

Einleitung

Objektyp: **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.

1. EINLEITUNG

1.1. PROBLEMSTELLUNG

Einseitige, auf einen erhöhten Ertrag ausgerichtete Züchtungen in der Landwirtschaft waren der Hauptgrund für die Verarmung der genetischen Vielfalt und begünstigten die Ausbreitung von Krankheiten (WHITHERS 1985a, KARTHA 1985). Es wird deshalb immer wichtiger, dass Kulturpflanzen und deren Wildformen in ihrer ganzen genetischen Breite in sogenannten Genbanken aufbewahrt werden können, um sie später jederzeit für gezielte Aufzuchtprogramme einsetzen zu können (KARTHA 1985). In vielen Forschungsbereichen ist die stete Verfügbarkeit von genetisch bekanntem Material ebenfalls von grosser Wichtigkeit (TOWILL 1981). Besondere Aufmerksamkeit sollte zudem den bedrohten Arten geschenkt werden, die auf diese Weise für künftige Wiederbesiedlungsversuche aufbewahrt werden könnten (ULRICH et al. 1984). Viele Arten lassen sich relativ einfach als Samen lagern. Schwieriger ist hingegen die Aufbewahrung jener Arten, deren Samen kurzlebig sind oder die sich hauptsächlich vegetativ vermehren. Verschiedene Autoren empfehlen allerdings ohnehin, Pflanzen als meristematische Gewebe zu kultivieren, da diese im allgemeinen pathogenfrei (LIMASSET und CORNUET 1949, MOREL und MARTIN 1952) und die daraus regenerierten Pflanzen genetisch identisch mit dem Ausgangsmaterial sind (KARTHA 1981, TOWILL 1984). Die Aufrechterhaltung einer solchen Sammlung ist nur mit grossem Arbeitsaufwand möglich (KARTHA 1980, SAKAI 1984) und zugleich mit hohen Kosten verbunden. Beim Wechsel auf frische Nährmedien besteht ausserdem die Gefahr, Verluste durch Unfälle oder Verunreinigungen mit Mikroorganismen zu erleiden (WHITHERS 1984). WHITHERS (1982a) nennt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, lebendes Pflanzenmaterial für längere Zeit zu konservieren. Das Material kann entweder unter wachstumslimitierenden Bedingungen aufbewahrt werden, wie dies unter anderem SAKAI und NISHIYAMA (1978) für Apfelbaumknospen zeigten oder aber bei tiefen Temperaturen. Dieses zweite Lagerungsverfahren wird Kryokonservierung genannt und hat gegenüber der ersten Methode den Vorteil, dass die Aufbewahrung bei genügend tiefen Temperaturen, wie beispielsweise in flüssigem Stickstoff zeitlich praktisch unbegrenzt ist (MAZUR 1976). Da in diesem Fall weder biologische noch physikalische Vorgänge ablaufen, ist die genetische Stabilität gewährleistet (GROUT et al. 1978, DEREUDDRE et al. 1988), allfällige Kontaminationen werden verhindert (DEREUDDRE et

al. 1990a), und jegliches Kristallwachstum ist unterbunden (BOUSTRON et al. 1982). Das Geobotanische Institut der ETH Zürich arbeitet seit über 20 Jahren experimentell physiologisch und ökologisch mit *Lemnaceae*. Diese Pflanzen eignen sich dank ihrer geringen Grösse und einer raschen vegetativen Vermehrung, die eine genetische Diversität weitgehend verhindert (URBANSKA-WORYTKIEWICZ 1980), sehr gut für Untersuchungen unter Laborbedingungen. Obwohl sie einige interessante Eigenschaften besitzen, die eine Verwendung in verschiedenen Bereichen als nützlich erscheinen lassen, ist ihre wirtschaftliche Bedeutung bis heute gering geblieben. Ihr Aminosäure- und Proteingehalt sind vergleichsweise hoch (AMADO et al. 1980), so dass sie als Eiweissquelle für die menschliche und tierische Ernährung gut geeignet wären (HILLMAN und CULLEY 1978). Dank der Toleranz gegenüber hohen Nitrat- und Phosphatkonzentrationen sowie der Fähigkeit, Schwermetalle (STEPHENSON et al. 1980), PCB (TRIDECH et al. 1981), Herbizide (LOCKHART et al. 1983) und andere giftige Substanzen zu akkumulieren, können sie zur Abwasserreinigung verwendet werden. Auch als Indikatoren für leichtverschmutzte Gewässer eignen sie sich bestens (POTT 1981). Die Resultate der am Institut geleisteten Forschungsarbeiten über *Lemnaceae* sind zusammenfassend in den von LANDOLT (1986) sowie LANDOLT und KANDELER (1987) erschienenen Monographien zu finden. Da diese beiden Werke einen umfassenden Überblick über die Familie vermitteln, werden sie in dieser Arbeit nur noch in speziellen Fällen zitiert. Die von verschiedenen Instituten regelmässig in Anspruch genommene *Lemnaceae*-Sammlung umfasst zur Zeit etwa 1200 Stämme aus der ganzen Welt. Der Unterhalt der Sammlung ist sehr arbeitsintensiv, da die Pflanzen alle drei Monate auf frische Agarmedien übertragen werden müssen. Die vorliegende Arbeit gewährt einen detaillierten Einblick, inwieweit und unter welchen Voraussetzungen es möglich ist, verschiedene Arten unter Flüssig-Stickstoffbedingungen aufzubewahren. Um eine geeignete Kryokonservierungsmethode entwickeln zu können, mussten die folgenden Grundlagen erarbeitet werden:

