



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Untersuchungen zur Reifung und Keimung  
somatischer Embryos von *Glycyrrhiza glabra* L.

Verfasserin

Barbara Weinstabl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp



## **Danksagung**

Allen voran möchte ich Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp für die persönliche Betreuung, das interessante Thema und die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Christoph Wawrosch für die nette und kompetente Betreuung während der Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mir nicht nur mein Studium ermöglicht haben, sondern auch immer an mich geglaubt und stets all meine Entscheidungen unterstützt haben. Ein großer Dank gilt auch meinem Freund Thomas für seine Geduld und seinen Optimismus.

Nicht zuletzt danke ich den Studienkollegen, die mich auf diesem Weg begleitet und mir oft mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.



## ABKÜRZUNGEN

|                 |                    |
|-----------------|--------------------|
| GA <sub>3</sub> | Gibberellinsäure   |
| IAA             | Indolyllessigsäure |
| PEG             | Polyethylenglykol  |
| TDZ             | Thidiazuron        |

MS                    Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962)

MS <sup>1</sup>/<sub>2</sub>                Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962) mit der halben Dosis an  
Makroelementen



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung und Problemstellung .....</b>                      | <b>1</b>  |
| <b>2. Material und Methoden .....</b>                               | <b>5</b>  |
| 2.1. Pflanzenmaterial .....                                         | 5         |
| 2.2. Nährmedien .....                                               | 7         |
| 2.3. Kulturgefäße .....                                             | 10        |
| 2.4. Kulturbedingungen .....                                        | 11        |
| 2.5. Kulturauswertung .....                                         | 11        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>                                          | <b>13</b> |
| 3.1. Untersuchungen zur Etablierung neuer Kalluskulturen .....      | 13        |
| 3.2. Untersuchungen zur Induktion der Embryobildung .....           | 14        |
| 3.2.1. Einfluss von Saccharose .....                                | 15        |
| 3.2.2. Einfluss von Polyethylenglykol .....                         | 16        |
| 3.3.3. Einfluss von Genotyp und Alter der Kalluskulturen .....      | 17        |
| 3.3. Untersuchungen zur Embryoreifung.....                          | 19        |
| 3.3.1. Einfluss von Saccharose .....                                | 22        |
| 3.3.2. Einfluss von Polyethylenglykol .....                         | 23        |
| 3.3.3. Einfluss von Genotyp und Alter der Kalluskulturen .....      | 24        |
| 3.4. Untersuchungen zu Embryokeimung und Konversion .....           | 28        |
| 3.4.1. Einfluss von Gibberellinsäure und Indolylessigsäure .....    | 32        |
| 3.4.2. Einfluss von Saccharose und der Menge an Makroelementen..... | 34        |
| 3.4.3. Einfluss vom Genotyp .....                                   | 36        |
| <b>4. Diskussion .....</b>                                          | <b>37</b> |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>                                     | <b>47</b> |
| <b>6. Summary .....</b>                                             | <b>49</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis .....</b>                                | <b>51</b> |
| <b>Lebenslauf .....</b>                                             | <b>57</b> |



## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

*Glycyrrhiza glabra* L. ist eine sehr gut untersuchte Arzneipflanze, bis heute sind ca. 400 Inhaltsstoffe beschrieben worden (Hänsel und Sticher 2010). Auch ein breites Spektrum an Wirkungen wurde im Laufe der Jahre für Süßholzextrakte oder einzelne Inhaltsstoffe daraus nachgewiesen (Asl und Hosseinzadeh 2008, Isbrucker und Burdock 2006). Im Vordergrund steht hierbei die antiulzerogene und antiphlogistische Wirkung von Glycyrrhizinsäure und Glyzyrrhetinsäure, die eine Anwendung zur Therapie von Magen- und Duodenalgeschwüren sowie Gastritis ermöglicht. Weiters wird die Süßholzwurzel als Expectorans und Sekretolytikum bei Atemwegserkrankungen verwendet. Die Flavonoid-Aglyka Isoliquiritigenin und Liquiritigenin wirken spasmolytisch.

An Bedeutung gewonnen haben in neuerer Zeit die antivirale Wirkung von Glycyrrhizinsäure (Fiore et al. 2005) und die neuroprotektive Wirkung des Isoflavans Glabridin (Yu et al. 2008). In der Lebensmittelindustrie wird Glycyrrhizin als natürlicher Süßstoff verwendet, der eine 50 Mal stärkere Süßkraft als Saccharose aufweist (Blumenthal et al. 2000).

Als häufigste unerwünschte Wirkung bei hohen Dosen oder Langzeitanwendung wird in zahlreichen Studien die Entwicklung eines Pseudoaldosteronismus durch Glycyrrhizinsäure beschrieben (Kato et al. 1995, Akao et al. 1992, Kageyama et al. 1992). Bei deglycyrrhizinierter Süßholzwurzel kommt es nicht zu dieser Entwicklung (Cooke und Baron 1971, Larkworthy und Holgate 1975). Aus diesem Grund sollte bei bestimmten Indikationen, deren Wirkung nicht auf Glycyrrhizinsäure beruht, der Gehalt möglichst gering sein.

Die Methoden der in vitro - Kultivierung ermöglichen uns die Vermehrung von genetisch einheitlichen Pflanzen mit definiertem Inhaltsstoffmuster in kurzer Zeit und großen Mengen. Im Fall von *Glycyrrhiza glabra* L. können so zum Beispiel Genotypen mit einem hohen Gehalt an Glycyrrhizin oder solche mit wenig Glycyrrhizin und hohem Anteil an Flavonoid-Aglyka vermehrt werden. Neben

Nodienkultur (Fursova 2006) kann hier auch der Weg der indirekten somatischen Embryogenese eingeschlagen werden.

In vorangegangenen Arbeiten von Lämmermayer (2007), Kazianka (Diplomarbeit in Vorbereitung), Winter (2009) und Hartl (2012) wurde bereits eine Methode zur Etablierung embryogener Kalluskulturen entwickelt. Zur Embryoreifung wurden Untersuchungen vorgenommen, bei denen der Einfluss verschiedener Substanzen (z.B. Abscisinsäure, Adeninsulfat, Aktivkohle, Thidiazuron), aber auch die Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Embryoentwicklung ausgetestet wurden.

Auf diesen Vorarbeiten aufbauend sollten im Rahmen dieser Diplomarbeit neue Versuche zur Embryoreifung und weiterführend auch zu Keimung der Embryos und Konversion zu Pflanzen durchgeführt werden.

