mit Rundfilterpapier (Rotilabo[®]-Rundfilter, Durchmesser: 55 mm) durch Anlegen von Vakuum 1 min lang abgesaugt wurde. Das Gewicht des Filterpapiers mit den darauf befindlichen Kulturen wurde anschließend bestimmt. Nun musste nur mehr das Gewicht des Filterpapiers vom gemessenen Wert abgezogen werden. Dazu wurde ein Mittelwert berechnet aus den Gewichten von 10 Rundfiltern verwendet. Diese 10 Filterpapiere wurden vor der Abwägung in einer Porzellannutsche platziert, mit 20 ml flüssigem Nährmedium versetzt und ebenfalls für 1 min unter Vakuum abgesaugt.

Zusätzlich wurde erhoben, inwieweit die angeimpften Explantate in kleinere Aggregate zerfallen waren. Charakterisierungen der Kalli aufgrund ihrer Farbe und Oberflächenstruktur erfolgten analog zu den halbfesten Kulturen (vgl. S. 14-16).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Statistica (StatSoft, Inc., Version 6). Es wurden für die Datensätze jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes ermittelt. Da die Prüfung der Daten auf Normalverteilung positiv ausfiel, konnte eine ANOVA (analysis of variance) durchgeführt werden. Die Signifikanz von Mittelwertsdifferenzen wurde sowohl mittels einfaktorieller als auch mehrfaktorieller Varianzanalysen mit einem Signifikanzniveau von 0,05 getestet. Die Daten wurden weiters unter Verwendung des multiplen Spannweitentests nach Duncan analysiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Samenkeimung

200 Samen von *Glycyrrhiza glabra* L. wurden oberflächensterilisiert und auf Keimungsmedium M29 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) inkubiert. Die Keimung erfolgte für 7 Tage im Licht (16 h-Photoperiode).

Innerhalb von 24 h auf Medium M29 kam es zum Quellen der Samen und die Samenschalen begannen aufzubrechen. Nach 7 Tagen hatten sich die Keimlinge so weit entwickelt, dass 4 bis 6 Kotyledonenexplantate pro Sämling zur Etablierung einer Kalluskultur gewonnen werden konnten. Insgesamt keimten unter den beschriebenen Bedingungen 169 der 200 Samen, was einer Keimrate von 84,5 % entspricht.

3.2. Etablierung von Kalluskulturen

Die gewonnenen Kotyledonenexplantate wurden auf Medium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) zur Induktion von Kalluswachstum geimpft. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss für 9 Wochen.

Die Kotyledonenexplantate nahmen im Laufe der ersten 7 Tage auf Kallusinduktionsmedium an Größe zu und begannen anzuschwellen. 10 Tage nach Kulturbeginn konnte an den Schnittstellen der Explantate das erste Auftreten von Kalluswachstum beobachtet werden. Nach 3 Wochen erfolgte die erste Passage der Kulturen auf frisches Nährmedium. Dabei wurden nur jene Explantate subkultiviert, die Kalluswachstum zeigten. 158 Sämlinge, deren Kotyledonenexplantate einen Kallus gebildet hatten, wurden weiterkultiviert. Das entspricht einer Kallusinduktionsrate von 93,5 % berechnet auf die Anzahl der gekeimten Samen.

Die folgende Abbildung 8 zeigt die Kotyledonenexplantate von 3 unterschiedlichen Genotypen 3 Wochen nach Kulturbeginn auf Kallusinduktionsmedium. Auf jedem Kreissektor wurde ein Klon inkubiert. Während manche Explantate kein Wachstum zeigten (a), nahmen andere um das Doppelte bis Dreifache der ursprünglichen Größe zu und bildeten an den Schnittstellen Kallusgewebe aus (b).

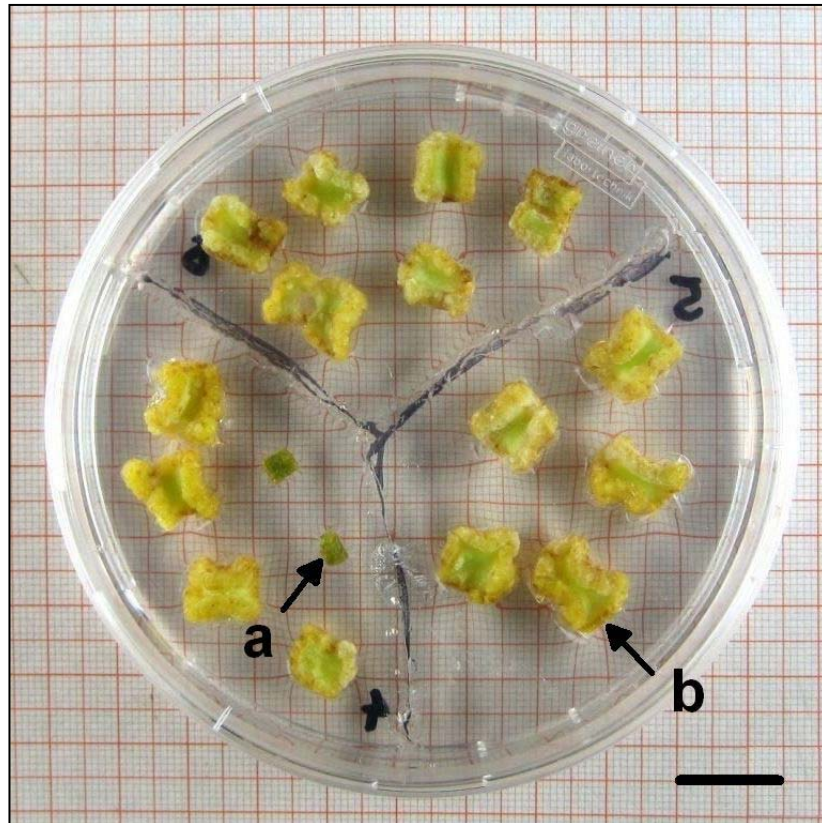


Abb. 8: Kein Wachstum der Kotyledonenexplantate (a) bzw. Bildung von Kallusgewebe (b) nach 3 Wochen auf Medium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S. 9), Balken = 1,5 cm

Nach 6 Wochen Kulturdauer hatte sich an den Wundrändern der Ausgangsexplantate genügend Kallusgewebe gebildet. Der Kallus wurde deshalb bei der zweiten Passage auf frisches Medium von den Kotyledonenexplantaten getrennt und subkultiviert.

Das Wachstum der Kalli wurde während der gesamten Kulturperiode durch wöchentliches Fotografieren dokumentiert. In Abbildung 9 ist die Zunahme an Kallusgewebe im Verlauf von 3 Wochen dargestellt. Die Fotos wurden zu Beginn der zweiten Subkultur (Tag 0) und nach jeweils 1, 2 und 3 Wochen (Tag 7, Tag 14 und Tag 21) aufgenommen.

Der auf Medium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S.9) induzierte Kallus war kompakt und wegen der Kultivierung im Dunkeln von gelblicher bis hellbrauner Farbe. Aussagen über das Wachstum können anhand optischer Gesichtspunkte getroffen werden. So kam es innerhalb der 3-wöchigen Subkultur zu einer Verdoppelung bis Verdreifachung der Größe der Explantate.

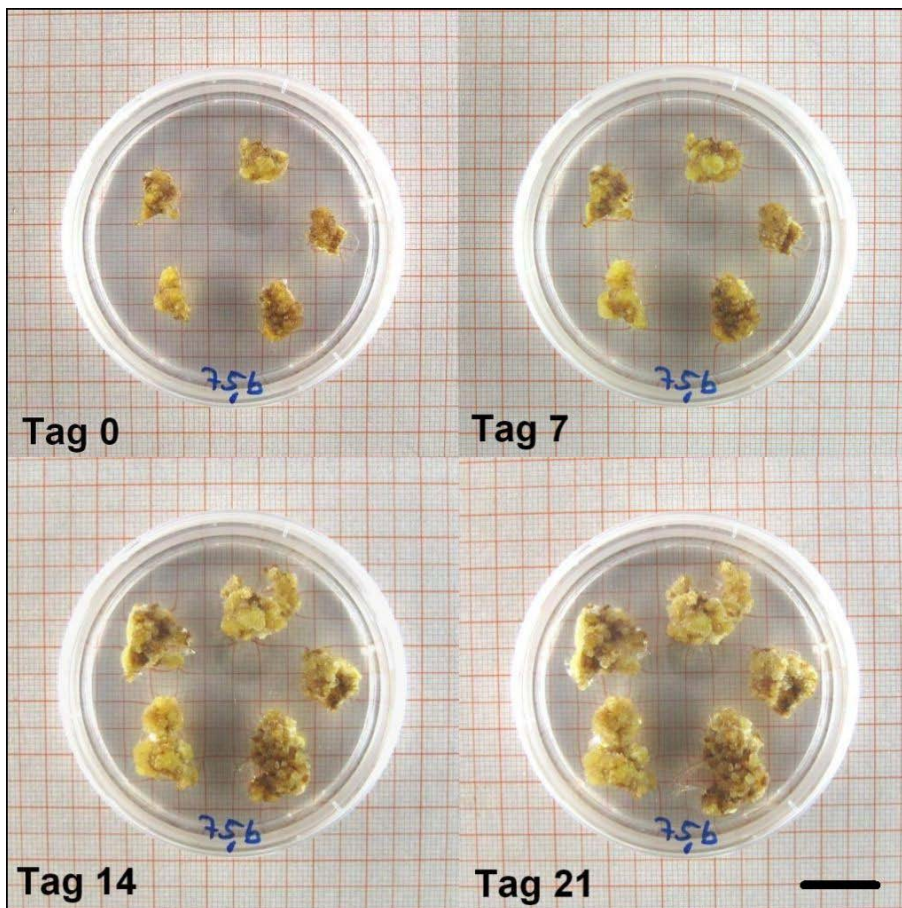


Abb. 9: Wachstumsverlauf der Kalli im Rahmen der zweiten Subkultur auf Medium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S. 9), Balken = 1,5 cm

Nach 9-wöchiger Kallusinduktionsphase war ausreichend Kallusmaterial für die Versuche zur Embryoentwicklung gebildet worden. Je nach Klon wurden 50 bis 245 Explantate mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 70 mg pro Explantat gebildet. Eine vollständige Auflistung aller im Rahmen der Etablierung von Kalluskulturen kultivierten Genotypen ist im Anhang dieser Arbeit (S. 84) angeführt.

Der in Abbildung 9 (S. 20) gezeigte Klon wurde neben 15 weiteren Genotypen für die Versuche zur Embryoentwicklung herangezogen. Dabei wurden den Klonen willkürlich Nummern von 1 bis 16 zur Unterscheidung zugeteilt. Die weitere Subkultur der Klone 1 bis 8 erfolgte auf halbfesten, die der Klone 9 bis 16 in flüssigen Stufe II-Medien. Um einen möglichst großen Stichprobenumfang zu erhalten, erfolgte die Auswahl jener Genotypen, die das stärkste Kalluswachstum zeigten. So wurde bereits im Vorfeld der Stufe II-Experimente eine gewisse Selektion des Pflanzenmaterials durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist aber berechtigt, da in der Praxis schnell wachsendes Gewebe gegenüber Kulturen mit geringen Wachstumsraten aus Zeitgründen vorzuziehen ist. So können schlussendlich in kurzer Zeit hohe Vermehrungsraten der *in vitro* kultivierten Pflanzen erzielt werden.

3.3. Versuche zur Induktion der Embryobildung

Das in der Kallusinduktionsphase erhaltene Kallusmaterial wurde in annähernd gleich große Stücke zerteilt (durchschnittliches Gewicht pro Explantat: ca. 70 mg) und auf die Medien zur Embryoentwicklung (vgl. Kap. 2.2., S. 9) transferiert. Dabei wurden 5 unterschiedliche Nährmedienzusammensetzungen in jeweils halbfester und flüssiger Form getestet. 8 unterschiedliche Genotypen, die willkürlich mit den Nummern 1 bis 8 belegt wurden (vgl. Tab. A, S. 84), wurden zur Etablierung der halbfesten Kulturen herangezogen. Das Beimpfen der Flüssigmedien erfolgte mit weiteren 8 Klonen (Nummer 9 bis 16). Eine zusätzliche Variation der Kulturbedingungen erfolgte durch Inkubation der Kalli im Dunkeln bzw. im Licht (16 h-Photoperiode). So sollte der Einfluss der Lichtverhältnisse auf die

Embryobildung festgestellt werden. Insgesamt ergaben sich durch Kombination aller angeführten Kulturbedingungen 20 verschiedene Versuchsanordnungen. Nach 6-wöchiger Kulturdauer auf bzw. in Medien zur Embryoentwicklung erfolgte die Auswertung der gebildeten Kalli.

In den folgenden Kapiteln erfolgt eine Auflistung der Ergebnisse geordnet nach den getesteten Nährmedien unterschiedlicher Zusammensetzung. Dabei werden die Einflüsse der Klone, der Lichtverhältnisse und der Konsistenz der Medien ohne Berücksichtigung der jeweils anderen Faktoren genauer erläutert.

3.3.1. Einfluss von Adeninsulfat

Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes von Adeninsulfat in der Embryoentwicklungsphase in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Kazianka, in Vorbereitung) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Versuchsreihe mit diesem Wuchsstoff durchgeführt. Das Cytokinin Adeninsulfat kam in einer Konzentration von 25 μM zum Einsatz. Die Kulturen auf bzw. in den Medien AdS25H (vgl. Tab. 2, S. 10) und AdS25F (vgl. Tab. 3, S. 11) wurden jeweils im Licht und im Dunkeln inkubiert. Im folgenden Abschnitt soll zunächst auf die Charakteristika der gebildeten Kalli und anschließend auf die Ergebnisse zur Embryogenese bzw. Organogenese eingegangen werden.

Kulturen auf Medium AdS25H im Licht

Das Kallusmaterial, das auf Medium AdS25H im Licht kultiviert wurde, zeigte mittelstarkes Wachstum mit einer Biomassenzunahme um mehr als das 5-fache des Animpfgewichts. Die Explantate waren meist von dunkelbrauner, seltener von hellbrauner Farbe. Der Großteil der Kalli hatte eine kompakte Konsistenz, teilweise konnte Knotenbildung beobachtet werden.

Kulturen auf Medium AdS25H im Dunkeln

Die Kallusexplantate, die unter Lichtausschluss gehalten wurden, zeigten ähnlich wie die Kulturen auf Medium AdS25H im Licht eine 5-fache Zunahme des Gewichts. Die Kalli waren jedoch meist von hellbrauner Farbe und wiesen gelegentlich eine pelzige Oberflächenstruktur und eine weiche Konsistenz auf.

Kulturen in Medium AdS25F im Licht

In der folgenden Abbildung 10 ist ein typisches Beispiel für Kulturen in Flüssigmedium mit 25 μ M Adeninsulfat im Licht dargestellt. Unter diesen Kulturbedingungen bildete sich ein eher mäßig wachsender, stets dunkelbrauner Kallus. An der Oberfläche der angeimpften Explantate, die während der gesamten Kulturdauer nicht zerfielen, wurde häufig Knotenbildung festgestellt.



Abb. 10: Kalluskultur nach 9 Wochen Kallusinduktion auf Medium TDZ1 und anschließender 6-wöchiger Embryoentwicklungsphase in Medium AdS25F im Licht (vgl. Kap. 2.2., S. 9), Balken = 1 cm

Kulturen in Medium AdS25F im Dunkeln

Wurden die Adeninsulfat-hältigen Flüssigmedien im Dunkeln inkubiert, so bildete sich analog zu den Flüssigkulturen im Licht ein mäßig wachsender, vorwiegend dunkelbrauner Kallus. Dieser Kallus war bei einigen Kolben in kleinere Aggregate zerfallen und zeigte häufig knotige, seltener pelzige Oberflächenstrukturen.

In Tabelle 4 erfolgt eine Darstellung des Wachstums und der Biomassenzunahme der Kulturen bei den durchgeführten Versuchen mit Adeninsulfat. Weiters ist die prozentuelle Häufigkeit von dunkelbraun gefärbtem Kallusmaterial angegeben.

Tab. 4: Einfluss von 25 μM Adeninsulfat in halbfestem (H) und flüssigem (F) Medium bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen auf Wachstum, Biomassenzunahme und Braunfärbung der Kalluskulturen

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anteil der Explantate (%) mit sehr gutem (+++) bis schlechtem (-) Wachstum				Biomassenzunahme (%)	dunkelbrauner Kallus (%)
	+++	++	+	-		
AdS25H Licht	-	44,4	53,7	1,9	578,2	74,4
AdS25H Dunkel	-	40,6	57,5	1,9	503,4	30,0
AdS25F Licht	-	12,5	79,2	8,3	460,1	100,0
AdS25F Dunkel	-	4,2	79,1	16,7	407,8	83,3

Beim Vergleich der unterschiedlichen Kulturbedingungen miteinander schien Lichtexposition sowohl bei den halbfesten als auch bei den flüssigen Medien zu einem gesteigerten Kalluswachstum und vermehrter Braunfärbung im Vergleich zu den jeweiligen Experimenten im Dunkeln zu führen. Weiters kam es bei den Flüssigkulturen zu einer geringeren Biomassenzunahme als bei den Kalli auf halbfesten Medien.

Morphogenese bei Adeninsulfat-hältigen Medien

Bei der Auswertung der Kulturen erfolgte die Unterscheidung zwischen globulären Embryos und Embryos, die sich über das globuläre Stadium hinaus entwickelt hatten. Für letztere wird in den folgenden Kapiteln zur Vereinfachung der Begriff

„Embryos“ verwendet. Damit sind alle beobachteten embryo-ähnlichen Bildungen exklusive der Anzahl an globulären Formen gemeint. Neben der Anzahl gebildeter somatischer Embryos wurde die Menge der entstandenen Adventivsprosse erhoben.

Bei allen Adeninsulfatmedien wurde die Bildung von somatischen Embryonen festgestellt. Ebenso wurde das Auftreten von Sprossbildung beobachtet, wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß als die Embryobildung. In der folgenden Tabelle 5 ist jeweils die mittlere Anzahl \pm Standardfehler an globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen pro g Animpfgewicht angegeben.

Tab. 5: Einfluss von 25 μ M Adeninsulfat, Konsistenz des Mediums und Lichtbedingungen auf die Bildung von Embryos bzw. Adventivsprossen pro g Animpfgewicht.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anzahl an Embryos pro g (Mittelwert \pm Std.f.)		Anzahl an Adventivsprossen pro g (Mittelwert \pm Std.f.)
	globuläre Embryos	Embryos	
AdS25H Licht	82,9 \pm 6,4 b	92,5 \pm 8,4 b	15,1 \pm 1,3 a
AdS25H Dunkel	41,1 \pm 4,8 a	56,6 \pm 5,6 ab	10,2 \pm 2,1 a
AdS25F Licht	71,6 \pm 9,5 b	78,4 \pm 9,2 ab	12,8 \pm 1,4 a
AdS25F Dunkel	75,9 \pm 8,1 b	51,5 \pm 6,4 a	25,8 \pm 3,1 b

Was die Bildung von globulären Embryos anbelangt, führte die Kultivierung in Flüssigmedien sowie auf Medium AdS25H im Licht zu guten Ergebnissen. Kalli auf Medium AdS25H im Dunkeln brachten signifikant weniger globuläre Embryos hervor als unter den anderen Kulturbedingungen.

Bezüglich der Bildung von entwickelten Embryonen war Medium AdS25H im Licht signifikant besser geeignet als Medium AdS25F im Dunkeln.

Das Medium AdS25H im Licht scheint sowohl für die Bildung von globulären embryo-ähnlichen Strukturen als auch für die weitere Entwicklung zu Embryos besonders effektiv zu sein.

Die Bildung von Adventivsprossen war mit Ausnahme des Mediums AdS25F unter Lichtausschluss, das im Mittel 25,8 Sprosse pro g hervorbrachte, eher schlecht. Insgesamt führte der Zusatz von Adeninsulfat in einer Konzentration von 25 μM zu Embryoentwicklungsmedien zu guten Ergebnissen, was die somatische Embryogenese betraf. Die Anzahl an beobachteten Adventivsprossen war hingegen wesentlich geringer. Das zeigt, dass unter den beschriebenen Kulturbedingungen die Morphogenese in Richtung Embryogenese gelenkt wurde. In einer vorangegangenen Diplomarbeit (Kazianka, in Vorbereitung) wurde bei Medien mit 50 μM Adeninsulfat vermutlich durch die zu hohe Konzentration an Cytokinin eine Unterdrückung des Wurzelwachstums beobachtet. Abbildung 11 (Pfeile) zeigt, dass bei Kultivierung der embryogenen Kalli auf Medien mit 25 μM Adeninsulfat normales Wurzelwachstum beobachtet werden konnte.