- Da im allgemeinen nur besonders gefrierresistente Pflanzenteile lebend eingefroren werden können (siehe Kapitel 1.5), musste überprüft werden, welche Gewebetypen oder Organe für die Kryokonservierung in Frage kommen.
- Untersuchungen über den Einfluss verschiedener biotischer und abiotischer Faktoren wie Kulturbedingungen, physiologischer Zustand der Pflanzen, Wirkungsweise der Gefrierschutzmittel sowie verschiedene Kühl- und Auftautechniken auf die Gefrierresistenz.

- Morphologische Beobachtungen an überlebenden Pflanzen, um anhand von ungewöhnlichen Bildungen oder abnormem Wachstum eine Aussage über Art und Schwere von Gefrierschäden machen zu können.
- Untersuchungen über die Wirkungsweise von Gefrierschutzmitteln sowie Beobachtungen über das physikalische Verhalten dieser Lösungen während dem Gefrier- und Auftauvorgang.

1.2. PHYSIKALISCHES VERHALTEN WÄSSERIGER LÖSUNGEN BEI TIEFEN TEMPERATUREN

Die physikalischen Veränderungen, die eine wässrige Lösung während dem Abkühlen und Erwärmen durchläuft, können am besten anhand eines Phasendiagramms erklärt werden. Figur 1 zeigt jenes des binären Systems Wasser-Glyzerin, das den am weitaus verbreitetsten Typ bei wässrigen Lösungen darstellt (REY 1960). Beim langsamen Abkühlen von Lösungen niedriger bis mittlerer Konzentration entstehen unterhalb der Schmelztemperatur Eiskristalle, deren normalerweise hexagonale Form durch die Struktur der Wassermoleküle geprägt ist. Der Entstehungsvorgang ist in FRANKS (1986) beschrieben und wird hier kurz wiedergegeben. Die Voraussetzung für jede Kristallisation ist das Vorhandensein von Eiskeimen, deren Entstehung durch Dichteschwankungen der Lösung verursacht wird. Diese Art der Eiskeimbildung wird als heterogene Nukleation bezeichnet. Besonders häufig kommt es zur Ansammlung der Wassermoleküle zu sogenannten Clusters auf fremden Oberflächen. Fehlen geeignete Katalysatoren, unterkühlt die Lösung. Je tiefer die Temperatur unter den Schmelzpunkt sinkt, desto kleiner ist die zur Auslösung der Kristallbildung notwendige Grösse der Eiskeime, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Kristallisation mit fortschreitender Unterkühlung zunimmt. Das völlige Fehlen von Eiskeimen führt im Bereich der homogenen Nukleationstemperatur zur spontanen Aggregation der Wassermoleküle. Diese Kristallisationsart kann jedoch nur in sehr kleinen Wassertropfen vorkommen, wie dies in der oberen Atmosphäre der Fall sein dürfte; ein weiteres Beispiel hierfür könnten Zellen sein (MACFARLANE 1986). Da in diesem Fall die freie Kristallisationsenergie verhältnismässig gross ist, entstehen sehr viele kleine Kristalle, während bei einer Auskristallisation im Schmelzbereich bedeutend weniger, aber grosse Kristalle gebildet werden (MACFARLANE 1987). Durch das Gefrierschutzmittel wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle erheblich gebremst, da die Diffusion der Wassermoleküle aus

der umgebenden Lösung gehemmt ist (MACFARLANE 1986). Bei genügend hoher Konzentration findet keine Kristallisation statt, und die Lösung friert im amorphen Zustand ein. Diese Erstarrung wird Vitrifikation genannt. Bei Lösungen geringerer Konzentration wird die entstehende Eismenge erheblich