Im Gegensatz zur stufenweisen Entwicklung bei zygotischen Embryos ist für somatische Embryos ein kontinuierliches Wachstum charakteristisch. Im zygotischen Embryo kommt es während der späten Phase der Embryoreifung zur Austrocknung und zum Entwicklungsstillstand, was die Grenze zwischen Embryoreifung und -keimung darstellt (Thomas 1993). Polyethylenglykol wird als Osmotikum verwendet, um bei somatischen Embryos eine Austrocknungsphase zu erzielen, wie sie auch während der zygotischen Embryoentwicklung vorkommt. Polyethylenglykol-Moleküle sind zu groß, um in die Zellen zu diffundieren, und wirken somit als nicht-penetrierendes Osmotikum, das keine Plasmolyse auslöst. Denchev et al. (1991) berichteten eine verbesserte Reifung somatischer Embryos von *Medicago falcata* durch Zusatz von Polyethylenglykol, genauso wie Maruyama (2009) dies für *Swietenia macrophylla* und Walker und Parrott (2001) für *Glycine max* zeigten.

Saccharose dient in der in vitro- Kultivierung zum einen als Energie- und Kohlenstoffquelle, wird aber ebenfalls als Osmotikum eingesetzt. Die benötigte Saccharose-Konzentration ist speziesspezifisch (George et al. 2008). Nachdem sich die Diplomarbeit von Hartl (2012) bereits mit Untersuchungen zur Erhöhung von Saccharose bei somatischen Embryos von *Glycyrrhiza glabra* beschäftigt hat, wurden

in dieser Arbeit vor allem Versuche mit niedrigen und wechselnden Saccharose-Konzentrationen durchgeführt, wodurch schon bei Prakash und Gurumurthi (2009) und Komatsuda et al. (1992) positive Effekte auf Embryoreifung und -keimung erzielt wurden.

Gibberellinsäure ist ein Wuchsstoff, der meistens eine hemmende Wirkung auf die Embryogenese hat (George 1993). In einigen Fällen wurde es allerdings auch mit Erfolg verwendet, um die Embryo-keimung und auch die Konversion zur Pflanze zu fördern (Kim et al. 2007, Kuo et al. 2002, Nadolska-Orczyk 1992). Zur Stimulation des Wurzelwachstums und einer Begünstigung der Embryo-keimung wird Gibberellinsäure häufig in Kombination mit dem Auxin Indolylessigsäure eingesetzt (George 1993).

Zusammengefasst war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen der Osmotika Polyethylenglykol und Saccharose sowie der Wuchsstoffe Gibberellinsäure und Indolylessigsäure auf Embryobildung, Embryoreifung, Embryo-keimung und der Konversion von Embryos zu Pflanzen im Rahmen somatischer Embryogenese von *Glycyrrhiza glabra* L. zu untersuchen. Im Zuge der Embryoreifung sollten dafür trockenstress-auslösenden Osmotika, wie Polyethylenglykol 4000 und wechselnde Saccharose-Konzentrationen, in embryogenen Kalluskulturen auf MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962) eingesetzt werden. Darauf folgend sollten zur Embryo-keimung diverse Gibberellinsäure-Konzentrationen kombiniert mit Indolylessigsäure-Konzentrationen in MS-Medium sowie niedrige Saccharose-Konzentrationen in MS - und MS <sup>1</sup>/<sub>2</sub> - Medien getestet werden.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Versuche dienten einerseits bereits etablierte Kalluskulturen von *Glycyrrhiza glabra* L., die im Oktober 2009 angelegt wurden und welche schon in der Vorarbeit von Hartl (2012) eingesetzt wurden. Die Kalluslinien wurden auf MS-Medium mit 1  $\mu$ M TDZ erhalten und alle 3 Wochen auf frisches Medium passagiert.

Um die Auswirkung des Alters der Kalluskultur auf Embryobildung und -reifung zu untersuchen und gleichzeitig bereits zu Beginn der Embryogenese einen Versuch mit niedriger Saccharose-Konzentration zu starten, wurden andererseits auch neue Kalluslinien angelegt.

Hierfür wurden Samen verwendet, die 2006 von einer Süßholzstaude aus dem Arzneipflanzengarten des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien geerntet worden waren. Die Samen wurden sterilisiert, gekeimt und anschließend an Kotyledonenexplantaten embryogener Kallus initiiert, der das Ausgangsmaterial für einen Teil der Untersuchungen zur indirekten somatischen Embryogenese lieferte.

#### Oberflächensterilisation der Samen

Die Samen wurden für die Sterilisation gemeinsam mit kleinen Glaskugeln in ein Säckchen aus Gaze gefüllt und verschlossen. Die Sterilisation erfolgte in einem mit Alufolie abgedeckten Kunststoffbecherglas. Die Behandlung startete mit 30 proz. Ethanol. Nach 10 Minuten wurde das Ethanol abgegossen und die Samen mit einer 20 prozentigen Natriumhypochloridlösung (W. Neuber's Enkel GmbH, 14 % aktiver Chlorgehalt in der konzentrierten NaOCl - Lösung) mit einem Tropfen Tween 20 übergossen. Für 35 Minuten Einwirkzeit blieb der Behälter unter Rühren auf einem Magnetrührer in der sterilen Werkbank. Abschließend wurden die Samen mit zuvor autoklaviertem Wasser gespült. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Nach dem ersten Spülen wurde das Wasser sofort abgegossen und die Samen danach noch drei Mal für 10 Minuten gewaschen.

### Samenkeimung

Die Keimung erfolgte in Petrischalen auf MS  $^{1/2}$  - Medium mit 3 % Saccharose für 7 Tage im Licht (16 h - Photoperiode), wie sich in den Vorarbeiten von Winter (2009) und Lämmermayer (2007) bewährt hatte.

### Kallusinitiation

Nach 7 Tagen wurden von den Keimlingen Kotyledonenexplantate gewonnen. Hierzu wurden aus den Kotyledonen quer zur Mittelrippe Stücke mit 3 - 4 mm Seitenlänge herausgeschnitten. Diese Explantate sollten an allen Seiten Schnittflächen aufweisen, damit sich Kallusgewebe entwickeln konnte.