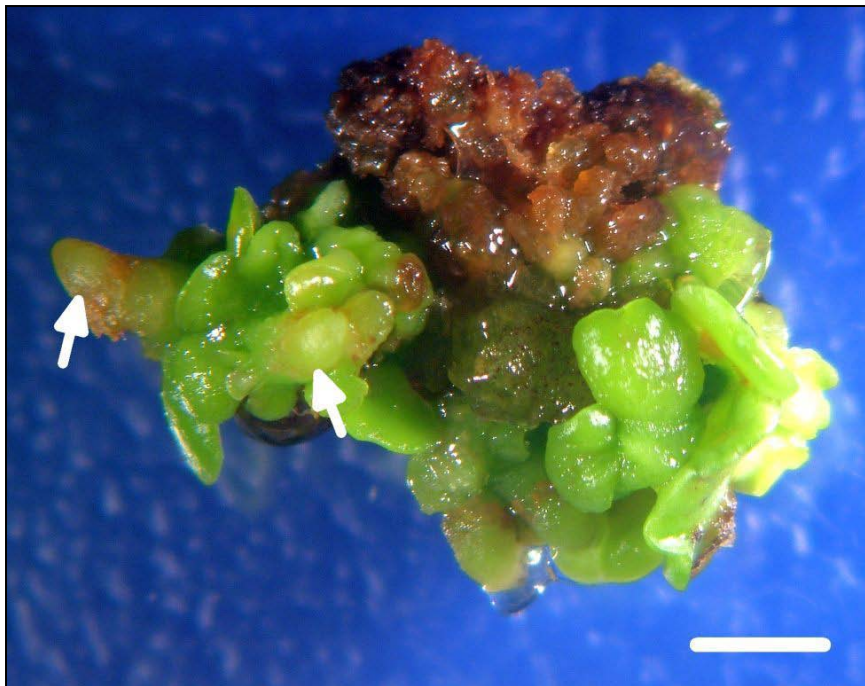


Abb. 11: Kallus mit somatischen Embryos mit normalem Wurzelwachstum, gebildet auf Medium AdS25H (vgl. Kap. 2.2., S. 9) im Licht, Balken = 0,2 cm

In den folgenden Kapiteln soll auf den Einfluss der verwendeten Genotypen, der Lichtverhältnisse und der Konsistenz der Nährmedien auf die somatische Embryogenese bzw. Adventivsprossbildung ohne Berücksichtigung der jeweils anderen Faktoren eingegangen werden.

3.3.1.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 8 Genotypen auf halbfesten Medien (Klone 1 bis 8) und 8 weitere Genotypen in Flüssigmedien (Klone 9 bis 16) kultiviert. Der Einfluss von unterschiedlichen Genotypen kann in der Mikrovermehrung von Pflanzen eine besondere Rolle spielen.

Tabelle 6 (S. 28) zeigt eine nach Genotypen geordnete Aufstellung der beobachteten globulären Strukturen, Embryos und Adventivsprosse pro g Kallus-Animpfgewicht.

Bei der Bildung von globulären somatischen Embryos lieferte Klon Nummer 1 signifikant schlechtere Ergebnisse als die Klone 4, 11, 14 und 15. Weiters unterschieden sich die Genotypen 12 und 15 mit statistischer Signifikanz voneinander.

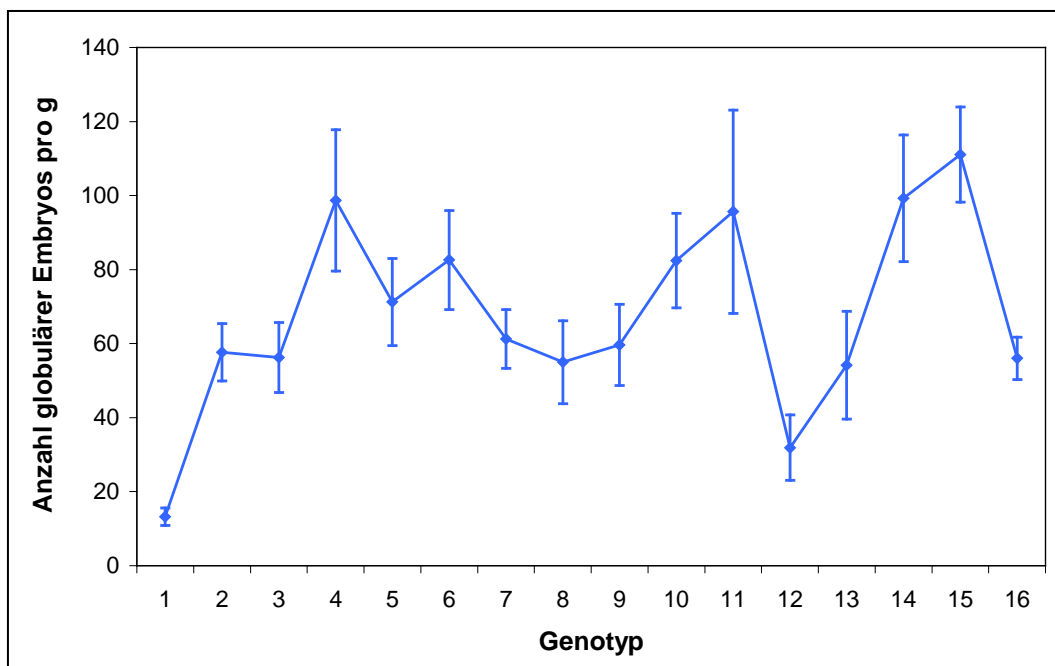
Klon Nummer 1 brachte auch die geringste Anzahl an entwickelten Embryos hervor. Mit einer durchschnittlichen Anzahl von 23,1 Embryos pro g unterschied sich Genotyp 1 signifikant von den Genotypen 6 und 15.

Außer bei den hier genannten Klonen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verwendeten Genotypen im Hinblick auf die somatische Embryogenese. In den Diagrammen 1 bis 3 (S. 28 und S. 29) erfolgt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

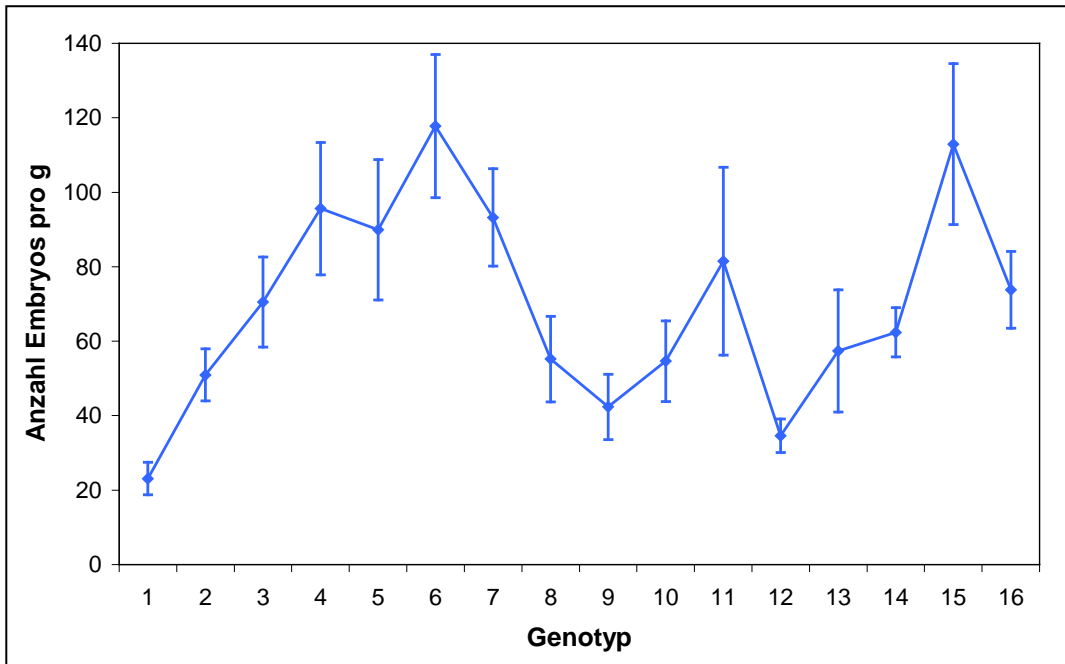
Tab. 6: Einfluss der Genotypen auf die somatische Embryogenese und Organogenese auf bzw. in Adeninsulfat-hältigen Medien.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

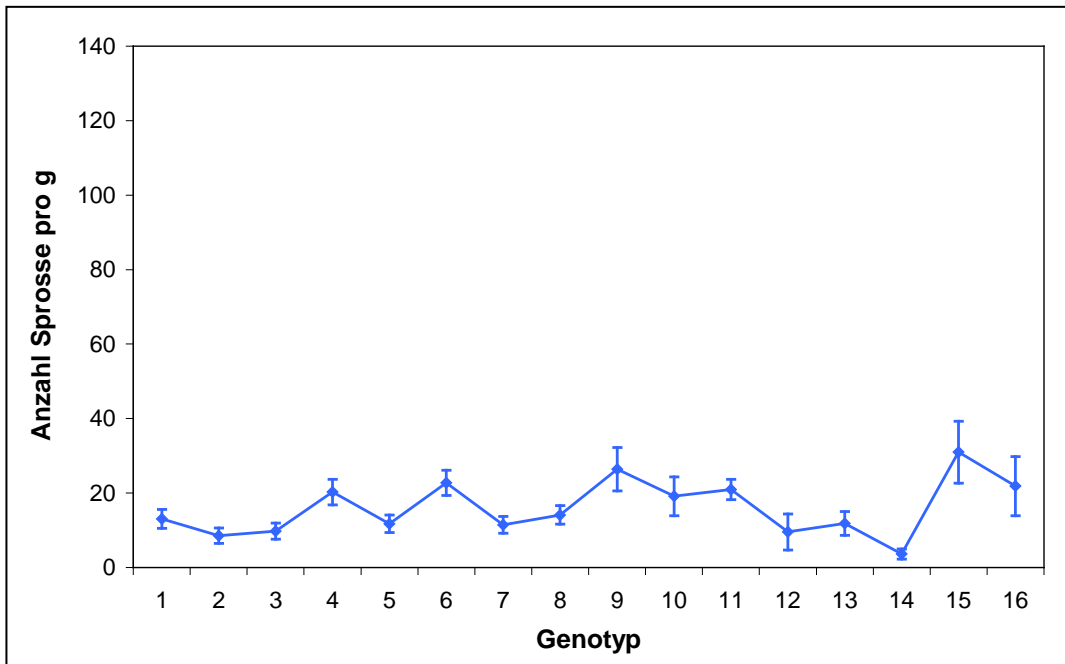
Genotyp	Anzahl globulärer Embryos pro g (Mittelwert ± Stdf.)	Anzahl Embryos pro g (Mittelwert ± Stdf.)	Anzahl Sprosse pro g (Mittelwert ± Stdf.)
1	13,3 ± 2,4 a	23,1 ± 4,3 a	13,1 ± 2,6 abc
2	57,7 ± 7,8 abc	51,0 ± 7,0 ab	8,5 ± 2,1 ab
3	56,3 ± 9,4 abc	70,5 ± 12,1 ab	9,8 ± 2,2 abc
4	98,7 ± 19,1 bc	95,6 ± 17,8 ab	20,3 ± 3,4 abcd
5	71,2 ± 11,8 abc	90,0 ± 18,9 ab	11,8 ± 2,4 abc
6	82,6 ± 13,4 abc	117,8 ± 19,2 b	22,7 ± 3,4 bcd
7	61,3 ± 8,0 abc	93,2 ± 13,1 ab	11,5 ± 2,3 abc
8	55,0 ± 11,2 abc	55,2 ± 11,5 ab	14,1 ± 2,5 abc
9	59,7 ± 11,0 abc	42,3 ± 8,8 ab	26,4 ± 5,8 cd
10	82,4 ± 12,8 abc	54,6 ± 10,8 ab	19,1 ± 5,2 abcd
11	95,6 ± 27,5 bc	81,5 ± 25,2 ab	20,9 ± 2,7 bcd
12	31,9 ± 8,8 ab	34,6 ± 4,5 ab	9,6 ± 4,8 abc
13	54,2 ± 14,6 abc	57,4 ± 16,4 ab	11,8 ± 3,2 abc
14	99,3 ± 17,1 bc	62,4 ± 6,6 ab	3,6 ± 1,4 a
15	111,1 ± 12,8 c	112,9 ± 21,6 b	31,0 ± 8,3d
16	56,0 ± 5,8 abc	73,8 ± 10,3 ab	21,9 ± 7,9 bcd



Diagr. 1: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von globulären Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 25 µM Adeninsulfat. Mittelwerte ± Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 2: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 25 μ M Adeninsulfat. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 3: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von Adventivsprossen auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 25 μ M Adeninsulfat. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

Für die Entwicklung von Adventivsprossen konnten zwar signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Klonen festgestellt werden (vgl. Tab. 6, S. 28), im Mittel aber spielte der Einfluss von unterschiedlichen Genotypen keine entscheidende Rolle (vgl. Diagr. 3, S. 29).

Insgesamt hatten die unterschiedlichen Klone keinen wesentlichen Einfluss auf die somatische Embryogenese bzw. Organogenese bei Adeninsulfat-hältigen Medien. Einzig Genotyp 1 zeigte signifikant unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu Genotyp 15, sowohl bei der Bildung von globulären Strukturen als auch von Embryos.

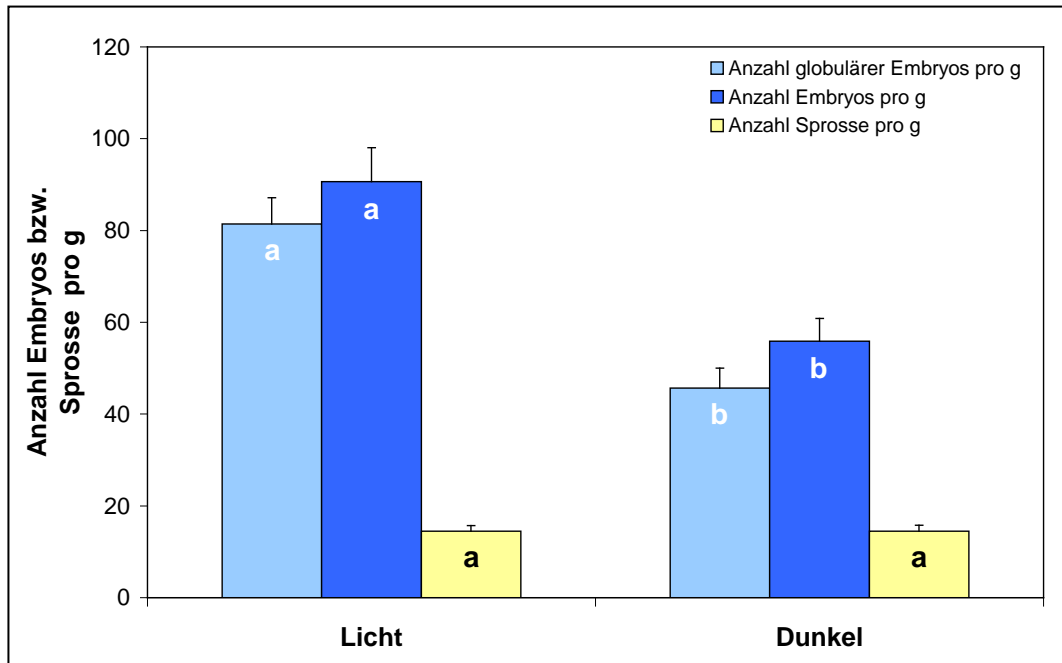
Aus Tabelle 6 (S. 28) bzw. den Diagrammen 1 bis 3 (S. 28 und S. 29) kann weiters abgelesen werden, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen Flüssigmedien und halbfesten Medien zu geben schien. Die Klone 9 bis 16, die in Flüssigkultur gehalten wurden, zeigten im Mittel keine besseren Ergebnisse als die Klone 1 bis 8, deren Kultivierung auf mit Gelbildner verfestigten Medien erfolgte. Der Einfluss der Konsistenz des Nährmediums soll in Kap. 3.3.1.3. (S. 31) genauer erläutert werden.

3.3.1.2. Einfluss der Lichtverhältnisse

Um den Einfluss von Lichtverhältnissen auf die Morphogenese zu untersuchen, wurden die Medien AdS25H und AdS25F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) sowohl im Dunkeln als auch im Licht (16 h-Photoperiode) inkubiert.

In Diagramm 4 (S. 31) ist die durchschnittliche Anzahl an gebildeten globulären Strukturen, Embryos und Adventivsprossen pro g dargestellt.

Die Kultivierung der Kalli im Licht lieferte bezüglich der Bildung von globulären Strukturen und Embryonen signifikant bessere Ergebnisse als bei Inkubation im Dunkeln. Der positive Effekt von Lichteinwirkung auf die somatische Embryogenese konnte bei der Bildung von Adventivsprossen nicht beobachtet werden.



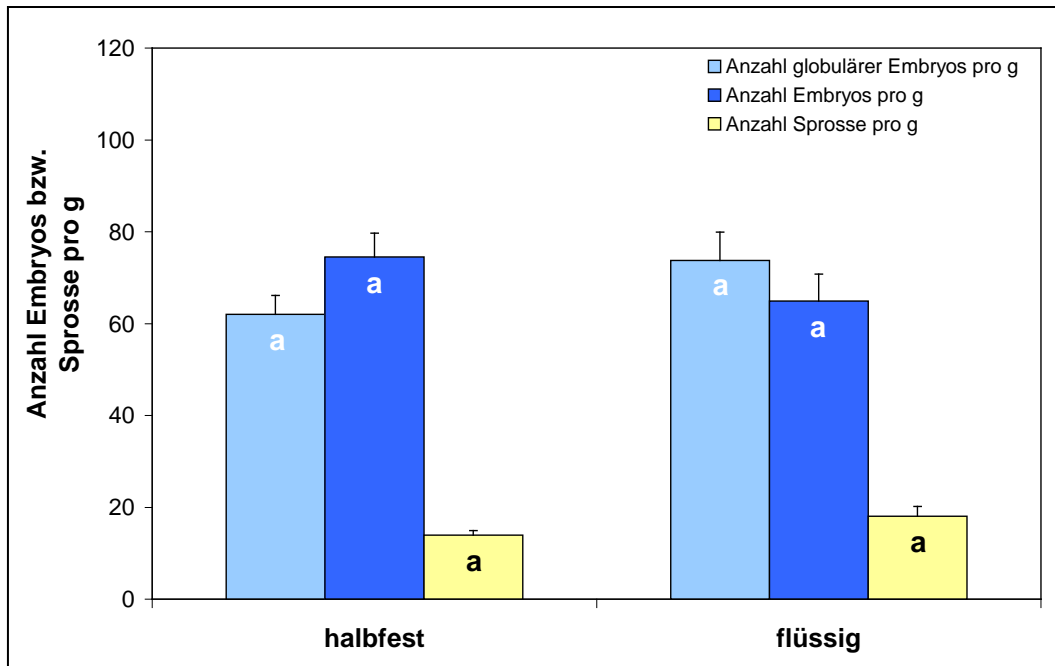
Diagr. 4: Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen bei Adeninsulfat-hältigen Medien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

3.3.1.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums

Adeninsulfatmedien wurden in Form von Flüssigmedien und halbfesten Medien eingesetzt. So sollte der Einfluss der Konsistenz des Nährmediums auf die somatische Embryogenese bzw. Organogenese festgestellt werden.

In folgendem Diagramm 5 (S. 32) ist die mittlere Anzahl an beobachteten Embryos und Sprossen jeweils für flüssige und mit Gelbildner verfestigte Medien dargestellt. Wie im Diagramm ersichtlich, brachte die Verwendung von Flüssigmedien gegenüber halbfesten Medien keine signifikanten Vorteile.



Diagr. 5: Einfluss der Konsistenz von Adeninsulfat-hältigen Nährmedien auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Säulen gleicher Farbe und mit gleichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,05$)

3.3.2. Einfluss von Aktivkohle

Für Stufe II-Experimente kamen die Medien AK1%H und AK1%F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) mit 10g/l Aktivkohle zum Einsatz. Ein Teil der Kulturen wurde im Licht, der andere Teil im Dunkeln inkubiert.

Es folgt eine Darstellung der Unterschiede in Wachstum, Aussehen und Morphogenese der Kalli für die jeweiligen Kulturbedingungen bei Aktivkohle-hältigen Medien.

Kulturen auf Medium AK1%H im Licht

Kalli, die auf halbfestem Aktivkohlemedium im Licht gebildet wurden, zeigten wenig bis kein Wachstum und waren meist von dunkelbrauner, seltener von grüner und hellbrauner Farbe. Das Kallusmaterial hatte sich während der Kulturperiode mit einer Biomassenzunahme von 295,1 % beinahe verdreifacht.

Kulturen auf Medium AK1%H im Dunkeln

Bei der Kultivierung auf Medium AK1%H unter Lichtausschluss wurde wenig bis kaum neugebildetes Kallusmaterial vorgefunden. Die Kalli waren hellbraun bis dunkelbraun gefärbt, gelegentlich wurden gelbliche Anteile festgestellt. Grüne Kalli kamen wegen der Inkubation im Dunkeln und der damit fehlenden Chlorophyllbildung nicht vor. Gelegentlich wurden pelzige Kallusabschnitte beobachtet.

Kulturen in Medium AK1%F im Licht

In Medium AK1%F im Licht war die Biomassenzunahme mit 230,0 % gering. Es bildeten sich durchwegs hellbraune Kalli, die manchmal eine knotige Oberfläche aufwiesen.

Kulturen in Medium AK1%F im Dunkeln

Das Wachstum und Aussehen der Flüssigkulturen im Dunkeln entsprach, abgesehen von häufiger beobachteten knotigen Oberflächenstrukturen, weitgehend den Charakteristika der Kulturen im Licht.

Insgesamt war das Wachstum der Kalli auf bzw. in den Aktivkohle-hältigen Medien gering. In Tabelle 7 (S. 34) sind die Merkmale Wachstum, Biomassenzunahme und das Auftreten von dunkelbraun gefärbtem Kallus zusammengefasst.

