universität wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchungen zur Bildung und Reifung

von somatischen Embryos bei *Glycyrrhiza glabra* L.

Verfasserin

Doris Hartl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die persönliche Betreuung und Motivation sowie die Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Weiters möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die kompetente Betreuung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei DI (FH) Yong-boem Kang für die Einführung ins praktische Arbeiten sowie das nette Arbeitsklima.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und die seelische Unterstützung während meiner Studienzeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Johannes Andres für die seelische Unterstützung und Geduld während meines Studiums sowie die Unterstützung bei der Formatierung dieser Arbeit.

ABKÜRZUNGEN

TDZ	Thidiazuron
ABA	Abscisinsäure

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 4

2.1. PFLANZLICHES MATERIAL 4
2.2. NÄHRMEDIEN 4
2.3. KULTURGEFÄßE 8
2.4. KULTURBEDINGUNGEN 8
2.5. KULTURAUSWERTUNG 9

3. ERGEBNISSE 11

3.1. EMBRYOINITIATION 11
3.1.1. Überblick 11
3.1.2. Synergistische Effekte 16
3.1.3. Einfluss des Genotyps 26
3.2. EMBRYOREIFUNG 29
3.2.1. Überblick 29
3.2.2. Synergismen bei der Embryoreifung 35
3.2.3. Einfluss des Klons auf die Embryoreifung 52
3.3. KONVERSION 53
3.3.1. Passagierabstand und Auswertungszeitpunkt 53
3.3.2. Ergebnisse zur Konversion 54

4. DISKUSSION 61

5. ZUSAMMENFASSUNG 69

6. SUMMARY 70

7. LITERATURVERZEICHNIS 71

LEBENSLAUF 74

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Glycyrrhiza glabra L. wird aufgrund ihres Gehalts an Glycyrrhizin nicht nur als Sekretolytikum und Expektorans angewendet, sondern aufgrund ihrer antiulzerogenen und antiphlogistischen Wirkung auch zur Therapie von Entzündungen im Magen-Darm-Bereich (Fiore et al., 2005; Khayyal et al., 2006; Rackova et al., 2007).

Die ebenso enthaltenen Flavonoid - Aglyka (Isoliquiritigenin und Liquiritigenin) zeigen spasmolytische Aktivität (Sato et al., 2007). Für die Anwendung als Spasmolytikum soll der Anteil an Glycyrrhizin möglichst gering sein, da hohe Dosen über längere Zeit einen Pseudoaldosteronismus auslösen (Wang et al., 1995; Armanini et al., 2002).

Die in vitro - Kultivierung ist eine geeignete Methode, um Genotypen mit definiertem Inhaltsstoffspektrum schnell in großem Maßstab zu vermehren.

In den Vorarbeiten von Lämmermayer (2007), Kazianka (in Vorbereitung) und Winter (2009) wurden bereits Untersuchungen zur Etablierung embryogener Kalluskulturen vorgenommen. Weiters wurden auch Versuche zur Embryoreifung durchgeführt. Diese reichten von der Austestung des Einflusses von Adeninsulfat über Thidiazuron, wuchstofffreies Medium bis hin zum Einsatz von Aktivkohle. Auch der Einfluss der Konsistenz der Nährmedien sowie Einflüsse von Kultivierung in Licht und Dunkelheit wurden untersucht.

In den oben genannten Vorarbeiten wurden bereits Untersuchungen zur Etablierung embryogener Kalluskulturen vorgenommen. Weiters wurden auch Versuche zur Embryoreifung durchgeführt. Diese reichen von der Austestung des Einflusses von Adeninsulfat über Thidiazuron, wuchstoffreies Medium bis hin zum Einsatz von Aktivkohle. Auch der Einfluss der Konsistenz der Nährmedien sowie Einflüsse von Kultivierung in Licht und Dunkelheit wurden untersucht.

Darauf aufbauend war es nun vorrangiges Ziel dieser Diplomarbeit, die Embryoreifung näher zu untersuchen, ob diese gezielt beeinflusst und die darauffolgende Keimung der Embryos gesteuert werden kann. Hierfür sollte die Wirkung verschiedener

Abscisinsäurekonzentrationen, kombiniert mit diversen Saccharosekonzentrationen in Medium MS nach Murashige and Skoog (1962) auf embryogenen Kallus von *Glycyrrhizs glabra* L. untersucht werden.

Die Anwendung der Abscisinsäure geht heute weit über die Bedeutung als Pflanzenwachstumsinhibitor hinaus. Abscisinsäure gilt für *Podophyllum peltatum* L. als alleiniger induzierender Faktor für indirekte somatische Embryogenese (Kim et al., 2007). Andere Untersuchen zeigten jedoch, dass Abscisinsäure die Embryoinitiation hemmen konnte (Tisserat und Murashige, 1977).

Weiters ist bekannt, dass Abscisinsäure die Reifung von somatischen Embryos förderte (Prakash und Gurumurthi, 2010; Ruduś et al., 2006; Langhansová et al., 2004) und die frühzeitige Keimung verhinderte (Ammirato, 1983; Ruduś et al., 2006). Bei zygotischen Embryos läuft die durch endogene Hormone geregelte Entwicklung stufenweise ab, während bei somatischen Embryos kontinuierliches Wachstum stattfindet, das oftmals zur Bildung von abnormalen Strukturen führt und somit die Konversionsrate vermindert (Faure et al., 1998). Durch exogen zugeführte Abscisinsäure konnte jedoch abnormales Wachstum unterdrückt werden (Ammirato, 1983; Ammirato, 1977).

Die verwendete Saccharose gilt nicht nur als häufigste eingesetzte Kohlenstoffquelle, sondern kann auch als kurzfristig trockenstress-auslösendes Osmotikum benutzt werden. Während für manche Spezies hohe Saccharose-Konzentrationen wichtig für die Induktion von somatischen Embryos und Embryoausbildung sind, musste für andere Spezies, um diese Effekte zu erzielen, die Saccharosekonzentration unter die übliche von 3 % abgesenkt werden (George, 1993).

Komatsuda et al. (1992) zeigten eine verbesserte Reifung von Soja-Embryos durch Steigerung der Saccharosekonzentration, ebenso wie Trembly und Trembly (1995) dies für *Picea mariana* berichteten. Prakash und Gurumurthi (2009) publizierten jedoch die reifungs- und keimungsverzögernde Wirkung von Saccharose an Embryos von *Eucalyptus camaldulensis*.

Ozudogru et al. (2006) kamen zu dem Ergebnis, dass Erhöhung der Konzentration an osmotisch wirkenden Substanzen zu exzessivem Stress führte, der die Entwicklung von somatischen Embryos hemmte, und dass durch Abscisinsäurezusatz diesem Effekt

entgegengewirkt werden konnte. Ebenso geht bei Bonga et al. (1995) hervor, dass die Effektivität einer Behandlung mit Abscisinsäure durch Erhöhung des osmotischen Potentials gefördert werden konnte.

Da sich in der Vorarbeit von Winter (2009) nicht nur bei Medium MS hohe Embryoinduktionsraten durch große Gesamtembryoausbeute zeigten, sondern auch bei Zusatz von 0,01 µM Thidiazuron (TDZ), wurde auch dieses Medium als Grundlage für die Austestung der verschiedenen Abscisinsäure- und Saccharosekonzentrationen gewählt.

Zusammenfassend sollten in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Abscisinsäure, Saccharose und Thidiazuron bezüglich Embryoinduktion, Embryoreifung, Embryo-keimung und der Konversion zu Pflanzen untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzliches Material

Ausgangsmaterial für die Versuche zur Embryobildung und -reifung stellten Kalluslinien der Stammpflanze *Glycyrrhiza glabra* L. dar.
Die eingesetzten Kalluslinien wurden im Oktober 2009 wie bei Winter (2009) beschrieben initiiert. Die verwendeten Samen stammten von einer Süßholzstaude aus dem Arzneipflanzengarten des Departements für Pharmakognosie in Wien.

Von Oktober 2009 bis Anfang April 2010 wurden die Kalluslinien auf Medium TDZ 1 (vgl. Tabelle 3, S.7) vermehrt*. Anschließend wurden die Versuche zur Embryobildung und -reifung durchgeführt. Pro Versuchsmedium wurden 4 Petrischalen mit je 5 Explantaten angesetzt. Das Animpfgewicht pro Petrischale lag etwa bei 0,35 g. Um eventuelle Unterschiede, bedingt durch genetisch verschiedene Individuen, mit-einfließen lassen zu können, wurden 3 Kalluslinien verwendet.

2.2. Nährmedien

Als Basalmedium diente für alle Versuchsanordnungen sowie auch für die Kalluserhaltung das Medium MS nach Murashige und Skoog (1962).

Hierfür wurde die Hälfte des benötigten destillierten Wasser in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Unter Rühren wurden Stammlösungen (im üblichen Reinheitsgrad, gelagert bei 4°C) der Makro- und Mikroelemente sowie der Vitamine in entsprechenden Mengen zugesetzt. Anschließend wurden myo-Inosit und Saccharose (in Form von handelsüblichem Haushaltszucker) zugegeben und gelöst. Weiters erfolgte portionsweise der Zusatz von Gelrite®. Zuletzt wurde mit destilliertem Wasser auf das entsprechende Volumen aufgefüllt und der pH-Wert mit KOH beziehungsweise HCl auf 5,75 ± 0,1 eingestellt.

*An dieser Stelle möchte ich mich bei Ing. Yong Boem Kang für die Herstellung und Vermehrung des für diese Arbeit verwendeten Kallusmaterials recht herzlich bedanken!

Bei der Herstellung des Mediums TDZ 1 (vgl. Tabelle 3, S.7), welches zur Kallusvermehrung und –erhaltung verwendet wurde, sowie der TDZ-hältigen Medien für Untersuchungen zur Embryobildung und –reifung (vgl. Tabelle 3, S. 6), erfolgte die Zugabe der Stammlösung des Wuchsstoffs Thidiazuron vor Volumenauffüllung und pH-Wert-Einstellung.

TDZ 1 Medium und Medium M29 (vgl. Tabelle 2, S. 6), welches für die Embryoauskeimung und Embryokonversion zu Pflanzen herangezogen wurde und eine Abwandlung des Medium MS mit halbkonzentrierten Makroelementen, 1% Saccharose und 3% Gelrite® darstellt, wurden nach Fertigstellung der Nährlösungen in Hipp®-Gläser gefüllt, mit Magenta B®Caps verschlossen und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Medien zur Beobachtung der Auswirkungen von Abscisinsäure, Thidiazuron (vgl. Tabelle 1, S. 6) und Saccharose, in jeweils verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen (vgl. Tabelle 2, S. 6 und Tabelle 3, S. 7), auf die Bildung und Reifung von indirekten somatischen Embryos wurden zu je 200 ml in 500 ml SCHOTT DURAN® Flaschen gefüllt und aufgrund des größeren Volumens 25 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Die SCHOTT DURAN® Flaschen wurden zum Abkühlen in einen auf 60°C temperierten Heraeus® -Schrank gestellt. Nach Abkühlung der Medien auf diese Temperatur erfolgte die Zugabe des Phytohormons Abscisinsäure. Hierfür wurde eine 1mM Stammlösung auf einen pH-Wert von 5,75 ± 0,1 mit KOH beziehungsweise HCl eingestellt. Die benötigte Gesamtmenge wurde in der Sterilwerkbank steril filtriert (Porengröße 0,22 µm) und die entsprechenden Mengen ebenfalls steril den bereits autoklavierten, auf 60°C abgekühlten, Medien zugesetzt. Die Stammlösung wurde, wenn nicht verwendet, bei -18°C gelagert.

Die nun fertigen Medien wurden sofort nach Abscisinsäurezusatz wieder bei 60°C gelagert, um eine frühzeitige Verfestigung, ausgelöst durch Gelrite®, zu verhindern. Anschließend wurden die Medien unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen.

Tabelle 1: Überblick über verwendete Wuchsstoffe

Verwendete Wuchsstoffe			
Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
TDZ	Thidiazuron (N-Phenyl-N`-1,2,3-Thidiazol-5-yl-Harnstoff)	Riedel-de Haen	45686
ABA	Abscisinsäure (2-cis,4-trans-Abscisic acid)	Sigma-Adrich	862169

Tabelle 2: MS-Nährmedien ohne TDZ für die Embryoentwicklung

Bezeichnung	Saccharose (%)	Abscisinsäure (µM)
A0S3	3	-
A0S4	4	-
A0S5	5	-
A0S6	6	-
A0,5S3	3	0,5
A0,5S4	4	0,5
A0,5S5	5	0,5
A0,5S6	6	0,5
A1S3	3	1
A1S4	4	1
A1S5	5	1
A1S6	6	1
A5S3	3	5
A5S4	4	5
A5S5	5	5
A5S6	6	5
A10S3	3	10
A10S4	4	10
A10S5	5	10
A10S6	6	10
M29 *	1	-

*Embryokeimung, ½ MS

Tabelle 3: MS- Nährmedien mit 0,01µM Thidiazuron für die Embryoentwicklung

Bezeichnung	Saccharose (%)	Abscisinsäure (µM)
TA0S3	3	-
TA0S4	4	-
TA0S5	5	-
TA0S6	6	-
TA0,5S3	3	0,5
TA0,5S4	4	0,5
TA0,5S5	5	0,5
TA0,5S6	6	0,5
TA1S3	3	1
TA1S4	4	1
TA1S5	5	1
TA1S6	6	1
TA5S3	3	5
TA5S4	4	5
TA5S5	5	5
TA5S6	6	5
TA10S3	3	10
TA10S4	4	10
TA10S5	5	10
TA10S6	6	10
TDZ 1 *	3	-

*Kallusinduktion und –erhaltung, 1µM TDZ

2.3. Kulturgefäße

Für die Kallusvermehrung und -erhaltung wurden Hipp®-Gläser (Ø: 6cm, H: 7cm), mit Magenta B®Caps verschlossen, als Kulturgefäße verwendet. Diese wurden hierfür mit 40 ml Medium TDZ 1 befüllt.
Für die Versuche zur Embryoentwicklung wurden sterile Kunststoffpetrischalen (60x15 mm), gefüllt mit je 15 ml Nährmedium, herangezogen.
Die Konversion der Embryos zu Pflanzen erfolgte in Hipp®-Gläsern mit Magenta B®-Caps. Hier wurde die Glashöhe dem Bedarf je nach Pflanzenhöhe angepasst. Es wurden Hipp®-Gläser (Ø: 6cm, H: 7cm) und (Ø: 6cm, H: 12,5cm) verwendet. Die Füllung mit Nährmedium lag unabhängig von der Glashöhe bei 40 ml.
Sowohl Hipp®-Gläser als auch Petrischalen wurden mit Parafilm®M verschlossen.

2.4. Kulturbedingungen

Alle Kulturen wurden bei 25±1°C und einer relativen Luftfeuchte von 50% gehalten.

Die Kalluslinien wurden, wie in Vorarbeiten von Lämmermayer (2007) und Kazianka (in Vorbereitung) empfohlen, für Vermehrung und Erhalt alle drei Wochen passagiert und unter Lichtausschluss kultiviert.

Versuchsmaterial zur Embryoentwicklung wurde ebenfalls nach drei Wochen vollständig auf Medien mit der selben Nährstoffzusammensetzung erneut passagiert und weitere drei Wochen dort belassen. Diese Kulturen wurden unter einem 16h-Tag (Leuchtstoffröhren, SYLVANIA Gro-Lux) mit einer Lichtintensität von 50 $\mu M \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ gehalten.

Nach dem eben erwähnten sechswöchigen Verbleib des Kallus auf Testmedium erfolgte die erste Auswertung. Eine Auswahl an weiterentwickelten sowie gekeimten Embryos (nähere Erläuterungen zu den Entwicklungsstufen im Kapitel 2.5., S. 9) wurde zur weiteren Beobachtung der Keimung und Konversion auf Medium M29 transferiert.

Hierbei wurde versucht, die Embryos ohne Kallus zu überführen. Wenn dies nicht durchführbar war, wurden auch anhaftende Kallusreste mit überführt. Nach etwa 60 Tagen erfolgte eine Passagierung auf frisches Medium M29, weitere 45 Tage später wurde erneut passagiert. 30 Tage nach der letzten Passage erfolgte die zweite Auswertung, die somit nach 135 Tagen des Verbleibes der Embryos auf Medium M29 erfolgte.

2.5. Kulturauswertung

Auswertung der Embyoinitiation und der Embryoreifung

Die erste Auswertung erfolgte nach sechs Wochen auf den Testmedien. Es wurde die Anzahl der gebildeten somatischen Embryos erfasst. Hierbei wurde wie in der Vorarbeit von Winter (2009) zwischen globulären Embryos, weiterentwickelten Embryos, gekeimten Embryos und Sprossen unterschieden. Die Zuordnung erfolgte in der sterilen Werkbank unter der Stereolupe. Aufgrund des teilweise erheblichen Wachstums konnten die ursprünglichen 5 Kallusexplantate nicht mehr eindeutig voneinander abgegrenzt werden, daher erfolgte die Auszählung pro gesamte Petrischale. Somit verringert sich hier die Stichprobengröße n pro Testmedium und Klon von ursprünglich n=20 auf n=4. Dies gilt es bei der statistischen Auswertung zu bedenken.
Die Ergebnisse aus den drei Embryoentwicklungsstufen wurden, da das anfängliche Animpfgewicht bekannt war, zwecks Vergleichbarkeit auf 1,00 g Kallus bezogen.

Auswertung der Konversion

Die Auswertung der Konversion erfolgte nach 135 Tagen auf Medium M29. Die Anzahl der angesetzten Embryos und deren Entwicklungsstadium im gerade erwähnten Schema waren bekannt. Es wurde die Anzahl der daraus gebildeten Pflanzen erhoben. Da die Auswertung makroskopisch erfolgte, wurden alle Individuen, die zumindest mit freiem Auge sichtbare Primärblätter zeigten, der Gruppe Pflanzen zugeordnet. Die

ursprünglich angedachte Methode, nämlich das Entwicklungsstadium aller angesetzten Embryos erneut zu beurteilen, musste aus Zeitgründen verworfen werden, da die Zahl der angesetzten Embryos über sekundäre Embryogenese stark angestiegen war.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Statistica (StatSoft, Inc., Version 6) durchgeführt. Zur Analyse der Ergebnisse wurden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte herangezogen, ebenso wie eine ANOVA (analysis of variance) zur Eruierung bestehender signifikanter Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt wurde.

Bei den Auswertungen der durchgeführten Untersuchungen konnten vereinzelt Sprosse nachgewiesen werden. Da diese in sehr geringer Anzahl gebildet wurden und nicht signifikant einem auslösenden Faktor zugeordnet werden konnten, entfällt in der vorliegenden Arbeit die Präsentation dieser Ergebnisse.

3. ERGEBNISSE

3.1. Embryoinitiation

In dem hier folgenden Unterkapitel soll die Wirkung von diversen Saccharose- und Abscisinsäurekonzentrationen auf die Embryoinitiation dargestellt werden. Hierbei wird zwischen dem TDZ-freiem und TDZ-hältigem Grundmedium (vgl. Tabelle 2, S. 6 und Tabelle 3, S. 7) unterschieden. Um positive oder negative Effekte auf die Embryoinitiation feststellen zu können, wird die Anzahl der gebildeten Embryos herangezogen und zwar ohne Unterscheidung zwischen den Entwicklungsstufen. Diese Anzahl wird fortan „Gesamtembryoanzahl“ genannt und die Gesamtheit aller Embryos „Gesamtembryos“.

3.1.1. Überblick

Für den einführenden Überblick wird jeder der untersuchten Faktoren ohne Berücksichtigung der anderen betrachtet. Es ist zu beachten, dass hier weder eventuell bestehende positive noch negative Synergismen der Faktoren zugeordnet werden können.

Thidiazuron

In der vorliegenden Arbeit wurden Grundmedien sowohl mit als auch ohne Thidiazuron verwendet. Die ausgetesteten Konzentrationen betrugen dabei entweder 0µM TDZ oder 0,01µM TDZ.

Der Einfluss von Thidiazuron auf die Anzahl an Gesamtembryos ist in Diagramm 1 (s. S. 12) dargestellt. TDZ-freie Medien brachten mit 54,8 ± 3,8 Gesamtembryos pro g signifikant mehr Embryos hervor als TDZ-hältige Medien mit 36,1 ± 3,1. Der Zusatz von Thidiazuron in der ausgetesteten Konzentration verringerte somit signifikant die Initiationspotenz der Kalli.

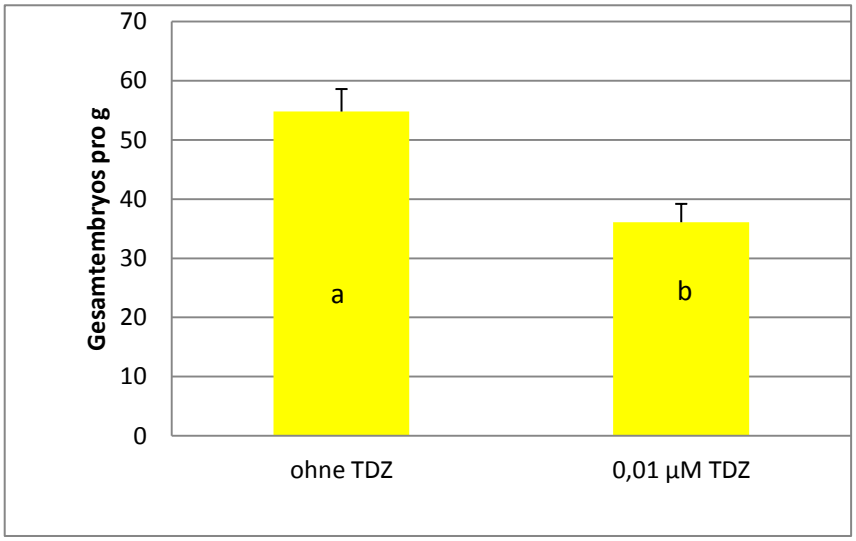

Diagramm 1: Einfluss von TDZ auf die Bildung von Gesamtembryos im Überblick über alle verwendeten Nährmedien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Da sich bereits hier in der Überblicksdarstellung signifikante Unterschiede bedingt durch verschiedene Grundmedien zeigten, wird ab sofort für weitere statistische Darstellungen immer zwischen den beiden Grundmedien unterschieden.

Abscisinsäure

Ausgetestet wurden folgende Abscisinsäurekonzentrationen: 0µM, 0,5µM, 1µM, 5µM und 10µM (Diagramm 2).

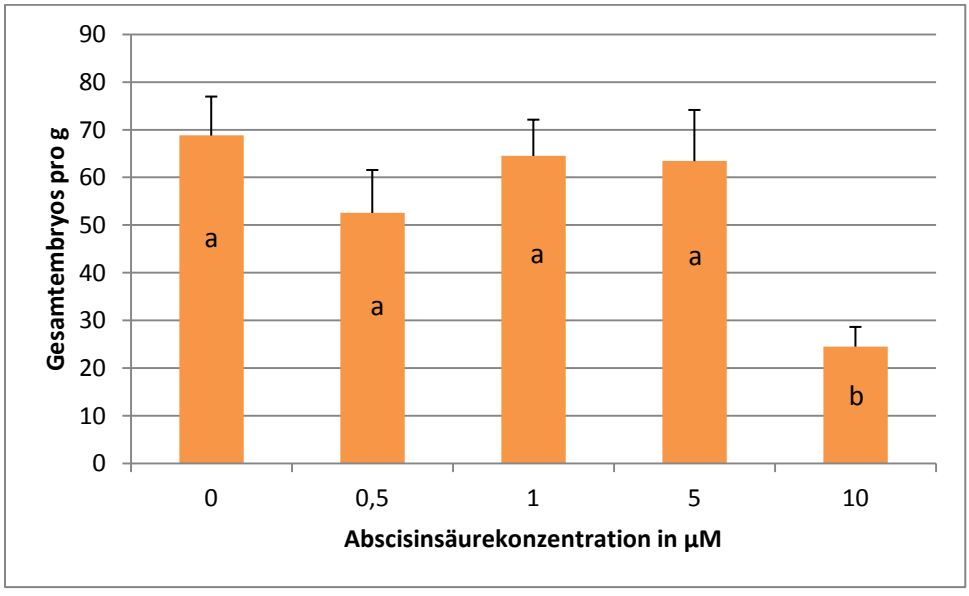

Diagramm 2: Einfluss von Abscisinsäure in Medien ohne TDZ auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

In Grundmedien ohne TDZ führte eine Abscisinsäurekonzentration bis zu 5µM zu keiner signifikanten Änderung in der Gesamtembryoanzahl. Erst die Steigerung auf eine Konzentration von 10µM führte zu einer signifikanten Reduktion der Bildung von Gesamtembryos.

