

Kryokonservierung von "Lemnaceae" = Cryopreservation of "Lemnaceae"

Autor(en): **Sauter, Peter Richard**

Objektyp: **Article**

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

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

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308976>

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.

Kryokonservierung von *Lemnaceae*

Cryopreservation of *Lemnaceae*

Peter Richard SAUTER

1993

INHALTSVERZEICHNIS

	Vorwort	5
1.	Einleitung	6
1.1.	Problemstellung	6
1.2.	Physikalisches Verhalten wässriger Lösungen bei tiefen Temperaturen	8
1.3.	Zellschädigung bei tiefen Temperaturen und natürliche Frostresistenz	11
1.4.	Die Kryokonservierung	14
1.5.	Stand der Forschung in der Pflanzenkryokonservierung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Die Familie der <i>Lemnaceae</i>	19
2.2.	Verwendete Arten und Stämme	22
2.3.	Sterilisation und Kultivierung der Pflanzen	22
2.4.	Gewinnung von Turionen und Samen	26
2.5.	Kryokonservierung der <i>Lemnaceae</i>	27
2.6.	Anfertigung transparenter Gliedpräparate	30
2.7.	Osmolalitätsmessungen	31
2.8.	Statistische und graphische Auswertungen	32
3.	Resultate	34
3.1.	Morphologische Beobachtungen	34
3.2.	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Überlebensrate von <i>Lemna minor</i>	39
3.2.1.	Wirkung verschiedener Gefrierschutzmittel in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungszeit	40
3.2.2.	Einfluss von Vorkühlung, Kühlrate und Auftaugeschwindigkeit	48
3.2.3.	Einfluss der verwendeten Kulturmedien	53
3.2.4.	Einfluss des Kulturalters	58
3.2.5.	Stickstofflagerung über längere Zeiträume	60
3.3.	Anwendung vielversprechender Methoden bei verschiedenen Arten und Stämmen	61
3.3.1.	Testung sämtlicher <i>Lemnoideae</i> -Arten	61
3.3.2.	Methodische Abänderungen bei vier Arten	67
3.3.3.	Versuche mit <i>Wolffioideae</i> -Arten	78
3.4.	Kryokonservierung von <i>Spirodela polyrrhiza</i> -Turionen und <i>Lemna aequinoctialis</i> -Samen	80
3.5.	Anzahl vorhandener Tochterglieder pro Mutterglied einiger Arten	83
3.6.	Osmolalität von Kryosäften einiger <i>Lemnaceae</i> -Arten und von Gefrierschutzmitteln	86
3.7.	Physikalische Eigenschaften verwendeter Gefrierschutzlösungen	91
4.	Diskussion	107
4.1.	Mögliche Wirkungsweisen extra- und intrazellulärer Komponenten	107
4.2.	Schadigungsgrad der überlebenden Zellen	113
4.3.	Vergleich der Gefrierresistenz von Arten und Stämmen (<i>Lemnoideae</i>)	114
4.4.	Methodische Änderungen, welche die Überlebensrate verschiedener Arten erhöhen könnten	115
4.5.	Eignung der Kryokonservierung für <i>Lemnaceae</i>	119
	Zusammenfassung – Summary	121
	Literaturverzeichnis	124

VORWORT

Die vorliegende Dissertation entstand in den Jahren 1987 bis 1992. Finanziert wurde sie durch Beiträge des Nationalfonds und der Stiftung Rübel des Geobotanischen Institutes.

Mein erster Dank gilt dem Leiter dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. E. LANDOLT, der meine Fragen über *Lemnaceae* stets fachkundig beantworten konnte. Weitere wichtige Informationen bekam ich von Frau A. HEGI, die mir ihre langjährigen Zuchterfahrungen weitervermittelte sowie die Stempel für die Kryoröhrchen entwarf und herstellte. Dafür und für die Beschriftung der Tuschzeichnung möchte ich ihr herzlich danken. Herrn Prof. Dr. H.-R. HOHL gebührt für die Mitbetreuung der Arbeit und die fachliche Beratung im Bereich der Zell- und Kryobiologie ein besonderer Dank. Sehr wertvoll waren für mich auch die anregenden Gespräche mit Frau Dr. B. DIETRICH während ihres Aufenthaltes am Institut für Pflanzenbiologie. Für die Weitergabe ihres umfangreichen Wissens auf dem Gebiet der Kryobiologie möchte ich ihr meinen herzlichen Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, und des Geobotanischen Institutes (ETH Zürich) bedanken, die mich mit Rat und Tat bei den Laboruntersuchungen unterstützten. Namentlich aufgeführt seien Frau S. BALSIGER, die mich in die Methodik der Kryobiologie einführte, sowie Frau H. GREUTERT und Herr M. BACHMANN, die mir bei den Osmolalitätsmessungen stets hilfsbereit zur Seite standen. Für die fachkundige Beratung im fototechnischen Bereich möchte ich mich bei Frau M. PRÖSCHEL und Herrn R. GRAF bedanken. Gedankt sei auch Herrn J.-J. PITTET für die spontane Hilfeleistung bei technischen Problemen aller Art.

Für die kritische Durchsicht der Manuskripte und Korrekturen der englischen Texte möchte ich mich ganz herzlich bei Frau A. LEISER, Herrn Dr. K. CROFT sowie bei den Herren Professoren H.-R. HOHL, E. LANDOLT und A. SLUSARENKO bedanken. Einen speziellen Dank schulde ich Herrn H.-R. BINZ für die Herstellung der Computerprogramme für einen Grossteil der graphischen Darstellungen. Frau A. HONEGGER (Redaktion), Frau R. MÜLLER und Herr B. GRIESSER halfen mir in verdankenswerter Weise bei der Lösung von Computerproblemen.

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

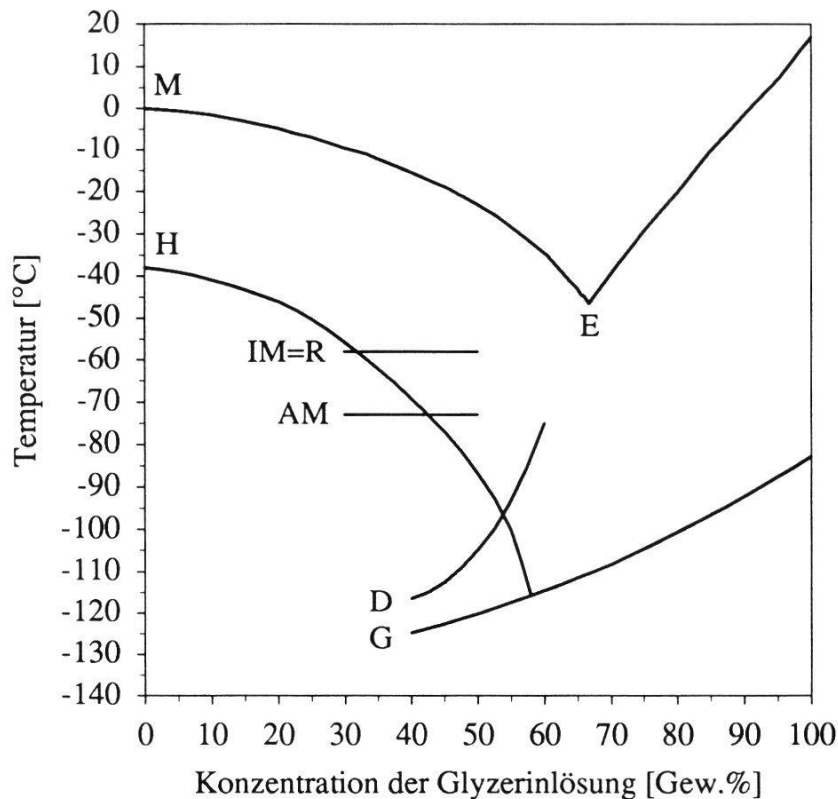


Fig. 1. Phasendiagramm wässriger Glycerinlösungen in Konzentrationen von 0-100%. Die Daten sind den Arbeiten von LANE (1925), LUYET (1970) und FAHY et al. (1984) entnommen.

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 Schmelzbegins 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 Einfriereschwindigkeit 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.

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

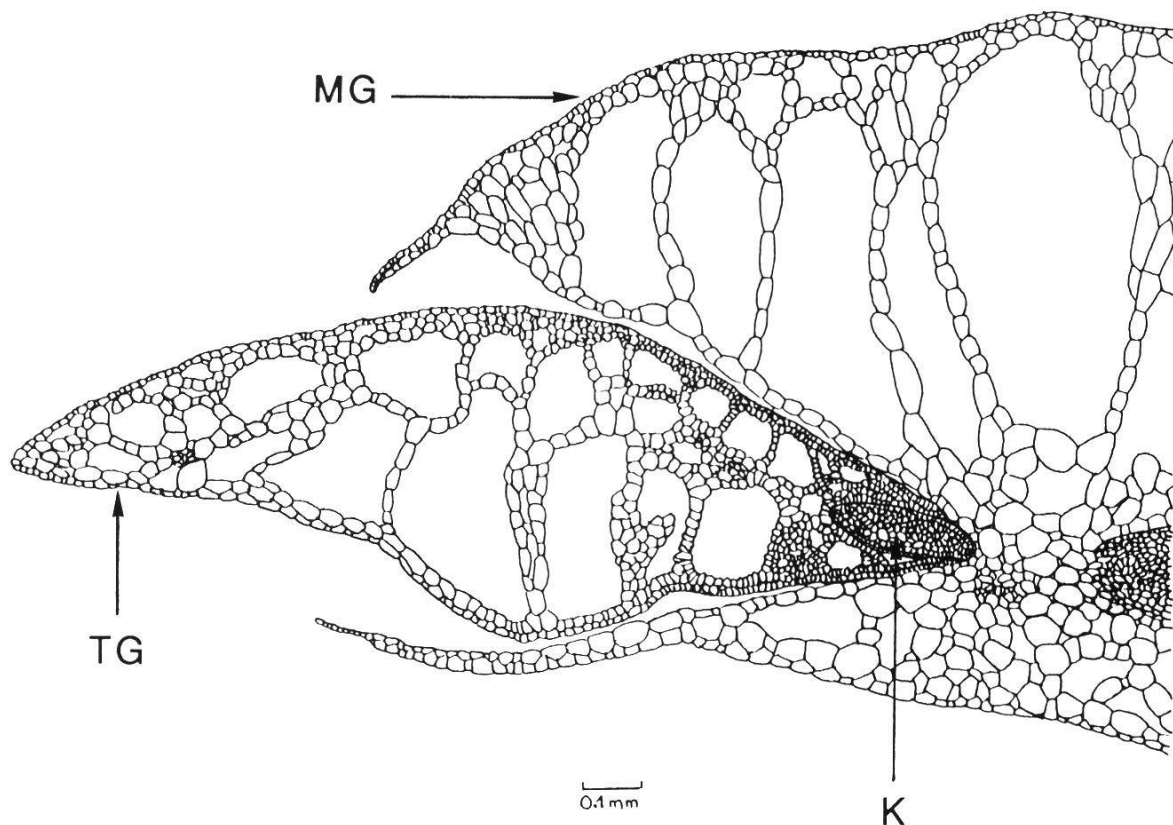


Fig. 2. Querschnitt von *Lemna gibba*-Gliedern (EFRAT et al. 1977) aus LANDOLT (1986).
Transverse section of Lemna gibba fronds (EFRAT et al. 1977) drawn from LANDOLT (1986).
MG = Mutterglied – *mother frond*, TG = Tochterglied der ersten Generation – *daughter frond of the first generation*, K = Knospe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

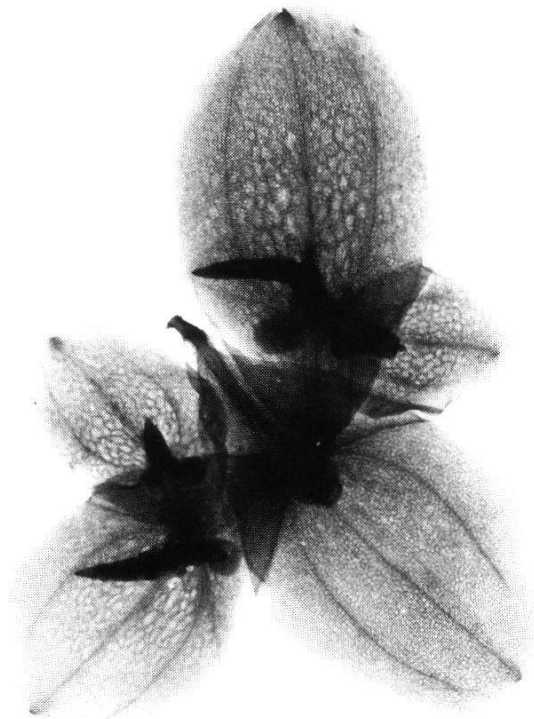


Fig. 3. Transparentes Gliedpräparat von *Lemna aequinoctialis* (aus LANDOLT 1986). Die Knospen befinden sich im basalen Gliedteil, neben der Wurzelansatzstelle.
Transparent frond slide of Lemna aequinoctialis drawn from LANDOLT (1986). Buds are located in the basal part of the frond beside the point 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,

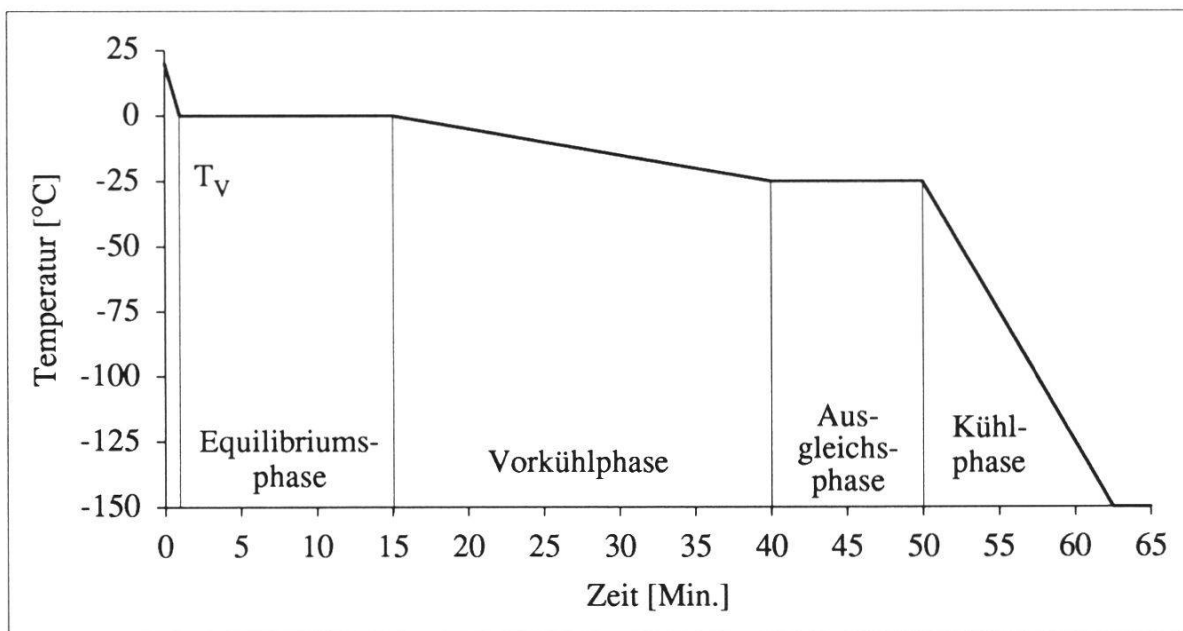


Fig. 4. Schematische Darstellung eines Gefrierprogramms (Beispiel T-25/1a).
Scheme of a freezing program (for example T-25/1a).

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.

3. RESULTATE

3.1. MORPHOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN

Bereits durch die Gefrierschutzmittelzugabe oder durch deren Entfernung werden alle Mutterglieder und Wurzeln abgetötet, was schon nach kurzer Einwirkungszeit der Fall ist. Es können lediglich Knospen und Tochterglieder während längerer Zeit überleben, wobei die aus den Gliedtaschen herausragenden Teile ebenfalls rasch absterben. Solange der basale Teil des Gliedes, der bekanntlich schon Knospen für die nächste Generation enthält, unbeschädigt bleibt, wachsen diese zu neuen Pflanzen aus. Die Gliedtaschen bieten somit einen guten Schutz gegen die Gefrierschutzmittel, die offenbar nur allmählich eindringen können. WILSON und ROBARDS (1980) stellten zudem fest, dass meristematische Wurzelzellen von *Hordeum vulgare* unter osmotischem Stress entschieden weniger stark schrumpfen als ausdifferenzierte Wurzelzellen. Es ist gut möglich, dass aus den gleichen Gründen die Knospen und jungen Tochterglieder durch die Gefrierschutzmittel weniger geschädigt werden. Für die *Lemnaceae*-Kryokonservierung bedeuten diese Beobachtungen, dass nur die unvollständig ausdifferenzierten Gewebe der Knospen und Tochterglieder lebend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden können. Das Auswachsen kryokonservierter Knospen nach dem Auftauen ist in Figur 5 dokumentiert.

Da nach den Versuchen die abgestorbenen Glieder nicht entfernt werden können, ist bei der Weiterzucht stets viel totes Material vorhanden. DIETRICH et al. (1982) bemerkten, dass bei *Digitalis*-Zellkulturen, welche nicht mindestens einen Anteil von 30% lebenden Zellen aufweisen, keine Zellvermehrung stattfindet. Bei *Lemnaceae* konnte diesbezüglich keine merkliche Beeinträchtigung festgestellt werden, da bei Arten, bei welchen nur vereinzelt Knospen die Gefrierversuche überleben, diese auswachsen und sich vermehren. Weitergehende Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt.

Überlebende Knospen beziehungsweise Tochterglieder wachsen oft nicht zur vollen Grösse aus (Fig. 6) und sterben teilweise relativ rasch ab, insbesondere auch jene, deren apikaler Teil abgetötet wurde. Dank einer raschen vegetativen Vermehrung der *Lemnaceae* gelingt es aber den meisten Knospen der zweiten Generation sich zu entwickeln, bevor das primär überlebende Glied abstirbt. Es wurde auch schon beobachtet, dass sehr stark beschädigte Tochterglieder ohne weiteres Wachstum nach wenigen Tagen abgestorben waren,

ihre Knospen aber trotzdem zu neuen Pflanzen auswachsen konnten. Viel häufiger kommt es allerdings in solchen Fällen zur Kallusbildung (vgl. mit nachfolgendem Abschnitt). Die Knospen von kryokonservierten Gliedern wachsen nach dem Auftauen durchschnittlich später aus als solche von mit dem entsprechenden Gefrierschutzmittel behandelten, jedoch nicht tiefgefrorenen Gliedern (Referenz). Die Gründe dafür wurden nicht weiter abgeklärt, es wäre aber durchaus denkbar, dass beim Tieffrieren oder Auftauen die älteren, weiter differenzierten Tochterglieder häufiger absterben. Somit würden die überlebenden Knospen ein niedrigeres Durchschnittsalter aufweisen, als jene aus entsprechenden Referenzversuchen. Andererseits muss auch in Betracht gezogen werden, dass aufgetaute Zellen zuerst eine Erholungsphase benötigen, um Zellschäden zu reparieren (FINKLE et al. 1985), bevor sie sich weiterentwickeln können. Solche Verzögerungsphasen kryokonservierter Proben konnten schon verschiedentlich bei Embryonen (BAJAJ 1984a, ZAVALA und SUSSEX 1986, CHIN et al. 1988, DEREUDDRE et al. 1991a), Vegetationsspitzen (TOWILL 1981, YAKUWA und OKA 1988) und Flüssigzellkulturen (LANGIS et al. 1989) beobachtet werden.

Nicht alle Knospen und Tochterglieder, die nach dem Auftauen noch leben, entwickeln sich weiter, oder es kommt zu Missbildungen mit anschliessendem Entwicklungsstillstand. Ähnliches mit meristematischen Geweben aus Vegetationsspitzen und Embryonen konstatierten auch BAJAJ (1984a), DIETRICH et al. (1987), ENGELMANN und DEREUDDRE (1988) sowie YAKUWA und OKA (1988), aber auch bei Zellkulturen scheint ein gewisser Prozentsatz der Zellen nach dem Auftauen noch abzusterben (PRITCHARD et al. 1986c). Bei *Lemnaceae* konnten folgende, durch die Kryokonservierung geschädigte Formen beobachtet werden, die in geringerem Mass bereits durch die Einwirkung der Gefrierschutzmittel hervorgerufen werden:

1. Junge, vor allem sehr kleine Knospen bleiben grün und sterben nach einer gewissen Zeit ohne sichtliches Wachstum ab.
2. Die Knospen wachsen zu einem Glied aus, das keine oder unförmige Tochterglieder bildet. Solche Exemplare sterben in der Regel spätestens nach einem Monat ab.
3. Es entstehen verkrüppelte, kallusförmige, ein- bis mehrgliedrige Pflanzen, die zu Boden sinken. Kallusbildung scheint bei der Kryokonservierung von Meristemgeweben häufig vorzukommen und wird dementsprechend öfters in der Literatur erwähnt, wie beispielsweise in GROUT et al. (1978), TOWILL (1983), HENSHAW et al. (1985a) oder REED (1988).
4. Es bilden sich fleischige, sukkulent aussehende Glieder, die keine Kutikula

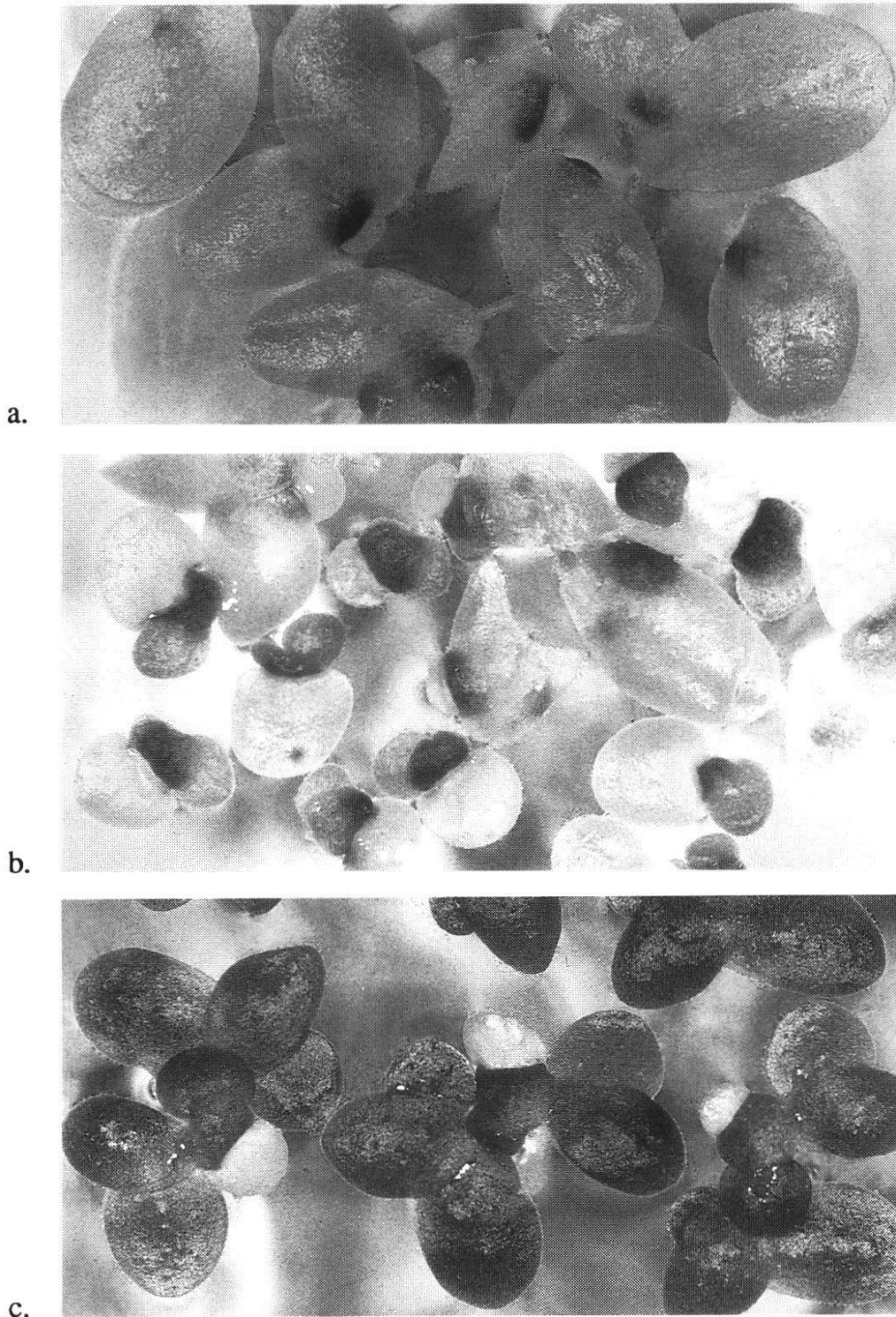


Fig. 5. Auswachsen überlebender Knospen von *Lemna minor* (Stamm 8765) nach dem Auftauen.

Growth of cryopreserved buds of Lemna minor (clone 8765) after thawing.

- a. Einige Tage nach dem Auftauen sind die toten Mutterglieder verblasst und die überlebenden Knospen als dunkle Punkte sichtbar.
A few days after thawing the mother fronds are pale whereas the surviving buds are visible as dark points.
- b. Die überlebenden Knospen beginnen auszuwachsen. – *Surviving buds are growing.*
- c. Aus Knospen neugebildete Pflanzen. Die primär überlebenden Tochterglieder sind oft am abgestorbenen Apikalteil zu erkennen.
Plants reproduced from buds. Primery surviving daughter fronds can be recognized often by their dead apical part.

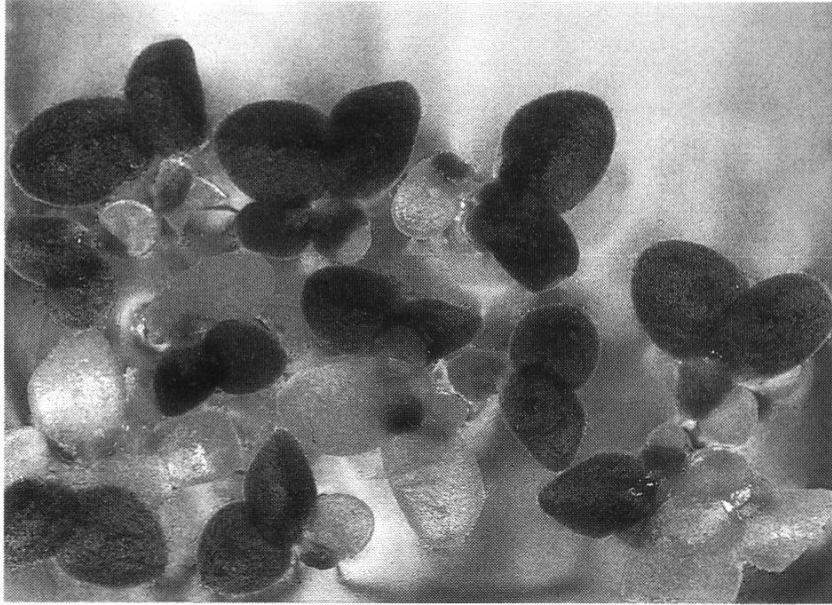


Fig. 6. Frisch ausgewachsene *Lemna japonica*-Pflanzen (Stamm 8339) nach dem Auftauen: Das primär auswachsende Tochterglied bleibt oft deutlich kleiner als die Glieder nachfolgender Generationen.

Lemna japonica plants (clone 8339) newly formed after thawing: The primary surviving daughter frond is often clearly smaller in size than fronds of the following generations.

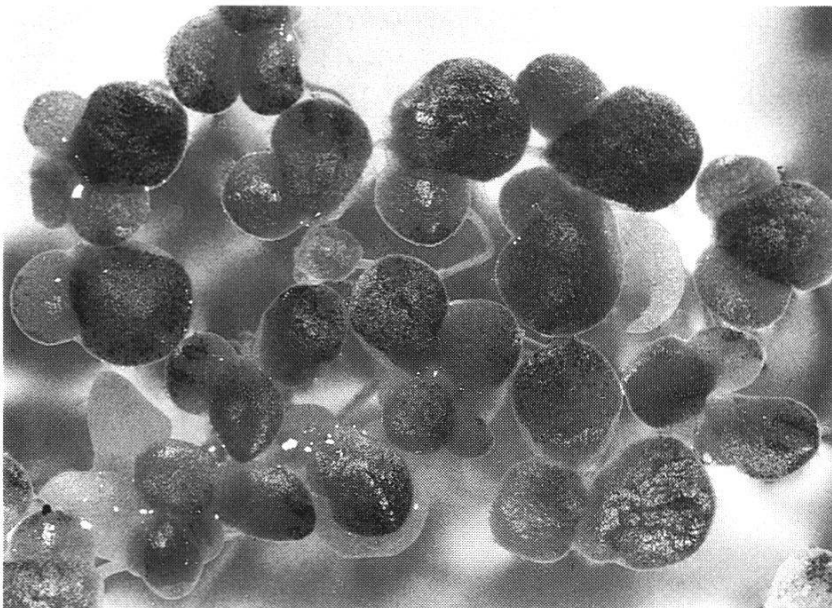


Fig. 7. Anthozyanbildung bei *Lemna gibba*-Pflanzen (Stamm 7262), 30 Tage nach dem Auftauen. Die roten Pigmente sind als dunkle Punkte erkennbar.

Anthocyanin production by *Lemna gibba* plants (clone 7262), 30 days after thawing. Red pigments can be recognized as dark points.

aufweisen. Aus diesen Gliedern wachsen Tochterglieder, die ebenfalls oft von sukkulenter Gestalt sind, in wenigen Fällen aber normal aussehen und mit einer Kutikula versehen sind. DIETRICH et al. (1987) stellten bei der Kryokonservierung von *Digitalis*-Vegetationsspitzen gleichermassen Sukkulenz fest. Sie vertreten die Meinung, dass es sich bei ihren Kulturen nicht um Gefrierschäden handelt, da Sukkulenz allgemein bei der Kultivierung von Meristemgeweben auf halbflüssigen Medien auftritt (LESHAM 1983, ZIV et al. 1983, VON ARNOLD und ERIKSSON 1984). Für *Lemnaceae* scheint diese Aussage nicht zuzutreffen, da bei Gefrierversuchen mit *Lemna minor* (Stamm 8765) unter suboptimalen Bedingungen, die eine erhöhte Mortalität der Knospen zur Folge haben, eine überdurchschnittlich hohe Sukkulenz- und Kallusbildung beobachtbar ist. Im übrigen scheint es sich bei der Sukkulenz um eine abgeschwächte Form von Kallus zu handeln, bei der noch eine weitgehende Differenzierung stattfindet, da alle Übergänge zwischen sukkulenten, aber normalgeformten Gliedern und stark kallusierten, verkrüppelten und unförmigen Gebilden auftreten können. Ferner sollte in Betracht gezogen werden, dass es sich bei *Lemnaceae* um Wasserpflanzen handelt, bei deren Kultivierung auf Flüssigmedien kein abnormes Wachstum auftreten sollte. Kallusbildung und Sukkulenz sind oft die Folge eines gestörten Wachstumshormonhaushalts. FRICK (1991) fand eine starke Korrelation zwischen der Anzahl sukkulenter Tochterglieder aus bereits sukkulenten *Lemna minor*-Pflanzen und dem Gehalt an Isopentenyl-Adenin im Nährmedium. Je höher dieser war, desto grösser war der Prozentsatz sukkulenter Tochterglieder. Im Gegensatz zu seinen Beobachtungen, wo in einer zytokininfreien Nährlösung fast ausschliesslich opake Glieder auswachsen, blieben nach Gefrier- und Referenzversuchen die meisten geschädigten Pflanzen sukkulent. Das sukkulente Ausgangsmaterial erhielt FRICK durch Osmoschock. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass das Auswachsen sukkulenter Glieder nach Referenzversuchen ebenfalls auf Verletzungen beruht, die durch einen zu hohen Druckunterschied zwischen Innen- und Aussenmilieu verursacht wurden.

Allgemein kann durch eine Verfestigung des Nährmediums (beispielsweise durch eine Erhöhung der Agarkonzentration) die Sukkulenzbildung gesenkt werden. Aus diesem Grund wurden sukkulente gebliebene *Lemna minor*-Pflanzen nach einem Monat von den Flüssigkulturen auf Hillman-Agar überimpft. Rund 25% der Pflanzen zeigten danach ein normales Wachstum, die restlichen Exemplare starben innert drei Monaten ab. Bereits sukkulente Glieder bildeten auf dem Agarmedium keine Kutikula

mehr. Diese Beobachtungen stimmen gut mit jenen von ZIV et al. (1983) und VON ARNOLD und ERIKSSON (1984) überein, die ebenfalls nur bei neu gebildeten Blättern respektive Nadeln ein nicht sukkulenten Wachstum feststellen konnten.

Bei verschiedenen *Lemna*- und *Spirodela*-Arten konnte nach dem Auftauen eine Anthozyanproduktion beobachtet werden (Fig. 7), wobei bereits das Einlegen der Glieder in die Gefrierschutzmittel dazu führen kann. Diese, in der Natur recht oft beobachtete Erscheinung, tritt unter Laborbedingungen im Normalfall nicht auf. Besonders ausgeprägt war die Anthozyanbildung bei *Lemna ecuadoriensis*, *Lemna gibba*, *Lemna japonica*, *Lemna obscura* und *Spirodela polyrrhiza*. Bei den *Lemna*-Arten sind die roten Pigmente mehrheitlich unregelmässig über die Ober- und Unterseite der Glieder verteilt. Bei *Spirodela polyrrhiza* ist die Gliedunterseite zum Teil recht intensiv pigmentiert, wobei die Adern und der Knotenpunkt die stärkste Färbung aufweisen. Die Oberseite weist beim Stamm 8786a ein ähnliches Muster auf wie bei den *Lemna* Arten, beim Stamm 7520 hingegen ist sie in der Regel grün, mit Ausnahme des Knotenpunkts, der tiefrot sein kann. Recht häufig treten Anthozyane auch bei sukkulenten Exemplaren auf. Als mögliche Ursachen hierfür kommen allgemein zu hohe Lichtintensität sowie ungünstige Nährstoffverhältnisse in Frage. Da die Bedingungen für alle auf Hutner-Flüssigkulturen gewachsenen Pflanzen etwa gleich waren, aber die Anthozyanbildung ausschliesslich bei zuvor mit einem Gefrierschutzmittel behandelten oder zusätzlich tiefgefrorenen Individuen auftrat, muss davon ausgegangen werden, dass durch diese Experimente verursachte Verletzungen den Nährstoffhaushalt der Pflanzen derart stören, dass bei ihnen Stresserscheinungen auftreten. Bei unzulänglicher Nitrat- und Phosphatnahrung beobachtete LÜÖND (1983) Anthozyanbildung bei *Lemna gibba* und *Spirodela polyrrhiza*, hingegen nicht bei *Lemna minor*, obwohl diese Art ebenfalls dazu befähigt ist. Auch nach Tiefgefrier- oder Referenzversuchen bildet diese Art keine Anthozyane.

3.2. EINFLUSS VERSCHIEDENER FAKTOREN AUF DIE ÜBERLEBENSRATE VON *LEMNA MINOR*

Sämtliche Untersuchungen in diesem Kapitel wurden mit dem Stamm 8765 durchgeführt. Die Resultate sind in den Figuren 8-22 dargestellt.

3.2.1. Wirkung verschiedener Gefrierschutzmittel in Abhängigkeit von der Konzentration und Einwirkungszeit

Um möglichst rasch eine gezielte Auswahl an vielversprechenden Gefrierschutzlösungen treffen zu können, wurden Vorversuche mit Radieschensamen (Radies Riesenbutter von Samen Mauser) durchgeführt, die in trockenem Zustand selbst ohne Gefrierschutzmittel erfolgreich tiefgefroren werden können (Resultate nicht dargestellt). Da diese Untersuchungen ein unsteriles Arbeiten erlauben und zudem die auswachsenden Keimlinge nach ungefähr einer Woche ausgezählt werden können, konnte innerhalb relativ kurzer Zeit eine grosse Anzahl Versuche durchgeführt werden. Es wurden nicht weniger als 25 verschiedene Lösungen getestet, die ein bis zwei der folgenden Gefrierschutzmittel enthielten: DMSO, Glukose, Glyzerin, PVP, 1,2-Propandiol, 1-Propanol und Skim milk powder (Fluka AG). Im Hinblick auf die bedeutend wasserreicheren Gewebe der *Lemnaceae* wurden etliche Tests mit gewässerten Radieschensamen durchgeführt. Die aufschlussreichsten Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Daraus geht klar hervor, dass ein vollumfänglicher Gefrierschutz erst nach einer längeren Einwirkungszeit dieser Lösungen vorhanden ist. Am vielversprechendsten sind Glyzerinlösungen in Konzentrationen ab 50%. Die 40% Glyzerinlösung und die

Tab. 4. Keimraten trockener und gewässelter Radieschensamen [%], die mit dem Gefrierapparat eingefroren wurden, wobei verschiedene Gefrierschutzmittel getestet wurden. Für jedes Experiment wurden mindestens 50 Samen verwendet.
Germination rates of dry and water-soaked radish seeds [%], which were cooled with the freezing apparatus in the presence of different cryoprotectants. At least 50 seeds were used for each experiment.

Einwirkungszeit Zustand der Samen Gefrierschutzmittel	keine		1 Stunde		
	trocken	1 Stunde gewässert	trocken	1 Stunde gewässert	2 Stunden gewässert
10% DMSO-5% Glukose	67	0	3	0	0
5% DMSO-25% Glukose	76	0	86	0	0
10% DMSO-40% Glukose	96	2	92	56	2
30% Glyzerin	68	0	52	2	0
40% Glyzerin	94	0	94	32	0
50% Glyzerin	78	0	80	80	38
100% Glyzerin	90	0	78	80	80
30% Propandiol-15% Propanol	80	0	6	0	0
40% PVP	62	0	46	0	0

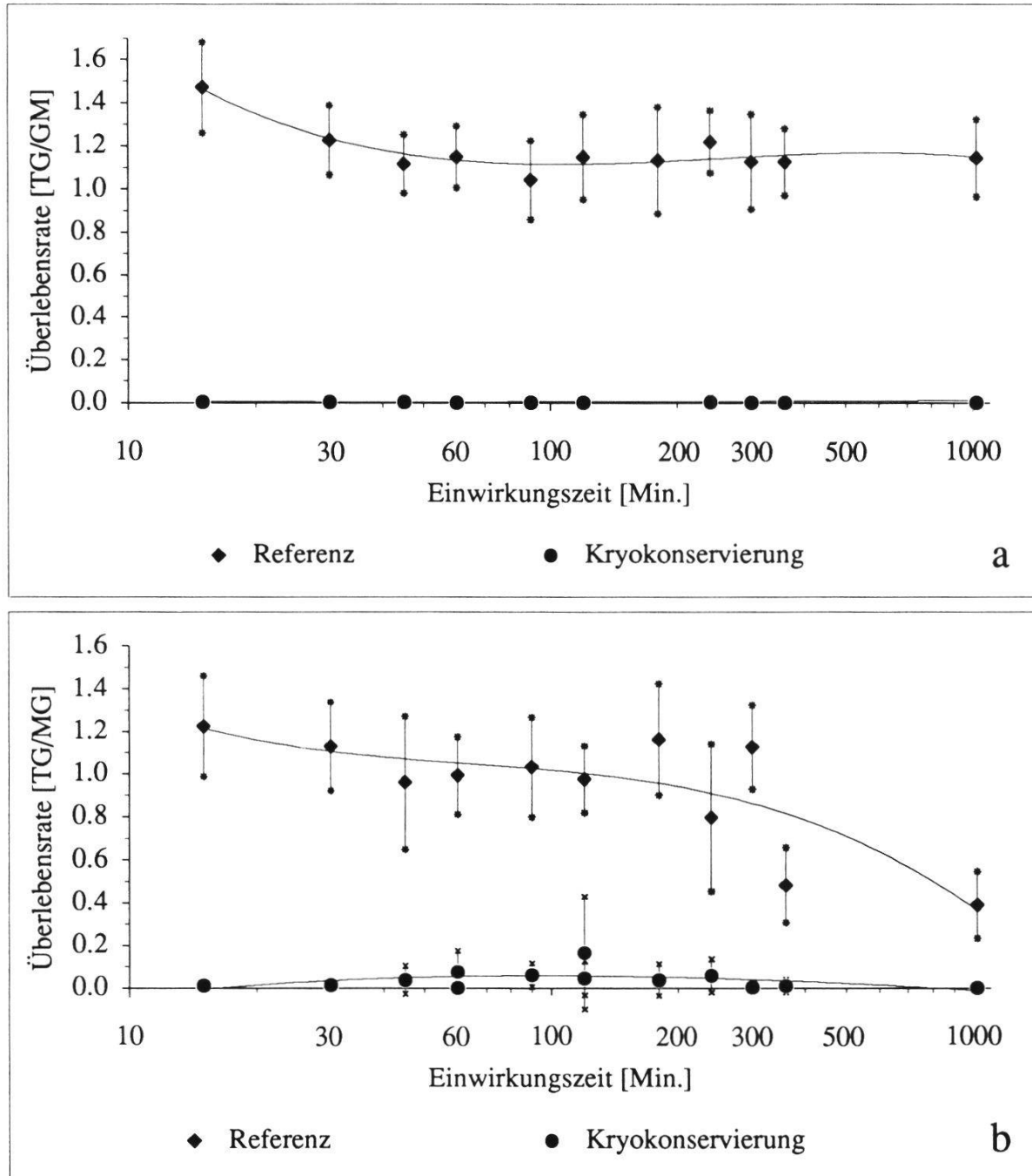


Fig. 8. Einfluss verschieden konzentrierter Glycerinlösungen auf die Überlebensrate nicht tiefgefrorener und mit dem Gefrierapparat eingefrorener *Lemna minor*-Pflanzen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit. Durch die Punkteschar der Mittelwerte wurde ein Polynom 3. Grades gelegt. Die Standardabweichung ist in Balken dargestellt.