Tab. 7: Einfluss von 1 % Aktivkohle in halbfestem (H) und flüssigem (F) Medium bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen auf Wachstum, Biomassenzunahme und Braunfärbung der Kalluskulturen

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anteil der Explantate (%) mit sehr gutem (+++) bis schlechtem (-) Wachstum				Biomassenzunahme (%)	dunkelbrauner Kallus (%)
	+++	++	+	-		
AK1%H Licht	-	0,6	58,8	40,6	295,1	66,9
AK1%H Dunkel	-	-	48,7	51,3	243,3	43,7
AK1%F Licht	-	-	45,8	54,2	230,0	-
AK1%F Dunkel	-	-	37,5	62,5	237,7	-

Morphogenese bei Aktivkohle-hältigen Medien

Unter allen Kulturbedingungen mit Aktivkohle wurden somatische Embryogenese und Organogenese beobachtet.

Beim Vergleich der jeweiligen Kulturbedingungen (siehe Tab. 8) war die Anzahl an globulären Embryos auf Medium AK1%H im Licht signifikant höher als bei den Aktivkohlemedien unter Lichtausschluss.

Bei der Bildung von Embryos lieferte das Medium AK1%H im Licht signifikant bessere Ergebnisse als die Flüssigkulturen.

Tab. 8: Einfluss von 1 % Aktivkohle, Konsistenz des Mediums und Lichtbedingungen auf die Bildung von Embryos bzw. Adventivsprossen pro g Animpfgewicht. Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anzahl an Embryos pro g (Mittelwert ± Stdf.)		Anzahl an Adventivsprossen pro g (Mittelwert ± Stdf.)
	globuläre Embryos	Embryos	
AK1%H Licht	37,2 ± 3,9 b	29,7 ± 3,4 b	7,4 ± 1,0 b
AK1%H Dunkel	13,5 ± 2,0 a	15,5 ± 2,2 ab	2,4 ± 0,5 a
AK1%F Licht	23,5 ± 4,0 ab	10,5 ± 2,7 a	7,6 ± 1,6 b
AK1%F Dunkel	15,3 ± 3,3 a	7,1 ± 1,5 a	3,5 ± 1,0 ab

Auffällig war, dass sich der Faktor Licht bei den halbfesten Medien positiv auf die Entwicklung von globulären Strukturen und Adventivsprossen auswirkte. Bei den Flüssigmedien konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kultivierung im Licht und im Dunkeln festgestellt werden. Wie bereits erwähnt (vgl. S. 33), zeigten die unterschiedlichen Lichtverhältnisse kaum einen Einfluss auf das Wachstum und Aussehen der Kalli in Flüssigkulturen. Die Ursache für diese Ergebnisse sind die durch die Eigenfärbung von Aktivkohle dunklen Kulturbedingungen in den ständig in Bewegung gehaltenen Flüssigmedien.

Insgesamt wirkte sich die Verwendung von Medien mit 1 % Aktivkohle ungünstig auf die Bildung von somatischen Embryos aus. Bei der Auszählung der Embryonen fiel auf, dass es vor allem in den Flüssigmedien zum vermehrten Auftreten von gekeimten Embryos kam. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich Aktivkohle in einer Konzentration von 10 g/l zwar negativ auf die Bildung von somatischen Embryos auswirkt, aber die Konversion von bereits gebildeten Embryos erleichtert. Bei diesen Beobachtungen handelt es sich aber nur um einen Eindruck, der bei der Auszählung gewonnen wurde. Abbildung 12 zeigt einen gekeimten Embryo, der in Medium AK1%F im Licht gebildet wurde.

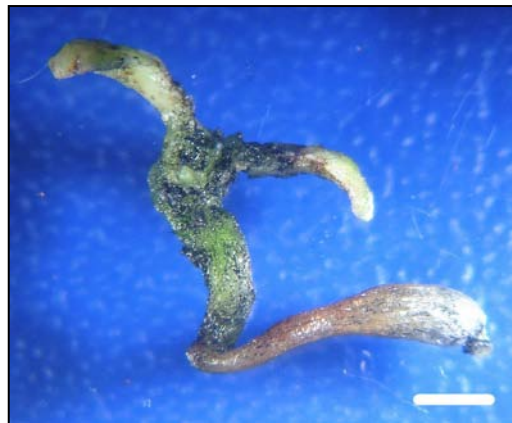


Abb. 12: Gekeimter Embryo, gebildet in Medium AK1%F im Licht (vgl. Kap. 2.2., S. 9), Balken = 0,2 cm

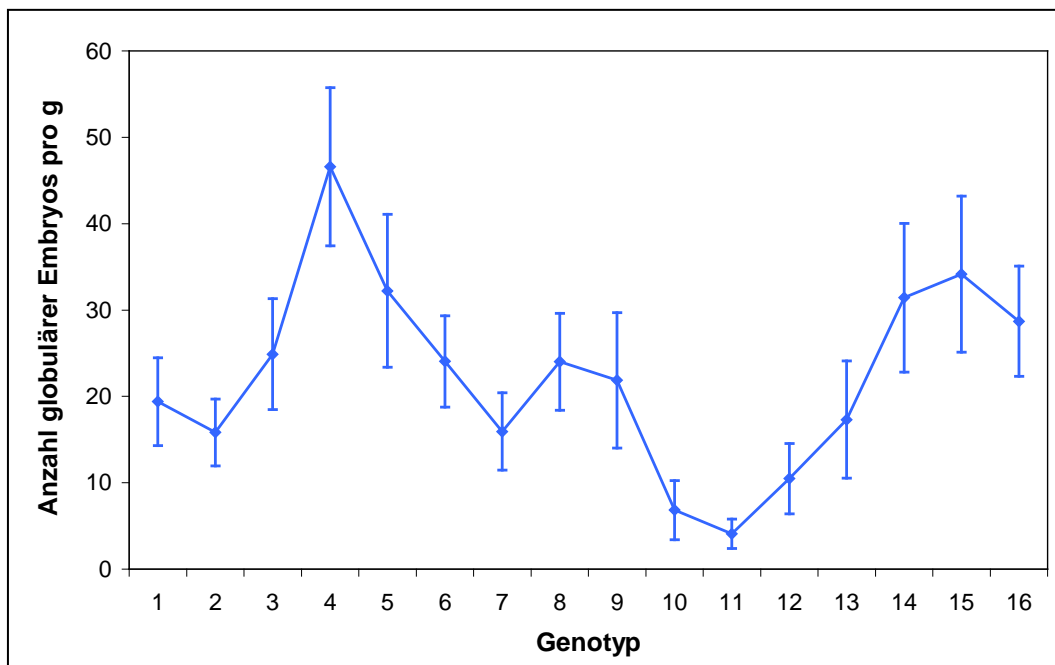
Die folgenden Kapitel behandeln die Einflüsse von Genotyp, Lichtverhältnissen und Konsistenz des Nährmediums auf die somatische Embryogenese und Organogenese. Die Auswertung der Daten erfolgte für jeweils einen Faktor ohne Berücksichtigung der anderen Faktoren.

3.3.2.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen

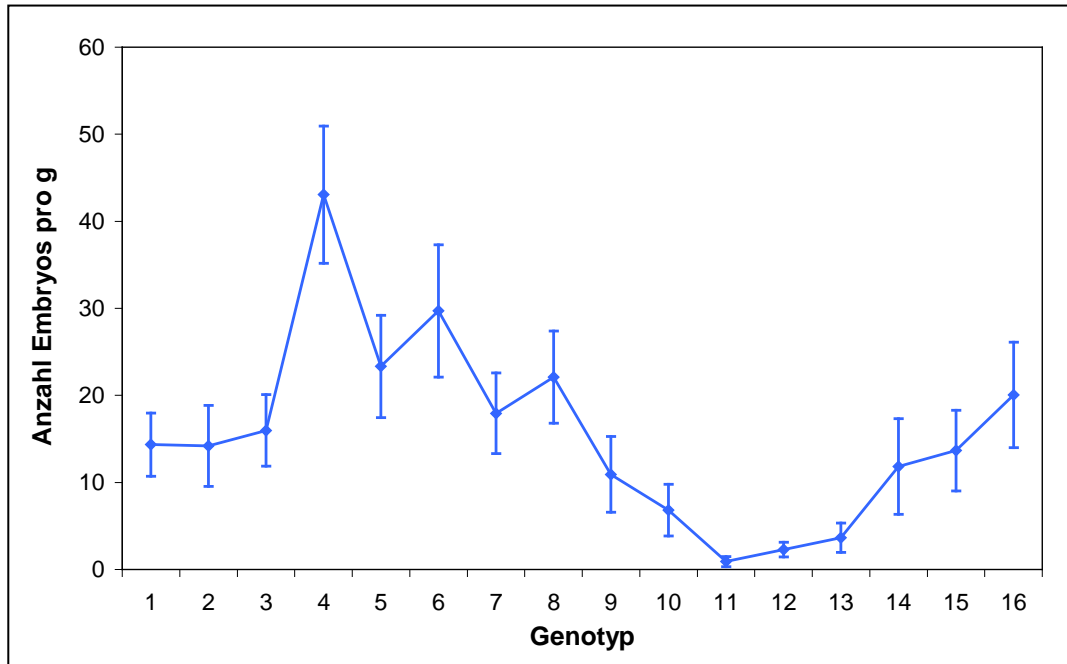
Der Einfluss der verwendeten Klone auf die Morphogenese bei Aktivkohle-hältigen Medien wurde ermittelt (siehe Tab. 9, S. 38).

Für die somatische Embryogenese zeigten alle verwendeten Klone annähernd gleiche Ergebnisse. Einzig Klon Nummer 4 brachte signifikant mehr globuläre Strukturen als Klon 11 und mehr Embryos als die Klone 10, 11, 12, und 13 hervor (siehe Diagr. 6 und Diagr. 7, S. 37).

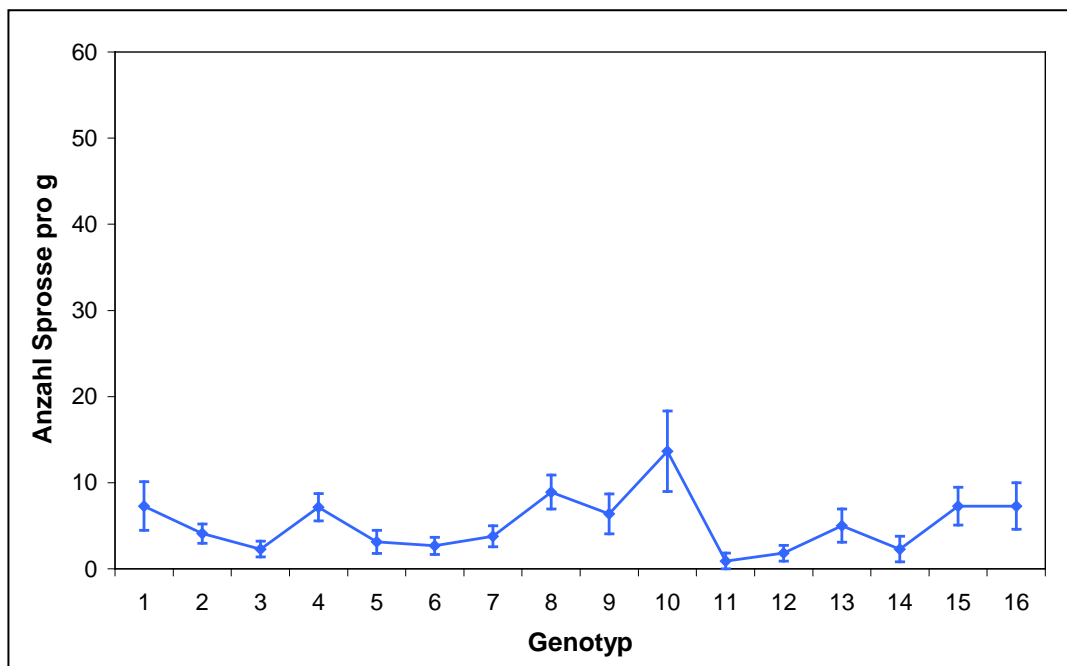
Die meisten Adventivsprosse wurden von Klon 10 gebildet (siehe Diagr. 8, S. 37), signifikant weniger Sprosse regenerierten am Kallus der Klone 3, 5, 6, 11, 12 und 14. Im Mittel aber waren die Unterschiede zwischen den Genotypen gering.



Diagr. 6: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von globulären Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 1 % Aktivkohle. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 7: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 1 % Aktivkohle.
Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 8: Einfluss der Genotypen auf die Adventivsprossbildung auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 1 % Aktivkohle.
Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

Beim Vergleich der Diagramme 6 bis 8 (S. 36 und S. 37) fällt auf, dass bei den Experimenten mit Aktivkohlemedien generell mehr Embryos als Adventivsprosse gebildet wurden.

Tab. 9: Einfluss der Genotypen auf die somatische Embryogenese und Organogenese auf bzw. in Aktivkohle-hältigen Medien.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

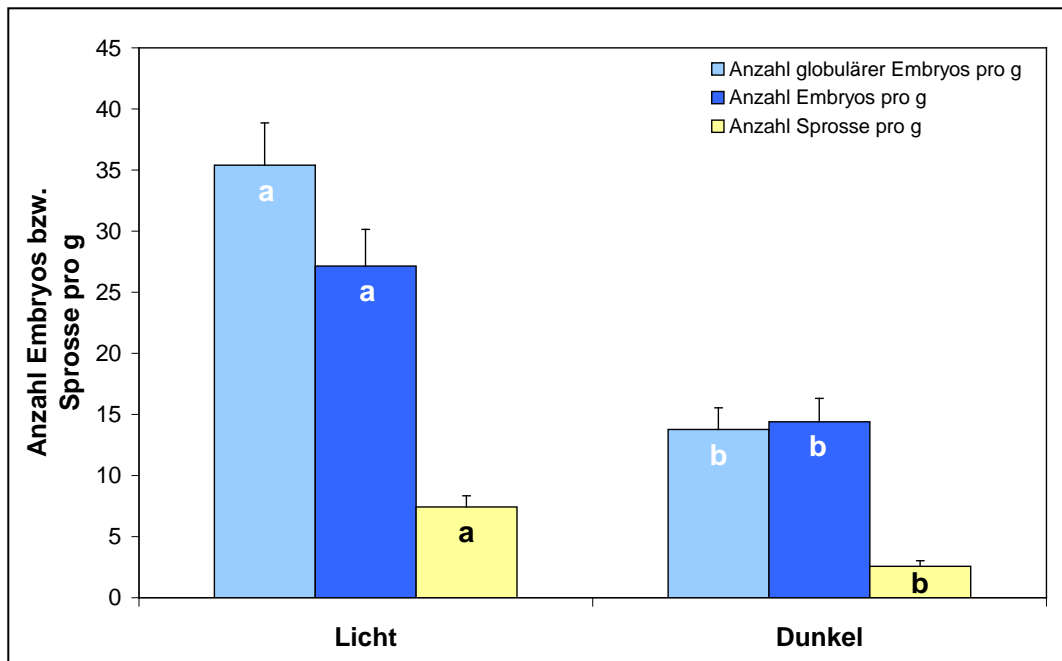
Genotyp	Anzahl globulärer Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Sprosse pro g (Mittelwert \pm Stdf.)
1	19,4 \pm 5,1 ab	14,3 \pm 3,6 ab	7,3 \pm 2,8 ab
2	15,8 \pm 3,9 ab	14,2 \pm 4,6 ab	4,1 \pm 1,1 ab
3	24,9 \pm 6,4 ab	16,0 \pm 4,1 ab	2,3 \pm 0,9 a
4	46,6 \pm 9,2 b	43,1 \pm 7,9 b	7,1 \pm 1,6 ab
5	32,2 \pm 8,9 ab	23,3 \pm 5,9 ab	3,1 \pm 1,3 a
6	24,0 \pm 5,3 ab	29,7 \pm 7,6 ab	2,7 \pm 1,0 a
7	15,9 \pm 4,5 ab	17,9 \pm 4,6 ab	3,8 \pm 1,2 ab
8	24,0 \pm 5,6 ab	22,1 \pm 5,3 ab	8,9 \pm 2,0 ab
9	21,9 \pm 7,9 ab	10,9 \pm 4,3ab	6,4 \pm 2,3 ab
10	6,8 \pm 3,4 ab	6,8 \pm 3,0 a	13,7 \pm 4,7 b
11	4,1 \pm 1,7 a	0,9 \pm 0,6 a	0,9 \pm 0,9 a
12	10,5 \pm 4,1 ab	2,3 \pm 0,8 a	1,8 \pm 0,9 a
13	17,3 \pm 6,8 ab	3,6 \pm 1,7 a	5,0 \pm 1,9 ab
14	31,4 \pm 8,6 ab	11,8 \pm 5,5 ab	2,3 \pm 1,5 a
15	34,2 \pm 9,0 ab	13,7 \pm 4,6 ab	7,3 \pm 2,2 ab
16	28,7 \pm 6,4 ab	20,0 \pm 6,1 ab	7,3 \pm 2,7 ab

3.3.2.2. Einfluss der Lichtverhältnisse

Die Medien mit 1 % Aktivkohle-Zusatz (vgl. Kap. 2.2., S. 9) wurden einerseits unter Lichtausschluss und andererseits im Licht (16 h-Photoperiode) kultiviert.

Die Inkubation der Kalli im Licht zeigte signifikant bessere Ergebnisse für die somatische Embryogenese und Organogenese als im Dunkeln (siehe Diagramm 9, S. 39). Die Information, dass unterschiedliche Lichtbedingungen bei Flüssigkulturen aufgrund der Eigenfärbung der Aktivkohle-hältigen Medien die

Morphogenese nicht beeinflussen (vgl. S. 35), ging hier verloren. Der Grund dafür waren unterschiedliche Stichprobengrößen der halbfesten Medien (N=160) und Flüssigmedien (N=24).



Diagr. 9: Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen bei Aktivkohle-hältigen Medien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

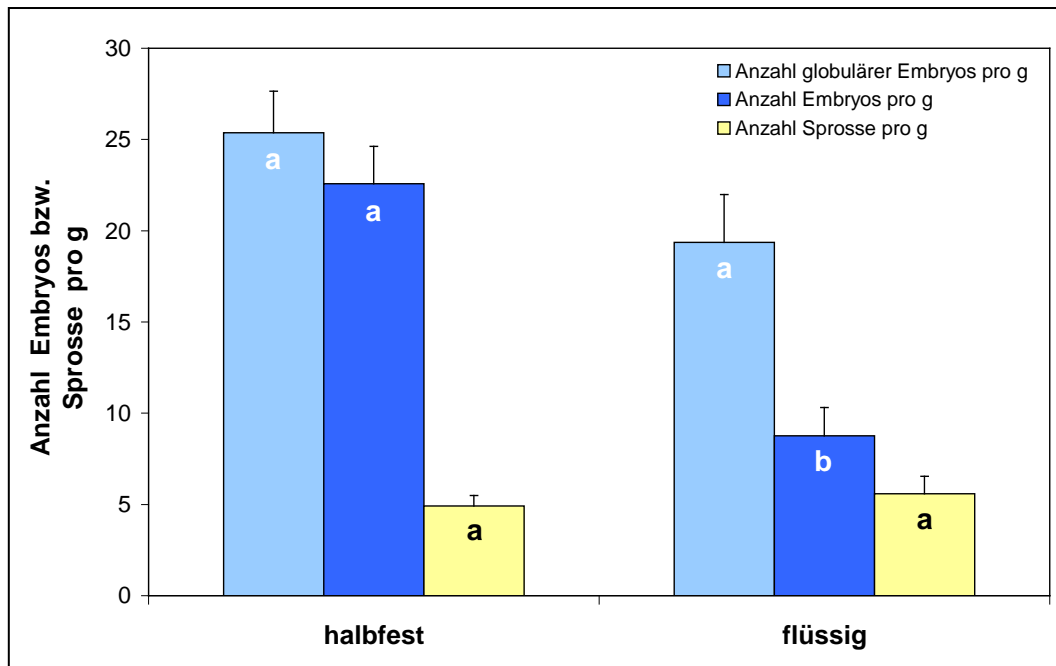
Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

3.3.2.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums

Beim Vergleich der halbfesten Medien mit den Flüssigkulturen zeigten sich keine signifikanten Einflüsse der Konsistenz des Mediums auf die Bildung von globulären Embryos und Adventivsprossen.

Für das Auftreten von Embryos, die sich über das globuläre Stadium hinaus entwickelt hatten, brachte die Kultivierung auf halbfesten Medien bessere Ergebnisse als in Flüssigmedien.

Aus Diagramm 10 (S. 40) kann die mittlere Anzahl an gebildeten globulären Strukturen, Embryos und Adventivsprossen entnommen werden.



Diagr. 10: Einfluss der Konsistenz von Aktivkohle-hältigen Nährmedien auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

3.3.3. Einfluss von 0,1 μM Thidiazuron

Um die Embryobildung zu induzieren, wurde die für die Kallusinduktion verwendete TDZ-Konzentration von 1 μM auf 0,1 μM reduziert. Zu diesem Zweck wurden embryogene Kalli auf bzw. in den Stufe II-Medien TDZ0,1H und TDZ0,1F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) subkultiviert. Eine weitere Variation der Kulturbedingungen erfolgte durch Inkubation sowohl im Licht als auch unter Lichtausschluss.

