

Material und Methoden

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.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. DIE FAMILIE DER *LEMNACEAE*

Lemnaceae sind kleine, frei auf der Wasseroberfläche schwimmende oder submers wachsende Blütenpflanzen. Sie besiedeln in der Regel stehende oder langsam fließende Gewässer und werden zu den *Monocotyledonae* gezählt. Ihr Aufbau ist sehr einfach und viele Organe sind stark reduziert. Die Pflanze besteht im wesentlichen aus einem blatt- bis kugelförmigen Körper, der als Glied bezeichnet wird. Eine Differenzierung in Blätter und Stiel ist nicht erkennbar. Einige Arten besitzen noch Wurzeln, deren wichtigste Funktion die Stabilisierung der Lage der Glieder sein dürfte; die Nährstoffaufnahme hingegen erfolgt in erster Linie durch die Epidermis der Gliedunterseite. Die Glieder bestehen aus einer ein bis zehn Zellen dicken Parenchymschicht, die von einer dünnen Epidermis mit Kutikula umgeben ist. Die meisten Arten besitzen vom parenchymatischen Gewebe umschlossene Hohlräume (aerenchymatisches Gewebe), bei der Gattung *Wolffia* sind jedoch lediglich interzelluläre Lufträume vorhanden, die den Pflanzen den notwendigen Auftrieb geben. Bei verschiedenen *Spirodela*- und *Lemna*-Arten wird das Einsinken zusätzlich durch eine auf der Gliedoberseite vorhandene, wasserabstossende Wachsschicht verhindert. Die Vermehrung geschieht hauptsächlich vegetativ durch Knospung. Die meristematischen Gewebe, aus denen die Tochterglieder auswachsen, befinden sich in Taschen oder Vertiefungen am Basisteil des Mutterglieds (siehe Fig. 2 und 3). Die Knospen beginnen bereits in einem sehr frühen Stadium auszudifferenzieren und bilden ihrerseits wiederum neue Knospen (HEGELMAIER 1868), so dass jedes neu entstandene Glied bereits Knospen für zwei weitere Generationen enthält (RIMON und GALUN 1968). Bei fast allen Arten konnten blühende Pflanzen in freier Natur beobachtet werden. Die ökologischen Bedingungen, die zur Blühinduktion führen, sind in den meisten Fällen nur ungenügend bekannt. Zudem kann das Blühverhalten innerhalb einer Art sehr unterschiedlich sein. Verschiedene Arten scheinen in kühleren Regionen ihres Verbreitungsgebiets eher selten zu blühen. Unter Laborbedingungen können die meisten Arten nur unter speziellen Zuchtbedingungen zum Blühen gebracht werden.

Die Familie umfasst lediglich 34 Arten, die in zwei Unterfamilien eingeteilt werden, nämlich in die *Lemnoideae*, bestehend aus den Gattungen *Spirodela* (drei Arten) und *Lemna* (13 Arten) und in die *Wolffioideae*, bestehend

aus den Gattungen *Wolffiella* und *Wolffia* (je neun Arten). Hauptunterscheidungsmerkmal der Unterfamilien ist das Vorhandensein von Wurzeln bei den *Lemnoideae*-Arten. Zudem besitzen die Vertreter der *Lemnoideae* zwei, jene der *Wolffioideae* lediglich eine Gliedtasche. Die Form der Glieder ist bei der Gattung *Wolffia* kugelförmig, ellipsoid, bootförmig oder zylindrisch, bei den anderen Arten sind sie blattförmig und von rundlicher, ovaler oder bandförmiger Gestalt.

Lemnaceae sind weltweit verbreitet. Sie fehlen nur in den nördlichsten und südlichsten Regionen, in Trockengebieten, wo während längerem Zeitraum eine vollständige Austrocknung der Gewässer erfolgt, sowie in sehr regenreichen Gebieten, in denen die Gewässer zu nährstoffarm sind. Besonders artenreich sind an die Tropen grenzende Gebiete, welche im östlichen Küstenbereich der Kontinente liegen, gefolgt von tropischen Gebirgsregionen sowie im westlichen Küstenbereich liegende Gebiete temperierter Klimazonen. Die

