

Diskussion

Objekttyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidg. Tech. Hochschule, Stiftung Rübel, in Zürich**

Band (Jahr): **112 (1993)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

4. DISKUSSION

4.1. MÖGLICHE WIRKUNGSWEISEN EXTRA- UND INTRAZELLULÄRER KOMPONENTEN

Bei *Lemnaceae* konnten lediglich getrocknete Samen und Knospen erfolgreich kryokonserviert werden. Von Natur aus trockene oder leichtdehydrierbare Samen sind mit Ausnahme der hohe Fett- oder Ölgehalte aufweisenden Samen (BECWAR et al. 1983, STANWOOD 1985) problemlos lebend tiefzufrieren (WITHERS 1982a), so dass sich eine diesbezügliche Diskussion erübrigt. Meristematische Gewebe aus Vegetationsspitzen bestehen aus kleinen, dichtgepackten und undifferenzierten Zellen, die eine dünne Zellwand, höchstens kleine, kaum sichtbare Vakuolen aufweisen (SAKAI 1985) und sich somit morphologisch und physiologisch deutlich von ausdifferenzierten Zellen unterscheiden. Ausser den bekannten Ruhepausen befinden sie sich stets in einer teilungsaktiven Phase. Kompakte Zellgewebe besitzen praktisch keine Interzellularräume, in denen sich während dem Dehydriervorgang Wasser ansammeln könnte, wodurch die Gefahr einer vorzeitigen Inokulation des Zellinhalts durch extrazelluläres Eis gebannt ist, so dass diese Gewebe oft eine gute Unterkühlbarkeit aufweisen (ASHWORTH und ABELES 1984). Die Zusammenfassung in Kap. 1.5 über die bis heute kryokonservierbaren pflanzlichen Gewebetypen und Einzelzellen zeigt klar, dass fast ausschliesslich wenig differenzierte, teilungsfähige Zellen erfolgreich tiefgefroren werden konnten. Verschiedene Literaturstellen weisen darauf hin, dass sich die Zellen dabei in einem aktiven Vermehrungsstadium befanden. So bemerkten VAN DER MEER und SIMPSON (1984), dass sie mit der Algenart *Gracilaria tikvahiae* die höchste Überlebensrate erzielen konnten, wenn sie junges, sich teilendes Material verwendeten. Bei zygotischen Embryonen empfiehlt es sich ebenfalls unreife, sich im Wachstum befindende Stadien zu verwenden, die kleine, dünnwandige und vakuolenfreie Zellen aufweisen (BAJAJ 1977, ZAVALA und SUSSEX 1986). Auch Zellkulturen sind kurz vor und während der exponentiellen Wachstumsphase besonders gefrierresistent (SUGAWARA und SAKAI 1974, WITHERS 1978, 1985b, DIETRICH et al. 1986, REUFF et al. 1988), wenn die Zellen ebenfalls klein und wenig vakuolisiert sind (SUTTON-JONES und STREET 1968). Oft können jedoch Zellkulturen nur dank vorheriger Behandlung mit osmotisch aktiven Substanzen, insbesondere Mannitol oder Sorbitol, zufriedenstellend kryokonserviert werden. Diese Vorkultivierung verursacht unter ande-

rem eine Verkleinerung der durchschnittlichen Zellgrösse (DIETRICH et al. 1982, PRITCHARD et al. 1986a), die Bildung dünner Zellwände (PRITCHARD et al. 1986a) und eine Reduktion des Vakuolenvolumens (PRITCHARD et al. 1986c). Welchem dieser Faktoren die grösste Bedeutung bezüglich Gefrierresistenz zukommt, kann anhand der Literatur nicht eindeutig abgeklärt werden, die Zellwanddicke scheint jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen (PRITCHARD et al. 1986a,c) und dürfte höchstens die Permeation eindringender Gefrierschutzmittel mitbeeinflussen. CHEN et al. (1984b), die Experimente mit zwei verschiedenen *Catheranthus roseus*-Zelllinien durchführten, konnten nur jene ohne Vorbehandlung erfolgreich tiefrieren, die kleine, wenig vakuolisierte Zellen enthielt. Die zweite Kultur, deren verhältnismässig grosse Zellen eine zentrale Vakuole aufwiesen, war nur dank Sorbitolzusatz kryokonservierbar. PRITCHARD et al. (1986a,c), die lediglich die kleinzelligen, vakuolenarmen *Acer pseudoplatanus*-Kulturen lebend kryokonservieren konnten, hingegen nicht die grossen, einen hohen Vakuolengehalt aufweisenden *Glycine max*-Zellen, sind der Meinung, dass kleine Zellen dank dem grösseren Oberflächen-Volumenverhältnis rascher und daher schonender dehydriert werden können und somit die Gefrierresistenz vor allem auf einer Osmoresistenz beruht. Meristematische Zellen sind in der Tat verhältnismässig osmoresistent (KARTHA et al. 1988), und es wäre vorstellbar, dass die Zellgrösse bei langsamem Kühlen eine gewisse Rolle spielt, da jedoch auch nach rascher Temperaturabsenkung der Zelltyp von Bedeutung ist, dürfte das Vakuolenvolumen der entscheidende Faktor sein. Dieser Meinung sind auch ZAVALA und SUSSEX (1986), die aus *Phaseolus vulgaris*-Samen herausgeschnittene Embryonenachsen nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium, das sich durch wenig vakuolisierte Zellen ausweist, erfolgreich durch ultraschnelles Einfrieren kryokonservieren konnten. MORRIS und CLARKE (1978) konnten bei rasch tiefgefrorenen *Chlorella*-Algen ebenfalls eine gute Korrelation zwischen prozentualem Vakuolenanteil und Überlebensrate feststellen. Die Autoren vermuten, dass Vakuolen besonders leicht auskristallisieren, weil ihr Inhalt vergleichsweise wässrig ist. Die Wahrscheinlichkeit einer Nukleation ist in kleinen Komplexen besonders gering (ASHWORTH et al. 1985), und daher dürfte eine Volumenreduktion die Unterkühlbarkeit dieser Organelle erhöhen und somit eine bessere Überlebenschance der Zellen zur Folge haben. Dieser Effekt könnte noch dadurch verstärkt werden, dass beispielsweise Mannitol nicht nur das Gesamtvolumen von Vakuolen vermindert, sondern diese gleichzeitig in viele kleine Vesikel aufteilt (PRITCHARD et al. 1982). Bereits SIMINOVITCH et al. (1968) äusserten die Vermutung, dass das Geheimnis winterharter Zellen