Zunächst erfolgt die Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Kulturbedingungen.

Kulturen auf Medium TDZ0,1H im Licht

Unter diesen Kulturbedingungen entstand reichlich grünes, seltener auch hellbraunes Kallusgewebe. Es konnte eine Biomassenzunahme um mehr als das 17-fache beobachtet werden (siehe Tab. 10, S. 41), was auf die relativ hohe

Thidiazuronkonzentration von 0,1 μM zurückzuführen ist. Die Kalli waren teilweise zerbrechlich und wiesen oft eine knotige Oberflächenstruktur auf.

Kulturen auf Medium TDZ0,1H im Dunkeln

Die Kalluskultur auf Medium TDZ0,1H unter Lichtausschluss zeigte ebenfalls sehr gutes Wachstum, wenn auch weniger als unter Lichtexposition. Das leicht zerbrechliche Kallusmaterial war von gelblicher bis hellbrauner Farbe, dunkelbraune Anteile wurden sehr selten festgestellt.

Kulturen in Medium TDZ0,1F im Licht

Unter diesen Kulturbedingungen wurde reichlich neugebildetes Kallusmaterial mit knotiger Oberflächenstruktur vorgefunden. Neben hellbraun gefärbten Kalli wurden auch dunkelbraune Kallusabschnitte beobachtet. Allgemein zerfielen die angeimpften Explantate bei den Flüssigkulturen mit 0,1 μM TDZ häufiger in kleinere Aggregate als bei den anderen verwendeten Flüssigmedien (vgl. Tab. 3, S. 11).

Kulturen in Medium TDZ0,1F im Dunkeln

Das Kallusmaterial, das in Medium TDZ0,1F unter Lichtausschluss gebildet wurde, zeigte sehr gutes Wachstum mit der Entwicklung von ausschließlich hellbraunen Kalli mit teils pelziger Oberfläche.

Tab. 10: Einfluss von 0,1 μM Thidiazuron in halbfestem (H) und flüssigem (F) Medium bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen auf Wachstum, Biomassenzunahme und Braunfärbung der Kalluskulturen

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anteil der Explantate (%) mit sehr gutem (+++) bis schlechtem (-) Wachstum				Biomassenzunahme (%)	dunkelbrauner Kallus (%)
	+++	++	+	-		
TDZ0,1H Licht	77,5	21,2	1,3	-	1751,9	2,5
TDZ0,1H Dunkel	74,4	23,1	2,5	-	1346,3	0,6
TDZ0,1F Licht	50,0	50,0	-	-	1338,1	41,7
TDZ0,1F Dunkel	87,5	12,5	-	-	1407,3	-

Die Kultivierung auf bzw. in Medien mit 0,1 μM Thidiazuron führte zur Bildung von reichlich Kallusmaterial, das mit Ausnahme der Kalli in Medium TDZ0,1F im Licht kaum Braunfärbung zeigte. Weiters wurde bei diesen Medien häufiger Kallusgewebe weicher und zerbrechlicher Konsistenz beobachtet als bei den übrigen Nährmedien.

Morphogenese bei Nährmedien mit 0,1 μM Thidiazuron

In allen Versuchen mit 0,1 μM Thidiazuron wurde sowohl somatische Embryogenese als auch Adventivsprossbildung induziert.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Kulturbedingungen zeigte sich, dass auf Medium TDZ0,1H im Licht die meisten globulären Strukturen, und auch mehr Embryos als in Flüssigmedien gebildet wurden (siehe Tab. 11). Insgesamt zeigte der Einsatz von Medien mit 0,1 μM Thidiazuron bei der Bildung von somatischen Embryonen ähnlich ungünstige Ergebnisse wie die Aktivkohle-hältigen Medien (vgl. Kap. 3.3.2., S. 32).

Die Entwicklung von Adventivsprossen wurde auf den halbfesten Medien mit 23,3 Sprossen pro g im Licht und 27,9 Sprossen pro g im Dunkeln signifikant häufiger beobachtet als in den Flüssigmedien. Generell erfolgte die Induktion von Sprossbildung annähernd gleich stark wie die somatische Embryogenese.

Tab. 11: Einfluss von 0,1 μM Thidiazuron, Konsistenz des Mediums und Lichtbedingungen auf die Bildung von Embryos bzw. Adventivsprossen pro g Animpfgewicht.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anzahl an Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)		Anzahl an Adventivsprossen pro g (Mittelwert \pm Stdf.)
	globuläre Embryos	Embryos	
TDZ0,1H Licht	50,9 \pm 4,6 b	44,7 \pm 4,4 c	23,3 \pm 2,1 b
TDZ0,1H Dunkel	13,6 \pm 1,7 a	27,4 \pm 3,2 bc	27,9 \pm 1,8 b
TDZ0,1F Licht	16,2 \pm 2,8 a	17,2 \pm 2,2 ab	12,8 \pm 1,4 a
TDZ0,1F Dunkel	8,4 \pm 2,1 a	6,0 \pm 1,2 a	5,9 \pm 1,4 a

3.3.3.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen

In diesem Kapitel soll der Einfluss der Klone 1 bis 8 auf halbfesten Medien und der Klone 9 bis 16 in Flüssigmedien auf die Morphogenese näher erläutert werden. Die Auswertung der Daten erfolgte einzig unter der Berücksichtigung des Faktors Genotyp (siehe Tab. 12).

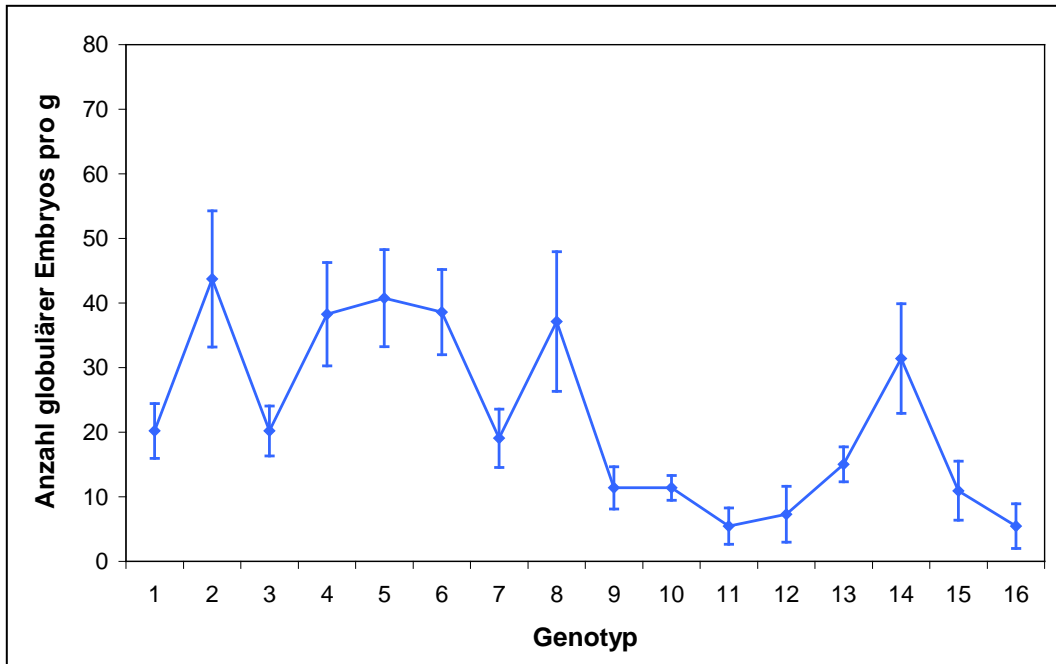
Tab. 12: Einfluss der Genotypen auf die somatische Embryogenese und Organogenese auf bzw. in Medien mit 0,1 μM Thidiazuron.
Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Genotyp	Anzahl globulärer Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Sprosse pro g (Mittelwert \pm Stdf.)
1	20,2 \pm 4,2 a	33,1 \pm 5,9 ab	15,0 \pm 3,3 abc
2	43,7 \pm 10,5 a	29,6 \pm 5,7 ab	22,9 \pm 3,2 abcd
3	20,2 \pm 3,9 a	27,5 \pm 7,0 ab	23,4 \pm 3,7 abcd
4	38,3 \pm 8,0 a	62,0 \pm 11,5 b	36,2 \pm 4,7 cd
5	40,8 \pm 7,5 a	30,7 \pm 8,0 ab	11,1 \pm 2,4 ab
6	38,6 \pm 6,6 a	53,8 \pm 9,4 ab	20,1 \pm 3,2 abc
7	19,1 \pm 4,5 a	18,0 \pm 3,9 ab	32,6 \pm 3,7 bcd
8	37,1 \pm 10,8 a	33,7 \pm 6,5 ab	43,7 \pm 4,5 d
9	11,4 \pm 3,3 a	12,3 \pm 3,1 a	10,0 \pm 4,2 a
10	11,4 \pm 1,9 a	7,7 \pm 2,3 a	10,5 \pm 4,1 a
11	5,5 \pm 2,8 a	10,0 \pm 2,0 a	9,1 \pm 3,0 a
12	7,3 \pm 4,3 a	7,7 \pm 4,1 a	5,9 \pm 2,2 a
13	15,0 \pm 2,7 a	13,2 \pm 2,5 a	10,9 \pm 3,1 ab
14	31,4 \pm 8,5 a	19,1 \pm 6,1 ab	9,6 \pm 3,6 a
15	10,9 \pm 4,6 a	11,4 \pm 6,4 a	12,8 \pm 2,5 ab
16	5,5 \pm 3,5 a	11,4 \pm 5,5 a	5,9 \pm 1,9 a

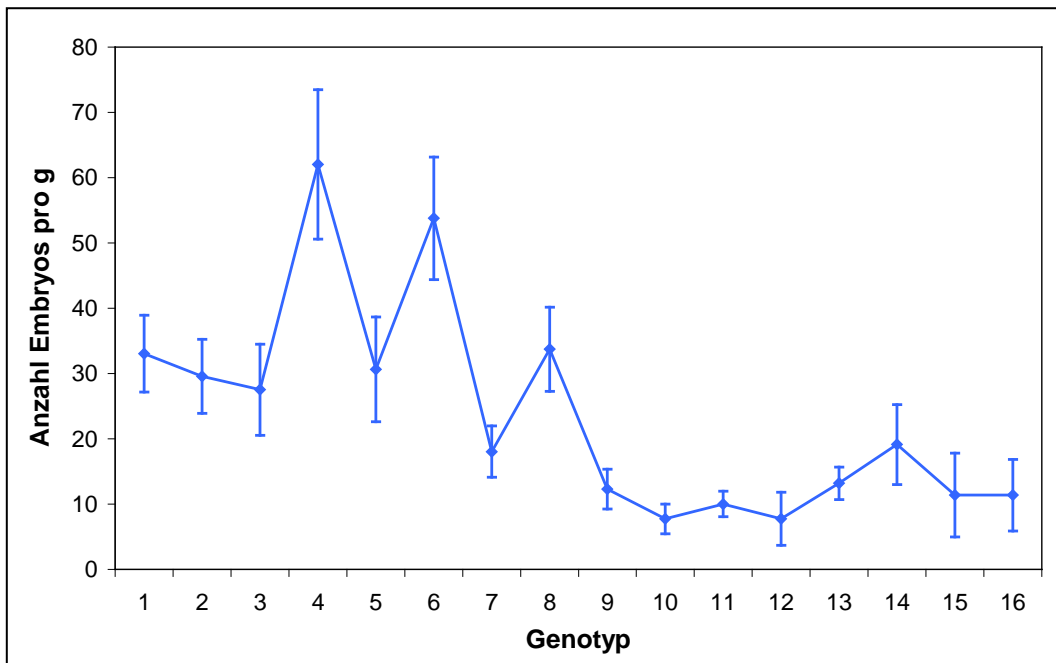
Zwischen den Klonen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens von globulären Embryos (siehe Diagr. 11, S. 44).

Bei der Bildung von Embryos, die sich über das Kugelstadium hinaus entwickelt hatten, zeigte Klon Nummer 4 wie bei den Aktivkohle-hältigen Medien (vgl. Kap. 3.3.2.1., S. 36) signifikant bessere Ergebnisse als die Genotypen 10 bis 13. Wie in

Diagramm 12 dargestellt, unterschied sich Genotyp 4 zusätzlich von den Klonen 9, 15 und 16.

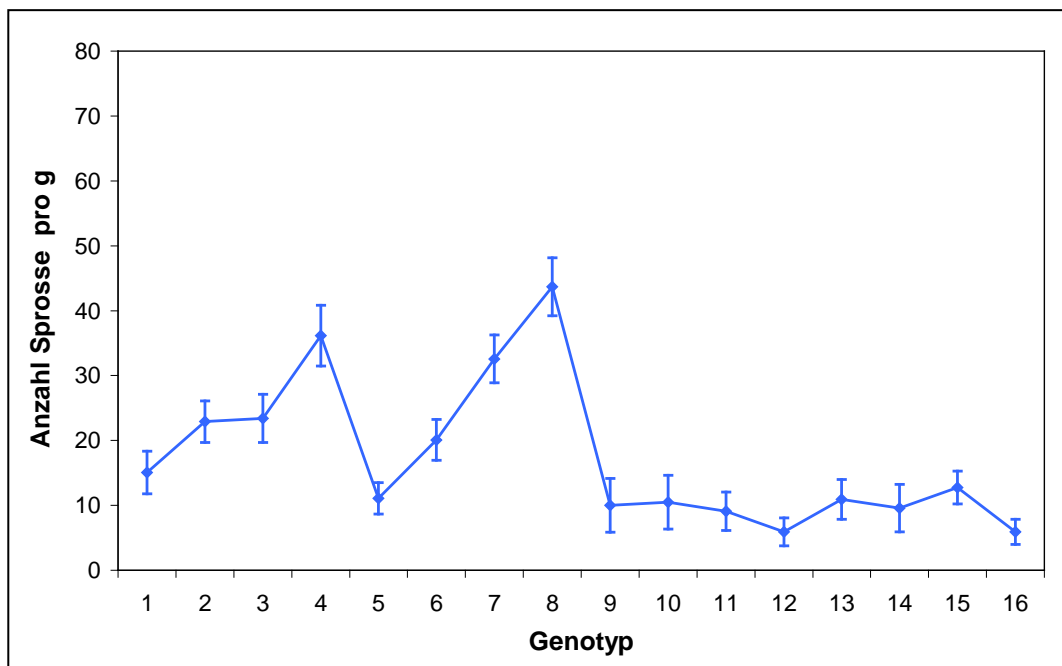


Diagr. 11: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von globulären Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 0,1 µM Thidiazuron. Mittelwerte ± Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 12: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 0,1 µM Thidiazuron. Mittelwerte ± Standardfehler (vertikale Balken)

Was die Entwicklung von Adventivsprossen betraf, war besonders auffällig, dass die Klone 4 und 8 mehr Sprosse als alle Klone in den Flüssigmedien (9-16) hervorbrachten. Ebenso erwies sich der auf halbfesten Medien kultivierte Genotyp 7 für die Sprossbildung signifikant besser als die Klone 9 bis 12, 14 und 16, die in Flüssigkultur gehalten wurden (siehe Diagr. 13).

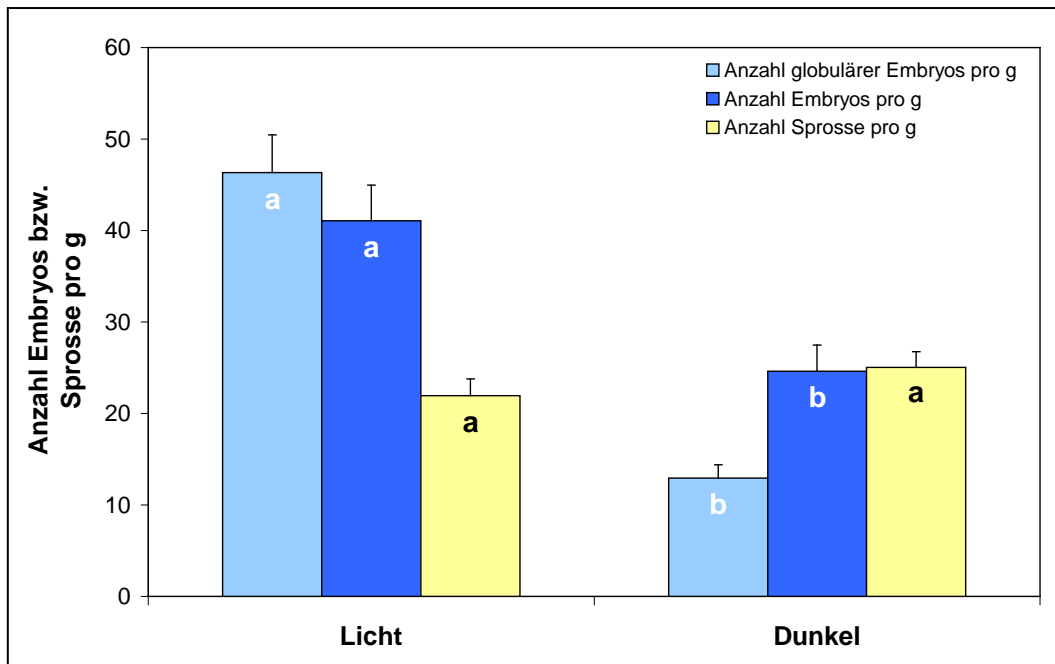


Diagr. 13: Einfluss der Genotypen auf die Adventivsprossbildung auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 0,1 μM Thidiazuron.
Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

Die Unterschiede, die sich bei der Bildung von entwickelten Embryos und Adventivsprossen zwischen den verwendeten Genotypen ergaben, sind möglicherweise nicht auf die Klone zurückzuführen. Einige Genotypen auf halbfesten Medien zeigten nämlich oft signifikant bessere Ergebnisse als Genotypen in der Flüssigkultur. Daher könnte der Grund für die meisten beobachteten Unterschiede zwischen den Klonen die Kultivierung auf bzw. in Medien unterschiedlicher Konsistenz sein.

3.3.3.2. Einfluss der Lichtverhältnisse

Der Einfluss von unterschiedlichen Lichtverhältnissen auf die Morphogenese bei den Medien TDZ0,1H und TDZ0,1F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) sollte durch Inkubation der Kulturen sowohl im Licht als auch im Dunkeln ermittelt werden. Die Daten wurden in Abhängigkeit vom Faktor Licht analysiert (siehe Diagr. 14).

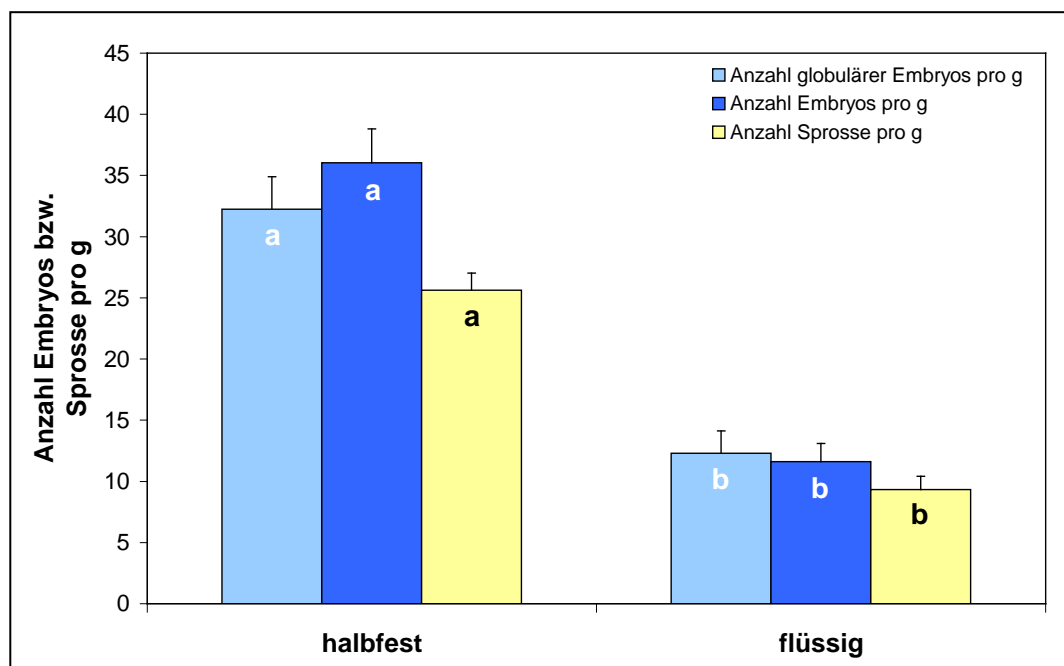


Diagr. 14: Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen bei Medien mit 0,1 μM TDZ, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Die Kultivierung im Licht zeigte signifikant bessere Ergebnisse für die somatische Embryogenese, nicht aber für das Auftreten von Adventivsprossen. Vor allem bei der Inkubation im Dunkeln wurden die Bildung von somatischen Embryos und die Organogenese annähernd gleich stark induziert.

3.3.3.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums

Wie bereits in Kapitel 3.3.3.1. (S. 43) angesprochen, konnten bei der Kultivierung auf halbfesten Medien signifikant mehr globuläre Strukturen, Embryos und Adventivsprosse als bei den Flüssigmedien beobachtet werden. In Diagramm 15 erfolgt die Darstellung der durchschnittlichen Anzahl gebildeter Embryos und Sprosse pro g Animpfkallus.