In Grundmedien mit TDZ zeigte sich deutlich der nichtlineare Zusammenhang zwischen Abscisinsäurekonzentration und der Bildung von Gesamtembryos. Das höchste Potential zur Bildung von Gesamtembryos zeigte sich bei einer Abscisinsäurekonzentration von 1µM. Medien mit 0µM ABA und 0,5µM ABA lagen nichtsignifikant zurück. Eine Erhöhung der Konzentration auf 5µM führte, verglichen mit Medien die 1µM ABA enthielten, zu einer signifikanten Reduktion an Gesamtembryos, jedoch bestand hier kein signifikanter Unterschied zu den beiden Medien mit den niedrigsten Konzentrationen an Abscisinsäure. Eine Steigerung auf eine Konzentration von 10µM ABA führte zu einer weiteren Reduktion der Gesamtembryoanzahl. Sie unterschied sich signifikant von Medien mit 0 bis 1µM ABA, aber nicht von Medien mit 5µM ABA (vgl. Diagramm 3).

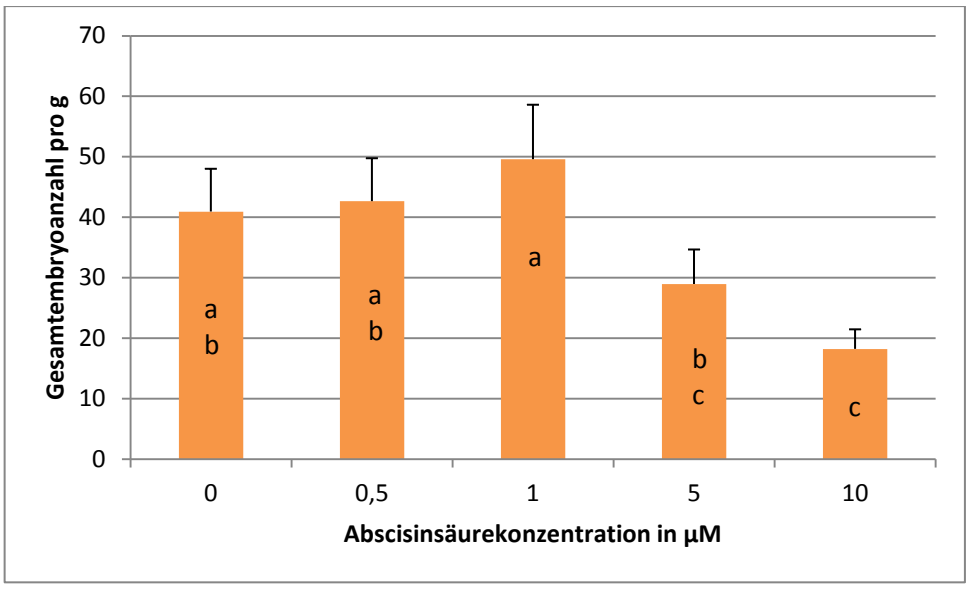

Diagramm 3: Einfluss der Absicinsäurekonzentration in Medien mit TDZ auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Vergleicht man nun die in Diagramm 2 und Diagramm 3 präsentierten Daten miteinander, so zeigt sich, dass signifikante Unterschiede in der Embryobildung dort bestanden, wo 0 oder 5µM ABA in verschiedenen Grundmedien zum Einsatz kam (vgl. Tabelle 4). Bei den Medien mit den übrigen Abscisinsäure-Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Embryoinitiation bei Vergleich der Grundmedien, jedoch wiesen alle TDZ-hältigen Medien niedrigere Gesamtembryo-anzahlen auf.

Tabelle 4: Einfluss von Abscisinsäurekonzentrationen in den zwei Grundmedien ohne Betrachtung des Einflusses von Saccharosekonzentration, auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Zeilen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

ABA Konz.	TDZ Konz.	Mittlere Gesamtembryoanzahl ± Standardfehler	Darstellung der Signifikanzen				
10	0,01	18,2 ± 3,2	e				
10	0	24,5 ± 4,1	e	d			
5	0,01	28,9 ± 5,7	e	d	c		
0	0,01	40,9 ± 7,1		d	c	b	
0,5	0,01	42,6 ± 7,1		d	c	b	
1	0,01	49,6 ± 9,0			c	b	a
0,5	0	52,6 ± 9,0				b	a
5	0	63,4 ± 10,7				b	a
1	0	64,5 ± 7,6				b	a
0	0	68,8 ± 8,2					a

Saccharose

In den Versuchen wurde der Effekt von vier verschiedenen Saccharose-konzentrationen auf die Embryoinitiation untersucht. Bei den verwendeten Konzentrationen handelte es sich um die üblicherweise in MS-Medien verwendete Konzentration von 3 Prozent, sowie auf 4, 5 und 6 Prozent erhöhte Konzentrationen.

In Medien ohne Thidiazuron zeigte sich, dass die Standardkonzentration von 3% Saccharose zur Bildung der meisten Gesamtembryos führte. Bei Medien, die 4% Saccharose enthielten, war die Embryoinitiation etwas, wenn auch nicht signifikant, niedriger. Erst eine Steigerung auf 5 und 6 % führte zu einer signifikanten Verminderung der Bildung von Gesamtembryos (vgl. Diagramm 4, S. 15).

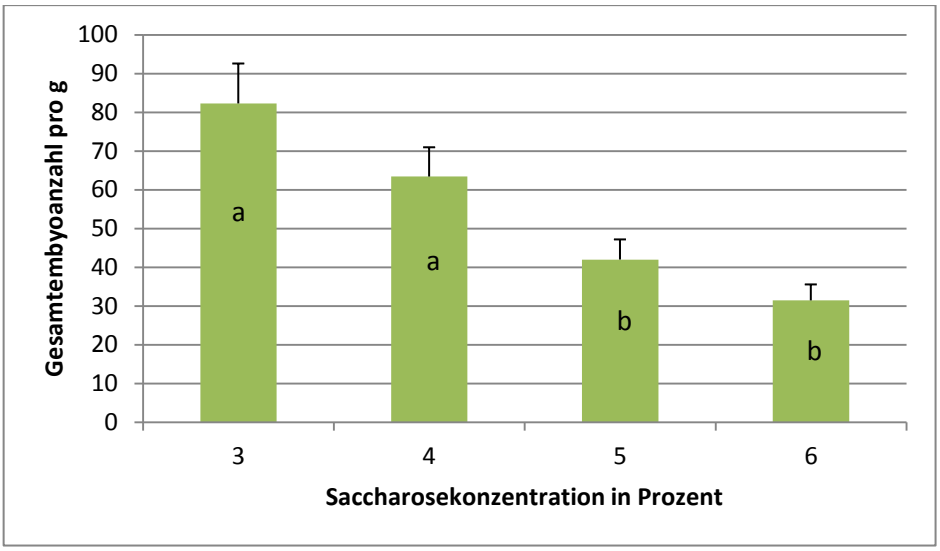

Diagramm 4: Einfluss von Saccharosekonzentrationen, in Medien ohne TDZ, auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

In Grundmedien mit Thidiazuron führte auch hier eine Saccharosekonzentration von 3% zur besten Embryoinitiation. Eine Steigerung der Saccharosekonzentration führte hier auf jeden Fall zu einer signifikant niedrigeren Bildung von Gesamtembryos. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen von 4 bis 6 % (vgl. Diagramm 5).

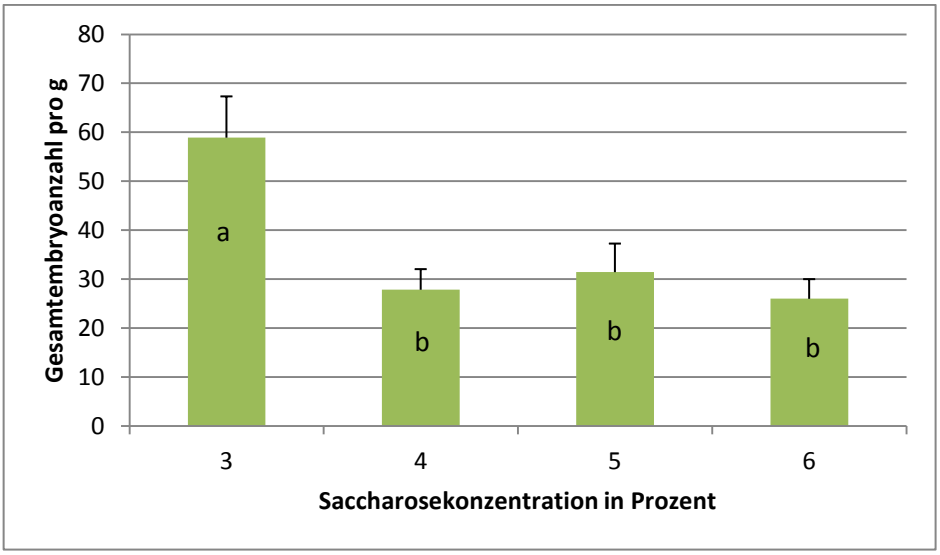

Diagramm 5: Einfluss von Saccharosekonzentrationen in Medien mit TDZ auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Vergleicht man nur die beiden eben dargestellten Diagramme, die sich lediglich durch ihr Grundmedium unterscheiden, so ist aus Tabelle 5 erkennbar, dass sich die Gesamtembryoanzahl pro g auf Medien mit Saccharosekonzentrationen von 3 und 4 Prozent signifikant voneinander unterschied. Bei den höheren Zuckerkonzentrationen war kein signifikanter Unterschied, bedingt durch verschiedene Grundmedien, erkennbar.

Tabelle 5: Einfluss von Saccharosekonzentrationen in den zwei Grundmedien ohne Betrachtung des Einflusses von Abscisinsäure, auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Zeilen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Saccharose-Konz. (%)	TDZ-Konz. (µM)	Gesamtembryo-anzahl pro g	Darstellung der Signifikanzen			
6	0,01	26,0 ± 4,0	d			
4	0,01	27,9 ± 4,2	d			
6	0	31,4 ± 4,1	d			
5	0,01	31,5 ± 5,8	d			
5	0	42,0 ± 5,2	d	c		
3	0,01	58,9 ± 8,4		c	b	
4	0	63,4 ± 7,6			b	
3	0	82,3 ± 10,3				a

3.1.2. Synergistische Effekte

In dem nun folgenden Unterkapitel soll der Einfluss von Kombinationen der ausgetesteten Substanzen auf die Embryoinitiation dargestellt werden. Hier können nun positive oder negative Synergismen zu Tragen kommen. Zum besseren Überblick werden die Ergebnisse der verschiedenen Medien, getrennt nach Grundmedien, präsentiert, und die in Tabelle 2 und 3 (vgl. S. 6 und 7) definierten Medienbezeichnungen kommen zum Einsatz.

Medien ohne Thidiazuron

Das Diagramm 6 (vgl. S. 17) gibt einen Überblick über den Einfluss von Medien, die kein TDZ enthalten, auf die Embryoinitiation. Auch hier ist in groben Zügen wie bereits aus Diagramm 2 (vgl. S. 12) ersichtlich, dass eine Abscisinsäurekonzentration von 10µM zu der jeweils geringsten Embryoinduktion führte. Auch der bereits in Diagramm 4 (vgl. S.

15) präsentierte negative Einfluss der mit 5 und 6 Prozent Saccharose versetzten Medien ist ablesbar.

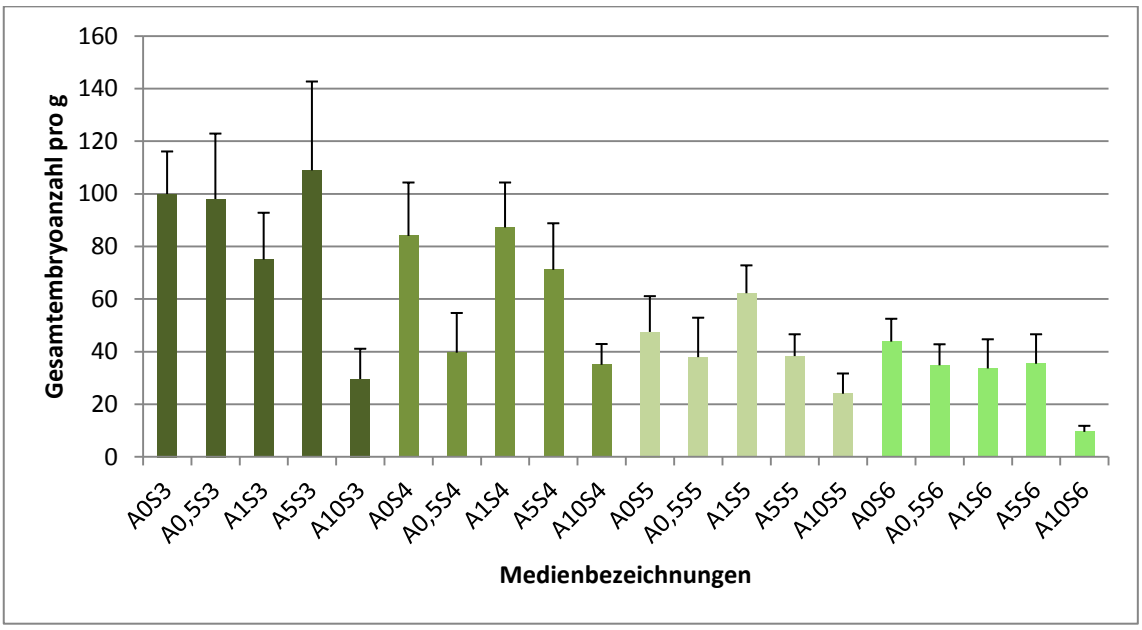

Diagramm 6: Einfluss von Medien ohne Thidiazuron auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

Die genauen Zusammenhänge zwischen Kombinationen von verschiedenen Konzentrationen der Substanzen ABA sowie Saccharose in Medien ohne TDZ und der daraus resultierenden Gesamtembyoanzahl pro g werden einfachheitshalber einzeln in Tabelle 6 bis 14 (S. 17 bis S. 20) dargestellt.

Einfluss der Konzentration von Abscisinsäure bei definierter Saccharosekonzentration in Medien ohne TDZ

Tabelle 6: Einfluss von ABA kombiniert mit 3% Saccharose auf die Gesamtembryo-anzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)		
A0S3	99,9	±	16,2	a	
A0,5S3	98,0	±	24,9	a	
A1S3	75,0	±	17,8	a	b
A5S3	108,9	±	33,8	a	
A10S3	29,6	±	11,5		b

In Grundmedien ohne TDZ mit 3% Saccharose führte eine Steigerung der ABA-Konzentration auf 10µM zur geringsten Gesamtembryoanzahl pro g. Während die Embryoinitiation auf den Medien A0S3, A0,5S3 und A5S3 sehr gut erfolgte, war die Gesamtembryoausbeute auf Medium A1S3 nicht signifikant, auf Medium A10 S3 signifikant niedriger. Die beste Embryoinitiation war bei dem Medium mit 5µM ABA zu beobachten (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 7: Einfluss von ABA kombiniert mit 4% Saccharose auf die Gesamtembryo-anzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)		
A0S4	84,0	±	20,3	a	b
A0,5S4	39,6	±	15,1	a	b
A1S4	87,2	±	17,1	a	
A5S4	71,1	±	17,7	a	b
A10S4	35,0	±	7,9		b

Während auf Medium A1S3 (vgl. Tabelle 6, S. 17) eine geringe Embryoinitiation zu beobachten war, erfolgte auf Medien ohne TDZ mit 4% Saccharose die höchste Embryobildung bei einer ABA-Konzentration von 1 µM. Medium A1S4 unterschied sich hier in seiner Initiationspotenz signifikant nur vom Medium mit 10µM Abscisinsäure (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 8: Einfluss von ABA kombiniert mit 5% Saccharose auf die Gesamtembryo-anzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)		
A0S5	47,5	±	13,6	a	b
A0,5S5	37,9	±	15,0	a	b
A1S5	62,2	±	10,6	a	
A5S5	38,3	±	8,3	a	b
A10S5	24,0	±	7,7		b

Erhöht man die Saccharosekonzentration auf 5%, führte wiederum (vgl. Tabelle 7) das Medium mit 1µM ABA zur besten Embryoinitiation, gefolgt vom Medium ohne Abscisinsäure, mit 5µM ABA und 0,5µM ABA (vgl. Tabelle 8). Ebenso wie bei den Medien mit 4% Saccharose unterschied sich hier nur die Gesamtembryoanzahl pro g des Mediums, das 1µM Abscisinsäure enthielt, signifikant von der des Mediums mit 10 µM ABA.

Tabelle 9: Einfluss von ABA kombiniert mit 6% Saccharose auf die Gesamtembryo-anzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)		
A0S6	43,8	±	8,7	a	
A0,5S6	34,8	±	8,0	a	b
A1S6	33,6	±	11,1	a	b
A5S6	35,4	±	11,2	a	b
A10S6	9,5	±	2,3		b

Bei Medien mit 6% Saccharose (vgl. Tabelle 9) führte nicht wie bei niedrigeren Zucker-konzentrationen (vgl. Tabelle 6-8) ein Medium mit 5 oder 1µM Abscisinsäure zur besten Embryoinitiation, sondern das Medium A0S6, welches keine Abscisinsäure enthielt. Die Gesamt-embryoanzahl des Mediums A0S6 unterschied sich signifikant von der des Mediums A10S6.

Den Zahlenwerten zufolge bestand ein negativer Synergismus. Je höher die Saccharosekonzentration desto wichtiger war eine niedrigere Abscisinsäure-konzentration für gute Erfolge bei der Embryoinitiation.

Einfluss der Saccharosekonzentration bei definierter Abscisinsäurekonzentration in Medien ohne TDZ

Tabelle 10: Einfluss von Saccharose in Medien ohne TDZ mit 0µM Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)				
A0S3	99,9	±	16,2	a	
A0S4	84,0	±	20,3	a	b
A0S5	47,5	±	13,6		b
A0S6	43,8	±	8,7		b

In Medien ohne ABA führte die Kombination mit 3% Saccharose zur besten Embryoinitiation mit einer Gesamtembryoanzahl pro g von 99,9 ± 16,2. Erhöhte man die Saccharosekonzentration auf 4 %, nahm die Embryoinitiation ab, jedoch nicht signifikant. Bei weiterer Erhöhung der Zuckerkonzentration auf 5 und 6 % fiel die Gesamtembryoanzahl pro g stark ab. Verglichen mit Medium A0S3 war auf Medium A0S5 und Medium A0S6, eine signifikante Verringerung der Bildung von Gesamtembryos zu beobachten (vgl. Tabelle10).

Tabelle 11: Einfluss von Saccharose in Medien ohne TDZ mit 0,5µM ABA auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)				
A0,5S3	98,0	±	24,9	a	
A0,5S4	39,6	±	15,1		b
A0,5S5	37,9	±	15,0		b
A0,5S6	34,8	±	8,0		b

Bei Medien, die 0,5µM ABA enthielten, führte ebenfalls 3% Saccharose zur besten Embryoinitiation (vgl. Tabelle 11). Die Gesamtembryoanzahl pro g auf Medium A0,5S3 unterschied sich signifikant von denen der anderen Medien mit 0,5µM Abscisinsäure. Eine Steigerung der Saccharosekonzentration im ausgetesteten Rahmen spielte keine Rolle, da sich hier keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Tabelle 12: Einfluss von Saccharose in Medien ohne TDZ mit 1µM ABA auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)				
A1S3	75,0	±	17,8	a	b
A1S4	87,2	±	17,1	a	
A1S5	62,2	±	10,6	a	b
A1S6	33,6	±	11,1		b

Enthielt das Medium 1µM Abscisinsäure, brachte Medium A1S4 die meisten Gesamtembryos pro g hervor. Medien mit Zuckerkonzentrationen von 3 oder 5% unterschieden sich jedoch nicht signifikant von A1S4 in ihrer Potenz zur Embryoinitiation. Nur Medium A1S6 brachte signifikant weniger Gesamtembryos als Medium A1S4 hervor (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 13: Einfluss von Saccharose in Medien ohne TDZ mit 1µM Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)		
A5S3	108,9	±	33,8	a	
A5S4	71,1	±	17,7	a	b
A5S5	38,3	±	8,3		b
A5S6	35,4	±	11,2		b

Medium A5S3 brachte nicht nur unter den Nährmedien mit 5µM ABA, sondern unter allen ausgetesteten Nährmedien ohne TDZ die meisten Gesamtembryos pro g hervor. Die Gesamtembryoanzahl pro g lag bei Medium A5S4 nicht signifikant niedriger als bei A5S3. Medien mit 5 und 6% Saccharose unterschieden sich jedoch in ihrer Fähigkeit zur Embryoinitiation signifikant von der auf Medium A5S3 (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 14: Einfluss von Saccharose in Medien ohne TDZ mit 10µM ABA auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)		
A10S3	29,6	±	11,5	a	b
A10S4	35,0	±	7,9	a	
A10S5	24,0	±	7,7	a	b
A10S6	9,5	±	2,3		b

Wurde die ABA-Konzentration auf 10 µM erhöht, so brachte die Kombination mit 4% Saccharose die meisten Gesamtembryos pro g hervor. Bei A10S6 fand man wiederum die geringste Gesamtembryoanzahl pro g (vgl. Tabelle 14). Verglichen mit Medien mit niedrigeren ABA-Konzentrationen lag hier jeweils die Gesamtembryoanzahl unabhängig von der Saccharosekonzentration auf einem sehr niedrigen Wert.

Abhängig von der jeweilig verwendeten Abscisinsäurekonzentration lagen die Maxima für die beste Embryoinitiation entweder bei 3 oder 4 % Saccharose. Die jeweils andere Saccharosekonzentration in Kombination mit der definierten ABA-Konzentration unterschieden sich meist nicht signifikant. Ein Schema, ob 3 oder 4 % Saccharose in einer bestimmten Kombination zur besseren Embryoinitiation führte, war nicht ablesbar.

Medien mit Thidiazuron

Der Einfluss von Kombinationen der ausgetesteten Substanzen in Grundmedien mit 0,01µM Thidiazuron wird überblickmäßig in Diagramm 7 dargestellt. Wie schon im Kapitel 3.1.1. dargestellt, zeigten sich in TDZ-hältigen Medien die besten Initiationsergebnisse bei 3 % Saccharose, was auch aus dem unten dargestellten Diagramm 7 hervorgeht. Die ebenfalls im Überblickskapitel 3.1.1. präsentierten Ergebnisse zum Einfluss von Abscisinsäure in Medien mit Thidiazuron waren nur in Medien mit 3 oder 4 % Saccharose erkennbar. Bei den ausgetesteten höheren Saccharosekonzentrationen fanden sich die besten Ergebnisse nicht bei Medien mit 1µM Abscisinsäure. Nähere Analysen und Signifikanzen sind im Anschluss in den Tabellen 15 bis 23 (S. 22 bis 25) präsentiert.