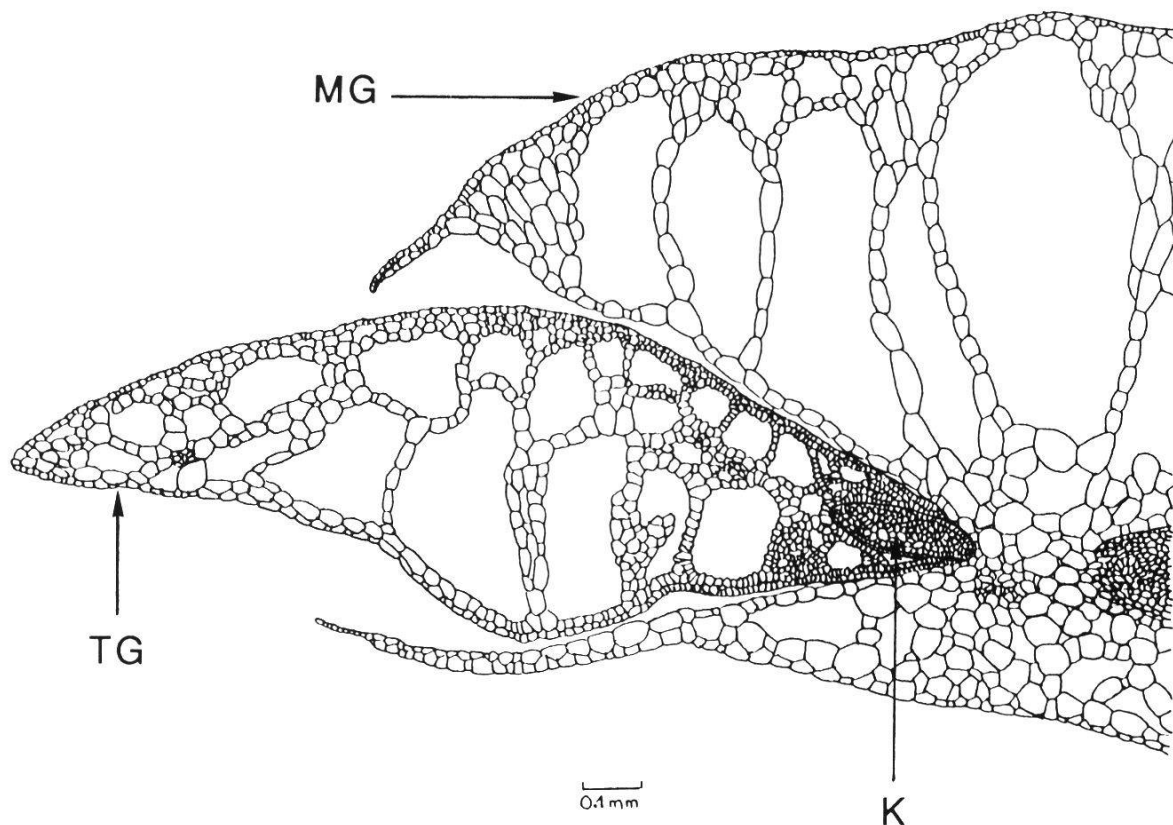


Fig. 2. Querschnitt von *Lemna gibba*-Gliedern (EFRAT et al. 1977) aus LANDOLT (1986).
Transverse section of Lemna gibba fronds (EFRAT et al. 1977) drawn from LANDOLT (1986).
MG = Mutterglied – *mother frond*, TG = Tochterglied der ersten Generation – *daughter frond of the first generation*, K = Knospe der zweiten Generation – *bud of the second generation*.

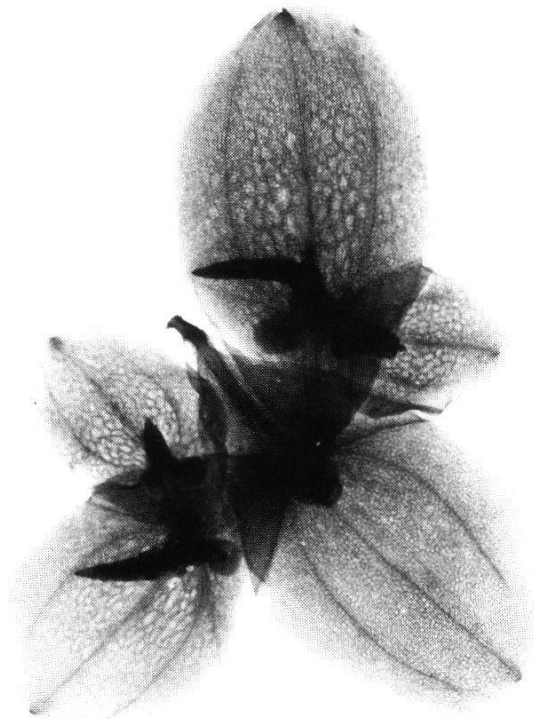


Fig. 3. Transparentes Gliedpräparat von *Lemna aequinoctialis* (aus LANDOLT 1986). Die Knospen befinden sich im basalen Gliedteil, neben der Wurzelansatzstelle.

Transparent frond slide of Lemna aequinoctialis drawn from LANDOLT (1986). Buds are located in the basal part of the frond beside the point of root origin.

grösste Artendiversität ist in Nord- und Südamerika zu finden. Viele Arten kommen nur in einer bestimmten Region vor wie beispielsweise *Lemna obscura* (südöstliches Nordamerika) und *Lemna japonica* (Ostasien), oder sie sind sehr lokal anzutreffen wie *Lemna ecuadoriensis* (Ecuador) und *Wolffiella rotunda* (Simbabwe). Andere Arten wie *Spirodela polyrrhiza*, *Lemna trisulca*, *Lemna turionifera* oder *Lemna aequinoctialis* sind sehr weit verbreitet und können die verschiedensten Klimazonen und Biotope besiedeln.

Viele Arten ertragen keinen Frost und benötigen zur Entwicklung hohe Temperaturen. Ihre Verbreitung ist deshalb auf warme Gebiete beschränkt, wie dies für die meisten *Wolffiella*- und einige *Wolffia*-Arten zutrifft. In gemäßigten Klimabereichen überwiegen Vertreter der Gattung *Lemna*. In Gebieten mit strengen Wintern (boreale und kontinentale Klimazonen) können lediglich noch vier Arten (*Spirodela polyrrhiza*, *Lemna minor*, *Lemna turionifera* und *Lemna trisulca*) gefunden werden. Die Glieder sämtlicher *Lemnaceae*-Arten sind wenig kältetolerant und Temperaturen unter -10°C können wohl von keiner Art in der vegetativen Form für längere Zeit überlebt

werden. Das Absinken in tiefere Wasserschichten ist für die Pflanzen die einzige Möglichkeit, die kalte Jahreszeit zu überdauern. Dies wird auf die folgende Weise ermöglicht:

- Die Glieder sterben jeweils im Herbst ab und sinken auf den Gewässergrund, wo die Knospen überleben und im kommenden Frühjahr neu austreiben.
- Das Absinken erfolgt, weil die Glieder ihr spezifisches Gewicht durch den Einbau von Stärke erhöhen. Zusätzlich reduzieren gewisse Arten das aerenchymatische Gewebe.
- Es werden Überdauerungsorgane gebildet, die ebenfalls einen hohen Stärkegehalt und nur wenige Luftkammern aufweisen. Diese speziellen Glieder, welche Turionen genannten werden, sinken auf den Grund und treiben dann im Frühling wieder aus.
- Gewisse Arten bilden kälteresistente Samen, die auf dem Gewässergrund überwintern.