Diagr. 15: Einfluss der Konsistenz von Nährmedien mit 0,1 μM TDZ auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

3.3.4. Einfluss von 0,01 μM Thidiazuron

Eine gängige Vorgehensweise zur Induktion der Embryobildung ist die Reduktion der in der Kallusinduktionsphase eingesetzten Wachstoffsstoffkonzentration (vgl. Kap. 1.2., S. 4). In Kap. 3.3.3. (S. 40) wurde bereits eine Versuchsreihe mit reduzierter TDZ-Konzentration von 0,1 μM beschrieben. Im Rahmen dieses Kapitels soll auf die Ergebnisse bei Medien mit 0,01 μM Thidiazuron eingegangen werden.

Kulturen auf den Medien TDZ0,01H und TDZ0,01F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) wurden sowohl im Dunkeln als auch im Licht inkubiert.

Zunächst erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse zu Wachstum und Aussehen der Kalli und induzierter Morphogenese, gereiht nach den getesteten Kulturbedingungen.

Kulturen auf Medium TDZ0,01H im Licht

In diesem Versuch zeigte das Kallusgewebe mittelstarkes Wachstum mit einer durchschnittlichen Biomassezunahme von 611,1 % (siehe Tab. 13, S. 49). Meist waren die Kalli von dunkelbrauner Farbe, seltener wurden auch hellbraune Anteile festgestellt. Bei der Hälfte der Kulturen wurde eine knotige Oberflächenstruktur beobachtet.

Kulturen auf Medium TDZ0,01H im Dunkeln

Bei der Kultivierung auf Medien mit 0,01 μM TDZ unter Lichtausschluss war die Biomassenzunahme geringfügig niedriger als bei der Kultivierung im Licht. Es kam zur Bildung von hellbraunen, teilweise auch dunkelbraunen Kalli mit gelegentlich pelziger Oberfläche.

Kulturen in Medium TDZ0,01F im Licht

In Medium TDZ0,01F im Licht entstand eher mäßig wachsendes, dunkelbraunes Kallusgewebe mit meist knotigem Aussehen. Die geimpften Explantate zerfielen bei den Flüssigmedien während der gesamten Kulturperiode nicht in kleinere Aggregate.

Kulturen in Medium TDZ0,01F im Dunkeln

Erfolgte die Kultivierung in Flüssigmedium im Dunkeln, so wurde durchschnittlich weniger Biomassenzunahme als bei der Inkubation im Licht festgestellt. Das Kallusmaterial war meist dunkelbraun, seltener auch hellbraun mit gelegentlich knotigen Kallusabschnitten.

Insgesamt zeigten die Kulturen auf bzw. in Medien mit 0,01 μM Thidiazuron mäßiges bis mittelstarkes Wachstum. Dunkelbraune Verfärbungen und eine geringfügig stärkere Biomassenzunahme wurden bei den jeweiligen Kulturen im Licht häufiger beobachtet als unter Lichtausschluss.

Tab. 13: Einfluss von 0,01 μM Thidiazuron in halbfestem (H) und flüssigem (F) Medium bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen auf Wachstum, Biomassenzunahme und Braunfärbung der Kalluskulturen

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anteil der Explantate (%) mit sehr gutem (+++) bis schlechtem (-) Wachstum				Biomassenzunahme (%)	dunkelbrauner Kallus (%)
	+++	++	+	-		
TDZ0,01H Licht	0,6	52,5	46,9	-	611,1	75,6
TDZ0,01H Dunkel	-	43,1	56,9	-	549,9	25,0
TDZ0,01F Licht	-	12,5	79,2	8,3	464,4	100,0
TDZ0,01F Dunkel	-	4,2	79,1	16,7	393,4	83,3

Morphogenese bei Medien mit 0,01 μM Thidiazuron

Unter allen Kulturbedingungen wurde somatische Embryogenese induziert. Weiters wurde das Auftreten von Adventivsprossen beobachtet. Tabelle 14 (S. 50) zeigt eine Auflistung der mittleren Anzahl an gebildeten somatischen Embryos und Adventivsprossen \pm Standardfehler des Mittelwertes.

Die Kalluskultur auf Medium TDZ0,01H im Licht zeigte mit 85,9 globulären Embryos pro g und mit 80,6 Embryos pro g die signifikant besten Ergebnisse. Bei den halbfesten Medien konnte weiters ein positiver Einfluss der Inkubation im Licht auf die Bildung von Embryos festgestellt werden.

Insgesamt führte das Medium TDZ0,01H im Licht und im Dunkeln bei der somatischen Embryogenese zu vergleichbar guten Ergebnissen wie bei dem Einsatz von Adeninsulfat-hältigen Medien (vgl. Tab. 5, S. 25).

Die Bildung von Adventivsprossen wurde seltener als die Bildung von somatischen Embryonen induziert.

Tab. 14: Einfluss von 0,01 μ M Thidiazuron, Konsistenz des Mediums und Lichtbedingungen auf die Bildung von Embryos bzw. Adventivsprossen pro g Animpfgewicht.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anzahl an Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)		Anzahl an Adventivsprossen pro g (Mittelwert \pm Stdf.)
	globuläre Embryos	Embryos	
TDZ0,01H Licht	85,9 \pm 6,2 b	80,6 \pm 7,4 c	17,0 \pm 1,7 b
TDZ0,01H Dunkel	37,3 \pm 3,7 a	47,3 \pm 4,5 b	13,0 \pm 1,3 ab
TDZ0,01F Licht	42,7 \pm 8,9 a	22,5 \pm 3,7 ab	5,5 \pm 1,0 a
TDZ0,01F Dunkel	21,3 \pm 2,4 a	12,2 \pm 1,8 a	5,8 \pm 1,2 a

3.3.4.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen

Von den verwendeten 16 Genotypen wurden die Klone 1 bis 8 auf Medium TDZ0,01H und die Klone 9 bis 16 in Medium TDZ0,01F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) inkubiert. Um den Einfluss der Klone auf die Morphogenese zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der mittleren Anzahl an gebildeten Embryos im Kugelstadium, entwickelten Embryos und Adventivsprossen pro g in Abhängigkeit vom Faktor Genotyp (siehe Tab. 15, S. 51).

Die Kalli der Klone 7 und 15 bildeten signifikant mehr globuläre Embryos als die Klone 1, 11, und 12. Zusätzlich unterschied sich Klon 7 mit statistischer Signifikanz von Klon 9.

Entwickelte Embryos wurden bei Klon 6 signifikant häufiger beobachtet als bei den Genotypen 9 bis 15.

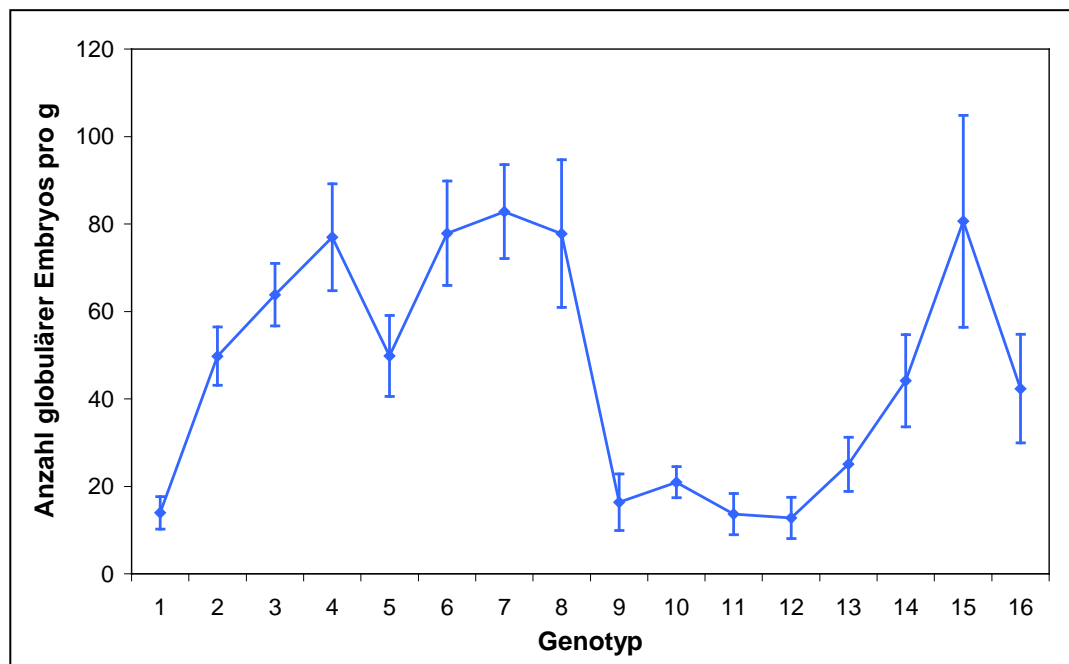
Sprossbildung wurde insgesamt seltener als somatische Embryogenese induziert und erfolgte unabhängig vom getesteten Klon.

In den Diagrammen 16 bis 18 (S. 51 und S. 52) erfolgt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

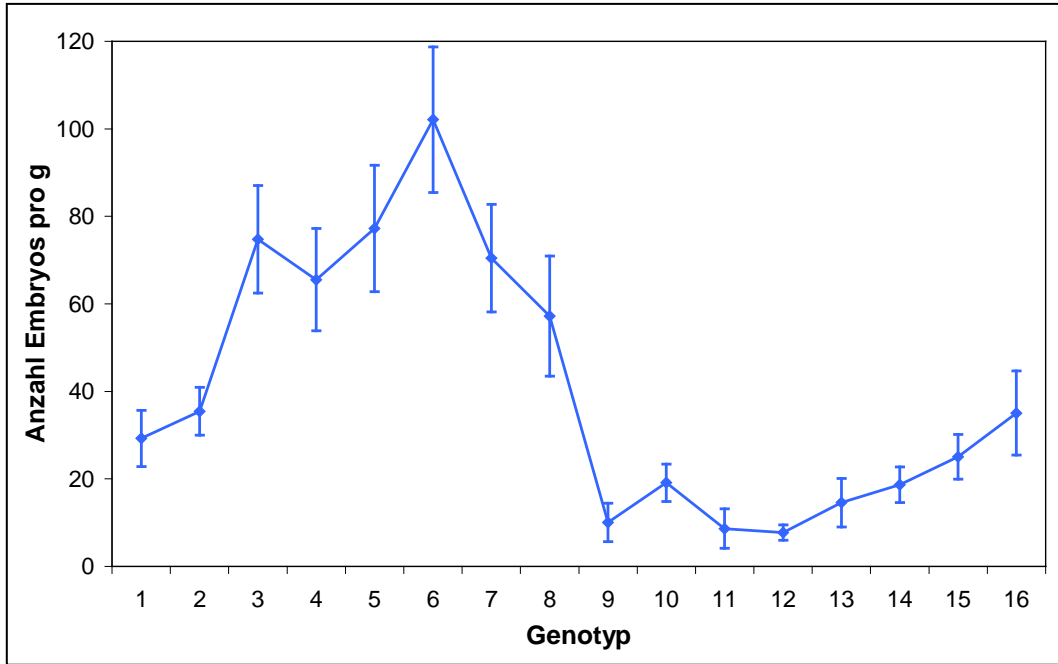
Tab. 15: Einfluss der Genotypen auf die somatische Embryogenese und Organogenese auf bzw. in Medien mit 0,01 μM Thidiazuron.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

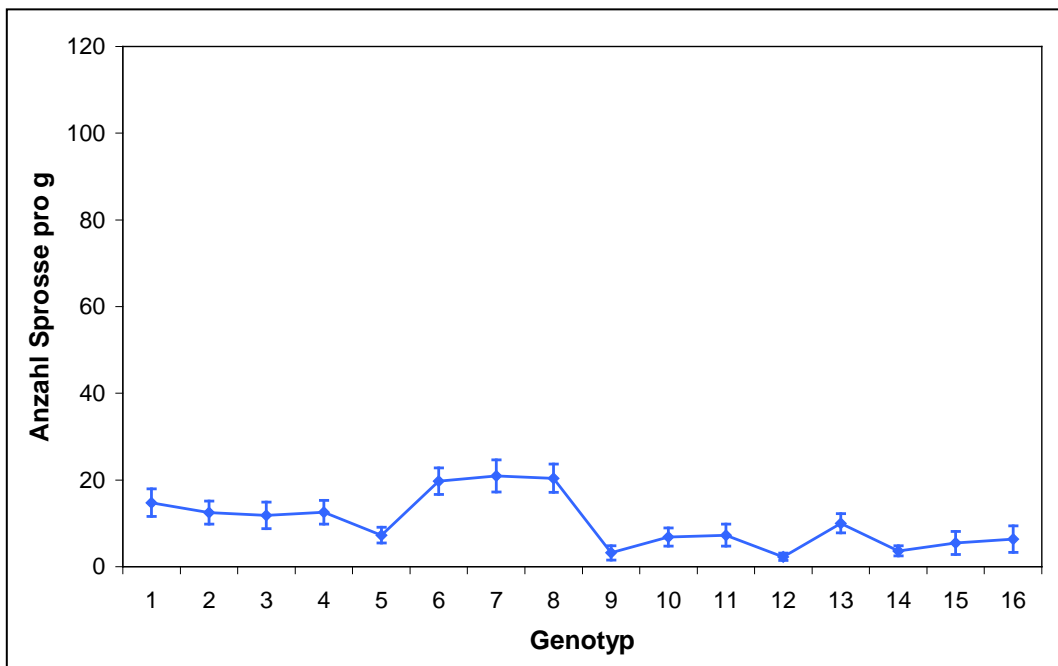
Genotyp	Anzahl globulärer Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Sprosse pro g (Mittelwert \pm Stdf.)
1	13,9 \pm 3,7 a	29,2 \pm 6,5 ab	14,8 \pm 3,2 a
2	49,8 \pm 6,7 abc	35,5 \pm 5,5 ab	12,4 \pm 2,7 a
3	63,8 \pm 7,1 abc	74,8 \pm 12,3 ab	11,8 \pm 3,1 a
4	77,0 \pm 12,2 abc	65,5 \pm 11,7 ab	12,6 \pm 2,7 a
5	49,8 \pm 9,3 abc	77,2 \pm 14,4 ab	7,3 \pm 1,8 a
6	77,9 \pm 11,9 abc	102,1 \pm 16,6 b	19,7 \pm 3,1 a
7	82,8 \pm 10,7 c	70,4 \pm 12,3 ab	21,0 \pm 3,7 a
8	77,8 \pm 16,9 abc	57,2 \pm 13,7 ab	20,4 \pm 3,3 a
9	16,4 \pm 6,5 ab	10,0 \pm 4,4 a	3,2 \pm 1,6 a
10	20,9 \pm 3,6 abc	19,1 \pm 4,3 a	6,8 \pm 2,1 a
11	13,7 \pm 4,7 a	8,7 \pm 4,5 a	7,3 \pm 2,5 a
12	12,8 \pm 4,7 a	7,7 \pm 1,8 a	2,3 \pm 0,8 a
13	25,0 \pm 6,2 abc	14,6 \pm 5,5 a	10,0 \pm 2,2 a
14	44,2 \pm 10,5 abc	18,7 \pm 4,1 a	3,6 \pm 1,2 a
15	80,6 \pm 24,2 bc	25,0 \pm 5,1 a	5,5 \pm 2,6 a
16	42,3 \pm 12,4 abc	35,1 \pm 9,6 ab	6,4 \pm 3,0 a



Diagr. 16: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von globulären Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 0,01 μM Thidiazuron. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 17: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 0,01 μ M Thidiazuron. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

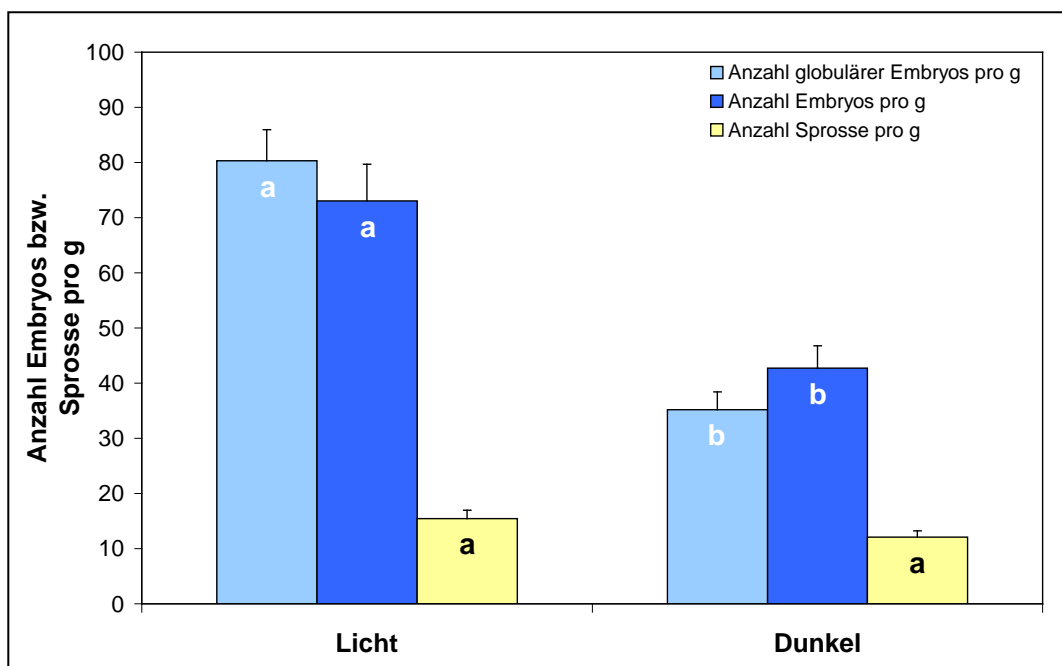


Diagr. 18: Einfluss der Genotypen auf die Adventivsprossbildung auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Medien mit 0,01 μ M Thidiazuron. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

Wie bei den Medien mit 0,1 μM Thidiazuron (vgl. Kap. 3.3.3.1., S. 43) könnte auch hier die Verwendung von Medien unterschiedlicher Konsistenz ein Hauptgrund für die Unterschiede zwischen den Klonen bei der somatischen Embryogenese gewesen sein. Mit Ausnahme der Klone 1 und 15 zeigten nämlich Genotypen auf halbfesten Medien tendenziell bessere Ergebnisse als die Genotypen in Flüssigmedien.

3.3.4.2. Einfluss der Lichtverhältnisse

Die Kalluskulturen auf bzw. in den Nährmedien mit 0,01 μM Thidiazuron wurden sowohl im Licht als auch unter Lichtausschluss kultiviert. Der Einfluss der unterschiedlichen Lichtbedingungen kann aus Diagramm 19 entnommen werden.



Diagr. 19: Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen bei Medien mit 0,01 μM TDZ, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

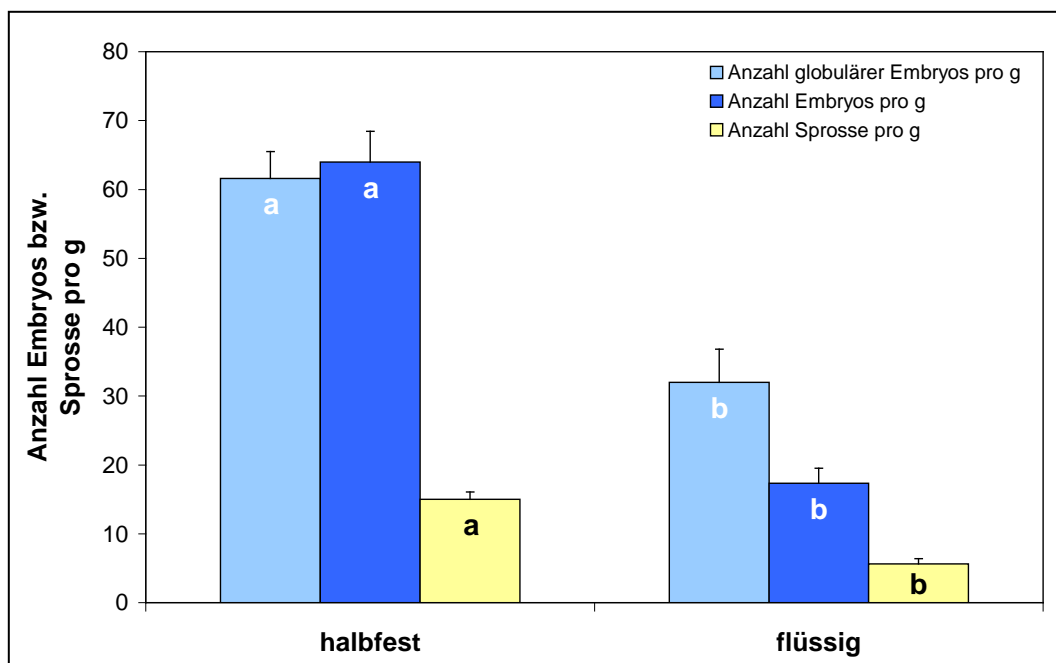
Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Lichtexposition der Kalluskulturen für täglich 16 h führte zu signifikant besseren Ergebnissen bei der Bildung somatischer Embryonen als die Inkubation im Dunkeln. Aus Tabelle 14 (S. 50) ist ersichtlich, dass sich die Inkubation im Licht nur bei halbfesten Medien, nicht aber bei Kultivierung in Flüssigmedien, positiv auf die somatische Embryogenese auswirkte. Bei der Auswertung der Daten unter Berücksichtigung des Faktors Licht wurden 160 Stichproben aus halbfesten Medien und 24 Stichproben aus Flüssigmedien analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Stichprobengrößen ist in Diagramm 19 (S. 53) hauptsächlich der Einfluss der Lichtverhältnisse bei den halbfesten Medien zu sehen.