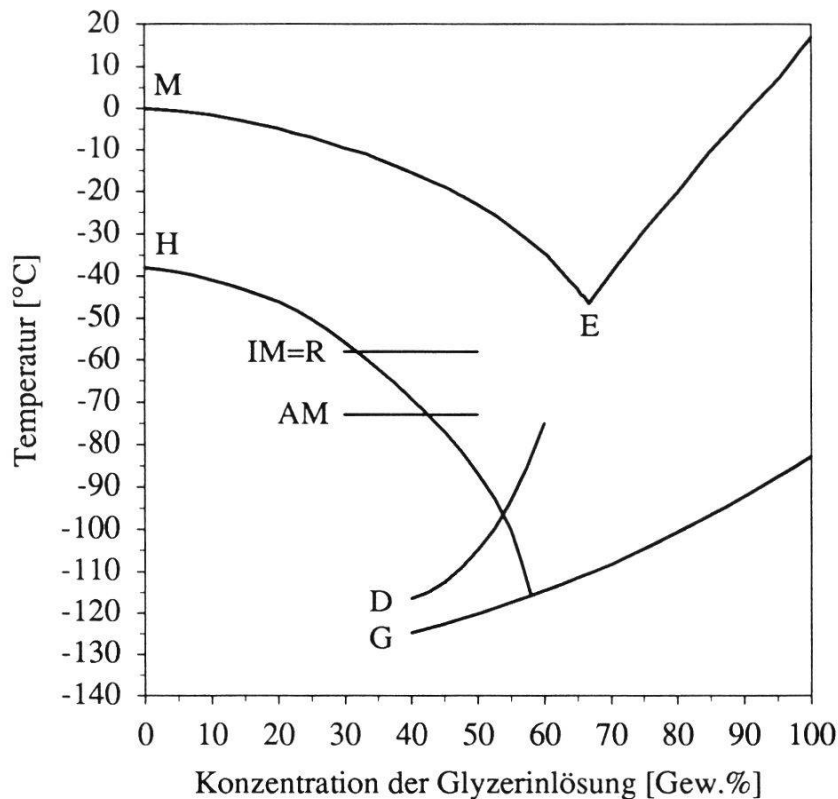


Fig. 1. Phasendiagramm wässriger Glycerinlösungen in Konzentrationen von 0-100%. Die Daten sind den Arbeiten von LANE (1925), LUYET (1970) und FAHY et al. (1984) entnommen.

Phase diagram of aqueous glycerol solutions of concentrations from 0 to 100%. Data were drawn from the works of LANE (1925), LUYET (1970) and FAHY et al. (1984).

- AM Temperaturbereich des "ante-melting", einer Zustandsänderung unbekannter Natur
temperature area of "ante-melting", a transition of unknown nature
- D Temperaturbereich der Devitrifikation – *temperature area of devitrification*
- E Eutektischer Punkt = Schmelzpunkt der gesättigten Lösung
eutectic = melting point of the saturated solution
- G Temperaturbereich der Zustandsänderung zwischen flüssiger und vitrifizierter Phase – *temperature area of glass transition*
- H Temperaturbereich der homogenen Nukleation – *temperature area of homogeneous nucleation*
- IM=R Temperaturbereich des Schmelzbeginns der kristallinen Phase mit anschließender Rekristallisation – *temperature area of incipient melting and following recrystallisation*
- M Schmelzpunktkurve, oberhalb der keine feste Phase existiert – *melting point curve, above which no solid phase exists*

durch die Einfriergeschwindigkeit beeinflusst (BOUTRON 1986, BOUTRON et al. 1986, MEHL und BOUTRON 1987), die auch Grösse und Form der Kristalle (LUYET 1960, BOUTRON et al. 1986) mitbestimmt. Bei genügend rascher Abkühlung entstehen zwar Nukleationskeime, das Kristallwachstum bleibt aber weitgehend aus (FAHY et al. 1984). In der Kryobiologie wird auch in diesem Fall von einer vitrifizierten Lösung gesprochen (LUYET 1960, MOOR 1973). Durch die Kristallisation wird dem System Wasser entzogen, so dass die Konzentration der Restlösung zunimmt und schliesslich im Fall von Glycerin, das unter normalen Umständen nicht auskristallisiert (LANE 1925), vitrifiziert (partielle Vitrifikation). Die Konzentration der Restlösung hängt von der entstehenden Eismenge und somit von der Kühlgeschwindigkeit ab (VASSOILLE et al. 1984, MACFARLANE 1987). Bei vollständiger Auskristallisierung einer Glycerinlösung beträgt die Konzentration der Restlösung 73 Gew.% und ist damit ein wenig höher als jene der eutektischen Lösung (LUYET 1970).