Die Kotyledonenexplantate von je 20 Keimlingen wurden mit der Blattunterseite auf die Kallusinduktionsmedien TDZ1 und TDZ2 (vgl. Tabelle 3, S. 9), die sich in ihrer Saccharose-Konzentration unterschieden, gelegt. Nach 3 Wochen wurden die Explantate gemeinsam mit dem gebildeten Kallus auf frisches Medium überimpft und weitere 3 Wochen kultiviert. Innerhalb dieser Zeit hatte sich genug Kallus gebildet, um ihn von den Kotyledonenexplantaten zu trennen und auf Medium TDZ1 zu vermehren.

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede, die aufgrund von genetischen Eigenheiten der einzelnen Individuen auftreten können, wurden sowohl von den Kalluskulturen aus dem Jahr 2009 als auch vom neuen Kallusmaterial jeweils drei verschiedene Linien für die Versuche ausgewählt. Um Vergleiche mit den Ergebnissen von Hartl (2012) anstellen zu können, wurden bei den Kalluslinien von 2009 dieselben Klonlinien wie in der vorangegangenen Arbeit verwendet.

Da die Embryos, die bei den Versuchen zu Embryobildung und -reifung erhalten wurden, als Ausgangsmaterial für die Tests zur Embryokeimung dienen sollten, musste bereits zu Beginn ein ausreichend großer Versuchsansatz gemacht werden. Somit wurden pro Embryokeimungs-Versuchsmedium (vgl. Tabelle 4, S. 10) und Genotyp je 5 Petrischalen mit 4 Kallusexplantaten angesetzt. Das Animpfgewicht wurde pro Explantat bestimmt und sollte ca. 70 mg betragen.

Die Tabelle 1 gibt eine bessere Übersicht über den Versuchsaufbau und das jeweilige Ausgangsmaterial der einzelnen Untersuchungen.

**Tabelle 1:** Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau der vorliegenden Diplomarbeit

| Versuch                   | Embryoreifung<br>(Phase II)                                                                                                                                                                                                                  | Embryokeimung                                                                                            |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                         | MS + 30 g/l Saccharose<br>(2 x 3 Wochen)                                                                                                                                                                                                     | MS + Ga <sub>3</sub> : 0/1/5/10 µM<br>+ IAA: 0/5 µM                                                      |
| 2 a                       | MS + 5 % PEG 4000<br>(2 x 3 Wochen)                                                                                                                                                                                                          | MS + Ga <sub>3</sub> : 0/1/5/10 µM<br>+ IAA: 0/5 µM                                                      |
| 2 b                       | MS + 10 % PEG 4000<br>(2 x 3 Wochen)                                                                                                                                                                                                         | MS + Ga <sub>3</sub> : 0/1/5/10 µM<br>+ IAA: 0/5 µM                                                      |
| 3                         | MS + 30 g/l Saccharose<br>(2 Wochen)<br>MS + 60 g/l Saccharose<br>(4 Wochen)                                                                                                                                                                 | MS + 30 g/l Saccharose<br>MS + 10 g/l Saccharose<br>½ MS + 30 g/l Saccharose<br>½ MS + 10 g/l Saccharose |
| 4<br>neue<br>Kalluskultur | <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Kallusinduktion:</b> MS + 1 µM TDZ + 5 od. 30 g/l Saccharose<br/>(3 x 3 Wochen)</li><li>• <b>Embryoreifung:</b> MS + 30 g/l Saccharose (2 Wochen)<br/>MS + 60 g/l Saccharose (4 Wochen)</li></ul> |                                                                                                          |

## 2.2. Nährmedien

Die von Murashige und Skoog (1962) entwickelte MS-Rezeptur wurde als Basisnährmedium für alle Versuche eingesetzt.

### Herstellung der Nährmedien

Zu Beginn wurden etwa zwei Drittel der benötigten Menge an destilliertem Wasser in einem Erlenmeyerkolben am Magnetrührer vorgelegt. Zunächst wurden Saccharose (in Form von Haushaltszucker) und Myo-Inositol darin gelöst. Dann erfolgte die Zugabe von Makroelementen, Vitaminen und Spurenelementen in Form von Stammlösungen. Es wurde mit destilliertem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt und im Anschluss mit HCl oder KOH der pH-Wert auf  $5,7 \pm 1$  eingestellt.

Die Medien TDZ1 (vgl. Tabelle 3, S. 9) für Kalluserhaltung und -vermehrung und MS  $1/2$  (vgl. Tabelle 4, S. 10) für die Embryokonversion zur Pflanze wurden in Hipp®-Gläser abgefüllt, mit Magenta B® Caps verschlossen und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Der Gelbildner Gelrite® (3 g/l, Carl Roth GmbH + Co. KG) wurde vor dem Auffüllen auf das Endvolumen portionsweise in der Nährlösung suspendiert.

Die übrigen Medien wurden für die Versuche in Petrischalen gegossen. Hier wurde Gelrite® je nach benötigter Menge an Medium in 500 oder 1000 ml SCHOTT DURAN® Flaschen vorgelegt und mit 250 bzw. 500 ml der fertigen Nährlösung aufgegossen. Die Flaschen wurden für 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Direkt nach dem Autoklavieren kamen die Medien in einen auf 60 °C temperierten Wärmeschrank, um einerseits ein vorzeitiges Erstarren der Medien zu verhindern und andererseits eine geeignete Temperatur zu erreichen, um thermolabile Wachstumsstoffe (z.B. Gibberellinsäure) hinzuzufügen. Schließlich wurden die Medien in der sterilen Werkbank in die entsprechenden Petrischalen gegossen.

Die Wachstumsstoffe Indolylessigsäure und Thidiazuron konnten problemlos in Form von Stammlösungen in die Nährmedien gegeben und mitautoklaviert werden.

Auch das Osmotikum Polyethylenglykol für die Medien PEG5 und PEG10 (vgl. Tabelle 3, S. 9) wurde der Nährlösung vor dem Autoklavieren und vor dem Auffüllen auf das Endvolumen hinzugefügt.

Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>) für die Keimungsmedien (vgl. Tabelle 4, S. 10) konnte wegen seiner Hitzelabilität nicht autoklaviert werden. Deshalb wurde eine Stammlösung mit pH  $5,7 \pm 1$  hergestellt. In der sterilen Werkbank wurde die Stammlösung direkt vor dem Gießen der Petrischalen steril filtriert (Porengröße 0,22 µm) und danach in die autoklavierten und auf 60 °C abgekühlten Medien pipettiert.