darin besteht, ihre Vakuolen durch Plasmastränge zu unterteilen. Die in der vorliegenden Arbeit benötigten Gefrierschutzmittelkonzentrationen sind allerdings derart hoch, dass sämtliche Gewebe bereits durch die Gefrierschutzmittelbehandlung abgetötet werden, mit Ausnahme jener Knospenteile, die sich in den Gliedtaschen befinden. Diese Tatsache lässt vermuten, dass in den Gliedtaschen nur eine allmähliche Vermischung des Wassers mit der Gefrierschutzlösung stattfindet, wodurch ein Osmoschock der Knospenzellen vermieden wird. Der Bau dieser Gliedtaschen könnte daher für die *Lemnaceae*-Kryokonservierung von grosser Bedeutung und vielleicht auch mit ein Grund sein, weshalb *Wolffioideae*-Arten derart sensibel auf hohe Glycerinkonzentrationen reagieren. Insbesondere für die Gattung *Wolffia* scheint dieser Verdacht naheliegend zu sein, weil diese keine eigentliche Gliedtaschen, sondern lediglich Vertiefungen aufweisen.

Glyzerin ist ein osmotisch sehr aktives Gefrierschutzmittel, das die Unterkühlung von Lösungen fördert, eine starke wachstumshemmende Wirkung auf Kristalle ausübt und die Bildung amorpher Strukturen ermöglicht (REY 1960). Zudem verändert sich das Volumen einer 50% Glyzerinlösung während dem Abkühlen praktisch nicht (LANE 1925), so dass die Proben keiner zusätzlichen mechanischen Belastung ausgesetzt sind. Im Gegensatz zu den meisten anderen Gefrierschutzmitteln entspricht die Oberflächenenergie von Glyzerin jener von Wasser, was für die Erhaltung des Stabilitätsgleichgewichts der Membranen von grosser Wichtigkeit ist (MERYMAN und WILLIAMS 1985). Diese Eigenschaft könnte auch der Grund sein, weshalb Glyzerin selbst in sehr hoher Konzentration für viele Zellen erstaunlich untoxisch ist. Der einzige Nachteil dieses Gefrierschutzmittels besteht in der ungenügenden Permeationsfähigkeit durch Zellmembranen (MERYMAN und WILLIAMS 1985) und ist möglicherweise der Hauptgrund, weshalb diese Substanz in der Pflanzenkryobiologie nur selten ohne weiteren Gefrierschutzmittelzusatz Verwendung fand. Die Eindringgeschwindigkeit von Glyzerin hängt von der Pflanzenart ab (RICHTER 1968, TOWILL und MAZUR 1976), und bei gewissen Arten wie beispielsweise *Haplopappus* sp. kann selbst nach Stunden keine Permeation nachgewiesen werden (TOWILL und MAZUR 1976). Ob Glyzerin bei *Lemnaceae* in die Zellen eindringen kann, ist unbekannt, und anhand der durchgeführten Experimente ergeben sich ebenfalls keine eindeutige Anhaltspunkte. Es stellt sich allerdings die Frage, ob nicht die Zellen nur dank einer guten Glyzerindurchlässigkeit die hohen verwendeten Konzentrationen überleben können. RICHTER (1968) bezeichnet diese Eigenschaft als Voraussetzung für eine hohe Osmotoleranz, weist aber gleichzeitig darauf hin, dass die Wässe-