Effect of glycerol solutions of different concentrations on the survival of non-frozen and frozen Lemna minor plants in relation to the incubation time. A 3rd degree polynomial expression was used to fit a line through the means. Bars represent standard deviations.

a. 20% Glycerin – 20% glycerol, b. 40% Glycerin – 40% glycerol

Bemerkung: In Fig. 8a wurden die Mittelwerte von 90 und 240 Minuten der Referenz für die Berechnung der Polynomgleichung weggelassen.

Note: In Fig. 8a the means of 90 and 240 minutes of the reference were omitted for the calculation of the polynomial expression.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

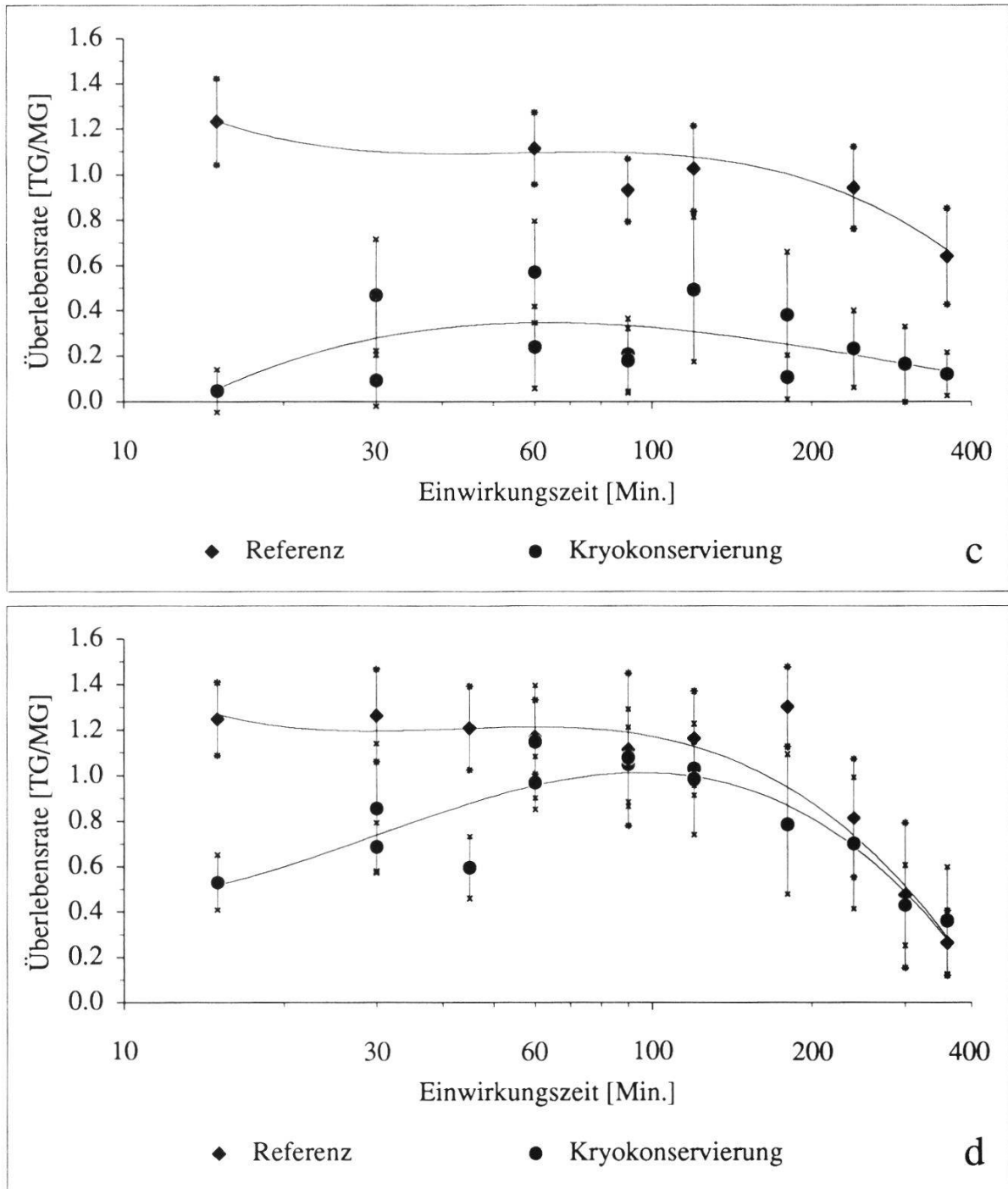


Fig. 8 (Forts. – continued)

c. 45% Glycerin – 45% glycerol

d. 50% Glycerin – 50% glycerol

Bemerkung: In Fig. 8c wurde der Mittelwert von 90 Minuten der Referenz und in Fig. 8d jener von 180 Minuten für die Berechnung der entsprechenden Polynomgleichungen weggelassen.

Note: In fig. 8c the means of 90 minutes of the reference and in fig. 8d that of 180 minutes were omitted for the calculation of the corresponding polynomal expressions.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

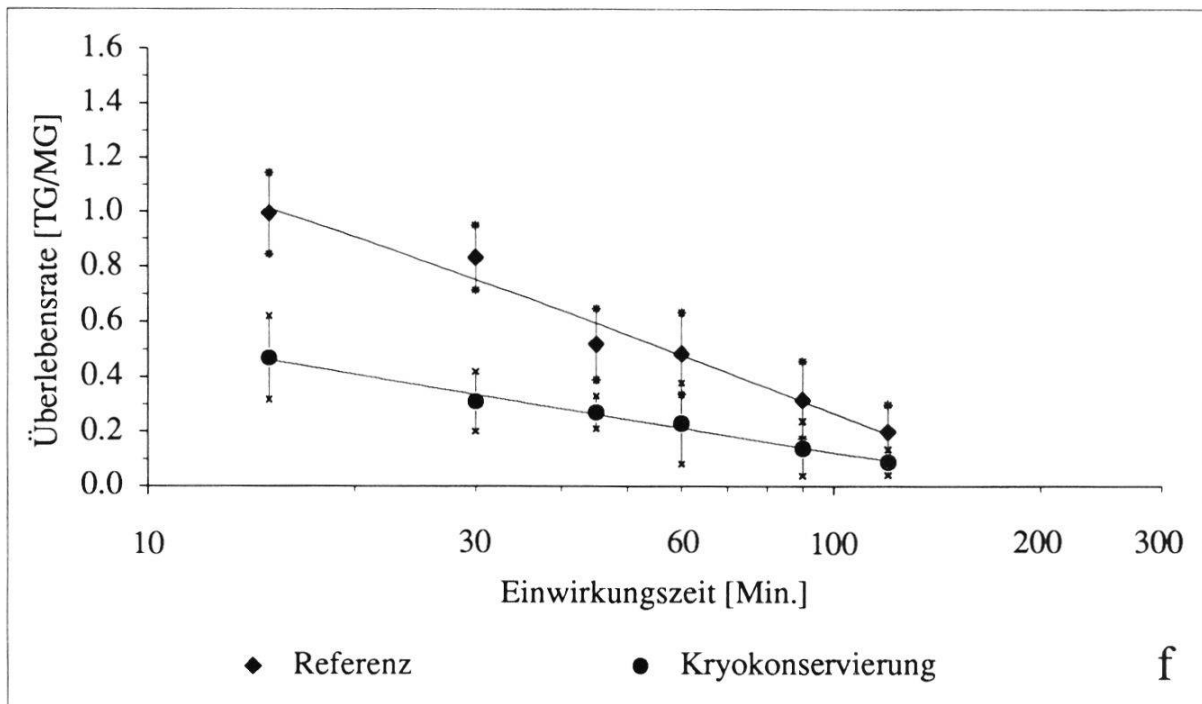
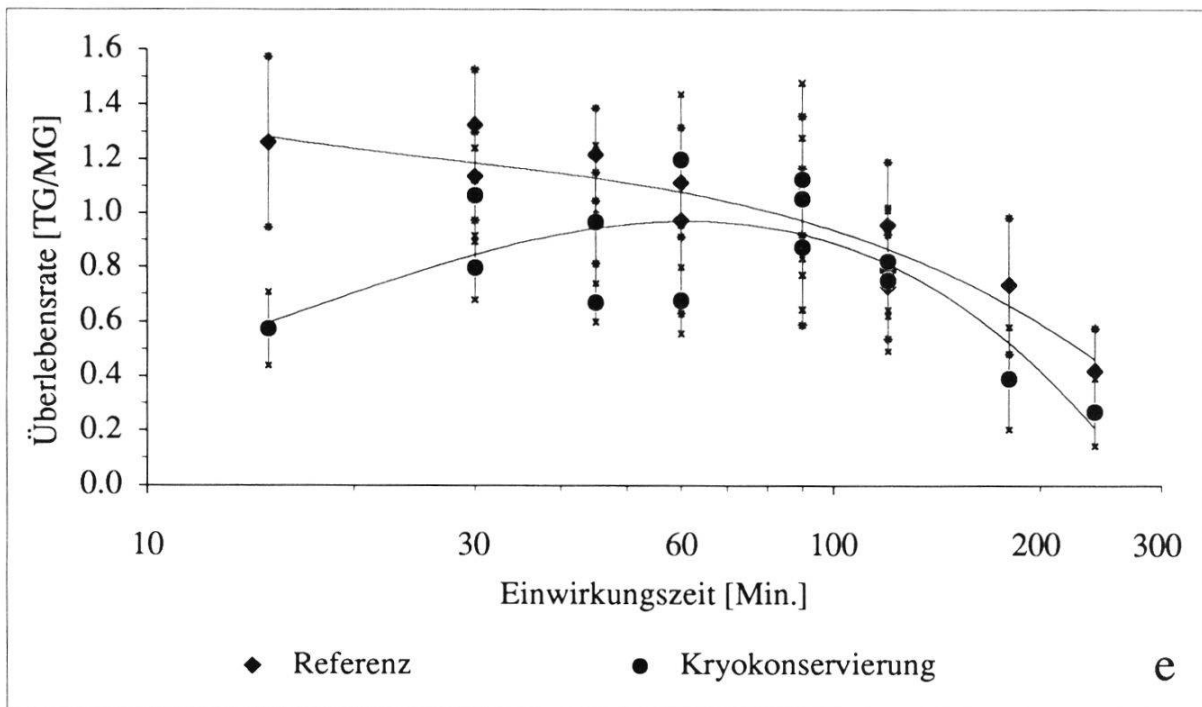


Fig. 8 (Forts. – continued)

e. 60% Glyzerin – 60% glycerol

f. 80% Glyzerin – 80% glycerol

Bemerkung: In Fig. 8f wurden lediglich Polynomgleichungen 2. Grades verwendet.

Note: In fig. 8f only 2nd degree polynomial expressions were used to fit the lines through the means.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

10% DMSO-40% Glukose-Lösung können ebenfalls noch für die Kryokonservierung der *Lemnaceae* in Betracht gezogen werden. Die restlichen Gefrierschutzmittel scheinen eher ungeeignet zu sein, insbesondere auch die 30% 1,2-Propandiol-15% 1-Propanol-Lösung, die nach BOUTRON und MEHL (1986) eine sehr hohe Glasstabilität aufweisen soll. Nebst einem ungenügenden Gefrierschutz scheint diese Lösung auch von den Radieschensamen schlecht ertragen zu werden. So beträgt bereits die Auskeimrate nicht tiefgefrorener Samen nach einer einstündigen Einwirkungszeit lediglich noch 34%. Für die *Lemnaceae*-Kryokonservierung kamen von den ausgetesteten Gefrierschutzmitteln lediglich noch verschieden stark konzentrierte Glycerinlösungen und die 10% DMSO-40% Glukose-Lösung zur Anwendung. PVP wurde ebenfalls in die weiteren Untersuchungen miteinbezogen, doch wurde die Konzentration auf 60% erhöht. Kultiviert wurden die Pflanzen mit der unter Kap. 2.3 beschriebenen Standardmethode. Die Proben wurden ausnahmslos mit dem Gefrierapparat tiefgefroren und im 30°C-Wasserbad aufgetaut. Das Alter der verwendeten Kulturen betrug ungefähr 50 Tage.

Bei *Lemna minor* eignet sich Glycerin in Konzentrationen von 50% bis 60% sehr gut als Gefrierschutzmittel (Fig. 8d,e). Mit zunehmender Einwirkungs-dauer dieser beiden Lösungen steigen die Überlebensraten der kryokonservierten Pflanzen an, bis die Werte ungefähr gleich hoch sind, wie jene mit dem entsprechenden Gefrierschutzmittel behandelte, aber nicht eingefrorene Exemplare (Referenz). Bei weiterer Verlängerung der Einwirkungszeit sinkt die Überlebensrate der kryokonservierten Proben zwangsläufig wieder, weil die der Referenzproben ebenfalls abnimmt. Die Werte eingefrorener und nicht tiefgekühlter Pflanzen sind in diesem Bereich ähnlich hoch, was bedeutet, dass praktisch alle zu Beginn des Einfrierens noch unverletzten Knospen erfolgreich kryokonserviert werden können. Der aus den Polynomgleichungen berechnete Maximalwert liegt bei den mit 50% Glycerin tiefgefrorenen Proben bei einer Einwirkungszeit von 96 Minuten und beträgt 1.01 TG/MG, jener mit 60% Glycerin kryokonservierter Pflanzen liegt bei 61 Minuten und beträgt 0.97 TG/MG. Ähnlich wie bei gewässerten Radieschensamen nimmt die Gefrierschutzwirkung von Glycerinlösungen in Konzentrationen unter 50% drastisch ab (Fig. 8a-c). So werden bereits bei der Verwendung von 40% Glycerin fast alle Knospen während dem Einfrier- oder Auftauvorgang abgetötet. Bei Versuchen mit 45% Glycerin ist die Streuung der Überlebensraten der einzelnen Proben sehr gross. In einigen Kryoröhrchen können sehr viele Knospen überleben, in anderen sterben alle ab. Hohe Glycerinkonzentrationen eignen sich im Gegensatz zur Radieschensamenkryokonservierung für *Lem-*

na minor weniger gut (Fig. 8f). Die Knospen werden mit zunehmender Einwirkungsdauer, auch ohne zusätzliches Einfrieren, durch das Gefrierschutzmittel ziemlich rasch abgetötet. Bei der Verwendung von 80% Glycerin sterben durch die Kryokonservierung bei allen getesteten Einwirkungszeiten durchschnittlich gut die Hälfte der zu Beginn des Einfrierens noch lebenden Knospen ab. Die Resultate zeigen auch, dass bei *Lemna minor* ebenfalls erst nach einer bestimmten Einwirkungsdauer ein vollumfänglicher Gefrierschutz vorhanden ist. Für wässrige Glycerinlösungen ab ungefähr 50% dürfte die Regel gelten, dass je höher die Konzentration, desto kürzer die optimale Einwirkungsdauer ist, bei der die grösstmögliche Anzahl Knospen die Kryokonservierung überlebt. Im Gegensatz dazu kann bei geringeren Glycerinkonzentrationen die Überlebensrate durch eine Verlängerung der Einwirkungszeit nicht erhöht werden.

Wird ein Teil des Glycerins (10% der Gesamtlösung) durch das gleiche Volumen DMSO ersetzt, ändert sich die Gefrierschutzwirkung nur unbedeutend (Fig. 9c,d). Da DMSO die Membranpermeabilität erhöht (FRANZ und VAN BRUGGEN 1967) und viel rascher eindringt als Glycerin (RICHTER 1968), sollte ein DMSO-Glyceringemisch einen geringeren osmotischen Stress verursachen als die entsprechende Glycerinlösung derselben Konzentration. Trotzdem ist die Überlebensrate nicht eingefrorener Pflanzen nach einer Behandlung mit 10% DMSO-40% Glycerin nicht höher als nach gleich langer Einwirkung von 50% Glycerin. Ein Nachteil der 10% DMSO-40% Glycerinlösung gegenüber 50% Glycerin besteht in der geringeren Glasstabilität, der sich aber offensichtlich bei *Lemna minor* nicht auswirkt. Nach BOUTRON und KAUFMANN (1978) liegt die niedrigste Glasstabilität eines wässrigen, rund 50 Gew.% DMSO-Glyceringemisches bei jenem, das einen Anteil von 10% DMSO aufweist. Ein grösserer DMSO-Gehalt würde zwar eine bedeutend höhere Glasstabilität zur Folge haben, doch ist diese Substanz in Konzentrationen ab 10% bis 20% in vielen Fällen sehr toxisch (KARTHA et al. 1979, TOWILL 1981, VAN DER MEER und SIMPSON 1984, KAURIN und STUSHNOFF 1985). Aus diesem Grund wurden keine Gefrierschutzlösungen mit einem DMSO-Anteil von über 10% getestet.

Die 10% DMSO-40% Glukose-Lösung schädigt die Pflanzen selbst nach sehr langer Einwirkung verhältnismässig wenig, ist aber für die Kryokonservierung von *Lemna minor* ungeeignet (Fig. 9a). Bei hier nicht dokumentierten Vorversuchen mit relativ wenig Testmaterial konnte zwar ein einziges auswachsendes Tochterglied beobachtet werden, doch war dieses Resultat bei späteren, viel umfangreicheren Einfrierversuchen nicht mehr reproduzierbar.

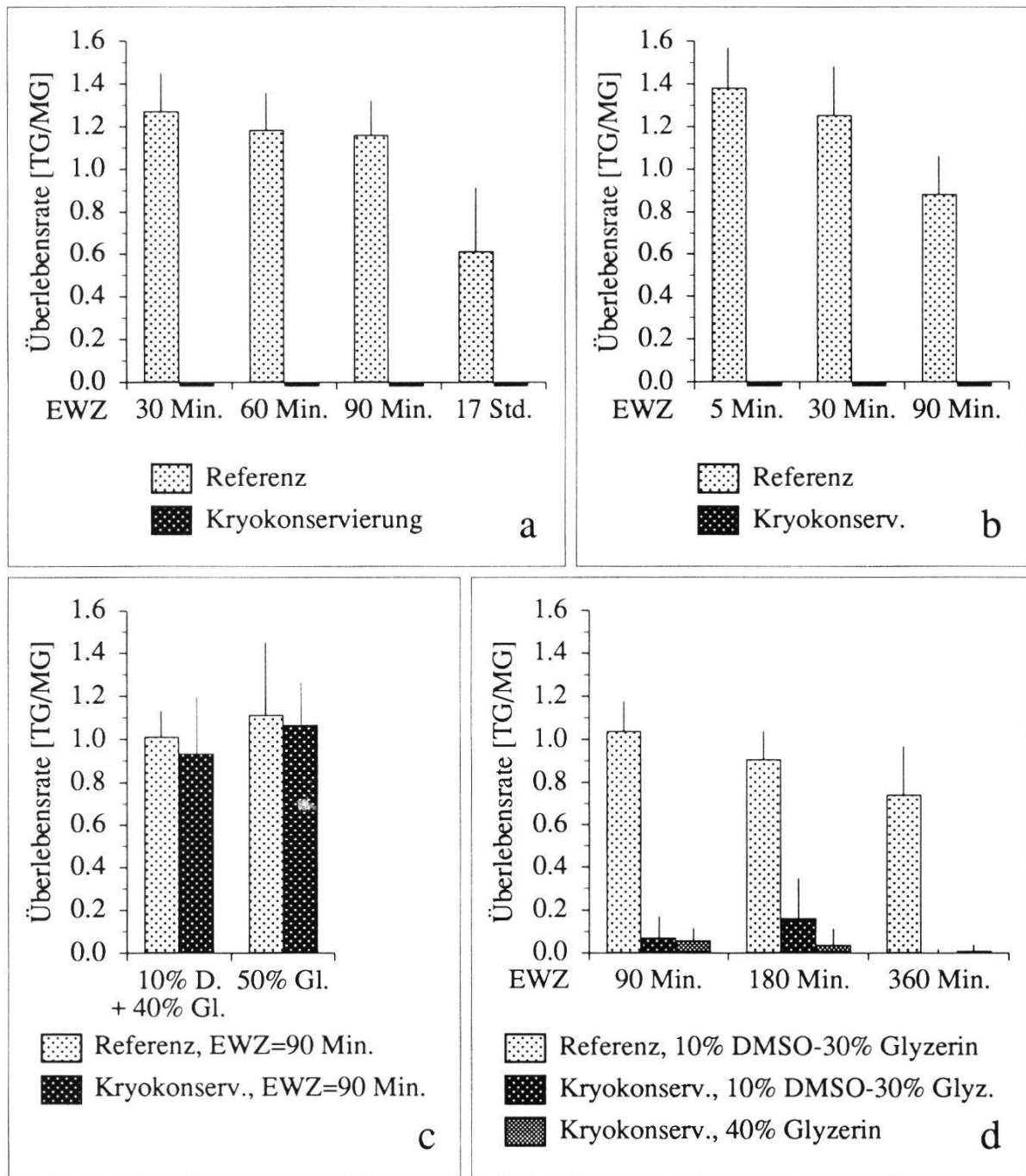


Fig. 9. Einfluss verschiedener Gefrierschutzlösungen auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener *Lemna minor*-Pflanzen. Einfrierexperimente erfolgten mit dem Gefrierapparat.

Effect of different cryoprotectants on the survival of frozen and non-frozen Lemna minor plants. Freezing experiments were conducted with the freezing apparatus.

a. 10% DMSO-40% Glukose – 10% DMSO-40% glucose

b. 60% Polyvinylpyrrolidon – 60% polyvinylpyrrolidone

c. 10% DMSO-40% Glycerin (im Vergleich mit 50% Glycerin)

10% DMSO-40% glycerol (compared with 50% glycerol)

d. 10% DMSO-30% Glycerin (im Vergleich mit 40% Glycerin)

10% DMSO-30% glycerol (compared with 40% glycerol)

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

60% PVP wird von den Pflanzen ebenfalls recht gut ertragen und ist trotz seiner klebrigen Eigenschaft und der hohen Viskosität leicht entfernbar. Als Einkomponentengefrierschutzmittel ist aber PVP offensichtlich völlig nutzlos (Fig. 9b).

Figur 10 veranschaulicht anhand von drei Gefrierschutzlösungen, welcher Effekt während der Einwirkungsphase besteht und welche Rolle diese Mittel während dem eigentlichen Gefrier- und Auftauvorgang spielen. Diese Untersuchungen zeigen, dass Gefrierschutzmittel mit gesamthaft geringer Schutzwirkung während der Einwirkungsphase keinen Einfluss auf die Gefrierresistenz von *Lemna minor* haben. So ist die Überlebensrate von mit 60% Glycerin eingefrorenen Pflanzen, die zuvor anderthalb Stunden in 40% Glycerin eingetaucht waren, nicht höher, als wenn die Pflanzen mit 60% Glycerin ohne Vorbehandlung tiefgefroren werden. Doch auch während dem Gefrier- und Auftauvorgang besitzt 40% Glycerin wahrscheinlich eine sehr geringe Schutzwirkung, da durch eine Vorbehandlung mit 60% Glycerin, das nach anderthalbstündiger Einwirkungszeit die Gefrierresistenz der Pflanzen deutlich erhöht, keine Verbesserung der Überlebensrate erzielt werden kann. Voraussetzung für diese Vermutung ist allerdings, dass während der Vorbehandlung

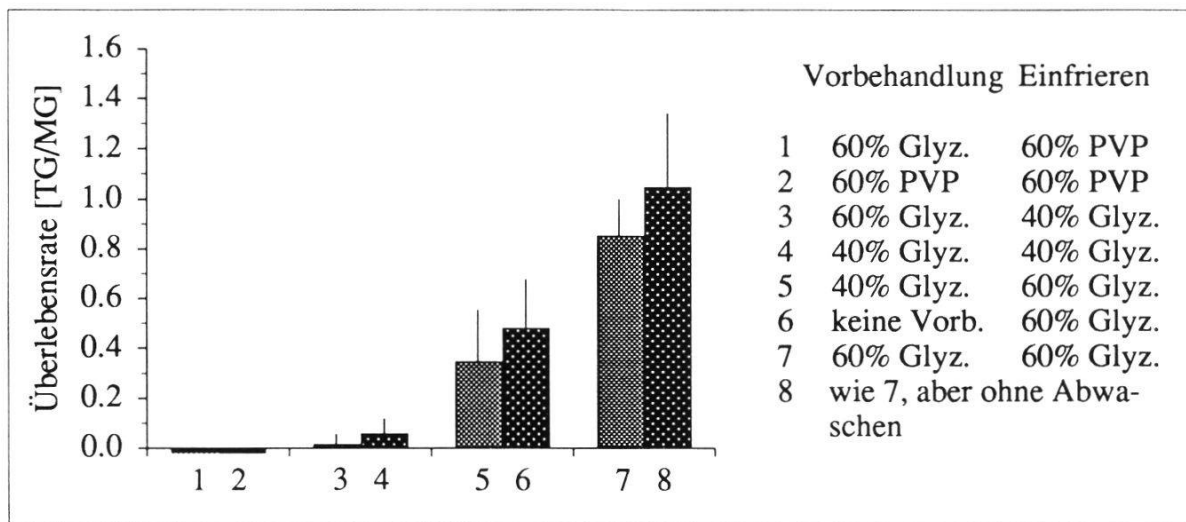


Fig. 10. Einfluss verschiedener Gefrierschutzmittel auf die Überlebensrate von *Lemna minor*, sowohl während der Einwirkungs- wie auch Gefrierphase. Die Proben wurden während 90 Minuten mit einem Gefrierschutzmittel behandelt, danach kurz mit sterilem Wasser abgespült und sofort nach erneuter Gefrierschutzmittelzugabe mit dem Gefrierapparat eingefroren.

Effect of different cryoprotectants on the survival of Lemna minor during incubation and during cooling. Following a 90 minute treatment with a cryoprotectant the samples were washed briefly with sterile water and immediately cooled with the freezing apparatus after renewed addition of a cryoprotectant.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

nicht ein grosser Teil des Glycerins in die Zellen eindringt, da sonst die Osmolalität des Zellinhalts höher wäre als jene von 40% Glycerin, wodurch die Zellen während der Vorkühlphase wieder Wasser aufnehmen würden. Beim entsprechenden Versuch mit PVP dürfte allerdings der Innendruck der Zellen höher sein. Trotzdem ist nicht sicher, ob während der Kühlphase eine grössere Menge Wasser in die Zellen gelangt, weil in konzentrierten Makromoleküllösungen die Wasserdiffusion stark gehemmt ist.

50% und 60% Glycerin sind osmotisch sehr aktive Lösungen und weisen bei tiefen Temperaturen ein stark reduziertes Kristallwachstum auf (BOUTRON 1984). Es muss davon ausgegangen werden, dass *Lemna minor* nur unter der Voraussetzung kryokonserviert werden kann, dass die Zellen genügend dehydriert sind und, wie auch aus Kap. 3.7 hervorgeht, während dem Einfrieren und Auftauen nur sehr kleine oder sogar keine Kristalle (Vitrifikation) in der Gefrierschutzlösung entstehen.

3.2.2. Einfluss von Vorkühltemperatur, Gefrier- und Auftaugeschwindigkeit

Bereits in Kap. 1.2 wurde darauf hingewiesen, dass der Temperaturbereich, in welchem sich Kristalle bilden, sowie die Geschwindigkeit des Kristallwachstums in grossem Masse von der Art und Konzentration der Gefrierschutzlösung abhängig sind. Zusätzlich wird das Kristallwachstum stark konzentrierter Lösungen erheblich durch die Gefrier- und Auftaugeschwindigkeit beeinflusst, da durch rasches Einfrieren und Auftauen die Zeitdauer, während der die Kristalle wachsen können, verkürzt wird. Des Weiteren sinkt der Gefrierpunkt mit zunehmender Kühlgeschwindigkeit in einen tieferen Temperaturbereich (MACFARLANE 1987), und beim Erwärmen wird die Devitrifikationstemperatur mit zunehmender Auftaurate nach oben verschoben, wodurch der Kristallwachstumsbereich verkleinert wird (BOUTRON und KAUFMANN 1978, BOUTRON et al. 1982, 1986). Der Einfluss dieser Faktoren wurde mit Glycerinlösungen in Konzentrationen von 40% bis 60% getestet. Sofern nichts weiter bemerkt ist, betrug die Einwirkungszeit der Gefrierschutzlösungen stets 90 Minuten. In dieser Arbeit und speziell in diesem Kapitel werden mehrmals Literaturwerte von Glycerinlösungen erwähnt. Weil dort die Konzentrationen in Gewichtsprozenten angegeben sind, mussten sie für einen direkten Vergleich in Volumenprozenten umgerechnet werden. Dazu wurden die Dichten von 20°C gewählt, die für Wasser 998 g/l, für Glycerin nach Fluka 1262 g/l betragen.

Bei 50% Glyzerin liegt die minimale Kühlrate, die bei *Lemna minor* eine letale Kristallisation verhindert, zwischen -1.8 und $-3.2^{\circ}\text{C}/\text{Min}$. (Fig. 11). Bei raschem Kühlen sind die Überlebensraten immer recht hoch, und allfällige Unterschiede scheinen in keinem Zusammenhang mit der verwendeten Kühlrate zu stehen. Beim Vergleich zwischen rascher Abkühlung durch direktes Eintauchen der Proben in flüssigen Stickstoff und dem Einfrieren mit dem Gefrierapparat, wobei verschiedene Einwirkungszeiten getestet wurden, ist zwar die Überlebensrate der rasch eingefrorenen Pflanzen meist tiefer (Fig. 12), eine klare Aussage ist indes nicht möglich. Sehr rasche Temperaturunterschiede werden offenbar von den Pflanzen gut ertragen, wenn auch eine kontrollierte Temperaturabsenkung mittels Gefrierapparat etwas schonender sein könnte. Bei zu langsamem Kühlen bis auf -125°C stirbt ein grosser Teil der Knospen in einem engen Temperaturbereich von ungefähr 10°C ab (Fig. 13). Da Proben, die während 90 Minuten auf einer Vorkühltemperatur von -25°C gehalten wurden, welche nach LANE (1925) 3°C über dem Schmelzpunkt liegt, und danach mit $10^{\circ}\text{C}/\text{Min}$. gekühlt wurden, gut überleben (Fig. 14), kann eine Schädigung durch zu lange Einwirkung des Gefrierschutzmittels ausgeschlossen werden. Vielmehr dürften die Gewebe unterhalb -40°C direkt oder indirekt durch wachsende Eiskristalle in der Gefrierschutzlösung abgetötet werden, wie dies auch aus Tabelle 14 (Kap. 3.7) hervorgeht. Bestimmungen von Nukleationstemperaturen wurden bisher nur selten durchgeführt. Als

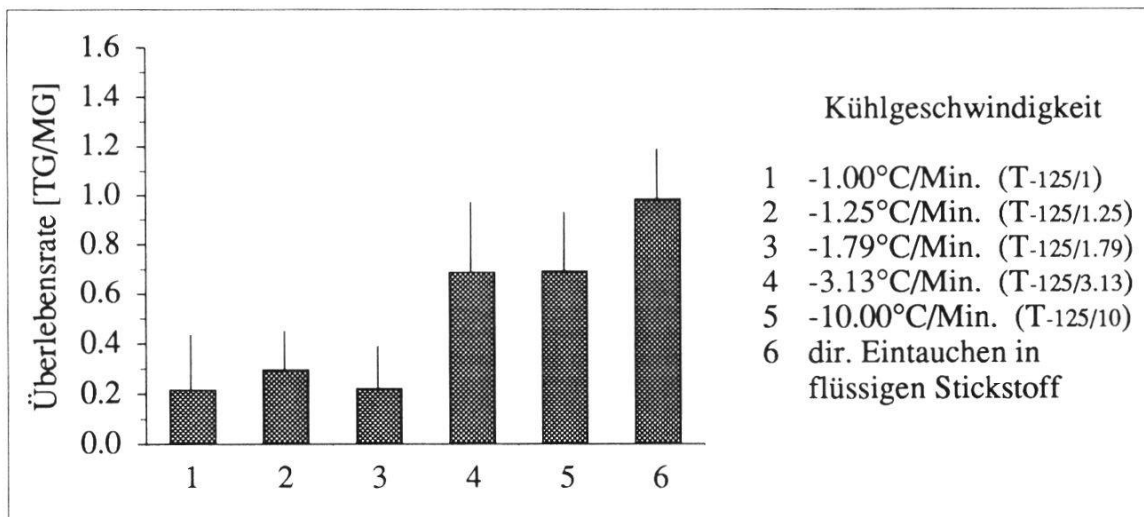


Fig. 11. Einfluss der Kühlgeschwindigkeit auf die Überlebensrate von *Lemna minor*. Als Gefrierschutzmittel wurde 50% Glyzerin verwendet, das 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben wurde.

Effect of cooling rate on the survival of Lemna minor. 50% glycerol was used as cryoprotectant which was added 90 minutes before freezing.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

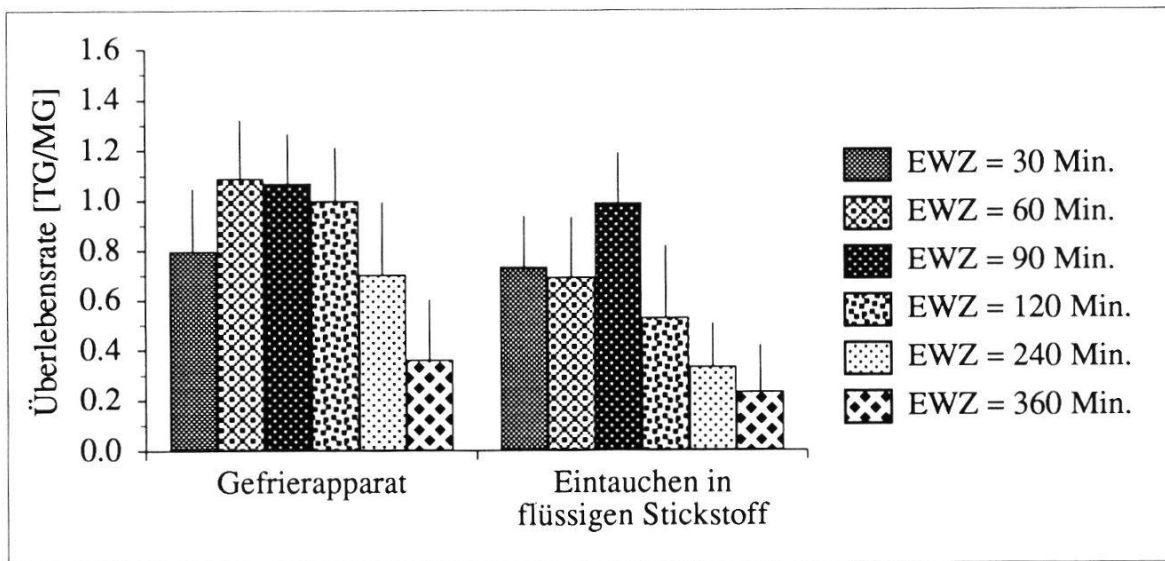


Fig. 12. Überlebensrate von *Lemna minor*-Pflanzen, die entweder mit dem Gefrierapparat oder durch direktes Eintauchen der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff tiefgekühlt wurden. Die Pflanzen wurden nach verschieden langer Vorbehandlung (EWZ) in 50% Glycerin tiefgefroren.

Survival of Lemna minor plants which were cooled with the freezing apparatus or by direct plunging of the cryotubes in liquid nitrogen. The plants were frozen in the presence of 50% glycerol following incubation for different time periods (EWZ).

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

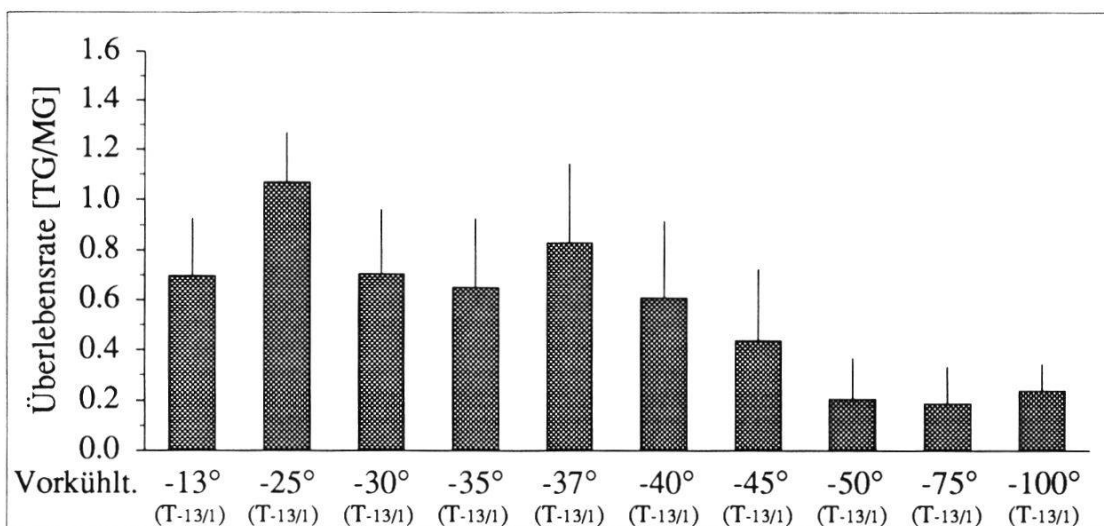


Fig. 13. Einfluss der Vorkühltemperatur auf die Überlebensrate von *Lemna minor*. Als Gefrierschutzmittel wurde 50% Glycerin verwendet, das 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben wurde.

Effect of prefreezing temperature on the survival of Lemna minor. A glycerol solution of 50% was used as cryoprotectant which was added 90 minutes before freezing.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

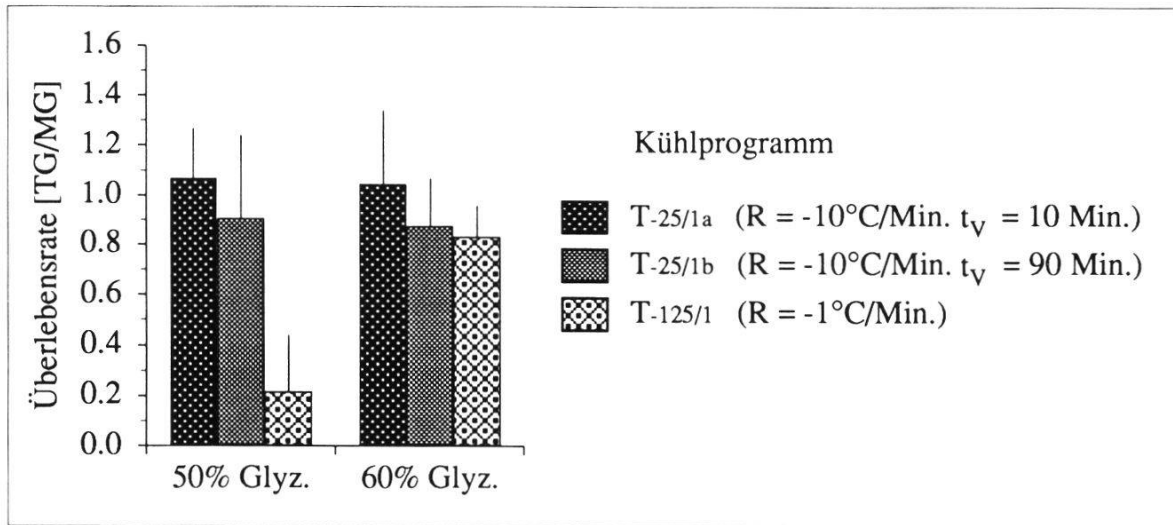


Fig. 14. Einfluss des Glyzeringehalts auf die Überlebensrate von *Lemna minor* unter Anwendung von zwei verschiedenen Kühlraten. (R = Kühlrate im Kristallwachstumsbereich des Gefrierschutzmittels, t_v = Dauer der Ausgleichsphase bei der Vorkühltemperatur). Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 90 Minuten vor dem Einfrieren.