2.2. VERWENDETE ARTEN UND STÄMME

In die Untersuchungen wurden sämtliche heute bekannten *Spirodela*- und *Lemna*-Arten miteinbezogen, sowie einige *Wolffiella*- und *Wolffia*-Arten. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Herkunft aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme. Mit etlichen Stämmen wurden quantitative Versuche durchgeführt, andere wurden lediglich für qualitative Tests verwendet.

2.3. STERILISATION UND KULTIVIERUNG DER PFLANZEN

In vitro können *Lemnaceae* nur unter sterilen Bedingungen über längere Zeit am Leben erhalten werden. Sie standen bereits zu Beginn steril zur Verfügung, mit Ausnahme von *Lemna tenera*, die erst gegen Ende der Arbeit ans Institut gelangte. Die Sterilisation erfolgte durch Eintauchen der Pflanzen in fünf- bis zehnfach verdünntes Javellewasser (Natriumhypochlorit) während zwei bis vier Minuten. Sowohl die Mutterglieder als auch viele Tochterglieder wurden dabei abgetötet. Am ehesten überlebten jene Tochterglieder, die knapp aus der Gliedtasche herausragten. Das Einlegen in Javellewasser musste mehrmals wiederholt werden.

Als Nährmedien wurden jene von HUTNER (1953) in zehnfacher Verdünnung

Tab. 1. Liste über Herkunft der untersuchten Stämme.

List about origin of studied clones.

Art	Stamm	Herkunft
<i>Spirodela intermedia</i>	7702	Argentinien, Corrientes, Mburucuya
	8818	Argentinien, Formosa
	8850	Brasilien, Rio de Janeiro
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	7344	Schweiz, Bonfol
	7520	Guatemala, Panajachel, Lago Atitlan
	8759	Tschechoslowakei, Velky Cep
	8786a	Nepal, Kathmandu
<i>Spirodela punctata</i>	7273	Australien, New Castle, Seaham
	8757	Florida, Talahassee
	8770	Kalifornien, Riverside County
	8846	Brasilien, Rio de Janeiro
<i>Lemna gibba</i>	7179	Argentinien, Buenos Aires, Buenos Aires
	7262	Chile, Santiago, Maipu
	8428	Schweiz, Aargau, Koblenz
	8760	Tschechoslowakei, Natalice
	8761	Tschechoslowakei, Jordan
<i>Lemna disperma</i>	7268	Tasmanien, Lewisham
	7767	Südwest-Australien, King River
<i>Lemna minor</i>	7194	Uganda, Masaka
	8765	Tschechoslowakei, Golden Canal
	8785	Kalifornien, San Diego
<i>Lemna japonica</i>	7472	Japan, Honshu, Tokyo, Adachiku
	8339	China, Kiangsu, Nanking
<i>Lemna obscura</i>	7143	Florida, Dade County, Miami
	8227	Tennessee, Davidson County, Nashville
<i>Lemna ecuadoriensis</i>	8996	Ecuador, Guyas, Nähe Guayaquil
<i>Lemna turionifera</i>	8117	Texas, Kerr County
	8783	Alaska, Chicken
<i>Lemna trisulca</i>	7013	Deutschland, Niedersachsen, Danneberg
	7172	Washington State, Pierce County, Tacoma
	7192	Uganda, Kigezi, Kabala
	7745	Michigan, Iona County, Belding
<i>Lemna perpusilla</i>	8473	North Carolina, Johnston County
	8612	New Jersey, Mercer County, Princetown
<i>Lemna aequinoctialis</i>	6746	Kalifornien, Merced County, Plainsburg
	8224	Oklahoma, Payne County
	8444	Nepal, Trisuli
<i>Lemna tenera</i>	9023	Australien, Northern Territory, Daly River
	9024	Australien, Northern Territory, Nowrlangie Camp
<i>Lemna valdiviana</i>	7005	Florida, Wakulla County, Crawfordville
	7227	Brasilien, Guanabara, Horto Botanico
	7284	Uruguay, Montevideo, Carrasco, Airport
	7288	Brasilien, Amazonas, Manaus, Rio Negro
	7329	Trinidad, St. Augustin
	7515	Louisiana, Iberia Par., Avery Island
	7546	Kalifornien, San Luis Obispo County
7653	Mexiko, Tabasco, Villahermosa	

Tab. 1 (Forts. – continued)