**Tabelle 2:** Überblick über verwendete Zusätze und Wuchsstoffe in den Nährmedien

| Verwendete Zusätze und Wuchsstoffe |                                                              |                |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| Abkürzung                          | Chemische Bezeichnung                                        | Hersteller     |
| PEG 4000                           | Polyethylenglykol                                            | AppliChem      |
| IAA                                | 3-Indolylessigsäure                                          | EGA-Chemie     |
| GA <sub>3</sub>                    | Gibberellinsäure A <sub>3</sub>                              | Fluka          |
| TDZ                                | Thidiazuron<br>(N-Phenyl-N'-1,2,3-Thiadiazol-5-yl-Harnstoff) | Riedel-de Haën |

**Tabelle 3:** Überblick über verwendete Medien für Kallusinduktion, Embryobildung und -reifung auf der Basis von MS-Medium

| Bezeichnung | Thidiazuron<br>(μM) | Polyethylenglykol<br>(%) | Saccharose<br>(g/l) |
|-------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| TDZ1        | 1                   | 0                        | 30                  |
| TDZ2        | 1                   | 0                        | 5                   |
| PEG5        | 0                   | 5                        | 30                  |
| PEG10       | 0                   | 10                       | 30                  |
| MS0, OS30   | 0                   | 0                        | 30                  |
| OS60        | 0                   | 0                        | 60                  |

**Tabelle 4:** Überblick über verwendete Keimungsmedien auf der Basis von MS-Medium

| Bezeichnung               | Gibberellinsäure<br>( $\mu\text{M}$ ) | Indolylessigsäure<br>( $\mu\text{M}$ ) | Saccharose<br>(g/l) |
|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|---------------------|
| G0I0                      | 0                                     | 0                                      | 30                  |
| G1I0                      | 1                                     | 0                                      | 30                  |
| G5I0                      | 5                                     | 0                                      | 30                  |
| G10I0                     | 10                                    | 0                                      | 30                  |
| G0I5                      | 0                                     | 5                                      | 30                  |
| G1I5                      | 1                                     | 5                                      | 30                  |
| G5I5                      | 5                                     | 5                                      | 30                  |
| G10I5                     | 10                                    | 5                                      | 30                  |
| 0S30                      | 0                                     | 0                                      | 30                  |
| 0S10                      | 0                                     | 0                                      | 10                  |
| 1/2S30 , MS $\frac{1}{2}$ | 0                                     | 0                                      | 30                  |
| 1/2S10                    | 0                                     | 0                                      | 10                  |

## 2.3. Kulturgefäße

Für Samenkeimung und Kallusinitiation wurden sterile Petrischalen (100x15 mm) verwendet, die mit 30 ml Nährmedium befüllt wurden.

Kalluserhaltung und -vermehrung erfolgte auf 40 ml Medium in kleinen Hipp®-Gläsern (h: 7 cm), die mit Magenta B® Caps verschlossen wurden.

Die Versuche zur Bildung, Reifung und Keimung von somatischen Embryos wurden anfangs in kleinen Kunststoffpetrischalen (60x15 mm) mit 15 ml Testmedium und nach einigen Wochen aufgrund der Größenzunahme der Explantate in den größeren Petrischalen (100x15 mm) mit 30 ml Medium durchgeführt.

Die Konversion zu Pflanzen erfolgte in höheren Hipp®-Gläsern (h: 12,5 cm) mit 40 ml Nährmediumfüllung.

Alle Petrischalen und Hipp®-Gläser wurden mit Parafilm®M versiegelt.

## 2.4. Kulturbedingungen

Alle Kulturen wurden den gleichen Kulturbedingungen ausgesetzt, einer konstanten Temperatur von  $25 \pm 1$  °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 %.

Die Induktion, Erhaltung und Vermehrung der Kalluskulturen erfolgte unter Lichtausschluss und die Kulturen wurden alle drei Wochen auf frisches Nährmedium überimpft, wie sich in vorangegangenen Arbeiten Lämmermayer (2007) und Winter (2009) bewährt hatte.

Die anderen Kulturen wurden einem 16 h - Tag ausgesetzt, wobei das notwendige Licht dafür SYLVANA Gro-Lux Leuchtstoffröhren mit einer Lichtintensität von  $45 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  lieferten.

Im Rahmen der Versuche zur Embryobildung und Keimung wurden die Kulturen alle drei Wochen passagiert. Eine Ausnahme bildeten dabei die Untersuchungen zu den wechselnden Saccharose-Konzentrationen. Hier fand die erste Passage der Explantate von Medium OS30 auf Medium OS60 (vgl. Tabelle 3 , S. 9) nach zwei Wochen statt, während die folgende Kulturpassage vier Wochen betrug.

Die Keimungsmedien wurden jeweils alle fünf Wochen erneuert, und nach insgesamt zehn Wochen unter Keimungsbedingungen wurden die Embryos auf MS  $1/2$  - Medium transferiert, um die Konversion zu Pflanzen zu begünstigen.

## 2.5. Kulturauswertung

### Embryoinduktion und Embryoreifung

Die Auswertung der Versuche zur Embryoinitiation und -reifung wurde nach sechs Wochen durchgeführt. Für jedes einzelne Explantat wurde die Anzahl der gebildeten somatischen Embryos gezählt. Wie in den Vorarbeiten von Hartl (2012) und Winter (2009) wurde zwischen globulären, weiterentwickelten und gekeimten Embryos differenziert. Die Erfassung dieser Ergebnisse erfolgte mittels einer Stereolupe in der Sterilwerkbank. Zur statistischen Auswertung wurden die Werte auf das anfangs bestimmte Animpfgewicht bezogen (Embryos pro Animpfgewicht).

### Embryokeimung und Konversion

Nach zehn Wochen auf Keimungsmedium und anschließenden fünf Wochen auf MS  $^{1/2}$  - Medium wurden nach insgesamt 110 Tagen die Pflanzen bzw. Keimlinge gezählt, die sich gebildet hatten. Zu diesem Zeitpunkt war es aufgrund der großen Zahl vor allem sekundärer Embryos, die sich gebildet hatten, nicht mehr möglich die gebildeten Embryos mit einzubeziehen. Die Bewertung erfolgte nach makroskopischen Gesichtspunkten.