Effect of glycerol concentration on the survival of Lemna minor using two different cooling rates (R = cooling rate in the range of crystal growth of the cryoprotectant, t_v = time of annealing at the prefreezing temperature). The cryoprotectant was added 90 minutes before freezing.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

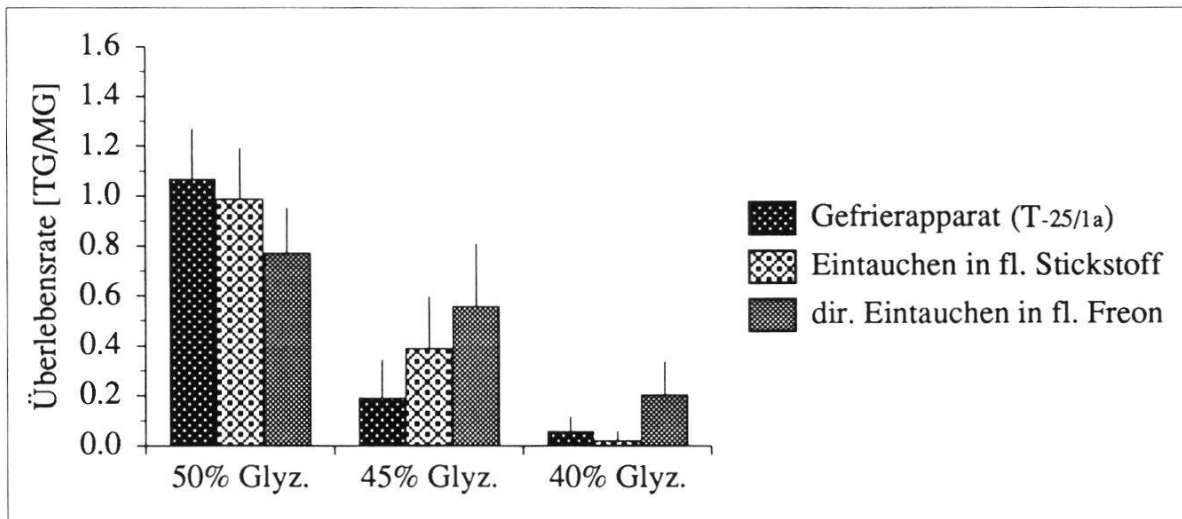


Fig. 15. Einfluss von Gefriermethoden, die sich bezüglich Kühl- und Auftaugeschwindigkeit unterscheiden, auf die Überlebensrate von *Lemna minor*, wenn als Gefrierschutzmittel verschieden konzentrierte Glycerinlösungen verwendet werden. Die Lösungen wurden 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben.

Effect of freezing methods, differing in their rate of cooling and thawing, on the survival of Lemna minor using different concentrations of glycerol as cryoprotectant. The solutions were added 90 minutes before freezing.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

besten Vergleich dazu können die mit einem "Differential Scanning Calorimeter" (DSC) durchgeführten Messungen von BOUTRON (1986) herangezogen werden, der für 44.2% Glycerin bei einer Kühlrate von $-5^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ den Gefrierpunkt bei -50°C ermittelte. Bei 50% Glycerin wäre somit eine niedrigere Gefriertemperatur zu erwarten. JOCHEM und KÖRBER (1987) weisen allerdings darauf hin, dass die für DSC-Messungen verwendeten Lösungsmengen im Mikroliterbereich liegen und daher viel stärker unterkühlen dürften als die hier gebrauchten Mengen. Zudem scheinen die Wasserlinsen oder die zum Untertauchen der Pflanzen verwendeten Stempel eine verfrühte Nukleation zu verursachen, da 50% Glycerin, das ohne Pflanzenmaterial mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ gekühlt wird, bei -50°C noch flüssig ist.

Für Lösungen mit geringerem Glyzeringehalt sind die mit dem Gefrierapparat möglichen Kühlraten zu niedrig, um eine starke Kristallisation der Gefrierschutzmittel zu verhindern (siehe Kap. 3.7), wodurch ein grosser Teil der Knospen abgetötet wird (Fig. 15). Nach BOUTRON (1986) wird praktisch keine Kristallisationsenergie freigesetzt, wenn 44.2% Glycerin mit mindestens $80^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$, 39.4% Glycerin mit mindestens $320^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ gekühlt wird. Damit sollten zumindest bei 45% Glycerin beim Eintauchen der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff keine Kristalle entstehen, beim direkten Eintauchen der Proben in flüssiges Freon auch bei 40% Glycerin nicht. Dass die Überlebensraten bei Einfrierversuchen mit diesen beiden Lösungen trotzdem verhältnismässig niedrig sind, könnte an den folgende zwei Punkten liegen:

1. Die kritische Wärmerate zur Verhinderung jeglichen Kristallwachstums ist allgemein dem Betrage nach bedeutend grösser als die minimale Kühlrate (MEHL und BOUTRON 1987, BOUTRON 1988). Als kritische Wärmeraten geben BOUTRON und KAUFMANN (1978) für 44.2% Glycerin $7 \cdot 10^7$ $^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und für 39.4% Glycerin 10^{13} $^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ an, die hier, selbst bei sehr raschem Auftauen von in flüssigem Freon gekühlten Proben, mit Sicherheit nicht erreicht werden konnten. Die vergleichsweise hohe Überlebensrate der mit 40% Glycerin eingefrorenen Pflanzen unter Anwendung der Freonmethode weisen zwar auf ein vermindertes Kristallwachstum hin, das aber offenbar noch zu rasch ist, um schwerwiegende Verletzungen zu vermeiden.
2. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel bemerkt wurde, sind die Knospen nach einer Vorbehandlung mit 40% Glycerin vermutlich zu wenig dehydriert, um ein langsames Tieffrieren und Auftauen im Wasserbad lebend zu überstehen. Es wäre möglich, dass der Wassergehalt der Zellen selbst für sehr rasches Abkühlen und Auftauen noch zu hoch ist.

Nach Kap. 3.7 entstehen auch bei 50% Glycerin beim Auftauen im Wasser-

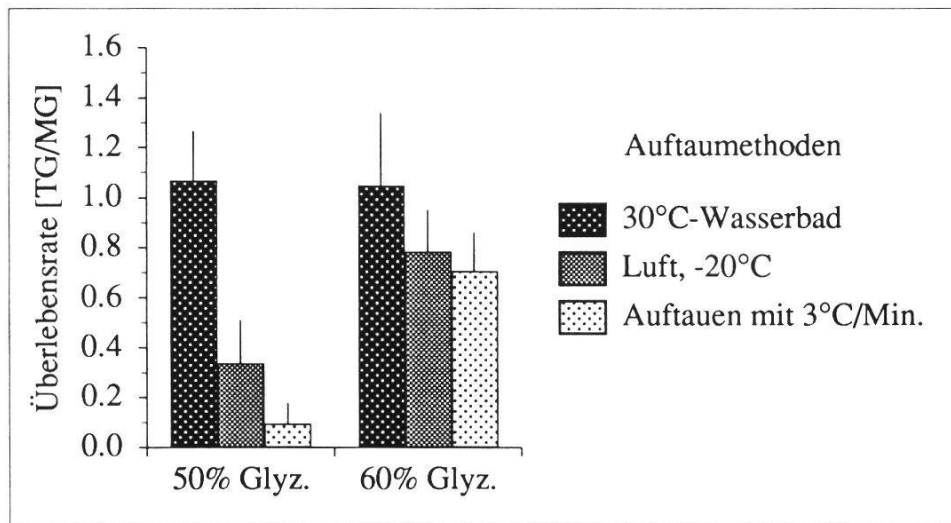


Fig. 16. Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf die Überlebensrate von *Lemna minor* Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden. Als Gefrierschutzmittel wurden 50% und 60% Glycerin verwendet. Die Zugabe erfolgte 90 Minuten vor dem Einfrieren.
Effect of thawing rate on the survival of Lemna minor plants cooled with the freezing apparatus. Glycerol solutions of 50% and 60% were used as cryoprotectants which were added 90 minutes before freezing.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

bad Kristalle, deren Wachstum aber offenbar zu langsam ist, als dass die Knospen während der kurzen Auftauphase gravierende Schäden erleiden würden. Werden die Pflanzen langsam aufgetaut, wird ein Grossteil der Knospen abgetötet (Fig. 16). Die Wachstumshemmung durch das Gefrierschutzmittel ist aber trotzdem recht hoch, da sowohl bei gemächlichem Abkühlen wie auch langsamem Auftauen stets ein kleiner Teil der Knospen überlebt.

Bei 60% Glycerin ist, unabhängig von der Auftaurate, kaum eine Kristallbildung zu erwarten. Selbst beim Erwärmen einer vitrifizierten, 54.3% Glycerinlösung mit rund 13°C/Min. konnte LUYET (1960) keine Kristallisation nachweisen und VIGIER und VASSOILLE (1987) konnten bei derselben Lösung bei einer Auftaurate von 0.3°C/Min. lediglich eine geringe Kristallisation beobachten. Es erscheint daher nicht überraschend, dass bei der Verwendung von 60% Glycerin, selbst nach langsamem Auftauen mit 3°C/Min., sehr viele Knospen überleben.

3.2.3. Einfluss der verwendeten Kulturmedien

Von Pflanzen synthetisierte Stoffe wie verschiedene Zucker (SAKAI und YOSHIDA 1968), Aminosäuren, insbesondere Prolin (MEYER 1983, WITHERS

und KING 1979) sowie Proteine (HEBER 1970) können die Gefrierresistenz deutlich erhöhen. Da die Art des Nährmediums nicht unwesentlich die Zusammensetzung des Zellsafts mitbestimmen kann, wurde der Einfluss der beiden am Institut gebräuchlichen Agarmedien (Hillman und Hutner) auf die Gefrierresistenz der Pflanzen untersucht. Letztere wurde auch als Nährlösung getestet. Nach dem Auftauen müssen die Knospen auswachsen, ohne dass sie von den nun abgestorbenen Gliedern mit Nahrung versorgt werden können. Weitere Untersuchungen zielten daher darauf hin, festzustellen, wie wichtig das Vorhandensein einer C-Quelle (Saccharose) für die Regeneration der Knospen ist. Zu Vergleichszwecken wurden zu diesem Thema noch Versuche mit *Lemna valdiviana* und *Lemna minuscula* durchgeführt. Sämtliche Proben wurden mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin tiefgefroren. Auf Hutner-Agar gewachsene *Lemna minor*-Pflanzen sind deutlich weniger gefrierresistent als jene von Hillman-Agarkulturen (Fig. 17). Die gleiche Tendenz zeichnet sich bei den beiden anderen untersuchten Arten ab (Fig. 18). Die beiden Nährmedien unterscheiden sich nicht unwesentlich in der Nitrat-

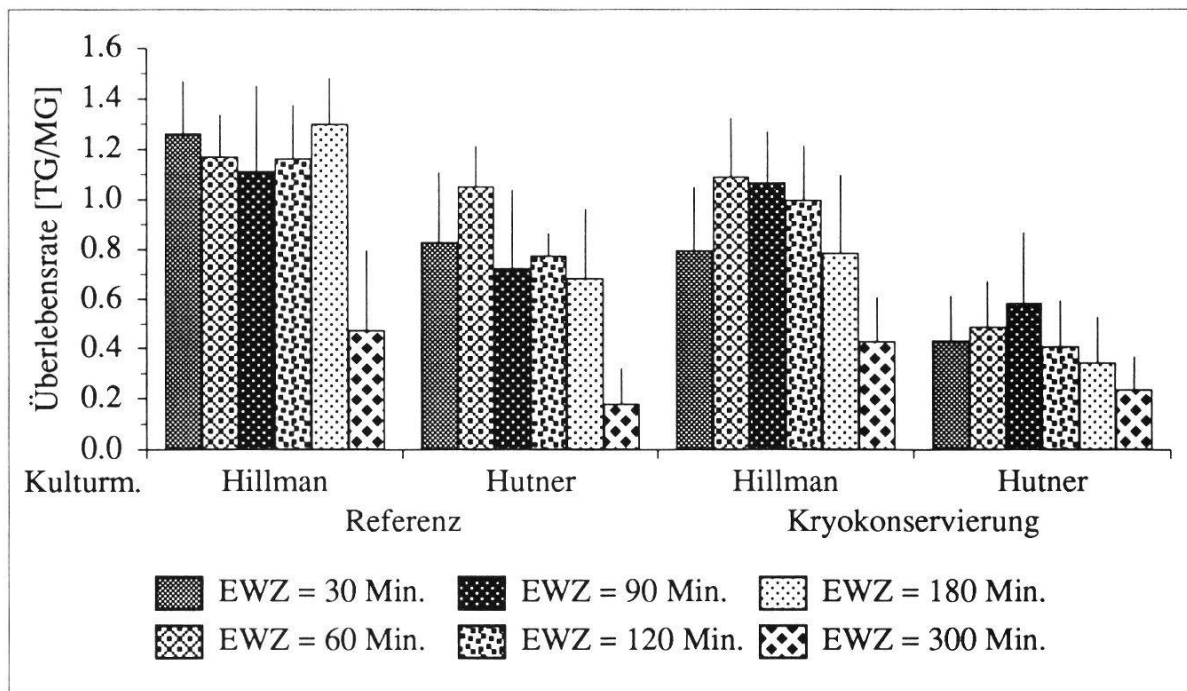


Fig. 17. Verträglichkeit gegenüber 50% Glycerin von *Lemna minor*-Pflanzen, die auf zwei verschiedenen Agar-Nährmedien kultiviert wurden, sowie Einfluss dieser Nährmedien auf die Gefrierresistenz. Die Pflanzen wurden mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin tiefgekühlt.

Tolerance to 50% glycerol of Lemna minor plants grown on two different agar nutrients and effect of these nutrient media on freezing resistance. The plants were cooled with the freezing apparatus in the presence of 50% glycerol.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

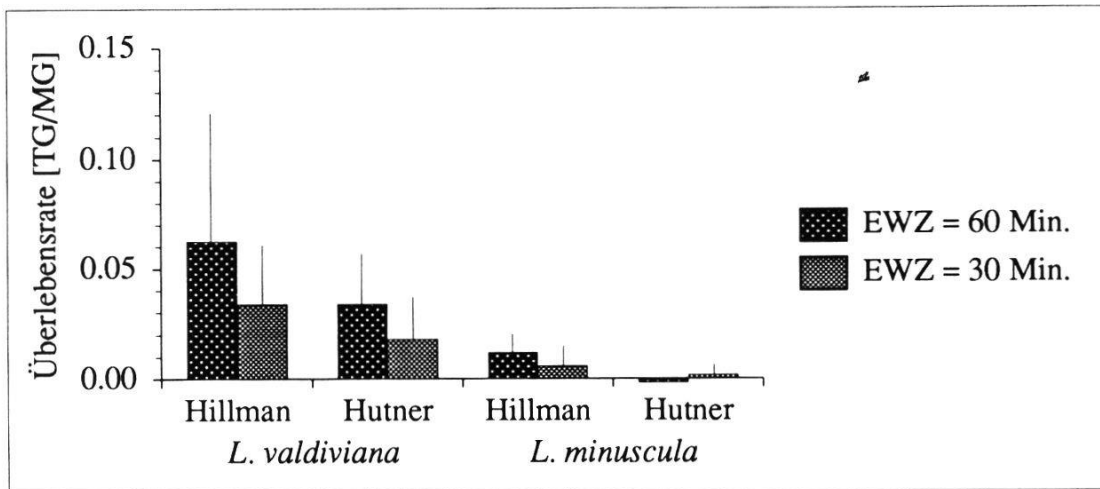


Fig. 18. Einfluss von zwei Agar-Nährmedien auf die Überlebensrate von *Lemna valdiviana*- und *Lemna minuscula*-Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin tiefgefroren wurden. Von jeder Art sind die durchschnittlichen Überlebensraten von je 5 Stämmen dargestellt. Von *Lemna valdiviana* wurden die Stämme 7005, 7227, 7284, 7288 und 7329; von *Lemna minuscula* die Stämme 6600, 6711, 6726, 6737 und 8739 verwendet. Die Daten der einzelnen Versuchsreihen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Effect of two agar nutrients on the survival of Lemna valdiviana and Lemna minuscula plants cooled with the freezing apparatus in the presence of 50% glycerol. For each species the average survival rates of 5 clones are shown. The clones of Lemna valdiviana used are 7005, 7227, 7284, 7288 and 8739; those of Lemna minuscula 6600, 6711, 6726, 6737 and 8739. Data of all series of experiments are shown in Table 6.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

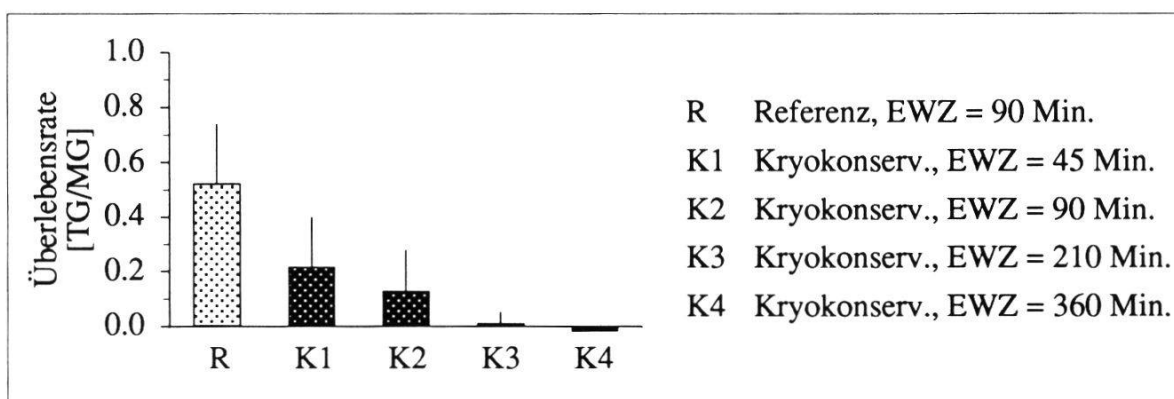


Fig. 19. Verträglichkeit gegenüber 50% Glycerin von *Lemna minor*-Pflanzen, die aus Hutner-Flüssigkulturen stammen (R), sowie Einfluss dieser Nährlösung auf die Gefrierresistenz (K1-K4). Die Pflanzen wurden mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin gekühlt.

Tolerance to 50% glycerol of Lemna minor plants grown on Hutner nutrient solution (R), and the effect of this nutrient solution on freezing resistance (K1-K4). The plants were cooled with the freezing apparatus in the presence of 50% glycerol.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

konzentration (siehe Tab. 2), wodurch bekanntlich die Aminosäure- und Proteinproduktion beeinflusst wird. Da gewisse Proteine nukleationshemmende oder membranstabilisierende Eigenschaften aufweisen (siehe Kap. 1.3), wäre es vorstellbar, dass eine nitratreiche Ernährung, wie sie durch die Hillman-Lösung gewährleistet ist, unter Umständen zu einer erhöhten Gefrier- wie auch Osmoresistenz führen kann (siehe auch Kap. 4.1). Besonders ungeeignet für die Kryokonservierung sind Pflanzen aus Hutner-Flüssigkulturen (Fig. 19). Da diese trotz der erleichterten Flüssigkeitsaufnahme keinen höheren Wassergehalt aufweisen als jene aus entsprechenden Agarkulturen (vgl. Kap. 3.6), könnte auch hier ein andersartiger, an die Flüssigkulturbedingungen angepasster Membranaufbau die Ursache der geringen Toleranz gegenüber 50%

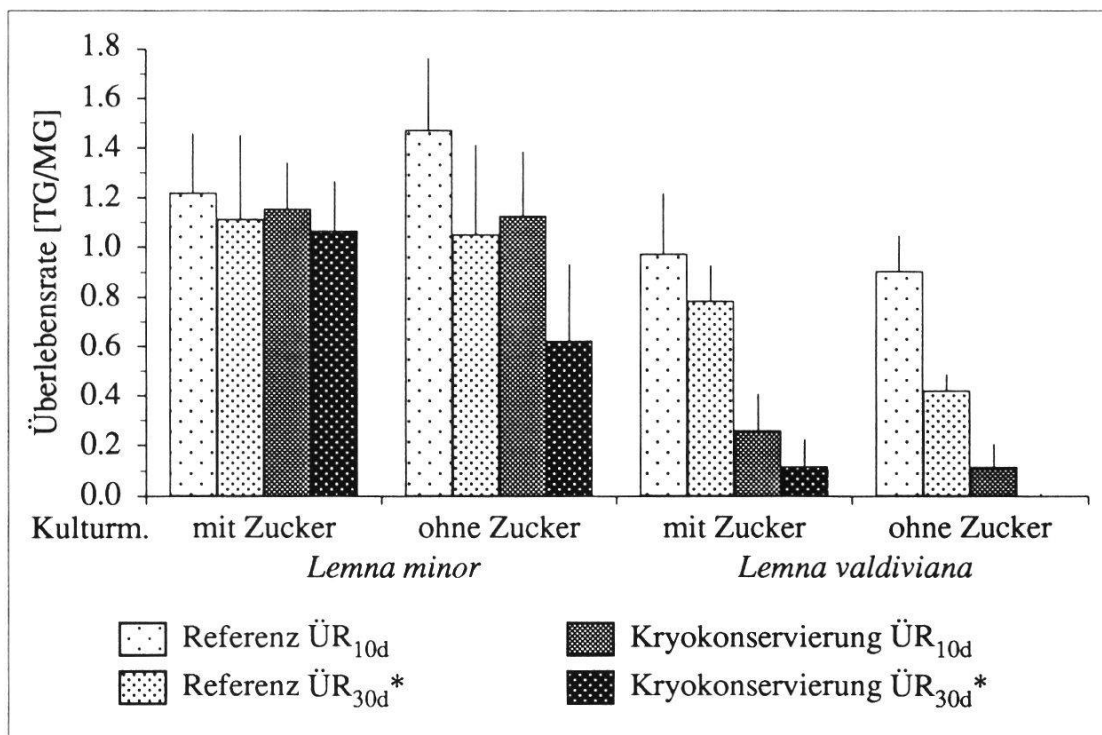


Fig. 20. Einfluss von Saccharose im Weiterzuchtmedium auf das Überleben der Knospen tiefgefrorener (Gefrierapparat) und nicht eingefrorener Pflanzen von *Lemna minor* (8765) und *Lemna valdiviana* (8845). Die Einwirkungszeit des Gefrierschutzmittels (50% Glycerin) betrug bei *Lemna minor* 90, bei *Lemna valdiviana* 30 Minuten. *Wegen dem verlangsamten Wachstum auf der zuckerfreien Nährlösung konnte die abschliessende Auszählung der ausgewachsenen Knospen jeweils erst nach 60 ($\ddot{U}R_{60d}$) anstatt 30 Tagen durchgeführt werden.

*Effect of sucrose in the nutrient medium for recovery on the survival of buds of frozen (freezing apparatus) and non-frozen plants of Lemna minor (8765) and Lemna valdiviana (8845). Lemna minor was pretreated with the cryoprotectant (50% glycerol) for 90 minutes, Lemna valdiviana for 30 minutes. *For the reason of slow growing on the sugar-free nutrient solution, the final count of recovered buds was done after 60 days ($\ddot{U}R_{60d}$) instead of 30 days.*

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

Glyzerin und der niedrigen Gefrierresistenz sein. Ähnlich wie bei auf Agar gewachsenen und mit 80% Glyzerin tiefgefrorenen Pflanzen überleben am meisten Knospen, wenn nach relativ kurzer Einwirkungszeit tiefgefroren wird. Die Frage, ob die rasche Abnahme der Überlebensrate von auf Flüssigkulturen gewachsenen Pflanzen mit einer übermässigen Dehydration der Zellen zusammenhängt, da die Plasmamembran dieser Pflanzen möglicherweise einen erhöhten Wasseraustritt erlaubt, oder ob die Membranen gegenüber hohen osmotischen Potentialen weniger druckresistent sind, kann anhand der ausgeführten Experimente nicht beantwortet werden.

Für die Weiterzucht aufgetauter Wasserlinsen spielt Saccharose als C-Quelle eine bedeutende Rolle (Fig. 20). Bei mit 50% Glyzerin behandelten, aber nicht eingefrorenen *Lemna minor*-Pflanzen konnte hingegen kein Unterschied bezüglich Überlebensrate zwischen auf saccharosehaltiger und saccharosefreier Nährlösung weitergezüchteten Pflanzen gefunden werden, wenn auch die Entwicklung der Knospen bei Abwesenheit von Saccharose bedeutend mehr Zeit in Anspruch nimmt. Offenbar sind die Knospen nicht auf eine Nahrungsversorgung durch die Mutterglieder angewiesen. Im Gegensatz dazu ist Saccharose für die Regeneration kryokonservierter Knospen sehr wichtig. Zwar konnten bei *Lemna minor* zehn Tage nach dem Auftauen, unabhängig vom Zuckergehalt, gleich viele überlebende Knospen gezählt werden, doch können ohne Saccharose bedeutend weniger Knospen zu neuen Pflanzen auswachsen. Durch die Kryokonservierung scheint eine zusätzliche Schwächung oder Schädigung der Gewebe aufzutreten, die in vielen Fällen nur dank dem Vorhandensein von Saccharose kein Absterben zur Folge hat. Ähnliche Beobachtungen können bei *Lemna valdiviana* (Stamm 8845) gemacht werden. Allerdings wachsen hier bereits bei den Referenzproben auf saccharosefreier Nährlösung weniger Knospen aus, als wenn Saccharose vorhanden ist, obwohl nach zehn Tagen noch gleich viele lebende Knospen ermittelt werden können. Bei kryokonservierten Exemplaren ist die Überlebensrate von auf saccharosefreier Nährlösung gehaltenen Pflanzen bereits nach zehn Tagen geringer als jene auf saccharosehaltiger Nährlösung weiterkultivierter Pflanzen. Ohne Saccharose können sich aber diese Knospen nicht entwickeln, wenn auch einige wenige Knospen über Monate am Leben und dabei regenerationsfähig bleiben. So konnte bei einem anderen Stamm dieser Art (8701) eine Knospe, die vier Monate nach dem Auftauen noch lebte, nach dem Übertragen auf eine saccharosehaltige Hutner-Nährlösung zu einer neuen Pflanze auswachsen.

3.2.4. Einfluss des Kulturalters

Wie aus Kap. 3.2.3 hervorgeht, spielt der physiologische Zustand der Zellen bei der Kryokonservierung eine wichtige Rolle. Dieser wird nicht nur durch das Nährmedium, sondern auch durch das Alter der Kultur beeinflusst. Besonders deutlich ist der Zusammenhang zwischen Gefrierresistenz und physiologischem Zustand bei Zellkulturen. In den meisten Fällen weisen diese eine besonders hohe Überlebensrate kurz vor und während der exponentiellen Wachstumsphase auf (SUGAWARA und SAKAI 1974, WITHERS 1978, 1985b, DIETRICH et al. 1986, REUFF et al. 1988). Nach VAN DER MEER und SIMPSON (1984) zeigt die Rotalge *Gracilaria tikvahiae* in der aktiven Phase ebenfalls eine erhöhte Gefrierresistenz, bei *Chlorella*-Kulturen andererseits eignet sich die stationäre Phase am besten zur Kryokonservierung (MORRIS 1976). Bei Meristemkulturen ist deren Alter ebenfalls von Bedeutung. So müssen abgeschnittene Vegetationsspitzen meist einige Tage auf einem Nährmedium gehalten werden, bevor sie erfolgreich kryokonserviert werden können (TOWILL 1981 und DEREUDDRE et al. 1988).

Der physiologische Zustand von *Lemnaceae* dürfte sich in den Agarkulturen aus folgenden Gründen im Laufe der Zeit ebenfalls ändern:

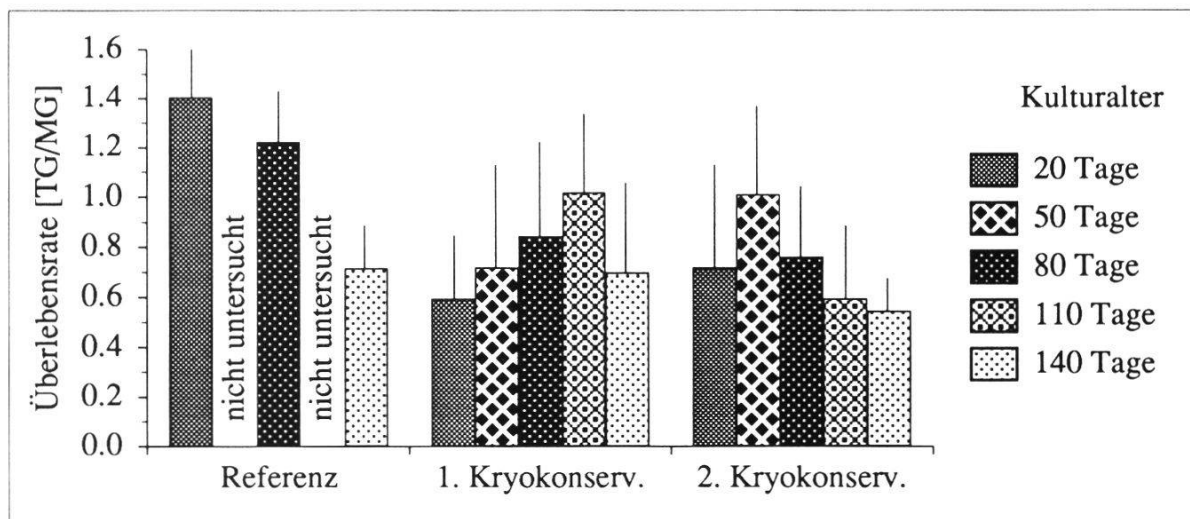


Fig. 21. Überlebensrate eingefrorener (Gefrierapparat) und nicht eingefrorener *Lemna minor*-Pflanzen in Abhängigkeit des Kulturalters. Die Proben wurden während 90 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel (50% Glyzerin) behandelt. Das Einfrierexperiment wurde einmal wiederholt.

Survival of frozen (freezing apparatus) and non-frozen Lemna minor plants in relation to the age of culture. The samples were treated for 90 minutes with the cryoprotectant (50% glycerol). The freezing experiment was repeated once.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

- Nach rund 30 Tagen ist die Agaroberfläche bei *Lemna minor*-Kulturen überwachsen, und die vegetative Vermehrung wird stark gebremst.
- Der Nährstoffgehalt des Agars dürfte bei alten Kulturen mehr oder weniger aufgebraucht sein.
- Der Agar trocknet allmählich aus. Die Nährstoffaufnahme wird dadurch erschwert und der Wassergehalt der Zellen nimmt ab (vgl. Kap. 3.6).

Aus diesen Gründen wurde das Gefrierverhalten von *Lemna minor* aus verschiedenen alten Hillman-Agarkulturen untersucht (Fig. 21). Die Gefrierexperimente wurden zweimal durchgeführt, wobei die Nährmedien aus zwei verschiedenen Herstellungsserien stammten. Die Proben wurden mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin tiefgefroren.

Aus Pflanzen von jungen, sich in einem Vermehrungsstadium befindenden Kulturen wachsen nach einer Behandlung mit Glycerin bedeutend mehr Knospen als aus solchen von sehr alten Kulturen (140 Tage), obwohl diese Pflanzen gleich viele Knospen aufweisen wie die der frischen Kulturen (siehe Kap. 3.5). Es wäre allerdings möglich, dass bei alten Kulturen verschiedene Knospen geschwächt und nicht mehr fähig sind auszuwachsen, weil der Agar dieser Kulturen bereits sehr stark ausgetrocknet und geschrumpft ist. Des weitern sollte auch in Betracht gezogen werden, dass sich der Membranaufbau mit zunehmendem Alter ändern könnte, möglicherweise derart, dass die Osmotoleranz der Zellen abnimmt. Sehr alte Kulturen eignen sich somit für die Kryokonservierung weniger gut, aber auch junge Kulturen zeigen trotz der guten Verträglichkeit gegenüber 50% Glycerin eine vergleichsweise geringe Gefrierresistenz. Pflanzen aus mittleren Altersklassen sind besonders gefrierresistent, wobei das optimale Kulturalter variieren kann. So fand bei den Kulturen für das zweite Experiment wahrscheinlich eine bedeutend raschere Alterung statt. Dies hängt möglicherweise mit der Festigkeit der Agars zusammen, die erfahrungsgemäss zwischen den einzelnen Herstellungsserien unterschiedlich sein kann. Des weitern muss in Betracht gezogen werden, dass der Wassergehalt des Agars während der Aufbewahrung bei 3°C allmählich abnehmen und somit der anfängliche Feuchtigkeitsgehalt je nach Lagerdauer unterschiedlich sein dürfte. Es muss auch erwähnt werden, dass die Pflanzen nach dem Abimpfen auf Agarröhrchen eine Angewöhnungszeit benötigen, die nicht konstant ist.

3.2.5. Stickstofflagerung über längere Zeiträume

Aus den in Kap. 1.1 angeführten Gründen sollte eine Langzeitlagerung von lebendem Material in flüssigem Stickstoff problemlos sein. Verschiedene Autoren erbrachten den Nachweis, dass pflanzliches Material in Form von Flüssigkulturen (ROTH 1983, DIETRICH et al. 1985, STRAUSS et al. 1985, REUFF et al. 1988), als Kalluskultur (ULRICH et al. 1984), Knospen (SAKAI und NISHIYAMA 1978) oder Meristemkulturen (BAJAJ 1981, 1983a,b) bedenkenlos für mindestens ein Jahr bei tiefsten Temperaturen aufbewahrt werden kann. Allerdings nahm bei SAKS (1978) die Überlebensrate von verschiedenen Algenarten, die er zwischen einem Tag und einem Jahr in flüssigem Stickstoff tiefgefroren hielt, mit zunehmender Lagerdauer ab. Eine mögliche Ursache hierfür gibt er nicht an.

Lemna minor wurde während maximal 21 Monaten in flüssigem Stickstoff gelagert (Fig. 22). Die Proben stammten aus Agarröhrchen der gleichen Herstellungsserie und wurden gleichzeitig mit dem Gefrierapparat eingefroren. Danach wurde alle drei Monate Material aufgetaut, ausser der ersten Probeentnahme, die bereits nach 40 Tagen stattfand. Mit Ausnahme der nach neun Monaten aufgetauten Pflanzen, deren Überlebensrate aussergewöhnlich

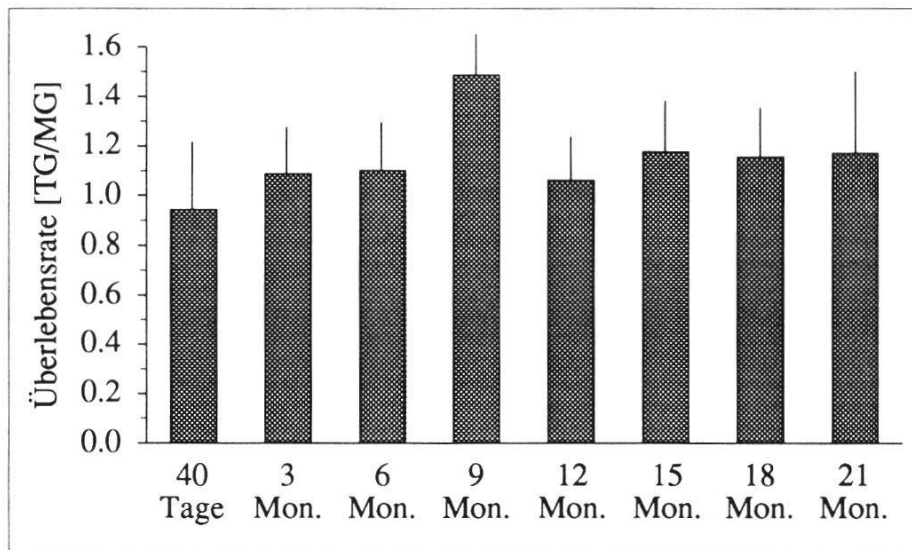


Fig. 22. Einfluss der Lagerdauer (40 Tage bis 21 Monate) in flüssigem Stickstoff auf die Überlebensrate von *Lemna minor*. Als Gefrierschutzmittel wurde 50% Glycerin verwendet, das 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben wurde. Alle Proben wurden gleichzeitig mit dem Gefrierapparat tiefgefroren.

Effect of storage duration (40 days to 21 months) in liquid nitrogen on the survival of Lemna minor. 50% glycerol was used as cryoprotectant added 90 minutes before freezing. All specimens were frozen simultaneously with the freezing apparatus.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

hoch war, ist die Vitalität der Pflanzen, unabhängig von der Lagerdauer, gleich gut. Es kann wohl davon ausgegangen werden, dass sowohl *Lemna minor* als auch andere *Lemnaceae*-Arten für lange Zeit ohne Qualitätseinbuße in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden können.

3.3. ANWENDUNG VIELVERSPRECHENDER METHODEN BEI VERSCHIEDENEN ARTEN UND STÄMMEN

3.3.1. Testung sämtlicher *Lemnoideae*-Arten

Anhand der mit *Lemna minor* gewonnenen Daten und Erkenntnisse wurde eine für diese Art optimale Methode entwickelt, die nun bei der Kryokonservierung aller *Lemnoideae*-Arten angewandt wurde. Von jeder Art wurden meist zwei bis drei Stämme getestet (Fig. 23). Es muss dazu bemerkt werden, dass für einige Schritte mehrere gleich gute Varianten zur Auswahl standen, wie beispielsweise bei der Wahl der Glycerinkonzentration (50% bis 60%) oder der Kühlgeschwindigkeit (rascher als $-3^{\circ}/\text{Min.}$). Da *Lemna minor* eine eher robuste Art sein dürfte, wurde in solchen Fällen die voraussichtlich schonendste Variante gewählt. Das Verfahren enthält daher die folgenden Schritte:

- Anzucht auf saccharosehaltigem Hillman-Agar, meist während 50 Tagen.
- Verwendung von 50% Glycerin als Gefrierschutzmittel.
- Vorbehandlung mit dem Gefrierschutzmittel während 90 Minuten bei Zimmertemperatur.
- Einfrieren mit dem Gefrierapparat (Programm: T-25/1a).
- Auftauen der Kryoröhrchen im 30°C -Wasserbad.
- Weiterzucht der Pflanzen auf saccharosehaltiger Hutner-Lösung. (Bemerkung: Die Hillman-Nährstoffzusammensetzung wurde am Geobotanischen Institut praktisch nie für Flüssigkulturen verwendet und daher hier nicht als Weiterzuchtmedium getestet).

Weil sich nicht alle Arten gleich rasch vermehren, musste die Dauer der Anzucht teilweise abgeändert werden. *Lemna disperma*-Kulturen beispielsweise altern sehr rasch und mussten daher nach spätestens 30 Tagen eingefroren werden. Bei einzelnen Arten und Stämmen ist bereits nach der 90-minütigen Vorbehandlung mit 50% Glycerin ein Grossteil der Knospen abgestorben. Aus diesem Grund wurde mit allen Stämmen eine weitere Versuchsreihe mit verkürzter Einwirkungszeit (30 Minuten) durchgeführt, deren Resultate ebenfalls in der Figur 23 dargestellt sind.

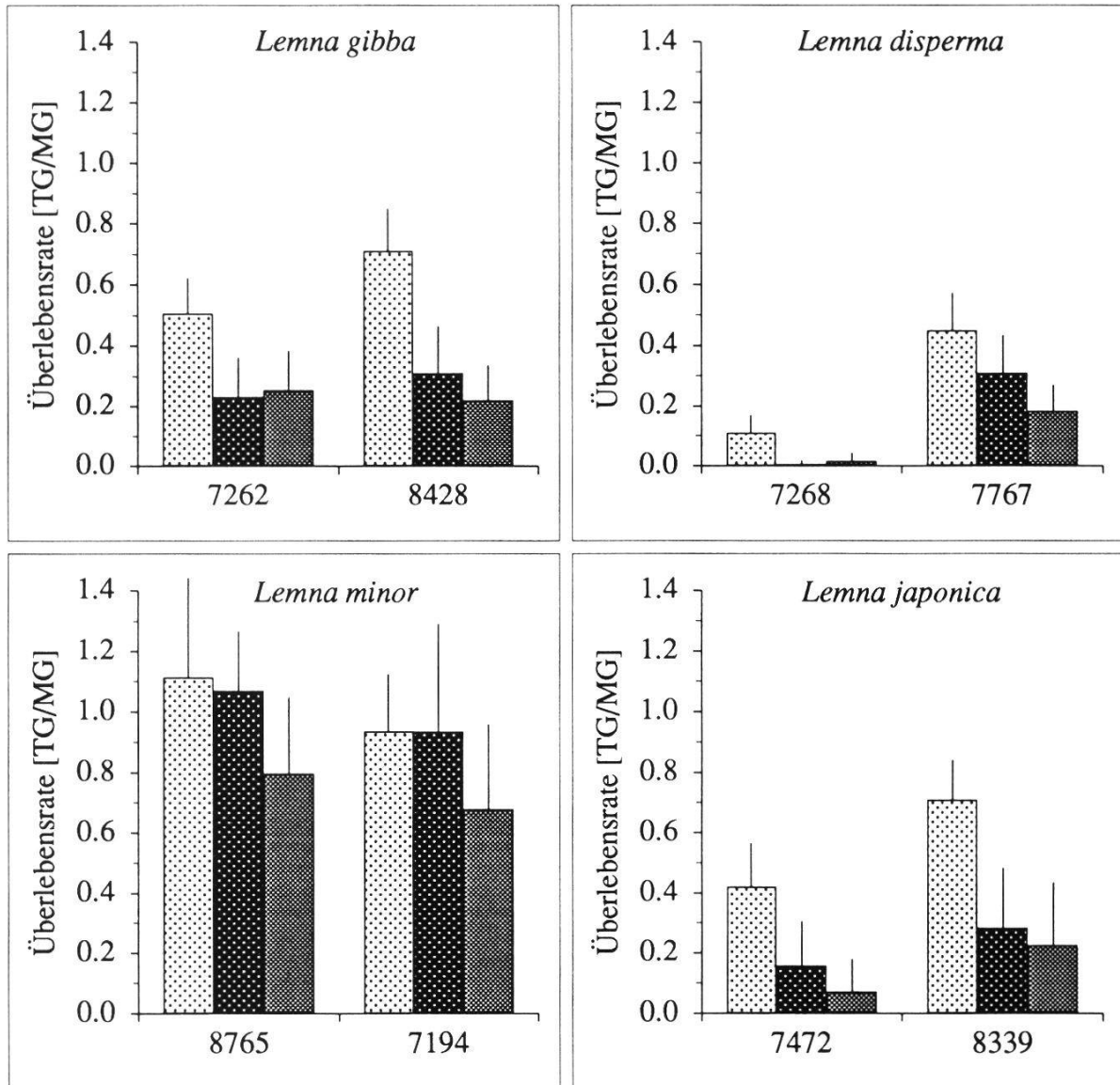


Fig. 23. Testung aller *Lemnoideae*-Arten – Testing of all *Lemnoideae* species.