Beim Erwärmen tiefgefrorener Lösungen schmilzt zuerst die vitrifizierte Phase, wodurch die Beweglichkeit der Moleküle abrupt zunimmt (LUYET 1970). Doch erst in einem höheren Temperaturbereich kommt es bei Lösungen, die während dem Kühlen nicht oder nur unvollständig auskristallisierten, zu einer Kristallisation respektive einem Weiterwachsen bereits vorhandener Kristalle. Diese Devitrifikation genannte Kristallbildung soll nach LUYET (1970) in jeder Lösung stets bei gleicher Viskosität beginnen. Der Temperaturbereich, wo deutliches Kristallwachstum nachgewiesen werden kann, ist aber nach BOUTRON und KAUFMANN (1978), FAHY et al. (1984) sowie MACFARLANE (1986) auch von der Auftaugeschwindigkeit abhängig. Bei einer vitrifizierten Lösung entstehen im allgemeinen zuerst kubische Kristalle, die in einem höheren Temperaturbereich in hexagonale umgewandelt werden (DOWELL und RINFRET 1960, BOUTRON und KAUFMANN 1978, BOUTRON und ARNAUD 1984), wobei die Wachstumsgeschwindigkeit stark temperaturabhängig ist (DOWELL und RINFRET 1960, BOUTRON und ARNAUD 1984, VIGIER und VASSOILLE 1987). Bei mittleren Glycerinkonzentrationen beispielsweise ist erst oberhalb -70°C ein messbares Kristallwachstum feststellbar (LUYET 1960, MACKENZIE 1977). Das Schmelzen der Eiskristalle beginnt in einem deutlich unterhalb der Schmelzpunktkurve liegenden Temperaturbereich, der nach LUYET (1970) für Glycerinlösungen von 25% bis 50% gleich sein soll. Beim Schmelzbeginn kann eine Rekristallisation stattfinden, falls sich die Wassermoleküle von kleinen Kristallen ablösen und sich an grösseren wieder ablagern. Beim Durchschreiten des Schmelzpunkts ist alles Eis geschmolzen. Die kritische Auftaurate zur Verhinderung jeglicher Eisbildung ist dem Betrage nach meist deutlich höher

als die minimale Kühlrate (MEHL und BOUTRON 1987, BOUTRON 1988) und in der Kryobiologie in vielen Fällen nicht realisierbar. BOUTRON und ARNAUD (1984) sind der Meinung, dass aber zumindest die Entstehung hexagonaler Kristalle bei Auftauraten ab 5000°C/Min. in jeder Lösung vermieden werden kann.

Abschliessend gilt noch zu bemerken, dass sich unter Hochdruck verschiedene Eigenschaften der Flüssigkeiten ändern. So weisen diese beispielsweise eine geringere Viskosität, einen tieferen Schmelz- und homogenen Nukleationspunkt und im Gegensatz dazu eine höhere Glasschmelz- und Devitrifikationstemperatur auf (KANNO et al. 1975, FAHY et al. 1984, MACFARLANE 1987). Durch erhöhten Druck kann somit die minimale Konzentration einer Lösung, die eine Vitrifikation erlaubt, gesenkt werden, und unter sehr hohem Druck dürfte die Devitrifikation bei jeder Flüssigkeit weitgehend verschwinden (MACFARLANE 1987).

1.3. ZELLSCHÄDIGUNG BEI TIEFEN TEMPERATUREN UND NATÜRLICHE FROSTRESISTENZ

Verletzungen der Zellen durch Kälteeinwirkung beruhen sowohl auf Gefrierschäden durch Kristallbildung, Wasserentzug und damit verbundenen Konzentrationseffekten wie auch auf Kälteschäden. Niedrige Temperaturen führen nämlich zur Änderung der Ionenaktivität, Erniedrigung der Diffusionsgeschwindigkeit und zum Zusammenbruch des Energiegleichgewichts, wodurch die Funktion makromolekularer Komplexe wie Enzyme und Membranen beeinträchtigt wird (FRANKS 1986). Je nach Pflanzenart, Zustand und Gefrierbedingungen verläuft die Schädigung unterschiedlich ab, so dass kaum ein einziger Mechanismus für den Zelltod verantwortlich gemacht werden kann (LARCHER und HÄCKEL 1985).

Überwinternde Pflanzen besitzen eine natürliche Frostresistenz (ULMER 1937, SAKAI 1973, WU et al. 1981), die durch niedrige Temperaturen oder kurze Tageslängen induziert wird (SAKAI 1973). Osmostress kann die Gefrierresistenz ebenfalls erhöhen (PRITCHARD et al. 1986a,b,c). Kälteadaption führt oft zu einem erhöhten Gehalt von verschiedenen Zuckern (SAKAI und YOSHIDA 1968), Prolin (LALK und DÖRFFLING 1985, FRANKS 1986, KUSHAD und YELENOSKY 1987), Polyaminen (KUSHAD und YELENOSKY 1987), Proteinen und Phospholipiden (SIMINOVITCH et al. 1968) sowie zur Synthese spezifischer Proteine (HEBER 1970, GUY und HASKELL 1987).