### Statistische Auswertung

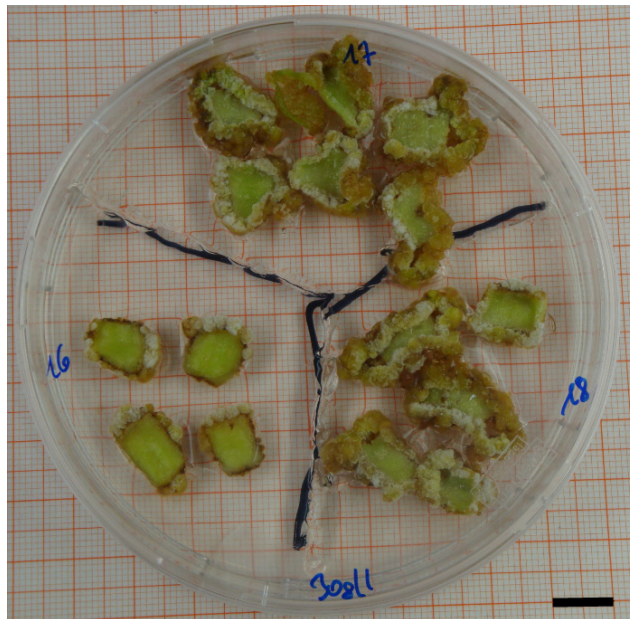
Für die statistische Bewertung wurde das Programm Statistica (StatSoft, Inc., Version 6) verwendet. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts bestimmt. Um zu analysieren ob signifikante Divergenzen zwischen den Ergebnissen bestehen, wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von 0,05 durchgeführt. Ebenso wurde der multiple Spannweitentest nach Duncan zur Datenanalyse herangezogen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Untersuchungen zur Etablierung neuer Kalluskulturen

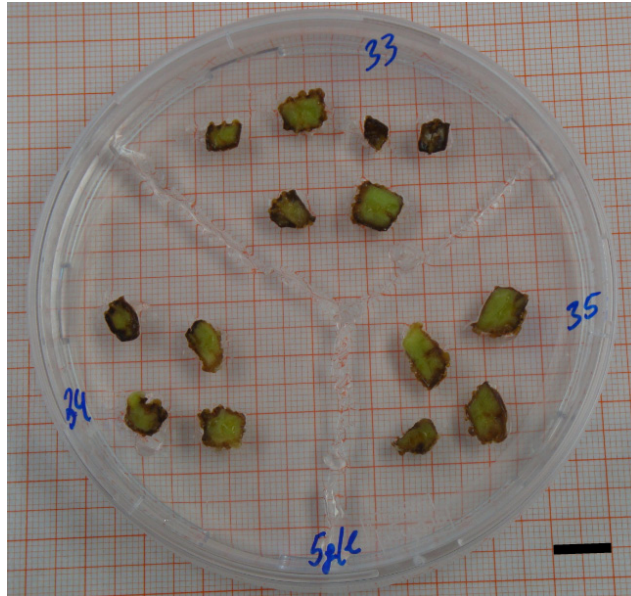
Neue Kalluskulturen wurden angelegt, um einerseits Vergleiche zu bereits bestehenden Kalluslinien anstellen zu können, und um andererseits die möglichen Auswirkungen einer veränderten Saccharose-Konzentration auf Kallusbildung und spätere Embryoentwicklung in dieser frühen Phase der Kallusinitiation zu untersuchen. Zur Induktion von Kallus wurden die Medien TDZ1 und TDZ2 (vgl. Tabelle 3 , S. 9) ausgetestet.

Nach 42 Tagen auf TDZ1 - Medium hatte sich ausreichend Kallus gebildet (vgl. Abbildung 1), sodass die Reste der Kotyledonen entfernt und das Kallusgewebe alleine weitervermehrt werden konnte.



**Abbildung 1:** Bildung von Kallusgewebe an Kotyledonen-Explantaten nach 42 Tagen auf Medium TDZ1, Balken = 1 cm

Auf Medium TDZ2 hingegen war nach 42 Tagen kaum Kallusbildung zu erkennen und die Ränder der Kotyledonenexplantate hatten sich dunkel verfärbt (vgl. Abbildung 2, S. 14). Die Explantate wurden daraufhin für weitere 21 Tage auf Medium TDZ2 belassen. Die Kallusbildung konnte dadurch aber nicht verbessert werden.



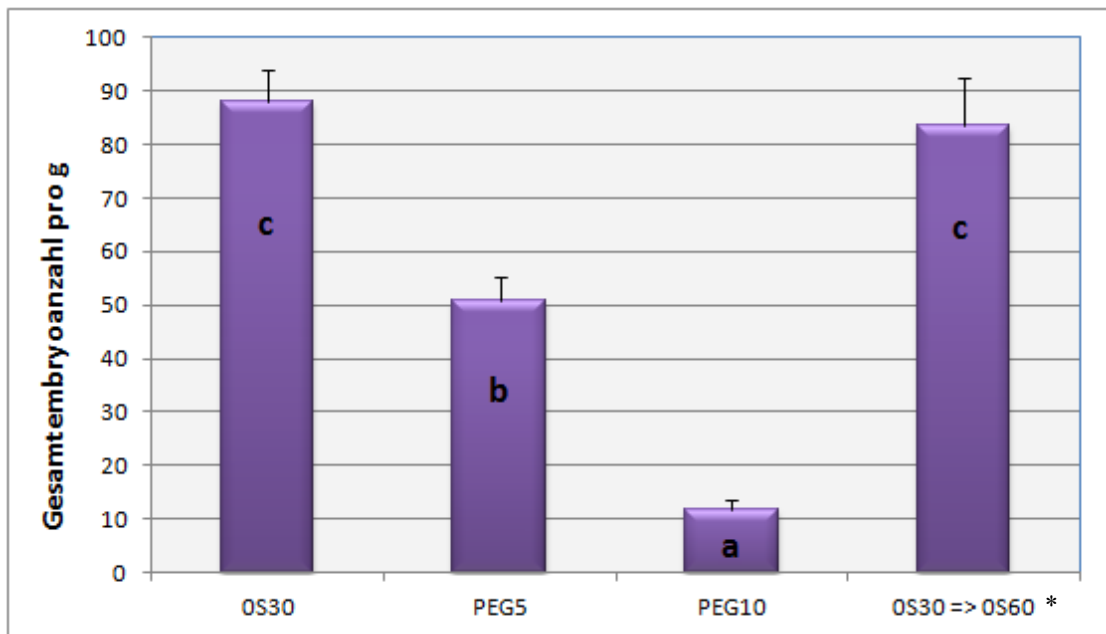
**Abbildung 2:** Minimale Bildung von Kallusgewebe an Kotyledonen-Explantaten nach 42 Tagen auf Medium TDZ2, Balken = 1 cm

Nachdem sich auf Medium TDZ2 auch nach 63 Tagen nicht ausreichend Kallusgewebe für eine Weitervermehrung gebildet hatte, wurden die Versuche mit den neuen Kalluslinien ausschließlich mit Linien durchgeführt, die auf Medium TDZ1 induziert worden waren. Hierfür wurden Klon 6, 18 und 110 ausgewählt.