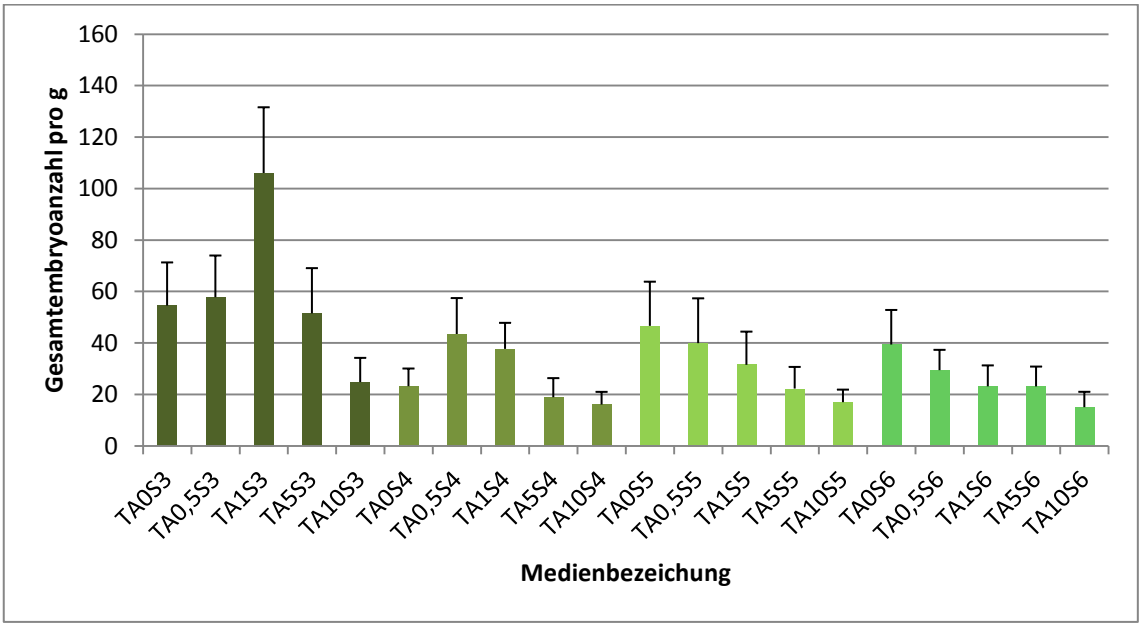

Diagramm 7: Einfluss von Medien mit Thidiazuron auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

Einfluss der Abscisinsäurekonzentration bei definierter Saccharosekonzentration in Medien mit TDZ

Tabelle 15: Einfluss von Abscisinsäure in Medien mit TDZ und 3% Saccharose auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)	
TA0S3	54,5	±	16,8	a b
TA0,5S3	57,8	±	16,2	a b
TA1S3	106,1	±	25,5	a
TA5S3	51,5	±	17,6	a b
TA10S3	24,8	±	9,4	b

In Medien mit TDZ und 3% Saccharose führte eine ABA-Konzentration von 1µM zur besten Embryoinitiation (vgl. Tabelle 15). Ein signifikanter Unterschied bestand allerdings nur zum Medium TA10S3. Die übrigen ausgetesteten ABA-Konzentrationen in dieser Kombination führten, verglichen mit 1µM ABA, zu mäßigen Ergebnissen bezüglich Embryoinitiation. Obwohl kein signifikanter Unterschied in der Gesamtembryoanzahl pro g bei den Medien mit 0 bis 5µM ABA bestand, brachte das Medium TA1S3 jedoch fast 50% mehr Gesamtembryos pro g hervor.

Tabelle 16: Einfluss von Abscisinsäure in Medien mit TDZ und 4% Saccharose auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW	±	Stdf.)	
TA0S4	23,2	±	6,9	a
TA0,5S4	43,5	±	14,0	a
TA1S4	37,7	±	10,1	a
TA5S4	18,9	±	7,4	a
TA10S4	16,1	±	4,9	a

In TDZ-hältigen Medien mit 4% Saccharose führte eine Erhöhung der Abscisinsäure im ausgetesteten Rahmen zu keiner signifikanten Veränderung der Gesamtembryoanzahl pro g (vgl. Tabelle 16). Die Embryoinitiation war hier generell auf einem niedrigen Niveau. Die meisten Gesamtembryos pro g bei dieser Testreihe zeigten sich bei Medium TA0,5S4 mit einer mittleren Gesamtembryoanzahl pro g von 43,5 ± 14.0, gefolgt von TA1S4. Somit zeigte sich, dass nicht mehr 1µM ABA sondern 0,5µM ABA zur besten Embryoinitiation führte.

Tabelle 17: Einfluss von Abscisinsäure in Medien mit TDZ und 5% Saccharose auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA0S5	46,6	±	17,2	a
TA0,5S5	39,9	±	17,4	a
TA1S5	31,5	±	12,9	a
TA5S5	22,3	±	8,4	a
TA10S5	17,0	±	4,9	a

Erhöhte man die Saccharosekonzentration in TDZ-hältigen Medien auf 5%, so führte eine Abscisinsäurevariation im ausgetesteten Rahmen zu keiner signifikanten Veränderung bei der Embryoinitiation. Zu erwähnen ist jedoch, dass hierbei nicht wie vormals ABA.Konzentrationen von 1µM oder 0,5 µM zur höchsten Gesamtembryoanzahl pro g führten, sondern dass hier (vgl. Tabelle 17) eine weitere Absenkung, also das Abscisinsäure-freie Medium TA0S5, die meisten Gesamtembryos pro g hervorbrachte.

Tabelle 18: Einfluss von Abscisinsäure in Medien mit TDZ und 6% Saccharose auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA0S6	39,4	±	13,4	a
TA0,5S6	29,4	±	7,9	a
TA1S6	23,1	±	8,2	a
TA5S6	23,1	±	7,7	a
TA10S6	15,0	±	6,0	a

Bei einem weiteren Anstieg von Saccharose auf 6% in TDZ-hältigen Medien zeigten sich durch die verschiedenen Abscisinsäurekonzentrationen wieder keine signifikanten Unterschiede in der Embryoinitiation (vgl. Tabelle 18). Wie schon im vorhergehenden Absatz für TDZ-hältige Medien mit 5% Saccharose festgestellt wurde, zeigte sich auch hier, dass die Embryoinitiation umso besser stattfand, je weniger Abscisinsäure in den Medien enthalten war.

Während in TDZ-hältigen Medien in Kombination mit 3% Saccharose noch 1µM Abscisinsäure zur besten Embryoinitiation führte, war eine Absenkung der ABA-Konzentration für eine möglichst hohe Gesamtembryoanzahl pro g umso wichtiger, je höher die Saccharosekonzentration war.

Einfluss der Saccharosekonzentration bei definierter Abscisinsäurekonzentration in Medien mit TDZ

Tabelle 19: Einfluss von Saccharose in Medien mit TDZ ohne Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA0S3	54,5	±	16,8	a
TA0S4	23,2	±	6,9	a
TA0S5	46,6	±	17,2	a
TA0S6	39,4	±	13,4	a

In TDZ-hältigen Medien ohne ABA zeigten sich durch Variation der Saccharosekonzentration im ausgetesteten Rahmen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 19). Der in Kapitel 3.1.1. (Seite 11) im Überblick dargestellte Sachverhalt, dass TDZ-hältige Medien mit 3% Saccharose signifikant mehr Gesamtembryos pro g hervorbrachten, konnte für diese Kombination nicht bestätigt werden, dennoch führte Medium TA0S3 mit geringem Abstand zur besten Embryoinitiation in dieser Versuchsreihe.

Tabelle 20: Einfluss von Saccharose in Medien mit TDZ und 0,5µM Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA0,5S3	57,8	±	16,2	a
TA0,5S4	43,5	±	14,0	a
TA0,5S5	39,9	±	17,4	a
TA0,5S6	29,4	±	7,9	a

Erhöhte man in TDZ-hältigen Medien die ABA-Konzentration auf 0,5µM, so fanden sich in Medien mit 3% Saccharose wieder die meisten Gesamtembryos pro g (vgl. Tabelle 20). Mit steigender Saccharosekonzentration sank die mittlere Gesamtembryoanzahl pro g, signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch keiner.

Tabelle 21: Einfluss von Saccharose in Medien mit TDZ und 1µM Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA1S3	106,1	±	25,5	a
TA1S4	37,7	±	10,1	b
TA1S5	31,5	±	12,9	b
TA1S6	23,1	±	8,2	b

Betrachtet man die Medien, die TDZ und 1µM ABA enthielten, so führte Medium TA1S3 zur Bildung von signifikant mehr Gesamtembryos pro g als Medien, die stattdessen 4, 5 oder 6% Saccharose enthielten (vgl. Tabelle 21). Beim Medium TA1S3 zeigte sich die Überblicksdarstellungen aus Kapitel 3.1.1. (Seite 11), nämlich dass in TDZ-hältigen Medien eine Saccharosekonzentration von 3% zu signifikant mehr Gesamtembryos pro g führte, bestätigt. Da Medium TA1S3 mit einer Gesamtembryoanzahl pro g von 106,1 ± 25,5 von allen 40 ausgetesteten Medien die

zweitbeste Embryoinitiation zeigte, fließen diese Ergebnisse dieses Medium natürlich sehr stark in die Gesamtbetrachtung im Kapitel 3.1.1. (Seite 11) ein.

Tabelle 22: Einfluss von Saccharose in Medien mit TDZ und 5µM Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA5S3	51,5	±	17,6	a
TA5S4	18,9	±	7,4	a
TA5S5	22,3	±	8,4	a
TA5S6	23,1	±	7,7	a

In Medien mit Kombinationen von 0,01µM TDZ und 5µM ABA führte eine Variation in der Saccharosekonzentration von 3 bis 6 % zu keiner signifikanten Änderung bei der Gesamtembryoanzahl pro g (vgl. Tabelle 22). Dennoch brachte das Nährmedium mit 3% Saccharose im Mittel mehr als doppelt so viele Gesamtembryos pro g hervor als die Medien mit anderen Zuckerkonzentrationen.

Tabelle 23: Einfluss von Saccharose in Medien mit TDZ mit 10µM Abscisinsäure auf die Gesamtembryoanzahl pro g, Mittelwert ± Standardfehler, Zeilen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Medium	Gesamtembryo-Anzahl pro g (MW ± Stdf.)			
TA10S3	24,8	±	9,4	a
TA10S4	16,1	±	4,9	a
TA10S5	17,0	±	4,9	a
TA10S6	15,0	±	6,0	a

Medium TA10S3 brachte in der Versuchsreihe mit TDZ, 10µM ABA und variierender Saccharose-konzentration die meisten, allerdings nicht signifikant mehr, Gesamtembryos hervor (vgl. Tabelle 23). In dieser Versuchsreihe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Fähigkeit zur Embryoinitiation lag bei diesem Versuch generell auf einem niedrigen Niveau.

In TDZ-hältigen Medien führte eine Saccharosekonzentration von 3% in allen Versuchsreihen zur besten Embryoinitiation. Ein signifikant besseres Ergebnis mit 3% Saccharose zeigte sich aber nur bei der Kombination mit 1µM Abscisinsäure.

3.1.3. Einfluss des Genotyps

Um einen eventuell bestehenden Einfluss des Genotyps auf die Embryoinitiation untersuchen zu können, wurden alle Versuche mit drei verschiedenen Klonen der Stammpflanze *Glycyrrhiza glabra* L. durchgeführt.

Da sich in einem Gesamtüberblick (vgl. Diagramm 8), bei dem nur der Faktor Klon, ohne Betrachtung des Einflusses der verschiedenen Nährmedien, berücksichtigt wird, sich bereits der Klon 4 durch eine signifikant niedrigere Gesamtembryoanzahl pro g von den beiden anderen Klonen, nämlich Klon 10 und Klon 11, abhob, wird im Folgenden näher der Einfluss des Genotyps erhoben.

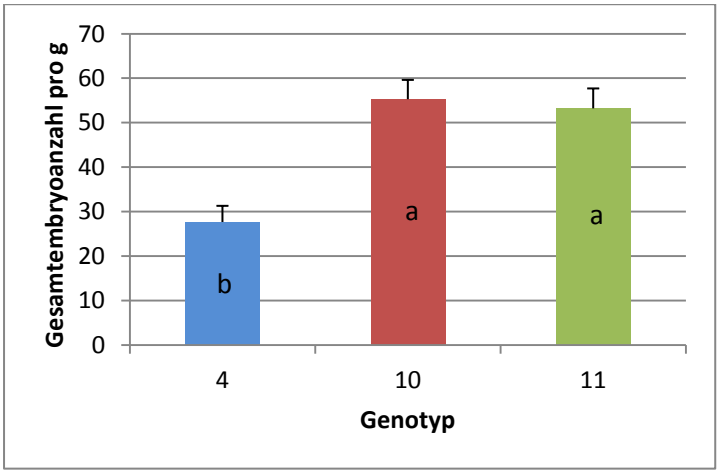

Diagramm 8: Einfluss des Genotyps auf die Bildung von Gesamtembryos als Überblick über alle verwendeten Testmedien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Einfluss von Genotyp und Grundmedium

Zu allererst soll der Einfluss der beiden Grundmedien erläutert werden, da die An- bzw. Abwesenheit von Thidiazuron, wie schon im Kapitel 3.1.1. und 3.1.2. (Seite 11 bis 25) gezeigt, zu signifikanten Unterschieden bezüglich der Gesamtembryoanzahl pro g führte.

In Grundmedien ohne TDZ zeigte sich, dass Klon 11 signifikant mehr Gesamtembryos pro g produziert als Klon 4 (vgl. Diagramm 9, S. 27). Die Gesamtembryoanzahl pro g von Klon 10 lag dazwischen und unterschied sich nicht signifikant von denen der

beiden anderen Klone. Auf TDZ-hältigen Medien produzierte Klon 10 signifikant mehr Gesamtembryos pro g als Klon 4. Klon 4 bildete auf TDZ-hältigen Medien signifikant weniger Gesamtembryos pro g als die beiden anderen Klone, aber auch signifikant weniger als alle Klone auf Grundmedien ohne Thidiazuron).

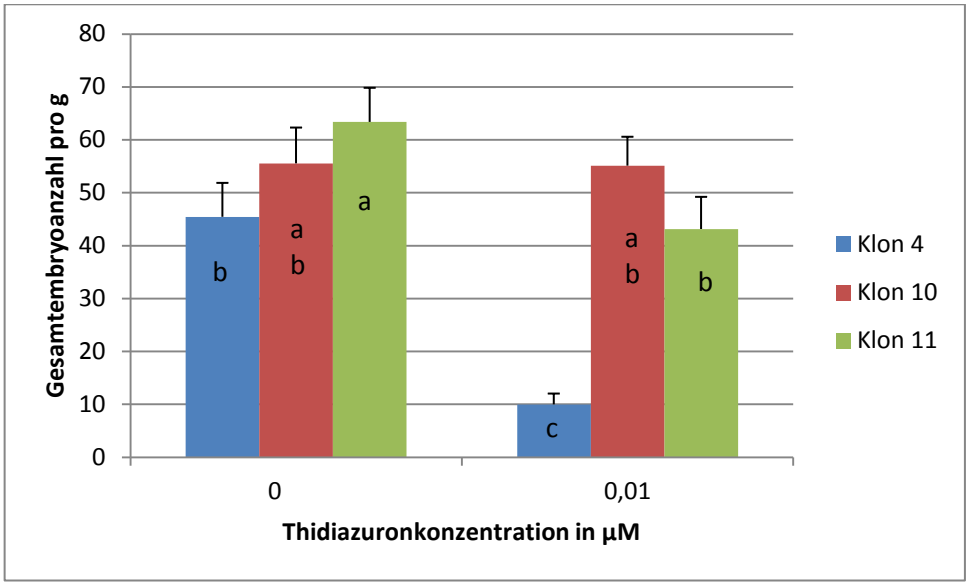

Diagramm 9: Einfluss von Genotyp und Grundmedium auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Da die Thidiazuronkonzentration bei Klon 11, vor allem aber bei Klon 4 zu signifikanten Unterschieden bei der Initiation von Embryos führte, wird in den folgenden Darstellungen des Einflusses von Saccharose und Klon sowie Abscisinsäure und Klon nur das Grundmedium ohne TDZ herangezogen, um den eben genannten Einfluss von TDZ auf die Klone auszublenden.

Auf diverse Abscisinsäurekonzentrationen reagierten die drei ausgetesteten Klone nicht signifikant unterschiedlich bezüglich Embryoinitiation. Klon 4 bildete in 80% der Fälle die wenigsten Gesamtembryos (vgl. Diagramm 10, S. 28).

Die verwendeten Klone reagierten auch bei 3 der 4 ausgetesteten Saccharose-konzentrationen nicht signifikant unterschiedlich. Allein in Medien mit der Saccharose-konzentration von 4% produzierte Klon 10 signifikant mehr Gesamtembryos pro g als Klon 4. Klon 11 lag mit seiner Gesamtembryoanzahl pro g zwischen denen der anderen

Klone und unterschied sich von beiden nicht signifikant. Auffällig ist weiterhin, dass Klon 4, der in den bis jetzt dargestellten Fällen zwar nicht signifikant, jedoch immer die niedrigste Ausbeute an Gesamtembryos pro g zeigte, bei einer Saccharosekonzentration von 3% gleich viele Gesamtembryos hervorbrachte wie Klon 11 (vgl. Diagramm 11).

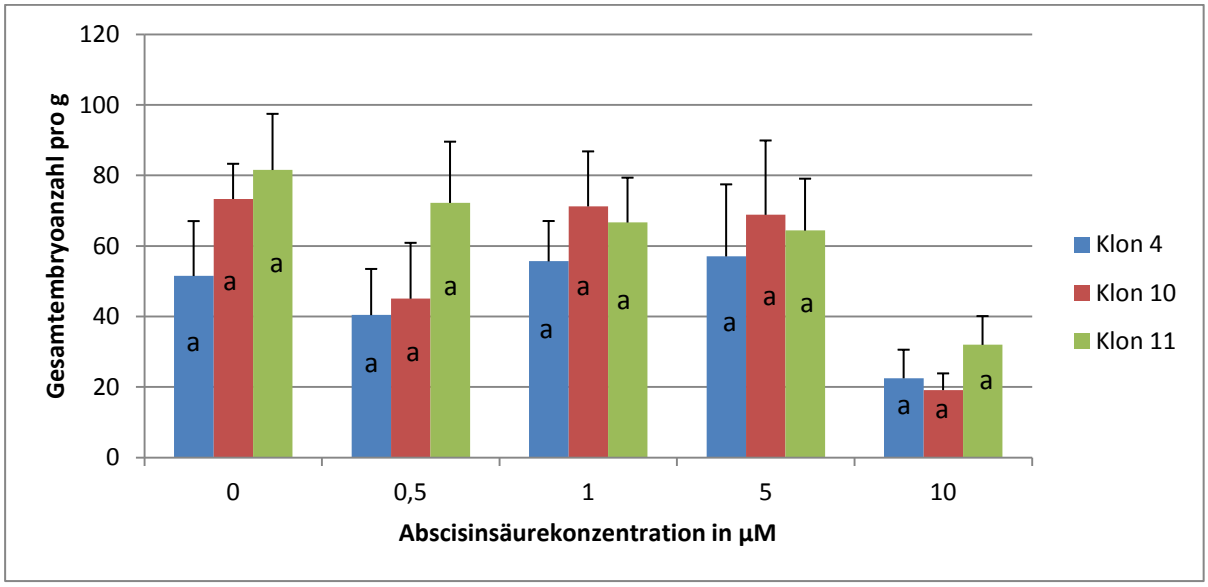

Diagramm 10: Einfluss von Genotyp und Abscisinsäurekonzentration auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05) wenn sie derselben Abscisinsäurekonzentration zugeordnet sind

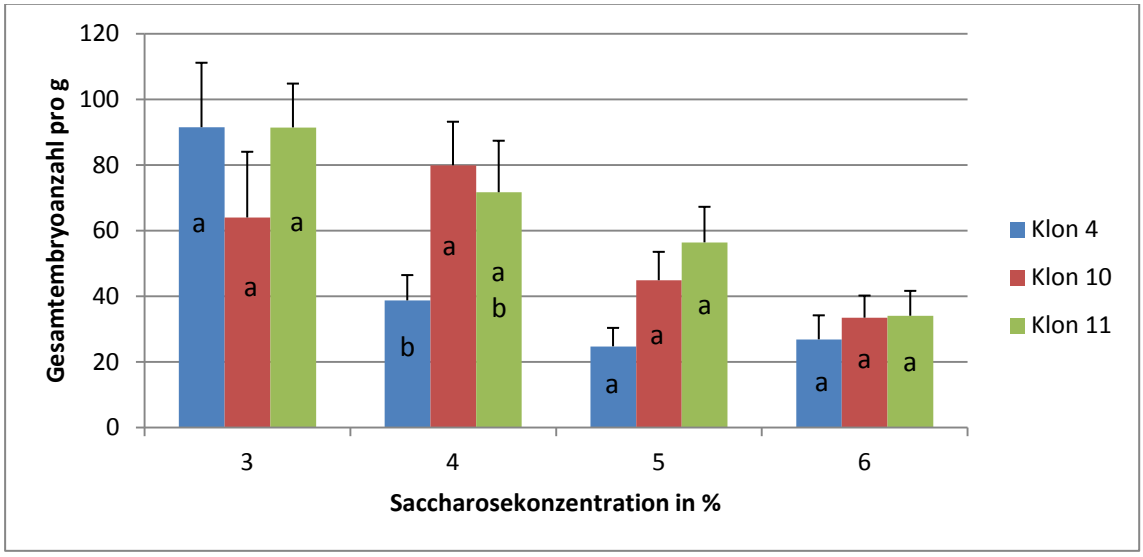

Diagramm 11: Einfluss von Genotyp und Saccharosekonzentration auf die Bildung von Gesamtembryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05) wenn sie derselben Saccharosekonzentration zugeordnet sind

3.2. Embryoreifung

In diesem Unterkapitel soll der Effekt der ausgetesteten Substanzen alleine und in Kombination auf die Embryoreifung untersucht werden. Um eine eventuelle reifungsfördernde bzw. –hemmende Wirkung oder keimungsfördernd bzw. –hemmende Wirkung ohne verzerrende Einflüsse durch verschiedene Embryoinitiationsfähigkeit darstellen zu können, wird in diesem Kapitel die jeweilige Gesamtembryoanzahl pro g auf 100 % normiert und somit die Anteile an Embryos im jeweiligen Entwicklungsstadium in Prozent dargestellt. Petrischalen, in denen keine Initiation stattgefunden hatte, wurden nicht berücksichtigt.

3.2.1. Überblick

Im Folgenden soll der Einfluss eines jeden Faktors ohne Betrachtung der anderen analysiert werden. Eventuell bestehende synergistische Effekte der ausgetesteten Substanzen können hierbei nicht zugeordnet werden.

In Medien, die Thidiazuron enthielten, unterschied sich der prozentuelle Anteil der globulären Embryos mit 9,6 % nicht signifikant von dem in Medien ohne TDZ (vgl. Diagramm 12). Die Anwesenheit von TDZ im Grundmedium wirkte sich weder reifungsfördernd noch reifungshemmend in Bezug auf die Reifung zu weiter-entwickelten Embryos aus.

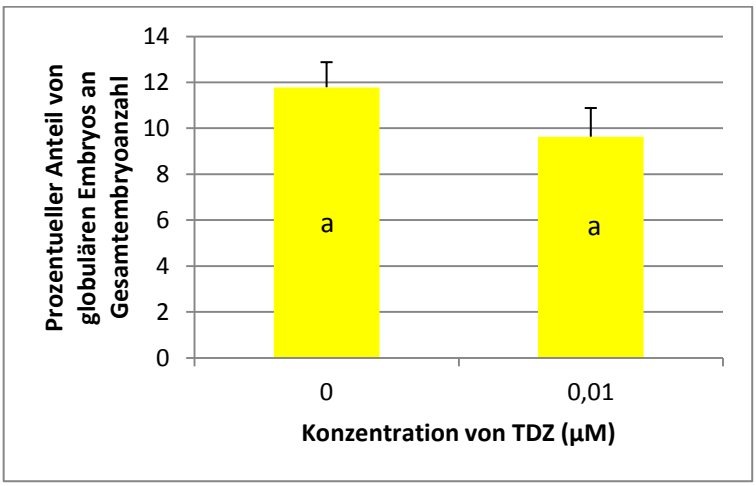

Diagramm 12: Einfluss von Thidiazuron auf die Bildung von globulären Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Die Anwesenheit von Thidiazuron in Medien hatte aber sehr wohl einen Einfluss auf die späteren Entwicklungsstufen. War TDZ mit der ausgetesteten Konzentration von 0,01µM in Medien enthalten, entstanden mit einem Anteil von 89,2 % weiterentwickelten Embryos signifikant mehr Embryos dieser Entwicklungsstufe verglichen mit dem Ergebnis auf Medien ohne TDZ (vgl. Diagramm 13).