In der Natur entsteht zuerst immer extrazelluläres Eis, das sich auf Pflanzenoberflächen und Interzellularräumen bildet. Das dadurch entstandene Potentialgefälle kann entweder durch einen Wasserentzug der Zellen oder intrazelluläre Kristallisation ausgeglichen werden (MAZUR 1969). Da allgemein angenommen wird, dass Membranen als Eisinduktionsbarrieren funktionieren (STEPONKUS 1985), dürften Zellen mit intakter Plasmamembran stets einer starken Dehydratation unterliegen. Dies führt zur Akkumulation der gelösten Zellinhaltsstoffe, wodurch viele chemische Reaktionen, trotz niedriger Temperatur, beschleunigt ablaufen dürften (FRANKS 1986), und die erhöhte Elektrolytenkonzentration kann zu Strukturschäden bei Makromolekülen führen (LARCHER und HÄCKEL 1985). Des weitern können Proteine bei Wassermangel S-S-Bindungen eingehen und dadurch irreversibel aggregieren (LEVITT 1964). Phospholipide und Proteine sind sehr kälteempfindlich und dürften daher oft auch ohne Wassermangel inaktiviert oder irreversibel denaturiert werden (FRANKS 1986). Da Membranen durch die erwähnten Faktoren besonders betroffen sind, sehen viele Kryobiologen einen direkten Zusammenhang zwischen Membraneigenschaften und Gefrierschäden (HEBER 1970, SINGH und MILLER 1985, FRANKS 1986). Besonders verletzlich dürfte die Plasmamembran sein, da sie im Vergleich mit anderen endoplasmatischen Membranen relativ starr (YOSHIDA 1984) und zudem direkt am Dehydrationsgeschehen beteiligt ist. So beobachteten STEPONKUS et al. (1983), dass sich kontrahierte Plasmamembranen beim Erwärmen der Zellen nicht mehr ausdehnen konnten. LEVITT und DEAR (1970) machen dafür eine Aggregation benachbarter Membranproteine durch die bereits angesprochenen Bindungsreaktion von SH-Gruppen verantwortlich, wodurch "Membranlöcher" entstehen. Der gleiche Effekt könnte auch die Ursache für die von SINGH und MILLER (1985) beobachtete Membranfusion zu Multibilayern sein, obwohl nach LARCHER und HÄCKEL (1985) für diese Schädigung eher zu hohe Ionenkonzentrationen in Frage kommen. FUJIKAWA und MIURA (1986) konnten zeigen, dass Plasmamembranaggregation auch ohne Wasserentzug möglich ist, und sie sind der Meinung, dass dies durch die direkte Druckeinwirkung des Eises geschehen kann. Eine weitere Verletzungsart ist in STEPONKUS et al. (1983) aufgeführt, wonach eine starke Kompression zum Verlust von Membranpartikeln führt und danach die Membran beim Auftauen durch die Deplasmolyseeinwirkung an den Läsionsstellen zerreißt.

Da Dehydratationseffekte somit beim Einfrieren eine zentrale Rolle spielen, ist es nicht verwunderlich, dass Gefrierresistenz in vielen Fällen mit Osmoresistenz gleichgesetzt werden kann (TYLER und STUSHNOFF 1984, MERYMAN

und WILLIAMS 1985, DEREUDDRE et al. 1990b). Abgehärtete Membranen sind stark komprimierbar (FRANKS 1986), zeigen eine bedeutend stärkere Invaginationsfähigkeit (SINGH und MILLER 1985) und bleiben während dem Abkühlen viel länger fluid (LEVITT und DEAR 1970, SLOCUM et al. 1984). An der Membranstabilisierung sollen verschiedene Zucker und Proteine (SAKAI und YOSHIDA 1968), aber auch Polyamine (SLOCUM et al. 1984, SONGSTAD et al. 1990) beteiligt sein. Die Fluidität hängt nach ALBERTS et al. (1983) vom Aufbau der Lipidköpfchen und deren Fettsäureschwänze ab. Ein vollumfänglicher Schutz der Plasmamembran kann nach LEVITT und DEAR (1970) nur durch den Einbau spezifischer Proteine gewährleistet werden, da membranbindende Substanzen lediglich die Innenseite zu schützen vermögen. Eine besondere Eigenschaft entdeckten MERYMAN und WILLIAMS (1985) bei Weizenzellen, die fähig sind, Phospholipide zu lagern und bei gegebener Deplasmolyse wieder in die Membran einzubauen. Ein Überleben ist nur möglich, wenn eine genügend grosse Restwassermenge in der Zelle bleibt (WEISER 1970, CHEN et al. 1984a, STEPONKUS 1985). Nach MERYMAN und WILLIAMS (1985) kann dies durch die Akkumulation osmotisch aktiver Stoffe, die Inaktivierung von Wasser oder möglicherweise eine geringere Wasserdurchlässigkeit der Plasmamembran erreicht werden. Für die Wasserinaktivierung sind vor allem hydrophile Makromoleküle geeignet (HEBER 1970, LARCHER und HÄCKEL 1985). VINCENT et al. (1988) schliessen nicht aus, dass ein letaler Wasseraustritt durch die Bildung von Polymernetzstrukturen verhindert werden kann, obwohl bisherige Untersuchungen diese Vermutung nicht zu bestätigen vermochten. Experimente mit synthetischen Gelen zeigten nämlich, dass diese bei niedrigen Temperaturen instabil sind (DOUZOU 1986), doch weist der Autor darauf hin, dass Biopolymere einen andersartigen Strukturaufbau aufweisen. ASHWORTH und ABELES (1984) sehen die Verminderung der Dehydration darin, dass gefrierresistente Zellen eine kompakte, lediglich Mikroporen enthaltende Zellwand aufweisen könnten, wodurch die Inokulation des sich in Zellwandhohlräumen befindenden Wassers bis weit unter den Gefrierpunkt verhindert werden kann. Einen ähnlichen Effekt haben Kutinschichten, die ebenfalls als Inokulationsbarrieren wirken (LARCHER und HÄCKEL 1985). Weitere Schutzmechanismen gegen Dehydrationseffekte dürften darauf hinzielen, eine übermässige Akkumulation gelöster Stoffe durch Abschirmung oder reversible Denaturierung zu verhindern. SAKAI (1973) vermutet zudem, dass nordische Holzpflanzen eine spezielle Oberfläche aufweisen, die eine Unterkühlung von extrazellulärem Wasser unterbindet, damit die Plasmamembran nicht durch eine plötzlich auftretende, heftige Dehydration überbelastet wird. Intrazelluläre Eisbildung