rung von mit Glycerin gefüllten Zellen riskant und meist tödlich ist, weil Wasser immer viel rascher eindringt als Glycerin austreten kann. Da bei Pflanzen ein Zerplatzen der Plasmamembran, wie dies bei tierischen Zellen oft geschieht, dank der Zellwand nicht möglich ist (MERYMAN und WILLIAMS 1985), dürfte die Zerstörung von Organellen wie beispielsweise der Vakuolen den Tod herbeiführen. Meristematische Zellen könnten aber womöglich solche Prozeduren überleben. *Lemnaceae* weisen einen hohen Wassergehalt auf und dürften nur nach rigorosem Wasserentzug kryokonservierbar sein. Die vorherige Einwirkung eines osmotisch aktiven Gefrierschutzmittels ist daher unbedingt notwendig. Bei allmählicher Temperaturabsenkung geschieht dies zum Teil auch während der Vorkühlphase, da mit 60% Glycerin eingefrorene *Lemna minor*-Pflanzen auch ohne Vorbehandlung eine respektable Überlebensrate aufweisen. Ein vollumfänglicher Gefrierschutz ist bei dieser Art aber erst nach einer ein- bis anderthalbstündigen Einwirkungsphase vorhanden. Obwohl diese Zeitdauer für den alleinigen Zweck der Zelldehydrierung als ungewöhnlich lang erscheinen mag, kann daraus nicht geschlossen werden, dass grössere Glycerinmengen eindringen. Dies könnte nämlich auch darauf zurückzuführen sein, dass die Entwässerung der Knospenzellen wegen dem nur allmählichen Eindringen des Gefrierschutzmittels in die Gliedtaschen verhältnismässig viel Zeit in Anspruch nimmt. Die niedrige Osmolalität der Zellsäfte lässt darauf schliessen, dass die Gewebe bei weitem nicht genügend entwässert werden können, als dass eine Verhinderung der intrazellulären Kristallisation mittels Gefrierpunktserniedrigung durch die zelleigenen Substanzen möglich wäre. Sofern nicht ein Grossteil des Glycerins eindringt, müssen die Zellen osmotisch wenig aktive Stoffe besitzen, die die Bildung von Nukleationskernen weitgehend unterdrücken. Dafür kommen am ehesten Proteine in Frage, die vielleicht auch an der Membranstabilisierung beteiligt sind. Der Proteingehalt von *Lemnaceae* ist von Natur aus ungewöhnlich hoch (AMADO et al. 1980), so dass diese Pflanzen ein effizientes Unterkühlungssystem besitzen könnten. Die Erhöhung der Gefrierresistenz durch die Kultivierung der Pflanzen auf dem im Vergleich zur Hutner-Nährlösung nitratreichen Hillman-Agar, wodurch ein Anstieg des Aminosäure- und Proteingehalts erwartet werden kann, verstärken die Vermutung, dass zelleigene Proteine bei der *Lemnaceae*-Kryokonservierung eine wichtige Rolle spielen. Da auf Hillman-Agar gewachsene *Lemna minor*-Pflanzen auch die Behandlung mit 50% Glycerin besser ertragen als solche aus Hutner-Agarkulturen, dürften zumindest einige dieser Proteine auch am Aufbau der Plasmamembran beteiligt sein, wodurch sich die Membraneigenschaften ändern. Voraussetzung für die

aufgeführten Vermutungen ist allerdings, dass *Lemnaceae* auch ohne Kälteinduktion spezifische Proteine bilden, die für die Kryokonservierung von Bedeutung sind. MERYMAN und WILLIAMS (1985) weisen noch darauf hin, dass die Unterkühlbarkeit von Pflanzenzellen durch die Verunreinigung mit Bakterien, die als Nukleationszentren wirken können (LINDOW et al. 1982) oft limitiert ist. Ob die Sterilität der verwendeten Kulturen für die Resultate dieser Arbeit von Bedeutung ist, kann nicht beurteilt werden, da meristematische Gewebe von Natur aus keimfrei sein sollten (LIMASSET und CORNUET 1949, MOREL und MARTIN 1952).

Da die Verknüpfung der Faktoren, die während dem Einfrieren respektive Auftauen zum Absterben der Zellen führen, recht komplex ist, reichen die bisherigen Untersuchungen nicht aus, um gesicherte Aussagen über die Art der Gefrierschäden machen zu können. Kälteschäden dürften bei der Gattung *Lemna* eher nicht in Frage kommen, da diese Arten grundsätzlich kryokonservierbar sind. Die Verhinderung des Kristallwachstums in der Gefrierschutzlösung ist während dem Einfrier-Auftauzyklus sehr wichtig, und nur in wenigen Fällen konnte kristallines Eis im extrazellulären Bereich toleriert werden. Beim Einfrieren kann das Kristallwachstum noch relativ gut durch die Kühlgeschwindigkeit kontrolliert werden, hingegen ist beim Aufwärmen die entstehende Eismenge weit stärker von der Gefrierschutzmittelkonzentration abhängig, und somit ist das Auftauen der Pflanzen die kritischste Phase. Die gute Korrelation zwischen extrazellulärer Eisbildung und der Überlebensrate von *Lemna minor* und weiterer *Lemna*-Arten lassen den Schluss zu, dass der Zelltod durch äussere Faktoren verursacht wird. Trotzdem kann eine intrazellulär ausgelöste Inokulation nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, da zu wenig über die Zusammensetzung des Zellsafts bekannt ist und zudem vermutet werden muss, dass Gefrierschutzlösungen mit ungenügender kristallwachstumshemmender Wirkung auch als Dehydriermittel ungeeignet sind. Als Verletzungstypen, die durch externe Ereignisse verursacht wurden, kommen mechanische Zerstörungen durch Eiskristalle, Schädigungen durch übermässigen Wasserentzug sowie Membranzusammenbrüche wegen einem plötzlich auftretenden osmotischen Ungleichgewicht in Frage. Schäden, die durch eine zu rasche Entwässerung hervorgerufen werden, könnten bei *Lemnaceae* durchaus eine wichtige Rolle spielen, da auch in den Gliedtaschen eine Kristallbildung stattfindet und somit der regulierende Effekt der Gliedtaschen wegfällt. 60% Glycerin ist die niedrigste Konzentration, bei der unabhängig von der Einfrier- und Auftaurate kein Kristallwachstum nachweisbar ist und welches sich somit für die osmotoleranten Arten gut