Für die Bildung von Adventivsprossen spielten unterschiedliche Lichtverhältnisse keine Rolle.

3.3.4.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums

Beim Vergleich der Medien TDZ0,01H und TDZ0,01F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) wurden bei den halbfesten Medien signifikant mehr somatische Embryos und Sprosse beobachtet als in den Flüssigkulturen (siehe Diagr. 20).



Diagr. 20: Einfluss der Konsistenz von Nährmedien mit 0,01 μM TDZ auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

3.3.5. Einfluss von Wuchsstoff-freiem Medium

In den Kapiteln 3.3.3. (S. 40) und 3.3.4. (S. 47) wurde der Einfluss von im Vergleich zur Kallusinduktionsphase reduzierter Thidiazuronkonzentration auf die Morphogenese behandelt. In diesem Kapitel erfolgt die Präsentation der Ergebnisse zur Embryoentwicklung bei Einsatz von Wuchsstoff-freien Medien. Die Kalli, die durch Kultivierung auf Stufe I-Medium erhalten worden waren, wurden auf bzw. in den MS-Basalmedien M0H und M0F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) subkultiviert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte zum einen Teil im Licht, zum anderen Teil unter Lichtausschluss.

Zunächst soll der Einfluss der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf das Wachstum und Aussehen der Kalli und die induzierte Morphogenese erläutert werden.

Kulturen auf Medium M0H im Licht

Während der 6-wöchigen Kulturdauer auf Medium M0H im Licht kam es zu einer Zunahme der Biomasse um das 6-fache (siehe Tab. 16, S. 56). Es bildete sich meist dunkelbraunes, seltener auch hellbraunes Kallusgewebe, das gelegentlich eine knotige Oberflächenstruktur aufwies.

Kulturen auf Medium M0H im Dunkeln

Erfolgte die Kultivierung auf Medium M0H unter Lichtausschluss, so war das Wachstum der Kalli im Vergleich zur Kultur im Licht vermindert. Das Kallusmaterial war von hellbrauner bis dunkelbrauner Farbe und wies teilweise eine weiche Konsistenz und pelzige Oberfläche auf.

Kulturen in Medium M0F im Licht

Unter diesen Kulturbedingungen entstand dunkelbraunes Kallusmaterial, das mittelstarkes Wachstum zeigte. Die angeimpften Explantate blieben kompakt und zerfielen nicht in kleinere Aggregate. Gelegentlich wurden knotige Kallusabschnitte festgestellt.

Kulturen in Medium M0F im Dunkeln

Auch bei den Flüssigkulturen im Dunkeln war das Wachstum der Kalli mittelstark und das Kallusmaterial von kompakter Konsistenz. Meist entstanden dunkelbraune, seltener auch hellbraune Kalli.

Tab. 16: Einfluss von Wuchsstoff-freiem, halbfesten (H) bzw. flüssigen (F) Medium bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen auf Wachstum, Biomassenzunahme und Braunfärbung der Kalluskulturen

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anteil der Explantate (%) mit sehr gutem (+++) bis schlechtem (-) Wachstum				Biomassenzunahme (%)	dunkelbrauner Kallus (%)
	+++	++	+	-		
M0H Licht	1,3	53,7	44,4	0,6	605,7	71,3
M0H Dunkel	-	35,0	63,1	1,9	511,4	41,3
M0F Licht	-	37,5	58,3	4,2	605,8	100,0
M0F Dunkel	-	33,4	45,8	20,8	548,2	75,0

Das Wachstum war insgesamt vergleichbar mit dem der Adeninsulfat-hältigen Medien (vgl. Tab. 4, S. 24) bzw. der Medien mit 0,01 µM Thidiazuronzusatz (vgl. Tab. 13, S. 49). Weiters schien Lichtexposition zu einem geringfügig besseren Wachstum und zum vermehrten Auftreten von dunkelbraunen Kalli zu führen.

Morphogenese bei Wuchsstoff-freien Medien

Die Induktion von somatischer Embryogenese und Organogenese erfolgte in allen Versuchen mit Wuchsstoff-freien Medien.

Die Inkubation der Kalli auf Medium M0H unter Lichtausschluss führte mit 45,7 globulären Embryos pro g zu den signifikant schlechtesten Ergebnissen (siehe Tab. 17, S. 57).

Die Entwicklung von somatischen Embryos über das Kugelstadium hinaus wurde ohne statistisch signifikante Unterschiede unter allen Kulturbedingungen beobachtet.

Insgesamt zeigten die Versuche mit Wuchsstoff-freien Medien gute Ergebnisse bezüglich der somatischen Embryogenese. Die Bildung von somatischen Embryos erfolgte ähnlich stark wie bei den Adeninsulfat-hältigen Medien (vgl. Tab. 5, S. 25).

Adventivprossbildung wurde eher selten beobachtet, mit signifikant besseren Ergebnissen auf Medium M0H im Licht als in Flüssigmedium M0F im Licht.

Tab. 17: Einfluss von Konsistenz des Mediums und Lichtbedingungen bei Wuchsstoff-freien Medien auf die Bildung von Embryos bzw. Adventivsprossen pro g Animpfgewicht.

Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Kulturbedingungen (H: halbfest, F: flüssig)	Anzahl an Embryos pro g (Mittelwert \pm Std.f.)		Anzahl an Adventivsprossen pro g (Mittelwert \pm Std.f.)
	globuläre Embryos	Embryos	
M0H Licht	97,1 \pm 7,3 b	95,1 \pm 9,0 a	16,7 \pm 1,8 b
M0H Dunkel	45,7 \pm 5,2 a	66,4 \pm 6,5 a	12,6 \pm 1,6 ab
M0F Licht	86,3 \pm 10,8 b	78,2 \pm 8,0 a	5,2 \pm 1,0 a
M0F Dunkel	94,1 \pm 8,9 b	56,0 \pm 4,8 a	13,8 \pm 2,2 ab

In Abbildung 13 sind ein globulärer Embryo (a) und ein Embryo mit einem entwickelten Keimblatt (b) dargestellt. Wegen der Inkubation des Kallusexplantates unter Lichtausschluss weisen die Embryonen eine gelbliche Farbe auf.

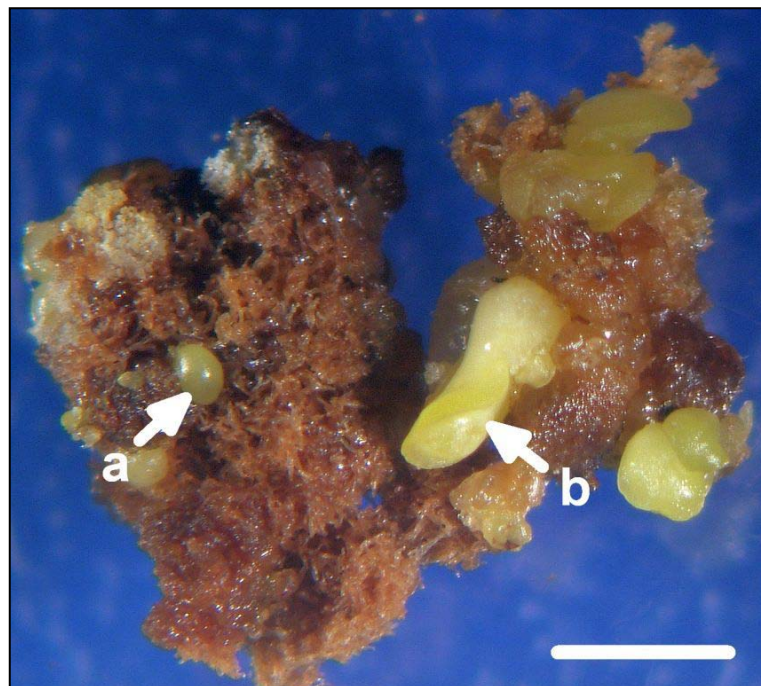


Abb. 13: Globulärer Embryo (a) und entwickelter Embryo (b) auf einem Kallus nach Kultivierung auf Medium M0H (vgl. Kap. 2.2., S. 9) im Dunkeln, Balken = 0,2 cm

3.3.5.1. Einfluss der unterschiedlichen Genotypen

Die Kalli von 16 unterschiedlichen Genotypen wurden auf bzw. in Wuchsstoff-freien Medien kultiviert. Die Anzahl gebildeter globulärer Strukturen, Embryos und Sprosse pro g Animpfgewicht wurde für jeden Klon ermittelt (siehe Tab. 18). Die Analyse der Daten erfolgte unter alleiniger Berücksichtigung des Faktors Genotyp.

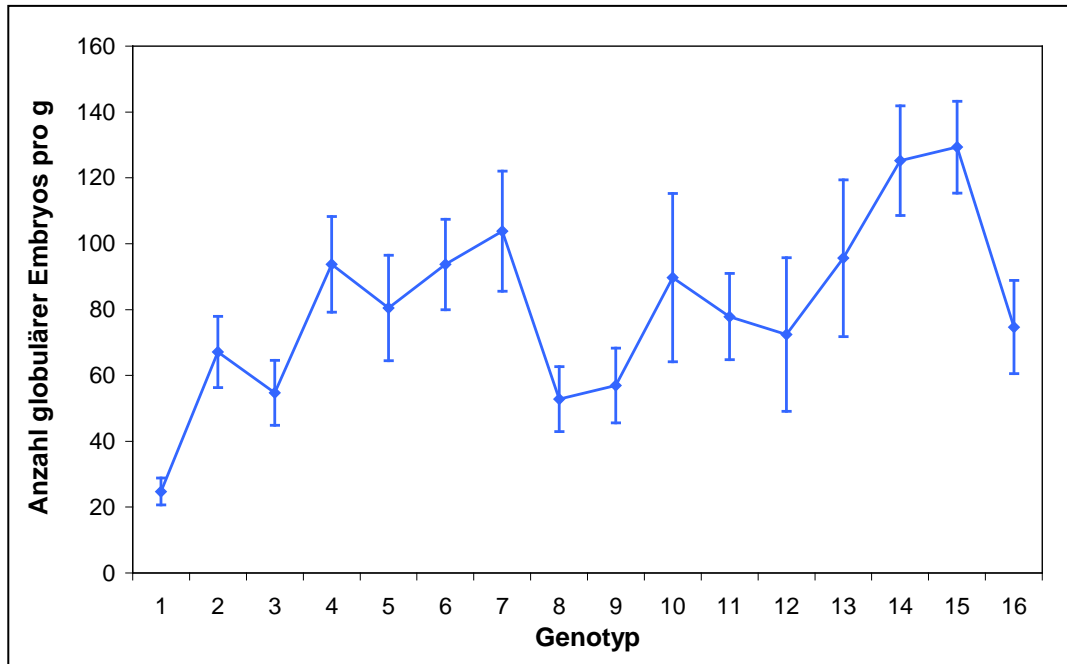
Tab. 18: Einfluss der Genotypen auf die somatische Embryogenese und Organogenese auf bzw. in Wuchsstoff-freien Medien.
Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Genotyp	Anzahl globulärer Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Embryos pro g (Mittelwert \pm Stdf.)	Anzahl Sprosse pro g (Mittelwert \pm Stdf.)
1	24,8 \pm 4,0 a	29,8 \pm 5,0 a	18,2 \pm 3,7 a
2	67,1 \pm 10,8 ab	73,4 \pm 13,9 a	7,5 \pm 1,8 a
3	54,8 \pm 9,9 ab	70,2 \pm 10,7 a	13,8 \pm 3,6 a
4	93,7 \pm 14,6 ab	90,7 \pm 14,3 a	24,4 \pm 5,5 a
5	80,5 \pm 16,0 ab	119,4 \pm 24,4 a	7,5 \pm 2,2 a
6	93,7 \pm 13,7 ab	116,8 \pm 16,9 a	15,4 \pm 3,0 a
7	103,8 \pm 18,3 ab	104,8 \pm 19,6 a	18,0 \pm 3,2 a
8	52,8 \pm 9,9 ab	41,1 \pm 7,1 a	12,1 \pm 2,1 a
9	56,9 \pm 11,4 ab	66,0 \pm 12,8 a	8,7 \pm 3,3 a
10	89,7 \pm 25,5 ab	61,5 \pm 16,8 a	10,5 \pm 4,1 a
11	77,9 \pm 13,1 ab	62,4 \pm 14,0 a	15,5 \pm 5,4 a
12	72,4 \pm 23,3 ab	49,2 \pm 10,3 a	9,6 \pm 3,6 a
13	95,6 \pm 23,8 ab	62,4 \pm 6,5 a	13,7 \pm 5,4 a
14	125,2 \pm 16,6 b	80,1 \pm 19,0 a	5,0 \pm 1,3 a
15	129,3 \pm 14,0 b	75,1 \pm 5,9 a	9,6 \pm 3,4 a
16	74,7 \pm 14,1 ab	80,1 \pm 21,5 a	3,6 \pm 2,0 a

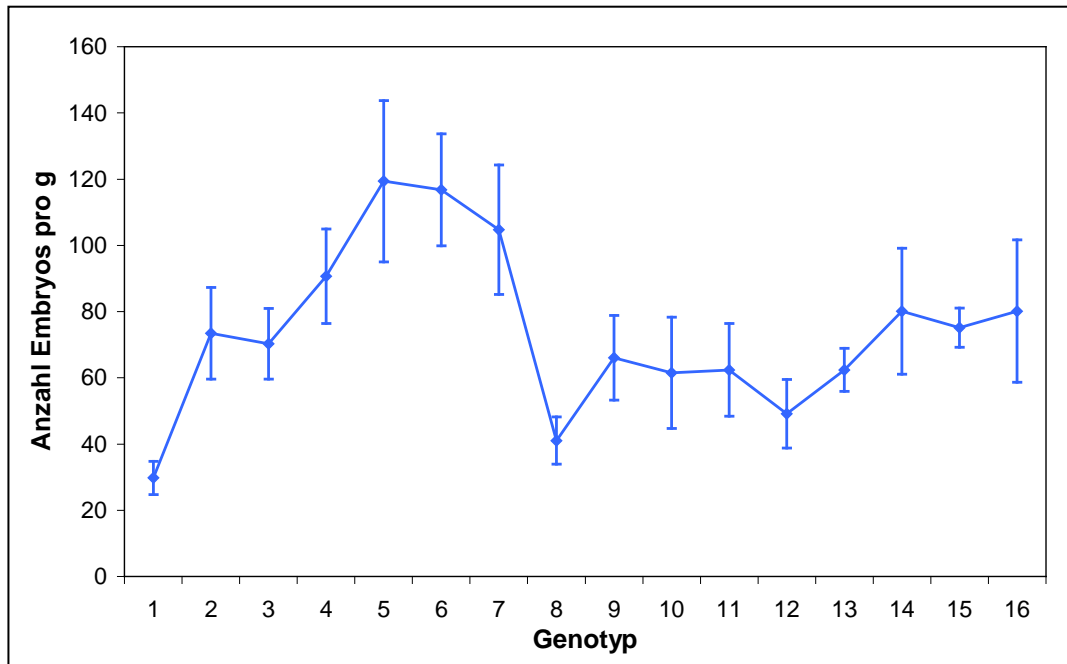
Bei den Klonen 14 und 15 entstanden signifikant mehr globuläre Embryos als bei Genotyp Nummer 1.

Ansonsten gab es zwischen den Klonen sowohl bei der Bildung somatischer Embryos als auch für das Auftreten von Adventivsprossen keine signifikanten Unterschiede.

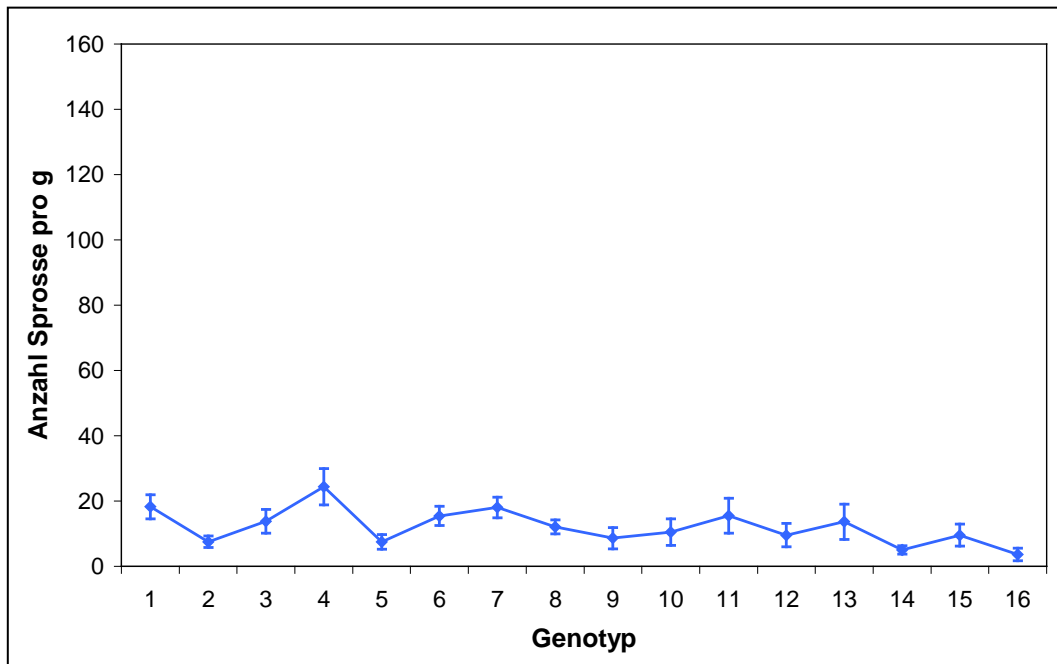
In den Diagrammen 21, 22 und 23 (S. 60) ist die mittlere Anzahl globulärer Embryos, Embryos und Adventivprosse pro g Animpfgewicht dargestellt.



Diagr. 21: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von globulären Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Wuchsstoff-freien Medien. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)



Diagr. 22: Einfluss der Genotypen auf die Bildung von Embryos auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Wuchsstoff-freien Medien. Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

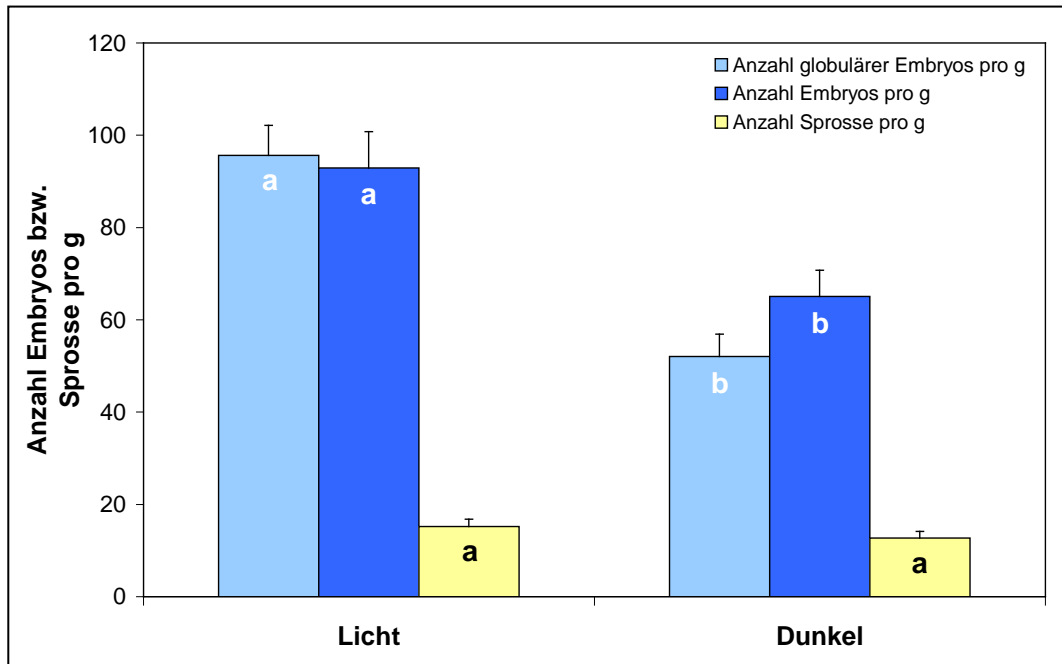


Diagr. 23: Einfluss der Genotypen auf die Adventivsprossbildung auf (Genotypen 1-8) bzw. in (Genotypen 9-16) Wuchsstoff-freien Medien.
Mittelwerte \pm Standardfehler (vertikale Balken)

3.3.5.2. Einfluss der Lichtverhältnisse

Die eine Hälfte der Kalluskulturen auf bzw. in den Medien M0H und M0F (vgl. Kap. 2.2., S. 9) wurde im Licht, die andere Hälfte unter Lichtausschluss inkubiert. Die Analyse der Daten erfolgte in diesem Kapitel unter alleiniger Berücksichtigung des Faktors Lichtverhältnisse.