wird meist in einem Temperaturbereich zwischen -10 und -20°C beobachtet (STEPONKUS 1985), wodurch die Plasmastrukturen weitgehend zerstört werden. Sie kann in den wenigsten Fällen lediglich durch eine Schmelzpunktniedrigung verhindert werden, da die dafür notwendige Konzentration gelöster Stoffe zu einer zu hohen Viskosität des Zellsafts führen würde. Die meisten Lebewesen sind deshalb fähig, mittels nukleationshemmender Substanzen zu unterkühlen (FRANKS 1986). Als besonders wirksam gelten Peptide der verschiedensten Grössen (FRANKS 1986). Dieser Gefrierschutzmechanismus ist sehr wirksam (MERYMAN und WILLIAMS 1985), so dass allgemein angenommen wird, dass meist nicht zelleigene Nukleationskerne, sondern hauptsächlich extrazelluläres Eis für die intrazelluläre Kristallisation verantwortlich ist (STEPONKUS 1985). Bereits ASAHINA (1962) postulierte, dass intrazelluläre Eisbildung meist die Folge einer Membranschädigung ist und daher nicht primär den Zelltod verursacht. Die meisten Pflanzen dürften kalte Jahreszeiten dank effizienter Unterkühlung überdauern (MERYMAN und WILLIAMS 1985); HIRSH et al. (1985) konnten gar nachweisen, dass der Zellsaft von *Populus balsamifera*-Zweigen während langsamem Kühlen vitrifiziert, wobei Prolin und verschiedene Zucker eine wichtige Rolle spielen (HIRSH 1987).

1.4. DIE KRYOKONSERVIERUNG

Das Überleben von tiefgekühltem Material hängt nicht nur von der Einfrier- und Auftauprozedur ab; auch die Zuchtbedingungen vor und nach der Flüssig-Stickstofflagerung sind von grosser Wichtigkeit. Die Art der Vorkultivierung zielt in erster Linie darauf ab, die natürliche Frostresistenz zu induzieren (SAKAI und SUGAWARA 1973, HIRSH et al. 1985, KUO und LINEBERGER 1985, DIETRICH et al. 1987). Dies geschieht vor allem durch die Haltung bei niedrigen Temperaturen (SAKAI und SUGAWARA 1973, KUO und LINEBERGER 1985, REED 1988, TOIVONEN und KARTHA 1989, DEREUDDRE et al. 1990a) oder durch die Zugabe osmotisch aktiver Substanzen wie beispielsweise Mannitol oder Sorbitol (DIETRICH et al. 1982, CHEN et al. 1984a, PRITCHARD et al. 1986c, DELVALLEE et al. 1989) ins Nährmedium, wodurch zugleich auch der Wassergehalt der Zellen reduziert wird (WEBER et al. 1983, DELVALLEE et al. 1989). Da diese Akklimatisierung durch Hormone gesteuert sein dürfte (BARNES und WILSON 1986), kann die Vorkultivierung mit dem richtigen Hormonzusatz ebenfalls erfolgreich sein (CHEN et al. 1985, BARNES und WILSON 1986, ORR et al. 1986). Des weitern ist eine Erhöhung der Frostresistenz durch die Kulti-