1. Säule: Überlebensrate nicht eingefrorener Pflanzen, nach einer 90-minütigen Behandlung mit 50% Glycerin.

1st column: Survival of non-frozen plants treated for 90 minutes with 50% glycerol.

2. Säule: Überlebensrate eingefrorener Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin 90 Minuten nach der Gefrierschutzmittelzugabe tiefgekühlt wurden.

2nd column: Survival of frozen plants, cooled with the freezing apparatus in the presence of 50% glycerol, 90 minutes after addition of the cryoprotectant.

3. Säule: Überlebensrate eingefrorener Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin 30 Minuten nach der Gefrierschutzmittelzugabe tiefgekühlt wurden.

3rd column: Survival of frozen plants, cooled with the freezing apparatus in the presence of 50% glycerol, 30 minutes after addition of the cryoprotectant.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

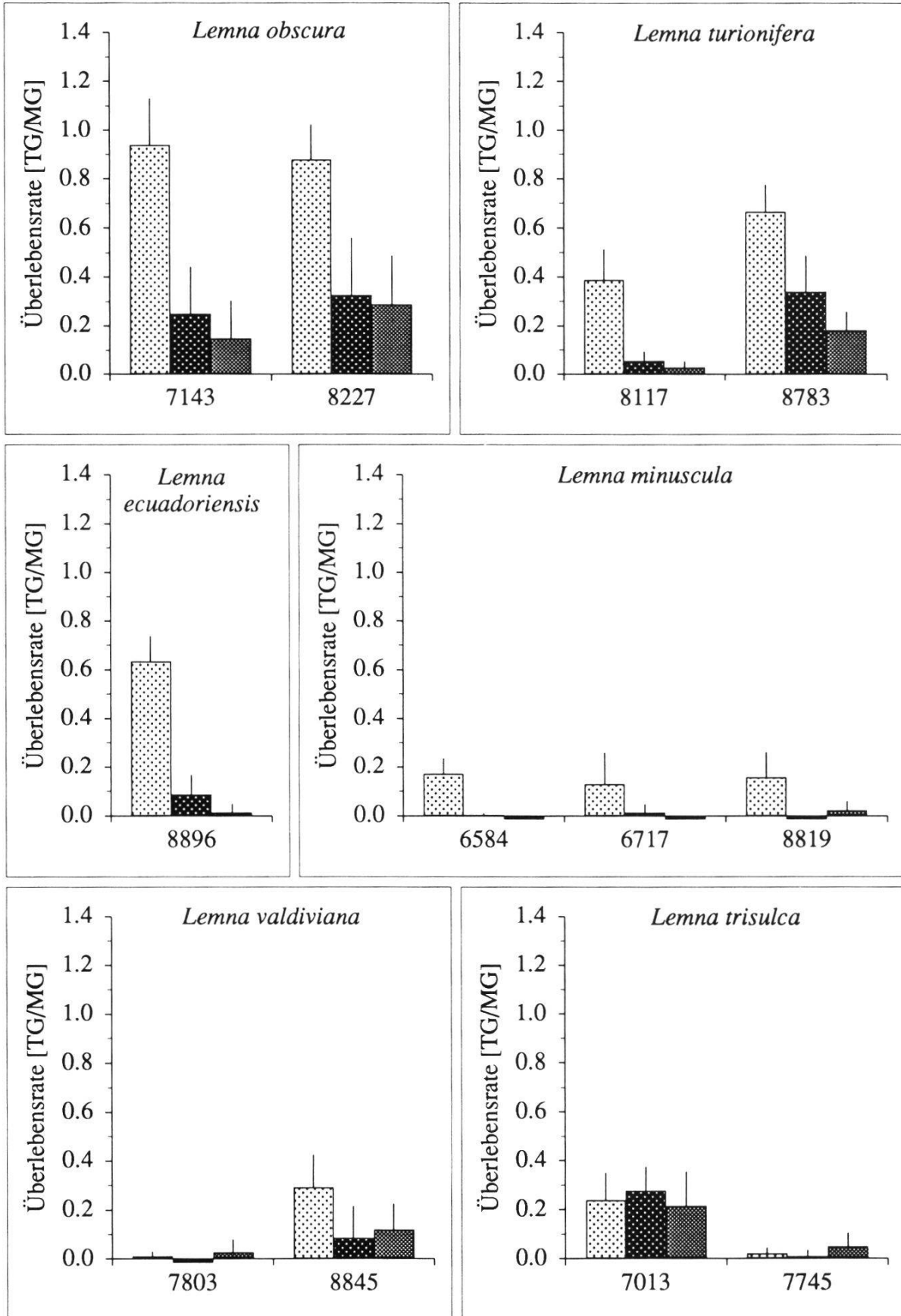


Fig. 23 (Forts. – continued)

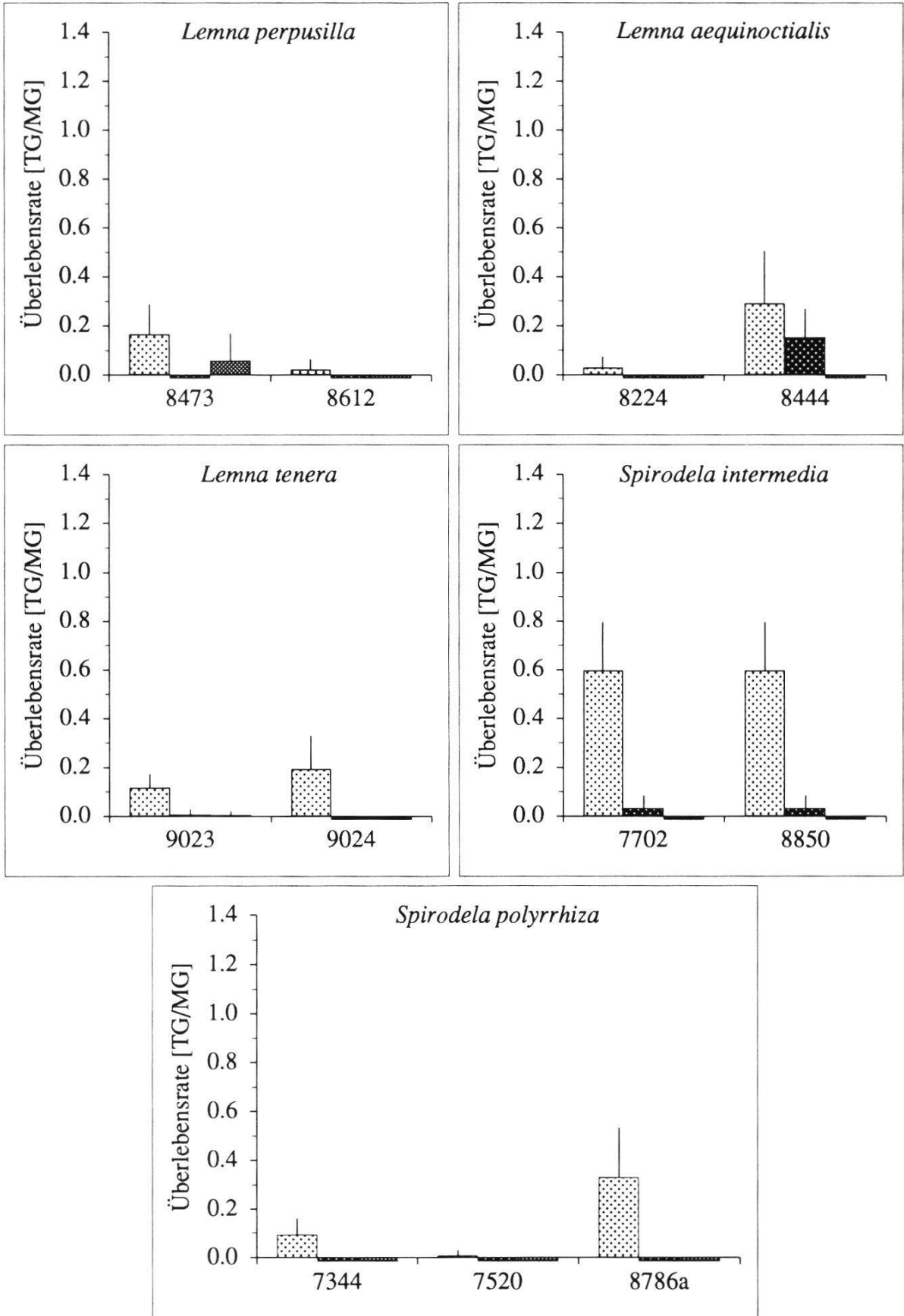


Fig. 23 (Forts. – continued)

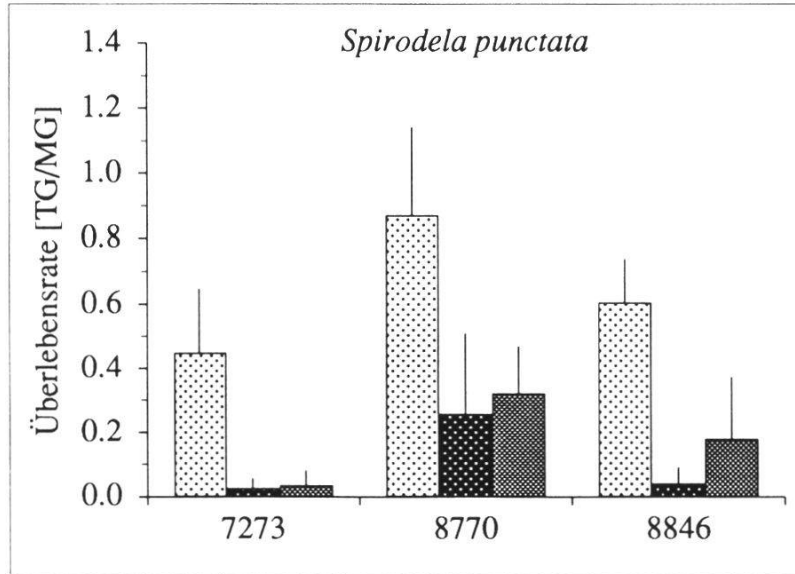


Fig. 23 (Forts. – continued)

Mit verschiedenen weiteren Stämmen wurden ebenfalls Kryoversuche durchgeführt. Dabei kamen auch andere Methoden zur Anwendung, gekühlt wurde jedoch immer mit dem gleichen Einfrierprogramm (T-25/1a). Die Resultate dieser Experimente sind in den Tabellen 5 und 6 aufgeführt, wobei die für Tabelle 5 verwendeten Kulturen 90, die restlichen 50 Tage alt waren.

Zwischen den Arten, wie auch zwischen den Stämmen innerhalb einer Art können grosse Unterschiede bezüglich der Gefrierresistenz und der Toleranz gegenüber der starken osmotischen Wirkung von 50% Glycerin festgestellt werden. Praktisch alle Autoren, die Kryokonservierungsversuche entweder mit verschiedenen Arten aus der gleichen Gattung (REED 1989) oder mit verschiedenen Stämmen und Rassen einer Art (CHEN et al. 1984a, DEREUDDRE et al. 1987, POLITO und LUZA 1988, TYLER et al. 1988) durchführten, konnten bezüglich Gefrierresistenz ebenfalls beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arten beziehungsweise Stämmen feststellen. TOWILL (1984), der sowohl mit verschiedenen *Solanum*-Arten, wie auch mit einigen Kulturformen von *Solanum tuberosum* arbeitete, kam zum selben Schluss.

Bei 50 Tage alten Kulturen konnten von jeder Art, mit Ausnahme von *Spirodela polyrrhiza*, bei zumindest einem Stamm auswachsende Tochterglieder nachgewiesen werden. Wie jedoch aus Tabelle 5 hervorgeht, wurden mit alten *Spirodela polyrrhiza*-Kulturen ebenfalls positive Resultate erzielt. Diese Ergebnisse waren jedoch seither nicht mehr reproduzierbar. *Lemna minor* ist offenbar eine sehr robuste Art und für eine Lagerung in flüssigem Stickstoff

Tab. 6. Überlebensraten [TG/MG] einiger *Lemna valdiviana*- und *Lemna minuscula*-Stämme, die in 50% Glycerin mit dem Gefrierapparat tiefgefroren wurden. Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 30 oder 60 Minuten vor dem Einfrieren.

Survival [TG/MG] of some Lemna valdiviana and Lemna minuscula clones cooled with the freezing apparatus in the presence of 50% glycerol. The cryoprotectant was added 30 or 60 minutes before freezing.

TG = Tochterglied – *daughter frond*, MG = Mutterglied – *mother frond*

Art	Anz.-med.	Hillman		Hutner	
	Stamm	EWZ=30 M.	EWZ=60 M.	EWZ=30 M.	EWZ=60 M.
<i>Lemna valdiviana</i>	7005	0.02	0.02	0.01	0.01
	7227	0.03	0.13	0.02	0.06
	7284	0.03	0.03	0.05	0.05
	7288	0.01	0.14	0.01	0.04
	7329	0.08	0.11	neg.	0.01
<i>Lemna minuscula</i>	6600	0.02	0.02	neg.	neg.
	6711	neg.	0.01	neg.	neg.
	6726	neg.	0.01	0.01	neg.
	6737	neg.	neg.	neg.	neg.
	8739	0.01	0.02	neg.	neg.

sehr gut geeignet. Alle übrigen Arten sind bedeutend weniger gefrierresistent, obwohl gewisse Stämme, beispielsweise die getesteten *Lemna obscura*-Stämme, eine ähnlich hohe Toleranz gegenüber dem Gefrierschutzmittel aufweisen wie jene von *Lemna minor*. Mit Ausnahme von *Lemna minor* und *Lemna trisulca* ist die Überlebensrate kryokonservierter Proben immer deutlich geringer als jene nicht eingefrorener Referenzproben, wenn die Einwirkungszeit 90 Minuten betrug. Durch die Verkürzung der Einwirkungszeit auf 30 Minuten kann die Überlebensrate der kryokonservierten Pflanzen nur in wenigen Fällen eindeutig erhöht werden. Von den insgesamt 34 in Figur 23 getesteten Stämmen war dies lediglich bei je einem Stamm von *Spirodela punctata*, *Lemna trisulca* und *Lemna perpusilla* der Fall.

3.3.2. Methodische Abänderungen bei vier Arten

TYLER und STUSHNOFF (1984) konnten bei der Kryokonservierung von Knospen einiger Apfelsorten bei der Anwendung derselben Methode ebenfalls unterschiedlich hohe Überlebensraten der einzelnen Rassen ermitteln. Wurde jedoch für jede Sorte eine eigene, optimal wirkende Methode entwickelt, konnte schlussendlich bei allen Sorten eine gleich hohe Überlebensrate erzielt werden. Die für *Lemna minor* konzipierte Methode dürfte für viele Arten eben-

falls keinen optimalen Gefrierschutz bieten. Genau genommen müsste für jeden Stamm eine eigene Methode entwickelt werden, was den Rahmen dieser Arbeit aber bei weitem sprengen würde. Anhand von vier Arten, die auf die im vorangegangenen Kapitel angewandte Methode recht unterschiedlich reagieren, wurde versucht abzuklären, welche Änderungen sich am besten eignen könnten. Die verwendeten Arten wurden aus den nachfolgend aufgeführten Gründen ausgewählt:

- *Spirodela polyrrhiza*, Stämme 7520 und 8786a: Die Art scheint von allen *Lemnoideae*-Arten am schwierigsten zu kryokonservieren zu sein. Zudem erträgt der Stamm 7520 die Einwirkung von 50% Glycerin sehr schlecht. Die Pflanzen wurden mit der gleichen, im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Methode eingefroren, die Glycerinkonzentration wurde jedoch auf 60% erhöht. Wegen der stärkeren Osmolarität dieser Lösung kommen nur kürzere Einwirkungszeiten um 30 Minuten in Frage. Beim Stamm 7520 wurden zudem einige Proben mit der Freonmethode tiefgefroren.
- *Lemna ecuadoriensis*, Stamm 8896: Die Überlebensrate der tiefgefrorenen Proben ist recht niedrig, obwohl die Art hohe Glycerinkonzentrationen verhältnismässig gut erträgt. Sollten die Knospen während der Kryokonservierung hauptsächlich durch Eiskristalle abgetötet werden, wäre durch eine Verminderung des Kristallwachstums (Erhöhung der Gefrierschutzmittelkonzentration oder Erhöhung der Kühl- und Auftaugeschwindigkeit) eine markante Steigerung der Überlebensrate zu erreichen.
- *Lemna tenera*, Stämme 9023 und 9024: Für diese sehr seltene und möglicherweise vom Aussterben bedrohte Art sollte unbedingt eine zufriedenstellende Methode gefunden werden. Angewandt wurde die bereits bei *Spirodela polyrrhiza* erwähnte Einfriermethode mittels Gefrierapparat und 60% Glycerin als Gefrierschutzmittel.
- *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Die Pflanzen reagieren äusserst sensibel auf 50% Glycerin. Neben einer weiteren Senkung der Kristallbildung könnte daher die Verminderung des osmotischen Stresses während der Einwirkungsphase eine wichtige Massnahme sein, um die Überlebensrate der kryokonservierten Pflanzen zu erhöhen. Sofern nichts weiter erwähnt ist, wurden die Pflanzen mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt. Es wurden die folgenden Methoden getestet:
 1. Senkung des Glyceringehalts auf 40%. Wie aus Versuchen mit *Lemna minor* hervorgeht, dürfte mit dieser Gefrierschutzlösung höchstens ultraschnelles Einfrieren und Auftauen (Freonmethode) erfolgreich sein.
 2. Verwendung von 10% DMSO-40% Glycerin. Die Lösung sollte dank

der guten Membranpermeabilität für DMSO osmotisch weniger aktiv sein. Obwohl bei *Lemna minor* die Überlebensrate der Referenz dadurch nicht erhöht werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei auf osmotische Änderungen sensibler reagierende Pflanzen ein diesbezüglicher Unterschied erkennbar ist. Nach den Versuchen mit *Lemna minor* zu urteilen, sollte diese Lösung einen gleich guten Gefrierschutz bieten wie 50% Glycerin.

3. Verkürzung der Einwirkungszeit. Bei *Lemna minor* muss 50% Glycerin recht lange einwirken können, bis ein optimaler Gefrierschutz gewährleistet ist. Wird jedoch 80% Glycerin verwendet, das die Knospen bereits nach kurzer Zeit ziemlich stark schädigt, ist die Überlebensrate kryokonservierter Pflanzen nach sehr kurzen Einwirkungszeiten am

Tab. 7. Titrationsverfahren, das bei *Lemna valdiviana* (Stamm 7803) in Fig. 31 angewandt wurde.

Titration procedure applied to Lemna valdiviana (clone 7803) in Fig. 31.

- Glycerintitration: Die Pflanzen befanden sich in 7.5 ml sterilem Leitungswasser. Es wurden total 22.5 ml einer 75% Glycerinlösung in 15 Schritten dazutitriert. Das Zeitintervall betrug 5 Minuten.

Glycerol titration: The plants were in 7.5 ml sterile tap water. A total of 22.5 ml of a 75% glycerol solution was added in 15 steps of 5 minutes each.

- Titration von sterilem Leitungswasser nach dem Auftauen: Die Pflanzen befanden sich anfänglich in 5 ml 50% Glycerin. Es wurden total 122.4 ml Wasser in 15 Schritten dazutitriert. Das Zeitintervall betrug 5 Minuten.

Titration of sterile tap water after thawing: The plants were initially in 5 ml 50% glycerol. A total of 122.4 ml water was added in 15 steps of 5 minutes each.

Schrittnummer	Glycerintitration		Titration von Wasser	
	Menge [ml]	Konzentration [%]	Menge [ml]	Konzentration [%]
1	0.3	2.9	0.6	44.6
2	0.3	5.6	1.0	37.9
3	0.3	8.0	1.0	32.9
4	0.3	10.3	1.1	28.7
5	0.3	12.5	2.0	23.4
6	0.5	15.8	2.1	19.5
7	0.5	18.8	2.1	16.8
8	0.5	21.4	4.1	13.2
9	1.0	26.1	4.2	10.8
10	1.0	30.0	4.2	9.1
11	1.0	33.3	10.0	6.7
12	2.0	38.7	10.0	5.3
13	2.0	42.9	20.0	3.7
14	2.0	46.2	30.0	2.6
15	3.0	50.0	30.0	2.0

höchsten. Da 50% Glycerin die Pflanzen des Stammes 7803 mindestens ebenso stark schädigt wie 80% Glycerin den getesteten *Lemna minor*-Stamm, müssen hier, bei der Verwendung von 50% Glycerin, Einwirkungszeiten von höchstens 15 Minuten nicht unbedingt aussichtslos sein.

4. Schrittweise Zugabe und Entfernung des Gefrierschutzmittels. Sowohl tierische wie auch pflanzliche Zellen ertragen hohe Glycerinkonzentrationen wesentlich besser, wenn der Glyzeringehalt allmählich erhöht und am Ende des Versuchs die Gefrierschutzlösung wieder langsam verdünnt wird (RICHTER 1968, ZELMAN et al. 1984). Die Glycerinzugabe erfolgte durch Titration nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Schema. Danach wurden die Pflanzen nach 30-minütiger Einwirkungszeit mit dem Gefrierapparat eingefroren. Aufgetaute Pflanzen wurden entweder wie bisher direkt in steriles Leitungswasser abgeimpft, oder das Gefrierschutzmittel wurde durch die schrittweise Zugabe des Leitungswassers allmählich verdünnt (siehe Tab. 7). Zu Vergleichszwecken wurde der Einfrierversuch zusätzlich mit *Lemna minor* (Stamm 8765) durchgeführt. Die Zeitdauer zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurde allerdings für diese Art verlängert (20 Minuten), die anschließende Einwirkungszeit ebenfalls (60 Minuten).
5. Verhinderung des Kristallwachstums bei 50% Glycerin durch ultraschallisches Einfrieren und Auftauen.
6. Verhinderung des Kristallwachstums der extrazellulären Lösung durch Erhöhung der Glycerinkonzentration auf 60%. Wegen der schwachen Osmotoleranz dieses Stammes kommen nur sehr kurze Einwirkungszeiten in Frage.

Diese Untersuchungen führten zu recht unterschiedlichen Ergebnissen, die für jede Art einzeln besprochen werden.

Spirodela polyrrhiza (Fig. 24)

Obwohl bei der Verwendung von 60% Glycerin während dem Einfrieren und Auftauen kein Kristallwachstum im extrazellulären Bereich stattfinden sollte, konnten die Pflanzen nicht erfolgreich kryokonserviert werden. Beim Stamm 7520 konnten bei den aufgetauten Proben immerhin wenige lebende Knospen gefunden werden. Die $\dot{U}R_{10d}$ betrug bei beiden Einfrierexperimenten 0.01 TG/MG. Insgesamt drei dieser Knospen wuchsen sogar aus, blieben aber sukulent und starben innerhalb von drei Monaten ab. Durch die Einwirkung dieses Gefrierschutzmittels während 30 Minuten werden deutlich weniger Knospen abgetötet, als nach einer 90-minütigen Behandlung mit 50% Glycerin.

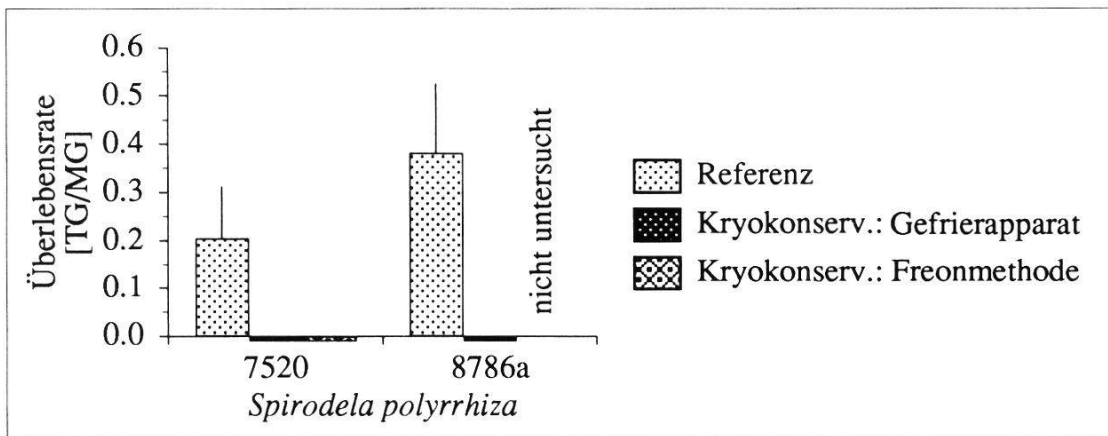


Fig. 24. *Spirodela polyrrhiza*: Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht eingefrorener Pflanzen, die während 30 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel behandelt wurden. Die Pflanzen wurden mit dem Gefrierapparat oder durch direktes Eintauchen in flüssiges Freon gekühlt.

Spirodela polyrrhiza: Effect of 60% glycerol on the survival of frozen and non-frozen plants treated for 30 minutes with the cryoprotectant. The plants were cooled with the freezing apparatus or by direct immersion in liquid freon.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

Lemna ecuadoriensis (Fig. 25, 26)

Nach einer 30-minütigen Einwirkung von 60% Glycerin leben ungefähr gleich viele Knospen wie nach einer 90-minütigen Behandlung mit 50% Glycerin. Die Überlebensrate der mit dem Gefrierapparat gekühlten Pflanzen konnte jedoch dank dem Gebrauch von 60% Glycerin drastisch erhöht werden. Wird 50% Glycerin verwendet, kann die gleiche Verbesserung durch ultraschnelles Einfrieren und Auftauen mit der Freonmethode erreicht werden. Wird mit 60% Glycerin nach einer 90-minütigen Einwirkungszeit tiefgefroren, überleben deutlich weniger Knospen als nach einer 30-minütigen Behandlung, doch ist die Überlebensrate gleich hoch wie jene der nicht eingefrorenen Referenzproben. Diese Resultate erinnern an jene aus entsprechenden Versuchen mit *Lemna minor*, wo bei genügend langer Einwirkungszeit ebenfalls ein praktisch 100%iger Gefrierschutz erreicht wird. Es kann daher vermutet werden, dass die nach einer 30-minütigen Einwirkungszeit erzielte Überlebensrate der kryokonservierten Pflanzen durch eine Verlängerung der Einwirkungszeit gar noch erhöht werden könnte. Die optimale Einwirkungszeit muss aber deutlich unter 90 Minuten liegen.

Auffallend bei dieser Art ist, dass bei der Kryokonservierung mit 60% Glycerin 10 Tage nach dem Auftauen bedeutend mehr lebende Knospen gezählt werden können, als danach zu normal gebildeten Pflanzen auswachsen. Viele

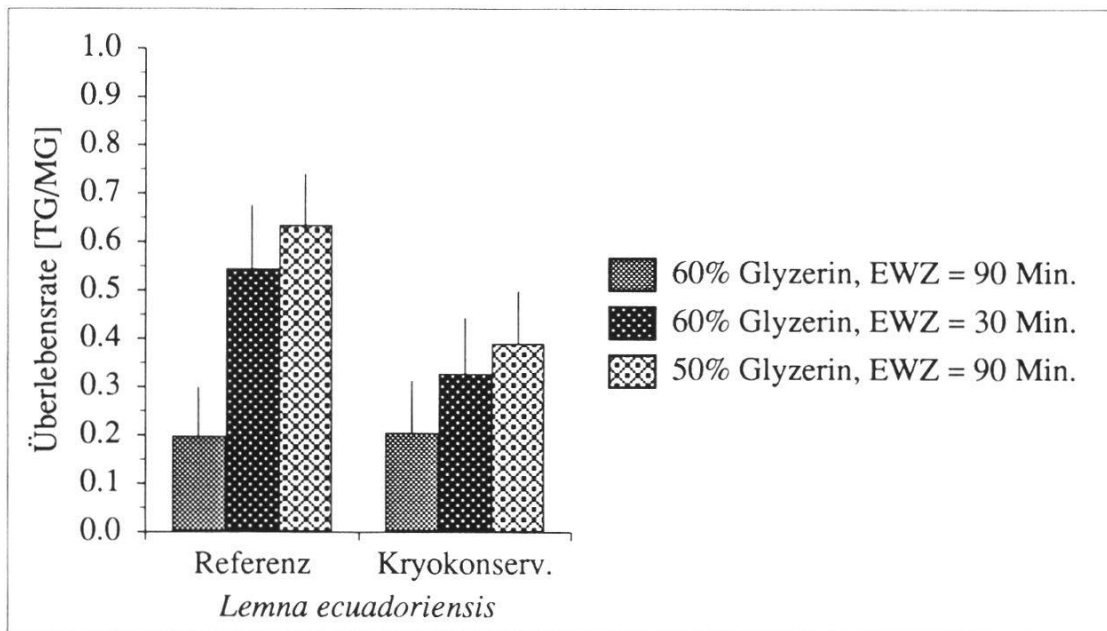


Fig. 25. *Lemna ecuadoriensis*: Vergleich der Überlebensraten von Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat in 60% Glyzerin tiefgefroren wurden, mit der Überlebensrate von ultraschall eingefrorenen und aufgetauten Pflanzen unter Verwendung von 50% Glyzerin. Im ersten Block sind die entsprechenden Referenzwerte nicht tiefgefrorener Proben dargestellt.

Lemna ecuadoriensis: Comparison of the survival of plants cooled with the freezing apparatus in the presence of 60% glycerol with the survival of plants which were ultra-rapidly frozen and thawed (freon method) in the presence of 50% glycerol. Corresponding values of non-frozen specimens are represented by the first block.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

der bei der zweiten Zählung nicht mehr berücksichtigten Knospen wuchsen zwar ebenfalls aus, blieben aber kallusförmig respektive sukkulent. Hormone können unter Umständen die Regenerationsfähigkeit meristematischer Gewebe erhöhen und daher eine wichtige Komponente des Nährmediums zur Weiterzucht darstellen (WITHERS 1985a). Wegen dem vielfältigen Wirkungsspektrum dieser Stoffe ist die Wahl des richtigen Hormons ausserordentlich schwierig. Wie verzwickelt die Angelegenheit sein kann, zeigt das folgende Beispiel. KARTHA et al. (1988) stellten fest, dass *Picea glauca*-Kalli Knospen bilden, sofern ein Zytokinin im Nährmedium vorhanden ist. Enthält das Nährmedium weitere Hormone, wird diese Ausdifferenzierung jedoch verhindert. Die durch das Zytokinin induzierten Knospen können aber nur unter hormonfreien Bedingungen austreiben. Bei *Lemna ecuadoriensis* wurde untersucht, ob durch die Anwesenheit des Zytokinins Zeatin (Sigma) in einer 10^{-3} mM Konzentration kallusierete Knospen vermehrt zu opaken Gliedern auswachsen. Bei diesem Experiment fielen die Überlebensraten der Referenz wie auch der

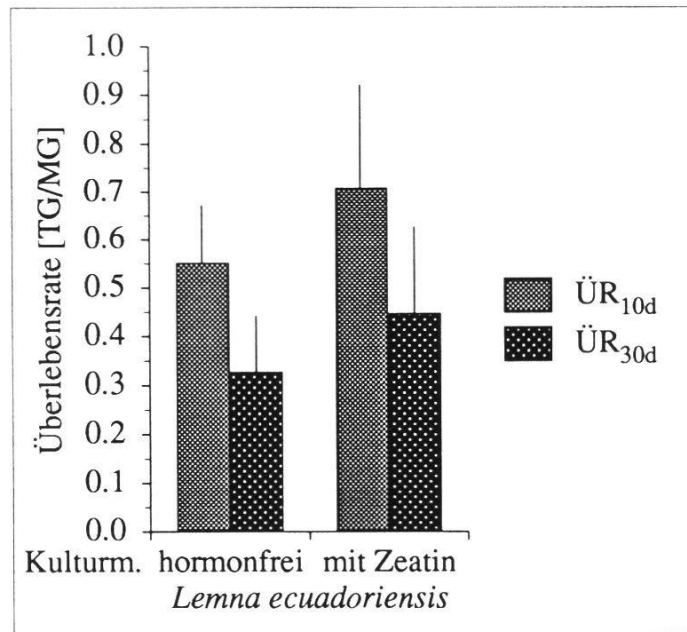


Fig. 26. Einfluss von Zeatin (10^{-3} mM) im Weiterzuchtmedium auf die Überlebensrate von *Lemna ecuadoriensis*-Pflanzen die mit dem Gefrierapparat in 60% Glycerin tiefgekühlt wurden. Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 30 Minuten vor dem Einfrieren.

*Effect of Zeatin (10^{-3} mM) in the recovery solution on the survival of *Lemna ecuadoriensis* plants cooled with the freezing apparatus in the presence of 60% glycerol. The cryoprotectant was added 30 minutes before freezing.*

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

tiefgefrorenen Proben ein wenig höher aus, doch das Verhältnis der beiden Werte blieb gleich. Zeatin besitzt offenbar in der verwendeten Konzentration keine kallushemmende Wirkung, unterdrückt aber auch nicht die Bildung opaker Glieder, wie dies bei *Lemna minor* mit dem Zytokinin Isopentenyl-Adenin in einer allerdings mehr als zehn mal höheren Konzentration der Fall ist (FRICK 1991). Vielleicht wäre die Verwendung von Gibberelinsäure erfolgreicher gewesen, wie dies GROUT et al. (1978) für die Regeneration kryokonservierter Tomatenvegetationsspitzen vorschlagen.

Lemna tenera (Fig. 27)

Durch die Verwendung von 60% Glycerin bei einer Einwirkungszeit von 30 Minuten konnte die Überlebensrate der Referenzproben wie auch der tiefgefrorenen Pflanzen deutlich erhöht werden. Beide Stämme sind ungefähr gleich gefrierresistent.

Lemna valdiviana (Fig. 28 bis 33)

Bei dem untersuchten Stamm gelang keine wesentliche Verbesserung der Ge-

frierresistenz. Bei Experimenten mit 60% Glycerin konnte zwar ein vermehrtes Auswachsen von Knospen festgestellt werden, es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei dieser Versuchsreihe auch die Überlebensrate der nicht eingefrorenen Proben ungewöhnlich hoch war (vgl. Fig. 30 und 33). Eine Abschätzung, inwieweit es sich dabei um eine methodische Verbesserung handelt, ist daher nicht möglich. Wird 50% Glycerin verwendet, scheint gegenüber der ursprünglichen Methode keine wesentliche Steigerung möglich zu sein. Im Gegensatz zu *Lemna ecuadoriensis* kann selbst durch die Anwen-

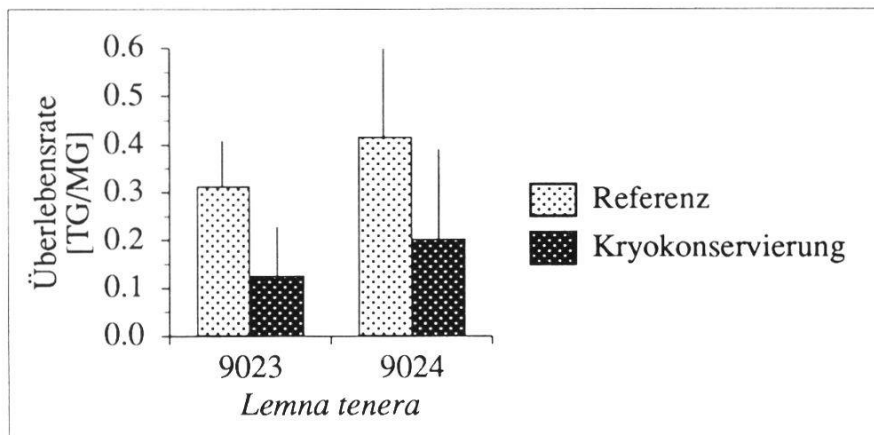


Fig. 27. *Lemna tenera*: Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht eingefrorener Pflanzen, die während 30 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel behandelt wurden. Einfrierexperimente wurden mit dem Gefrierapparat durchgeführt.

Lemna tenera: Effect of 60% glycerol on the survival of frozen and non-frozen plants which were treated with the cryoprotectant for 30 minutes. Freezing experiments were conducted with the freezing apparatus.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

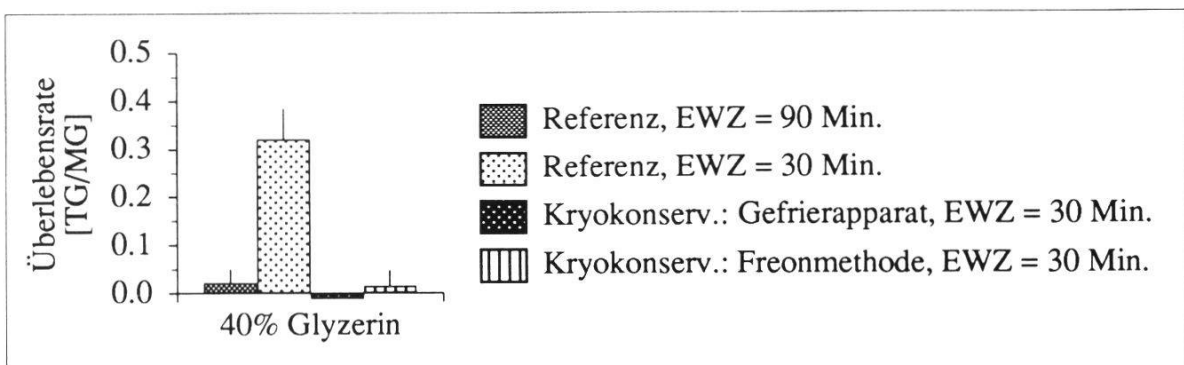


Fig. 28. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Referenz- und Einfrierversuche (Gefrierapparat und Freonmethode) unter Verwendung von 40% Glycerin als Gefrierschutzmittel.

Lemna valdiviana, clone 7803: Reference and freezing experiments (freezing apparatus and freon method) using 40% glycerol as cryoprotectant.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

dung der Freonmethode die Gefrierresistenz nicht erhöht werden, die nicht einmal höher ist, als wenn 40% Glycerin verwendet wird. Durch die schrittweise Zugabe des Gefrierschutzmittels kann der osmotische Stress offenbar vermindert werden, die Überlebensrate kryokonservierter Pflanzen ist jedoch nicht deutlich höher. Die allmähliche Verdünnung des Gefrierschutzmittels nach dem Auftauen scheint die Pflanzen sogar zusätzlich zu schädigen, da auch die zum Vergleich herangezogene *Lemna minor* dadurch eine deutliche Einbusse ihrer Überlebensrate erleidet. Auch durch das Ersetzen eines Fünftels des Glycerins durch DMSO konnte kein Fortschritt erzielt werden. Das

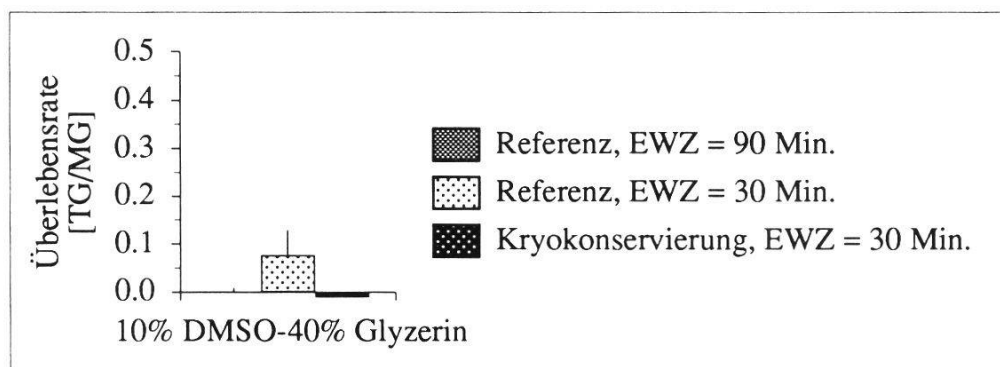


Fig. 29. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Referenz- und Einfrierversuche (Gefrierapparat) bei der Verwendung von 10% DMSO-40% Glyzerin als Gefrierschutzmittel.