eignet. Bei 50% Glycerin entstehen während dem Auftauen der vitrifizierten Lösung im 30°C-Wasserbad stets Kristalle. Nach ANGELL und MACFARLANE (1982) dürfte es sich dabei um viele, sehr kleine Kristalle handeln, die bei weiterem Temperaturanstieg allmählich zu wachsen beginnen (LUYET 1960, MACKENZIE 1977), wegen der verhältnismässig raschen Erwärmung aber recht klein bleiben dürften. Weshalb im Gegensatz zu *Lemna minor* die Knospen von *Lemna ecuadoriensis* und wahrscheinlich der meisten anderen Arten dadurch teilweise letale Schädigungen erleiden, ist nicht erklärbar, mechanische Verletzungen scheinen jedoch eher unwahrscheinlich zu sein. Bei langsamem Auftauen kommen grundsätzlich alle genannten Verletzungstypen in Frage, da die Kristalle bedeutend grösser werden und die stets beobachtbare freiwerdende Kristallisationsenergie darauf hinweist, dass die Pflanzen einem plötzlich auftretenden osmotischen Ungleichgewicht ausgesetzt waren. Während sehr langsamem Kühlen dürften wenige, aber sehr grosse Kristalle entstehen (siehe Kap. 1.2), wodurch die Zellen mechanische Verletzungen oder Dehydratationsschäden erleiden können, hingegen sollte die osmotische Belastung nur allmählich zunehmen. Bei 40% Glycerin kristallisiert spätestens während dem Auftauen im 30°C-Wasserbad ein Grossteil der Lösung aus. Bei Anwendung der Freonmethode konnte keine Temperaturkurve aufgezeichnet werden, die durchschnittliche Auftaurate eines 40% Glycerintropfens beträgt jedoch rund 4500°C/Min. und ist damit nicht viel geringer als die von BOUTRON und ARNAUD (1984) angenommene minimale Auftaurate, die notwendig wäre um in Wasser die Bildung hexagonaler Kristalle zu verhindern. Auch wenn der Temperaturanstieg in den Taschen langsamer vor sich gehen dürfte, da wässrige Systeme eine schlechte Wärmeleitfähigkeit aufweisen (WILLISON und BROWN 1979), sollten bei einer 40% Glycerinlösung trotzdem lediglich kubische Kristalle zu erwarten sein. Diese dürften allerdings in grosser Menge entstehen, da diese Kristallform in verhältnismässig kurzer Zeit gebildet wird (DOWELL und RINFRET 1960). Da nach BOUTRON und ARNAUD (1984) kubische Kristalle keine Strukturschäden verursachen und wegen der sehr kurzen Auftauzeit auch eine letale Überdehydratation ausgeschlossen werden kann, kommt hier eigentlich nur ein Membranzusammenbruch infolge des plötzlich auftretenden extrazellulären Wasserverlusts in Frage.

Spirodela polyrrhiza kann selbst mit 60% Glycerin und ultraschnellem Einfrieren und Auftauen nicht lebend kryokonserviert werden. Da sie im Gegensatz zu den *Wolffioideae*-Arten hohe Glycerinkonzentrationen noch vergleichsweise gut erträgt, können bei ihr von aussen wirkende Schadfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden. Die folgenden Ursachen können daher in Betracht gezogen werden:

- Sofern für die Lebendkonservierung von *Lemnaceae* das Eindringen der Gefrierschutzmittel ins Zellinnere notwendig ist, könnte eine ungenügende Glycerinpenetration für den Zelltod verantwortlich sein.
- Die Art ist möglicherweise unter den angewandten Kulturbedingungen nicht fähig, gefrierschutzspezifische Proteine zu bilden.
- Membranen oder andere lebenswichtige Makromoleküle erleiden irreversible Kälteschäden.