vierung auf Nährmedien möglich, die bekannte Gefrierschutzstoffe wie Saccharose oder Prolin enthalten (WITHERS und KING 1979, BERTRAND-DEBRUNAIIS et al. 1988, DEREUDDRE et al. 1990b). Im allgemeinen gelingt die Lebendkonservierung bei tiefen Temperaturen nur mit Hilfe eines Gefrierschutzmittels. Noch heute sind in vielen Fällen die komplexen Mechanismen dieser Gefriersubstanzen unklar; mögliche Wirkungsweisen sind in FINKLE et al. (1985) zusammengefasst. Bekannt ist hingegen, dass viele Gefrierschutzmittel erst nach einer bestimmten Einwirkungszeit einen vollumfänglichen Schutz bieten und daher häufig eine halbe bis mehrere Stunden vor dem Einfrieren dazugegeben werden müssen (WITHERS und KING 1980, GRIMSLEY und WITHERS 1983, FINKLE et al. 1985). Die Vielfalt möglicher Schutzfunktionen dürfte auch der Grund sein, weshalb sich aus mehreren Komponenten bestehende Gefrierschutzlösungen besonders oft bewährt haben (TAO und LI 1986). Dabei kann eine synergistische Wirkung auftreten (MEYER 1983, FINKLE et al. 1985), die in einigen Fällen auf der Verminderung der Toxizität der einen Substanz durch eine zweite beruht (FINKLE und ULRICH 1979, KARTHA et al. 1988). Am weitesten häufigsten wurde in der Pflanzenkryobiologie Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet (TSURO 1973, GROUT et al. 1978, SAKS 1978, KARTHA et al. 1980, TOWILL 1983, VOLKOVA et al. 1983, ZHENG et al. 1983, KEEFE und HENSHAW 1984, ULRICH et al. 1984, ZAVALA und SUSSEX 1986, DIETRICH et al. 1987, REED 1988, DEREUDDRE et al. 1990a). Ebenfalls öfters gebraucht wurden: Glycerin (TSURO 1973, SAKS 1978, WITHERS 1978, DIETRICH et al. 1982, 1985, 1987, KUO und LINEBERGER 1985, PRITCHARD et al. 1986c, SEITZ 1987), Saccharose (WITHERS und KING 1980, DIETRICH et al. 1982, ULRICH et al. 1984, SEITZ 1987, BERTRAND-DEBRUNAIIS et al. 1988), Glukose (SUGAWARA et al. 1980, GRIMSLEY und WITHERS 1983, ZAVALA und SUSSEX 1986, REED 1988), Prolin (WITHERS und KING 1979, MEYER 1983, PRITCHARD et al. 1986c) und Polyethylenglykol (ULRICH et al. 1984, ZAVALA und SUSSEX 1986, REED 1988). Während in der Natur intrazelluläre Kristallbildung in der Regel durch Unterkühlung vermieden werden kann, ist dies beim Abkühlen auf -196°C nur durch Vitrifikation des Zellsafts möglich und setzt im allgemeinen eine starke Entwässerung der Zellen voraus. Dies ist vor dem Einfrieren durch Lufttrocknung (BECWAR et al. 1983, PRITCHARD 1984, CHIN et al. 1988, DEREUDDRE et al. 1990b) oder wie bereits erwähnt durch das Einlegen der Objekte in eine hypertonische Lösung möglich; am häufigsten werden jedoch die Zellen durch das während langsamem Kühlen entstehende extrazelluläre Eis entwässert. Um eine gleichmässige, möglichst schonende Dehydration zu gewährleisten, ist es ratsam, eine Unterkühlung der extrazellulären Lösung

durch künstliche Inokulation zu verhindern (SAKAI et al. 1978, TOWILL 1981, KEEFE und HENSHAW 1984, VAN DER MEER und SIMPSON 1984, DIETRICH et al. 1987). Langsames Einfrieren auf sehr tiefe Temperaturen gelang nur selten (WITHERS 1978, DIETRICH et al. 1982, 1985), da wohl die Zellen dabei meist durch eine übermässig auftretende Dehydratation abgetötet werden. Die in der Pflanzenkryobiologie weitaus gebräuchlichste Gefriermethode ist daher das sogenannte Zweischrittverfahren, das unter anderem von SAKAI et al. (1978), KARTHA et al. (1982), GRIMSLEY und WITHERS (1983), TOWILL (1983), BERTRAND-DESBRUNAIS et al. (1988) und REED (1988) erfolgreich angewandt wurde. Dabei werden die Proben erst langsam gekühlt, bis der Zellinhalt genügend dehydriert ist, um bei rascher Temperaturabsenkung zu vitrifizieren. Dies ist in der Regel bei rund -40°C der Fall. Anschliessend werden die Kryobehälter in flüssigen Stickstoff getaucht. Rasches oder ultraschnelles Einfrieren ohne Vorkühlung war in einigen Fällen ebenfalls erfolgreich (WITHERS 1982b, HENSHAW et al. 1985a, ZAVALA und SUSSEX 1986, DIETRICH et al. 1987, WITHERS et al. 1988, BENSON et al. 1989), setzt jedoch eine genügend hohe Anfangskonzentration des Zellsafts voraus. Bei dieser Einfriermethode ist die extrazelluläre Kristallisation nicht erwünscht, kann aber oft nicht vermieden werden, weil die dafür benötigte Gefrierschutzmittelkonzentration für die meisten biologischen Systeme tödlich ist (TONER et al. 1984). Die Arbeiten von DE BOUCAUD und CAMBECEDES (1988), LANGIS et al. (1989) sowie LANGIS und STEPONKUS (1990) dürften die ersten erfolgreichen Versuche sein, mehrzelliges pflanzliches Material in einer vitrifizierenden Gefrierschutzlösung zu kryokonservieren. Während dem Auftauen ist die Gefahr einer Kristallbildung besonders gross (siehe Kapitel 1.2.), und deshalb werden die Objekte praktisch ausnahmslos rasch, in einem temperierten Wasserbad erwärmt (BAJAJ 1985, MERYMAN und WILLIAMS 1985, WITHERS 1985b). Oft werden danach die Gefrierschutzmittel abgewaschen, wodurch die Proben erhebliche Zellschäden erleiden können. WITHERS (1985b) empfiehlt daher, Gefrierschutzlösungen nur bei absoluter Notwendigkeit zu entfernen. Den Kulturbedingungen für die Weiterzucht wurde bis anhin nur wenig Beachtung geschenkt, obwohl sie für die Erholungsphase der Zellen von grosser Bedeutung sein könnten (WITHERS 1980). Untersuchungen über den Einfluss von Licht und beigelegten Hormonen wurden von GROUT et al. (1978), BAJAJ (1979, 1984b), TOWILL (1983), HENSHAW et al. (1985a), KARTHA et al. (1988) und WITHERS et al. (1988) durchgeführt.