Lemna valdiviana, clone 7803: Reference and freezing experiments (freezing apparatus) using 10% DMSO-40% glycerol as cryoprotectant.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

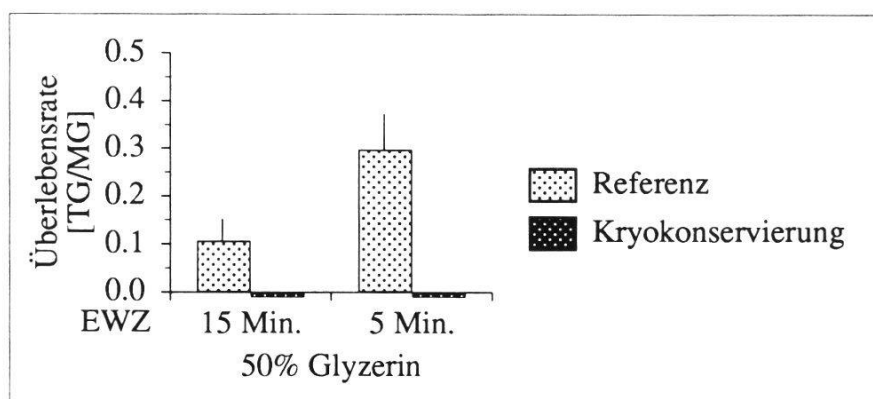


Fig. 30. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Einfluss einer nur kurzen Behandlung (15 und 5 Minuten) mit 50% Glyzerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener (Gefrierapparat) und nicht eingefrorener Pflanzen.

Lemna valdiviana, clone 7803: Effect of short incubation times (15 and 5 minutes) with 50% glycerol on the survival of frozen (freezing apparatus) and non-frozen plants.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

Gefrierschutzmittel 10% DMSO-40% Glycerin wird von den Pflanzen keinesfalls besser ertragen als 50% Glycerin.

Bei den Arten *Lemna ecuadoriensis* und *Lemna tenera* konnte durch eine weitere Verminderung oder möglicherweise völligen Unterdrückung der Auskristallisierung des Gefrierschutzmittels die Anzahl überlebender Knospen markant erhöht werden. Die beim Auftauen einer 50% Glycerinlösung im 30°C-Wasserbad entstehenden Kristalle töten bei diesen beiden Arten offenbar einen grossen Teil der Knospen ab, während jene von *Lemna minor* dadurch nicht merklich geschädigt werden. Da bei den meisten untersuchten Arten durch das Einfrieren oder wohl vielmehr durch das Auftauen eine deutliche Verminderung der Überlebensrate zu verzeichnen ist, dürfte bei vielen weiteren Vertretern dieser Unterfamilie, insbesondere der Sektion *Lemna*,

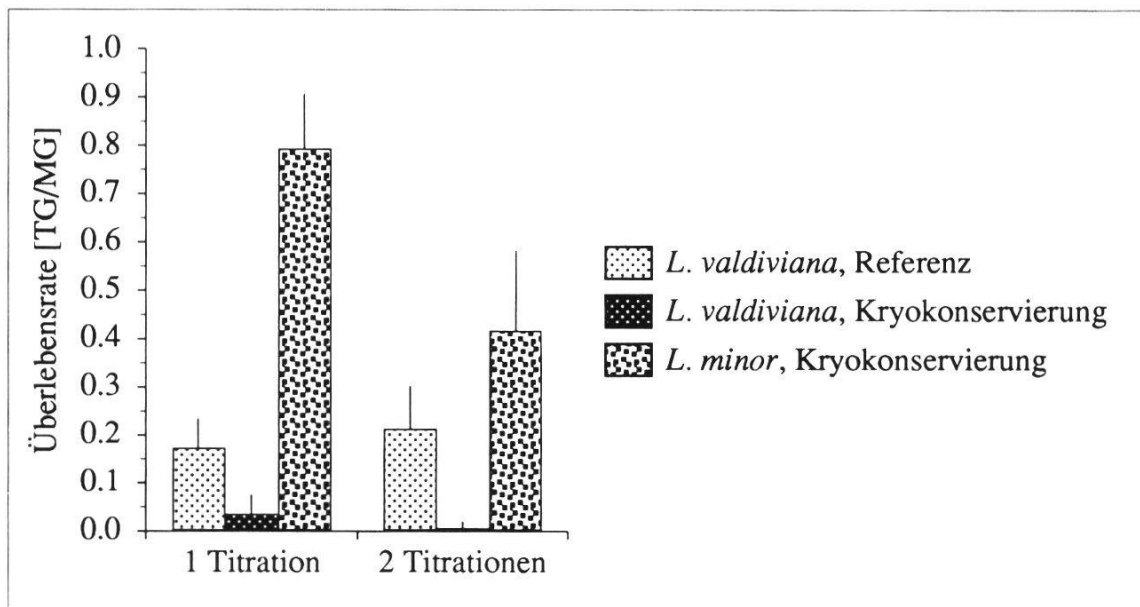


Fig. 31. Einfluss von 50% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener Pflanzen von *Lemna valdiviana* (Stamm 7803) und *Lemna minor* (Stamm 8765), wenn die Gefrierschutzmittelkonzentration schrittweise erhöht wird (1. Block). Bei einem zweiten Experiment wurde zusätzlich das Gefrierschutzmittel nach dem Auftauen schrittweise verdünnt (2. Block). *Lemna valdiviana* wurde 30, *Lemna minor* 60 Minuten nach beendeter Titration mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt. Weitere Erläuterungen sind der Tab. 7 zu entnehmen.

Effect of 50% glycerol on the survival of frozen and non-frozen plants of Lemna valdiviana (clone 7803) and Lemna minor (clone 8765) when the concentration of the cryoprotectant is increased stepwise (1st block). In a second experiment the cryoprotectant was additionally diluted stepwise after thawing (2nd block). The plants were cooled with the freezing apparatus, Lemna valdiviana 30 and Lemna minor 60 minutes after titration with the cryoprotectant has finished. For further explanations see Table 7.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

die Anwendung einer der beiden Methoden (langsames Einfrieren mit 60% Glycerin oder ultraschnelles Einfrieren und Auftauen mit 50% Glycerin) eine deutliche Reduktion von Gefrierschäden ermöglichen. Welche der beiden Methoden im einzelnen Fall wirkungsvoller ist, kann anhand der vorliegenden Resultate nicht entschieden werden, doch sollte aus Umweltschutzgrün-

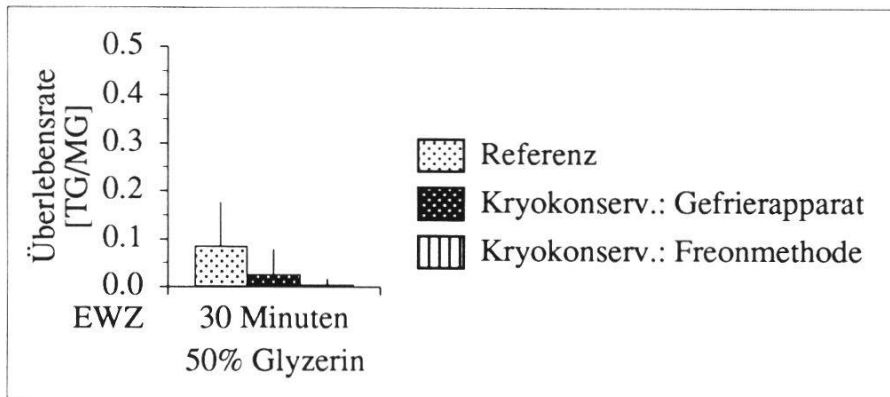


Fig. 32. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Vergleich zwischen den Überlebensraten von Pflanzen, die in 50% Glycerin entweder mit dem Gefrierapparat oder durch direktes Eintauchen in flüssiges Freon tiefgefroren wurden. Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 30 Minuten vor dem Kühlen. Die Überlebensrate nicht eingefrorener Proben ist durch die erste Säule dargestellt.

Lemna valdiviana, clone 7803: Comparison of the survival of plants either cooled with the freezing apparatus or by direct immersion in liquid freon in the presence of 50% glycerol which was added 30 minutes before freezing. The first column represent the survival of non-frozen specimens.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

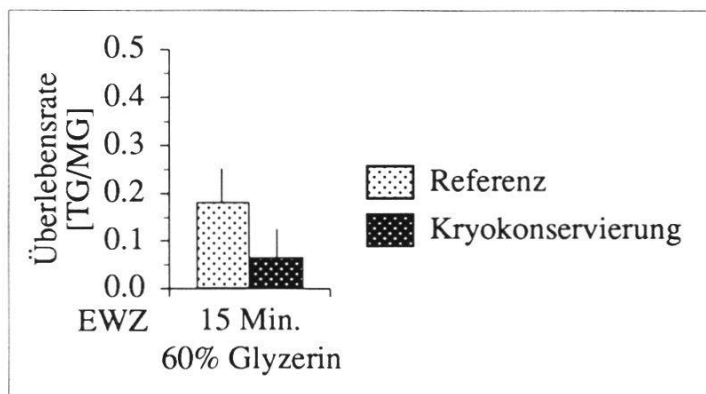


Fig. 33. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener Pflanzen, die während 15 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel behandelt wurden. Einfrierexperimente wurden mit dem Gefrierapparat durchgeführt.

Lemna valdiviana: Effect of 60% glycerol on the survival of frozen and non-frozen plants treated for 15 minutes with the cryoprotectant. Freezing experiments were conducted with the freezing apparatus.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

den und auch der einfacheren Handhabung wegen, nach Möglichkeit die erstere gewählt werden. Wie das Beispiel mit *Spirodela polyrrhiza* zeigt, existieren jedoch weitere Faktoren, die ein Überleben der Knospen verunmöglichen können. Vorstellbare Ursachen hierfür werden in Kap. 4.1 diskutiert.

3.3.3. Versuche mit *Wolffioideae*-Arten

Bereits Referenzversuche mit verschiedenen konzentrierten Glycerinlösungen zeigten, dass die Vertreter dieser Unterfamilie nicht mit der für *Lemna minor* entwickelten Methode kryokonserviert werden können (Tab. 8). Nach einer 30-minütigen Behandlung mit 50% Glycerin konnten lediglich bei vier der zehn getesteten Stämme noch vereinzelt regenerationsfähige Knospen beobachtet werden. Selbst durch 20% Glycerin werden nach gleich langer Einwirkung die meisten Knospen abgetötet. Von den untersuchten Arten zeigt *Wolffia brasiliensis* die höchste Resistenz gegenüber osmotischem Stress. Durch die Verkürzung der Einwirkungszeit kann die Überlebensrate einiger Arten viel stärker angehoben werden als durch eine Verringerung der Glycerinkonzentration. So ist sie bei den beiden getesteten *Wolffia*-Arten nach einer fünfminütigen Behandlung mit 50% Glycerin sogar höher als die entsprechenden Überlebensraten des *Lemna valdiviana*-Stammes 7803 (vgl. Tab. 9 mit Fig. 30). Jedoch bereits nach einer 15-minütigen Einwirkung überleben bei diesem Stamm mehr Knospen pro behandeltes Mutterglied als bei den beiden *Wolffia*-Stämmen, wegen den in Kap. 3.5 aufgeführten Gründen dürfte der Prozentsatz überlebender Knospen der drei Stämme ungefähr gleich hoch sein. Für 60% Glycerin scheint diese Feststellung ebenfalls zuzutreffen. Einfrierversuche wurden mit all jenen Proben durchgeführt, bei denen mit Referenzversuchen positive Resultate erzielt werden konnten. Sämtliche Proben wurden mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt, bei den in Figur 34 aufgeführten Stämmen wurden zusätzlich einige Proben durch direktes Eintauchen in flüssiges Freon eingefroren. Alle Versuche diese Pflanzen lebend zu kryokonservieren, schlugen jedoch fehl. Nach den Erfahrungen mit *Lemna minor* und anderen *Lemna*-Arten kommt zwar dieses Resultat nicht ganz überraschend. So waren die Erfolgsaussichten bei Einfrierversuchen mit Glycerinkonzentrationen unter 50% von vornherein eher gering. Zudem waren wohl die Referenzwerte bei fast allen Versuchsreihen zu klein, um überlebende Knospen erwarten zu können. Dies dürfte auch für alle Untersuchungen mit 50% Glycerin zutreffen, bei denen die Einwirkungszeit mindestens 15 Minuten betrug. Wird bereits nach fünf Minuten tiefgefroren, ist womöglich die Einwir-

kungszeit zu kurz, um einen Gefrierschutz bieten zu können, wie dies bereits bei *Lemna valdiviana* (Stamm 7803) der Fall war. 60% Glycerin hingegen zeigt bei *Lemna minor* bereits nach dieser kurzen Einwirkungszeit eine beachtliche Gefrierschutzwirkung, wenn auch die Überlebensrate noch deutlich unterhalb dem Maximum liegt. Die drei verwendeten *Wolffioideae*-Arten

Tab. 8. Überlebensraten [TG/MG] von einigen nicht eingefrorenen *Wolffiella*- und *Wolffia*-Stämmen, die mit Glycerinlösungen verschiedener Konzentrationen während 30 oder 60 Minuten behandelt wurden.

Survival [TG/MG] of some non-frozen Wolffiella and Wolffia clones treated with glycerol solutions of different concentrations for 30 or 60 minutes.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

Art	Stamm	20% Glyz.		30% Glyz.		40% Glyz.		50% Glyz.	
		30 M.	60 M.	30 M.	60 M.	30 M.	60 M.	30 M.	60 M.
<i>Wolffiella hyalina</i>	7376	0.02	0.01	0.01	<0.01	<0.01	neg.	neg.	neg.
	7378	neg.	neg.	—	—	—	—	—	—
<i>Wolffiella neotropica</i>	7225	0.01	neg.	0.01	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>Wolffiella oblonga</i>	7167	—	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>Wolffiella gladiata</i>	7173	0.01	<0.01	0.01	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>Wolffia brasiliensis</i>	7376a	0.27	—	—	—	—	—	—	—
	7663	0.18	0.20	0.06	0.01	0.03	neg.	0.02	neg.
<i>Wolffia angusta</i>	7274	—	—	—	—	—	—	0.02	neg.
	7476	0.04	0.03	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>Wolffia arrhiza</i>	7014	—	—	—	—	—	—	0.01	neg.
	7421	0.03	0.01	0.03	0.01	0.02	neg.	0.01	0.01
<i>Wolffia columbiana</i>	7795	—	—	—	—	—	—	neg.	neg.

Tab. 9. Einfluss von 50% Glycerin auf die Überlebensrate [TG/MG] tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener Pflanzen verschiedener *Wolffiella*- und *Wolffia*-Stämme. Behandlungen mit dem Gefrierschutzmittel betragen maximal 30 Minuten. Tiefgefrierversuche wurden mit dem Gefrierapparat durchgeführt.

Effect of 50% glycerol on the survival [TG/MG] of frozen and non-frozen plants of different Wolffiella and Wolffia clones. Treatments with the cryoprotectant did not exceeding 30 minutes. Freezing experiments were conducted with the freezing apparatus.

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

Art	Stamm	nicht eingefrorene Proben			tiefgefrorene Proben		
		5 Min.	15 Min.	30 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
<i>Wolffiella hyalina</i>	7376	—	neg.	neg.	—	—	—
<i>Wolffiella gladiata</i>	7173	0.25	—	neg.	neg.	—	—
<i>Wolffia brasiliensis</i>	7663	0.65	0.06	0.02	neg.	neg.	neg.
<i>Wolffia angusta</i>	7274	—	0.05	0.02	—	neg.	neg.
<i>Wolffia arrhiza</i>	7421	0.55	0.06	0.06	neg.	neg.	neg.
<i>Wolffia columbiana</i>	7795	—	neg.	neg.	—	—	—

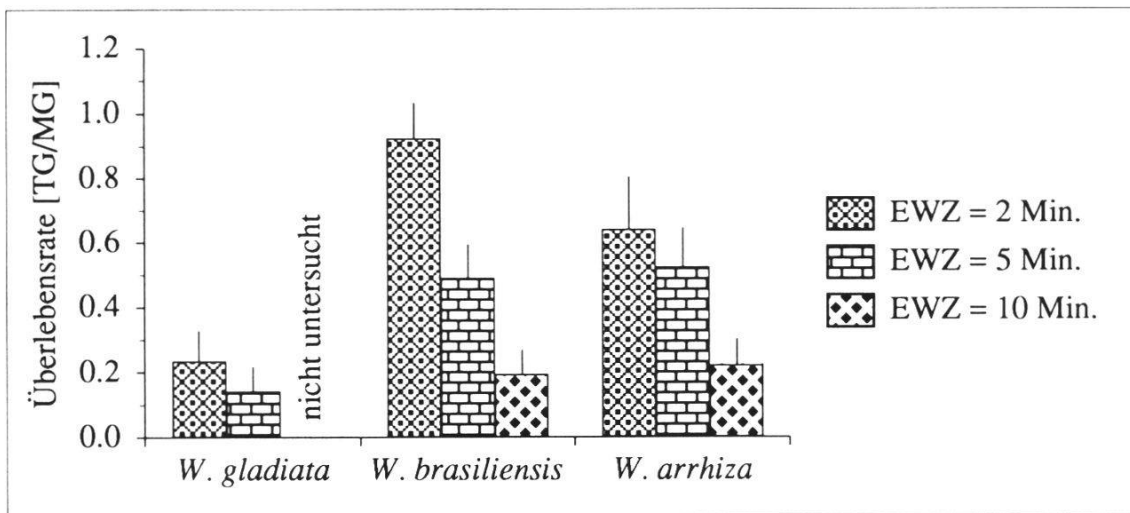


Fig. 34. Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate nicht eingefrorener Pflanzen von *Wolffiella gladiata* (7173), *Wolffia brasiliensis* (7663) und *Wolffia arrhiza* (7421) nach verschieden langer Einwirkung.

Effect after different times of pretreatments with 60% glycerol on the survival of non-frozen plants of Wolffiella gladiata (7173), Wolffia brasiliensis (7663) and Wolffia arrhiza (7421).

TG = Tochterglied – daughter frond, MG = Mutterglied – mother frond

können jedoch auch mit diesem Gefrierschutzmittel nicht kryokonserviert werden, selbst dann nicht, wenn die Pflanzen direkt in flüssiges Freon getaucht und ultraschnell aufgetaut werden. Diese Knospen scheinen somit weder durch extrazelluläres Kristallwachstum, noch durch eine zu starke Dehydratation abgetötet zu werden. Als mögliche Ursachen kommen Verletzungen durch intrazelluläre Kristallbildung in Frage oder, dass gewisse Membranen bei niedrigen Temperaturen lebenswichtige Eigenschaften verlieren.

3.4. KRYOKONSERVIERUNG VON *SPIRODELA POLYRRHIZA*-TURIONEN UND *LEMNA AEQUINOCTIALIS*-SAMEN

Da Turionen unter Laborbedingungen nur selten gebildet werden und zudem nicht alle Arten dazu befähigt sind, spielt die Kryokonservierung dieser Organe nur eine geringe Rolle und könnte höchstens dort von Bedeutung sein, wo Gliedknospen kaum kryokonserviert werden können, wie dies bei *Spirodela polyrrhiza* der Fall ist. Das Thema der Turionen- und Samenkryokonservierung wird hier nur kurz behandelt und durch wenige Experimente dokumentiert. Für sämtliche Kryokonservierungsversuche wurde der Gefrierapparat verwendet.

Obwohl Turionen Überdauerungsorgane sind, dank derer verschiedene Arten wie beispielsweise *Spirodela polyrrhiza*, *Lemna turionifera* und einige *Wolffia*-Arten, kalte Jahreszeiten überstehen können, sind diese nicht besonders kälteresistent. So sterben *Spirodela polyrrhiza*-Turionen bei Temperaturen um -12°C bereits nach spätestens zwei Tagen ab (JACOBS 1947), die von DAS und GOPAL (1969) untersuchten Turionen waren noch weniger kälteresistent. Für die Kryokonservierung scheinen sie ebenfalls nicht geeignet zu sein, da bei der Verwendung von 50% Glycerin keine Knospen überlebten (Tab. 10). Allerdings wird bereits durch die Einwirkung dieses Gefrierschutzmittels ein grosser Teil der Turionenknospen abgetötet. Sie werden bei diesem Stamm durch 50% Glycerin etwa gleich stark geschädigt, wie jene der Glieder. Turionen sind zwar nicht im eigentlichen Sinn trockenresistent, können aber ausserhalb des Wassers für wenige Stunden überleben (JACOBS 1947). Es wurden daher weitere Turionen auf Filterpapier (Schleicher & Schüll) in Plastik-Petrischalen während 10 bis 30 Minuten bei 3°C getrocknet und dann unmittelbar nach erfolgter Gefrierschutzmittelzugabe eingefroren. Auch mit dieser Methode gelang keine Lebendkonservierung. Wie stark die Turionen nach einer 30-minütigen Lufttrocknung entwässert sind, kann allerdings nicht abgeschätzt werden. Möglicherweise müsste die Trocknungsphase verlängert werden. Des weitern ist über die Wirkungsweise von Glycerin zu wenig bekannt. Sollte dieses Gefrierschutzmittel eine membranstabilisierende Funktion aufweisen und zudem durch die Zellwand oder gar Plasmamembran

Tab. 10. Kryokonservierungsversuche mit *Spirodela polyrrhiza*-Turionen (Stamm 7344), die in 50% Glycerin mit dem Gefrierapparat tiefgefroren wurden. Die Dehydratation der Zellen erfolgte durch vorherige Behandlung mit dem Gefrierschutzmittel oder durch Lufttrocknung. Letztere wurden ohne Vorbehandlung mit der Gefrierschutzlösung eingefroren. Zähler geben die Anzahl überlebender Turionen an, Nenner die Gesamtzahl untersuchter Exemplare.

Cryopreservation experiments with Spirodela polyrrhiza turions (clone 7344) cooled in the presence of 50% glycerol with the freezing apparatus. Cell dehydration occurred by pretreatment with the cryoprotectant or by air drying. Last-named samples were frozen without pretreatment with the cryoprotectant. Numerators represent the number of surviving turions, denominators the total sample size of specimens investigated.

Art der Entwässerung	Einlegen in die Glycerinlösg.			luftgetrocknet		
	keine	30 Min.	60 Min.	10 Min.	20 Min.	30 Min.
Referenz	21/40	2/10	1/10	10/10	6/13	10/12
Tiefgefrorene Turionen	—	0/100	0/100	0/50	0/50	0/50

eindringen können, wäre eine Vorbehandlung trotz Lufttrocknung unumgänglich. Ob Turionen für eine Kryokonservierung grundsätzlich ungeeignet sind, kann anhand der wenigen vorliegenden Resultate nicht entschieden werden, denn die Art *Spirodela polyrrhiza* könnte allgemein sehr schwierig zu kryokonservieren sein. Es müsste daher abgeklärt werden, wie sich diesbezüglich Turionen anderer Arten, vorzugsweise von der überdurchschnittlich gefrierresistenten *Lemna turionifera*, verhalten.

Lemna aequinoctialis-Samen gelten als recht trockenresistent, und die Art zählt zu den wenigen Ausnahmen, die Trockenperioden auf diese Weise überdauern können (LANDOLT 1986). Radieschensamen, die nach einer 20-stündigen Wässerung für 48 Stunden luftgetrocknet wurden, keimen nach Einfrierversuchen mit verschiedenen Gefrierschutzmitteln (unter anderem 10% DMSO-5% Glukose) genau so gut aus wie ungewässerte, auf die gleiche Weise tiefgefrorene Samen (Resultate nicht dargestellt). *Lemna aequinoctialis*-Samen wurden daher auf die bereits bei den Turionen angewandte Art getrocknet, die Trocknungsphase betrug allerdings 18 bis 24 Stunden. Die Keimfähigkeit scheint dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt zu werden, doch war sie bereits bei ungetrockneten Samen relativ niedrig (Tab. 11). Anschliessend wurden sie ohne vorherige Gefrierschutzmitteleinwirkung eingefroren, wobei zwei Gefrierschutzlösungen getestet wurden. Nach dem Auftauen konnten bei beiden Versuchsreihen auskeimende Samen beobachtet werden. 5% DMSO-25% Glukose scheint eine gute Gefrierschutzwirkung aufzuweisen, da die Keimrate gleich hoch ist, wie jene nicht eingefrorener Samen,

Tab. 11. Kryokonservierungsversuche mit luftgetrockneten *Lemna aequinoctialis*-Samen (Stamm 6746), die in 2 verschiedenen Gefrierschutzlösungen mit dem Gefrierapparat eingefroren wurden. Es fand keine Vorbehandlung mit dem Gefrierschutzmittel statt. Zähler geben die Anzahl überlebender Samen an, Nenner die Gesamtzahl untersuchter Samen. *Cryopreservation experiments with Lemna aequinoctialis seeds (clone 6746) cooled with the freezing apparatus following air drying. There was no pretreatment with the cryoprotectant. Numerators represent the number of surviving seeds, denominators the total sample size of seeds investigated.*

* Als Gefrierschutzmittel wurde 5% DMSO-25% Glukose verwendet.
5% DMSO-25% glucose was used as cryoprotectant.

** Als Gefrierschutzmittel wurde 10% DMSO-5% Glukose verwendet.
10% DMSO-5% glucose was used as cryoprotectant.

Zustand der Samen	nass	18 Std. getrocknet	24 Std. getrocknet
nicht eingefrorene Samen	10/30	4/20	5/20
tiefgefrorene Samen	—	7/20*	2/60**

während die 10% DMSO-5% Glukoselösung für diese Samen einen ungenügenden Gefrierschutz bietet. Ungetrocknete *Lemna aequinoctialis*-Samen können erwartungsgemäss mit diesen Gefrierschutzlösungen nicht kryokonserviert werden. Weitere Versuche mit ungetrockneten *Lemnaceae*-Samen wurden nicht durchgeführt, es wäre aber denkbar, dass diese analog zu gewässerten Radieschensamen mit Glycerinlösungen, die einen Gefrierschutzmittelanteil von mindestens 50% aufweisen, erfolgreich eingefroren werden können, sofern sie genügend osmotolerant sind.

3.5. ANZAHL VORHANDENER TOCHTERGLIEDER PRO MUTTERGLIED EINIGER ARTEN

Da lediglich Knospen und junge Tochterglieder erfolgreich kryokonserviert werden können, hängt die Zahl der überlebenden Knospen von der Anzahl tiefgefrorener Knospen ab und damit nur indirekt von der Anzahl Mutterglieder. Trotzdem wurde in dieser Arbeit die Überlebensrate als Anzahl primär neugebildete Tochterglieder pro Mutterglied definiert, weil eine Zählung der Knospen nur an gebleichten und daher abgetöteten Gliedern möglich ist. Dies bedeutet allerdings, dass die Überlebensraten lediglich von solchen Versuchsreihen direkt miteinander verglichen werden können, bei denen die Menge vorhandener Knospen pro Mutterglied zum Zeitpunkt des Experimentbeginns etwa gleich war.

Untersuchungen wie viele Tochterglieder aus einem Mutterglied auswachsen können, wurden bereits verschiedentlich durchgeführt. Bei *Lemna*-Arten konnten zwischen zehn und maximal 24 Neubildungen beobachtet werden, wobei das Auswachsen dieser Knospen mit zunehmendem Alter nach immer längeren Zeitintervallen stattfindet (ASHBY et al. 1949, PIRSON und GOELLNER 1954). *Wolffia*-Arten scheinen eine geringere Knospenproduktivität aufzuweisen, da LAWALREE (1943) bei *Wolffia arrhiza* höchstens fünf neu auswachsende Glieder zählen konnte. Nach WANGERMAN und ASHBY (1951) hängt die Zahl neu gebildeter Knospen auch vom jeweiligen Stamm und den Kulturbedingungen ab. Für die Kryokonservierung dürfte jedoch nicht die Gesamtzahl vorhandener Meristemanlagen massgebend sein, sondern lediglich die Anzahl jener Knospen, die zum Zeitpunkt des Einfrierens genügend weit entwickelt sind, um aus einem abgestorbenen Mutterglied auswachsen zu können. Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, wie viele Knospen in einem Mutterglied gleichzeitig vorhanden sind, wurden bei vier Arten diesbezü-

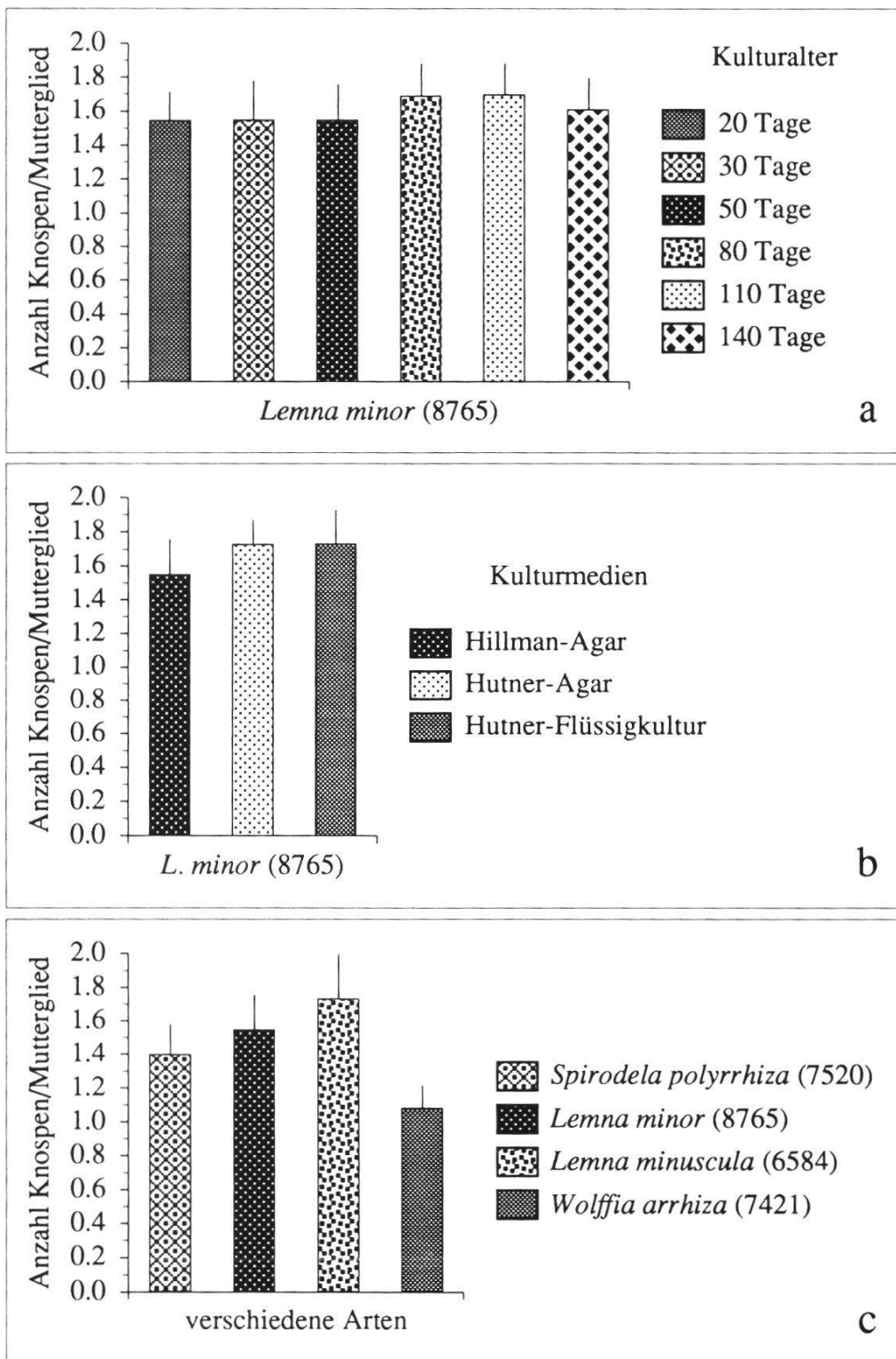


Fig. 35. Durchschnittliche Zahl der Knospen und jungen Tochterglieder pro Mutterglied.
Average number of buds and young daughter fronds per mother frond.

a. *Lemna minor*, Stamm 8765: unterschiedliche Kulturalter.

Lemna minor, clone 8765: cultures of various age.

b. *Lemna minor*, Stamm 8765: verschiedene Kulturmedien.

Lemna minor, clone 8765: different culture media.

c. Verschiedene Arten – different species.

gliche Auszählungen vorgenommen, deren Ergebnisse in den Figuren 35a-c dargestellt sind. Die zu diesem Zweck angefertigten Gliedpräparate sind zu wenig transparent, als dass sehr kleine, meristematische Zellkomplexe unter dem Binokular gesehen werden könnten. Die kleinsten Knospen, die als solche erkannt werden konnten, hatten bei *Wolffia arrhiza* einen Durchmesser von 30 µm, bei den übrigen Arten 90 µm. Da kleinere Knospen wohl zu wenig weit entwickelt sind, um selbständig auswachsen zu können, dürfte die mit dieser Methode ermittelte Anzahl Knospen ungefähr jenem Wert entsprechen, der für die Kryokonservierung von Bedeutung ist. Die für diese Untersuchungen verwendeten Pflanzen wurden im allgemeinen auf Hillman-Agar angezogen und nach ungefähr 50 Tagen ausgezählt. Abweichende Verfahrensschritte sind in den entsprechenden Figurenlegenden erwähnt.

Beim *Lemna minor*-Stamm 8765 konnten bei allen Untersuchungen immer etwa gleich viele Knospen pro Mutterglied ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die numerischen Voraussetzungen für sämtliche Kryokonservierungsversuche mit diesem Stamm gleich waren und unterschiedliche Bedingungen während der Anzuchtphase sich lediglich auf die Gefrierresistenz sowie auf die Verträglichkeit gegenüber dem Gefrierschutzmittel auswirken. Würde die Überlebensrate neu als Anzahl ausgewachsene Tochterglieder pro Anzahl eingefrorene Knospen definiert, würden bei diesem Stamm bei einer unter den bestmöglichen Bedingungen ausgeführten Kryokonservierung rund 70% der Knospen überleben.

Die einzelnen Arten hingegen weisen teilweise eine unterschiedliche Anzahl Knospen pro Glied auf. So scheint sie bei *Spirodela polyrrhiza* etwas geringer zu sein als bei den beiden *Lemna*-Arten. Die mit Abstand tiefste Knospenanzahl weist *Wolffia arrhiza* auf. Dies könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass *Wolffioideae*-Arten nur eine Gliedtasche besitzen, in der sich die Knospen entwickeln können. Inwieweit die in dieser Arbeit ermittelten Überlebensraten verschiedener Arten bedenkenlos miteinander verglichen werden können, ist anhand der vier untersuchten Arten schwierig abzuschätzen. Vergleiche zwischen Arten aus derselben Gattung scheinen am unproblematischsten zu sein, hingegen sollten solche zwischen *Wolffia*- und *Lemna*-Arten nur mit der nötigen Vorsicht angestellt werden.

3.6. OSMOLALITÄT VON KRYOSÄFTEN EINIGER *LEMNACEAE*-ARTEN UND VON GEFRIERSCHUTZ MITTELN

Die Erfassung der Osmolalität von Pflanzensäften gibt einen ersten Anhaltspunkt über den relativen Wassergehalt der Zellen, der die natürliche Kälteresistenz entscheidend beeinflussen kann. Die Erhöhung der Osmolalität, die vor allem durch die Akkumulation verschiedener Zucker (SAKAI und YOSHIDA 1968) zustande kommt, ist in der Natur ein weitverbreiteter Mechanismus, um den Gefrierpunkt zu senken und die Kristallgrösse zu reduzieren (MERYMAN und WILLIAMS 1985). Für die vorliegende Arbeit wäre insbesondere der Wassergehalt der Knospen von Interesse, doch sind diese derart klein, dass die Gewinnung einer genügend grossen Menge Kryosafts aus methodischen Gründen unmöglich ist. Es erscheint aber nicht abwegig, anzunehmen, dass Knospen von Pflanzen, bei denen eine überdurchschnittlich hohe Osmolalität gemessen wird, ebenfalls einen verhältnismässig konzentrierten Zellsaft aufweisen dürften. Der Kryosaft wurde daher aus ganzen Pflanzen hergestellt, wobei die Glieder naturgemäss den Hauptanteil stellen. Die Verarbeitung fand in der Regel zur gleichen Tageszeit statt (8.30 Uhr, Winterzeit), und es wurden von wenigen Ausnahmen abgesehen 50 Tage alte Agarkulturen verwendet. Abweichungen sind in den entsprechenden Figuren erwähnt.

Anhand der Messresultate, die in den Figuren 36a-c dargestellt sind, können folgende Aussagen gemacht werden:

1. Zwischen den einzelnen Arten und Stämmen bestehen oft markante Unterschiede bezüglich der Osmolalität.
2. Zwischen den Kulturen eines Stammes treten in vielen Fällen, trotz einheitlicher Kulturbedingungen (gleicher Zeitpunkt des Abimpfens, Verwendung von Agarröhrchen der gleichen Herstellungsserie, Licht, Temperatur etc.), bedeutende Unterschiede auf.
3. Die Osmolalität der *Lemnaceae*-Zellsäfte ist verglichen mit anderen Pflanzen eher niedrig, doch weisen die folgenden aus FLINDT (1988) entnommenen Beispiele darauf hin, dass ein geringer Partikelgehalt für viele Wasserpflanzen typisch ist (*Elodea* und die Alge *Spirogyra* um 470 mMol/kg, *Potamogeton* ca. 450 mMol/kg, *Myriophyllum* 330 mMol/kg). Die von SUN et al. (1988) durchgeführten Messungen mit fünf verschiedenen *Azolla*-Arten ergaben Werte zwischen 118 und 155 mMol/kg.
4. Die Zusammensetzung der Nährmedien beeinflusst bei *Lemna minor* die Zellsaftkonzentration deutlich.

5. Der Wassergehalt von auf Hutner-Flüssigkulturen gewachsenen *Lemna minor*-Pflanzen ist gleich hoch wie von Pflanzen aus entsprechenden Agarkulturen.
6. *Lemna minor*-Pflanzen aus alten Hillman-Agarkulturen weisen einen deutlich geringeren Wassergehalt auf als solche aus jüngeren Kulturen. Dies dürfte in erster Linie damit zusammenhängen, dass der Agar nach 100 Tagen bereits sehr stark ausgetrocknet ist und die Pflanzen wohl unter Wasserstress stehen.
7. Die beiden untersuchten *Lemna trisulca*-Stämme weisen am frühen Nachmittag eine markant geringere Osmolalität auf als morgens. Die prozentuale Konzentrationsabnahme des Zellsafts ist bei den zwei Stämmen etwa gleich.

Eine Korrelation zwischen Gefrierresistenz und Osmolalität existiert offensichtlich nicht. So sind die Werte der verhältnismässig schwierig tiefzufrierenden Art *Lemna valdiviana* oder der bis anhin nicht kryokonservierbaren *Wolffia arrhiza* mindestens ebenso hoch wie jene von *Lemna minor*, der weitaus gefrierresistentesten Art. Von den getesteten Nährmedien weisen *Lemna minor*-Pflanzen aus Hillman-Agarkulturen die geringste Osmolalität auf, erreichen jedoch die höchste Überlebensrate bei Gefrierversuchen. Zwischen auf Hutner-Agar und Hutner-Flüssigkulturen gewachsenen Pflanzen besteht trotz gleicher Osmolalität ein deutlicher Unterschied bezüglich Gefrierresistenz. Die allgemein geringe Osmolalität von *Lemnaceae* liess diese Feststellung allerdings bereits vermuten, denn nach der Formel

$$\Delta T [^{\circ}\text{C}] = 1.86 \cdot \text{Osm. [Mol/kg]}$$

wäre die Gefrierpunktserniedrigung einer 400 millimolalen Lösung lediglich 0.7°C , und selbst nach einem Wasserentzug von 80%, der für *Lemnaceae* wohl illusorisch sein dürfte, würde der Gefrierpunkt nur um 3.7°C sinken. Diese Teilchenkonzentration wäre auch zu gering, um ein markantes Kristallwachstum zu verhindern. PRITCHARD et al. (1986a,b) stellten selbst zwischen Zellkulturen von zwei Arten, deren Zellsäfte gegenüber jenen von *Lemnaceae* deutlich konzentrierter waren, keinen Zusammenhang zwischen Gefrierresistenz und der Osmolalität fest.