Art	Stamm	Herkunft	
<i>Lemna valdiviana</i>	7703	Argentinien, Corrientes, Mburucuya	
	7803	Illinois, Chicago, Salt Creek	
	7996	Brasilien, Rio Grande do Sul, Pelotas	
	8411	Panama, Panama City	
	8621	Argentinien, Corrientes, Concepcion	
	8658	Argentinien, Corrientes, San Luis	
	8662	Argentinien, Corrientes, Empedrado	
	8699	Japan, Honshu	
	8701	Japan, Honshu	
	8800	Kalifornien, San Diego	
	8821	Argentinien, Formosa	
	8831	Argentinien, Formosa	
	8836	Argentinien, Chaco	
	8839	Argentinien, Corrientes	
	8843	Argentinien, Corrientes	
	8845	Brasilien, Rio de Janeiro	
	8880	Kalifornien, San Luis Obispo County	
	8900	Kalifornien, San Diego	
	<i>Lemna minuscula</i>	6584	Kalifornien, Alameda County
		6589	Kalifornien, San Joaquin County, Stockton
6600		Kalifornien, Mono County, Fales Hot Springs	
6711		Kalifornien, San Mateo County, La Honda	
6717		Guatemala, Chimaltenango, Chocoyas	
6726		Kalifornien, Kern County, Onyx	
7637		Washington State, Asontin County	
8022		Arkansas, Clarc County, Gurdon	
8065		Texas, Brazoria County, Old Ocean	
8686		Chile, Valdivia	
8739		Argentinien, Rio Negro	
8804		Argentinien, Chaco	
8810		Argentinien, Buenos Aires	
8819		Argentinien, Formosa	
8835		Argentinien, Chaco	
8857		Kalifornien, San Luis Obispo County	
8860		Kalifornien, San Diego	
8879		Kalifornien, San Luis Obispo County	
8899		Chile	
<i>Wolffiella hyalina</i>		7376	Ägypten, Mahallet, El Qubba
	7378	Ägypten, Hatr Shoukr	
<i>Wolffiella neotropica</i>	7225	Brasilien, Guanabara, Rio de Janeiro	
<i>Wolffiella oblonga</i>	7167	Louisiana, St. Charles Par., Norco	
<i>Wolffiella gladiata</i>	7173	Washington State, Pierce County, Tacoma	
<i>Wolffia brasiliensis</i>	7306a	Mexiko, Mexico City, Mixquic	
	7663	Mexiko, Hidalgo, 110 km nördl. von Mexico City	
<i>Wolffia angusta</i>	7274	Australien, New South Wales, Newcastle	
	7476	Australien, Victoria, Shepparton, Bunbartha	
<i>Wolffia arrhiza</i>	7014	Deutschland, Niedersachsen, Danneberg	
	7421	Yugoslavien, Kroatien, Zagreb, Bot. Garten	
<i>Wolffia columbiana</i>	7795	Michigan, Ingham County, East Lansing	

Tab. 2. Zusammensetzung der verwendeten Nährlösungen [mg/l].
Composition of nutrient solutions [mg/l].

Substanzen	Hillman	Hutner 1/10
KNO ₃	1515	—
NH ₄ NO ₃	—	20
KH ₂ PO ₄	680	—
K ₂ HPO ₄	—	40
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	1180	35.4
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	492	50
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	5.4	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	—	2.5
MnCl ₂	3.7	1.8
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.22	6.6
H ₃ BO ₃	2.9	1.4
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.12	2.5
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.48	0.39
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	—	0.02
C ₄ H ₆ O ₆	3	—
Na ₂ -Salz von EDTA	—	50

sowie von HILLMAN (1961) in leicht veränderter Form verwendet. Die beiden Nährmedien unterscheiden sich im wesentlichen im Nitrat-, Phosphat- und Sulphatgehalt. Die genaue Zusammensetzung ist aus Tab. 2 ersichtlich. Es wurden sowohl wässrige Lösungen wie auch Agarmedien (2% Pulveragar, Merck) verwendet. Die Agarmedien enthalten zusätzlich 0.6 g/l Casamino Acid Extract und 0.1 g/l Bacto Yeast Extract (beide Difco Laboratories). Ausser in speziellen Fällen wurde den Nährmedien 1% Saccharose beigefügt. Die Sterilisation erfolgte sodann durch Autoklavieren während 20 Minuten bei 120°C. Der pH-Wert wurde vor der Hitzesterilisation mit Salzsäure und Kalilauge auf 5.5 eingestellt; doch weist LÜÖND (1983) darauf hin, dass durch das Autoklavieren der pH-Wert der Hutner-Nährlösung bis zu einer Einheit steigen kann. Da diese Werte für die meisten Arten noch im optimalen Bereich liegen, ist dadurch keine Beeinträchtigung des Wachstums zu befürchten. Für die Untersuchungen wurden im allgemeinen Pflanzen aus saccharosehaltigen Hillman-Agarkulturen (Schrägagarröhrchen) verwendet. Wenn nicht genügend Anfangsmaterial zur Verfügung stand, mussten die Pflanzen zuerst auf Hutner-Nährlösung in Erlenmeyerkolben vermehrt werden. Nach dem Experiment wurden die Proben in Reagenzröhrchen, meist auf saccharosehaltiger Hutner-Nährlösung, weiterkultiviert. Abweichende Kulturbedingungen finden

in den entsprechenden Kapiteln eine spezielle Erwähnung.