1.5. STAND DER FORSCHUNG IN DER PFLANZEN- KRYOKONSERVIERUNG

Erfolgreiche Arbeiten liegen über Pilze (SIDYAKINA et al. 1986, YARLETT et al. 1986, BREIEROVA et al. 1987a,b, MORRIS et al. 1988), Algen (TSURO 1973, MORRIS und CLARKE 1978, SAKS 1978, BEN-AMOTZ und GILBOA 1980, MEYER 1983, VAN DER MEER und SIMPSON 1984, MACLELLAN 1989), Moose (GRIMSLLEY und WITHERS 1983) und vor allem über Blütenpflanzen vor, wobei im allgemeinen lediglich einzelne Zellen, Gewebe oder Organe kryokonserviert werden können. Am weitaus häufigsten wurden bisher Samen erfolgreich tiefgefroren, und STANWOOD (1985) hat eine eindruckliche Liste über die verwendeten Arten zusammengestellt. Die Überlebensrate wird dabei nur selten durch die Kühl- und Auftaugeschwindigkeit beeinflusst (STANWOOD 1985), und bei genügend geringem Wassergehalt können viele Samen auch ohne Gefrierschutzmittel lebend tiefgefroren werden (GROUT 1979, BECWAR et al. 1983, PRITCHARD 1984, DE BOUCAUD und CAMBECEDES 1988, eigene Untersuchungen mit *Cichorium*, *Nasturtium*, *Papaver*, *Phaseolus* und *Raphanus*). Auf Trockenheit sensibel reagierende Samen sind hingegen schwierig zu kryokonservieren. BAJAJ (1985) empfiehlt in solchen Fällen aus Samen herausgetrennte Embryonen zu verwenden, doch gelang damit nur selten ein Fortschritt (BAJAJ 1984b, CHIN et al. 1988). Ebenfalls verhältnismässig einfach zu kryokonservieren ist Pollen, wobei auch hier der Wassergehalt als entscheidender Überlebensfaktor gilt (TOWILL 1985). In der genannten Arbeit findet sich auch eine umfangreiche Literaturliste, die noch durch die Veröffentlichungen von GANESHAN (1986), ANDREICA et al. (1988) sowie POLITO und LUZA (1988) ergänzt werden kann. Besonders viele Kryobiologen befassten sich mit der Konservierung von Zellsuspensionskulturen. Mit Ausnahme des von LANGIS et al. (1989) entwickelten "Vitrifikationsverfahrens" sind sich die Methoden recht ähnlich, und die Zellen werden normalerweise mit dem Zweischrittverfahren, seltener durch langsames Abkühlen eingefroren. WITHERS (1985c) beschreibt daher eine Routinemethode, die bei den meisten Pflanzenarten anwendbar sein dürfte. Protoplasten und Kalluskulturen können prinzipiell auf die gleiche Art kryokonserviert werden (WITHERS 1985c), doch arbeiteten nur wenige Forscher mit diesen Formen. Eine Zusammenstellung der Literatur über die Kryokonservierung von Protoplasten, Suspensions- und Kalluskulturen findet sich in WITHERS (1985a). Neuere Schriften darüber liegen von DIETRICH et al. (1986), PRITCHARD et al. (1986c), HAHNE und LOERZ (1987), BAJAJ (1988), REUFF et al. (1988), LANGIS et al. (1989) sowie LANGIS

und STEPONKUS (1990) vor. Im Gegensatz zu Zellkulturen muss für die Kryokonservierung von meristematischem Gewebe aus Vegetationsspitzen und Knospen oft von Grund auf ein neues Verfahren entwickelt werden (WITHERS 1985c). Einen Überblick, welche Arten bisher verwendet wurden, vermitteln SAKAI (1984), KARTHA (1985) und WITHERS (1985a). Weitere Arbeiten zur Meristemkryokonservierung stammen von TOWILL (1984, 1988), TYLER und STUSHNOFF (1984), DEREUDDRE et al. (1987, 1988, 1990a,b), DIETRICH et al. (1987), BRAUN (1988), REED (1988, 1989, 1990), WITHERS et al. (1988) und BENSON et al. (1989). Eine Gesamtübersicht der möglichen Gefrierschutzmethoden für jedes einzelne Kultursystem ist in WITHERS (1982a) zu finden.