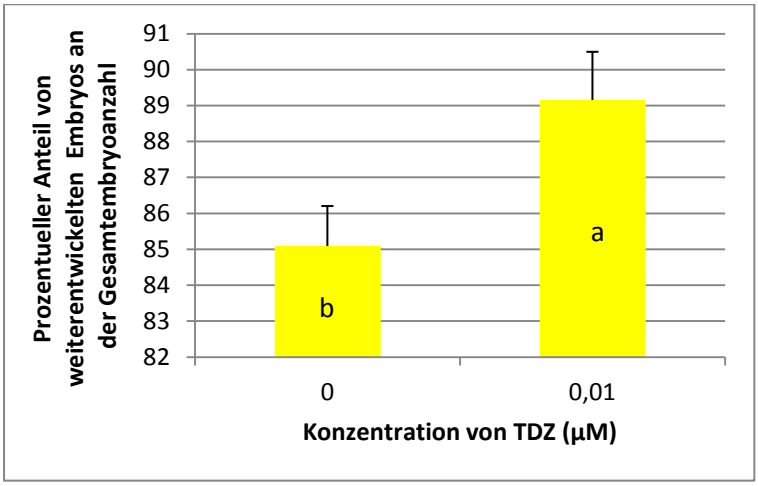

Diagramm 13: Einfluss von Thidiazuron auf die Bildung von weiterentwickelten Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Der Grund für den verminderten Anteil an weiterentwickelten Embryos in TDZ-freien Medien lag darin, dass in diesen mit 3,1 % Anteil an gekeimten Embryos eine signifikante reifungsfördernde Wirkung bestand verglichen mit Thidiazuron-hältigen Medien, in denen nur 1,2 % gekeimte Embryos aufzufinden waren (vgl. Diagramm 14).

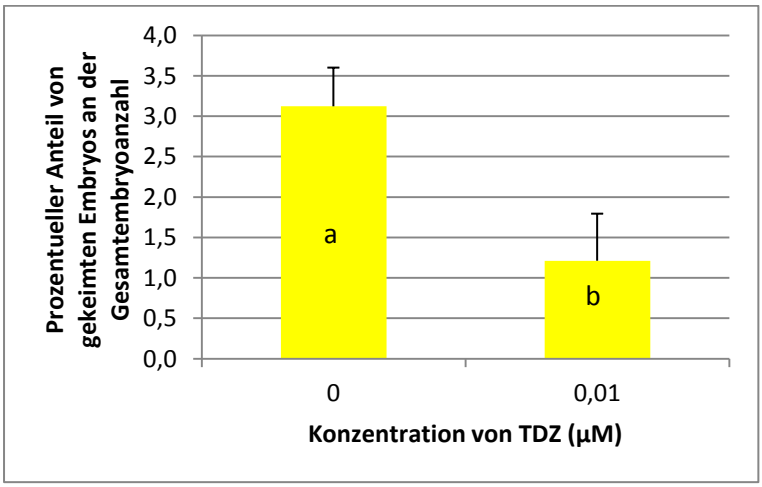

Diagramm 14: Einfluss von Thidiazuron auf die Bildung von gekeimten Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Auch der Einfluss der verschiedenen ausgetesteten Abscisinsäurekonzentrationen wird ohne Betrachtung der anderen einfließenden Faktoren untersucht. Da es sich hier nur um einen Überblick handelt und im folgenden Unterkapitel die Effekte der ausgetesteten Substanzen in Kombination untersucht werden, entfällt hier die Unterteilung nach Grundmedien.

In Medien mit 10 µM ABA fanden sich mit einem Anteil von 6% signifikant weniger globuläre Embryos als in Medien mit 0, 0,5 und 5µM ABA. Der prozentuelle Anteil in Medien mit 1 µM ABA lag im Mittelfeld (vgl. Diagramm 15). Nicht zum ersten Mal zeigten sich bei den durchgeführten Untersuchungen nicht lineare Zusammenhänge. Diese Ergebnisse kamen durch synergistische Effekte zustande, die im nächsten Unterkapitel analysiert werden.

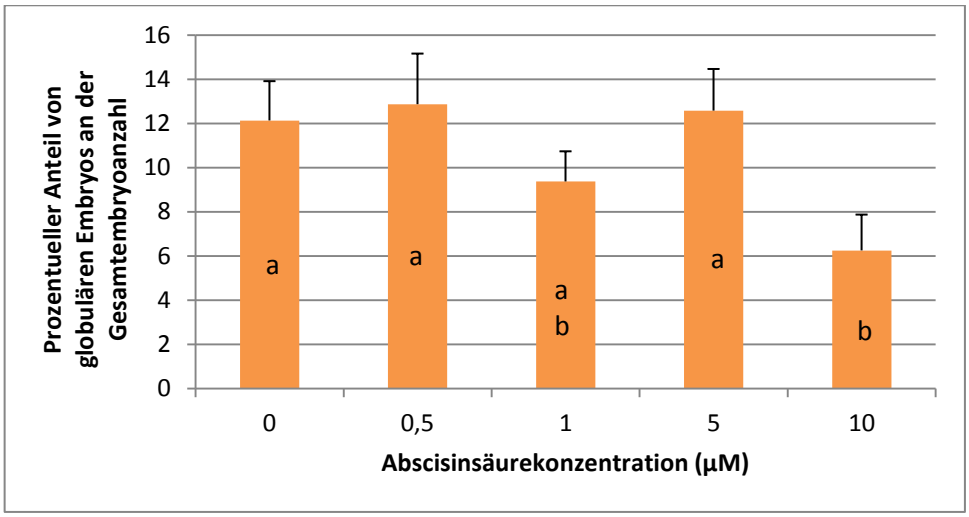

Diagramm 15: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Bildung von globulären Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Da sich durch den Einsatz diverser ABA-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede auf die Embryokeimung nachweisen ließen (vgl. Diagramm 16**,** S 32), zeigten sich folgend signifikante Unterschiede in der Bildung von weiterentwickelten Embryos. Da sich bei 1 und 10 µM ABA auf dem Medium weniger globuläre Embryos befanden ist naturgemäß der prozentuelle Anteil an weiterentwickelten Embryos bei diesen ABA-Konzentrationen höher (vgl. Diagramm 17**,** S 32). Es zeigte sich eine reifungsfördernde Wirkung von globulären hin zu weiterentwickelten Embryos. Bei

Medien mit 10 µM ABA lag der prozentuelle Anteil an weiterentwickelten Embryos bei 92,6 ± 1,7 %.

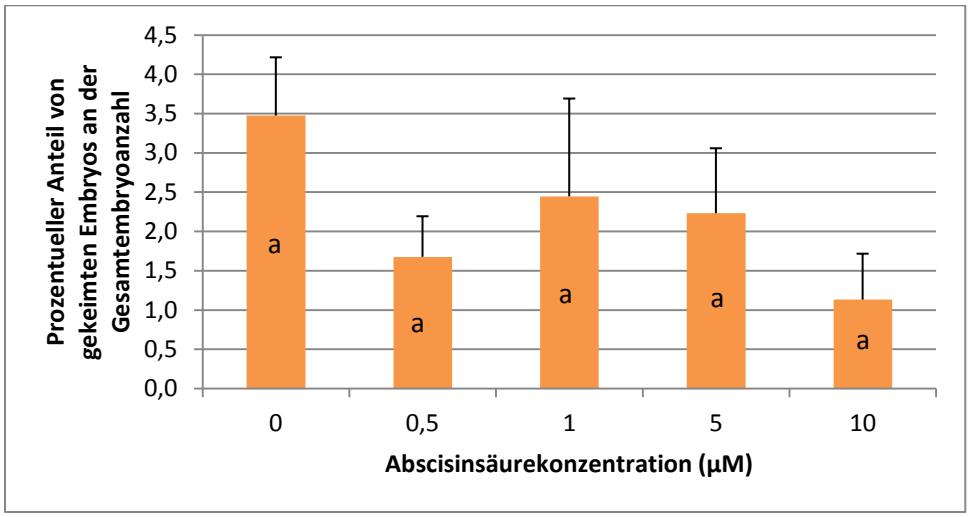

Diagramm 16: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Bildung von gekeimten Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

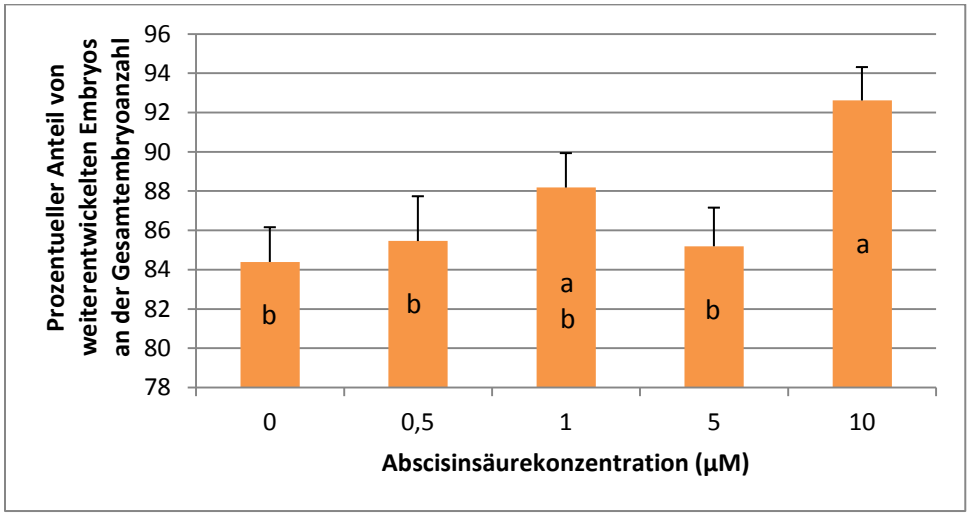

Diagramm 17: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Bildung von weiterentwickelten Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Auch zur Erfassung des Einflusses der verschiedenen Saccharosekonzentrationen wird nicht zwischen den beiden Grundmedien unterschieden. Die meisten globulären Embryos bildeten sich bei einer Saccharosekonzentration von 4%. Der Anteil an der Gesamtembryoanzahl betrug hier 16,0 %. Unsignifikant weniger globuläre Embryos brachten Medien mit 5% Saccharose hervor. Diese beiden Zuckerkonzentrationen stimulierten am wenigsten die Embryoreifung. Signifikant weniger globuläre Embryos als auf Medien mit 4% Saccharose befanden sich auf Medien mit 3 und 6% Saccharose. Auf Medien mit 3% Saccharose betrug der Anteil von globulären Embryos nur mehr 9,1%, bei Medien mit 6% Saccharose 6,7 % (vgl. Diagramm 18).

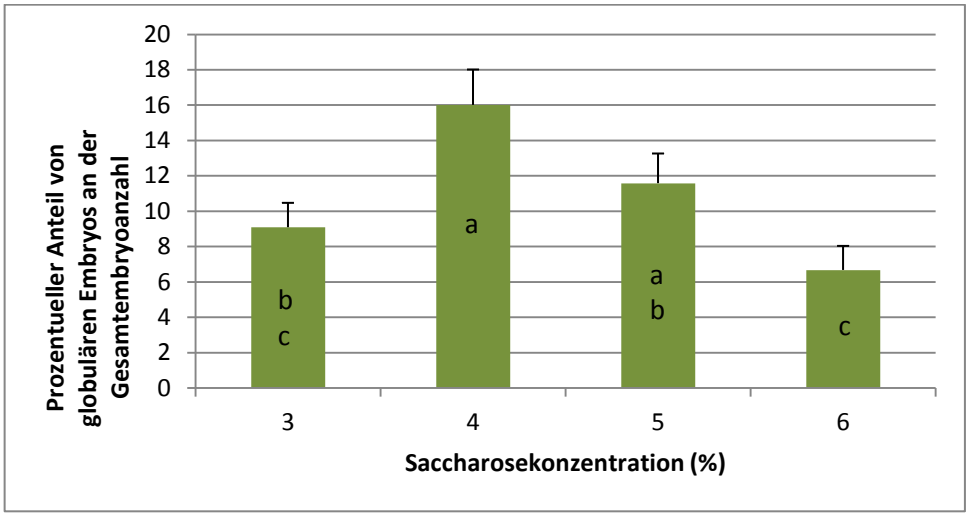

Diagramm 18: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Bildung von globulären Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Der Anteil an weiterentwickelten Embryos war bei einer Saccharosekonzentration von 4 % mit einem Anteil von 82,0 ± 2,2 % am geringsten. Bei dieser Zuckerkonzentration war wie eben erwähnt die Reifung verzögert. Die prozentuellen Anteile an weiterentwickelten Embryos bei den anderen ausgetesteten Zuckerkonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander, aber von denen auf Medien mit 4 % Saccharose signifikant (vgl. Diagramm 19, S. 34).

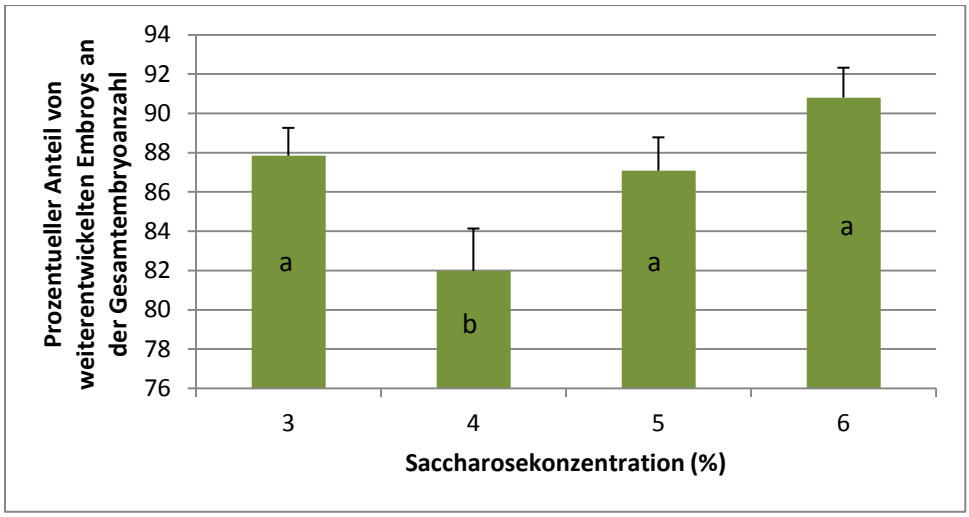

Diagramm 19: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Bildung von weiterentwickelten Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Eine Variation in der Saccharoskonzentration führte zu keinem signifikanten Unterschied beim Anteil an gekeimten Embryos. Die erhobenen Mittelwerte lagen hier zwischen 1,3 und 3,1 % (vgl. Diagramm 20).

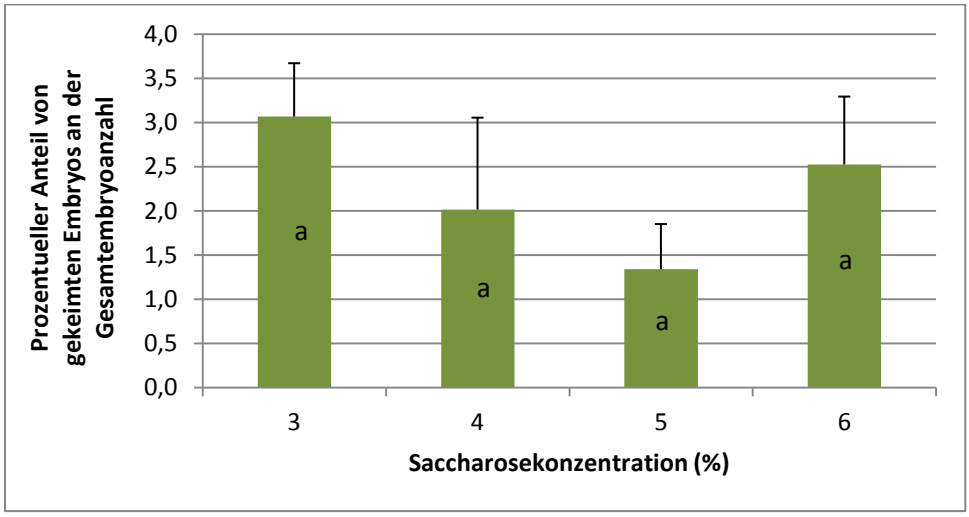

Diagramm 20: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Bildung von gekeimten Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

3.2.2. Synergismen bei der Embryoreifung

In diesem Unterkapitel erfolgt nun die genaue Analyse des Zusammenspiels der Wirkung der ausgetesteten Substanzen auf die Embryoreifung.

Zu Beginn wird die Auswirkung der Grundmedien ohne, bzw. mit 0,01µM Thidiazuron, mit der jeweiligen Supplementierung von Abscisinsäure und Saccharose in allen Konzentrationskombinationen untersucht. Jede Kombination von Abscisinsäure und Saccharose in ausgewählter Konzentration wird mit derselben Kombination im anderen Grundmedium verglichen. Es werden auch hier die einzelnen Entwicklungs-stadien miteinander verglichen.

TDZ führte nur bei bestimmten Kombinationen von ABA- und Saccharose-konzentrationen zu signifikanten Unterschieden im Reifungsprozess (vgl. Tabelle 24, S. 36). Bei Medien mit der Kombination A0S3 führte der Zusatz 0,01µM TDZ zu einer signifikant niedrigeren Keimrate. Diese sank von 8,0 ± 2,8 % in der Kombination ohne TDZ auf 1,4 ± 0,7% bei Vorhandensein von 0,01µM TDZ. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Kombination A0S6. Auch hier führte die Anwesenheit von 0,01µM TDZ zur Ausbildung von signifikant weniger gekeimten Embryos. Bei den Kombinationen A0,5S3 und A0,5S6 verhinderte eine TDZ-Konzentration von 0,01µM im Medium signifikant die Auskeimung von Embryos. Zwar zeigten sich bei anderen Kombinationen keine signifikanten Unterschiede in der Keimrate, dennoch soll erwähnt werden, dass die Mittelwerte der Ergebnisse der Keimungsrate mit Ausnahme der Kombinationen von A0S5, A1S4 und A1S5 ansonsten immer bei Grundmedien mit TDZ niedriger lagen, sofern es überhaupt zu einer Keimung in Medien ohne TDZ kam.

Die Kombination A1S5 im Grundmedium mit 0,01µM Thidiazuron führte zu einem signifikant niedrigeren Anteil an globulären Embryos verglichen mit dem Grundmedium ohne TDZ. Anwesenheit von TDZ in dieser Kombination schien die Reifung ebenso zu fördern wie bei der Kombination A5S4. Da sich bei den eben genannten Kombinationen die Anteile an gekeimten Embryos nicht signifikant

unterschieden, zeigten sich naturgemäß auch beim Entwicklungsstadium der weiterentwickelten Embryos signifikante Unterschiede. Im Hinblick auf die Mittelwerte der Ergebnisse bei den globulären Embryos kann kein Muster erkannt werden, bei welchen Kombinationen Thidiazuron den prozentuellen Anteil an globulären Embryos hob und bei welchen es ihn senkte.

Tabelle 24: Einfluss von Thidiazuron in Medien mit definierter Abscisinsäure – und Saccharosekonzentration, Darstellung der prozentuellen Anteile der Embryoentwicklungsstadien und Standardfehler, die mit einem Stern gekennzeichneten Ergebnisse unterscheiden sich signifikant (p=0,05) von dem selben Embryoentwicklungsstadium bei der gleichen Abscisinsäure-Saccharose-Kombination im jeweilig anderen Grundmedium

Konzentration der Test-Substanzen	globuläre Embryos		weiterentwickelte Embryos		gekeimte Embryos	
	ohne TDZ	0,01µM TDZ	ohne TDZ	0,01µM TDZ	ohne TDZ	0,01µM TDZ
A0S3	6,6 ± 1,7	11,9 ± 4,8	85,4 ± 2,9	86,7 ± 4,7	8,0 ± 2,8 *	1,4 ± 0,7 *
A0S4	14,7 ± 2,3	27,5 ± 9,5	82,9 ± 2,2	71,4 ± 9,3	2,4 ± 1,0	1,1 ± 0,8
A0S5	18,2 ± 6,3	4,2 ± 2,3	80,7 ± 6,3	91,3 ± 3,5	1,3 ± 0,9	4,5 ± 3,1
A0S6	5,2 ± 3,2	10,9 ± 4,2	87,2 ± 3,9	88,6 ± 4,1	7,6 ± 2,9 *	0,6 ± 0,6 *
A0,5S3	5,9 ± 1,9	13,3 ± 5,6	91,8 ± 1,8	86,7 ± 5,6	2,3 ± 1,0 *	0,0 ± 0,0 *
A0,5S4	33,5 ± 10,7	10,1 ± 4,2	65,1 ± 10,4	89,9 ± 4,2	1,3 ±1,0	0,0 ± 0,0
A0,5S5	9,5 ±3,5	5,5 ± 3,2	85,0 ± 4,1	93,9 ± 3,3	5,5 ± 3,4	0,6 ± 0,6
A0,5S6	8,2 ± 2,8	16,0 ± 9,9	88,0 ± 3,2	84,1 ± 9,9	3,8 ± 1,6 *	0,0 ± 0,0 *
A1S3	3,5 ± 1,6	8,2 ± 2,3	91,8 ± 2,3	91,2 ± 2,4	4,6 ± 2,1	0,6 ± 0,4
A1S4	19,3 ± 4,7	10,5 ± 3,8	78,7 ± 4,8	76,7 ± 10,1	2,0 ± 0,9	12,7 ± 11,0
A1S5	19,6 ± 5,0 *	2,6 ± 1,6 *	79,9 ± 5,1 *	96,9 ± 1,6 *	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,5
A1S6	6,4 ± 2,7	1,8 ± 1,8	93,6 ± 2,7	98,2 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
A5S3	8,7 ± 2,6	18,1 ± 9,5	84,6 ± 3,0	80,6 ± 9,5	6,7 ± 2,8	1,3 ± 1,1
A5S4	18,2 ± 4,4 *	4,2 ± 3,0 *	81,5 ± 4,4 *	95,8 ± 3,0 *	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0
A5S5	20,3 ± 4,7	12,6 ± 8,2	79,7 ± 4,7	87,4 ± 8,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
A5S6	7,0 ± 3,0	7,1 ± 4,0	85,6 ± 5,4	92,9 ± 4,0	7,4 ± 4,6	0,0 ± 0,0
A10S3	3,7 ± 1,6	11,8 ± 6,4	91,8 ± 3,1	88,2 ± 6,4	4,5 ± 2,3	0,0 ± 0,0
A10S4	8,9 ± 2,3	2,9 ± 2,9	90,8 ± 2,5	97,1 ± 2,9	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0
A10S5	12,6 ± 8,5	4,7 ± 2,4	87,4 ± 8,5	95,3 ± 2,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
A10S6	0,0 ± 0,0	1,9 ± 1,9	96,3 ± 3,7	98,1 ± 1,9	3,7 ± 3,7	0,0 ± 0,0

Einfluss der Abscisinsäurekonzentration

In Grundmedien ohne Thidiazuron mit 3 % Saccharose führte eine Variation der Abscisinsäurekonzentration im ausgetesteten Rahmen zu keiner signifikanten Veränderung im Reifungsprozess von somatischen Embryos. Die Mittelwerte der Anteile der globulären Embryos lagen im Rahmen von 3,5 bis 8,7 %. Die meisten globulären Embryos befanden sich im Medium mit 5µM Abscisinsäure, während der geringste Anteil an globulären Embryos auf Medium A1S3 bestimmt wurde. Der Anteil an weiterentwickelten Embryos lag bei diesem Vergleich zwischen 84,6 und 91,8 %. Auch auf die Keimrate zeigten die eingesetzten ABA-Konzentrationen in Kombination mit 3 % Saccharose sowie ohne Thidiazuron keine signifikanten Unterschiede. Die niedrigste Keimrate zeigte sich auf Medium A0,5S3 mit 2,3 %, während die beste Keimung sich auf Medium ohne ABA mit einer Rate von 8,0 % im Mittel zeigte. Bei keinem der untersuchten Embryoentwicklungsstadien zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Anteil der einzelnen Entwicklungsstufen und der Abscisinsäurekonzentration (vgl. Diagramm 21).