4.2. SCHÄDIGUNGSGRAD DER ÜBERLEBENDEN ZELLEN

Gefriereschädigte Zellen müssen nicht zwangsläufig absterben. So stellten DIETRICH et al. (1982) fest, dass viele der überlebenden *Digitalis lanata*-Zellen Membranvesikel im extraplasmatischen Raum aufwiesen. Als weitere Anomalien solcher Zellen nennen die Autoren aufgetrennte Kerndoppelmembranen sowie ausgeweitete Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Es ist anzunehmen, dass sich derart beeinträchtigte Zellen erst nach einer Regenerationsphase wieder normal vermehren können. Ein vergleichsweise spätes Auswachsen der aufgetauten *Lemnaceae*-Knospen, das Auftreten sukkulenter und kallusförmiger Glieder sowie die Produktion von Anthozyanen, die unter den hier angewandten Zuchtbedingungen normalerweise nicht auftreten, weisen darauf hin, dass viele der überlebenden Gewebe ebenfalls Gefrierschäden aufweisen dürften. Während bei Zellkulturen eine recht bescheidene Anzahl überlebender Zellen ausreicht, um die Zelllinie zu erhalten, kann bei Geweben der Ausfall einzelner Zellen bereits erhebliche Entwicklungsstörungen verursachen. Kallusbildung ist ein typisches Zeichen, dass ein organisiertes Wachstum der Gewebe verloren ging (KUO und LINEBERGER 1985). Dank der grossen Autonomie meristematischer Zellen dürften solche Gewebe aber eher befähigt sein, schwerwiegende Verletzungen zu überstehen als ausdifferenzierte Zellverbände. So ist KARTHA (1981) der Ansicht, dass bei Meristemen recht wenige intakte Zellen ausreichen um Kallus zu bilden, aus dem unter Umständen neue Vegetationsspitzen auswachsen können, wie dies GROUT et al. (1978), TOWILL (1983) und DIETRICH et al. (1987) durch gezielte Kulturmassnahmen erreichen konnten. Bei stark kallusierten *Lemnaceae*-Knospen ist ebenfalls damit zu rechnen, dass die Gewebe abgestorbene Zellen enthalten, wogegen dies bei anthozyanbildenden, aber normal geformten Gliedern nicht der Fall sein dürfte, da nach WITHERS et al. (1988) ein geordnetes Wachstum nur möglich ist, wenn die gegenseitigen Zellkontakte ungestört

sind. Das Auftreten von Anthozyanen deutet somit auf eine leichte Schädigung vereinzelter Zellen hin.

4.3. VERGLEICH DER GEFRIERRESISTENZ VON ARTEN UND STÄMMEN (*LEMNOIDEAE*)

In Kap. 3.3.1 wurden mit sämtlichen *Lemnoideae*-Arten Tieffrierversuche durchgeführt, deren Resultate in der Figur 23 und den Tabellen 5 und 6 dargestellt sind. Daraus geht klar hervor, dass zwischen den Arten, aber auch zwischen verschiedenen Stämmen einer Art, beträchtliche Unterschiede bezüglich Gefrierresistenz bestehen können.

REED (1990) konnte keine Korrelation zwischen der Überlebensrate apikaler Meristeme von verschiedenen *Pyrus*-Arten und ihrer geographischen Verbreitung finden. Dies trifft auch für *Lemnaceae* zu. Von den vier in der borealen Klimazone vorkommenden Arten (siehe Kap. 2.1), zeigen zwar die drei *Lemna*-Arten eine mittlere bis hohe Gefrierresistenz, jedoch die vierte Art, *Spirodela polyrrhiza*, deren Hauptverbreitung allerdings in warmen Gebieten liegt, scheint sehr schwierig zu kryokonservieren sein. Im Gegensatz dazu ist die vorwiegend in den kühleren Subtropen beheimatete *Spirodela punctata* deutlich gefrierresistenter. Zwischen der Herkunft der Stämme und ihrer Gefrierresistenz besteht ebenfalls kein Zusammenhang, wenn auch bei einigen Arten Stämme aus besonders kühlen Gebieten eine überdurchschnittlich hohe Überlebensrate aufweisen. So ist beispielsweise bei *Lemna turionifera* der Stamm aus Alaska bedeutend gefrierresistenter als jener aus Texas und bei *Lemna trisulca* gilt dasselbe für die beiden getesteten Stämme aus Niedersachsen und dem Staate Washington im Vergleich zu jenem aus Uganda. Andererseits besteht bei *Lemna minor* kein Unterschied zwischen dem Stamm aus der Tschechoslowakei und jenem aus Uganda. Besonders viele Stämme wurden von *Lemna valdiviana* getestet. Von den überdurchschnittlich gefrierresistenten Stämmen kommt ein Grossteil aus sehr warmen Gebieten (Brasilien, Trinidad, subtropisches Argentinien). Der Stamm 7803 aus Illinois hingegen ist deutlich weniger gefrierresistent.

Vielmehr könnte ein Zusammenhang zwischen Gefrierresistenz und dem Verwandtschaftsgrad bestehen. Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens der einzelnen Stämme ist allerdings eine Aussage sehr schwierig. Nahverwandte Arten reagieren aber oft ähnlich auf tiefste Temperaturen. So ist die durchschnittliche Überlebensrate von Arten der Sektion *Lemna*, zu der *Lemna*

gibba, *Lemna disperma*, *Lemna minor*, *Lemna japonica*, *Lemna obscura*, *Lemna ecuadoriensis* und *Lemna turionifera* gezählt werden, verhältnismässig hoch. Einzig *Lemna ecuadoriensis* fällt etwas aus dem Rahmen, doch konnte von dieser Art, welche sich von *Lemna obscura* kaum unterscheidet, lediglich ein Stamm getestet werden. Von den restlichen *Lemna*-Arten zeigt *Lemna trisulca* noch die höchste Gefrierresistenz. Sie ist die einzige Vertreterin der Sektion *Hydrophylla*, die der Sektion *Lemna* am nächsten steht. Das Gleiche gilt für die Gattung *Spirodela*. Hier zeigen die beiden zur Sektion *Spirodela* gehörenden Arten *Spirodela intermedia* und *Spirodela polyrhiza* eine sehr geringe Gefrierresistenz, während dem die durchschnittliche Überlebensrate von *Spirodela punctata* (Sektion *Oligorrhizae*) deutlich höher ist.