### 3.2. Untersuchungen zur Induktion der Embryobildung

Als Medien für die Embryobildung und -reifung wurden MS-Medien mit verschiedenen Konzentrationen der Osmotika Saccharose und Polyethylenglykol ausgetestet (OS30, PEG5, PEG10 und ein Wechsel von OS30 auf OS60; vgl. Tabelle 3, S. 9). Alle Versuche wurden mit drei Klonen des bestehenden Kallusmaterials von 2009 durchgeführt (Klon 4, 10 und 11). Um Rückschlüsse über den Einfluss des Kallus-Alters auf Bildung und Reifung von Embryos ziehen zu können, wurde der Versuch mit den wechselnden Saccharose-Konzentrationen ebenfalls mit drei Klonen der neuen, 2010 initiierten Kalluskultur gemacht. Nach sechs Wochen Kultivierung erfolgte die Auswertung. Zur Bewertung der Embryoinitiation wurde die „Gesamtembryoanzahl“ herangezogen, die durch die Anzahl aller gebildeten Embryos ohne Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Entwicklungsstadien definiert wurde.

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die Einflüsse der osmotischen Faktoren, der Genotypen und des Alters unabhängig voneinander erörtert. Zuvor soll Abbildung 3 eine allgemeine Übersicht über alle eingesetzten Nährmedien liefern und versuchsübergreifende Vergleiche ermöglichen.



**Abbildung 3:** Einfluss der verschiedenen Nährmedien auf die gebildete Gesamtembryoanzahl, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Werte mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )  
\* 2 Wochen auf Medium OS30, gefolgt von 6 Wochen auf OS60

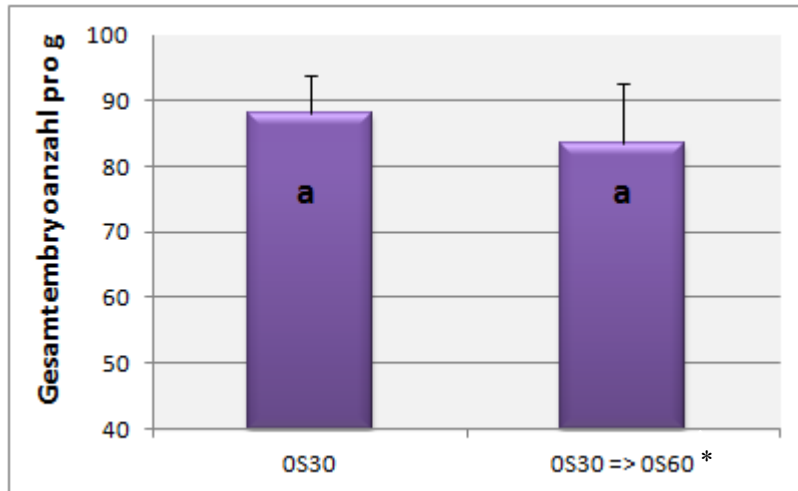
Auffallend war, dass auf beiden Medien mit Polyethylenglykol signifikant weniger Embryos gebildet wurden als auf den Medien mit Saccharose als Osmotikum. Die Embryobildung nahm mit steigender Polyethylenglykol-Konzentration stark ab.

### 3.2.1. Einfluss von Saccharose

Es kamen zwei MS-Medien mit unterschiedlichen Saccharose Konzentrationen zum Einsatz. Als Referenz wurde Medium OS30 verwendet, das die gängige Menge von 30 g/l Saccharose enthält. Um einen osmotischen Effekt zu erzielen, wurde nach zwei Wochen Kultivierung bei 30 g/l zum Medium OS60 gewechselt, das 60 g/l Saccharose enthielt. Diese Kombination hatte schon bei Komatsuda et al. (1992) positive Effekte auf das Frischgewicht somatischer Embryos gezeigt.

## Ergebnisse

Die Abbildung 4 zeigt, dass sich bei beiden Versuchen annähernd gleich viele Embryos gebildet hatten. Es entstand kein signifikanter Unterschied durch die Passage der Kulturen von Medium mit 30 g/l zu 60 g/l Saccharose.



**Abbildung 4:** Einfluss der Saccharose-Konzentration auf die gebildete Gesamtembryoanzahl, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

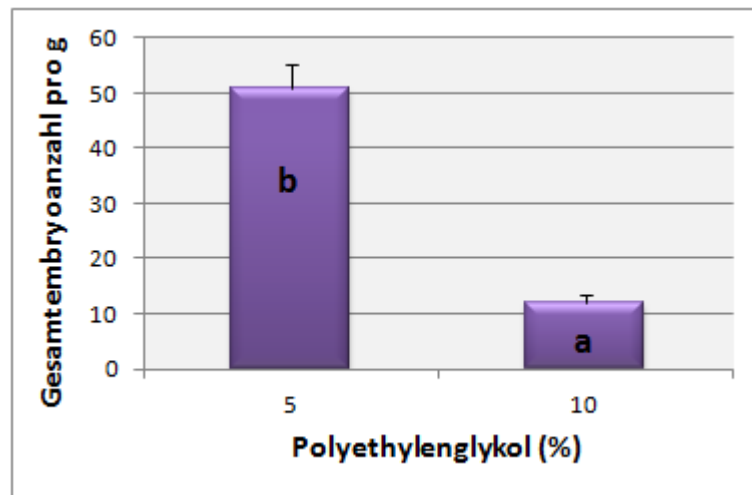
\* 2 Wochen auf Medium OS30, gefolgt von 6 Wochen auf OS60

### 3.2.2. Einfluss von Polyethylenglykol

Polyethylenglykol dient bei der somatischen Embryogenese als trockenstress-auslösendes Osmotikum, das die Reifung und Keimung der Embryos beschleunigen soll. In der vorliegenden Arbeit wurde embryogener Kallus für sechs Wochen auf MS-Medium, das mit 5 und 10 % Polyethylenglykol versetzt war, kultiviert. Bei der Auswertung der Embryobildung hat sich gezeigt, dass Kulturen auf Medien mit Polyethylenglykol die signifikant niedrigste Anzahl an Embryos aufwiesen. Auf Medium, das 5 % Polyethylenglykol enthielt, hatten sich um 40% weniger Embryos gebildet als auf unverändertem MS-Medium. Bei einer Konzentration von 10 % Polyethylenglykol war die Gesamtembryoanzahl um ein Vielfaches niedriger (vgl. Abbildung 5, S. 17).