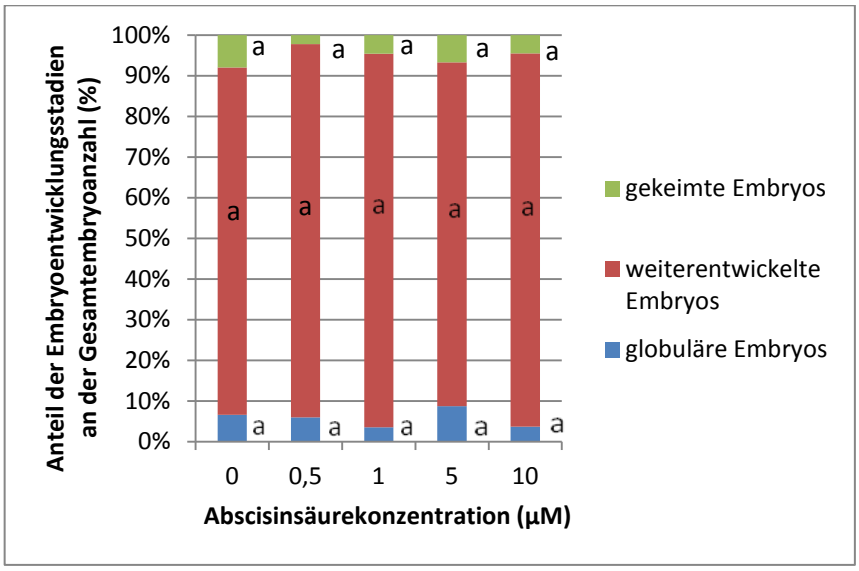

Diagramm 21: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 3% Saccharose und Abwesenheit von TDZ, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

In Medien ohne Thidiazuron mit 4% Saccharose führte eine Abscisinsäurekonzentration von 0,5µM zum höchsten Anteil an globulären Embryos mit einem Durchschnitt von 33,5 %. Diese ABA-Konzentration führte zu einer signifikanten Reifungsverzögerung bezüglich Medium A0S4 und A10S4. Medium A1S4 und A5S4 lagen mit ihren Anteilen an globulären Embryos zwischen denen der eben genannten Medien und unterschieden sich nicht signifikant von ihnen. Bei der Betrachtung der Anteile an weiterentwickelten Embryos zeigte sich das eben erwähnte Schema wieder. Wie sich schon bei den Medien A0S4 und A10S4 eine bessere Reifung anhand des verminderten Anteils an globulären Embryos gezeigt hat, fanden sich hier die größten Anteile an weiterentwickelten Embryos. Die Anteile von gekeimten Embryos unterschieden sich bei dieser Kombination durch die eingesetzten Abscisinsäurekonzentrationen nicht. Die reifungsfördernde Wirkung der Medien A0S4 und A10S4 bezog sich daher nur auf die bessere Entwicklung hin zu weiterentwickelten Embryos, nicht aber auf eine bessere Keimung. Die höchste Keimrate in diesem Versuch zeigte sich bei Medium A0S4 mit 2,4%, gefolgt von Medium A1S4 mit 2,0% (vgl. Diagramm 22,).

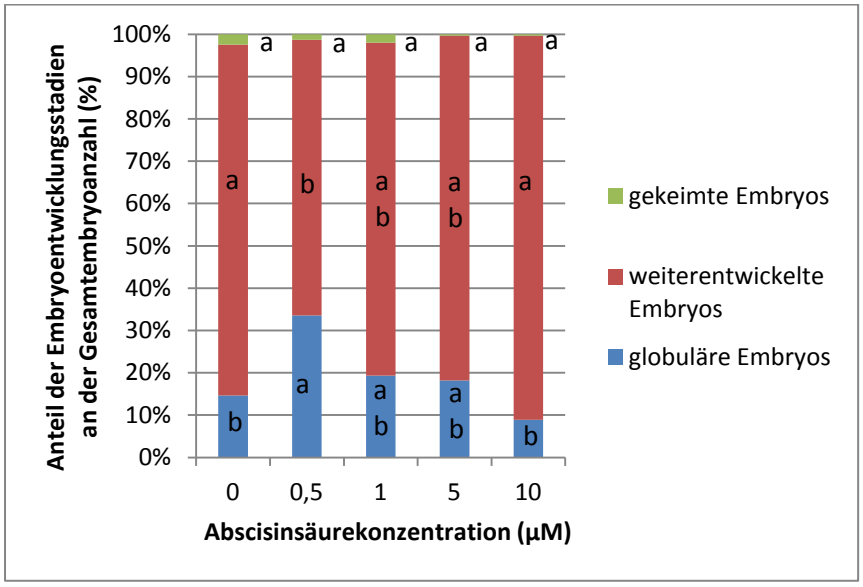

Diagramm 22: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 4% Saccharose und Abwesenheit von TDZ, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Bei der Analyse der Auswirkungen von variierender ABA-Konzentration in der Kombination mit 5 % Saccharose in Grundmedien ohne Thidiazuron zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den Anteilen an globulären Embryos an der Gesamtembryoanzahl pro g. In dieser Kombination führte eine Abscisinsäurekonzentration von 0,5µM nicht zu einer verzögerten Reifung. Im Medium A0,5S5 betrug der Anteil an globulären Embryos 9,5 % und lag somit niedriger als bei den Vergleichsmedien mit 5% Saccharose ohne TDZ. Die Anteile an weiterentwickelten Embryos unterschieden sich nicht signifikant. Bei den Anteilen an gekeimten Embryos lag der auf Medium A0,5S5 signifikant höher als bei den Vergleichsmedien. Während bei Medium A0,5S5 die Keimrate 5,5 % betrug, lag sie bei Medium A0S5 nur mehr bei 1,3 % und bei Medium A1S5 bei 0,4 %. Auf den Medien A5S5 und A10S5 konnte keine Keimung nach der sechswöchigen Testphase beobachtet werden. Dennoch unterschieden sich die Anteile an gekeimten Embryos bei den Medien mit totaler Keimhemmung nicht signifikant von denen auf Medium A1S5 oder A0S5 (vgl. Diagramm 23).

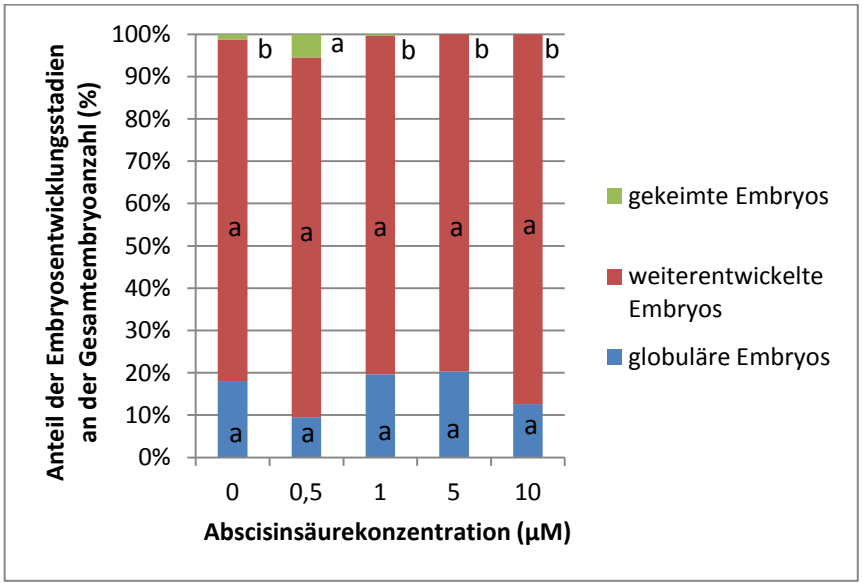

Diagramm 23: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 5% Saccharose und Abwesenheit von TDZ, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Es konnte kein signifikanter Einfluss verschiedener Abscisinsäurekonzentrationen auf die Reifung in Medien mit 6 % Saccharose ohne Thidiazuron beobachtet werden. Dennoch fiel auf, dass auf Medium A10S6 keine globulären Embryos nach sechs Testwochen aufzufinden waren ebenso wie auf Medium A1S6 anscheinend eine totale Keimhemmung bestand (vgl. Diagramm 24).

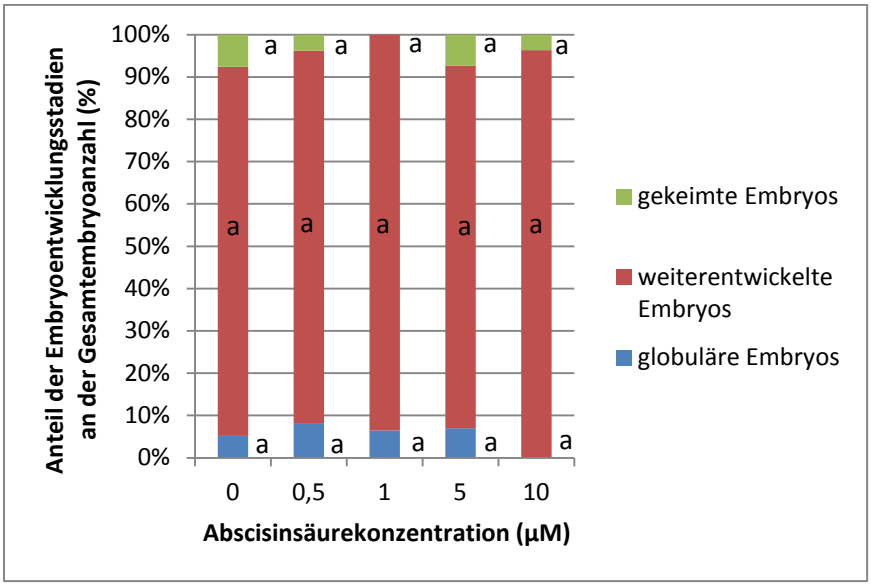

Diagramm 24: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 6% Saccharose und Abwesenheit von TDZ, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

In Grundmedien mit 0,01µM TDZ und 3% Saccharose bewirkte eine Variation von ABA im ausgetesteten Rahmen keine signifikanten Unterschiede im Reifungsvorgang. Die meisten globulären Embryos befanden sich auf Medium mit 5µM ABA, mit einem Anteil von durchschnittlich 18,1 %. Eine signifikante Reifungsverzögerung bezüglich der Vergleichsmedien konnte nicht beobachtet werden. Die Anteile an weiterentwickelten Embryos lagen zwischen 80,6 % und 91,2%. Die Keimraten lagen bei den Medien TA0S3 und TA5S3 mit rund 1,3 % etwa gleich. Bei Medium TA1S3 lag sie nur mehr bei 0,6%, bei den anderen beiden Vergleichsmedien mit 0,5 µM ABA und 10 µM ABA wurde keine Keimung beobachtet. Dennoch unterscheiden sich die erhobenen Werte nicht signifikant (vgl. Diagramm 25, S. 41).

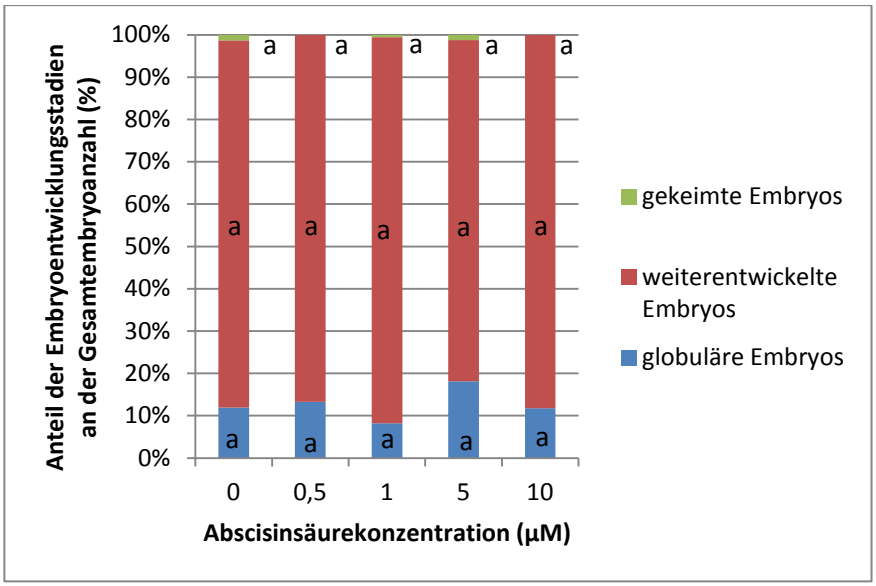

Diagramm 25: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 3% Saccharose und einer TDZ- Konzentration von 0,01µM, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Auf Medien mit 4% Saccharose und einer TDZ-Konzentration von 0,01µM führte eine Steigerung der ABA-Konzentration im ausgetesteten Rahmen zu einer Verminderung des Anteils an globulären Embryos. Auf Medium TA0S4 war der Anteil an globulären Embryos mit 27,5 % signifikant höher als auf den Medien TA5S4 und TA10S4, deren Anteile bei 4,2 und 2,9 % lagen. Die prozentuellen Anteile an globulären Embryos der Medien TA1S4 und TA0,5S4 lagen zwischen denen von TA0S4 und TA5S4 und unterschieden sich von diesen nicht signifikant. Die prozentuellen Anteile der weiterentwickelten Embryos zeigten dasselbe Schema wie schon anhand der globulären Embryos ersichtlich war. In dieser Kombination führte das Medium ohne ABA zu einer signifikanten Reifungsverzögerung bezüglich der ersten beiden Entwicklungsstufen verglichen mit den Medien, die 5 oder 10 µM Abscisinsäure enthielten. Bei den Anteilen an gekeimten Embryos führte eine Steigerung der ABA-Konzentration zu keinem signifikanten Unterschied bei den Keimraten. Dennoch waren die prozentuellen Anteile im Mittel auseinanderliegend. Die höchste Keimrate zeigte sich bei einer ABA-Konzentration von 1µM mit einem Anteil von 12,7 %, gefolgt von der auf Medium TA0S4 mit einer durchschnittlichen Keimrate von 1,1 %. Bei den

übrigen Vergleichsmedien konnte keine Keimung festgestellt werden (vgl. Diagramm 26).

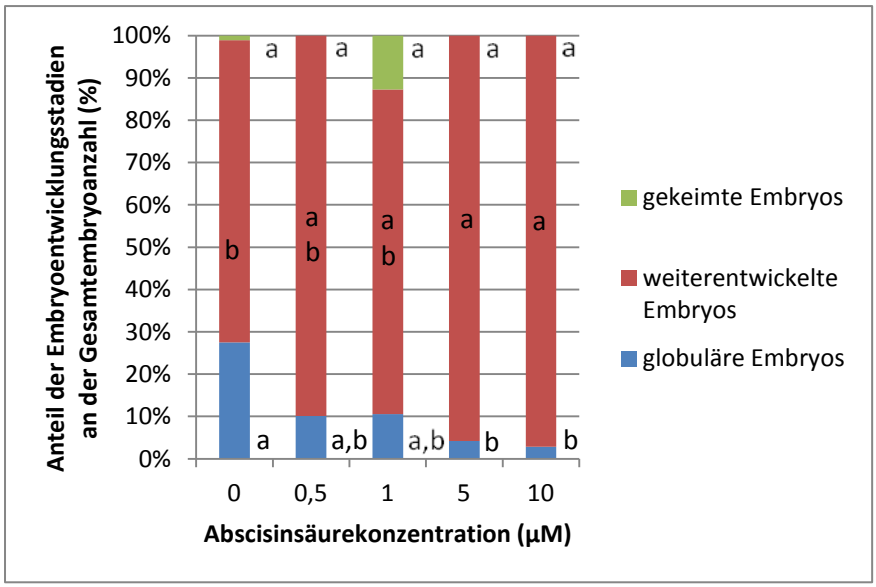

Diagramm 26: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 4% Saccharose und einer TDZ- Konzentration von 0,01µM, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

In der Versuchsreihe mit Medien, die 5% Saccharose und eine TDZ-Konzentration von 0,01µM enthielten, führte eine Steigerung der Abscisinsäurekonzentration im ausgetesteten Rahmen zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die Reifung der somatischen Embryos. Der größte Anteil an globulären Embryos zeigte sich mit 12,6 % bei einer ABA-Konzentration von 5µM. Die Anteile an globulären Embryos bei den anderen Abscisinsäurekonzentrationen lagen zwischen 2,6 und 5,5 %. Der größte Anteil an gekeimten Embryos war auf Medium TA0S5 mit 4,5 % gekeimten Embryos zu finden. Erhöhte man die ABA-Konzentration auf 0,5 oder 1µM, lagen die Werte bei 0,6 bzw. 0,5 %, während bei einer weiteren Erhöhung auf 5 oder 10 µM keine gekeimten Embryos mehr anzutreffen waren. Dennoch unterschieden sich die Werte nicht signifikant (vgl. Diagramm 27, S. 43).

In Medien mit 6% Saccharose und einer TDZ-Konzentratation von 0,01 µM führten ABA-Konzentrationen von 0 bzw. 0,5µM zu den höchsten Anteilen an globulären Embryos mit 10,9 bzw. 16,0 %. Bei einer Abscisinsäurekonzentration von 5µM lag der Anteil mit 7,1 % etwas niedriger. Bei den Medien TA1S6 bzw. TA10S6 lagen die Anteile

mit 1,8 bzw. 1,9 am niedrigsten. Ein signifikanter Unterschied im Reifungsprozess konnte hier allerdings nicht beobachtet werden. Beim Medium TA0S6 betrug die Keimrate nach den 6 Testwochen 0,6 %. Auf den Vergleichsmedien mit ABA-Konzentrationen ab 0,5µM war keine Keimung mehr beobachtbar (vgl. Diagramm 28).

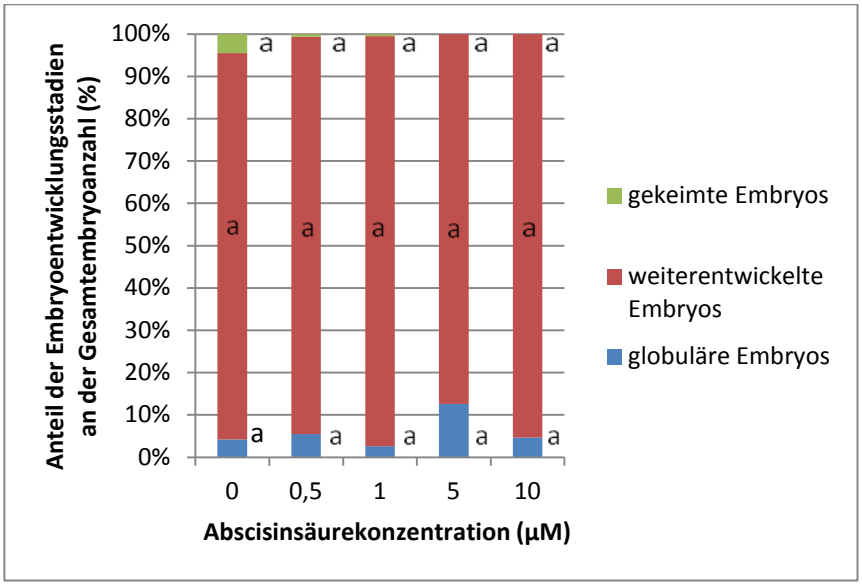

Diagramm 27: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 5% Saccharose und einer TDZ- Konzentration von 0,01µM, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

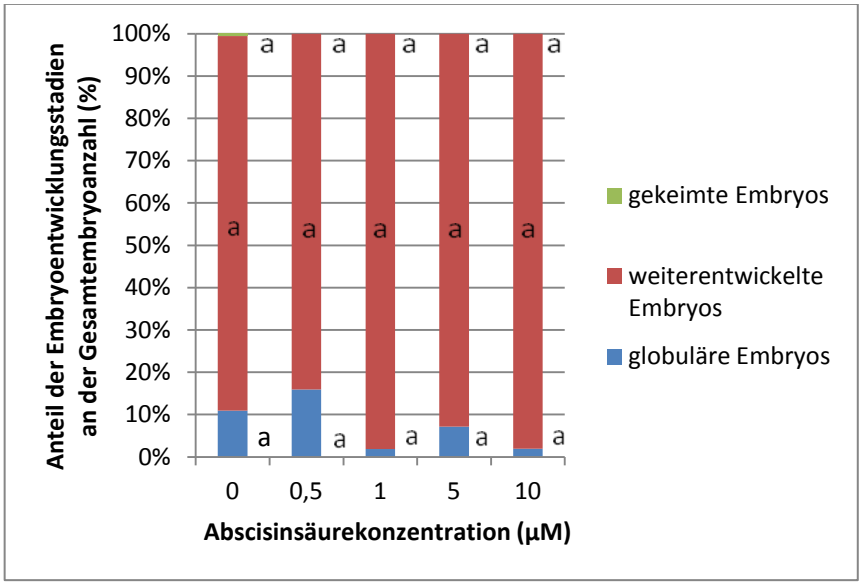

Diagramm 28: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 6% Saccharose und einer TDZ- Konzentration von 0,01µM, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Einfluss der Saccharosekonzentration

Auf Medien ohne Abscisinsäure und TDZ war bei steigender Saccharosekonzentration bis 5% eine Zunahme des Anteils von globulären Embryos erkennbar, wobei hier deren Anteil bei 18,1 % lag. Bei einer weiteren Steigerung auf 6% kam es zu einem signifikanten Abfall des Anteils auf 5,2%. Eine Steigerung der Saccharosekonzentration von 3% auf 4 bzw. 5% schien eine reifungsverzögernde Wirkung zu haben. Bei Medien mit 6% Saccharose war dieser Effekt nicht beobachtbar. Variierende Saccharosekonzentrationen hatten auf die Anteile an weiterentwickelten Embryos keinen signifikanten Einfluss. Die meisten gekeimten Embryos zeigten sich mit einem Anteil von 8,0 % bei Medium A0S3. Nicht signifikant weniger wurden auf Medium A0S4 (2,4%) und A0S6 (7,6%) gebildet. Eine signifikant niedrigere Keimrate als auf Medium A0S3 zeigte sich bei Medium A0S5 mit 1,3% (vgl. Diagramm 29).

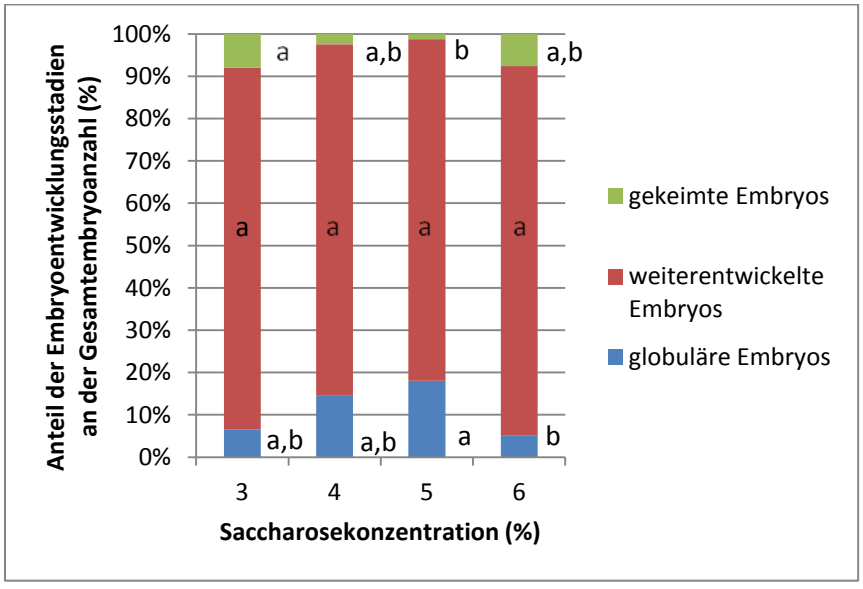

Diagramm 29: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien ohne Abscisinsäure und TDZ, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Vergleicht man Medien mit 0,5µM ABA und ohne TDZ, so war eine signifikante Reifungsverzögerung auf Medien mit 4% Saccharose zu beobachten. Auf Medium A0,5S4 lag der Anteil an globulären Embryos bei 33,5%. Dies war der höchste ermittelte prozentuelle Anteil an globulären Embryos auf allen Versuchsmedien. Diese spezielle Kombination zeigte somit die stärkste Reifungsverzögerung im Entwicklungsschritt von globulären Embryos hin zu weiterentwickelten Embryos. Die Medien A0,5S3, A0,5S5 und A0,5S6 wiesen einen prozentuellen Anteil von globulären Embryos zwischen 5,9 und 9,5 % auf. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bezüglich des Anteils an weiterentwickelten Embryos bestätigten das eben erwähnte Schema. Auf Medium A0,5S4 befanden sich signifikant weniger weiterentwickelte Embryos. Die ausgetesteten Saccharosekonzentrationen hatten in dieser Kombination keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil an gekeimten Embryos. Die höchste Keimrate dieser Reihe befand sich auf Medium A0,5S5 mit einem Anteil von 5,5 % gekeimten Embryos (vgl. Diagramm 30).