4.4. METHODISCHE ÄNDERUNGEN, DIE DIE ÜBERLEBENS- RATE VERSCHIEDENER ARTEN ERHÖHEN KÖNNTEN

Lemna minor überlebt Einfrierversuche sehr gut, so dass bei ihr methodische Verfeinerungen prinzipiell überflüssig sind. Die Art wäre aber als Testobjekt zur Erprobung von Verbesserungsvorschlägen recht interessant, doch scheint sie sich dafür aus den folgenden Überlegungen nicht zu eignen. DEREUDDRE et al. (1988) zeigten, dass apikale Vegetationsspitzen von *Dianthus caryophyllus* bedeutend gefrierresistenter sind als axilläre Vegetationsspitzen, was mit dem unterschiedlichen physiologischen Zustand der beiden Knospentypen zusammenhängen dürfte. Sollte diese Feststellung auf *Lemnaceae* übertragbar sein, kann das Auswachsen von einem intakten Tochterglied pro aufgetautes Mutterglied, wie dies bei *Lemna minor* im Durchschnitt der Fall ist, als sehr gut bezeichnet werden. Eine Erhöhung der Gefrierresistenz müsste somit bei dieser Art vor allem auf die nachfolgend auswachsenden Knospen ausgerichtet sein, während bei den übrigen Arten in erster Linie der Gefrierschutz primärer Knospen verbessert werden sollte. Trotzdem dürfte es von allgemeinem Interesse sein zu erfahren, ob bei *Lemna minor* durch die Vorkultivierung auf einem mit Benzyl-Adenin versehenen Nährmedium eine klare Steigerung der Überlebensrate erreichbar wäre, da durch dieses Hormon die durch das grösste Tochterglied verursachte Entwicklungsinhibition der jüngeren Knospen aufgehoben wird (GUERN 1965).

Bei verhältnismässig osmotoleranten Arten, die durch die Kryokonservierung mit 50% Glycerin eine deutliche Einbusse ihrer Überlebensrate erleiden, dürf-

te eine Erhöhung der Gefrierschutzmittelkonzentration auf 60%, wie dies beispielsweise mit *Lemna ecuadoriensis* bereits erfolgreich getestet wurde, am vielversprechendsten sein, wobei für jede Art die optimale Einwirkungszeit einzeln eruiert werden muss. Auf die bezüglich Gefrierschutzwirkung ebenbürtige Freonmethode sollte indes für eine Routinekryokonservierung verzichtet werden, um eine unnötige Umweltbelastung durch fluorierte Kohlenwasserstoffe zu vermeiden. Zudem müssten die auf diese Weise tiefgefrorenen Proben anschliessend in sterile Kryoröhrchen abgefüllt werden, da sonst während längerer Lagerung in flüssigem Stickstoff Kontaminationen auftreten könnten (DIETRICH et al. 1987). Nach Ansicht dieser Autoren ist das Überführen der eingefrorenen Pflanzen in sterile Gefässe sehr problematisch, weil die Pflanzen dabei leicht einer zu starken Erwärmung ausgesetzt sind. Für gewisse Arten kann vielleicht das Kristallwachstum in der 50% Glycerinlösung bereits durch die Verwendung kleinerer Probevolumina genügend gehemmt werden, wie dies MEYER et al. (1985) vorschlagen. Rasches Auftauen im Mikrowellenofen könnte ebenfalls erfolgversprechend sein, da genügend rasch eingefrorene und daher vitrifizierte Proben beim Auftauen einen gleichmässigen Wärmefluss gestatten (MERYMAN und WILLIAMS 1985).

Der Versuch einen Teil des Glycerins durch DMSO zu ersetzen, um damit den durch die Gefrierschutzmittelzugabe verursachten Osmoschock zu reduzieren, zeigt bei *Lemna valdiviana* keine positive Wirkung. Durch die Verwendung von PVP könnte die Osmolalität weit mehr gesenkt werden und in Glycerin-PVP-Lösungen soll das Kristallwachstum ebenfalls stark gehemmt sein (DOUZOU 1986). Sofern den Zellen während der Einwirkungszeit trotz der geringeren osmotischen Aktivität genügend Wasser entzogen wird und keine Notwendigkeit besteht, dass beträchtliche Glycerinmengen in die Zellen eindringen müssen, könnte ein PVP-Glyceringemisch durchaus erfolgversprechend sein.