Die Kulturen wurden im Labor unter einer 40 Watt Leuchtstoffröhre (Osram L 25, universalweiss, respektive Philips TLM 33 RS, weiss) im Abstand von 20 bis 25 cm gehalten. Die Lichtintensität, gemessen in einer Entfernung von 22 cm mit einem Quantenfühler und einem Photometer von Li-Cor Inc. (LI-185B), betrug in der Mitte der Leuchtstoffröhre 38 bis 41 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (2650 bis 2900 Lux), an den Enden noch 19 bis 21 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (1250 bis 1400 Lux). Es gilt jedoch zu beachten, dass die für die Pflanzen verfügbare Lichtmenge wegen der Glaswand der Kulturgefässe geringer war. Ein merklicher Unterschied bezüglich Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb einer Art konnte trotz der unterschiedlichen Lichtverhältnisse nicht festgestellt werden. Dies ist in erster Linie auf die fast ausnahmslose Verwendung saccharosehaltiger Kulturmedien zurückzuführen. Die Leuchtstoffröhren waren täglich während zwölf Stunden (07.00 bis 19.00 Uhr, Winterzeit) in Betrieb. Im Sommerhalbjahr war die Lichtdauer länger, da einfallendes Sonnenlicht durch die Laborfenster den Raum zusätzlich erhellte. Da die Kulturen sehr weit vom Fenster entfernt waren, dürfte dieser Einfluss eher gering sein. Die Temperatur betrug nachts etwa 20°C und stieg tagsüber durch die Erwärmung der Leuchtstoffröhren auf 26 bis 30°C an.

2.4. GEWINNUNG VON TURIONEN UND SAMEN

Für die Gefrierversuche wurden Turionen von *Spirodela polyrrhiza* verwendet. Der dafür ausgewählte Stamm 7344 bildet ohne spezielle Kulturbedingungen diese Überdauerungsorgane, sobald die Nährstoffe knapp werden. Es handelt sich dabei um den Typ der braunen Turionen, welche von SIBASAKI und ODA (1979) als "alte Turionen" bezeichnet werden. Der Vorteil dieses Typs besteht darin, dass er keine obligate Ruhepause benötigt und bei genügend hohem Nitratgehalt, unabhängig von der Lichtintensität, rasch auskeimt.

Die verwendeten Samen stammten von *Lemna aequinoctialis*. Der gebrauchte Stamm 6746 blüht im Labor spontan und es entwickeln sich auch bei Selbstbestäubung sehr viele Samen, sofern die Kulturen während dem Blühen hie und da leicht geschwenkt werden. HILLMAN (1975) konnte zeigen, dass dieser Stamm heterozygot ist. *Lemna aequinoctialis*-Samen sind befähigt, ohne vorangegangene Kühlphase unmittelbar nach der Reife auszukeimen. Beide Stämme wurden in 500 ml Erlenmeyer auf saccharosehaltiger Hutner-

Nährlösung gezüchtet. Da sowohl Turionen wie auch Samen auf den Grund sinken, konnten sie nicht abgeimpft werden, sodass für deren Verwendung der ganze Inhalt steril abfiltriert werden musste. Als Filter wurde eine Nylon-Gaze (Nybolt) verwendet, bei welcher die Nährlösung, trotz der engen Maschenweite von 100 µm, sehr rasch abfließt. Einfrierversuche wurden auf die gleiche Weise durchgeführt, wie dies im folgenden Kapitel für ganze Pflanzen beschrieben ist.

2.5. KRYOKONSERVIERUNG DER *LEMNACEAE*

Das Vorgehen umfasst die nachfolgenden fünf Teilschritte:

- Gefrierschutzmittelzugabe
- Einwirkung der Mittel auf die Pflanzen
- Einfrieren
- Lagerung
- Auftauen der Proben und Entfernung der Gefrierschutzmittel

Gefrierschutzmittelzugabe

Die verwendeten Pflanzen stammten aus Kulturen, deren Agaroberfläche beziehungsweise Nährlösungsoberfläche vollständig bewachsen war. Für die meisten Arten war dies nach 30 bis 60 Tagen der Fall; Flüssigkulturen fanden nach 21 Tagen Verwendung. Die Pflanzen wurden steril in Polypropylenröhrchen (Nunc-Kryoröhrchen, 1.8 ml) abgeimpft, die 1 ml Gefrierschutzmittel enthielten. Je nach Grösse der betreffenden Art wurden die Röhrchen mit 15 bis 60 Gliedern gefüllt, bei *Wolffioideae*-Arten war die Anzahl noch erheblich grösser. Als Gefrierschutzmittel wurden Dimethylsulfoxid (DMSO, puriss.), D(+)-Glukose (wasserfrei), Glycerin (wasserfrei, puriss.) und Polyvinylpyrrolidon (PVP K30, pract.) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von rund 40 kDa. (alle von Fluka AG) erprobt. Die Substanzen wurden einzeln oder in Kombination als wässrige Lösungen verwendet. Konzentrationsangaben sind bei Glycerin enthaltenden Gefrierschutzmittel in Volumenprozenten, bei den übrigen Lösungen in Gewichtsprozenten ausgedrückt. Die mit Gefrierschutzmittel abgefüllten Nunc-Röhrchen wurden anschliessend autoklaviert. Durch die Hitzesterilisation wurde bewusst eine geringe Änderung des Mischverhältnisses in Kauf genommen. Damit ein vollständiges Eintauchen der Pflanzen sichergestellt war, wurden sie mit einem Stempel unter die Gefrierschutzmitteloberfläche gedrückt. Dieser besteht aus einem runden

Drahtgitter (Maschenweite 0.3 mm), dessen Durchmesser jenem des Innenrandes der Kryoröhrchen entspricht, und einem etwa 2.5 cm langen Kunststoffstiel, der durch Erhitzen des einen Endes an das Drahtgitter "geklebt" wird. Da diese Kunststoffstiele, die üblicherweise für Eis am Stiel verwendet werden, nicht besonders hitzebeständig sind, wurden die Stempel zur Sterilisation mehrere Tage lang in Plastik-Petrischalen mit einer Ultraviolett-Leuchtstoffröhre (Philips TUV, 15 Watt/29) bestrahlt.