Charakteristisch für die Kultivierung auf Medien mit Polyethylenglykol war das stark verringerte Kalluswachstum unter diesen Bedingungen. Der Kallus nahm durchgehend eine dunkelbraune Färbung an. Häufig bildeten sich kreisförmig um die Explantate Bereiche, in denen sich das Medium braun gefärbt hatte. Bei 10 % Polyethylenglykol war dieser Effekt stärker zu erkennen als bei 5 % Polyethylenglykol, was sich durch die steigende osmotische Aktivität erklären lässt. Beim Auszählen der

Embryos unter der Stereolupe war auffallend, dass sich durchaus mehr Embryos gebildet hatten, als ausgewertet werden konnten. Es waren Embryos zu erkennen, die stark braun gefärbt waren und eine weiche Konsistenz aufwiesen. Diese wurden bei der Gesamtembryoanzahl nicht berücksichtigt.



**Abbildung 5:** Einfluss von Polyethylenglykol auf die gebildete Gesamtembryoanzahl, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

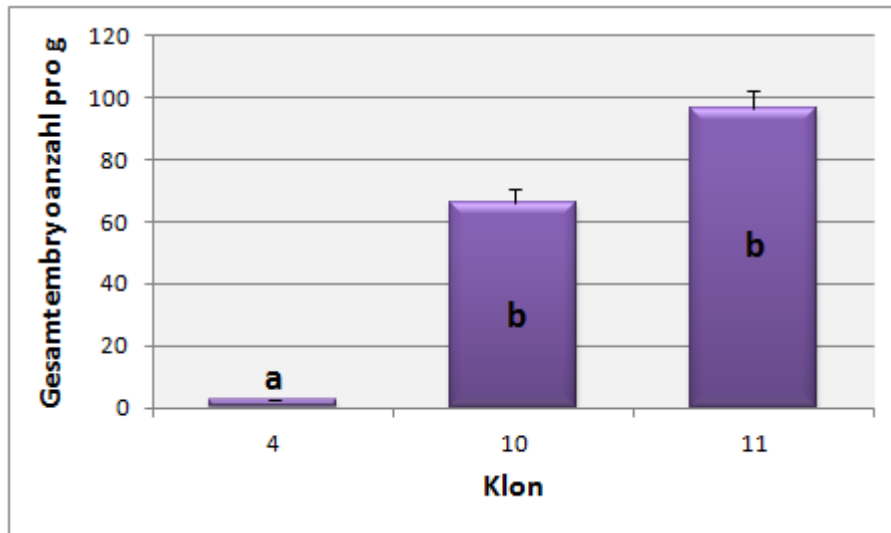
### 3.2.3. Einfluss von Genotyp und Alter der Kalluskulturen

Um potenzielle Auswirkungen des Genotyps auf die Embryobildung zu testen, wurden alle Versuche mit denselben drei Linien durchgeführt. Damit Vergleiche mit der Vorarbeit angestellt werden konnten, wurden dieselben drei Klone wie bei Hartl (2012) ausgewählt.

Der Einfluss des Alters der Kalluskulturen auf die Initiation von Embryos konnte untersucht werden, indem ein Versuch zusätzlich mit drei Klonen der neu etablierten Kalluslinie gemacht wurde.

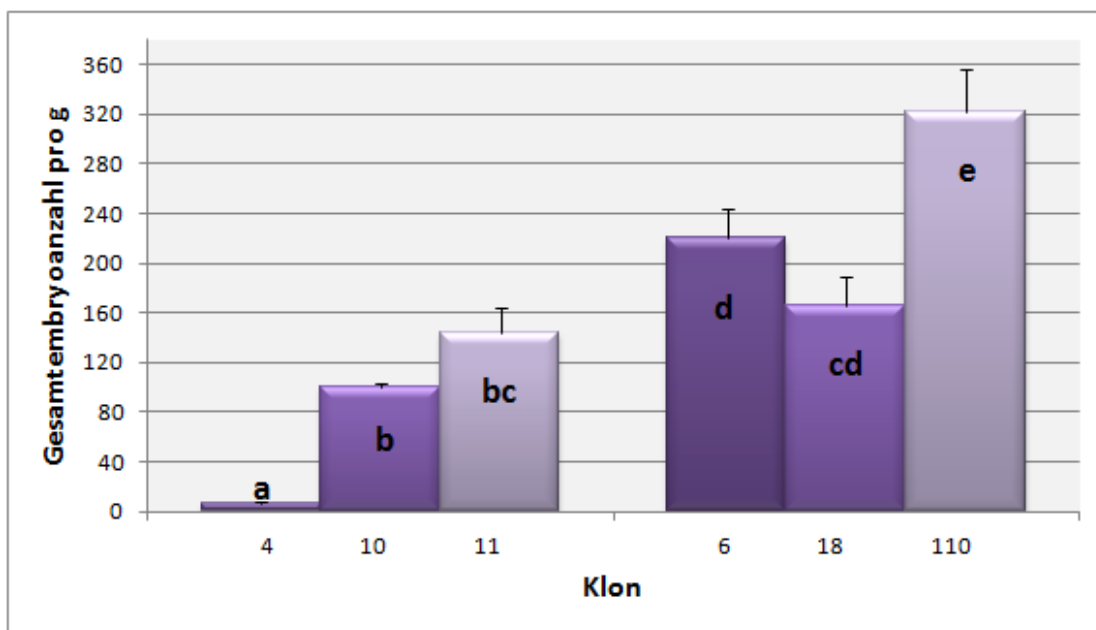
Klon 4 wies bei allen Untersuchungen die geringste Gesamtembryoanzahl auf. Er unterschied sich dadurch signifikant von Klon 10 und Klon 11 (vgl. Abbildung 6, S. 18). Diese Tendenz wurde auch schon bei Hartl (2012) festgestellt. Verglichen mit den Ergebnissen von Hartl (2012) hatte sich die gebildete Embryoanzahl bei Klon 4 allerdings noch verringert. Dieser Genotyp zeigte starkes Kalluswachstum, hatte seine Fähigkeit Embryos zu produzieren allerdings beinahe eingebüßt.