Obwohl die Verhinderung der extrazellulären Kristallisation für das Überleben der *Lemnaceae* eine wichtige Voraussetzung ist, zeigen die Freonversuche mit *Spirodela polyrrhiza*, dass die Verfeinerung des eigentlichen Gefrier- und Auftauvorgangs nicht unbedingt ausreicht, um eine Lebendkonservierung bei tiefsten Temperaturen zu garantieren. Vielmehr müssen für einige Arten auch die Kulturbedingungen vor und nach der eigentlichen Kryokonservierung geändert werden. Die Abhärtung von Pflanzen durch Haltung bei Temperaturen knapp über dem Gefrierpunkt ist eine weitverbreitete und oft erfolgreiche Methode (siehe Kap. 1.3), scheint jedoch für *Lemnaceae* aus den folgenden Überlegungen kaum geeignet zu sein:

- Viele Arten haben ihr Hauptverbreitungsgebiet in warmen Gebieten und dürften bereits durch die über längere Zeit dauernde Einwirkung solcher Temperaturen abgetötet werden.
- Die Überlebensstrategie, um kalte Jahreszeiten zu überstehen, geht bei *Lemnaceae* nicht in Richtung einer erhöhten Frostresistenz, sondern die Pflanzen entwickelten vielmehr Fähigkeiten, um in irgend einer Form auf dem frostfreien Gewässergrund überdauern zu können. So dient der Einbau von Stärke, wie dies insbesondere auch für Turionen typisch ist, vor allem der Erhöhung des spezifischen Gewichts und als Nahrungsvorrat für die im Frühling frisch austreibenden Glieder. Ein Gefrierschutzeffekt wird hingegen dadurch nicht erreicht (HEBER 1968). Auch eigene Einfrierexperimente mit Turionen lieferten keine positiven Resultate.
- Eine Verbesserung der Gefrierresistenz durch die Erhöhung des Proteingehalts, wie dies vermutlich durch die Kultivierung auf Hillman-Agar eintritt, erscheint nur plausibel, wenn sich darunter gefrierschutzspezifische Proteine befinden, die somit von verschiedenen Arten auch ohne Kälteinduktion synthetisiert würden.

Eine weiter Steigerung des Proteingehalts könnte sich aber durchaus positiv auswirken, wie dies beispielsweise durch die Zugabe von Indolessigsäure ins Anzuchtmedium zu erwarten wäre (MACIEJEWSKA-POTAPZYK et al. 1976). HEBER (1970) und HINCHA et al. (1988) konnten zeigen, dass die Gefrierresistenz von Chloroplasten nicht abgehärteter Pflanzen zunimmt, wenn sie im Zellsaft von abgehärteten Pflanzen gekühlt werden, wobei die mutmasslichen Gefrierschutzstoffe nicht artspezifisch zu reagieren scheinen (HEBER 1970). Es könnte sich daher womöglich lohnen, den Zellsaft von *Lemna minor* dem Anzuchtmedium oder zumindest der Gefrierschutzlösung anderer Arten beizumischen. Unbeantwortet bleibt allerdings die Frage, ob die essentiellen Substanzen die Möglichkeit hätten, ins Zellinnere zu gelangen. Eventuell besteht aber auch eine äusserliche Gefrierschutzwirkung, wie dies schon MAXIMOW (1912) erkannte. Die Vorkultivierung auf zucker-, aminosäure- oder proteinhaltigen Zuchtmedien könnte die Gefrierresistenz ebenfalls erhöhen, und PRIBOR (1974) macht auf die Dringlichkeit vermehrter Untersuchungen über den Membranaufbau der aufzubewahrenden Zellen aufmerksam, damit solche Supplemente gezielt eingesetzt werden könnten.

Nach KARTHA (1981) sind grössere Meristeme deutlich gefrierresistenter als kleine, die viel öfters zu kallusförmigem Wachstum neigen. Diese Feststellung könnte auch für *Lemnaceae* zutreffen, da spät auswachsende *Lemna minor*-Knospen häufiger missgebildet waren. Durch eine Hormonzugabe

könnte vielleicht ein Teil dieser Knospen gerettet werden. Über die Problematik der richtigen Hormonwahl wurde schon in Kap. 3.3.2 berichtet. Grössere Knospen hingegen weisen möglicherweise bereits vakuolisierte Zellen auf, so dass eine Verkleinerung dieser Organelle von Vorteil sein könnte. MORRIS und CLARKE (1978) machten bei verschiedenen Algenarten die Erfahrung, dass dies durch nitratarme Ernährung der Fall ist. Da, wie bereits früher erwähnt, ein hoher zelleigener Proteingehalt für die *Lemnaceae*-Kryokonservierung wichtig sein dürfte, kann diese Methode hier kaum zum Ziel führen. Hingegen sollte die Vorkultivierung mit Mannitol oder Sorbitol ins Auge gefasst werden, wodurch eine Vesikulation und Volumenreduktion der Vakuolen herbeigeführt werden kann (siehe Kap. 4.1). WITHERS (1978) konnte anhand von sich synchron teilenden *Acer pseudoplatanus*-Zellen zeigen, dass sich die überlebenden Exemplare vor allem in der G1-Phase des Zellteilungszyklus befanden. Sie postulierte daher, dass sich langsam vermehrende Kulturen, deren Zellen sich länger in der G1-Phase aufhalten, für die Kryokonservierung besonders geeignet sind. Sollte Mannitol die Vermehrungsrate von *Lemnaceae* verlangsamen, wie dies PRITCHARD et al. (1986a) bei *Acer pseudoplatanus*- und *Glycine max*-Zellkulturen feststellten, könnte durch die Kultivierung auf mannitolhaltigem Nährmedium auch dadurch die Überlebensrate erhöht werden. Ob von Natur aus langsam wachsende Arten und Stämme gefrierresistenter sind, wurde nicht untersucht.