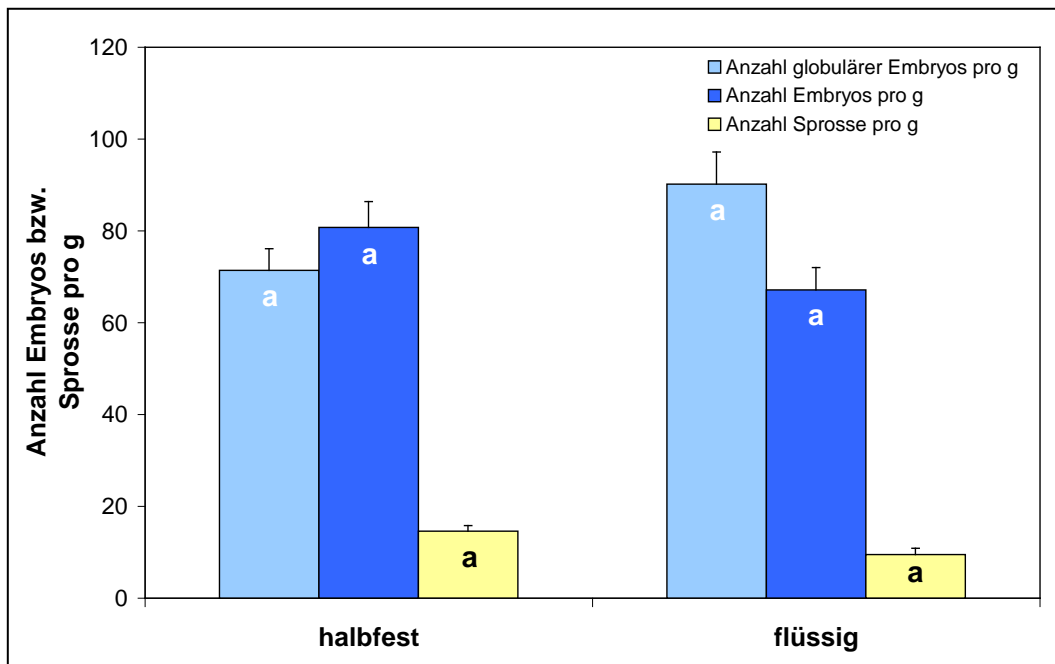
Wie aus Diagramm 24 (S. 61) ersichtlich, wirkte sich Lichtexposition der Kalluskulturen positiv auf die Bildung somatischer Embryos aus. Das Auftreten von Adventivsprossen wurde von unterschiedlichen Lichtverhältnissen nicht beeinflusst.



Diagr. 24: Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen bei Wuchsstoff-freien Medien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.
Säulen gleicher Farbe und mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

3.3.5.3. Einfluss der Beschaffenheit des Nährmediums

Bei der Verwendung des halbfesten Mediums M0H zeigten sich gegenüber dem flüssigen Medium M0F keine signifikanten Vorteile bezüglich somatischer Embryogenese und Adventivsprossbildung. Die Ergebnisse der Analyse der Daten unter Berücksichtigung des Faktors Konsistenz des Nährmediums können aus Diagramm 25 (S. 62) entnommen werden.



Diagr. 25: Einfluss der Konsistenz von Wuchsstoff-freien Nährmedien auf die Bildung von globulären Embryos, Embryos und Adventivsprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen gleicher Farbe und mit gleichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,05$)

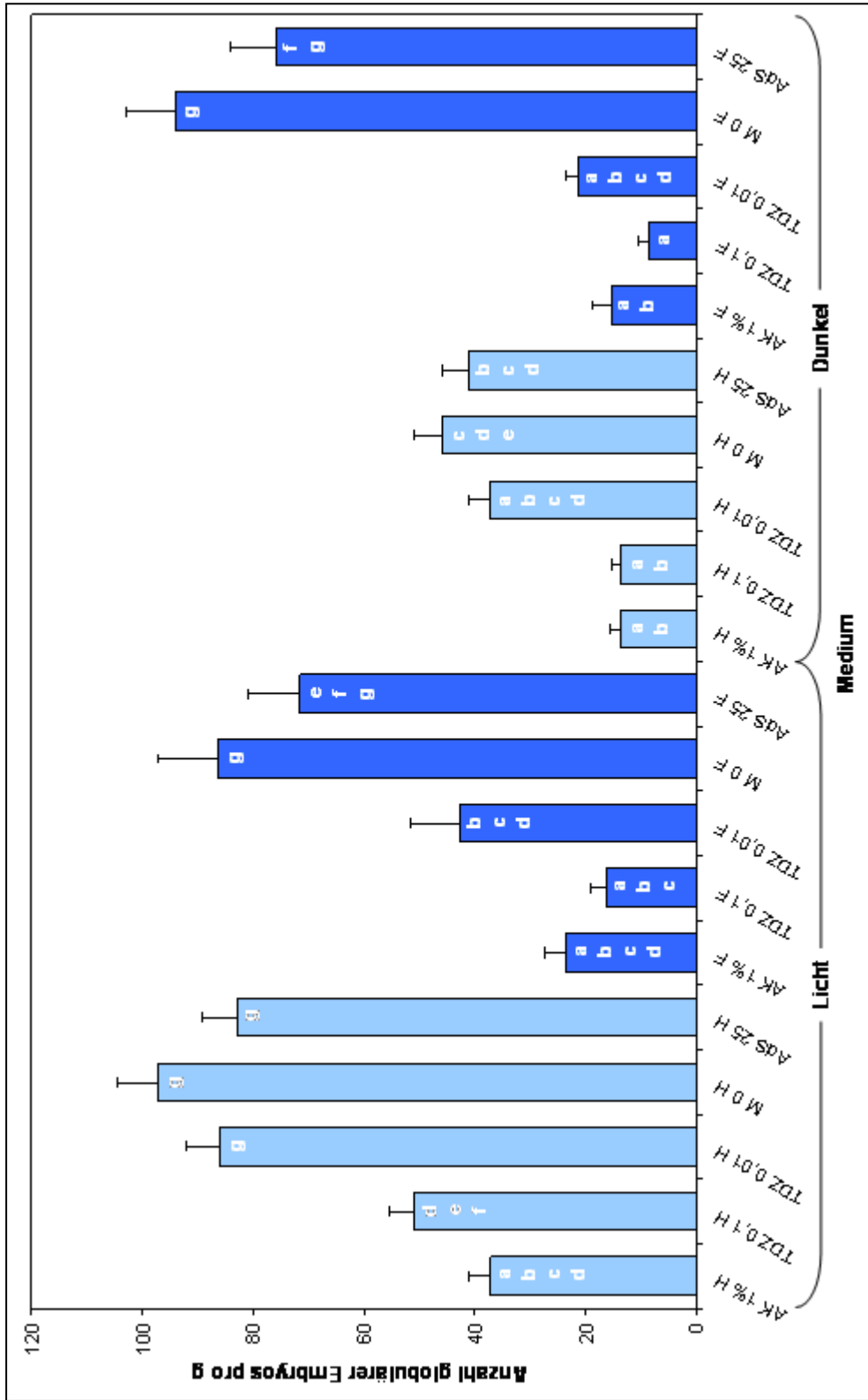
4. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung eines Protokolls zur Vermehrung von *Glycyrrhiza glabra* L. über indirekte somatische Embryogenese.

Aufbauend auf bereits durchgeführten Diplomarbeiten zu diesem Thema (Lämmermayer, 2007; Kazianka, in Vorbereitung) erfolgte im ersten Schritt die Etablierung einer embryogenen Kalluskultur. Dazu wurden sterilisierte Samen von *Glycyrrhiza glabra* L. zur Keimung auf Medium M29 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) im Licht (16 h-Photoperiode) inkubiert. Nach 7 Tagen konnten von den unter sterilen Bedingungen entstandenen Sämlingen Kotyledonenexplantate gewonnen werden. Diese Explantate stellten das Ausgangsmaterial für die embryogene Kalluskultur dar und wurden zu diesem Zweck auf Medium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) subkultiviert. Nach 9-wöchiger Kallusinduktionsphase wurden 16 Genotypen, die das meiste Kallusmaterial gebildet hatten, für die Experimente zur Embryoentwicklung herangezogen.

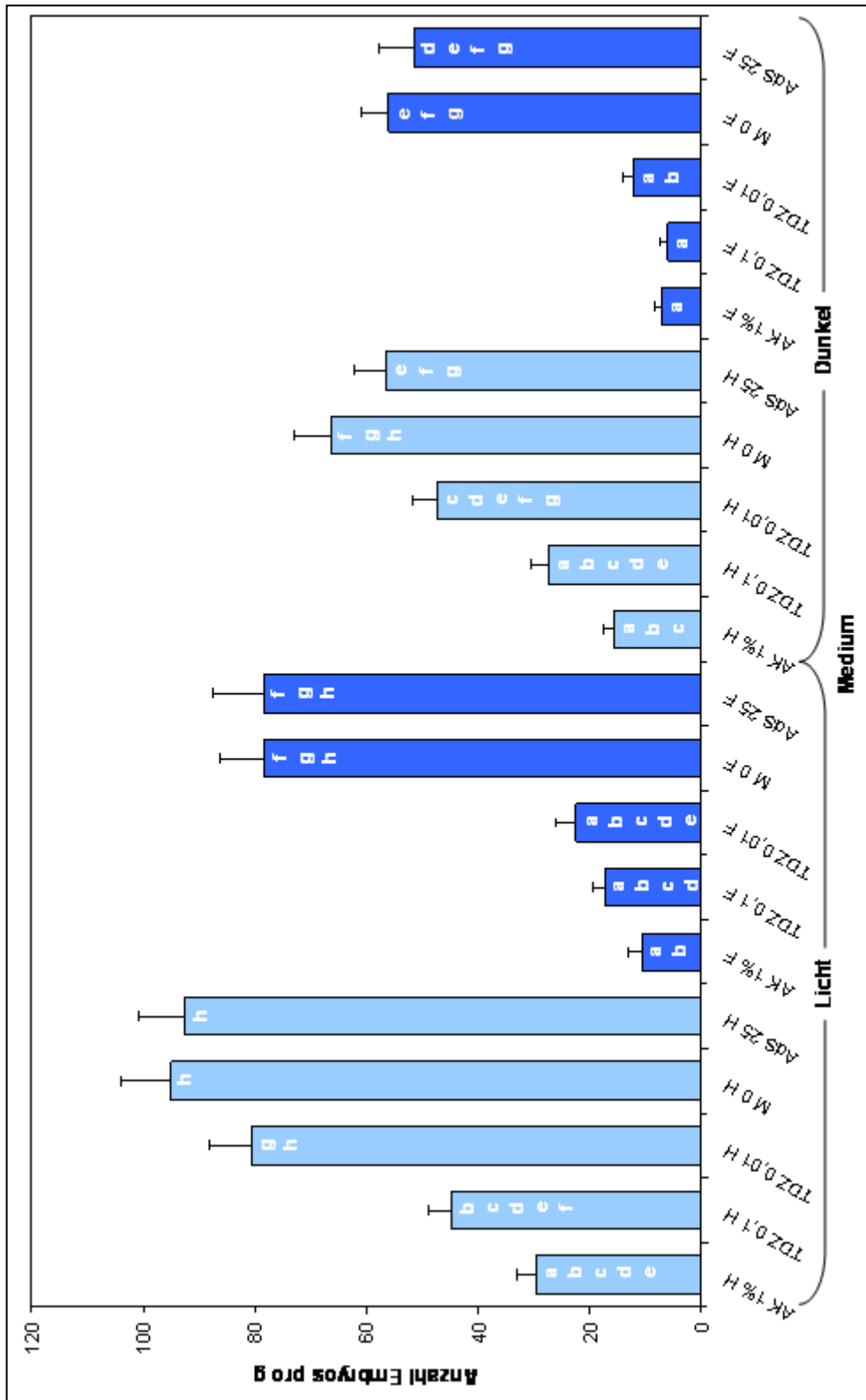
Der Einfluss von 5 unterschiedlichen Nährmedien auf die Bildung von globulären Embryos, entwickelten Embryos und Adventivsprossen wurde untersucht. Dabei kamen sowohl Wuchsstoff-freie Medien als auch Medien mit Aktivkohle-, Adeninsulfat- oder Thidiazuronzusatz zum Einsatz (vgl. Kap. 2.2., S. 9). Eine weitere Variation der Kulturbedingungen wurde durch Verwendung von halbfesten bzw. flüssigen Nährmedien und der Inkubation im Licht bzw. im Dunkeln erreicht. Aus Kombination der genannten Kulturbedingungen ergaben sich 20 unterschiedliche Versuchsanordnungen in der Embryoentwicklungsphase.

Die Diagramme 26 (S. 64) und 27 (S. 65) geben einen zusammenfassenden Überblick über den Einfluss der getesteten Parameter auf die Bildung von globulären Embryos und entwickelten Embryos.



Diagr. 26: Einfluss von Nährmedium (vgl. Kap. 2.2., S. 9) und Lichtbedingungen auf die Bildung von globulären Embryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)



Diagr. 27: Einfluss von Nährmedium (vgl. Kap. 2.2., S. 9) und Lichtbedingungen auf die Bildung von entwickelten Embryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Der Einsatz von Medien mit 1 % Aktivkohle führte insgesamt zur Bildung von wenigen somatischen Embryos. So zeigte beispielsweise die Inkubation der Kalli auf Medium AK1%H bzw. in Medium AK1%F meist signifikant schlechtere Ergebnisse bezüglich der Bildung von globulären Embryos als alle Versuche mit Wuchsstoff-freien bzw. Adeninsulfat-hältigen Medien (vgl. Diagr. 26, S. 64). Ebenso konnte in allen Versuchen mit Medien ohne Wuchsstoff bzw. mit Adeninsulfatzusatz das Auftreten von entwickelten Embryos signifikant häufiger beobachtet werden als in Medium AK1%F (vgl. Diagr. 27, S. 65). Das Wachstum der auf bzw. in Aktivkohle-hältigen Medien kultivierten Kalli war gering. Während der 6-wöchigen Embryoentwicklungsphase kam es zu einer Verdoppelung bis Verdreifachung der Biomasse (vgl. Tab. 7, S. 34).

Aktivkohle weist eine sehr große Oberfläche auf, an der eine Vielzahl von Molekülen, darunter inhibitorische Stoffwechselprodukte und auch Wuchsstoffe, adsorbiert werden können. Dadurch kann der Zusatz von Aktivkohle zu Nährmedien das Wachstum und die Entwicklung pflanzlicher Zellen positiv beeinflussen. In der pflanzlichen Gewebekultur erfolgt der Einsatz von Aktivkohle innerhalb eines sehr weiten Konzentrationsbereichs von 0,002 g/l bis 150 g/l (Thomas, 2008).

Von Motoike et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass sich im Rahmen der indirekten somatischen Embryogenese bei *Vitis x Labruscana* ein Zusatz von 2,5 g/l Aktivkohle zum Nährmedium positiv auf die Entwicklung somatischer Embryos aus embryogenem Kallusmaterial auswirkte.

Zhang et al. (2000) führten Versuche sowohl zur indirekten als auch direkten somatischen Embryogenese bei *Gossypium hirsutum* L. durch. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden signifikant mehr reife Embryos bei Einsatz von Zeatin-hältigen Medien mit 2 g/l Aktivkohlezusatz beobachtet als bei Verwendung von Zeatin-hältigen Medien ohne Aktivkohle. Der Zusatz von Aktivkohle führte weiters zu einer Unterdrückung des Wachstums von embryogenem Kallusgewebe.

Thomas (2008) weist darauf hin, dass sich die Verwendung von Aktivkohle auch negativ auf die Entwicklung von Pflanzenzellen auswirken kann. Es besteht nämlich das Problem, dass nicht nur unerwünschte Substanzen, sondern auch notwendige Phytohormone oder Wuchsstoffe adsorbiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine im Vergleich zu anderen Arbeiten zur somatischen Embryogenese (Motoike et al., 2001; Zhang et al., 2000) relativ hohe

Aktivkohlekonzentration von 10 g/l eingesetzt. Dies war möglicherweise die Ursache für die verminderte Proliferation der Kalluszellen und die Unterdrückung der somatischen Embryogenese.

Die Induktion der embryogenen Kalluskulturen erfolgte auf Medien mit 1 μM Thidiazuron. Hohe Wuchsstoffkonzentrationen wirken sich meist negativ auf eine weitere Embryoentwicklung aus (vgl. Kap. 1.2., S. 4). Daher wurden im Rahmen der Stufe II-Experimente 2 Versuchsreihen mit reduzierter Thidiazuronkonzentration von 0,1 μM bzw. 0,01 μM und eine Versuchsreihe mit Wuchsstoff-freiem Medium durchgeführt. Die Reduktion der anfänglichen Wuchsstoffkonzentration ist eine gängige Methode zur Förderung der Bildung bzw. Entwicklung von somatischen Embryonen. Sheibani et al. (2007) beispielsweise induzierten indirekte somatische Embryogenese bei *Crocus sativus* L. unter Verwendung von Medien unterschiedlicher TDZ-Konzentrationen. Die Reifung der Embryos erfolgte auf Thidiazuron-freien Medien.

Bei TDZ handelt es sich um ein substituiertes Harnstoffderivat (*N*-Phenyl-*N'*-1,2,3-Thidiazol-5-yl-Harnstoff) mit sowohl typischen Cytokinin- als auch Auxinwirkungen. Thidiazuron konnte bereits erfolgreich bei einigen Fabaceen zur Induktion von somatischer Embryogenese und Adventivsprossbildung eingesetzt werden (Lakshmanan und Taji, 2000).

Beispielsweise führte der Einsatz unterschiedlicher TDZ-Konzentrationen zur direkten Bildung von Sprossen und somatischen Embryonen an Keimlingen der Fabaceae *Cajanus cajan* L. (Singh et al., 2003).

Indirekte somatische Embryogenese bei *Cajanus cajan* L. gelang Sreenivasu et al. (1998). Dabei führte die Verwendung von Medien mit 10 μM TDZ zu den besten Ergebnissen bezüglich der Bildung somatischer Embryonen. Sowohl die Kallusinduktion als auch die Embryobildung konnten auf diesem Medium induziert werden. Die entstandenen Embryos wurden zur weiteren Entwicklung auf Wuchsstoff-freies Medium transferiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Embryoentwicklung eine Versuchsreihe mit Medien mit einem Zehntel der in der Kallusinduktionsphase verwendeten Thidiazuronkonzentration durchgeführt. Die Medien TDZ0,1H und TDZ0,1F zeigten bei der Bildung und Entwicklung somatischer Embryonen ähnlich ungünstige Ergebnisse wie die Aktivkohle-hältigen Medien (vgl. Diag. 26, S. 64

und Diagr. 27, S. 65). Aufgrund der relativ hohen Thidiazuronkonzentration entstand meist reichlich Kallusgewebe mit einer Biomassenzunahme um das 13- bis 17-fache des Animpfgewichts (vgl. Tab. 10, S. 41).

Bei Einsatz von Medien mit 0,01 μM Thidiazuron bzw. bei Wuchsstoff-freien Nährmedien erfolgte eine stärkere Induktion der somatischen Embryogenese als bei Medien mit 0,1 μM TDZ. Je geringer die TDZ-Konzentration, umso mehr globuläre Strukturen und entwickelte Embryos wurden gebildet. Vor allem in Flüssigkultur zeigten Wuchsstoff-freie Medien signifikant bessere Ergebnisse als TDZ-hältige Medien (vgl. Diagr. 26, S. 64 und Diagr. 27, S. 65). Die Reduktion der Thidiazuronkonzentration führte zu einer Verringerung des Kalluswachstums. So kam es bei den Kalli auf bzw. in den Medien TDZ0,01H, TDZ0,01F, M0H und M0F zu einer 4- bis 6-fachen Biomassenzunahme (vgl. Tab. 13, S. 49 und Tab. 16, S. 56).

Weiters wurde der Einfluss von Adeninsulfat auf die Bildung somatischer Embryonen untersucht. Bei *Anacardium occidentale* L. konnte von Martin (2003) durch Verwendung von Medien mit BAP (6-Benzylaminopurin), NAA (α -Naphthylelessigsäure) und Adeninsulfat direkte somatische Embryogenese induziert werden.

Der Einsatz von Medien mit 25 μM Adeninsulfat führte in der vorliegenden Arbeit zu guten Ergebnissen bei der indirekten somatischen Embryogenese. Die durchschnittliche Anzahl an gebildeten globulären Strukturen und entwickelten Embryos war zwar meist geringer als bei der Verwendung von Wuchsstoff-freien Medien. Diese Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant (vgl. Diagr. 26, S. 64 und Diagr. 27, S. 65). Die Kalli auf bzw. in Adeninsulfat-hältigen Medien zeigten meist mittelstarkes Wachstum bei einer 4- bis 5-fachen Biomassenzunahme (vgl. Tab. 4, S. 24).

In einer vorangegangenen Diplomarbeit (Kazianka, in Vorbereitung) konnte gezeigt werden, dass sich der Zusatz von 50 μM Adeninsulfat zu Stufe II-Medium positiv auf die Entwicklung somatischer Embryonen auswirkte. Bei den gebildeten Embryonen wurde aber ein gehemmtes Wurzelwachstum beobachtet, vermutlich wegen einer zu hohen Konzentration des Cytokinins. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine Reduktion der Adeninsulfatkonzentration auf 25 μM

verhindert werden: Die somatischen Embryonen zeigten normales Wurzelwachstum (vgl. Abb. 11, S. 26).