Die Messungen fördern allerdings einen interessanten Gesichtspunkt zu Tage. Die zum Teil erstaunlich unterschiedlichen Werte der einzelnen Kulturen eines Stammes könnten ein Hinweis sein, dass selbst unter identischen Zuchtbedingungen der physiologische Zustand der Kulturen, der sehr wohl die Ge-

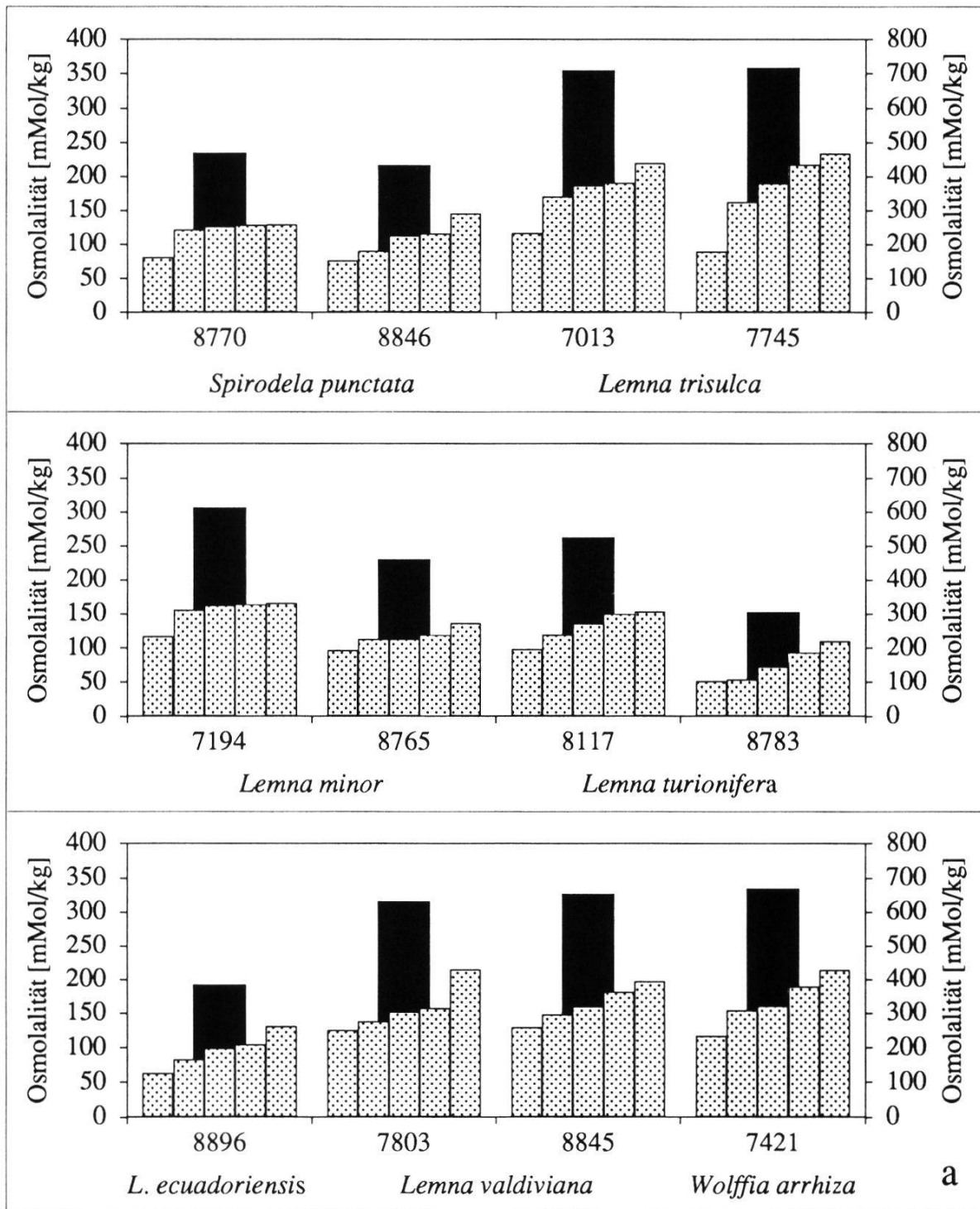


Fig. 36. Osmolalität [mMol/kg] von *Lemnaceae*-Zellsäften. Für jede Messreihe wurden fünf Kulturen untersucht, deren Werte in aufsteigender Reihenfolge dargestellt sind (graue Säulen). Die daraus resultierenden Mittelwerte (schwarze Säulen) sind entsprechend der linken Werteskala in doppelter Grösse abgebildet.

Osmolality [mmol/kg] of Lemnaceae saps. For each experimental series five cultures were tested, whose values are represented in ascending order (gray columns). Resultant mean values (black columns) are figured double the size corresponding to the left y-axis.

a. Verschiedene Arten und Stämme – Different species and clones.

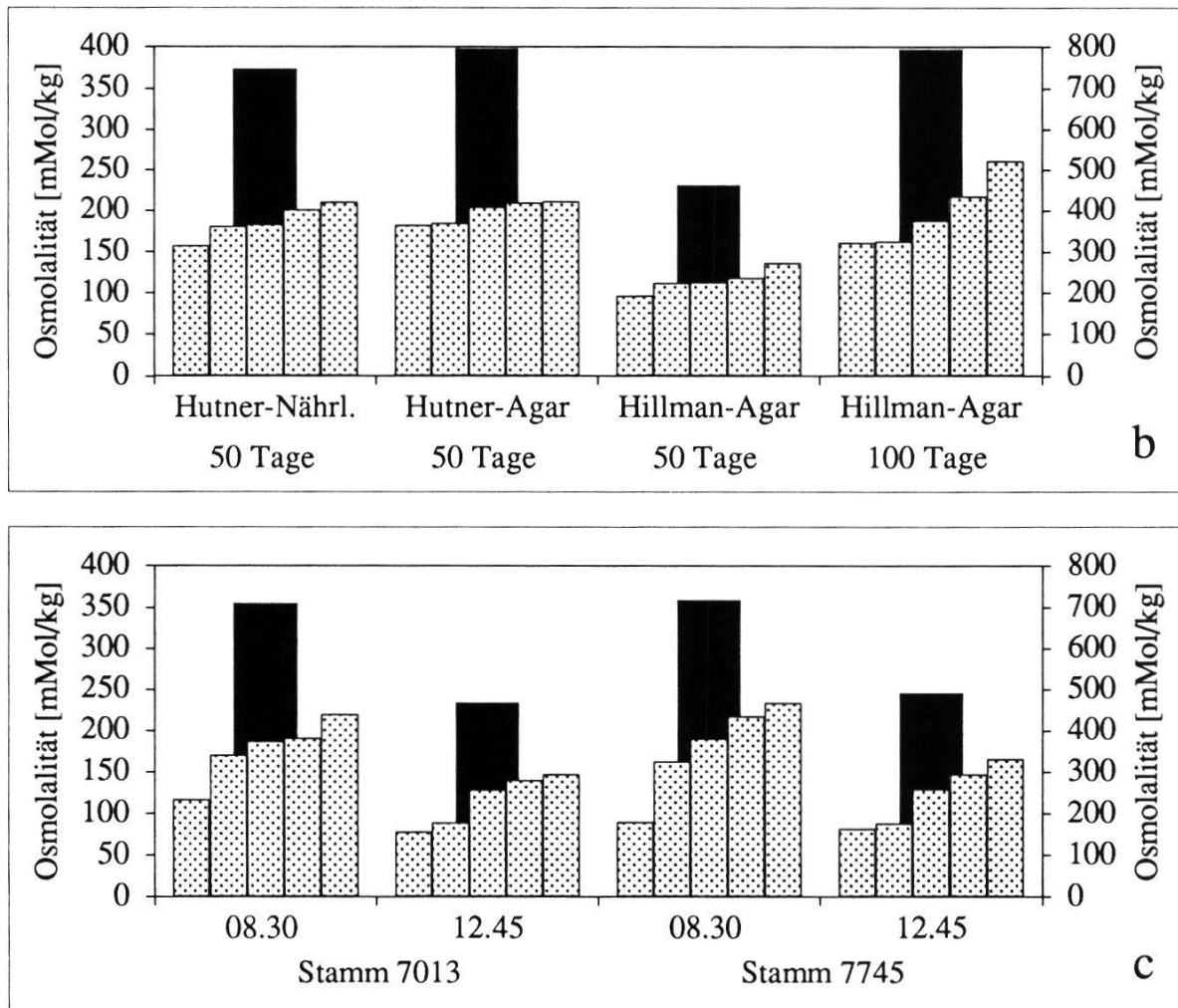


Fig. 36 (Forts. – continued)

b. *Lemna minor*, Stamm 8765: Vergleich zwischen verschiedenen Kulturmedien (Blöcke 1 bis 3) und zwischen zwei Kulturalter (Blöcke 3 und 4).

Lemna minor, clone 8765: Comparison of different culture media (blocks 1 to 3) and of two different ages of culture (blocks 3 and 4).

c. Zwei *Lemna trisulca*-Stämme: Vergleich zwischen Zellsäften, die zu verschiedenen Tageszeiten gewonnenen wurden.

Two *Lemna trisulca* clones: Comparison of saps collected at two different times of the day.

frierresistenz beeinflussen dürfte, verschieden sein kann. Wie das Beispiel von *Lemna trisulca* zeigt, ändert sich der physiologische Zustand der Pflanzen auch während des Tagesverlaufs. Allerdings konnten bei diesbezüglich unternommenen Gefrierversuchen mit den beiden *Lemna trisulca*-Stämmen sowie dem *Lemna minor* Stamm 8765 keine unterschiedlichen Überlebensraten gefunden werden (Resultate nicht dargestellt). Weitergehende Abklärungen wurden nicht durchgeführt, es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die

Knospen in den täglichen Rhythmus der Stoffwechselfvorgänge miteinbezogen sind.

Mit Gefrierschutzmitteln wurden analoge Untersuchungen durchgeführt, deren Resultate in Tabelle 12 aufgeführt sind. Die Osmolalität der verwendeten Gefrierschutzmittel konnte jedoch nicht direkt gemessen werden und wurde daher mit der folgenden Formel näherungsweise berechnet:

$$\text{Osm. d. Gefrierschutzlösung} = \text{Osm. d. verdünnten Lösung} \cdot \frac{\text{Mol. d. Gefrierschutzlösung}}{\text{Mol. d. verdünnten Lösung}}$$

Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass es sich lediglich um einen Schätzwert handeln kann, da derart konzentrierte Lösungen bei weitem nicht einer idealen Lösung entsprechen und die Zunahme der Osmolalität somit kaum proportional zur Erhöhung der Partikelzahl verläuft. Über die Osmolalität verdünnter Glycerinlösungen existieren Literaturwerte (WEAST 1983-1984), die mit den eigenen Messresultaten gut übereinstimmen. WILSON und ROBARDS (1982) untersuchten den osmotischen Druck verschieden konzentrierter PVP-Lösungen und geben für 12% PVP eine Osmolarität von rund 60 mMol/l an. Da in diesem Konzentrationsbereich für eine grobe Abschätzung die Molarität durch die Molalität ersetzt werden darf, kann der ermittelte Wert ebenfalls bestätigt werden. Für die unverdünnten Gefrierschutzlösungen stehen keine direkten Vergleichsmöglichkeiten zur Verfügung. Lediglich für Glycerin kann die Osmolalität einer 34.5%igen Lösung herangezogen werden, die nach WEAST (1983-1984) 8330 mMol/kg beträgt; nach vorangegan-

Tab. 12. Osmolalität [mMol/kg] der fünffach verdünnten Gefrierschutzlösungen und daraus abgeschätzte Werte der unverdünnten Gefrierschutzmittel. In Klammern ist die Osmolalität autoklavierter Lösungen angegeben.

Osmolality [mmol/kg] of cryosolutions diluted five times and therefore estimated values of the undiluted cryoprotectants. The osmolality of autoclaved solutions is given in parenthesis.

Konzentration der verwendeten Gefrierschutzmittel	Konzentration der verdünnten Gefrierschutzmittel	Osmolalität der verdünnten Gefrierschutzmittel	Geschätzte Osmolalität der Gefrierschutzmittel
40% Glycerin	8% Glycerin	1221 (1248)	9400
50% Glycerin	10% Glycerin	1582 (1565)	14200
60% Glycerin	12% Glycerin	1882 (1896)	20700
10% DMSO-40% Glyz.	2% DMSO-10% Glyz.	1560 (1568)	14000
10% DMSO-40% Gluk.	2% DMSO-10% Gluk.	899 (905)	8100
60% PVP	12% PVP	66 (62)	700

gener Formel jedoch nur 7300 mMol/kg ergeben würde. Daher dürfte zumindest der Schätzwert für 40% Glycerin eher zu niedrig sein. Ausser bei der PVP-Lösung ist die Osmolalität aller Gefrierschutzmittel sehr viel höher als jene der Zellsäfte. Von den getesteten Lösungen bieten nur solche einen zufriedenstellenden Gefrierschutz für *Lemnaceae*, die eine Osmolalität von über 10 Mol/kg aufweisen. Durch das Autoklavieren der Gefrierschutzlösungen in den Kryoröhrchen verändert sich die Osmolalität nicht.

3.7. PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN GEFRIERSCHUTZMITTEL

Von den meisten in dieser Arbeit verwendeten Gefrierschutzmitteln wurde der Temperaturverlauf, unter Anwendung der bei Kryokonservierungsversuchen benutzten Methoden, während dem Einfrieren und Auftauen aufgezeichnet. Infolge der raschen Temperaturänderungen konnten bei Freonversuchen keine entsprechenden Messungen durchgeführt werden. Wird nämlich ein mit einem Glycerintropfen versehener Temperaturfühler in flüssiges Freon getaucht, dauert sowohl die Abkühlung als auch die anschliessende Erwärmung durch direktes Eintauchen des Fühlers in Wasser bei Zimmertemperatur weniger als zwei Sekunden. Bei derartigen Experimenten gilt zu beachten, dass der gemessene Temperaturverlauf der Lösung in grossem Masse von der Entfernung des Fühlers von der Aussenwand des Gefässes abhängt. Dabei handelt es sich keinesfalls lediglich um einen zeitlich verzögerten Ablauf, sondern auch Kühlrate, Grad der Unterkühlung und möglicherweise die entstehende Eismenge können örtlich verschieden sein (PERSIDSKY und LUYET 1975). Daher wurde darauf geachtet, dass bei allen Messungen die Spitze des Temperaturfühlers im Zentrum des Kryoröhrchens, rund 3 mm über dem Gefässboden plaziert werden konnte. Des weitern wurde auch eine allfällige Trübung der Lösungen festgehalten (Tab. 13 und 14). Es muss jedoch zur Kenntnis genommen werden, dass durchsichtiges Eis keinesfalls kristallfrei sein muss (MERYMAN 1958, LUYET et al. 1962, MACKENZIE 1977). Nach LUYET (1970) wird nämlich die Trübung nur von Kristallen verursacht, deren Ausdehnung grösser als die kleinste Wellenlänge des sichtbaren Lichts ist. Dies bedeutet auch, dass der Zeitpunkt einer beobachtbaren Trübung nicht mit dem Kristallisationszeitpunkt übereinstimmen muss. Die verschiedenen Zustandsänderungen während dem Einfrieren und Auftauen können am besten mit einem "Differential Scanning Calorimeter" anhand von endo- und exothermen

Vorgängen festgestellt werden. Durch die Kristallisation wie auch Vitrifikation der Lösung wird Wärme freigesetzt (ANGELL und TUCKER 1980, BOUTRON et al. 1986), während beim Schmelzen des kristallinen und auch amorphen Eises Energie aufgewendet werden muss (REY 1960, LUYET 1970, BOUTRON et al. 1986, MACFARLANE 1986, HIRSH 1987, JOCHEM und KÖRBER 1987), wodurch die Erwärmung des Systems gehemmt wird. Die Umwandlung von kubi-

Tab. 13. Beobachtungen über Zustandsänderungen verschiedener Gefrierschutzmittel während dem Einfrieren und Auftauen.

Observations for different cryoprotectants of phase transitions during freezing and thawing.

Gefrierschutzmittel	Art des Einfrierens	Optische Änderung	Art des Auftauens	Optische Änderung
40% Glycerin	direkt in fl. Stickstoff	bleibt ± durchsichtig	30°C-Wasserbad	wird opak
	Gefrierapparat	wird opak	—	—
45% Glycerin	Gefrierapparat	wird opak	—	—
50% Glycerin	direkt in fl. Stickstoff	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	wird opak
	Gefrierapparat	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	wird opak
			3°C/Minute	wird opak
	-1°C/Minute	wird opak	—	—
60% Glycerin	direkt in fl. Stickstoff	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	bleibt durchsichtig
	Gefrierapparat	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	bleibt durchsichtig
			3°C/Minute	bleibt durchsichtig
	-1°C/Minute	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	bleibt durchsichtig
10% DMSO-40% Glycerin	Gefrierapparat	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	wird opak
10% DMSO-40% Glukose	Gefrierapparat	wird opak	—	—
60% PVP	Gefrierapparat	bleibt durchsichtig	30°C-Wasserbad	bleibt durchsichtig

Tab. 14. Beobachtungen über Zustandsänderungen bei 50% Glycerin. Die Proben enthielten *Lemna minor*-Pflanzen und wurden entweder mit verschiedenen Kühlgeschwindigkeiten tiefgefroren oder mit 1°C/Min. auf eine bestimmte Temperatur vorgekühlt und nach 10-minütiger Ausgleichsphase mit 10°C/Min. weitergekühlt.

Observations with 50% glycerol of phase transitions. The samples containing Lemna minor plants were either frozen at different cooling rates or precooled to a certain temperature at 1 °C/min and, following a 10 minute annealing, cooled further at 10 °C/min.

Kühlrate [°C/Min.]	-10.00	Lösung bleibt durchsichtig
	-3.13	Lösung bleibt ±durchsichtig, aber opake Einschlüsse vorhanden
	-1.79	Lösung wird ±opak
	-1.25	Lösung wird opak
Vor- Kühl- tempe- ratur [°C]	-30	Lösung bleibt durchsichtig
	-35	Lösung bleibt durchsichtig
	-40	Lösung bleibt durchsichtig, aber opake Einschlüsse vorhanden
	-45	Lösung wird opak
	-50	Lösung wird opak
	-75	Lösung wird opak
	-100	Lösung wird opak

schem in hexagonales Eis dürfte mit thermodynamischen Messmethoden nicht erfassbar sein, da der Strukturaufbau dieser beiden Kristallformen sehr ähnlich ist (DOWELL und RINFRET 1960). Zur Beurteilung der aufgezeichneten Einfrier- und Auftaukurven muss allerdings berücksichtigt werden, dass Zustandsänderungen unter Umständen durch weitere thermodynamische Ereignisse überdeckt sein können und dann schwer oder nicht erkennbar sind. So bemerkt BOUTRON (1984), dass mit dem "Differential Scanning Calorimeter" keine freiwerdende Kristallisationsenergie gemessen werden kann, wenn das Kristallwachstum langsam über einen weiten Temperaturbereich vor sich geht. Bei den hier verwendeten Lösungen dürfte dies, zumindest bei raschem Auftauen, ebenfalls der Fall sein. Das Vorhandensein von Kristallen kann jedoch am Abflachen der Auftaukurve unterhalb des Schmelzpunkts festgestellt werden. Nach beendetem Schmelzvorgang steigt die Kurve wieder stärker an. Ob die Kristalle vorwiegend während dem Einfrieren oder Auftauen entstanden sind, kann bei partiell vitrifizierenden Lösungen anhand des Schmelzens des amorphen Eises beurteilt werden. Dieser Vorgang ist ebenfalls durch eine Abflachung der Auftaukurve gekennzeichnet und sollte bei den hier verwendeten Glycerinlösungen meist zwischen -120 und -100°C beobachtbar sein. Danach ist ein deutliches Ansteigen der Kurve feststellbar, das aber in den wenigsten Fällen mit einem Kristallwachstum in Zusammenhang gebracht werden kann und auch dann auftritt, wenn kein späteres Schmelzen von kristallinem Eis erkennbar ist (siehe Fig. 38c). Dieser erhöhte Temperaturanstieg

dürfte vielmehr das Resultat des plötzlich fehlenden Wärmeentzugs sein, wie dies auch nach dem Schmelzen der kristallinen Phase der Fall ist, oder er könnte auf eine womöglich bessere Wärmeleitfähigkeit der Flüssigkeit zurückzuführen sein. Wenn bereits während dem Einfrieren eine grössere Menge kristallines Eis ausgefallen ist, kann beim Auftauen der Schmelzvorgang des vitrifizierten Eises undeutlich oder nicht mehr erkennbar sein (LUYET und KROENER 1958). Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Wärmeleitfähigkeit der kristallinen Phase allgemein bedeutend höher ist als jene des amorphen Eises.

Beim Einfrieren von 40% Glycerin bleibt die Lösung lediglich während dem direkten Eintauchen des Kryoröhrchens in flüssigen Stickstoff durchsichtig, und in diesem Fall kann auch keine freiwerdende Kristallisationsenergie festgestellt werden (Fig. 37a). Daher sollte beim Auftauen im 30°C-Wasserbad (Fig. 38a) das Schmelzen des amorphen Eises beobachtbar sein, ist aber wohl wegen der hohen Wärmeleitfähigkeit dieser Lösung, die nach PERSIDSKY und LUYET (1975) mit zunehmendem Wassergehalt deutlich zunimmt, kaum ausmachbar. Der Schmelzvorgang könnte jedoch bei etwa -120°C beendet sein, da dort die Kurve deutlich ansteigt. Während dem weiteren Auftauen muss eine grössere Menge Kristalle entstehen, da die Lösung opak wird und das Schmelzen dieses Eises klar ersichtlich ist. Der Zeitpunkt dieser Kristallisation kann wie erwartet nicht eindeutig festgelegt werden, der nur bei dieser Kurve beobachtbare konkave Verlauf im Bereich zwischen -120 und -80°C dürfte jedoch darauf hinweisen, dass die Kristallbildung unterhalb -80°C stattfindet. LUYET et al. (1958) ermittelten bei dieser Lösung bei einer allerdings erheblich geringeren Auftaugeschwindigkeit einen Kristallwachstumsbereich von -105 bis -87°C. Beim Einfrieren dieser Lösung mit dem Gefrierapparat ist stets eine Kristallisation feststellbar, welche deutlich unterhalb dem Schmelzpunkt liegt (Fig. 39a und 43a). Beim langsamen Kühlen mit 1°C/Min. ist zudem, wie bei den übrigen getesteten Glycerinlösungen, im Bereich von ungefähr -105°C eine geringe Abflachung der Kurve bemerkbar, die möglicherweise durch eine Vitrifikation verursacht wird. Die Auftaukurve der zuvor mit dem Einfrierprogramm T-25/1a gekühlten und im Wasserbad aufgewärmten Probe erinnert trotz dem Vorhandensein einer beträchtlichen Menge kristallinen Eises an jene vitrifizierter Lösungen (Fig. 40a). Das Schmelzen des amorphen Eises würde allerdings in einem ungewöhnlich hohen Temperaturbereich von -100 bis -92°C stattfinden. Nach den Resultaten von BOUTRON und KAUFMANN (1978) zu urteilen, die ähnliche Versuche mit 35% und 39% Glycerin durchführten, dürfte es ziemlich sicher sein, dass eine 40%

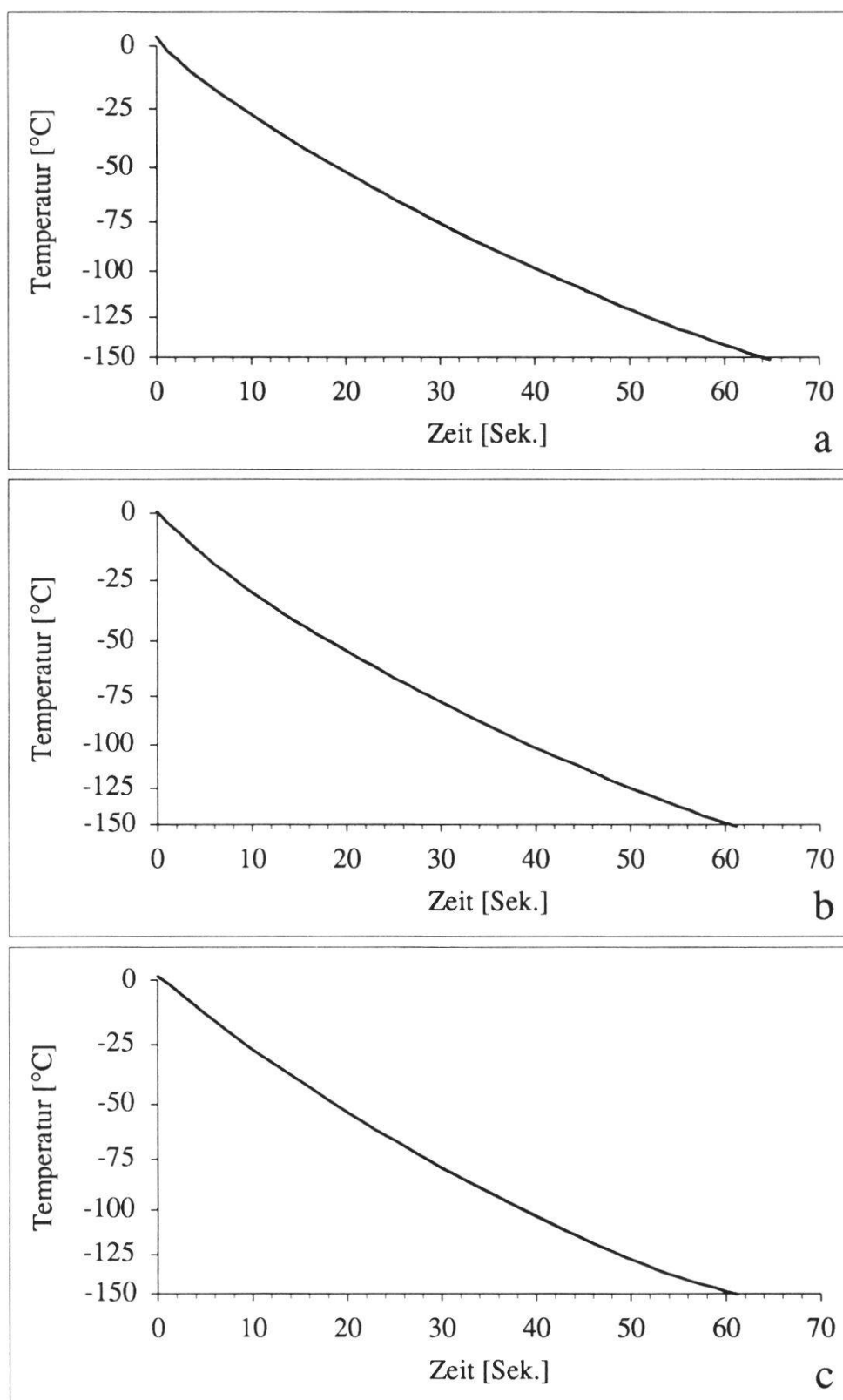


Fig. 37. Einfrierkurven von Glycerinlösungen, die durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff rasch tiefgekühlt wurden.

Freezing curves of glycerol solutions rapidly cooled by direct immersion in liquid nitrogen.

a. 40% Glycerin, b. 50% Glycerin, c. 60% Glycerin

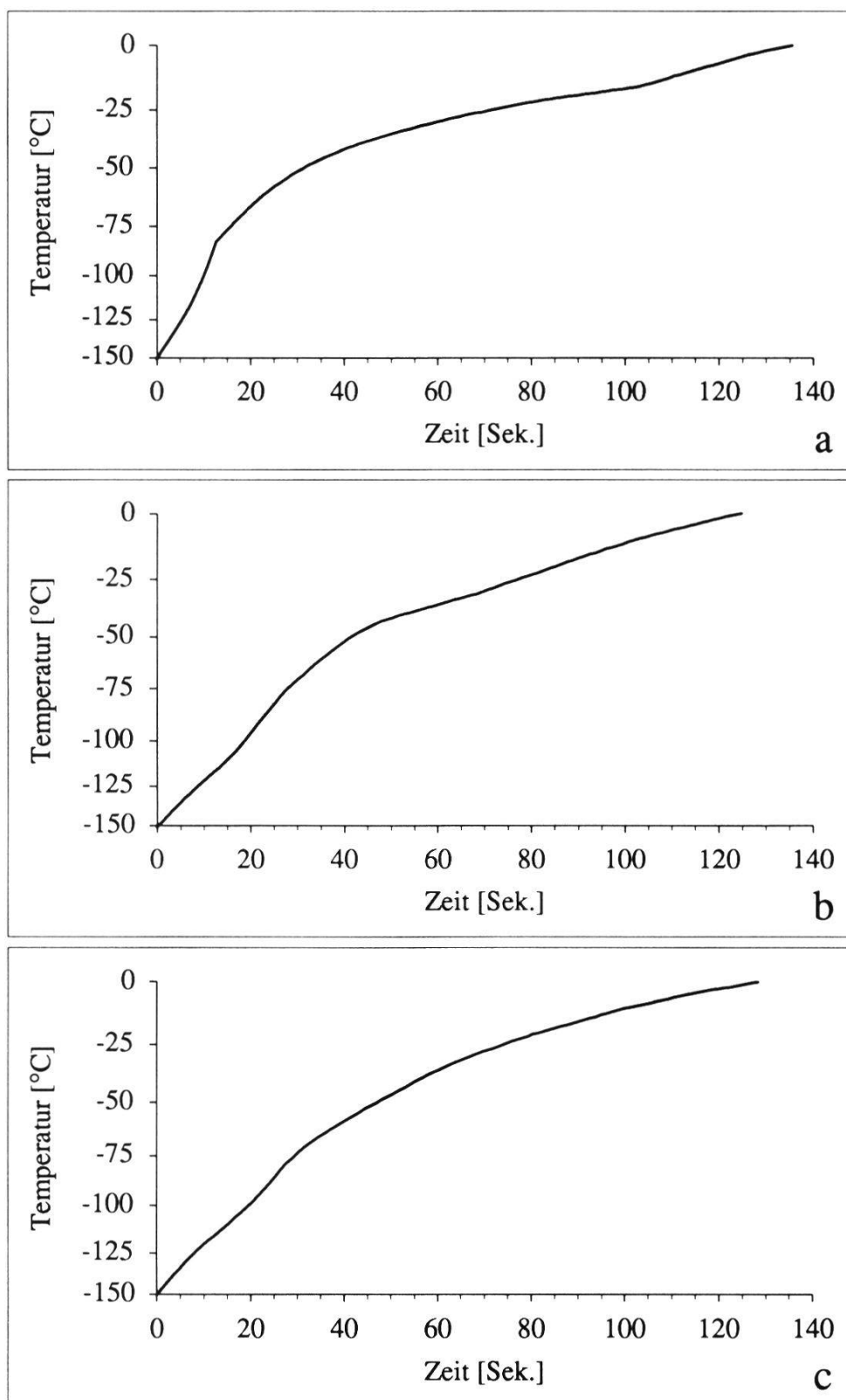


Fig. 38. Auftaukurven von im 30°C-Wasserbad rasch erwärmten Glycerinlösungen, die zuvor durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff tiefgekühlt wurden.
Rewarming curves of glycerol solutions rapidly thawed in a 30°C waterbath following cooling by direct immersion in liquid nitrogen.
a. 40% Glycerin, b. 50% Glycerin, c. 60% Glycerin

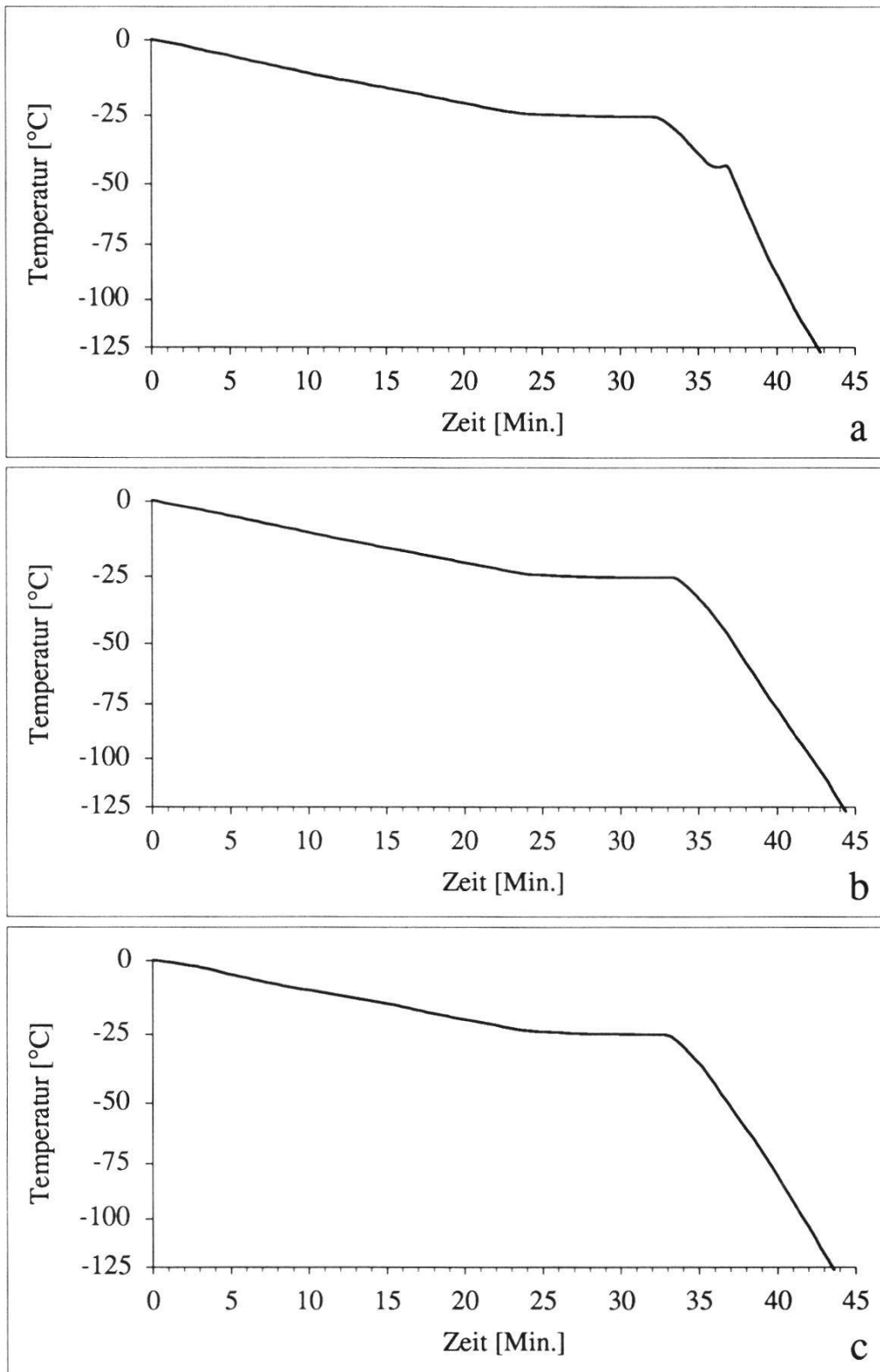


Fig. 39. Einfrierkurven von Glycerinlösungen, die mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Freezing curves of glycerol solutions cooled with the freezing apparatus.

a. 40% Glycerin, b. 50% Glycerin, c. 60% Glycerin

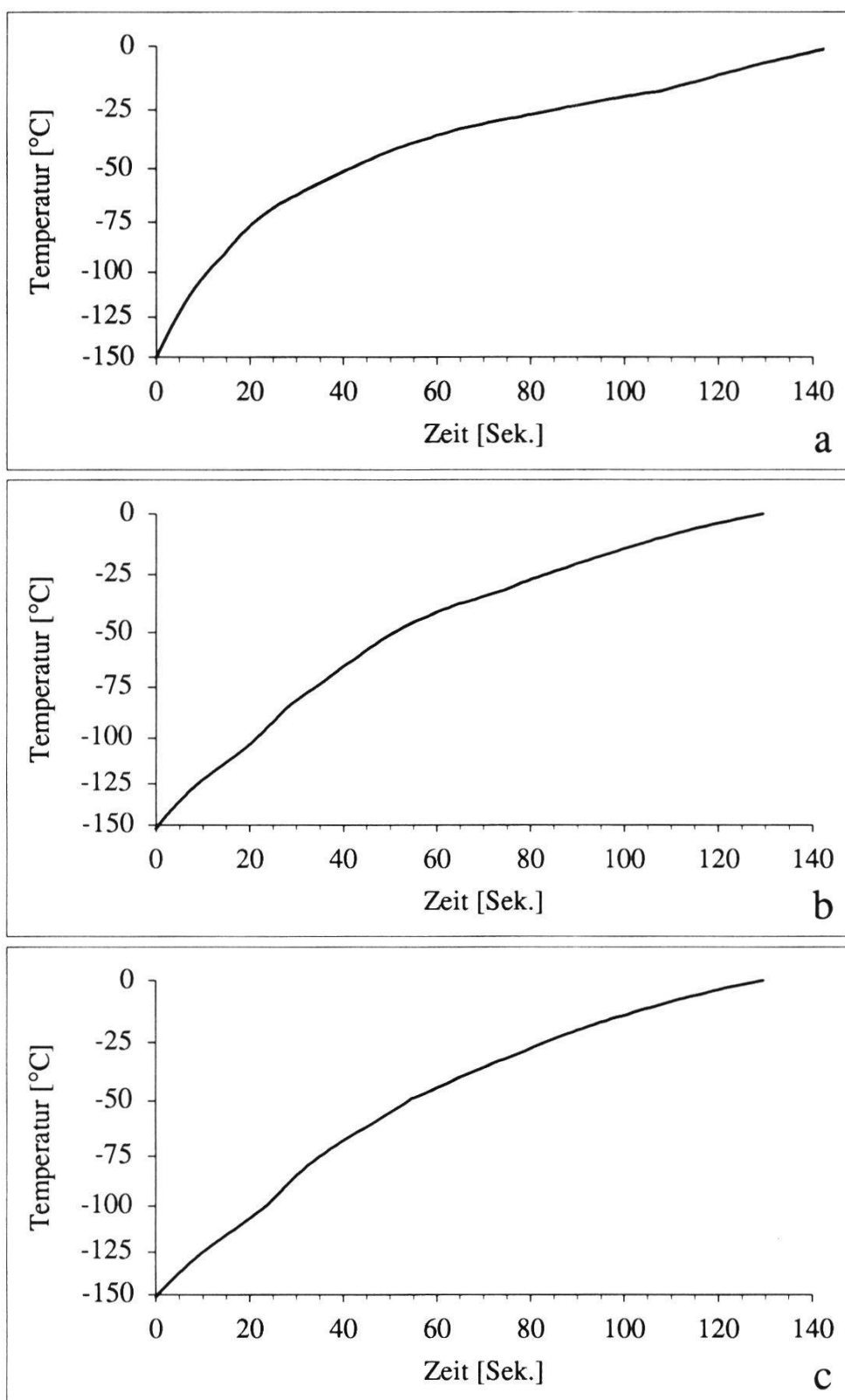


Fig. 40. Auftaukurven von im 30°C-Wasserbad rasch erwärmten Glycerinlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Rewarming curves of glycerol solutions rapidly thawed in a 30°C waterbath following cooling with the freezing apparatus.

a. 40% Glycerin, b. 50% Glycerin, c. 60% Glycerin

Glyzerinlösung beim Kühlen mit dem Gefrierapparat völlig auskristallisiert, wodurch der Schmelzpunkt der amorphen Restlösung höher als jener stärker konzentrierter, aber nur unvollständig auskristallisierter Lösungen ist und bei Auftauraten ab $20^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ tatsächlich über -100°C liegt.