Einwirkung der Mittel auf die Pflanzen

Gefrierschutzmittel haben oft verschiedene Wirkungsweisen, die zum Teil erst nach längerer Einwirkung einen wirkungsvollen Schutz bieten. Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte aus diesem Grund stets einige Minuten bis mehrere Stunden vor dem eigentlichen Einfrieren. Der ganze Vorgang erfolg-

Tab. 3. Beschreibung der verwendeten Kühlprogramme.

Description of freezing programs.

T_V = Vorkühltemperatur [°C] – *prefreezing temperature* [°C], t_V = Zeitdauer der Ausgleichsphase [Min.] – *time of annealing at the prefreezing temperature* [min], R_V = Kühlrate der Vorkühlung [°C/Min.] – *cooling rate of prefreezing* [°C/min], R_K = Kühlrate der Kühlphase [°C/Min.] – *cooling rate of freezing* [°C/min], CR_t = durchschnittliche Kühlrate für den theoretischen Kristallwachstumsbereich (Schmelztemperatur bis Glasbildungstemperatur) von Wasser ($CR_{t,1}$) und einer wässrigen 50% Glycerinlösung ($CR_{t,2}$) [°C/Min.], berechnet nach HAYES et al. (1984) – *average cooling rate in the range of possible crystal growth (melting temperature to glassforming temperature) of water ($CR_{t,1}$) and a 50% aqueous glycerol solution ($CR_{t,2}$), according to HAYES et al. (1984)*. Die Vorkühlung beginnt immer nach einer 15-minütigen Equilibriumszeit bei 0°C. – *Prefreezing starts always after a 15 minute equilibration at 0°C.*

Programm	T_V	t_V	R_V	R_K	$CR_{t,1}$	$CR_{t,2}$
T-13/1	-13	10	-1.00	-10	-3.92	-10.00
T-25/1a	-25	10	-1.00	-10	-3.01	-10.00
T-25/1b	-25	90	-1.00	-10	-0.61	-10.00
T-30/1	-30	10	-1.00	-10	-2.75	-4.30
T-35/1	-35	10	-1.00	-10	-2.52	-3.53
T-37/1	-37	10	-1.00	-10	-2.44	-3.30
T-40/1	-40	10	-1.00	-10	-2.33	-3.00
T-45/1	-45	10	-1.00	-10	-2.17	-2.60
T-50/1	-50	10	-1.00	-10	-2.03	-2.30
T-75/1	-75	10	-1.00	-10	-1.53	-1.45
T-100/1	-100	10	-1.00	-10	-1.23	-1.06
T-125/1	-125	10	-1.00	-10	-1.11	-1.00
T-125/1.25	-125	0	-1.25	-10	-1.38	-1.25
T-125/1.79	-125	0	-1.79	-10	-1.96	-1.79
T-125/3.13	-125	0	-3.13	-10	-3.37	-3.13
T-125/10	-125	0	-10.00	-10	-10.00	-10.00

te bei Zimmertemperatur. In Figuren und Tabellen wurde die Einwirkungszeit der Gefrierschutzmittel jeweils als EWZ abgekürzt.

Einfrieren

Die nachfolgenden drei Gefriermethoden fanden Anwendung:

- Langsames, kontrolliertes Einfrieren mit einem programmierbaren Gefrierapparat: Dazu wurde ein mit einem Mikroprozessor (Mic 15) ausgerüstetes Gefriergerät (BV 6) von Cryoson Ireland Ltd. benutzt. Die Kühlung erfolgte mit flüssigem Stickstoff, der unter Druck steht und beim Öffnen eines Ventils in die Kühlkammer eingespritzt wird, wo er sofort verdampft. Die Einspritzmenge wird durch den Mikroprozessor anhand der eingegebenen Daten und der mit einem Fühler gemessenen Temperatur der Kühlkammer bestimmt. Die Proben wurden möglichst rasch auf 0°C gekühlt und nach einer Equilibriumsphase mit diversen Programmen, die in Tab. 3 beschrieben sind, auf -150°C hinuntergekühlt. Das weitaus am häufigsten benutzte Kühlprogramm ist in Fig. 4 schematisch dargestellt. Sofern nichts weiter bemerkt ist, wurde bei Einfrierexperimenten mit dem Gefrierapparat stets dieses Programm (T-25/1a) verwendet.
- Rasches Einfrieren: Die Proben wurden in den Kryoröhrchen direkt in flüssigen Stickstoff getaucht.
- Ultraschnelles Tiefkühlen in flüssigem Freon: Verwendet wurde Freon 22,