Die 5 unterschiedlichen Nährmedien zeigten sowohl einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung somatischer Embryonen, als auch auf das Wachstum der Kallusexplantate. Generell brachten Kalli mit schlechtem Wachstum, wie bei Aktivkohle-hältigen Medien beobachtet, und Kalli mit sehr starkem Wachstum, wie bei Medien mit 0,1 μM TDZ, wenig somatische Embryos hervor. Kalluskulturen auf bzw. in Adeninsulfat-hältigen Medien, Wuchsstoff-freien Nährmedien und Medien mit 0,01 μM TDZ zeigten meist mittelstarkes Wachstum und waren für die somatische Embryogenese besser geeignet.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Hou und Jia (2004) überein. Im Rahmen der indirekten somatischen Embryogenese bei *Astragalus melilotoides* Pall. erfolgte die Bildung von drei Kallustypen, die unterschiedliches Wachstum und Aussehen zeigten. Lediglich der Kallustyp mit mittelstarkem Wachstum zeigte embryogene Potenz.

Es wurde auch der Einfluss der Genotypen, Lichtverhältnisse und Beschaffenheit des Nährmediums auf die indirekte somatische Embryogenese von *Glycyrrhiza glabra* L. untersucht.

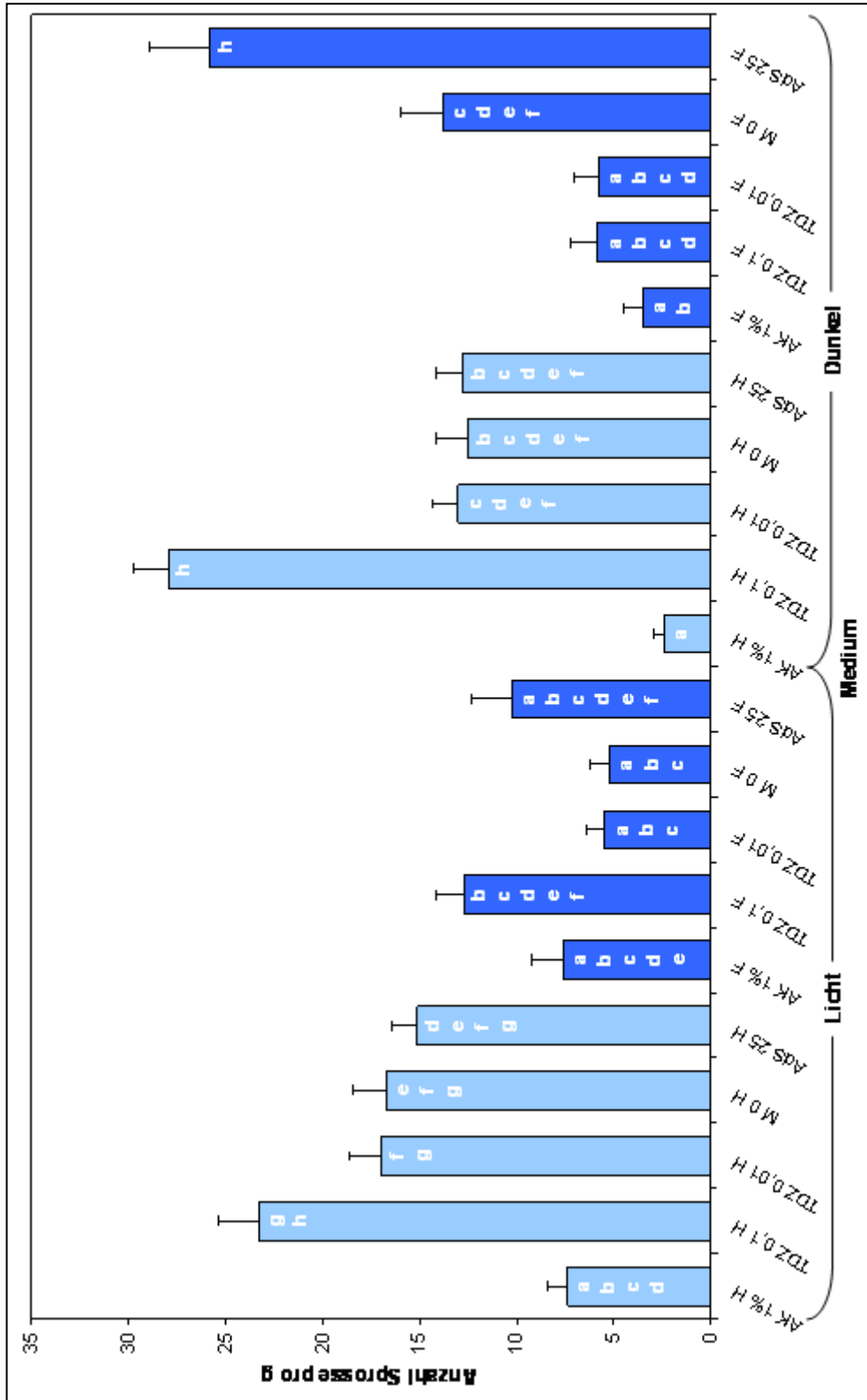
Der Genotyp scheint bei der somatischen Embryogenese einiger Fabaceen eine Rolle zu spielen (Lakshmanan und Taji, 2000). In der vorliegenden Arbeit kamen 16 unterschiedliche Genotypen zum Einsatz. Dabei wurden die Klone 1 bis 8 auf halbfesten Medien, die Klone 9 bis 16 in Flüssigmedien kultiviert. Insgesamt konnten bis auf wenige Ausnahmen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verwendeten Genotypen festgestellt werden. Vor allem bei den TDZ-hältigen Medien war der Hauptgrund für die Unterschiede die Kultivierung der Klone auf bzw. in Medien unterschiedlicher Konsistenz (vgl. Kap. 3.3.3.1., S. 43 und Kap. 3.3.4.1., S. 50).

Bei *Glycine max* (L.) Merrill konnte kein Einfluss von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf die Bildung somatischer Embryonen festgestellt werden (Bonacin et al., 2000). Experimente mit unterschiedlich langer Lichtexposition bei der somatischen Embryogenese von *Prunus incisa* Thunb. cv. February Pink zeigten, dass sich Licht negativ auf das Auftreten von somatischen Embryonen

auswirkte (Cheong und Pooler, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten hingegen unabhängig vom Nährmedium bei der Kultivierung im Licht signifikant mehr somatische Embryos gewonnen werden als bei Inkubation im Dunkeln (vgl. Diagr. 4, S. 31; Diagr. 9, S. 39; Diagr. 14, S. 46; Diagr. 19, S. 53 und Diagr. 24, S. 61).

Der Einfluss von Nährmedien unterschiedlicher Konsistenz auf die somatische Embryogenese war weniger eindeutig. Auf TDZ- bzw. Aktivkohle-hältigen, halbfesten Medien wurden meist mehr somatische Embryos gebildet als in TDZ- bzw. Aktivkohle-hältigen Flüssigmedien (vgl. Diagr. 26, S. 64 und Diagr. 27, S. 65). Der Einsatz von Flüssigmedien führt in der Regel durch bessere Nährstoffversorgung zu einem schnelleren Wachstum der Pflanzenzellen als bei halbfesten Medien (Heß, 1992). Beschleunigtes Wachstum führt unmittelbar zu einem früheren Altern der Kulturen und schnellerem Verbrauch der im Medium bereitgestellten Nährstoffe. Das könnte auch die Ursache für die schlechteren Ergebnisse bei den genannten Flüssigmedien gewesen sein, da nur alle 3 Wochen ein Nährmedienwechsel erfolgte.

Neben der Induktion von somatischer Embryogenese kam es, wenn auch in einem meist geringeren Ausmaß, zur Bildung von Adventivsprossen. Dabei führte die Inkubation der Kalli in Flüssigmedium mit 25 μ M Adeninsulfat unter Lichtausschluss zum Auftreten einer verhältnismäßig großen Anzahl an Sprossen. Die Kalluskultur auf Medium TDZ0,1H sowohl im Licht als auch im Dunkeln brachte ebenfalls viele Sprosse hervor (siehe Diagr. 28, S. 71).



Diagr. 28: Einfluss von Nährmedium (vgl. Kap. 2.2., S. 9) und Lichtbedingungen auf die Bildung von Adventivsprossen,

Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler.

Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Bei Etablierung einer Kalluskultur von *Glycyrrhiza glabra* L. mit unterschiedlichen Konzentrationen an Thidiazuron (0,45 µM, 2,27 µM und 4,5 µM) konnte bereits von Wongwicha et al. (2008) Sprossbildung induziert werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte bei Medien mit 0,1 µM TDZ die Induktion von somatischer Embryogenese und Sprossbildung annähernd gleich stark (vgl. Tab. 11, S. 42). Bei einer weiteren Reduktion der Thidiazuronkonzentration wurden mehr Embryos als Adventivsprosse gebildet. Die verwendete TDZ-Konzentration scheint einen Einfluss darauf auszuüben, ob somatische Embryogenese oder Organogenese induziert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der direkten Morphogenese bei *Cajanus cajan* L. (Singh et al., 2003) und *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Mithila et al., 2003) gemacht. In beiden Arbeiten erfolgte bei geringeren TDZ-Konzentrationen die Induktion direkter Sprossbildung, bei wesentlich höheren Konzentrationen kam es zur direkten somatischen Embryogenese.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, *Glycyrrhiza glabra* L. über indirekte somatische Embryogenese zu vermehren. Dabei wurden, aufbauend auf vorangegangenen Diplomarbeiten (Lämmermayer, 2007; Kazianka, in Vorbereitung), die Einflüsse der Nährmedienzusammensetzungen, Genotypen, Lichtverhältnisse und Konsistenz der Nährmedien auf die Bildung somatischer Embryonen untersucht.

Weiterführende Untersuchungen sollten sich mit der Konversion der somatischen Embryos, der Akklimatisierung und ex vitro-Kultur, sowie der Überprüfung der genetischen Homogenität befassen. Schlussendlich würde ein optimiertes Vermehrungsprotokoll über somatische Embryogenese eine schnelle und genetisch einheitliche Vermehrung von definierten, hochwertigen Süßholzgenotypen ermöglichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur indirekten somatischen Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L. durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung einer embryogenen Kalluskultur dienten Kotyledonenexplantate von 7 Tage alten, unter sterilen Bedingungen gekeimten Sämlingen. Die Explantate wurden zur Kallusinduktion auf MS-Basalmedium mit 1 μM Thidiazuron kultiviert. Nach 9-wöchiger Kallusinduktionsphase wurden die erhaltenen Kalli auf Medien zur Embryobildung und -entwicklung subkultiviert. Dabei wurden 5 Nährmedienzusammensetzungen in jeweils flüssiger und halbfester Form getestet: MS-Basalmedium ohne Wachststoffe bzw. mit 0,01 μM TDZ, 0,1 μM TDZ, 25 μM Adeninsulfat oder 1 % Aktivkohle. Die Kulturen wurden sowohl im Licht (16 h-Photoperiode) als auch im Dunkeln inkubiert.

Der Einfluss der Nährmedien, der verwendeten Genotypen, der Lichtverhältnisse und der Konsistenz des Nährmediums auf die somatische Embryogenese wurde ermittelt.

Medien mit 1 % Aktivkohle bzw. 0,1 μM TDZ führten zur Bildung von wenigen somatischen Embryonen. Eine Reduktion der TDZ-Konzentration auf 0,01 μM begünstigte die somatische Embryogenese. Die größte Anzahl an Embryos wurde bei Einsatz von Wachststoff-freien Medien bzw. Medien mit 25 μM Adeninsulfat gebildet. Das Kallusmaterial von 16 unterschiedlichen Genotypen wurde für die Versuche zur Embryobildung herangezogen. Zwischen den Klonen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Hinblick auf die somatische Embryogenese. Die Untersuchungen zum Einfluss der Lichtbedingungen ergaben signifikant bessere Ergebnisse für die Kulturen im Licht als unter Lichtausschluss. Ein Einfluss der Konsistenz des Nährmediums (fest/flüssig) auf die somatische Embryogenese konnte nur bei TDZ- bzw. Aktivkohle-hältigen Medien beobachtet werden. Bei den entsprechenden halbfesten Medien wurden meist mehr somatische Embryonen gebildet als in den Flüssigmedien.

Neben der Induktion von somatischer Embryogenese wurde in allen Versuchen auch Adventivsprossbildung beobachtet. Besonders viele Sprosse wurden in Flüssigmedium mit 25 μM Adeninsulfat im Dunkeln, bzw. auf halbfesten Medien mit 0,1 μM TDZ gebildet.

Es konnten somit wesentliche Faktoren wie die Nährmedienzusammensetzung, Lichtverhältnisse und Einfluss des Genotyps für die indirekte somatische Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L. identifiziert werden.

6. SUMMARY

In the present study factors affecting indirect somatic embryogenesis in *Glycyrrhiza glabra* L. were investigated.

Cotyledons obtained from 7 day-old aseptically germinated seedlings were used as explant source. For the establishment of embryogenic callus cultures explants were placed on basal MS medium containing 1 μM thidiazuron (TDZ). After 9 weeks on callus induction medium calli were transferred to different media for embryo formation and development. Five media containing different concentrations of TDZ (0.1 or 0.01 μM), 25 μM adenine sulfate, 1 % activated charcoal or no growth regulators or additives at all were tested. Both liquid and semi-solid media were used. Additionally, cultures were maintained in the dark or under a 16/8 h (light/dark) photoperiod.

The effects of media modifications, different genotypes, light conditions and the addition of gelling agents to the media on somatic embryogenesis were evaluated. Media supplemented with 1 % activated charcoal or 0.1 μM TDZ were not effective in promoting embryogenesis. Formation of somatic embryos tended to increase on media containing lower concentrations of TDZ (0.01 μM). The highest mean number of somatic embryos was observed on growth regulator free media and media supplemented with 25 μM adenine sulfate. Among the 16 different genotypes used for embryo formation and development studies, no major differences were observed. Different light conditions significantly influenced somatic embryogenesis. Explants cultivated in the light produced more somatic embryos than explants grown in the dark. The promotive effect of adding a solidifying agent to the media on somatic embryogenesis was only observed on media supplemented with TDZ or activated charcoal.

Beside embryo formation, adventitious shoot regeneration was observed in all tested treatments. Calli cultured in liquid media containing 25 μM adenine sulfate in the dark as well as calli formed on semi-solid media supplemented with 0.1 μM TDZ produced the highest mean number of shoots.

Our results indicate that nutrient medium and light conditions are essential factors for the formation and maturation of somatic embryos in *Glycyrrhiza glabra* L., while no major variations occurred within different genotypes.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Bonacin G.A., Mauro A.O., Oliveira R.C., Perecin D. (2000), Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos, *Genet. Mol. Biol.* **23**: 865-868.

Cheong E.J., Pooler M. R. (2004), Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink, *Plant Cell Reports* **22**: 810-815.

Chin Y.W., Jung H.A., Liu Y., Su B.N., Castoro J.A., Keller W.J., Pereira M.A., Kinghorn A.D. (2007), Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*), *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4691-4697.

Europäisches Arzneibuch, Grundwerk (2005), 5. Ausgabe, 5. Nachtrag, Verlag Österreich GmbH, S. 5742-5744.

Europäisches Arzneibuch, Grundwerk (2005), 5. Ausgabe, Verlag Österreich GmbH, S. 3385-3388.

Europäisches Arzneibuch, Grundwerk (2008), 6. Ausgabe, Verlag Österreich GmbH, S. 4015-4018.

Fursova E. (2006), In vitro-Vermehrung von *Glycyrrhiza glabra* L. über Nodienkultur, Diplomarbeit, Univ. Wien.

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

George E.F., Debergh P.C. (2008), *Micropropagation: Uses and Methods*, in George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. (Hrsg.), *Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Dordrecht, S. 31-33.

Gumpricht E., Dahl R., Devereaux M.W., Sokol R.J. (2005), Licorice compounds glycyrrhizin and 18beta-glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* **280**: 10556-10563.

Heß D. (1992), *Biotechnologie der Pflanzen : eine Einführung*, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, S. 20-63.

Hou S., Jia J. (2004), High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **79**: 95-100.

Kakutani K., Ozaki K., Watanabe H., Tomoda K. (1999), Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on several Species of licorice, *Plant Biotechnol.* **16**: 239-241.

Kazianka C., Diplomarbeit, Univ. Wien, in Vorbereitung.

Kohjyouma M., Kohda H., Tani N., Ashida K., Sugino M., Yamamoto A., Horikoshi T. (1995), In vitro propagation from axillary buds of *Glycyrrhiza glabra* L., *Plant Tissue Culture Lett.* **12**: 145-149.

Kondo K., Shiba M., Nakamura R., Morota T., Shoyama Y. (2007), Constituent properties of licorices derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* identified by genetic information, *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1271-1277.

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

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

Martin K.P. (2003), Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.), *Sci. Hortic.* **98**: 299-304.

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 Reports* **21**: 408-414.

Motoike S.Y., Skirvin R.M., Norton M.A., Otterbacher A.G. (2001), Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **66**: 121-131.

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

Seitz H.U., Seitz U., Alfermann W. (1985), *Pflanzliche Gewebekultur : ein Praktikum*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, S. 21-24, 60-61.

Sheibani M., Azghandi A.V., Nemati S.H. (2007), Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ), *Pakistan J. Biol. Sci.* **10**: 3564-3570.

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.

Somjen D., Knoll E., Vaya J., Stern N., Tamir S. (2004), Estrogen-like activity of licorice root constituents: glabridin and glabrene, in vascular tissues in vitro and in vivo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **91**: 147-155.

Sreenivasu K., Malik S.K., Kumar P.A., Sharma R.P. (1998), Plant regeneration via somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp), *Plant Cell Reports* **17**: 294-297.

Sticher O. (2007), Triterpene einschließlich Steroide, in Sticher O. (Hrsg.), *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 956-961.

Thomas T.D. (2008), The role of activated charcoal in plant tissue culture, *Biotechnol. Adv.* **26**: 618-631.

Wichtl M., Willuhn G., Loew D. (2009), *Liquiritiae radix*, in Wichtl M. (Hrsg.), *Teedrogen und Phytopharmaka*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S.397-400.

Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Tuvshintogtokh I., Putalun W. (2008), Production of glycyrrhizin in callus cultures of licorice, *Z. Naturforsch.* **63c**: 413-417.

Zhang B.H., Liu F., Yao C.B. (2000), Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **60**: 89-94.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Zuname: Winter
Vorname: Marina
Geburtsdatum, Ort: 27.09.1985, 3500 Krems
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig

Bildungsweg

09/1992 – 06/1996 Volksschule,
3621 Hofarnsdorf
09/1996 – 06/2004 AHS Unterstufe und Oberstufe,
Bundesrealgymnasium Krems,
3500 Krems
Seit 10/2004 Studium der Pharmazie
an der Fakultät für Lebenswissenschaften,
Universität Wien

Der praktische Teil der vorliegenden Diplomarbeit wurde von Oktober 2008 bis Februar 2009 durchgeführt.

ANHANG

Die folgende Tabelle A gibt die Anzahl der verfügbaren Kallusexplantate pro Genotyp nach 9 Wochen Kulturdauer auf Kallusinduktionsmedium TDZ1 (vgl. Kap. 2.2., S. 9) wieder. Jeder Klon wurde mit einer Nummer versehen, wobei die 16 Genotypen mit dem besten Kalluswachstum für die Versuche zur Embryobildung herangezogen wurden. In der Tabelle sind dies die Genotypen mit den Nummern 1 bis 16 (fett dargestellt).

Tab. A: Auflistung der Anzahl der Explantate pro Klon nach 9 Wochen Kulturdauer auf Kallusinduktionsmedium TDZ1

Genotyp Nummer	Anzahl der Explantate	Genotyp Nummer	Anzahl der Explantate
1	200	26	100
2	235	27	175
3	225	28	175
4	205	29	75
5	220	30	125
6	245	31	175
7	215	32	150
8	210	33	175
9	200	34	175
10	200	35	150
11	200	36	75
12	200	37	75
13	200	38	100
14	210	39	100
15	210	40	150
16	210	41	175
17	175	42	75
18	175	43	100
19	125	44	75
20	75	45	150
21	175	46	150
22	175	47	175
23	50	48	75
24	75	49	75
25	150	50	100

Fortsetzung von Tabelle A

Genotyp Nummer	Anzahl der Explantate	Genotyp Nummer	Anzahl der Explantate
51	50	91	80
52	75	92	90
53	125	93	175
54	205	94	60
55	100	95	75
56	80	96	150
57	110	97	130
58	200	98	155
59	100	99	85
60	125	100	100
61	205	101	90
62	150	102	85
63	100	103	75
64	115	104	60
65	160	105	75
66	190	106	80
67	185	107	80
68	185	108	125
69	75	109	175
70	165	110	100
71	180	111	130
72	105	112	115
73	60	113	55
74	50	114	125
75	60	115	100
76	180	116	125
77	150	117	85
78	165	118	110
79	75	119	100
80	85	120	75
81	130	121	105
82	180	122	100
83	175	123	195
84	120	124	155
85	175	125	80
86	135	126	110
87	155	127	195
88	140	128	180
89	100	129	75
90	175	130	185

Fortsetzung von Tabelle A

Genotyp Nummer	Anzahl der Explantate	Genotyp Nummer	Anzahl der Explantate
131	105	145	180
132	100	146	90
133	110	147	175
134	125	148	80
135	125	149	155
136	75	150	125
137	185	151	75
138	160	152	130
139	50	153	135
140	55	154	100
141	105	155	85
142	105	156	145
143	120	157	110
144	160	158	80