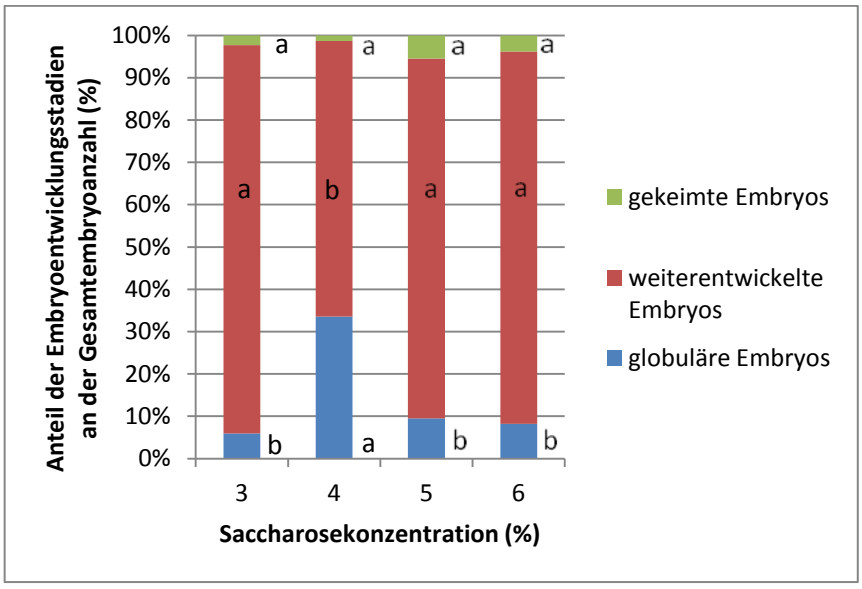

Diagramm 30: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien ohne TDZ mit 0,5µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Erhöhte man in Medien ohne TDZ die Abscisinsäurekonzentration von 0,5µM auf 1 µM, so stellte sich nicht nur eine Saccharosekonzentration von 4 % als signifikant reifungsverzögernd heraus, sondern dieser Effekt ließ sich auch bei einer Saccharose-konzentration von 5% anhand des vergrößerten Anteils an globulären Embryos beobachten. In dieser Versuchszusammenstellung zeigte sich auch ein signifikanter Einfluss auf die Anteile an gekeimten Embryos: Je höher die Saccharosekonzentration, desto geringer war der Anteil an gekeimten Embryos. Während auf Medium A1S3 die Keimrate noch bei 4,6 % lag, war sie auf Medium A1S4 bereits nur mehr etwa halb so hoch und sank auf Medium A1S5 auf 0,4 %. Auf Medium A1S6 konnte keine Keimung mehr beobachtet werden (vgl. Diagramm 31).

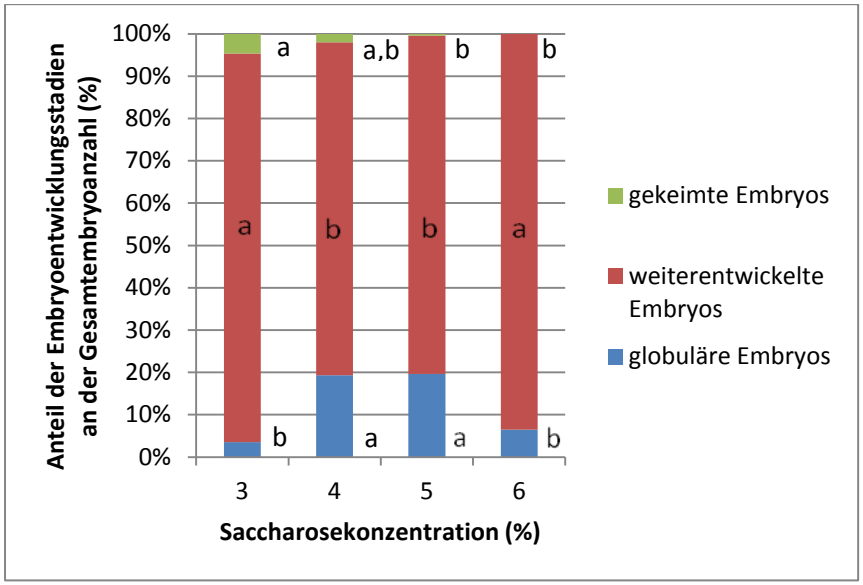

Diagramm 31: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien ohne TDZ mit 1µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Auf Medien mit 5 µM ABA ohne TDZ war der Anteil an globulären Embryos bei einer Saccharosekonzentration von 5% am größten. Nicht signifikant weniger globuläre Embryos zeigten sich auf Medium A5S4. Bei den Kombinationen mit 3 und 6 % Saccharose wurde die Reifung signifikant beeinflusst, verglichen mit dem Medium mit 5% Saccharose. Beim Anteil an weiterentwickelten Embryos zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Ebenso war auch beim Anteil an gekeimten Embryos bei dieser Versuchsreihe kein signifikanter Unterschied durch steigende Saccharose-

konzentration zu beobachten. Während bei der Versuchsanordnung mit 1µM ABA ohne TDZ steigende Saccharosekonzentration für die Keimung hinderlich schienen, war hier bei einer Saccharosekonzentration von 5% keine Keimung zu beobachten, während bei 6% Saccharose die Keimrate annähernd der von Medien mit 3% Saccharose entsprach (vgl. Diagramm 32).

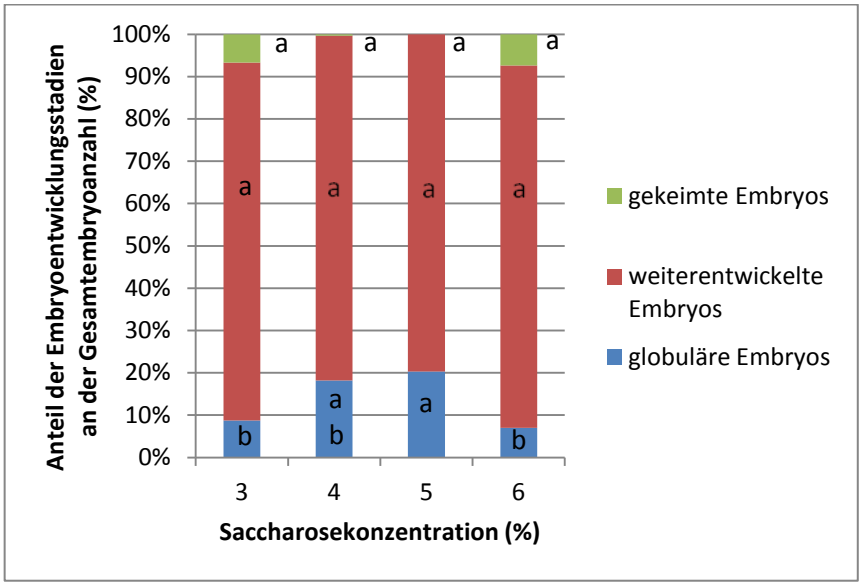

Diagramm 32: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien ohne TDZ mit 5µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Bei einer Abscisinsäurekonzentration von 10µM und ohne TDZ führten die ausgetesteten Saccharosekonzentrationen zu keiner signifikanten Reifungs-beschleunigung. Der Anteil an globulären Embryos war dennoch auch hier wieder auf Medien mit einer Saccharosekonzentration von 5% am größten. So wie bei der vorherigen Versuchsanordung waren die Anteile an gekeimten Embryos bei 3 und 6 % Saccharose am größten, unterschieden sich aber nicht signifikant von den Werten auf den beiden anderen Versuchsmedien (vgl. Diagramm 33, S. 48).

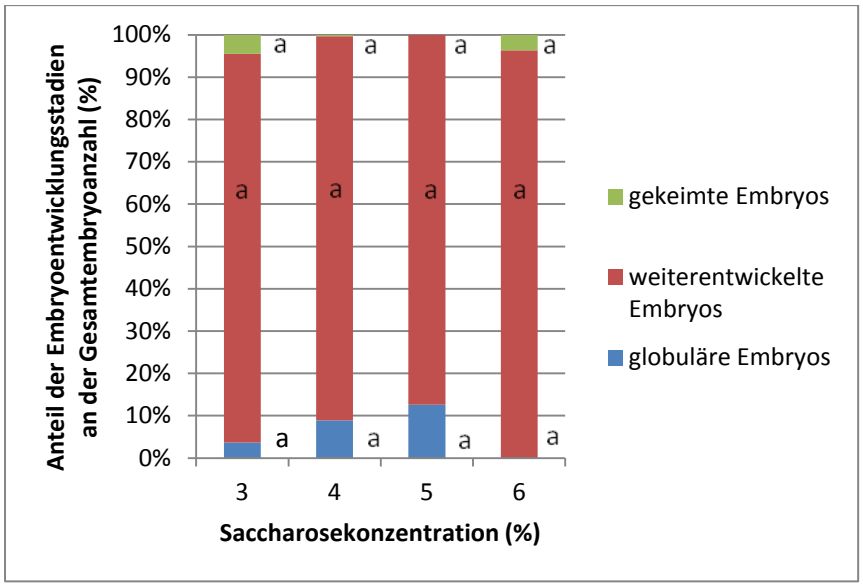

Diagramm 33: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien ohne TDZ mit 10µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Bei der Versuchsanordnung mit 0,01µM TDZ ohne Abscisinsäure im Nährmedium zeigten sich in den Medien durch die verschiedenen ausgetesteten Saccharose-konzentrationen signifikante Unterschiede bei den Anteilen an globulären Embryos. Der größte Anteil mit durchschnittlich 27,5% fand sich auf Medium TA0S4. Es führte zu einer signifikant gehemmten Reifung verglichen mit dem Medium TA0S5, wo der Anteil nur bei 4,2 % lag. Auf den Medien mit 3 bzw. 6% Saccharose lag der Anteil an globulären Embryos zwischen den eben genannten mit etwa 11 % und unterschied sich von den beiden nicht signifikant. Der Anteil an weiterentwickelten Embryos war bei einer Saccharosekonzentration von 4% am geringsten, da hier die Reifung am stärksten verzögert war. In der Keimrate zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede (vgl. Diagramm 34, S. 49).

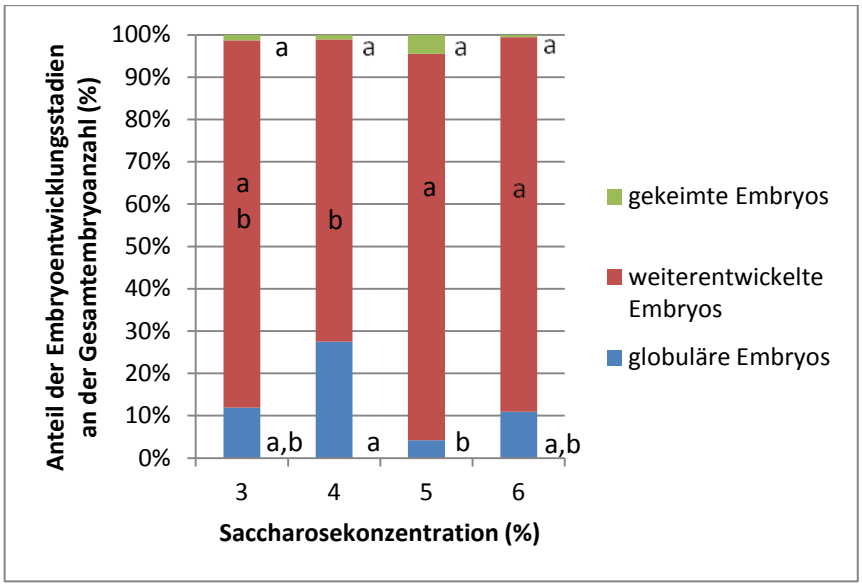

Diagramm 34: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 0,01µM TDZ ohne ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

In Medien mit TDZ und 0,5µM ABA zeigte sich durch erhöhte Saccharosekonzentration kein signifikanter Unterschied im Reifungsprozess. Globuläre Embryos waren auf den Medien dieser Versuchsanordung mit einem Anteil zwischen 5,5 und 16,0 % enthalten. Gekeimte Embryos waren auf den Medien mit 3, 4 und 6% Saccharose nicht gebildet worden. Beim Medium TA0,5S5 lag die Keimrate bei 0,6% (vgl. Diagramm 35).

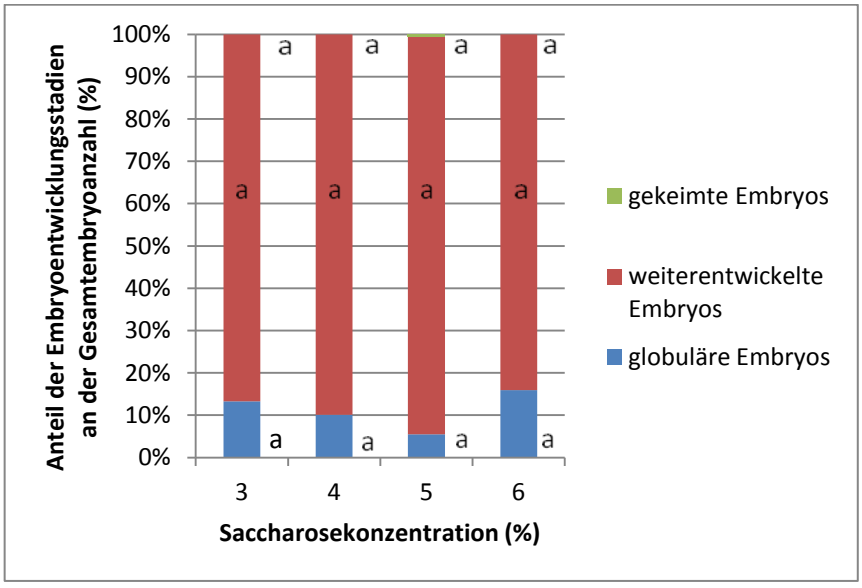

Diagramm 35: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 0,01µM TDZ und 0,5µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Die Versuchsreihe mit 0,01 µM TDZ und 1µM ABA in den Nährmedien wies signifikante Unterschiede bei den Anteilen an globulären Embryos auf. Bei einer Saccharosekonzentration von 4% war der Anteil mit einem Wert von 10,5% hier am höchsten, gefolgt von dem auf Medium TA1S3, bei dem der Anteil bei 8,2 % lag. Bei den Medien mit 5 und 6% Saccharose bestand, verglichen mit Medium TA1S4 eine signifikante Reifungsbeschleunigung hin zu den weiterentwickelten Embryos. Die Keimraten auf den Medien mit verschiedener Saccharosekonzentration unterschieden sich nicht signifikant, wenn auch die Keimrate auf Medium TA1S4 im Mittel bei 12,7 % lag, während bei TA1S3 und TA1S5 der Wert rund 0,5% betrug und auf Medium TA1S6 keine Keimung beobachtet werden konnte (vgl. Diagramm 36).

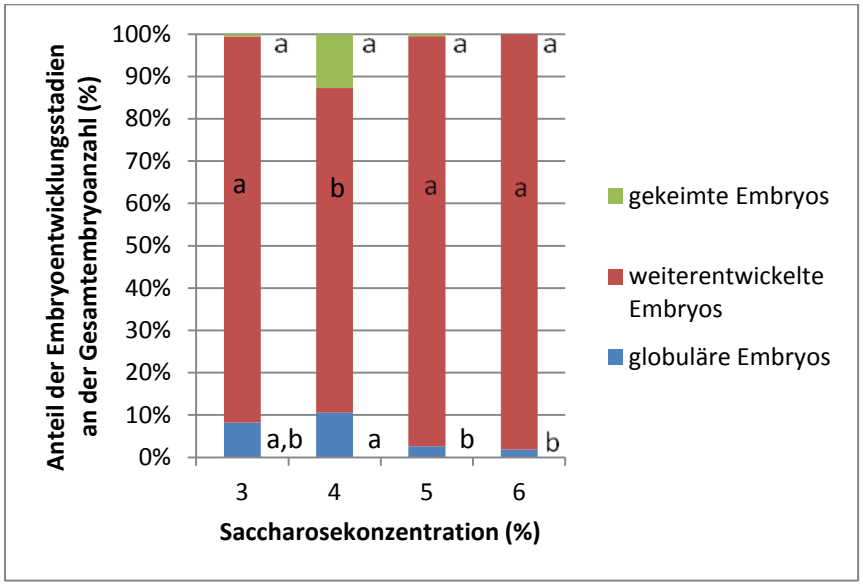

Diagramm 36: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 0,01µM TDZ und 1µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Auf Medien mit 0,01µM Thidiazuron und 5µM Abscisinsäure führten erhöhte Saccharosekonzentrationen zu keinen signifikanten Unterschieden im Reifungsprozess. Gekeimte Embryos konnten nur auf Medium TA5S3 beobachtet werden. Durch höhere Zuckerkonzentrationen in dieser Versuchskombination schien die Keimung total gehemmt zu sein (vgl. Diagramm 37, S. 51).

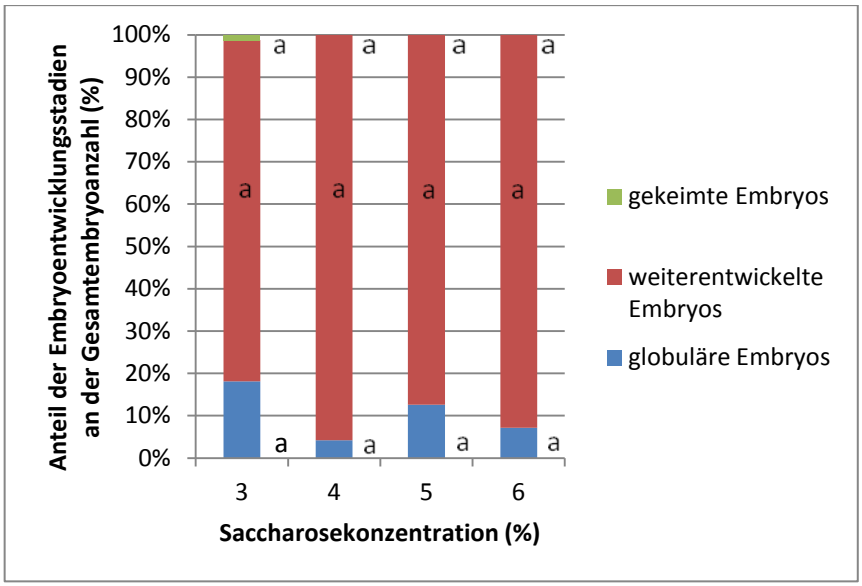

Diagramm 37: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 0,01µM TDZ und 5µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Lag die Abscisinsäurekonzentration bei 10µM, in Kombination mit 0,01µM TDZ, so zeigten die ausgetesteten Saccharosekonzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf den Reifungsprozess. Der Anteil an globulären Embryos lag hier generell sehr niedrig und die Keimung war bei allen Medien dieser Versuchsanordnung total gehemmt (vgl. Diagramm 38).

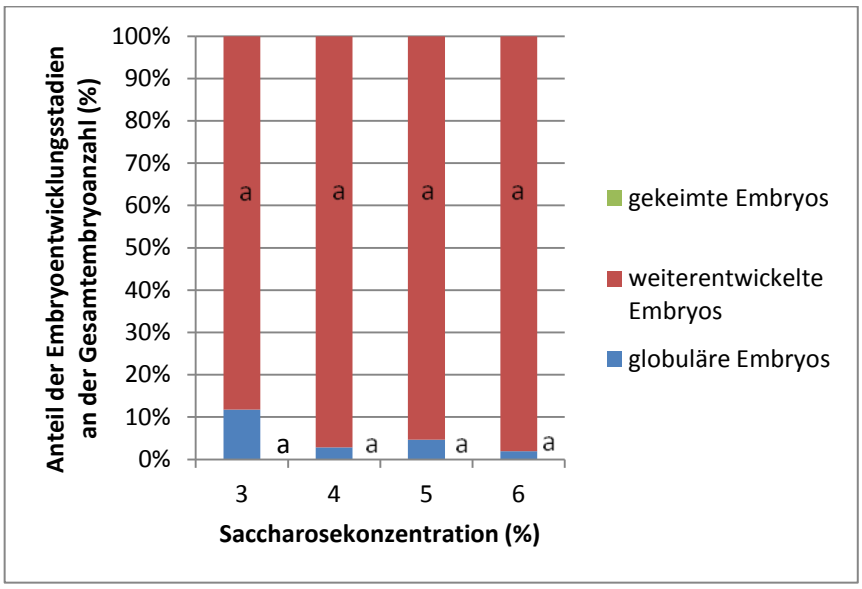

Diagramm 38: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Reifung von Embryos in Medien mit 0,01µM TDZ und 10µM ABA, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

3.2.3. Einfluss des Klons auf die Embryoreifung

Da der Einfluss von verschiedenen Genotypen auf Wachstum und Entwicklung bereits in der Vorarbeit von Winter (2009) bestätigt werden konnte, wird in der vorliegenden Arbeit in diesem Kapitel im Speziellen auf etwaige Unterschiede im Reifungsverhalten von Embryos der untersuchten Klone eingegangen.

Signifikante Unterschiede im Reifungsverhalten zwischen den einzelnen Klonen konnten auf Medium TA0S4 beobachtet werden. Klon 4 zeigte auf diesem Medium nach 6 Testwochen mit 63,3 ± 18,6 % signifikant mehr globuläre Embryos als die beiden Vergleichsklone. Bei Klon 4 zeigte sich somit eine deutliche Reifungsverzögerung von globulären Embryos hin zu weiterentwickelten Embryos. Gekeimte Embryos konnten bei Klon 4 nicht aufgefunden werden. Bei den anderen beiden Klonen konnte der Keimungsvorgang am Ende von 6 Testwochen nachgewiesen werden, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zu Klon 4. Klon 10 und Klon 11 lieferten keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse. Bei diesen lag der Anteil an globulären Embryos bei 7,9 ± 3,2 bzw. bei 17,9 ± 6,2 Prozent (vgl. Diagramm 39).

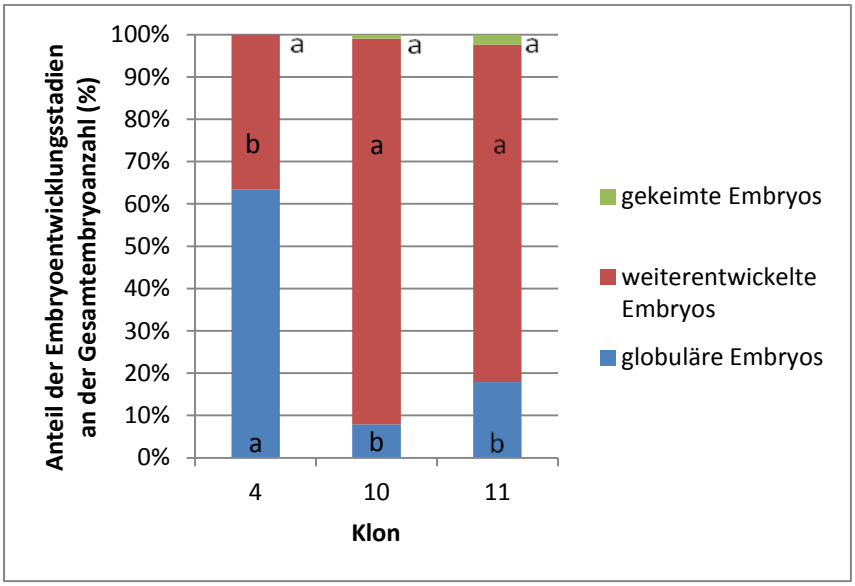

Diagramm 39: Einfluss des Klons auf die Embryoreifung im Medium TA0S4, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen der gleichen Farbe mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

3.3. Konversion

Im Abschluss wurde auch die Konversion der Embryos hin zu Pflanzen untersucht. Hierbei handelte es sich um eine überblicksartige Untersuchung, deren vorrangiges Ziel es war, auszuschließen, dass die Vorbehandlung derart in die Embryoentwicklung eingegriffen hat, dass eine normale Pflanzenentwicklung nicht möglich ist. Außerdem sollte festgestellt werden, ob Abscisinsäurezusatz zum Induktions- und Reifungsmedium sich positiv auf die Reifung und dadurch auf die Pflanzenbildung auswirkt (Ammirato, 1983). Weiters wurde ein optimaler Passagierabstand gesucht, um die bestmögliche Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen bei minimalem Passagier- und Materialaufwand zu gewährleisten.