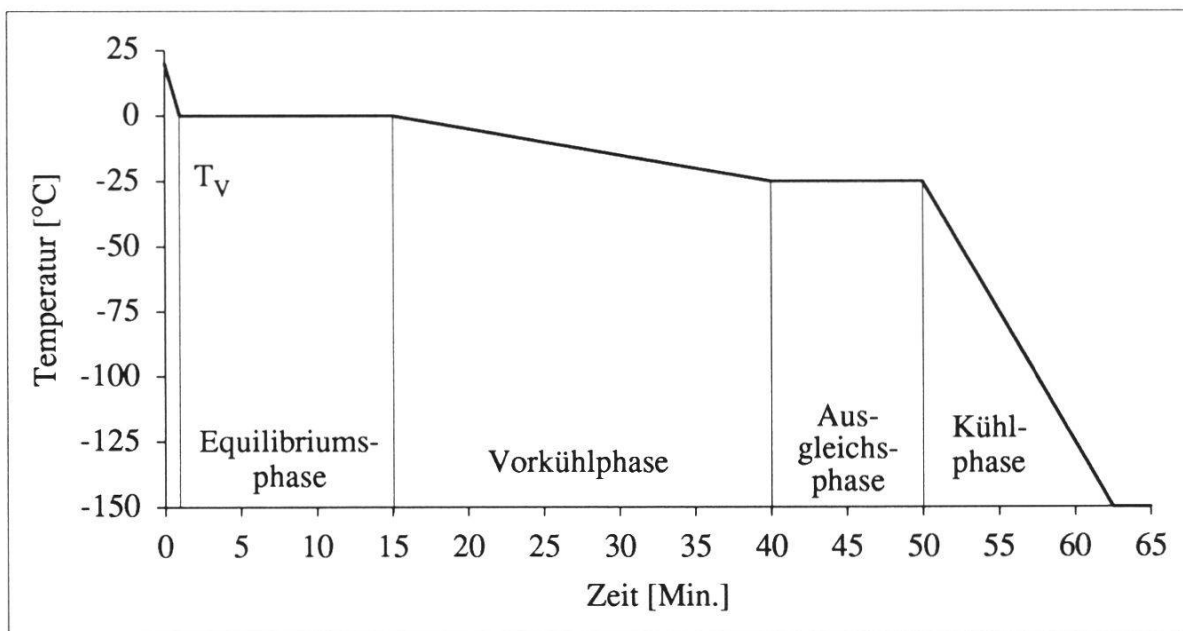


Fig. 4. Schematische Darstellung eines Gefrierprogramms (Beispiel T-25/1a).
Scheme of a freezing program (for example T-25/1a).

das in einem sterilen Metallzylinder mit flüssigem Stickstoff beinahe bis zum Gefrierpunkt (ca. -150°C) gekühlt wurde. Dadurch kann beim Eintauchen der Proben der Leidenfrostsche Effekt umgangen werden. Jener entsteht beispielsweise in flüssigem Stickstoff, wenn die Wärmeabfuhr durch Bildung einer Gasschicht um die eingetauchten Objekte verzögert wird. Eine weitere Beschleunigung der Temperaturabsenkung konnte erreicht werden, indem die Proben ohne Kryoröhrchen in einer geringen Menge des entsprechenden Gefrierschutzmittels tiefgefroren wurden. Nach erfolgter Gefrierschutzmitteleinwirkung wurden die Pflanzen mit einer grossen Öse (Durchmesser ca. 5 mm) aus den Kryoröhrchen abgeimpft. Dabei kamen die Pflanzen in einen Gefrierschutzmitteltropfen zu liegen und konnten darin durch direktes Eintauchen der Öse in das Freon eingefroren werden.

Lagerung

Die in Kryoröhrchen tiefgefrorenen Proben wurden für mindestens 15 Stunden in einem Stickstoffbehälter von Tylor-Wharton (34 HC) aufbewahrt. Die in flüssigem Freon eingefrorenen Pflanzen wurden aus praktischen Gründen nach 30 Sekunden wiederum aufgetaut.

Auftauen und Entfernen der Gefrierschutzmittel

Die Kryoröhrchen wurden in einem auf 30°C erwärmten Wasserbad aufgetaut. Nach ungefähr zwei Minuten war jegliches Eis geschmolzen und der Inhalt konnte in ein etwa 12 ml steriles Leitungswasser enthaltendes Reagenzröhrchen geleert werden. Die in flüssigem Freon tiefgefrorenen Proben wurden durch direktes Eintauchen der Öse in das ungefähr 20°C warme Leitungswasser aufgetaut. Die verwendeten Gefrierschutzmittel waren durchwegs wasserlöslich und konnten daher leicht abgespült werden. Nach ungefähr einer Stunde wurden die Pflanzen auf die zur Weiterzucht bestimmten Nährlösungen übertragen.

2.6. ANFERTIGUNG TRANSPARENTER GLIEDER

Die innere Struktur der Glieder kann durch Bleichen und anschliessendes Färben der Zellen sichtbar gemacht werden. Da bei der Kryokonservierung von *Lemnaceae* die Anzahl vorhandener Knospen eine wichtige Rolle spielen dürfte (siehe Kap. 3.1), wurden zu deren Auszählung transparente Gliedpräparate von verschiedenen Arten angefertigt. Die Herstellung erfolgte nach

dem folgenden, in LANDOLT (1986) beschriebenen Verfahren, welches gewisse Abänderungen erfuhr:

Die Glieder wurden für zwei bis drei Minuten in 70% Äthylalkohol gekocht und danach, je nach Art, während zwei bis vier Minuten in unverdünntem Javellewasser zu Ende gebleicht. Hinterher wurden die Glieder in zehnfach verdünntes Javellewasser gegeben, das zwei Tropfen (Pasteurpipette) des Netzmittels Etalfix (Maag) pro Milliliter Lösung enthielt. Darin fand während 15 bis 20 Minuten unter dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe eine Entlüftung statt. Nach gründlichem Spülvorgang wurden die Glieder während vier Stunden mit Grenachers Karminrot gefärbt, das durch Kochen einer 10 g/l Karminrot (Fluka) und 50 g/l $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ (Bender & Hobein AG) enthaltenden wässrigen Lösung im Rückflusskühler gewonnen wird. Nach erneutem Spülen können die Glieder als Laktophenolpräparate unter dem Binokular betrachtet werden. Da der Farbstoff lediglich die Zellwände färbt, erscheinen junge Tochterglieder, welche aus kleinen, dichtgepackten Zellen aufgebaut sind, dunkelrot, während die grösseren Zellen des Parenchyms und der Epidermis nur wenig angefärbt sind.