KURIYAMA et al. (1989) machten die Beobachtung, dass die Regenerationsfähigkeit von *Oryza sativa*-Zellen durch Ammonium erheblich vermindert wird, jedoch nicht durch Nitrat. Die zur Weiterzucht verwendete Hutner-Lösung enthält zwar nur wenig Ammonium, ein Verzicht auf dieses Nährion wäre trotzdem ratsam. Es drängt sich daher der Gebrauch der ammoniumfreien Hillman-Lösung auf, die ohnehin eine für *Lemnaceae* ausgeglichene Nährstoffzusammensetzung aufweist (LANDOLT, pers. Mitteilung).

Spirodela polyrrhiza-Turionen konnten bisher nicht lebend tiefgefroren werden, was zumindest teilweise damit erklärbar ist, dass sie eine Entwässerung durch Glyzerin schlecht ertragen. Durch die angewandte Lufttrocknung im Kühlschrank könnten die Zellen ebenfalls abgetötet werden, bevor sie genügend dehydriert sind. Da Turionen angeblich in ausgetrockneten Gewässern überdauern können, sofern sie mit Schlamm völlig zugedeckt sind, dürften sie bei schonender Entwässerung recht trockenresistent sein. DEREUDDRE et al. (1990b, 1991a,b) entwickelten eine Methode, wodurch sie schwer dehydrierbare Gewebe dank einem Alginatüberzug erfolgreich mit einem Luftstrom trocknen und einfrieren konnten.

4.5. EIGNUNG DER KRYOKONSERVIERUNG FÜR *LEMNACEAE*

Am Geobotanischen Institut wurden bereits mit verschiedenen Arten und Stämmen umfangreiche morphologische, ökologische und physiologische Untersuchungen durchgeführt. Dies erlaubt für zukünftige Forschungsprojekte eine gezielte Auswahl geeigneter Klone. Es ist daher von grösster Wichtigkeit, dass durch die Kryokonservierung keine Selektion stattfindet und somit die spezifischen Eigenschaften jedes Stammes vollumfänglich erhalten bleiben. Bisherige Untersuchungen, die meist mit mutierten Zelllinien durchgeführt wurden, lassen vermuten, dass durch die Flüssig-Stickstofflagerung weder morphologische, genetische noch physiologische Veränderungen zu befürchten sind (DIETRICH et al. 1982, 1985, ROTH 1983, VOLKOVA et al. 1983, WEBER et al. 1983, ZHENG et al. 1983, CHEN et al. 1984b, STRAUSS et al. 1985, SIDYAKINA et al. 1986, REUFF et al. 1988). Eine Selektion gefrierresistenter Zellen durch wiederholtes Einfrieren der gleichen Kultur kann ebenfalls ausgeschlossen werden (WITHERS 1980). Die Meristemkryokonservierung eignet sich für *Lemnaceae* besonders gut, da das Auswachsen von Knospen aus toten Gliedern ein natürlicher Vorgang ist und keine besondere Ansprüche an die Kulturbedingungen stellt. Dank der raschen vegetativen Vermehrung reichen bereits eine bis wenige überlebende Knospen aus, um innert nützlicher Frist eine grosse Anzahl Pflanzen heranzuziehen. Viele Stämme der Sektion *Lemna* zeigen eine recht gute Überlebensrate und lassen sich problemlos in flüssigem Stickstoff lagern. Bei konsequenter Verwendung von 60% Glycerin als Gefrierschutzmittel können wahrscheinlich alle Stämme dieser Sektion sowie *Spirodela punctata* sicher kryokonserviert werden. Viele der restlichen *Lemnoideae* könnten ebenfalls ohne methodische Verbesserungen auf diese Weise aufbewahrt werden, sofern eine genügend grosse Anzahl Glieder (etwa 1000) eingefroren wird. Eine derart grosse Stückzahl ist vor allem auch deshalb empfehlenswert, weil bei der Wiederholung von Einfrierexperimenten beträchtliche Unterschiede bezüglich Überlebensrate auftreten können, wie dies HENSHAW et al. (1985b) und BENSON et al. (1989) bei Kartoffelmeristemen feststellten. KARTHA et al. (1980) führen dies auf die grosse physiologische Variation von Meristemen zurück. Trotz der hohen benötigten Gliedzahl sollte die Lagerung dieser Stämme keine Platzprobleme verursachen, denn für eine routinemässige Stickstofflagerung können weitaus mehr Glieder in ein Kryoröhrchen abgeimpft werden, als dies für die Untersuchungen zweckmässig war. Bei diesen Arten erscheint es jedoch ratsam, jeden Stamm vorerst einzeln zu testen, ob zumindest eine geringe Gefrierresistenz vorhanden ist.

Bisher nicht kryokonservierbar sind *Spirodela polyrrhiza* und wohl sämtliche *Wolffioideae*-Arten. Da letztere hohe Gefrierschutzmittelkonzentrationen nicht ertragen, dürfte die in dieser Arbeit vorgeschlagene Gefriermethode durch Vitrifikation der extrazellulären Lösung für diese Arten nicht anwendbar sein. Für die Vertreter dieser Unterfamilie müsste somit eine völlig andersartige Technik entwickelt werden. Es bleibt abzuwarten, ob sich dafür beispielsweise das Zweischnittverfahren eignet, bei dem die Pflanzen erst während der Vorkühlphase allmählich entwässert werden.