3.3.1. Passagierabstand und Auswertungszeitpunkt

Während für die Vermehrung und Erhaltung der Kalluslinien schon aus Vorarbeiten der optimale Passagierabstand von 3 Wochen bekannt war, gab es bezüglich der Kultivierung von somatischen Embryos von *Glycyrrhiza glabra* L. auf Medium 29, auf dem sie zu Pflanzen konvertieren sollten, noch keine Erfahrungswerte. Nach der ersten Passage auf Medium 29 zeigten sich nach 60 Tagen die ersten deutlichen Mangelsymptome (Blattfall, gelbliche Verfärbungen) an den bereits zu Pflanzen konvertierten Embryos. Es erfolgte daher die erste Passage aller Embryos und Pflanzen. Die zweite Passage wurde nach weiteren 45 Tagen durchgeführt. Zuletzt befanden sich die Embryos und Pflanzen 30 Tage auf dem Medium. Demnach erfolgte die Auswertung zur Konversion von Embryos zu Pflanzen nach 135 Tagen auf Medium 29.

Dieser Auswertungszeitpunkt wurde als angemessen gesehen, da bei der Zwischenauswertung am Tag 121 noch deutlich weniger Pflanzen dokumentiert werden konnten. Sehr wahrscheinlich hätten eine weitere Passage und dadurch mehr Wachstumszeit zu einer noch größeren Ausbeute an Pflanzen geführt, dies konnte jedoch aus Zeitmangel nicht verifiziert werden.

3.3.2. Ergebnisse zur Konversion

Nach 135 Tagen auf Medium M29, bei Einhaltung der soeben vorgestellten Passagierzeiträume, zeigte sich in allen Kulturgläsern fortgeschrittenes Wachstum. Der ursprünglich geplante Auswertungsmodus, nämlich eine neuerliche Auszählung und Zuordnung der Embryos in die vorliegenden Reifungsstadien, konnte aufgrund von ausgeprägter sekundärer Embryogenese nicht durchgeführt werden. Abbildung 1 zeigt einen gekeimten Embryo, auf dessen Oberfläche sich sekundäre Embryos gebildet haben.

Die Embryoanzahl wuchs in manchen Kulturgläsern auf bis zu das 20 fache an. Lediglich in Kulturen auf Nährmedien mit 6% Saccharosekonzentration in Kombination mit 10µM ABA ohne TDZ zeigte sich zwar geringe Weiterentwicklung jedoch keine sekundäre Embryogenese.

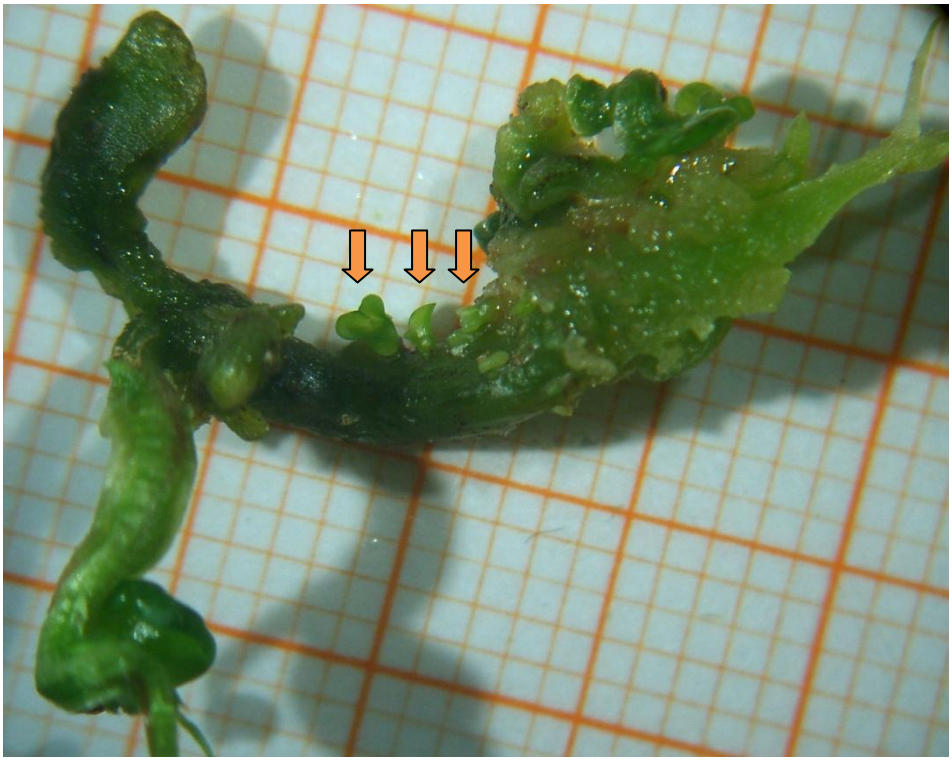

Abbildung 1: Somatischer Embryo mit sekundären Embryos

In 61,1% der Kulturgefäße zeigte sich Pflanzenbildung. Selbst in Kulturgläsern, in denen zum Zeitpunkt der Passage auf Medium M29 keine gekeimten Embryos vorhanden waren, war eine Pflanzenbildung erfolgt. Offenbar hatte auf Medium M29 eine

fortschreitende Reifung von Embryos, die zuvor der Gruppe der weiterentwickelten Embryos zugeordnet worden war, stattgefunden. In Kulturgefäßen, in die keine gekeimten Embryos überführt worden waren, lag der prozentuelle Anteil an gebildeten Pflanzen, bezogen auf die Ansatzmenge, bei 9 %. In Kulturgefäßen, in die bereits gekeimte Embryos passagiert worden waren, lag die Rate bei 20,7%. Jedoch wurde festgestellt, dass nicht alle kultivierten gekeimten Embryos die Konversion zu Pflanzen durchmachten.

Abbildung 2 zeigt eine Auswahl aus Embryos konvertierten Pflanzen.

Abbildung 2: Aus Embryos konvertierte Pflanzen nach 135 Tagen auf Medium 29

Wurde ausschließlich die Thidiazuronkonzentration als ausschlaggebend für die Konversion betrachtet, so ergab sich folgendes Bild: Embryos, die auf TDZ-hältigen Medien induziert worden waren, wiesen eine Konversionsrate von 4,9 ± 1,2 % auf. Embryos, die hingegen auf Thidiazuron-freien Medien induziert worden waren, lagen bezüglich der Konversionrate, die sich im Mittel bei 21,7 ± 7,0 % befand, signifikant höher (vgl. Diagramm 40, S. 56).

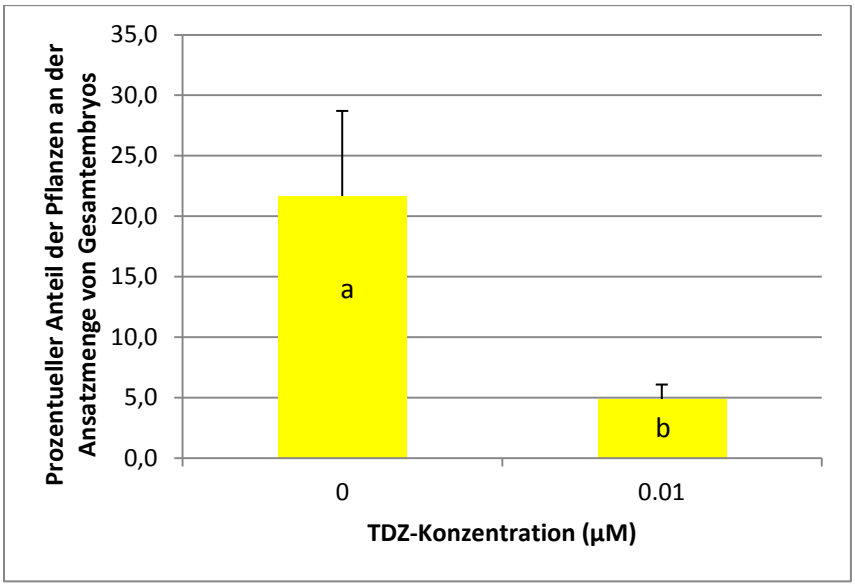

Diagramm 40: Einfluss der Thidiazuronkonzentration auf die Konversion von Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Betrachtet man nun die Ergebnisse für jedes Reifungsmedium (vgl. Tabelle 25, S. 59), so ergibt sich folgendes Bild: Abhängig von der Kombination des Grundmediums mit den ausgetesteten Konzentrationen von Abscisinsäure und Saccharose zeigten auch manche TDZ-hältigen Medien gleich hohe, wenn nicht sogar bessere Konversionsraten als bei Abwesenheit von Thidiazuron. Ob TDZ-freies oder TDZ-hältiges Grundmedium mit einer bestimmten Kombination von Abscisinsäure- und Saccharosekonzentration zu besseren Konversionsraten führte, konnte nur empirisch festgestellt werden.

Korreliert man ausschließlich die Abscisinsäurekonzentration mit der Konversionsrate, so zeigte sich kein signifikanter Einfluss. Während bei 0 bis 1µM ABA die Konversionsrate bei etwa 10 bis 15 % lag, wurden in Medien mit 5µM ABA 25,1 ± 19,0 % der Embryos zu Pflanzen konvertiert (vgl. Diagramm 41, S. 57). Nähere Analysen ergaben, dass die Konversionsrate bei einer ABA-Konzentration von 5µM deswegen im Mittel so hoch liegt, weil auf Medium A5S3 ausschließlich bei Klon 4 die Konversionsrate nicht nur der inkubierten sondern auch der sekundären Embryos sehr hoch lag. Bei Klon 10 bildeten sich auf Medium A5S3 hingegen keine Pflanzen, und bei Klon 11 lag die Konversionsrate bei rund 9%. Insgesamt betrachtet fand man somit keinen signifikanten Vorteil einer Behandlung mit 5µM Abscisinsäure, verglichen mit

den anderen ausgetesteten Konzentrationen. Wie aus Diagramm 41 ersichtlich, brachten Embryos, die auf Medien mit 10µM Abscisinsäure induziert wurden, die wenigsten Pflanzen hervor.

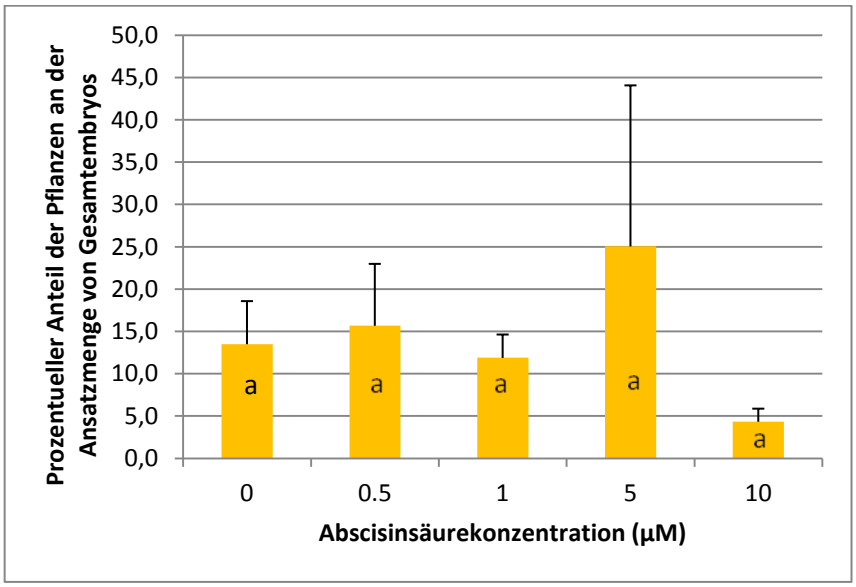

Diagramm 41: Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Konversion von Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Aus Tabelle 25 (S. 59) geht hervor, dass Embryos aus Medien mit 10µM ABA generell niedrige Konversionsraten zeigten. Die Kombination mit höheren Saccharose-konzentrationen wirkte sich noch verstärkend negativ aus. Es konnte jedoch nicht für alle Medien verallgemeinert werden, dass hohe Saccharosekonzentrationen auf jeden Fall zu schlechten Ergebnissen führten.

Die Saccharosekonzentration schien keinen signifikanten Einfluss auf die Konversionsrate zu haben. Auf Medien mit 3% Saccharose lag die Konversionsrate bei 23,7 ± 12,4 %, gefolgt von der auf Medien mit 6% Saccharose mit einem Anteil von 15,7 ± 9,0 %. In den Medien mit 4 und 5 % Saccharose lag die Konversionsrate bei 10,6 ± 1,8 bzw. bei 6,4 ± 1,3 % (vgl. Diagramm 42, S. 58).

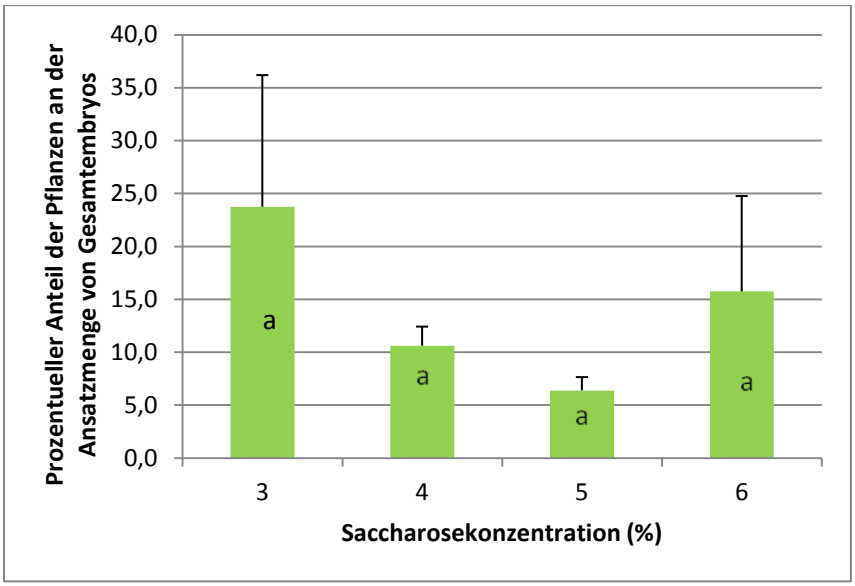

Diagramm 42: Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Konversion von Embryos, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Betrachtete man jedes Medium für sich (vgl. Tabelle 25, S. 59) so zeigte sich, dass die in der Überblicksdarstellung (Diagramm 42) präsentierte recht gute Konversionsrate von Embryos, die in Medien mit 6% Saccharose induziert worden waren, dadurch zustande kam, dass Embryos von Grundmedien ohne TDZ in Kombination mit 0,5µM bzw. ohne Abscisinsäure die maximale Konversionsrate bei 6 % Saccharose hatten. Bei einer Erhöhung der ABA-Konzentration auf 1 bis 10µM in Kombination mit 6% Saccharose im Induktionsmedium konnte keine Konversion zu Pflanzen beobachtet werden. In Grundmedien mit Thidiazuron zeigte sich dieser Effekt nicht so stark.

Der in der Überblicksdarstellung präsentierte positive Effekt der Embryokonversion auf Medien mit 3 % Saccharose war vor allem dadurch bedingt, dass die Konversionsrate der Embryos auf Medium A5S3 extrem hoch lag, verglichen mit den Konversionsraten der Embryos auf den übrigen Medien. Verallgemeinernd kann gesagt werden, dass eine geringe Saccharosekonzentration für gute Ergebnisse bei der Konversionsrate der Embryos umso wichtiger war, je höher die ABA-konzentration im Induktionsmedium gewesen ist. Welche Saccharosekonzentration für eine bestimmte Kombination nun das beste Ergebnis liefert ist nicht abschätzbar und kann nur durch Versuche ermittelt werden. Die exakten Ergebnisse sind der Tabelle 25 (S. 59) zu entnehmen.

Medium	Prozentueller Anteil der Pflanzen an der Ansatzmenge von Gesamtembryos ± Standardfehler	Medium	Prozentueller Anteil der Pflanzen an der Ansatzmenge von Gesamtembryos ± Standardfehler
A0S3	20,3 ± 12,2	TA0S3	5,8 ± 4,3
A0S4	11,6 ± 3,2	TA0S4	3,5 ± 2,4
A0S5	9,9 ± 4,0	TA0S5	8,8 ± 5,5
A0S6	31,8 ± 29,6	TA0S6	2,1 ± 1,1
A0.5S3	8,1 ± 3,8	TA0.5S3	11,6 ± 9,9
A0.5S4	19,6 ± 4,1	TA0.5S4	5,5 ± 4,5
A0.5S5	6,0 ± 3,9	TA0.5S5	2,4 ± 2,4
A0.5S6	70,4 ± 64,8	TA0.5S6	4,8 ± 4,8
A1S3	32,3 ± 11,3	TA1S3	6,5 ± 3,3
A1S4	11,5 ± 3,3	TA1S4	1,0 ± 1,0
A1S5	16,0 ± 2,0	TA1S5	4,3 ± 4,3
A1S6	0,0 ± 0,0	TA1S6	9,0 ± 9,0
A5S3	95,5 ± 91,1	TA5S3	2,7 ± 2,7
A5S4	14,0 ± 4,1	TA5S4	22,1 ± 22,1
A5S5	6,1 ± 3,3	TA5S5	0,0 ± 0,0
A5S6	0,0 ± 0,0	TA5S6	0,0 ± 0,0
A10S3	8,0 ± 8,0	TA10S3	3,0 ± 3,0
A10S4	8,4 ± 6,6	TA10S4	3,0 ± 0,0
A10S5	4,4 ± 2,6	TA10S5	0,0 ± 0,0
A10S6	0,0 ± 0,0	TA10S6	3,8 ± 3,8

Tabelle 25: Prozentueller Anteil gebildeter Pflanzen an der Ansatzmenge von Gesamtembryos

Es konnte kein signifikanter Einfluss des Genotyp auf die Auskeimung von Embryos zu Pflanzen beobachtet werden. Dennoch lag die Konversionsrate bei Klon 4 und Klon 10 mit einem Anteil von circa 18 % fast doppelt so hoch als bei Klon 11 (vgl. Diagramm 43, S. 60).

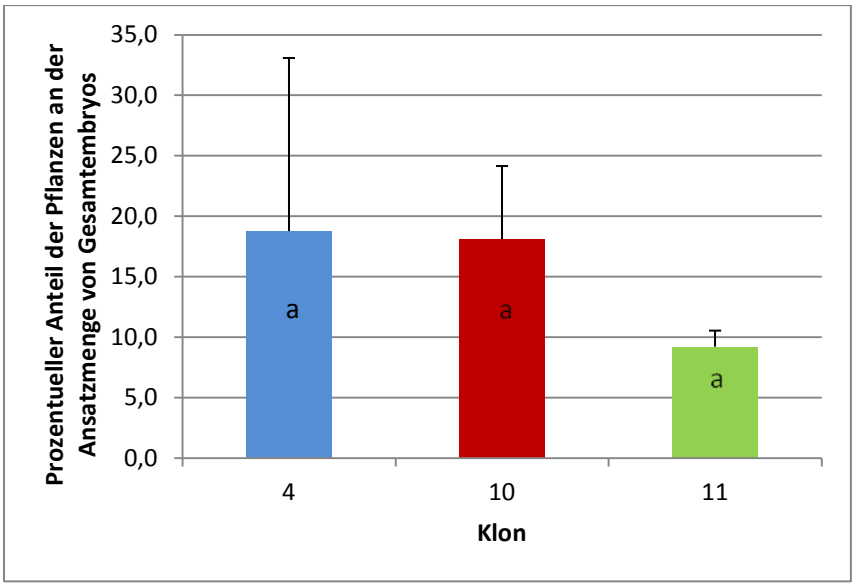

Diagramm 43: Einfluss des Genotyps auf die Konversion von Embryos zu Pflanzen, Darstellung der prozentuellen Anteile, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen zur indirekten somatischen Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L. durchgeführt. Das Hauptaugenmerk lag hierbei in der Untersuchung der Auswirkung von Saccharose, Abscisinsäure und Thidiazuron auf den Reifungsprozess von somatischen Embryos. Da allerdings für wirtschaftliches Arbeiten in der Gewebekultur die Ausbeute an Gesamtembryos eine wichtige Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit auch ermittelt, ob die Testsubstanzen die Induktion von indirekter somatischer Embryogenese fördern können. Fortführend wurde auch die Konversion der Embryos zu Pflanzen beobachtet um auszuschließen, dass die jeweiligen Nährmedien sich negativ auf die Entwicklung der Embryos auswirken und schlussendlich dadurch niedrige Konversionsraten zu Pflanzen resultieren.

Es wurde die Auswirkung der Kultivierung von Kallus auf Nährmedien untersucht, die Saccharose in den Konzentrationen 3, 4, 5 oder 6 %, sowie Abscisinsäure in den Konzentrationen 0, 0,5, 1, 5 oder 10 µM enthielten. Als Grundmedium diente entweder Medium MS, oder Medium MS mit 0,01µM Thidiazuron, da diese beiden Medien in der Vorarbeit von Winter (2009) gute Ergebnisse bei der Embryoinduktion lieferten. Alle möglichen Kombinationen dieser ausgetesteten Faktoren ergaben 40 Medien. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Genotypen durchgeführt.

Der erste Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war die Embryoinduktion. In der Vorarbeit von Winter (2009) gingen sowohl Medium MS als auch Medium MS mit 0,01µM Thidiazuon als die beiden Medien mit der besten Embryoinitiation hervor. Auch Sheibani et al. (2007) hatten schon den positiven Effekt von TDZ bei der Embryoinduktion an Safran gezeigt. Cheong und Pooler (2004) beschrieben jedoch bei *Prunus incisa cv. February Pink* den inhibierenden Einfluss auf die Embryogenese. Da Winter (2009) für *Glycyrrhiza glabra* den positiven Einfluss auf die Initiation gezeigt hat, sollte hier nun untersucht werden, ob dieser Vorteil auch bei Kombinationen von Thidiazuron mit Abscisinsäure und Saccharose besteht.

Auch bezüglich der Auswirkungen der Abscisinsäure auf die Embryoinitiation liegen unterschiedliche Erkenntnisse vor. Tisserat und Murashige (1977) zeigten, dass ABA die

Embryoinitiation hemmte, während Kim et al. (2007) bei *Podophyllum peltatum* L. beschrieben, dass hier Abscisinsäure den alleinigen induzierenden Faktor der Embryogenese darstellte. An *Daucus carota* L. konnte direkte somatische Embryogenese, induziert durch ABA, beobachtet werden (Nishiwaki et al., 2000).

Der dritte ausgetestete Faktor in der vorliegenden Arbeit waren diverse Saccharosekonzentrationen. Das verwendete Kohlenhydrat spielt eine wichtige Rolle bei der somatischen Embryogenese. Cheong und Pooler (2004) zeigten, dass Saccharose sowie Glucose positiv auf die Embryoinduktion wirkten, während die Zuckeralkohole Sorbit und Mannit diesen Effekt nicht aufwiesen. Auch die verwendete Saccharosekonzentration spielte eine wichtige Rolle bei der Embryoinduktion. Während für manche Pflanzen-Spezies bessere Ergebnisse mit niedrigen Saccharose-konzentrationen zu erwarten waren, galt für andere, dass hohe Konzentrationen zu besseren Ergebnissen führten (George, 1993). Winter (2009) zeigte bereits mit ihren Untersuchungen an *Glycyrrhiza glabra*, dass mit 3% Saccharose im Nährmedium Embryoinduktion erzielt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit testeten wir zusätzlich die Auswirkung von 4, 5 und 6 % Saccharose.