Beim Einfrieren von 50% Glyzerin unter Anwendung verschiedener Kühlmethoden ist nie eine deutliche Kristallisation sichtbar (Fig. 37b, 39b und 43b). Während dem Abkühlen mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ findet aber offenbar ein langsames Kristallwachstum statt, da die tiefgefrorenen Proben opak sind. Bei genauem Hinsehen kann zwar eine ganz leichte Abflachung der Einfrierkurve zwischen -50 und -65°C bemerkt werden, diese Abweichung ist jedoch zu gering, um

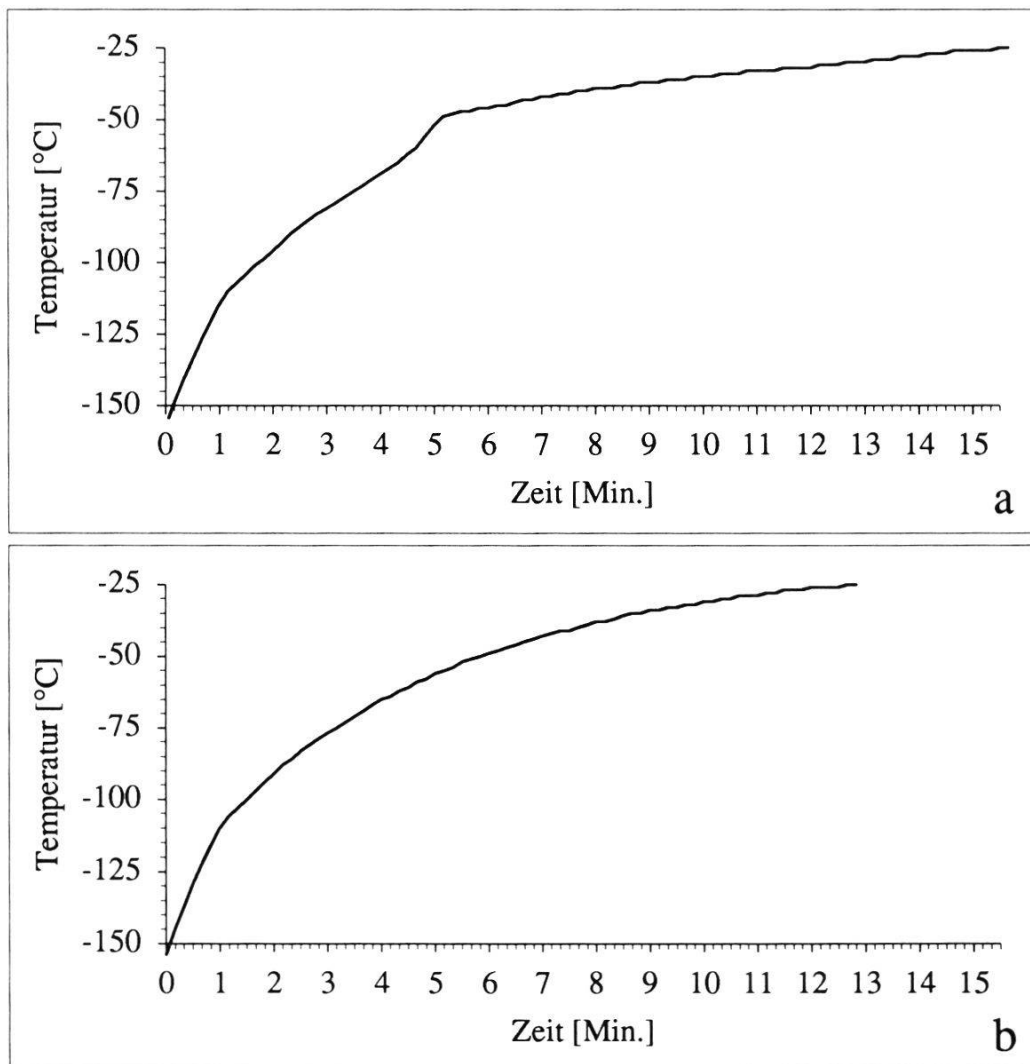


Fig. 41. Auftaukurven von in Luft bei -20°C erwärmten Glyzerinlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Rewarming curves of glycerol solutions thawed by air of -20°C following cooling with the freezing apparatus.

a. 50% Glyzerin, b. 60% Glyzerin

eine klare Aussage über den Kristallisationsbereich machen zu können. Beim Auftauen dieser Lösung im 30°C-Wasserbad (Fig. 44a) ist das Schmelzen der amorphen Restlösung nicht sichtbar, im Gegensatz zu den während dem Einfrieren durchsichtig bleibenden Lösungen, bei denen diese Phasenumwandlung klar erkennbar ist (Fig. 38b und 40b). Bei weiterem Erwärmen werden auch diese Lösungen opak, erwartungsgemäss ist jedoch kein deutlicher Kristallwachstumsbereich ausmachbar. Der Schmelzpunkt des kristallinen Eises ist hingegen in allen drei Fällen gut erkennbar. Werden die mit dem Gefrierprogramm T-25/1a gekühlten Proben langsam aufgetaut, ist der Wachstumsbereich klar ersichtlich (Fig. 41a und 42a). Die Kristallisation findet bei Proben,

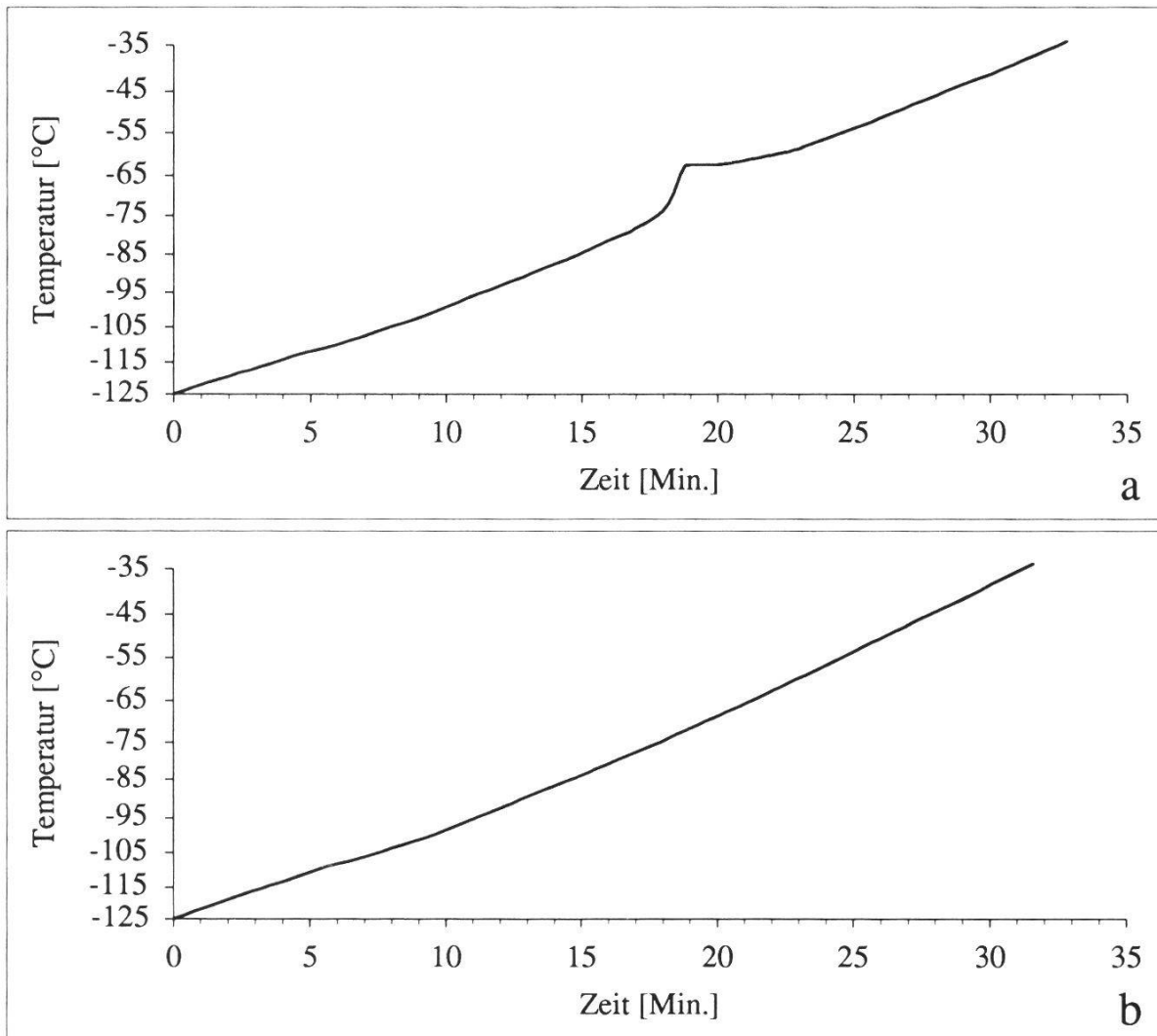


Fig. 42. Auftaukurven von mit 3°C/Min. erwärmten Glycerinlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Rewarming curves of glycerol solutions thawed at 3°C/min following cooling with the freezing apparatus.

a. 50% Glyzerin, b. 60% Glyzerin

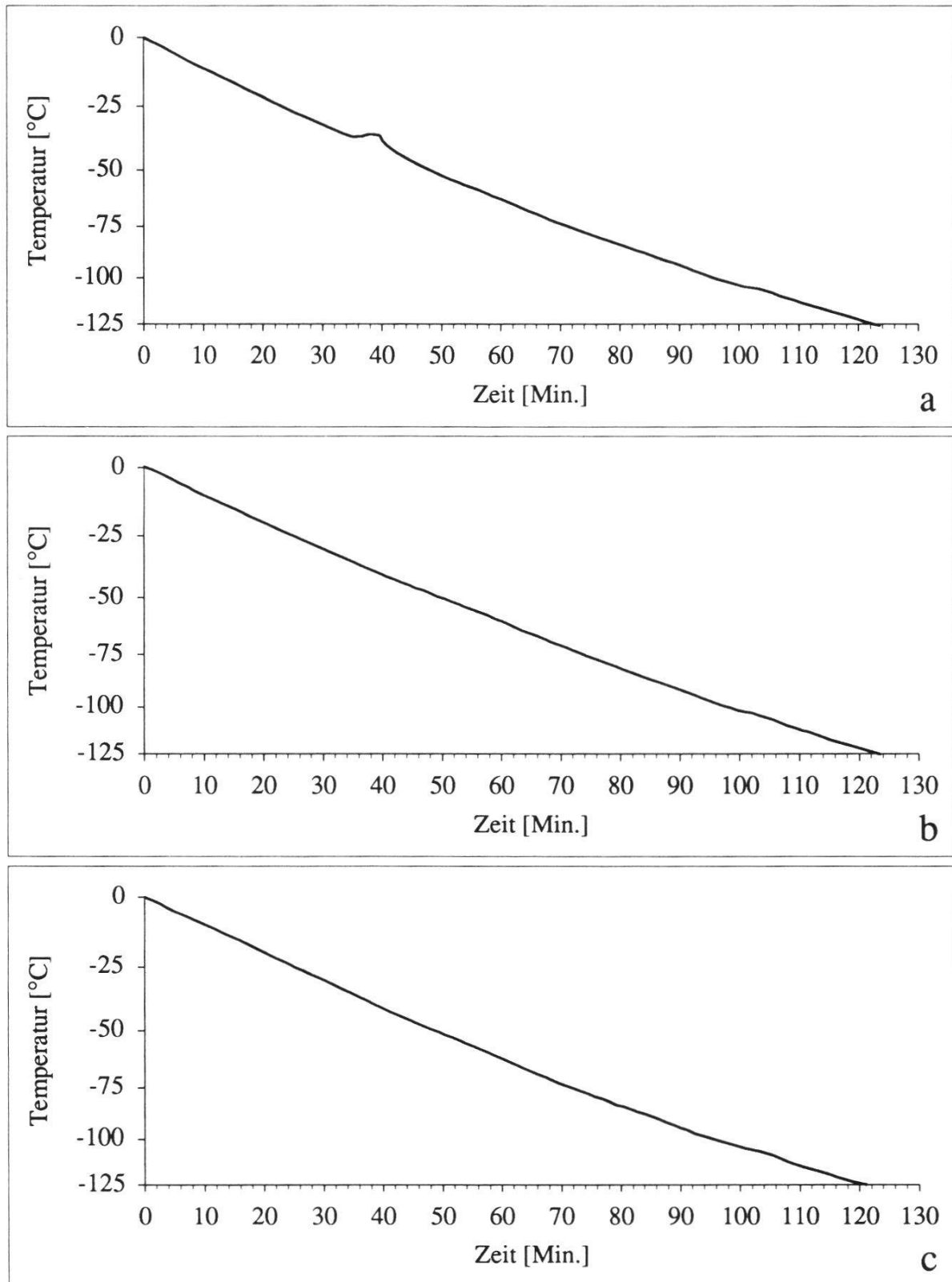


Fig. 43. Einfrierkurven von Glycerinlösungen, die mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ tiefgekühlt wurden.
Freezing curves of glycerol solutions cooled at $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$
a. 40% Glycerin, b. 50% Glycerin, c. 60% Glycerin

die in -20°C Luft aufgetaut wurden, grösstenteils zwischen -65 und -50°C statt, bei noch langsamerer Erwärmung ist dieser Temperaturbereich rund 10°C tiefer. Die in Figur 41 aufgezeichneten Kurven können gut mit den Auftauexperimenten von LUYET et al. (1958) verglichen werden, da dort die Auftaurate nicht wesentlich rascher war. Die entsprechenden Kurven sind sich recht ähnlich, wenn auch hier die Kristallisation etwas später einsetzt als bei ihnen. Des weitern ist in Figur 41a der Schmelzpunkt des kristallinen Eises nicht sichtbar, was wohl mit dem geringen Temperaturunterschied zum Ausenmilieu erklärt werden kann wie auch damit, dass bei dieser Auftaumethode nur alle zehn Sekunden eine Temperaturmessung vorgenommen wurde. In Fi-

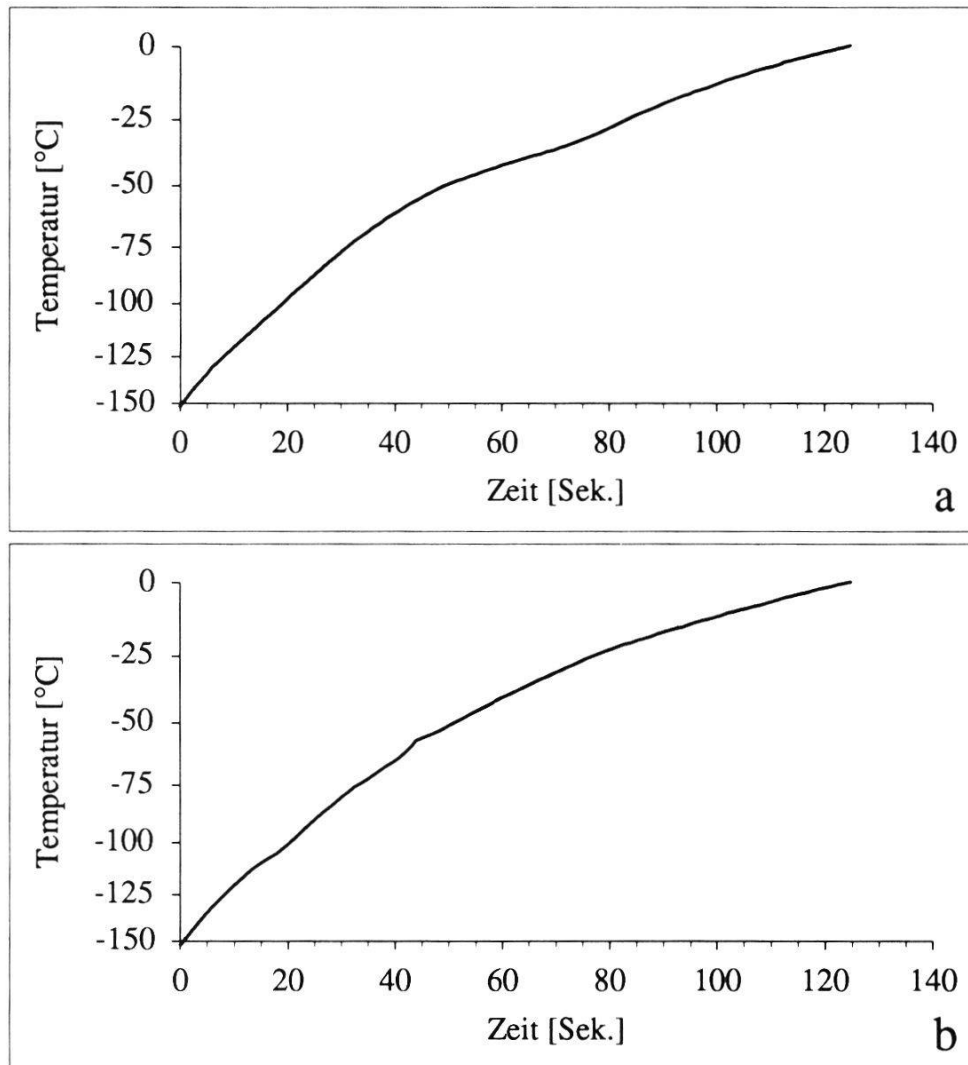


Fig. 44. Auftaukurven von im 30°C -Wasserbad rasch erwärmten Glyzerinlösungen, die zuvor mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Min}$. tiefgekühlt wurden.
Rewarming curves of glycerol solutions rapidly thawed in a 30°C waterbath following cooling at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
a. 50% Glyzerin, b. 60% Glyzerin

gur 42a wurde die Temperaturaufzeichnung vor Erreichen des Schmelzpunktes beendet.

60% Glycerinlösungen bleiben unabhängig von der verwendeten Einfrier- und Auftaumethode stets durchsichtig, und zumindest beim Kühlen kann nirgends freiwerdende Kristallisationsenergie festgestellt werden (Fig. 37c, 39c und 43c). Beim Auftauen ist das Schmelzen des vitrifizierten Eises in jedem Fall zwischen -110 und -105°C deutlich erkennbar. Ob beim Erwärmen im 30°C -Wasserbad bei Proben, die zuvor mit dem Gefrierapparat eingefroren wurden, eine geringe Menge kristallines Eis entsteht, ist unklar, da einerseits eine kleine Temperaturspitze bei -55 respektive -65°C zu verzeichnen ist, andererseits, wie bei den übrigen Auftaukurven, kein Schmelzen von Kristallen erkennbar ist.

Beim Auftauen der vitrifizierten Glycerinlösungen im Wasserbad entstehen immer Risse, wie dies bei Materialien mit einer schlechten Wärmeleitfähigkeit, wodurch lokal unterschiedliche Ausdehnungen auftreten, oft vorkommt (MACFARLANE 1987, LANGIS und STEPONKUS 1990). Wie gross bei den Kryoversuchen der dadurch entstandene Verlust an Wasserlinsen ist, konnte nicht untersucht werden, dürfte jedoch in Anbetracht der geringen Grösse der Knospen eher unbedeutend sein.

Von drei weiteren Gefrierschutzlösungen wurden während dem Einfrieren mit dem Gefrierapparat ebenfalls Temperaturkurven aufgezeichnet (Fig. 45a-c), wie auch beim anschliessenden Auftauen im 30°C -Wasserbad (Fig. 46a-c). Obwohl es sich bei 10% DMSO-40% Glycerin um eine aus drei Komponenten bestehende Lösung handelt, besteht kein nennenswerter Unterschied zur Auftaukurve von 50% Glycerin. Die Lösung bleibt beim Einfrieren ebenfalls durchsichtig und wird während dem Aufwärmen opak. Der Schmelzpunkt des amorphen Eises ist um einige Grade tiefer, wie dies anhand der Daten von BOUTRON und KAUFMANN (1978) zu erwarten war. 10% DMSO-40% Glukose hingegen kristallisiert bereits während der Vorkühlphase aus. Während beim hier abgebildeten Beispiel die Lösung nicht unterkühlt, konnte bei Wiederholungsversuchen eine geringe Unterkühlung um wenige Grade festgestellt werden. Beim Auftauen kann kein Schmelzen von amorphem Eis registriert werden, der Schmelzpunkt der kristallinen Phase ist jedoch gut erkennbar. Bei 60% PVP kristallisiert ein Teil des Wassers nur wenig unterhalb dem Schmelzpunkt aus. Es dürfte sich dabei um eine recht geringe Menge handeln, da das Schmelzen dieses Eises beim Auftauen nicht feststellbar ist und beim Kühlen von 65% PVP keine Kristallisation beobachtet werden konnte (Temperaturkurve nicht abgebildet). Die Resultate stimmen gut mit dem in

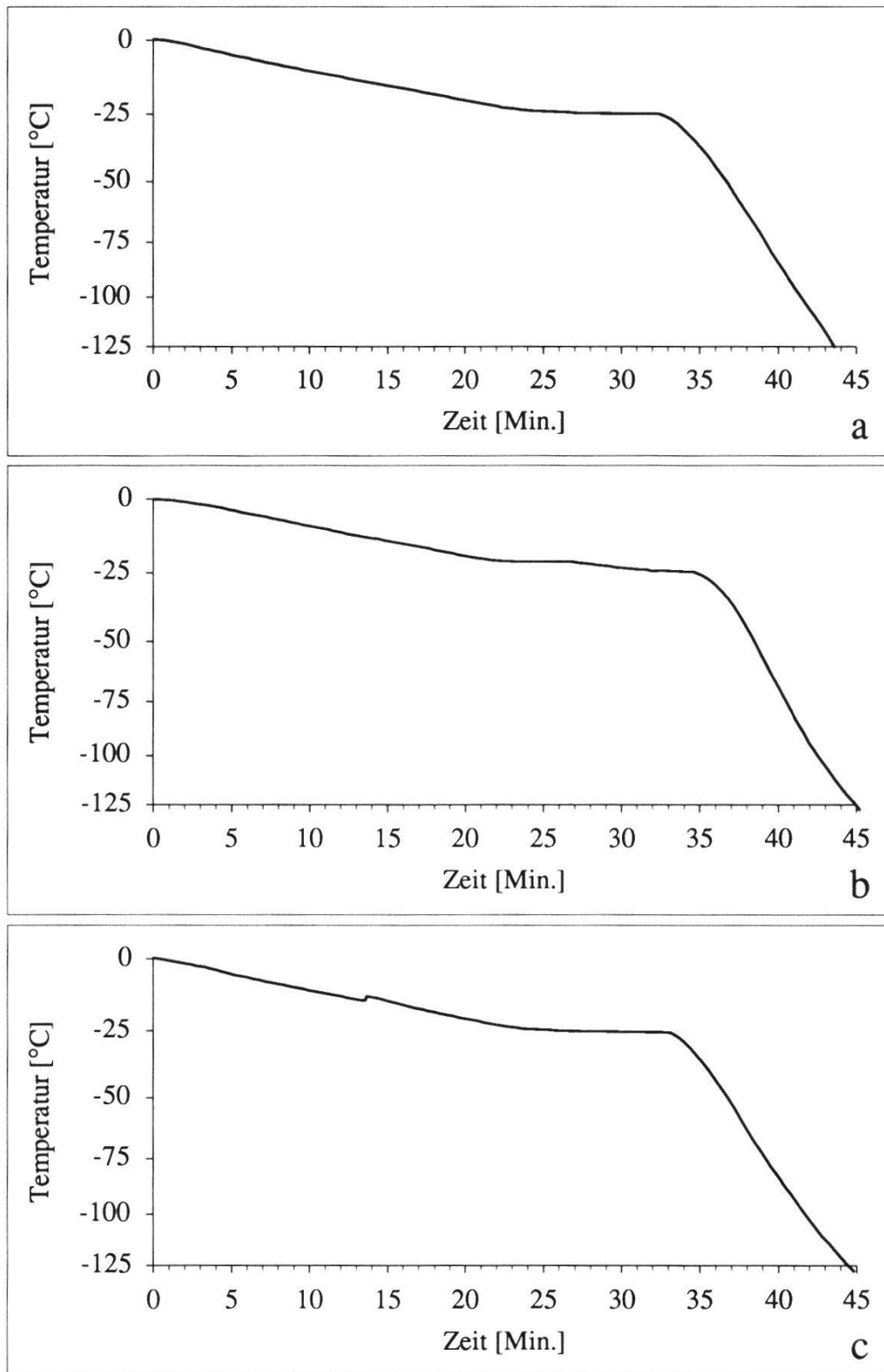


Fig. 45. Einfrierkurven von verschiedenen Gefrierschutzlösungen, die mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Freezing curves of different cryosolutions cooled with the freezing apparatus.

a. 10% DMSO-40% Glyzerin, b. 10% DMSO-40% Glukose, c. 60% PVP

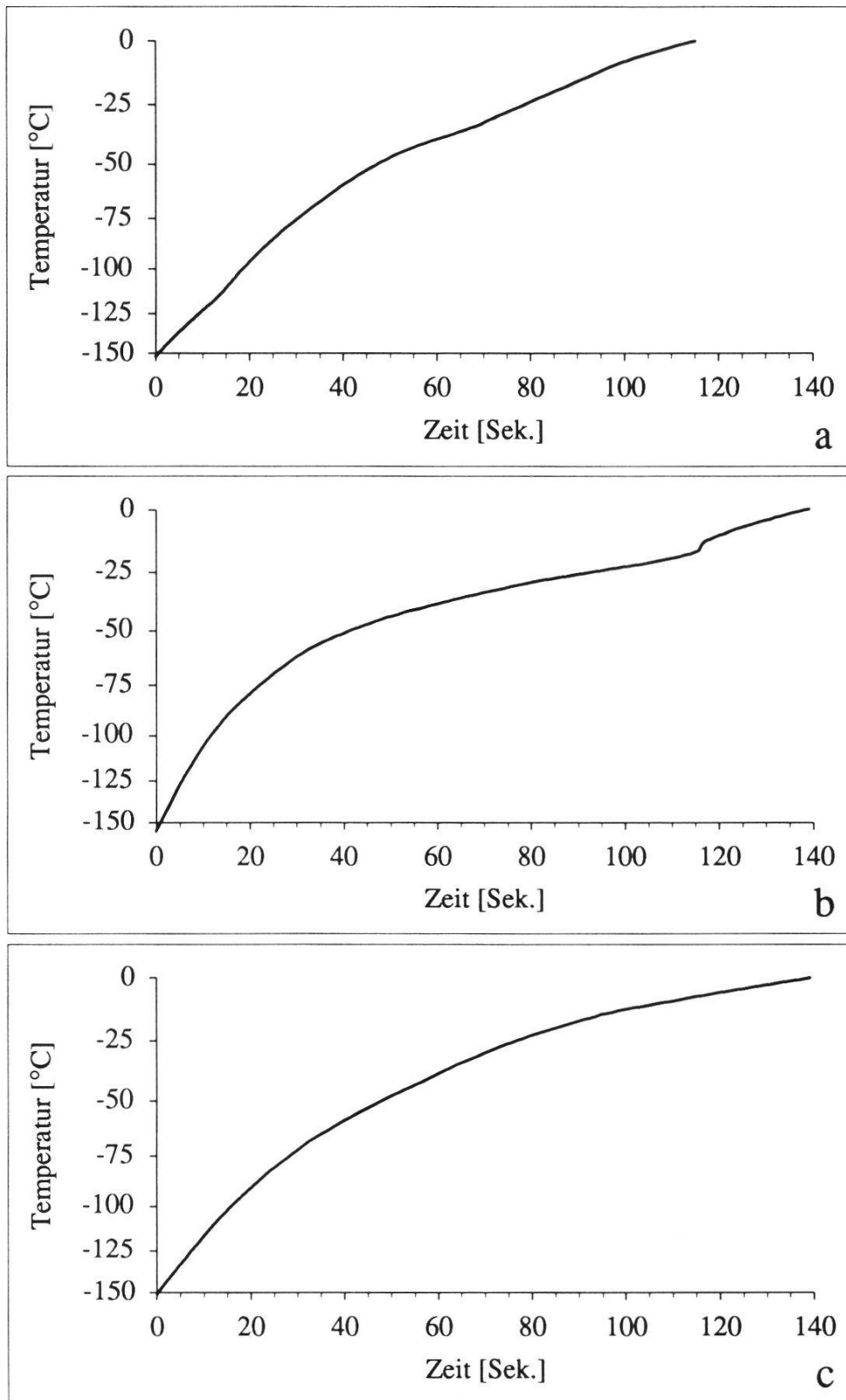


Fig. 46. Auftaukurven von verschiedenen, im 30°C-Wasserbad rasch erwärmten Gefrierschutzlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Rewarming curves of different cryosolutions thawed in a 30°C waterbath following cooling with the freezing apparatus.

a. 10% DMSO-40% Glyzerin, b. 10% DMSO-40% Glukose, c. 60% PVP

MACKENZIE (1977) abgebildeten Phasendiagramm überein, obwohl das von ihm verwendete PVP ein etwas niedrigeres durchschnittliches Molekulargewicht aufwies. Unerklärt bleibt die Tatsache, dass bei 60% PVP kein Schmelzen einer amorphen Phase sichtbar ist, obwohl nach MACKENZIE (1977) PVP genau wie Glycerin nicht auskristallisiert und oberhalb -50°C schmelzen sollte. Die untersuchten PVP-Lösungen blieben während dem ganzen Kühl- und Auftauvorgang durchsichtig.

Die anhand von diesen Temperaturkurven gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die Vermutung, dass *Lemnaceae* nur dann erfolgreich kryokonserviert werden können, wenn ein Kristallwachstum in der Gefrierschutzlösung vermieden oder zumindest stark unterdrückt werden kann. So entsteht bei 40% Glycerin, das für die *Lemnaceae*-Kryokonservierung ungeeignet ist, stets eine erhebliche Menge kristallines Eis, wie dies auch bei der 10% DMSO-40% Glukose-Lösung der Fall ist, die selbst bei raschem Kühlen durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff auskristallisiert (Einfrierkurve nicht abgebildet). 60% Glycerin zeigt bei allen Versuchen keine oder höchstens eine minimale Kristallbildung und ist daher als Gefrierschutzmittel, unabhängig von der Kühl- beziehungsweise Auftaurate, gut geeignet. Bei 50% Glycerin findet zwar zumindest während dem Auftauen stets eine Kristallisation statt, wenn aber das Wachstum durch genügend rasches Kühlen und Erwärmen derart gehemmt wird, dass beim Auftauen der Schmelzpunkt des amorphen Eises gut beobachtbar bleibt und kein klarer Kristallwachstumsbereich feststellbar ist, scheinen sich diese Kristalle zumindest auf gewisse *Lemnaceae*-Arten nicht schädigend auszuwirken. Die bei 60% PVP entstandene kristalline Eismenge dürfte allerdings kaum für das 100%ige Absterben der *Lemna minor*-Pflanzen verantwortlich sein. Um diese Vermutung zu bestätigen, wären Kryokonservierungsversuche mit 65% PVP nötig gewesen, doch ist diese "Lösung" derart zähflüssig, dass es unmöglich ist, die Pflanzen in dieselbe einzutau- chen, ohne gravierende Verletzungen zu verursachen.

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 prozentalem 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.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Kryokonservierungsmethode für *Lemnaceae* (Wasserlinsen), damit zukünftig ganze Sammlungen ohne grossen Zeit- und Arbeitsaufwand lebend aufbewahrt werden können. Von den weltweit 34 bekannten Arten wurden deren 24 in die Untersuchungen miteinbezogen. Getestet wurden im allgemeinen vegetative, aus einem oder mehreren Gliedern bestehende Pflanzen. Wenige Zusatzexperimente wurden mit Turionen von *Spirodela polyrrhiza* und Samen von *Lemna aequinoctialis* durchgeführt. Sofern nichts weiter bemerkt wird, beziehen sich die hier aufgeführten Beobachtungen immer auf ganze Pflanzen.

Bei sämtlichen 16 Arten der Gattungen *Spirodela* und *Lemna* wurden nach dem Auftauen lebende Exemplare festgestellt, die weiterkultiviert und vermehrt werden konnten. Bei *Spirodela polyrrhiza* gelang dies allerdings nur bei einem Vorversuch, und dieses Resultat war seither nicht mehr reproduzierbar. Die Gefrierresistenz der einzelnen Arten ist sehr unterschiedlich. Ähnliches gilt für die Stämme innerhalb einer Art. Es besteht keine Korrelation zwischen der Überlebensrate und der geographischen Herkunft der Pflanzen.

Glieder, Wurzeln und aus den Gliedtaschen herausragende Teile der Tochterglieder werden bereits durch die Zugabe der benötigten Gefrierschutzmittel oder deren Entfernung abgetötet. Die Gliedtaschen scheinen für die *Lemnaceae*-Kryokonservierung eine sehr wichtige Rolle zu spielen, indem sie jene Gewebeteile, die sich in den Taschen befinden vor einem Osmoschock bewahren, vermutlich, weil nur ein allmähliches Eindringen der dazugegebenen Flüssigkeit in die Taschen stattfindet. Für die eigentliche Kryokonservierung stehen somit lediglich noch Knospen und junge Tochterglieder zur Verfügung, aber die Regeneration zu neuen Individuen erfordert bei *Lemnaceae*, im Gegensatz zu den meisten anderen Blütenpflanzen, keine speziellen Zuchtbedingungen. Die mit *Lemnaceae* gemachten Feststellungen stimmen gut mit den Erfahrungen der Pflanzenkryobiologie überein, da bisher praktisch ausschliesslich junges, teilungsfähiges Gewebe meristematischer Herkunft erfolgreich tiefgefroren werden konnte. Die überlebenden Knospen sind teilweise ebenfalls geschädigt. Dies zeigt sich darin, dass nicht alle nach dem Auftauen noch lebenden Knospen auswachsen. Weiter können kallusförmige Gebilde und sukkulente Pflanzen auftreten, die in vielen Fällen für eine Weiterkultivierung unbrauchbar sind. Leicht geschädigte Exemplare neigen bei gewissen Arten zur Produktion von Anthozyanen. Ein verhältnismässig spätes Auswachsen nach dem Auftauen lässt vermuten, dass viele Knospen eine Regenerationsphase benötigen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Kryokonservierung der *Lemnaceae* ist, dass die Pflanzen vor dem Einfrieren durch das Gefrierschutzmittel entwässert werden und die Gefrierschutzlösung während dem Kühlvorgang vitrifiziert. Beim Auftauen kann teilweise eine geringe Kristallbildung toleriert werden. Glycerin ist das einzige der getesteten Gefrierschutzmittel, das in Konzentrationen um 50 Vol.% diese Anforderungen erfüllt und zumindest für die *Lemnoideae*-Arten verhältnismässig untoxisch ist. Die Kühlrate muss allerdings mindestens $-3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ betragen und die Proben müssen im 30°C -Wasserbad rasch aufgetaut werden. *Lemna minor*, die mit Abstand gefrierresistenteste Art, kann mit 50 Vol.% Glycerin sehr gut lebend kryokonserviert werden und eine markante Steigerung der Überlebensrate scheint kaum möglich zu sein. Bei sämtlichen anderen *Lemnoideae*-Arten empfiehlt es sich, auch während dem Auftauen jegliches Kristallwachstum zu verhindern. Dies kann entweder durch ultraschnelles Einfrieren und Auftauen der sich in einem 50 Vol.% Glycerintropfen befindenden Pflanzen erreicht werden, oder aber durch eine Erhöhung der Glycerinkonzentration auf 60 Vol.%, bei gleichzeitiger Verkürzung der Dehydrationsphase. Ob Glycerin eine rein äusserliche Gefrierschutzwirkung besitzt oder ob diese Substanz in die Zellen einzudringen vermag, konnte nicht festgestellt werden.

Für die Überlebensrate der Pflanzen ist die Art der Kultivierung vor und nach der Kryo-

konservierung ebenfalls wichtig. Besonders gut eignen sich auf Agarnährmedien gehaltene Pflanzen. Die Erhöhung der Gefrierresistenz durch eine nitratreiche Ernährung lässt vermuten, dass viele Arten Proteine produzieren, die wahrscheinlich durch Nukleationshemmung des Zellsafts und/oder Membranstabilisierung Schutz vor Gefrierschäden bieten. Nach dem Auftauen ist darauf zu achten, dass den Pflanzen Zucker (Saccharose) zur Verfügung steht, der für die Regeneration der Knospen von Bedeutung ist. Insbesondere wenig gefrierresistente Arten können sich in einer zuckerfreien Nährlösung nicht weiter entwickeln, und die Knospen sterben mit der Zeit ab. Die Überlebensrate wird ebenfalls durch das Kulturalter beeinflusst. Aus jungen und sehr alten Kulturen stammende Pflanzen zeigen eine verminderte Gefrierresistenz.

Samen von *Lemnaceae* weisen einen vergleichsweise hohen Wassergehalt auf, und die verwendeten *Lemna aequinoctialis*-Samen konnten nur dank vorangegangener Lufttrocknung erfolgreich kryokonserviert werden. Die Gefrierschutzmittelkonzentration war bedeutend tiefer, als sie für ganze Pflanzen benötigt wird, und die Lösung kristallisierte bereits während dem Kühlen aus. Bei Einfrierexperimenten mit Turionen von *Spirodela polyrrhiza* gelangen keine positive Resultate.

Die Kryokonservierung ist als Lagermethode für die Unterfamilie *Lemnoideae* grundsätzlich geeignet. Die folgenden acht Arten können in flüssigem Stickstoff bedenkenlos aufbewahrt werden: *Spirodela punctata*, *Lemna gibba*, *Lemna disperma*, *Lemna minor*, *Lemna japonica*, *Lemna obscura*, *Lemna ecuadoriensis* und *Lemna turionifera*. Für die restlichen *Lemnoideae*-Arten, ausser *Spirodela polyrrhiza*, ist eine Flüssig-Stickstofflagerung ebenfalls möglich, sofern eine genügend grosse Stückzahl eingefroren wird. Allerdings sollte bei diesen Arten vorerst jeder Stamm überprüft werden, ob zumindest eine geringe Gefrierresistenz vorhanden ist. Aus der erfolgreichen Kryokonservierung von *Lemna minor* über einen Zeitraum von 21 Monaten kann geschlossen werden, dass kein Vitalitätsverlust während einer Langzeitlagerung zu befürchten ist. Die erarbeitete Kryokonservierungsmethode kann bei *Wolffia*- und *Wolffiella*-Arten, die sehr sensibel auf osmotische Änderungen reagieren, nicht angewandt werden.

SUMMARY

The aim of the present work was to develop a cryopreservation method for *Lemnaceae* (duckweeds), so that whole collections can be stored without great expense of time and work in the future. Of the 34 world-wide known species, 24 were involved in these investigations. Generally vegetative plants of one to several fronds were tested. In addition a few experiments were conducted with turions of *Spirodela polyrrhiza* and seed of *Lemna aequinoctialis*. Unless stated otherwise, the present observations belong always to whole plants.

After thawing living specimens were obtained by all 16 species of the genera *Spirodela* and *Lemna*, which could be cultivated further on and multiplied. But with *Spirodela polyrrhiza* only one pre-experiment was successful, and since then this result was irreproducible. The freezing resistance of each species is very different. This establishment applies also to clones of one species. There is no noticeable correlation of geographical origin of the plants and survival rate.

Fronds, roots, and parts of daughter fronds, which are outside of the pouches, are killed by the addition of the cryoprotectant or by its removal. The pouches seems to play a very important role to the *Lemnaceae* cryopreservation by keeping those parts of tissue, which are inside the pouches, from osmotic shock, supposedly due to the slow penetration of the fluid added into these pouches. Thus buds and young daughter fronds are exclusively available for the actual cryopreservation, but regeneration to new individuals requires no special culture conditions for *Lemnaceae*, in contrast to most other flowering plants. The

findings of this study with *Lemnaceae* are in good agreement with cryobiological experiments, where until now almost, exclusively young tissue of meristematic origin with cells fit for segmentation was successfully cryopreserved. Buds surviving cryopreservation are sometimes also damaged and not all of them grow out after thawing. Also callus formation and succulent plants can be recognized, which are in many cases not useable for a further cultivation. Specimens of certain species which are slightly damaged tend to produce anthocyanins. A comparatively late recovery after thawing suggests that many buds need a time period for regeneration.

It is assumed that for the successful cryopreservation of *Lemnaceae* the plants were dehydrated by the cryoprotectant before freezing and the cryosolution vitrifies during cooling. During thawing a slight crystal growth can be tolerated in some cases. Glycerol in a concentration of about 50 v/v% is the only one of all cryoprotectants tested which comes up to these demands and is comparatively un toxic at least for *Lemnoideae* species. Though the minimal cooling rate has to be $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and the samples must be rapidly thawed in a 30°C water bath. *Lemna minor*, by a wide margin the most freeze-resistant species can be cryopreserved very easily in the presence of 50 v/v% glycerol, and a distinct increase of the survival rate seems hardly to be possible. It is recommendable for all other *Lemnoideae* species to avoid any crystal growth even during thawing. This aim can be achieved either by an ultra-rapid cooling and thawing of a 50 v/v% glycerol drop containing the plants or by increasing the glycerol concentration to 60 v/v%, while simultaneously shortening the incubation time for dehydration. Whether protection by glycerol against freezing injuries is only external or if this agent has the ability to penetrate into the cells could not be established.

The kind of cultivation before and after cryopreservation is also important for the survival rate. Plants grown on an agar nutrient medium are especially fitted for a storage in liquid nitrogen. The increase of freezing resistance by a food sources rich in nitrate suggests that many species produce proteins, which offer a protection against freezing damage, probably by inhibiting intracellular nucleation and/or by stabilisation of membranes. After thawing sugar (sucrose), which is important for recovery of the buds, should be available for the plants. Importantly, buds of plants with a low freezing resistance do not regenerate when growing on a sugar-free nutrient solution and die after a certain time. Also the age of culture influences the survival rate. Plants from young or very old cultures show a reduced freezing resistance.

Seed of *Lemnaceae* contains much water and the seeds of *Lemna aequinoctialis* studied could survive cryopreservation only following previous air-drying. The concentration of the cryoprotectant needed was remarkably lower than is necessary for whole plants, and the solution crystallised during cooling. In freezing experiments with turions of *Spirodela polyrrhiza* there was no success.