2.7. OSMOLALITÄTSMESSUNGEN

Ein geringer Wassergehalt sowie ein hoher Gehalt an zelleigenen Zuckern und Aminosäuren kann für das Überleben der Pflanzen bei tiefen Temperaturen sehr wichtig sein. Um diesbezüglich einen Anhaltspunkt zu erhalten, wurde die Osmolalität der Zellsäfte verschiedener Arten und Stämme bestimmt. Als Vergleich wurden die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Gefrierschutzmittel ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Messungen erfolgten mit einem Dampfdruckosmometer von Wescor Inc. (Modell 5100 C).

Um die Osmolalität der Pflanzensäfte messen zu können, bedurfte es der Herstellung eines sogenannten Kryosafts. Zur Gewinnung dieses Zellsafts mussten die Zellstrukturen zerstört werden. Dies geschah durch kurzes Einfrieren der Pflanzen, die zuvor in mit einem Glasfilter versehenen Kunststoffspritzen abgefüllt worden waren, in flüssigem Stickstoff. Nach einer kurzen Wartezeit, während der die Pflanzen aufzutauen beginnen, wurde der Kryosaft mit rund 2500g bei 4°C während 15 Minuten abzentrifugiert. Der Kryosaft dringt hierbei durch den Glasfilter hindurch und wird in einem an die Spritzenspitze aufgesteckten Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt.

Die Gefrierschutzmittel konnten nur in verdünntem Zustand gemessen werden, da andernfalls der Messbereich des Geräts (0 bis 2000 mMol/kg), ausser bei der PVP-Lösung, bei weitem überschritten worden wäre. Die PVP-Lösung musste gleichermassen verdünnt werden, da sie zu dickflüssig war. Sämtliche Messungen wurden deshalb mit den fünffach verdünnten Lösungen durchgeführt. Die osmotische Wirksamkeit der Gefrierschutzlösungen konnte somit aufgrund der Messungen und einiger Literaturangaben lediglich geschätzt werden.

2.8. STATISTISCHE UND GRAPHISCHE AUSWERTUNGEN

Wie aus Kap. 3.1 hervorgeht, entwickeln sich nicht alle überlebenden Knospen zu normal aussehenden, für eine Weiterkultivierung verwendbare Pflanzen. Aus diesem Grund wurden für die quantitative Auswertung die folgenden zwei Überlebensraten definiert:

1. $\dot{U}R_{10d}$ = Anzahl überlebende Knospen/Anzahl Mutterglieder [K/MG]
2. $\dot{U}R_{30d}$ = Anzahl ausgewachsene Tochterglieder der ersten Generation/Anzahl Mutterglieder [TG/MG]

Die erste Überlebensrate wurde nach zehn, die zweite nach 30 Tagen erhoben. Glieder, die unmittelbar nach dem Versuch mindestens zur Hälfte aus der Gliedtasche herausragten, wurden als Mutterglieder gewertet, alle jüngeren Glieder als Tochterglieder respektive Knospen. Als überlebende Knospen galten jene, die zehn Tage nach dem Versuch noch deutlich grün waren. Für die zweite Überlebensrate wurden nur noch jene Knospen gezählt, die zu normal aussehenden, ein- bis mehrgliedrigen Pflanzen ausgewachsen waren. Verkrüppelte, kallusierete oder sukkulente Exemplare fanden keine Berücksichtigung mehr. Für die Ermittlung der Überlebensraten wurden meist zehn bis 15 Proben (eine Probe entspricht dem Pflanzenmaterial aus einem Kryoröhrchen) ausgewertet. In graphischen Darstellungen wurde im allgemeinen lediglich der Wert der zweiten Überlebensrate ($\dot{U}R_{30d}$) berücksichtigt. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die Überlebensraten der einzelnen Proben und sind somit unabhängig von der Anzahl getesteter Glieder. In den meisten Fällen wurden Säulendiagramme gewählt. Nullwerte sind dort als kleine, unter die Kategorienachse ragende Säulen hervorgehoben. In den Figuren 8a-f wurden Kurvendiagramme verwendet. Dort wurde der Einfluss wässriger Glycerinlösungen verschiedener Konzentrationen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit auf die Überlebensrate von *Lemna minor* darge-

stellt. Durch die in Experimenten ermittelten Werte wurde ein Polynom 3. oder 2. Grades gelegt, das die Überlebensrate für jede beliebige Einwirkungszeit angenähert wiedergibt. Bei der Formel

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d$$

bedeuten y die Überlebensrate und x der Logarithmus der Einwirkungszeit. Verschiedene Einfrier- und Auftauvorgänge wurden mit einem Schreiber von W + W electronic AG (Model 302 und 1100) aufgezeichnet. Dazu wurde die Temperatur der Gefrierschutzlösung mit einem Kupfer-Konstatinfühler gemessen, der durch ein enges Loch im Deckel eines Kryoröhrchens in die Lösung eingeführt werden konnte. Die Empfindlichkeit des Geräts war auf 10 mV eingestellt. Die so erhaltenen Kurven wurden ausgemessen und mit einem Computergraphikprogramm neu gezeichnet. Bei in Luft von -20°C langsam aufgetauten Proben wurde die Temperatur lediglich mit einem Digitalthermometer (Doric, Serie 400) registriert. Alle zehn Sekunden fand eine Ablesung statt, und anhand dieser Werte wurde mit dem gleichen Computerprogramm eine Auftaukurve gezeichnet.