Allgemein kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit Nährmedien, die 0,01 µM Thidiazuron enthielten, signifikant weniger somatische Embryos hervorbrachten als Medien ohne TDZ. Bei den TDZ-freien Medien lieferten diejenigen die meisten Gesamtembryos pro g, die 3 % Saccharose enthielten. Erhöhte Konzentrationen konnten bei *Glycyrrhiza glabra* die Embryoinitiation nicht verbessern. Von den Medien ohne TDZ mit 3 % Saccharose lieferten die Medien mit 0, 0,5 und 5 µM Abscisinsäure die besten Ergebnisse bei der Embryoinitiation, und signifikant mehr Gesamtembryos pro g als das Medium mit 10 µM ABA. Die Gesamtembryoanzahl pro g war auf Medium A5S3 mit 108,9 ± 33,8 Embryos am höchsten, gefolgt von den Ergebnissen auf den Medien A0S3 (99,9 ± 16,2 Gesamtembryos pro g) und A0,5S3 (98,0 ± 24,9). Während bei Medien mit 3 % Saccharose die Kombination mit 5 µM Abscisinsäure zur besten Embryoinitiation führte, resultierte in Medien mit 4 und 5 % Saccharose die Kombination mit 1 µM Abscisinsäure in der Bildung der meisten Gesamtembryos pro g. Die Medien mit den besten Ergebnissen bei 4 und 5 % Saccharose lieferten jedoch deutlich weniger Gesamtembryos pro g (A1S4: 87,2 ± 17,1; A1S5: 62,2 ± 10,6) als die

besten Medien mit 3 % Saccharose (Gesamtembryoanzahl pro g: 98,0 und darüber). Erhöhte man die Saccharosekonzentration auf 6 %, so führte die Kombination mit 0 µM ABA zur besten Embryoinitiation mit 43,8 ± 8,7 Gesamtembryos pro g. Aus den eben dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass für eine bestmögliche Embryoinitiation die ABA-Konzentration bei höherer Saccharosekonzentration gesenkt werden sollte. Weiters ist zu erwähnen, dass sich unabhängig von der Zuckerkonzentration die höchsten Gesamtembryoausbeuten immer signifikant von denen auf entsprechenden Medien mit 10 µM Abscisinsäure unterschieden.

Betrachtet man nun wiederum die eben erwähnten Medien, gestaffelt nach deren Abscisinsäuregehalt, so resultierten immer die Kombinationen mit 3 oder 4 % Saccharose in der höchsten Gesamtembryoanzahl. Führte die Kombination mit 4 % Saccharose zur besten Embryoinitiation, so war das Ergebnis bei dem Medium mit 3 % Saccharose nur geringfügig niedriger. Bei allen Abscisinsäurekonzentrationen unterschied sich jedoch die Gesamtembryoanzahl pro g der Kombinationen mit dem besten Ergebnis zumindest immer signifikant von der, die auf Medien mit derselben ABA-Konzentration, jedoch mit 6 % Saccharose, auftrat.

Bezüglich der Medien, mit 0,01 µM Thidiazuron ergab Medium TA1S3 106,1 ± 25,5 Gesamtembryos pro g. In allen anderen Thidiazuron-hältigen Medien betrug die Anzahl an gebildeten Gesamtembryos pro g nicht mehr als rund 60. Somit lagen die Ergebnisse hier generell auf einem niedrigen Niveau und oft auch sehr eng beieinander.

Unabhängig von TDZ schien eine steigende Saccharosekonzentration eine Reduzierung der Abscisinsäurekonzentration für bestmögliche Ergebnisse zu bedingen. Unabhängig von der Abscisinsäurekonzentration führte bei TDZ-hältigen Medien auf jeden Fall eine Saccharosekonzentration von 3 % zur höchsten Gesamtembryoausbeute.

Wie schon aus der Vorarbeit von Winter (2009) bekannt, kann bei der Embryogenese von Süßholz der Genotyp durchaus eine Rolle spielen. In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass die Gesamtembryoanzahl pro g bei den Klonen 10 und 11 im Mittel signifikant höher liegt als bei Klon 4. Dieser führte auf TDZ-hältigen Medien zur geringsten Embryoausbeute. In Kulturgefäßen mit Klon 11

fanden wir auf Medien ohne TDZ signifikant mehr somatische Embryos als auf Medien mit TDZ. Dennoch war hier der Unterschied bei weitem nicht so gravierend wie bei Klon 4. Bei Klon 10 hatte Thidiazuron keinen Einfluss. Bei den ausgetesteten Abscisinsäurekonzentrationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den verwendeten Klonen. Abgesehen von einer Ausnahme führten die verschiedenen Saccharosekonzentrationen bei den Klonen zu keinen signifikanten Unterschieden in der Gesamtembryoanzahl pro g. Bei einer Saccharosekonzentration von 4% entwickelte Klon 4 signifikant weniger Gesamtembryos pro g als Klon 10.

Ein weiterer zu untersuchender Punkt in dieser Arbeit war die Embryoreifung. Diese läuft bei somatischen Embryos während eines kontinuierlichen Wachstumsprozesses ab. Im Vergleich hierzu findet die Entwicklung von zygotischen Embryos in mehreren Stufen statt. Dieser Prozess ist wichtig für eine normale Entwicklung und die Hemmung von frühzeitiger Keimung (Thomas, 1993). Faure et al. (1998) fanden beim Vergleich der Entwicklung von somatischen mit zygotischen Embryos von *Vitis vinifera* in somatischen Embryos zwar einen Anstieg an endogener Abscisinsäure, jedoch konnte keine derart hohe Konzentration, wie sie in den zygotischen Embryos nachzuweisen war, bei den somatischen Embryos detektiert werden. Sie vermuteten, dass dieser Abscisinsäure-Peak unter anderem dafür verantwortlich war, eine frühzeitige Keimung zu unterdrücken. Dass Abscisinsäure abnormale Entwicklung von somatischen Embryos inhibiert und eine frühzeitige Keimung hemmt, wurde bereits 1983 von Ammirato (1983) gezeigt, und konnte auch von Ruduś et al (2006) bestätigt werden.

Auch für osmotisch wirkende Substanzen wurde die Hemmung der frühzeitigen Keimung postuliert (Morris et al., 1990). Gestiegener osmotischer Druck führte zur Stabilisierung von Proteinen und Membranen, wenn die Salzkonzentration oder die Temperatur ungünstig waren, und war somit für die Anpassung an widrige Umweltbedingungen wichtig (Yancey, 1994). Während Wendt dos Santos et al. (2002) an somatischen Embryos von *Araucaria angustifolia* keine entwicklungsfördernde Wirkung durch die Kombination von Abscisinsäure mit einem Osmotikum zeigen konnten, waren somatische Embryos von *Panax ginseng* durch diese Behandlung in

ihrer Struktur besser entwickelt als die aus der Vergleichsgruppe (Langhansová et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht, ob Abscisinsäure in den Konzentrationen von 0, 0,5, 1, 5 und 10 µM in Kombination mit Saccharose in den Konzentrationen 3, 4, 5 sowie 6 % zu Veränderungen im Reifungsverhalten von somatischen Embryos von *Glycyrrhiza glabra* führte. Hierfür wurden die prozentuellen Anteile der globulären, weiterentwickelten sowie gekeimten Embryos von den verschiedenen Medien miteinander verglichen.

Ein dritter variabler Faktor, der auch schon im Hinblick auf die Embryoinitiation untersucht wurde, war das Grundmedium, das entweder TDZ-frei war, oder 0,01 µM dieses Wuchsstoffs enthielt. 70 % der Medien, die kein TDZ beinhielten, resultierten in einer höheren Keimrate als TDZ-hältige Medien. Weitere Einflüsse auf die Embryoreifung durch Thidiazuron konnten nicht verallgemeinert werden.

Variierende Abscisinsäurekombinationen führten nur in speziellen Kombinationen zu signifikanten Unterschieden im Reifungsprozess. Die verschiedenen ausgetesteten Abscisinsäurekonzentrationen führten in TDZ-freien Medien, in Kombination mit einer Saccharosekonzentration von 3 %, zu einem Anteil von 3,5 bis 8,7 % an globulären Embryos. Statistische Unterschiede konnten hier ebenso wenig festgestellt werden wie bei der Keimrate, die zwischen 2,3 und 8,0 % im Mittel lag. In der Versuchsreihe ohne TDZ mit 4 % Saccharose lieferte die Kombination mit 0,5 µM ABA die meisten globulären Embryos mit einem Anteil von 33,5 ± 10,7 % und somit signifikant mehr globuläre Embryos als auf den Medien A0S4 und A10S4. Die mittleren der ausgetesteten ABA-Konzentrationen hemmten somit den Reifungsprozess auf der Stufe der globulären Embryos. Weiters waren signifikante Einflüsse auf den Reifungsprozess auch auf Medien mit 0,01 µM TDZ und wiederum 4 % Saccharose zu erkennen. Der Anteil der globulären Embryos sank hier bei steigender Abscisinsäurekonzentration von 27,5 ± 9,5 % auf etwa 3 %. Verglichen mit der erst oben dargestellten Versuchsreihe ohne TDZ und 4 % Saccharose, führten hier bei der Testreihe mit TDZ und 4 % Saccharose nicht die mittleren (0,5, 1, 5 µM) ausgetesteten ABA-Konzentrationen zu einer Reifungsverzögerung sondern die niedrigsten Konzentrationen (0, 0,5 µM).

Bei der Analyse des Einflusses der ausgetesteten Saccharosekonzentrationen im Rahmen von 3 bis 6 % auf die Entwicklung der somatischen Embryos waren deutlich mehr signifikante Unterschiede zu beobachten. In der Versuchsreihe ohne TDZ und ABA führte eine Saccharoseerhöhung bis 5 % zu einem Anstieg an globulären Embryos bis zu einem Anteil von 18,2 ± 6,3 %. Ein weiterer Saccharoseanstieg auf 6 % ließ den Anteil an globulären Embryos auf 5,2 ± 3,2 % sinken. Bei der Versuchsanordung ohne TDZ mit 0,5 µM Abscisinsäure führte eine Saccharosekonzentration von 4 % zu einem signifikant höherem Anteil (33,5 ± 10,7 %) an globulären Embryos als die anderen ausgetesteten Saccharosekonzentrationen. Bei den Versuchsreihen mit Abscisinsäurekonzentrationen von 1 und 5 µM lieferten jeweils die Medien mit Saccharosekonzentrationen von 4 und 5 % den größten Anteil an globulären Embryos mit je rund 20 %. Bei der Versuchsanordung mit 10 µM Abscisinsäure zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Reifungsverhalten der somatischen Embryos, dennoch war wiederum ein Anstieg des Anteils an globulären Embryos bis zu einer Saccharosekonzentration von 5 % zu beobachten. Zusammenfassend ist somit zu sagen, dass beinahe unabhängig von der Abscisinsäurekonzentration TDZ-freie Medien mit 4 oder 5 % Saccharose den größten Anteil an globulären Embryos hervorbrachten.

Auf TDZ-hältigen Medien spielte die Saccharosekonzentration keine so große Rolle im Reifungsprozess. Lediglich bei 0 sowie 1 µM Abscisinsäure fanden wir auf Medien mit 4 % Saccharose signifikant größere Anteile an globulären Embryos.

Wie in dem vorhergehenden Literaturüberblick dargestellt, wirkten Abscisinsäure und Saccharose nicht nur auf die Reifung von somatischen Embryos, sondern sie konnten auch den Keimungsprozess beeinflussen. In unseren Untersuchungen zeigten sich auf TDZ-freien Medien ohne Abscisinsäure bei allen Saccharosekonzentrationen gekeimte Embryos mit einer Keimrate von 1,3 bis 8 %. Auch wenn die ABA-Konzentration bei 0,5 µM lag, waren bei allen Zuckerkonzentrationen noch gekeimte Embryos zu finden, allerdings lag hier die Keimrate bei 1,3 bis 5,5 %. Erhöhte man die Abscisinsäurekonzentration weiter auf 1, 5 sowie 10 µM so war bei den Medienkombinationen mit 5 oder 6 % Saccharose keine Keimung mehr zu beobachten.

Auf TDZ-hältigen Medien zeigte sich ein leicht anderes Bild. Hier konnten wir auf Medien ohne Abscisinsäure bei allen Saccharosekonzentrationen gekeimte Embryos

mit einem Anteil von 0,6 bis 4,5 % finden. Mit steigender Abscisinsäurekonzentration sank hier die Anzahl an Medien mit den diversen Saccharosekonzentrationen auf denen gekeimten Embryos beobachtet werden konnten. Auf Medien, die TDZ und 10 µM Abscisinsäure enthielten, führte nach 6 Testwochen keine der ausgetesteten Saccharosekonzentrationen zur Bildung von gekeimten Embryos.

Signifikante Unterschiede im Reifungsverhalten, bedingt durch verschiedene Genotypen, konnten nur auf Medium TA0S4 nachgewiesen werden. Kallus des Klon 4 bildete auf diesem Medium signifikant mehr globuläre Embryos als Kallus der anderen beiden Klone.

Weitere Untersuchungen galten der Konversion von somatischen Embryos zu Pflanzen. Hierfür wurden sämtliche weiterentwickelte sowie gekeimte Embryos auf das Medium 29 überführt. Die optimalen Passageabstände verkürzten sich mit jeder Subkultivierung von 60 über 45 auf 30 Tage. Die Konversion von Embryos zu Pflanzen konnte ab Tag 100 beobachtet werden. Zwischen Tag 121 und Tag 135 nahm der Anteil an Pflanzen deutlich zu. Aus Zeitgründen erfolgte die Endauswertung zur Konversion am Tag 135.

Ein weiterer Untersuchungsaspekt war, wie sich der Einfluss durch die verschiedenen ausgetesteten Medien während der Embryoinduktions- und Reifungsphase auf die Konversion der Embryos zu Pflanzen auswirkt. Etienne et al. (1993) zeigten, dass somatische Embryos, die bei 1 µM Abscisinsäure in Kombination mit 120 g/l Saccharose reiften, eine bessere Keimung sowie Konversion zu Pflanzen aufwiesen. Auch Ruduś et al. (2006) zeigten an somatischen Embryos von *Medicago sativa*, dass 20 µM Abscisinsäure im Reifungsmedium als Standard gilt, und dass somatische Embryos mit dieser Vorbehandlung nach Passage auf Medium MS die höchste Keimrate sowie die beste Konversionsrate zu Pflanzen aufwiesen. An somatischen Embryos von *Panax ginseng* beobachteten Langhansovà et al. (2004), dass die Reifungsphase mit ABA und Polyethylenglycol, einem Osmotikum, positiven Einfluss auf die Konversion zeigte. Ohne diese Reifungsphase konnten zwar Pflänzchen generiert werden, diese bildeten jedoch keine Wurzeln aus.

Der Konzentrationsbereich von Abscisinsäure im Reifungsmedium lag in der vorliegenden Arbeit zwischen 0 und 10 µM. Vermutlich hätte sich eine höhere ABA-Konzentration nicht positiv ausgewirkt, da die eigenen Ergebnisse zeigten, dass die Konversionsraten von auf Medien mit 10 µM Absicinsäure induzierten und gereiften Embryos deutlich unter denen lagen, die auf Medien mit niedriger ABA-Konzentration initiiert wurden. Auch bei den Untersuchungen zu Embryoinduktion und Embryoreifung hatten sich schon Kombinationen mit 10 µM ABA als nachteilig herausgestellt. Auch die Kombination mit einer osmotisch wirkenden Substanz, in unserem Fall erhöhte Saccharosekonzentrationen, führte nicht zu besseren Konversionsraten. Gerade das Gegenteil war der Fall: Je höher die Abscisinsäurekonzentration im Reifungsmedium, desto wichtiger war die Kombination mit einer niedrigeren Saccharosekonzentration. Gute Konversionsraten (%) zeigten sich in folgenden Medien: A0S3 (20,3 ± 12,2), A0S6 (31,8 ± 29,6), A0,5S4 (19,6 ± 4,1), A0,5S6 (70,4 ± 64,8), A1S3 (32,3 ± 11,3), A5S3 (95,5 ± 91,1) und TA5S4 (22,1 ± 22,1). Die hohen Standardabweichungen ergaben sich durch die oftmals sehr kleine Stichprobengröße. Weiters ist zu beachten, dass die Keimrate auf manchen Medien durch starke sekundäre Embryogenese sehr hoch war.

Abschließend können folgende drei Medien für das Vermehrungsprotokoll von *Glycyrrhiza glabra* über indirekte somatische Embryogenese empfohlen werden, da auf diesen Medien nicht nur eine sehr gute Embryoinitiation möglich war, sondern auch die dort entstandenen Embryos auf Medium 29 eine hohe Konversionsrate zu Pflanzen aufwiesen.

Medium A5S3 (mittlere Anzahl an gebildeten Gesamtembryos: 108,9 ± 33,8 bei einer Konversionsrate von 95,5 ± 91,1 %), Medium A0S3 (mittlere Anzahl an gebildeten Gesamtembryos: 99,9 ± 16,2 bei einer Konversionsrate von 20,3 ± 12,2 %) und Medium A1S3 (mittlere Anzahl an gebildeten Gesamtembryos: 75,0 ± 17,8 bei einer Konversionsrate von 32,3 ± 11,3 %).

Wegen der derzeit langen Dauer vom Ansetzen des Kallus aufs Induktions – und Reifungsmedium bis hin zur Pflanzenernte, sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, ob eine Verkürzung der Keimungs- und Konversionszeit möglich ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen zur in vitro-Vermehrung des Süßholz (*Glycyrrhiza glabra* L.) über somatische Embryogenese durchgeführt. Ein entsprechend optimiertes Vermehrungsprotokoll würde eine schnelle und genetisch einheitliche Produktion selektionierter Genotypen mit definiertem Glycyrrhizingehalt ermöglichen. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Einfluss von Abscisinsäure (ABA), Saccharose und Thidiazuron (TDZ) auf Bildung, Reifung und Konversion der somatischen Embryos.

Es wurden insgesamt 40 Versuche durchgeführt, um den Einfluss der untersuchten Faktoren auf die Stadien der Embryogenese verifizieren zu können.

Thidiazuron-freie Medien brachten signifikant mehr Gesamtembryos hervor als solche mit 0,01 µM TDZ. Auf Medien mit 3% Saccharose wurden die meisten Gesamtembryos gebildet. Um hohe Induktionsraten von somatischen Embryos zu erzielen, schien eine Verringerung der ABA-Konzentration umso vorteilhafter, je höher die Saccharose-Konzentration im entsprechenden Medium war. Unabhängig von der Saccharosekonzentration lieferten Medien mit 10 µM ABA signifikant weniger somatische Embryos als Medien mit niedrigeren ABA-Konzentrationen.

Die Reifung der somatischen Embryos konnte ebenfalls beeinflusst werden: Beinahe unabhängig von der Abscisinsäurekonzentration ließen sich auf TDZ-freien Medien mit 4 oder 5% Saccharose die größten Anteile an globulären Embryos erzielen.

Bei den Untersuchungen zur Konversion von somatischen Embryos zu Pflanzen hat sich gezeigt, dass zur Erreichung einer guten Konversionsrate eine niedrige Saccharose-Konzentration umso wichtiger ist, je höher die ABA-Konzentration im Medium ist.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass ABA, Saccharose und TDZ bei der somatischen Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* von wesentlicher Bedeutung sind, um ein effizientes Vermehrungsprotokoll zu erstellen.

6. SUMMARY

The present study deals with investigations on the in vitro-propagation of Liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) through somatic embryogenesis. Such an optimized protocol would allow for a rapid and genetically homogeneous production of selected genotypes with a defined content of glycyrrhicin. The focus was on the effects of abscisic acid (ABA), sucrose, and Thidiazuron (TDZ) on the various stages of embryogenesis.

A total of 40 experiments were conducted to elucidate the effects on embryo induction, embryo ripening, and embryo conversion to plants.

TDZ-free media resulted in significantly more total embryos than those with 0.01 µM TDZ. Most embryos were formed on media with 3% sucrose. A lower ABA concentration at higher sucrose levels seemed to be beneficial for embryo induction. However, independently of the sucrose concentration, 10 µM ABA resulted in less somatic embryos than lower ABA levels.

Embryo ripening could be controlled through 4 or 5 % sucrose, with nearly no influence of ABA, resulting in a maximum formation of globular embryos.

Concerning the conversion of somatic embryos to plants, our results indicate that a low sucrose concentration might be essential when ABA levels are high.

We could herewith demonstrate that ABA, sucrose, and TDZ could be essential within the establishment of an efficient micropropagation protocol for Liquorice.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ammirato P. V. (1977), Hormonal Control of Somatic Embryo Development from Cultured Cells of Caraway, Plant Physiol. **59**: 579-586.

Ammirato P. V. (1983), The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: Suspension culture techniques and hormone requirements, Nat. Biotechnol. **1**: 68-74.

Armanini D., Fiore C., Mattarello M.J., Bielenberg J., Palermo M. (2002), History of the endocrine effects of licorice, Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes **110**: 257-61.

Bonga J. M., Klimaszewska K., Lelu M. A., von Aderkas P. (1995), Somatic embryogenesis in Larix, in Jain S., Gupta P., Newton R. (Hrsg.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht v. 3, S. 315-340.

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

Etienne H., Montoro P., Michaux-Ferriere N., Carron M. P. (1993), Effects of Desiccation, Medium Osmolarity and Abscisic acid on the Maturation of *Hevea brasiliensis* Somatic Embryos, J. Exp. Bot. **44**: 1613-1619.

Faure O., Dewitte W., Nougarède A., Van Onckelen H. (1998), Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts, Physiol. Plant. **102**: 591-595.

Fiore C., Eisenhut M., Ragazzi E., Zanchin G., Armanini D. (2005), A history of the therapeutic use of liquorice in Europe, J. Ethnopharmacol. **99**: 317-324.

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

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

Khayyal M.T., Seif-El-Nasr M., El-Ghazaly M.A., Okpanyi S.N., Kelber O., Weiser D. (2006), Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast®) and its components against ulcers and rebound acidity, Phytomedicine **13**: 56-66.

Kim Y. S., Lim S., Choi Y. E., Ramesh Anbazhagan V. (2007), High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Podophyllum peltatum* L., an important source of anticancer drug, Curr. Sci. **92**: 662-666.

Komatsuda T., Lee W., Lka S. (1992), Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybean *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr., Plant Cell Tissue Organ Cult. **28**: 103-113.

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

Langhansová L., Konrádová H., Vaněk T. (2004), Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embyos, Plant Cell Rep. **22**: 725-730.

Morris P. C., Kumar A., Bowles D. J., Cuming A. C. (1990), Osmotic stress and abscisic acid induce expression of the wheat Em genes, Eur. J. Biochem. **190**: 625-630.

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

Nishiwaki M., Fujino K., Yasunori K. Masuda K., Kikuta Y. (2000), Somatic embryogenesis induced b the simple application of abscisic acid to carrot (Daucus carota L.) seedlings in culture, Planta **211**: 756-759.

Prakash M. G., Gurumurthi K. (2010), Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*, Plant Cell Tissue Organ Cult. **100:** 13-20.

Racková L., Jancinová V., Petríková M., Drábiková K., Nosál R., Stefek M., Kostálová D., Prónayová N., Kovácová M. (2007), Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin, Nat. Prod. Res**. 21**: 1234-1241.

Ruduś I., Kępczyńska E., Kępczyński J. (2006), Comparative efficacy of abscisic acid and methyl jasmonate for indirect somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L., Plant Growth Regul. **48**: 1-11.

Sato Y., He J.X., Nagai H., Tani T., Akao T. (2007), Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of Glycyrrhiza ularensis roots, acts in the lower part of intestine, Biol. Pharm. Bull. **30**: 145-149.

Sheibani M., Azghandi A. V., Nemati S. H. (2007), Induction of Somatic Embryogenesis in Saffron Using Thidiazuron (TDZ), Pak. J. Biol. Sci. **10**: 3564-3570.

Thomas T. L. (1993), Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview, Plant Cell **5**: 1401-1410.

Tisserat B., Murashige T. (1977), Repression of asexual embryogenesis in vitro by some plant growth regulators, In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant **13**: 799-805.

Trembly L., Trembly F. (1995), Maturation of black spruce somatic embryos: sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium, Plant Cell Tissue Organ Cult. **42**: 39-46.

Wang Z., Nishioka M., Kurosaki Y., Nakayama T., Kimura T. (1995), Gastrointestinal absorption characteristics of glycyrrhizin from glycyrrhiza extract, Biol. Pharm. Bull. **18**: 1238-1241.

Wendt dos Santos A. L., Silveira V., Steiner N., Vidor M., Guerra M. P. (2002), Somatic Embryogenesis in Parana Pine (Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze), Braz. Arch. Biol. Technol. **45**: 97-106.

Winter M. (2009), Vermehrung von Süßholz über somatische Embryogenese, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Yancey P.H. (1994), Compatible and counteracting solutes, in K. Strange (Hrsg.), Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, CRC Press, Boca Raton, S. 81-109

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Zuname:	Hartl
Vorname:	Doris
Familienstand:	ledig
Nationalität:	Österreich
Geburtsdatum:	01.12.1986
Geburtsort:	3580 Horn

Bildungsweg

1993-1997	Volksschule Eggenburg
1997-2005	Bundesgymnasium Horn
Seit 2005	Studium der Pharmazie an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Diplomarbeit wurden von März bis Dezember 2010 durchgeführt.