Cryopreservation is basically suitable as storage method for the subfamily *Lemnoideae*. The following mentioned eight species can be stored in liquid nitrogen without hesitation: *Spirodela punctata*, *Lemna gibba*, *Lemna disperma*, *Lemna minor*, *Lemna japonica*, *Lemna obscura*, *Lemna ecuadoriensis* and *Lemna turionifera*. Storage in liquid nitrogen is also possible for the residual *Lemnoideae* species, with exception of *Spirodela polyrrhiza*, as far as the sample size of frozen fronds is big enough. First of all each clone of these species should to be tested for existence of low freezing resistance. It can be concluded from the successful cryopreservation of *Lemna minor* over a period of 21 months that there is no fear of lost of viability during a long-term storage. The cryopreservation method developed in this work is not applicable for *Wolffia* and *Wolffiella* species, which respond very sensitively to osmotical changes.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., ROFF M., ROBERTS K. and WATSON J. D., 1983: Molecular biology of the cell. Garland Publ., Inc., New York. 1146 S.
- AMADO R., MUELLER-HIEMEYER R. und MARTI U., 1980: Proteingehalt, Aminosäurezusammensetzung und Neutralzucker Gehalt von *Lemnaceae* (Vorläufige Mitteilung). Veröff. Geobot.Inst.ETH,Stiftung Rübel, Zürich 70, 102-117.
- ANDREICA A., SPARCHEZ C. and SORAN V., 1988: Germination of wheat pollen under normal and under cryopreservation conditions. (In Rumänisch). Stud.Cercet.Biol.Ser.Biol. Veg. 40(1), 55-58.
- ANGELL C.A. and MACFARLANE D.R., 1982: Conductimetric and calorimetric methods for the study of homogeneous nucleation below both T_h and T_g . Adv.Ceram. 4, 66-72.
- ANGELL C.A. and TUCKER J.C., 1980: Heat capacity changes in glass-forming aqueous solutions and the glass transition in vitreous water. J.Phys.Chem. 84, 168-272.
- ASAHINA E., 1962: Frost injury in living cells. Nature (London) 196, 445-446.
- ASHBY E., WANGERMANN E. and WINTER E.J., 1949: Studies in the morphogenesis of leaves III. Preliminary observations on vegetative growth in *Lemna minor*. New Phytol. 48, 374-381.
- ASHWORTH E.N. and ABELES F.B., 1984: Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. Plant Physiol.(Bethesda) 76, 201-204.
- ASHWORTH E.N., DAVIES G.A. and ANDERSON J.A., 1985: Factors affecting ice nucleation in plant tissues. Plant Physiol.(Bethesda) 79, 1033-1037.
- BAJAJ Y.P.S., 1977: Survival of *Atropa* and *Nicotiana* pollen embryo frozen at -196°C . Curr.Sci.(Bangalore) 46, 305-307.
- BAJAJ Y.P.S., 1979: Freeze preservation of meristems of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum*. Indian J.Exp.Biol. 17, 1405-1407.
- BAJAJ Y.P.S., 1981: Regeneration of plants from potato *Solanum tuberosum* meristems freeze preserved for 24 months. Euphytica 30, 141-146.
- BAJAJ Y.P.S., 1983a: Cassava *Manihot esculenta* plants from meristem cultures freeze preserved for 3 years. Field Crops Res. 7(3), 161-168.
- BAJAJ Y.P.S., 1983b: Production of normal seeds from plants regenerated from the meristems of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum* cryopreserved for 20 months. Euphytica 32, 425-430.
- BAJAJ Y.P.S., 1984a: The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. Theor.Appl.Genet. 67, 525-528.
- BAJAJ Y.P.S., 1984b: Induction of growth in frozen embryos of coconut and ovules of citrus. Curr.Sci.(Bangalore) 53, 1215-1216.
- BAJAJ Y.P.S., 1985: Cryopreservation of embryos. In: KARTHA K.K. (ed.), Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 227-242.
- BAJAJ Y.P.S., 1988: Regeneration of plants from frozen -196°C protoplasts of *Atropa belladonna* L., *Datura innoxia* Mill., and *Nicotiana tabacum* L. Indian J.Exp.Biol. 26, 289-292.
- BARNES J.D. and WILSON J.M., 1986: Effects of hormones on morphogenesis and cold resistance in berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). J.Exp.Bot. 37, 1542-1551.
- BECWAR M.R., STANWOOD P.C. and LEONHARDT K.W., 1983: Dehydration effects of freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. J.Amer.Soc.Hort.Sci. 108(4), 613-618.
- BEN-AMOTZ A. and GILBOA A., 1980: Cryopreservation of marine unicellular algae. 1. A survey of algae with regard to size culture age, photosynthetic activity and chlorophyll to cell ratio. Mar.Ecol.Prog.Ser. 2(2), 157-162.
- BENSON E.E., HARDING K. and SMITH H., 1989: Variation in recovery of cryopreserved

- shoot tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post-freeze light regimes. *Cryo-Lett.* 10, 323-344.
- BERTRAND-DEBRUNAIS A., FABRE J., ENGELMANN F., DEREUDDRE J. et CHARRIER A., 1988: Reprise de l'embriogenèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier (*Coffea arabica* L.) après leur congélation dans l'azote liquide. *C.R.Acad.Sci.Paris Sér.III* 307, 795-801.
- BOUTRON P., 1984: More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: Comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21, 183-191.
- BOUTRON P., 1986: Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallisation and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. *Cryobiology* 23, 88-102.
- BOUTRON P., 1988: Vitrification of aqueous solutions. *Cryobiology* 25, 555.
- BOUTRON P. and ARNAUD F., 1984: Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *Cryobiology* 21, 348-358.
- BOUTRON P. and KAUFMANN A., 1978: Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-dimethylsulfoxid. *Cryobiology* 15, 93-108.
- BOUTRON P. et MEHL P., 1986: Nouveaux cryoprotecteurs pour la cryopréservation des cellules par vitrification totale. *Bull.Soc.Bot.Fr.* 133(3), 27-39.
- BOUTRON P., DELAGE D., ROUSTIT B. and KÖRBER C., 1982: Ternary systems with 1,2-propanediol – A new gain in the stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol-1-propanol. *Cryobiology* 19, 550-554.
- BOUTRON P., MEHL P., KAUFMANN A. and ANGIBAUD P., 1986: Glass-forming tendency and stability in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. 1. Binary systems water-polyalcohols. *Cryobiology* 23, 453-469.
- BRAUN A., 1988: Cryopreservation of sugar beet germplasm. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 14, 161-168.
- BREIEROVA E., KAVACOVSKA R. and KOCKOVA-KRATOCHVILOVA A., 1987a: Cryoprotection and freeze drying of yeasts. *Biologia (Bratislava)* 42(3), 239-245.
- BREIEROVA E., KOCKOVA-KRATOCHVILOVA A. and DELGADO R., 1987b: Storage of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and related species in liquid nitrogen. *Folia Microbiol. (Prag)* 32, 426-430.
- CHEN T.H.H., KARTHA K.K., CONSTABEL F. and GUSTA L.V., 1984a: Freezing characteristics of cultured *Catheranthus roseus* L. G. Don cells treated with dimethylsulfoxid and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol.(Bethesda)*75, 720-725.
- CHEN T.H.H., KARTHA K.K., LEUNG N.L., KURZ W.G.W., CHATSON K.B. and CONSTABEL F., 1984b: Cryopreservation of alkaloid producing cell cultures of periwinkle *Catheranthus roseus*. *Plant Physiol.(Bethesda)* 75, 726-731.
- CHEN T.H.H., KARTHA K.K. and GUSTA L.V., 1985: Cryopreservation of wheat *Triticum aestivum* cultivar Norstar suspension culture and regenerable callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 4, 101-110.
- CHIN H.F., KRISHNAPILLAY B. and ALANG Z.C., 1988: Cryopreservation of *Veitchia* and *Howea* palm embryos: Non-development of the haustorium. *Cryo-Lett.* 9, 372-379.
- DAS R.R. and GOPAL B., 1969: Vegetative propagation in *Spirodela polyrrhiza*. *Trop.Ecol.* 10, 270-277.
- DE BOUCAUD M.-T. and CAMBECEDES J., 1988: The use of 1,2-propanediol for cryopreservation of recalcitrant seeds: The model case of *Zea mays* imbibed seeds. *Cryo-Lett.* 9, 94-101.
- DELVALLEE I., GUILLAUD J., BECKERT M. and DUMAS C., 1989: Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and in vitro. *Plant Sci.(Shannon)* 60(1), 129-136.
- DEREUDDRE J., GALERNE M. et GAZEAU C., 1987: Effets du saccharose sur la résistance à la congélation dans l'azote liquide (-196°C) des méristèmes apicaux d'oeillets (*Dianthus cario-*

- phyllus*) cultivés in vitro. C.R.Acad.Sci.Paris Sér.III 304, 485-487.
- DEREUDDRE J., FABRE J. and BASSAGLIA C., 1988: Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. Plant Cell Rep. 7, 170-173.
- DEREUDDRE J., SCOTTEZ C., ARNAUD Y. et DURON M., 1990a: Effets d'un durcissement au froids des vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy) sur la résistance des apex axillaires à une congélation dans l'azote liquide. C.R.Acad.Sci.Paris Sér.III 310, 265-272.
- DEREUDDRE J., SCOTTEZ C., ARNAUD Y. et DURON M., 1990b: Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy), enrobés dans l'alginat à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: Effets d'une durcissement préalable au froids. C.R.Acad.Sci.Paris Sér.III 310, 317-323.
- DEREUDDRE J., BLANDIN S. and HASSEN N., 1991a: Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture. Cryo-Lett. 12, 125-134.
- DEREUDDRE J., HASSEN N., BLANDIN S. and KAMINSKI M., 1991b: Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. Thermal analysis. Cryo-Lett. 12, 135-148.
- DIETRICH B., POPOV A.S., PFEIFFER B., NEUMANN D., BUTENKO R. and LUCKNER M., 1982: Cryopreservation of *Digitalis lanata* cell cultures. Planta Med. 46(2), 82-87.
- DIETRICH B., HAACK U., POPOV A.S., BUTENKO R. and LUCKNER M., 1985: Long-term storage in liquid nitrogen of an embryogenic cell strain of *Digitalis lanata*. Biochem. Physiol.Pflanz. 180(1), 33-43.
- DIETRICH B., HAACK U. and LUCKNER M., 1986: Cryopreservation of *Digitalis lanata* cells grown in vitro. Precultivation and recultivation. J.Plant Physiol. 126, 63-73.
- DIETRICH B., WOLF T., BORMANN A., POPOV A.S., BUTENKO R. and LUCKNER M., 1987: Cryopreservation of *Digitalis lanata* shoot tips. Planta Med. 53(4), 359-363.
- DOUZOU P., 1986: Interactive effects of cryosolvents, ionic and macromolecular solutes on protein structures and functions. Cryobiology 23, 38-47.
- DOWELL L.G. and RINFRET A.P., 1960: Low temperature forms of ice as studied by X-ray diffraction. Nature (London) 188, 1144-1148.
- EFRAT Y., PIETERSE A.H. and BOUMAN F. 1977: A comparative study of developing air chambers in flat and gibbous fronds of *Lemna gibba* L. Acta Bot.Neerl. 26, 343-347.
- ENGELMANN F. and DEREUDDRE J., 1988: Cryopreservation of oil palm somatic embryos: Importance of the freezing process. Cryo-Lett. 9, 220-235.
- FAHY G.M., MACFARLANE D.R., ANGELL C.A. and MERYMAN H.T., 1984: Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21, 407.
- FINKLE B.J. and ULRICH J.M., 1979: Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. Plant Physiol.(Bethesda) 63, 598-604.
- FINKLE B.J., ZAVALA M.E. and ULRICH J.M., 1985: Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. In: KARTHA K.K. (ed.), Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 75-113.
- FLINDT R., 1988: Biologie in Zahlen. (3. Aufl.). Fischer, Stuttgart. 283 S.
- FRANKS F., 1986: Molekulare Grundlagen der Kälteresistenz von Lebewesen. Chem.unserer Zeit 20(5), 146-155.
- FRANZ T.J. and VAN BRUGGEN J.T., 1967: A possible mechanism of action of DMSO. Ann. New York Acad.Sci. 141, 302-309.
- FRICK H., 1991: Vitrification in vivo in *Lemna minor* and its maintenance by isopentenyl adenine. J.Plant Physiol. 137, 502-504.
- FUJIKAWA S. and MIURA K., 1986: Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation of extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit bodies of *Basidiomycetes*. Cryobiology 23, 371-382.

- GANESHAN S., 1986: Viability and fertilizing capacity of onion pollen *Allium cepa* stored in liquid nitrogen minus 196° Celsius. *Indian Trop.Agric.* 63(1), 46-48.
- GRIMSLEY N.H. and WITHERS L.A., 1983: Cryopreservation of cultures of the moss *Physcomitrella patens*. *Cryo-Lett.* 4, 251-258.
- GROUT B.W.W., 1979: Low temperature storage of imbibed tomato seeds: A model for recalcitrant seed storage. *Cryo-Lett.* 1, 71-76.
- GROUT B.W.W., WESTCOTT R.J. and HENSHAW G.G., 1978: Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology* 15, 478-483.
- GUERN J., 1965: Corrélations de croissance entre frondes chez Lemnaceés. *Ann.Sci.Nat. Bot.Paris Sér.12* 6, 1-156.
- GUY C.L. and HASKELL D., 1987: Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.(Bethesda)* 84, 872-878.
- HAHNE G. and LOERZ H., 1987: Cryopreservation of embryogenic callus cultures from barley *Hordeum vulgare*. *Plant Breeding* 99(4), 330-332.
- HAYES L.J., DILLER K.R., LEE H.S. and BAXTER C.R., 1984: Definition of an average cooling rate during cell freezing. *Cryo-Lett.* 5, 97-110.
- HEBER U., 1968: Freezing and loss of enzyme activities. *Cryobiology* 5, 188-201.
- HEBER U., 1970: Proteins capable of protecting chloroplast membranes against freezing. In: WOLSTENHOLME G.E.W. and O'CONNOR M. (eds.), *The frozen cell. A Ciba foundation symposium.* Churchill, London. (Longman group Ltd). 27-50.
- HEGELMAIER F., 1868: *Die Lemnaceen. Eine monographische Untersuchung.* Engelmann, Leipzig. 169 S.
- HENSHAW G.G., O'HARA J.F. and STAMP J.A., 1985a: In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 159-170.
- HENSHAW G.G., KEEFE P.D. and O'HARA J.F., 1985b: Cryopreservation of potato meristems. In: SCHAEFER-MENUHR A. (ed.), *Advances in agricultural biotechnology. In vitro techniques: Propagation and long-term storage.* Junk, Dordrecht. 155-160.
- HILLMAN W.S., 1961: Experimental control of flowering in *Lemna*. 3. A relationship between medium composition and the opposite photoperiodic responses of *L. perpusilla* 6746 and *L. gibba* G3. *Amer.J.Bot.* 48, 413-419.
- HILLMAN W.S., 1975: Photoperiodism in seedling strains of *Lemna perpusilla*: Juvenility without obvious morphological correlates? *Amer.J.Bot.* 62, 537-510.
- HILLMAN W.S. and CULLEY D.D., 1978: The uses of duckweed. *Amer.Sci.* 66(4), 442-451.
- HINCHA D.K., SCHMITT J.M. and HEBER U., 1988: Cryoprotective proteins in plants. *Cryobiology* 25, 557.
- HIRSH A.G., 1987: Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology* 24, 214-228.
- HIRSH A.G., WILLIAMS R.J. and MERYMAN H.T., 1985: A novel method of natural cryoprotection (Intracellular glass formation in deeply frozen *Populus*). *Plant Physiol.(Bethesda)* 79, 41-56.
- HUTNER S.H., 1953: Comparative physiology of heterotropic growth. In: LOOMIS W.E. (ed.), *Growth and differentiation in plants.* Iowa State Coll. Press. 417-446.
- JACOBS D.L., 1947: An ecological life history of *Spirodela polyrrhiza* (greater duckweed) with emphasis on the turion phase. *Ecol.Monogr.* 17, 437-469.
- JOCHEM M. and KÖRBER C.H., 1987: Extended phase diagrams for the ternary solutions H₂O-NaCl-hydroxyethylstarch (HES) determined by DSC. *Cryobiology* 24, 513-536.
- KANNO H., SPEEDY R.H. and ANGELL C.A., 1975: Supercooling of water to -92°C under pressure. *Science (New York)* 189, 880-881.
- KARTHA K.K., 1980: Cryopreservation of plant meristems – A novel approach for germplasm storage. 2nd int. congr. of systematic and evolutionary biol. University of British Columbia: Vancouver, B.C., 1980. *Canad.Paper*, 45.

- KARTHA K.K., 1981: Meristem culture and cryopreservation methods and applications. In: THORPE T.A. (ed.), Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Symp. based on the UNESCO training course. Campinas, Sao Paulo, 1978. Acad.Press, Inc., London. 181-222.
- KARTHA K.K., 1985: Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA K.K. (ed.), Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 115-134.
- KARTHA K.K., LEUNG N.L. and GAMBORG O.L., 1979: Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant.Sci.Lett.* 15, 7-15
- KARTHA K.K., LEUNG N.L. and PAHL K., 1980: Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 105(4), 481-484.
- KARTHA K.K., LEUNG N.L., GAUDET-LAPRAIRIE P.G. and CONSTABEL F., 1982: Cryopreservation of periwinkle, *Catheranthus roseus* cells cultured in vitro. *Plant Cell Rep.* 1, 135-138.
- KARTHA K.K., FOWKE L.C., LEUNG N.L., CASWELL K.L. and HAKMAN I., 1988: Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J.Plant.Physiol.* 132, 529-539.
- KAURIN Å. and STUSHNOFF C., 1985: Influence of dimethylsulfoxid on freezing resistance of lettuce seeds. *Cryobiology* 22, 569-573.
- KEEFE P.D. and HENSHAW G.G., 1984: A note of the multiple role of artificial nucleation of the suspending medium during two-step cryopreservation procedures. *Cryo-Lett.* 5, 71-78.
- KUO C.C. and LINEBERGER R.D., 1985: Survival of in vitro cultured tissue of "Jonathan" apples exposed to -196°C. *HortScience* 20, 764-767.
- KURIYAMA A. WATANABE K., UENO S. and MITSUDA H., 1989: Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Sci.(Shannon)* 64(2), 231-236.
- KUSHAD M.M. and YELENOSKY G., 1987: Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiol.(Bethesda)* 84, 692-695.
- LALK I. and DÖRFFLING K., 1985: Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol.Plant.(Kopenhagen)* 63, 287-292.
- LANDOLT E., 1986: The family of *Lemnaceae* – A monographic study (vol. 1). Veröff. Geobot.Inst.ETH,Stiftung Rübel,Zürich 71, 566 S.
- LANDOLT E. and KANDELER R., 1987: The family of *Lemnaceae* – A monographic study (vol. 2). Veröff.Geobot.Inst.ETH,Stiftung Rübel,Zürich 95, 638 S.
- LANE L.B., 1925: Freezing points of glycerol and its aqueous solutions. *Ind.Eng.Chem.* 17, 924.
- LANGIS R., SCHNABEL B., EARL E.D. and STEPONKUS P.L., 1989: Cryopreservation of *Brassica campestris* cell suspensions by vitrification. *Cryo-Lett.* 10, 421-428.
- LANGIS R. and STEPONKUS P.L., 1990: Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant Physiol.(Bethesda)* 92, 666-671.
- LARCHER W. und HÄCKEL H., 1985: Handbuch der Pflanzenkrankheiten (begründet. v. SO-RAUER P.). Bd. 1, Teil 5 (7. Aufl.). Herausg. v. RADEMACHER B. und RICHTER H. Parey, Berlin/Hamburg. 326 S.
- LAWALREE A., 1943: La multiplication végétative des Lemnaceés en particulier chez *Wolffia arrhiza*. *Cellule* 49, 337-382.
- LESHEM B., 1983: Growth of carnation meristems in vitro: Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Ann.Bot.(London)* 52, 413-415.
- LEVITT J., 1964: Cryobiology as viewed by the botanist. *Cryobiology* 1, 11-17.
- LEVITT J. and DEAR J., 1970: The role of membrane proteins in freezing injury and resistance. In: WOLSTENHOLME G.E.W. and O'CONNOR M. (eds.), The frozen cell. A Ciba foundation symposium. Churchill, London. (Longman group Ltd). 149-174.

- LIMASSET P. and CORNUET P., 1949: Recherche du virus de la mosaïque du tabac (Marmor Tabaci Holmes) dans les méristèmes des plantes infectées. C.R.Acad.Sci.Paris Sér.III 228, 1971-1972.
- LINDOW S.E., ARNY D.C. and UPPER D.C., 1982: Bacterial ice nucleation: A factor to frost injury to plants. Plant Physiol.(Bethesda) 70, 1084-1089.
- LOCKHART W.L., BILLECK B.N., DE MARCH B.G.E. and MUIR D.C.G., 1983: Uptake and toxicity of organic compounds: studies with an aquatic macrophyte (*Lemna minor*). ASTM Spec.Tech.Publ. 802, 460-468.
- LÜÖND A., 1983: Das Wachstum von Wasserlinsen (*Lemnaceae*) in Abhängigkeit des Nährstoffangebots, insbesondere Phosphor und Stickstoff. Veröff.Geobot.Inst.ETH, Stiftung Rübel,Zürich 70, 101 S.
- LUYET B.J., 1960: On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. Ann.New York Acad.Sci. 85, 549-569.
- LUYET B.J., 1970: Physical changes occurring in frozen solutions during rewarming and melting. In: WOLSTENHOLME G.E.W. and O'CONNOR M. (eds.), The frozen cell. A Ciba foundation symposium. Churchill, London. (Longman group Ltd). 27-50.
- LUYET B.J. and KROENER C., 1958: Temperatures at which abrupt changes in configurational order occur in vitrous mixtures of glycerol and water. Bull.Amer.Phys.Soc.Ser.II 3, 359.
- LUYET B.J., KROENER C. and RAPATZ G., 1958: Detection of heat of recrystallisation in glycerol-water mixtures. Biodynamica 8, 73-80.
- LUYET B.J., TANNER J. and RAPATZ G., 1962: X-ray diffraction study of the structure of rapidly frozen gelatin solutions. Biodynamica 9, 21-46.
- MACFARLANE D.R., 1986: Devitrification in glass-forming aqueous solutions. Cryobiology 23, 230-244.
- MACFARLANE D.R., 1987: Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. Cryobiology 24, 181-195.
- MACIEJEWSKA-POTAPCZYK W., KONOPSKA L. and RESKA J., 1976: Influence of IAA and kinetin on *Lemna minor* L. proteins. Acta Univ.Nicolai Copernici Nauk.Mat.-Przyr. 37, 183-186.
- MACKENZIE A.P., 1977: Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems. Phil. Trans.R.Soc.Lond.B. 278, 167-189.
- MACLELLAN M.R., 1989: Cryopreservation of diatoms. Diatom Res. 4(2), 301-318.
- MAXIMOV N.A., 1912: Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Einfrieren III. Über die Natur der Schutzwirkung. Ber.Dtsch.Bot.Ges. 30, 504-516.
- MAZUR P., 1969: Freezing injury in plants. Ann.Rev.plant physiol. 20, 419-448.
- MAZUR P., 1976: Mechanisms of injury and protection in cells and tissues at low temperatures. Cryoimmunologie (INSERM) 62, 37-60.
- MEHL P. and BOUTRON P., 1987: Glass-forming tendency and stability at the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. II. Ternary systems with water, 1,2-propanediol or 1,3-butanediol or 2,3-butanediol. Cryobiology 24, 355-367.
- MERYMAN H.T., 1958: X-ray analysis of rapidly frozen gelatin gels. Biodynamica 8, 69-72.
- MERYMAN H.T. and WILLIAMS R.J., 1985: Basic principles of freezing injury to plant cells: Natural tolerance and approaches to cryopreservation. In: KARTHA K.K. (ed.), Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 13-47.
- MEYER M.A., 1983: The effects of proline and methanol on the freezing survival of a marine diatome. Cryobiologie 20, 748.
- MEYER M.A., HOOKS C.E. and FRYXELL G.A., 1985: Introduction of two-step warming rates for cryopreservation. Cryobiologie 22, 620.
- MOOR H., 1973: Cryotechnology for the structural analysis of biological material. In: BE-

- NEDETTI E.L. and FAVARD P. (eds.), Freeze-etching techniques and applications. Société française de microscopie électronique, Paris. 11-19.
- MOREL G. and MARTIN C., 1952: Guérison du dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad.Sci.Paris Sér.III 235, 1324-1325.
- MORRIS G.J., 1976: The cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling, proteine additive and recovery rate. Arch.Microbiol. 107(1), 57-62.
- MORRIS G.J. and CLARKE A., 1978: The cryopreservation of *Chlorella*. 4. Accumulation of lipid as a protective factor. Arch.Microbiol. 119(2), 153-156.
- MORRIS G.J., SMITH D. and COULSON G.E., 1988: A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for 19 species of fungi. Cryobiology 25, 517.
- ORR W., KELLER W.A. and SINGH J., 1986: Induction of freezing tolerance in an embryonic cell suspension culture of *Brassica napus* by abisic acid at room temperature. J.Plant Physiol. 126, 23-32.
- PERSIDSKY M.D. and LUYET B.J., 1975: Analysis of the freezing process across temperature gradients within gelatin gels. Cryobiology 12, 364-385.
- PIRSON A. und GOELLNER E., 1954: Beobachtungen zur Entwicklungsphysiologie der *Lemna minor* L. Flora 140, 485-498.
- POLITO V.S. and LUZA J.G., 1988: Low temperature storage of pistachio pollen. Euphytica 39, 265-270.
- POTT R., 1981: Ökologie und Indikatorwert von Wasserpflanzengesellschaften. Mitt.Landesanst.Ökologie, Landschaftsentw. u. Forstpl. Nordrhein-Westfalen, Sonderheft Landestagungen 1980, 57-64.
- PRIBOR D.B., 1974: PVP contrasted with dextran and multifactor theory of cryoprotection. Cryobiology 11, 60-72.
- PRITCHARD H.W., 1984: Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. Cryo-Lett. 5, 295-300.
- PRITCHARD H.W., GROUT B.W.W., SHORT K.C. and REID D.S., 1982: The effects of growth and water stress on the structure, metabolism and cryopreservation of cultured sycamore cells. In: FRANKS F. and MATHIAS S.F. (eds.), Biophysics of water. Wiley, Chichester. 315-318.
- PRITCHARD H.W., GROUT B.W.W. and SHORT K.C., 1986a: Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 1. Growth and ultrastructure of sycamore and soybean cell suspensions. Ann.Bot.(London) 57, 41-48.
- PRITCHARD H.W., GROUT B.W.W. and SHORT K.C., 1986b: Osmotic stress as a pregrowth procedur for cryopreservation. 2. Water relations and metabolic state of sycamore *Acer pseudoplatanus* and soybean *Glycine max* cultivar Biloxi cell suspensions. Ann.Bot. (London) 57, 371-378.
- PRITCHARD H.W., GROUT B.W.W. and SHORT K.C., 1986c: Osmotic stress as a pregrowth procedur for cryopreservation. 3. Cryobiologie of sycamore *Acer pseudoplatanus* and soybean *Glycine max* cultivar Biloxi cell suspensions. Ann.Bot.(London) 57, 379-388.
- REED B.M., 1988: Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. Cryo-Lett. 9, 166-171.
- REED B.M., 1989: The effect of cold hardening and cooling rate on the survival of apical meristems of *Vaccinium* species frozen in liquid nitrogen. Cryo-Lett. 10, 315-322.
- REED B.M., 1990: Survival of in vitro grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. HortScience 25, 111-113.
- REUFF I., SEITZ U., ULBRICH B. and REINHARD E., 1988: Cryopreservation of *Coleus blumei* cell suspension and callus cultures. J.Plant Physiol. 133, 414-418.
- REY L.R., 1960: Thermal analysis of eutectics in freezing solutions. Ann.New York Acad. Sci. 85, 510-534.
- RICHTER H., 1968: Die Reaktion hochpermeabler Pflanzenzellen auf drei Gefrierschutz-

- stoffe (Glyzerin, Äthylenglycol, Dimethylsulfoxid). *Protoplasma* 65, 155-166.
- RIMON D. and GALUN E., 1968: Morphogenesis in *Spirodela oligorrhiza*: Ontogenesis of fronds. *Bot.Gaz.* 129(2), 138-144.
- ROTH E.J., 1983: Freeze preservation of plant suspension cultures. *Plant Physiol.* (Bethesda) 72 (suppl. 1), 48.
- SAKAI A., 1973: Characteristics of winterhardiness in extremely hardy twigs of woody plants. *Plant And Cell Physiol.* 14, 1-9.
- SAKAI A., 1984: Cryopreservation of apical meristems. In: JANICK J. (ed.), *Horticultural reviews* (vol. 6). Avi Publ. Company, Inc., Westport, Connecticut. 357-372.
- SAKAI A., 1985: Cryopreservation of shoot tips of fruit trees and herbaceous plants. In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 135-158.
- SAKAI A. and NISHIYAMA Y., 1978: Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *Hort Science* 13, 225-227.
- SAKAI A. and SUGAWARA Y., 1973: Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant and Cell Physiol.* 14, 1201-1204.
- SAKAI A. and YOSHIDA S., 1968: The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology* 5, 160-174.
- SAKAI A., YAMAKAWA M., SAKATO D., HARADA T. and YAKUWA T., 1978: Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C. *Low Temp. Sci.Ser.B* 36, 31-38.
- SAKS N.M., 1978: The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology* 15, 563-568.
- SEITZ U., 1987: Cryopreservation of plant cell cultures. *Planta Med.* 53(4), 311-314.
- SIBASAKI T. and ODA Y., 1979: Heterogeneity of dormancy in the turions of *Spirodela polyrrhiza*. *Plant And Cell Physiol.* 20, 563-571.
- SIDYAKINA T.M., KISHKOVSKII Z.N., KOZNETSOVA E.V. and SAKHAROVA T.A., 1986: Application of lyophilization and cryopreservation for long-term storage of wine yeast cultures (in Russian). *Prikl.Biokhim.Mikrobiol.* 22(6), 840-843.
- SIMINOVITCH D., RHEAUME B., POMEROY K. and LEPAGE M., 1968: Phospholipid, protein and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. *Cryobiology* 5, 202-225.
- SINGH J. and MILLER R.W., 1985: In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 61-73.
- SLOCUM R.D., KAUR-SAWHNEY R. and GALSTON A.W., 1984: The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch.Biochem.Biophys.* 235, 283-303.
- SONGSTAD D.D., DUNCAN D.R. and WIDHOLM J.M., 1990: Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension cultures. *J.Exp.Bot.* 41, 289-294.
- STANWOOD P.C., 1985: Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 199-226.
- STEPHENSON M., TURNER G., POPE P., COLT J., KNIGHT J. and TCHOBANOGLIOUS G., 1980: The use and potential of aquatic species for wastewater treatment. Appendix A: The environmental requirements of aquatic plants. *California State Water Res.Contr.Board* 65, 291-440.
- STEPONKUS P.L., 1985: Cryobiology of isolated protoplasts: Applications to plant cell cryopreservation. In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 49-60.
- STEPONKUS P.L., DOWGERT M.F. and GORDON-KAMM W.J., 1983: Destabilisation of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: The influence of cold acclimation. *Cryobiology* 20, 448-465.

- STRAUSS A., FRANKHAUSER H. and KING P.J., 1985: Isolation and cryopreservation of methyltreonine-resistant *Rosa* cell lines altered in the feedback sensitivity of L-threonine deaminase EC-4.2.1.16. *Planta* (Berlin) *163*(4), 554-562.
- SUGAWARA Y. and SAKAI A., 1974: Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiol.*(Bethesda) *54*, 722-724.
- SUGAWARA Y., MATSUSHIMA H. and TAKEUCHI M., 1980: Cryopreservation of plant protoplasts and their differentiation after thawing. *Cryobiology* *17*, 623.
- SUN W.D., ZHU H.Y., HUA T.C. and LU P.J., 1988: Cryopreservation of *Azolla* sporocarp, seedling and shoot apex. *Cryobiology* *25*, 528.
- SUTTON-JONES B. and STREET H., 1968: Studies on the growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspension culture. *J.Exp.Bot.* *19*, 114-118.
- TAO D. and LI P.H., 1986: Classification of plant cell cryoprotectants. *J.Theor.Biol.* *123*, 305-310.
- TOIVONEN P.M.A. and KARTHA K.K., 1989: Cryopreservation of cotyledons of nongerminated white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) embryos and subsequent plant regeneration. *J.Plant Physiol.* *134*, 766-768.
- TONER M., CRAVALHO E.G. and CHIANG Y.M., 1988: Vitrification of biological cell suspensions – The importance of ultrarapid cooling and warming. *Cryobiology* *25*, 551.
- TOWILL L.E., 1981: *Solanum tuberosum*: A model for studying the cryobiology of shoot tips in the tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Sci.Lett.* *20*, 315-324.
- TOWILL L.E., 1983: Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from in vitro plantlet cultures of potato. *Cryobiology* *20*, 567-573.
- TOWILL L.E., 1984: Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups Andigena, Phureja, Stenotomum, Tuberosum, and other tuber-bearing *Solanum* spp. *Cryo-Lett* *5*, 319-326.
- TOWILL L.E., 1985: In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 171-198.
- TOWILL L.E., 1988: Survival of shoot tips from mint species after short-term exposure to cryogenic conditions. *HortScience* *23*, 839-841.
- TOWILL L.E. and MAZUR P., 1976: Osmotic shrinkage as a factor in freezing injury in plant tissue cultures. *Plant Physiol.*(Bethesda) *57*, 290-296.
- TRIDECH S., ENGLAND A.J., Jr., HERBERT M.J. and WILKINSON R.F., 1981: Tertiary wastewater treatment by the application of vascular aquatic plants. *Chem.Water Reuse* *2*, 521-539.
- TSURO S., 1973: Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. *Cryobiology* *10*, 445-452.
- TYLER N. and STUSHNOFF C., 1984: The effect of dehydration on cryopreservation of vegetative buds. *HortScience* *19*, 541.
- TYLER N., STUSHNOFF C. and GUSTA L.V., 1988: Freezing of water in dormant vegetative apple buds in relation to cryopreservation. *Plant Physiol.*(Bethesda) *87*, 201-205.
- ULMER W., 1937: Über den Jahresgang der Frosthärte einiger immergrüner Arten der alpinen Stufe, sowie der Zirbe und Kiefer. Unter Berücksichtigung von osmotischem Wert, Zuckerspiegel und Wassergehalt. *Jahrb.Wiss.Bot.* *84*, 553-592.
- ULRICH J.M., FINKLE B.J., MACKEY B.E., SCHAEFFER G.W. and SHARPE F., Jr., 1984: Responses of 6 rice *Oryza sativa* callus cultures to deep frozen temperatures. *Crop Sci.* (Madison) *24*(1), 82-84.
- URBANSKA-WORYTKIEWICZ K., 1980: Cytological variation within the family of *Lemnaceae*. *Veröff.Geobot.Inst.ETH,Stiftung Rübel,Zürich* *70*, 30-101.
- VAN DER MEER J.P. and SIMPSON F.J., 1984: Cryopreservation of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) and other macrophytic marine algae. *Phycologia* *23*(2), 195-202.
- VASSOILLE R., PEREZ J. and TATIBOUET J., 1984: Internal friction measurements and stability of the vitreous phase of water-glycerol mixtures. *Cryo-Lett.* *5*, 393-408.

- VIGIER G. and VASSOILLE R., 1987: Ice nucleation and crystallisation in water-glycerol mixtures. *Cryobiology* 24, 345-354.
- VINCENT C., PRULIERE G., PAJOT-AUGY E., CAMPION E. and DOUZOU P., 1988: Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophysical Chemistry* 29, 161-169.
- VOLKOVA L.A., POPOV A.S., NOSOV A.M. and BUTENKO R.G., 1983: Preservation of biosynthetic potential by cells of *Dioscorea* (*D. deltoidea* Wall.) after cryogenic storage. *Dokl.Akad.Nauk SSSR* 265(2), 504-506.
- VON ARNOLD S. and ERIKSSON T., 1984: Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea glauca* [L.] Karst. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3, 257-264.
- WANGERMAN E. and ASHBY E., 1951: Study in the morphogenesis of leaves. VII, 1. Effects of light intensity and temperature on the cycle of ageing and rejuvenation in the vegetative history of *Lemna minor*. *New Phytol.* 50, 186-199.
- WAEST R.C. (ed.), 1983-1984: Handbook of chemistry and physics (64th ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- WEBER G., ROTH E.J. and SCHWEIGER H.G., 1983: Storage of cell suspensions and protoplasts of *Glycine max* [L.] Merr., *Brassica napus* L., *Datura innoxia* Mill. and *Daucus carota* L. by freezing. *Z. Pflanzenphysiol.* 109, 29-39.
- WEISER C.J., 1970: Cold resistance and injury in wood plants. *Science (New York)* 169, 1269-1278.
- WILLISON J.H.M. and BROWN R.M., Jr., 1979: Pretreatment artifacts in plant cells. In: RASH J.E. and HUDSON C.S. (eds.), *Freeze fracture: Methods, artifacts and interpretations*. Raven Press, New York. 51-71.
- WILSON A.J. and ROBARDS A.W., 1980: Some limitations of the polymer polyvinyl pyrrolidone for the cryoprotection of barley (*Hordeum vulgare*) roots during quench freezing. *Cryo-Lett.* 1, 416-425.
- WILSON A.J. and ROBARDS A.W., 1982: Experience in the use of a polymeric cryoprotectant in the freezing of plant tissue. *J.Microscop.* 25, 287-298.
- WITHERS L.A., 1978: The freeze-preservation of synchronously dividing cultured cells of *Acer pseudoplatanus*. *Cryobiology* 15, 87-92.
- WITHERS L.A., 1980: The cryopreservation of higher plant tissue and cell cultures – An overview with some current observations and future thoughts. *Cryo-Lett.* 1, 239-250.
- WITHERS L.A., 1982a: Storage of plant tissue cultures. In: WITHERS L.A. and WILLIAMS J.T. (eds.), *Crop genetic resources: The conservation of difficult material*. IUBS/IBPGR (IUBS Series B42), Paris. 49-82.
- WITHERS L.A., 1982b: The development of cryopreservation techniques for plant cell, tissue and organ cultures. *Proc.5th int.congr.plant tissue cell cult.*, Japan, 1982, 793.
- WITHERS L.A., 1984: In vitro techniques for germplasm storage. In: LANGE W., ZEVEN A.C. and HOGENBOOM N.G. (eds.), *Efficiency in plant breeding: Proc.10th congr.Eucarpia*, Wageningen, Netherlands, 1984, 182-193.
- WITHERS L.A., 1985a: Cryopreservation of cultured cells and meristems. In: VASIL I.K. (ed.), *Cell cultures and somatic cell genetics of plants* (vol. 2). Acad.Press, Inc., London. 253-316.
- WITHERS L.A., 1985b: Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: KARTHA K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 243-267.
- WITHERS L.A., 1985c: Cryopreservation and storage of germplasm. In: DIXON R.A., *Plant cell culture (a practical approach)*. IRL Press, Oxford. 169-191.
- WITHERS L.A. and KING P.J., 1979: Proline, a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.(Bethesda)* 64, 675-678.
- WITHERS L.A. and KING P.J., 1980: A simple freezing unite and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *Cryo-Lett* 1, 213-220.

- WITHERS L.A., BENSON E.E. and MARTIN M., 1988: Cooling rate / culture medium interactions in the survival and structural stability of cryopreserved shoot tips of *Brassica napus*. *Cryo-Lett.* 9, 114-119.
- WU M.T., HUGHES H. and BECWAR M.R., 1981: Cold hardiness and cryopreservation of vegetative buds of *Rubus*. *HortScience* 16, 443.
- YAKUWA H. and OKA S., 1988: Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koids.) stored in liquid nitrogen. *Ann.Bot. (London)* 62, 79-82.
- YARLETT N.C., YARLETT N., ORPIN C.G. and LLYOD D., 1986: Cryopreservation of the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Lett.Appl.Microbiol.* 3, 1-3.
- YOSHIDA S., 1984: Studies on freezing injury of plant cells. *Plant Physiol.(Bethesda)* 75, 38-42.
- ZAVALA M.E. and SUSSEX I.M., 1986: Survival of developing wheat embryos and bean axes following cryoprotection and freezing in liquid nitrogen. *J.Plant Physiol.* 122, 193-198.
- ZELMAN A., LEA S., BARTHEL D. and GISSER D., 1984: Stepwise glycerolisation of red blood cells greatly reduces hemolytic losses during subsequent freezing-thawing and deglycerolisation. *Cryobiology* 21, 693-694.
- ZHENG G.Z., HE J.B. and WANG S.L., 1983: Cryopreservation of calli and their suspension culture cells of *Anisodus acutangulus*. *Acta Bot.Sin.* 25(6), 512-518.
- ZIV M., MEIR G. and HALEVY A.H., 1983: Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2, 55-65.

Adresse des Autors: Peter Richard SAUTER
Geobotanisches Institut ETH
Stiftung Rübel
Zollikerstrasse 107
CH-8008 Zürich