## Ergebnisse



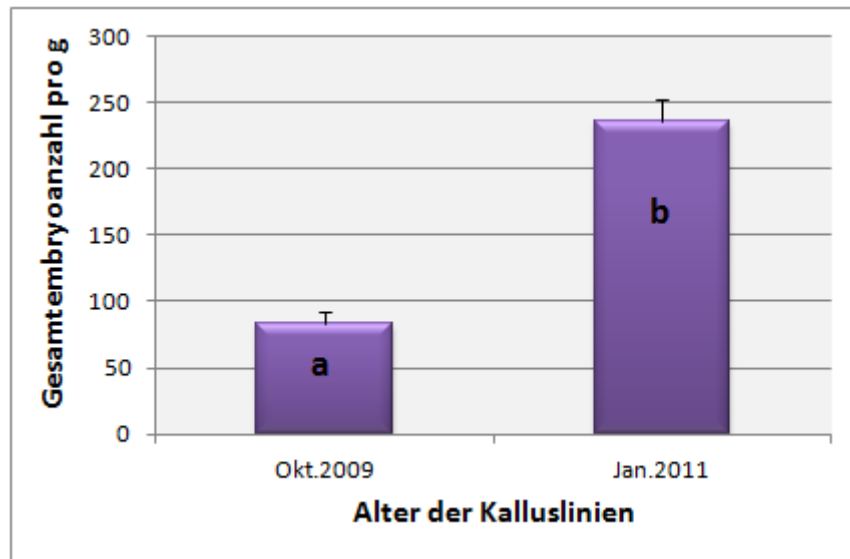
**Abbildung 6:** Einfluss des Genotyps auf die gebildeten Gesamtembryos als Übersicht über alle verwendeten Nährmedien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Zog man die drei Klone der neu etablierten Kalluslinie zum Vergleich mit den drei Klonen, die schon über ein Jahr erhalten und vermehrt worden waren, heran, erkannte man auch hier, dass die diversen Genotypen unterschiedliche Ergebnisse lieferten (vgl. Abbildung 7). Hier unterschied sich Klon 110 signifikant von den anderen Klonen, indem er beinahe um hundert Embryos pro Gramm mehr gebildet hatte.



**Abbildung 7:** Einfluss des Genotyps auf die gebildete Gesamtembryoanzahl bei wechselnden Saccharose-Konzentrationen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

In Abbildung 8 sind jeweils die drei Klone, die zur selben Zeit induziert worden waren, zusammengefasst, um ausschließlich den Einfluss des Alters beurteilen zu können. Es fand sich auf den jüngeren Kalluskulturen mehr als die doppelte Gesamtembryoanzahl. Mit steigendem Alter sank somit die Zahl der gebildeten Embryos signifikant ab.



**Abbildung 8:** Einfluss des Alters der Kalluskulturen auf die gebildete Gesamtembryoanzahl, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Da auch schon in Vorarbeiten (Hartl 2012, Winter 2009) angeführt wurde, dass der Genotyp auf die Embryoinitiation einwirken kann, wurde der Einfluss des Klons auch in Kombination mit den verschiedenen eingesetzten Nährmedium ermittelt.

Das Nährmedium schien keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Genotypen zu haben. Immer produzierte Klon 4 signifikant die wenigsten Embryos, während Klon 11 geringfügig mehr Embryos als Klon 10 aufwies.

### 3.3. Untersuchungen zur Embryoreifung

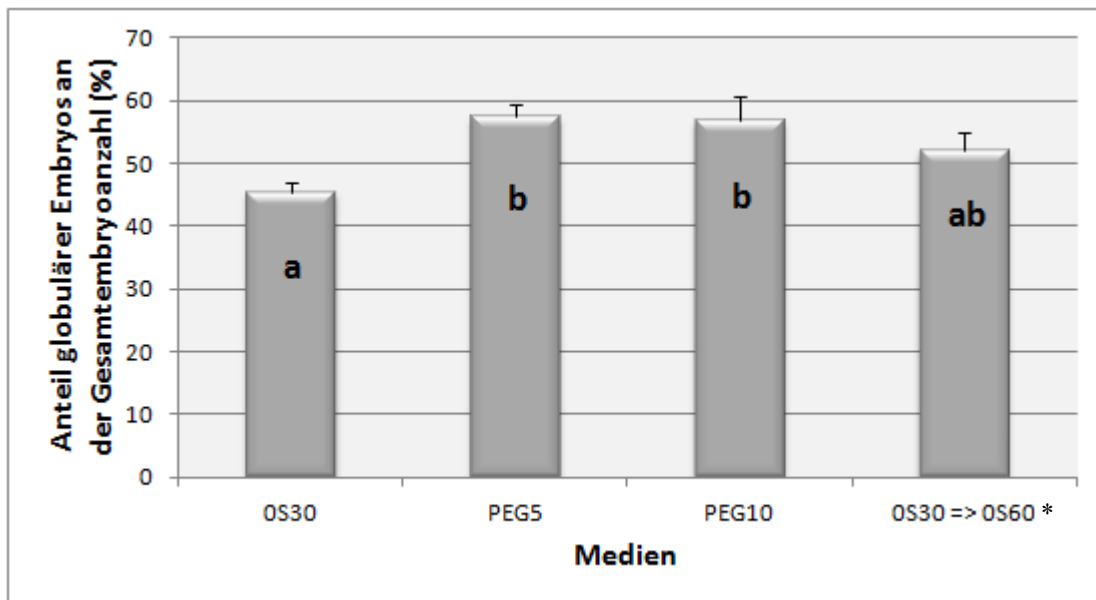
Um positive oder negative Effekte auf die Embryoreifung feststellen zu können, wurden dieselben Nährmedien und Kulturen verwendet wie zuvor für die Induktion der Embryobildung (vgl. Kapitel 3.2., S. 14).

## Ergebnisse

Damit ausschließlich die Embryoreifung beurteilt werden konnte, ohne den Einfluss der ungleichmäßigen Embryoinitiationsfähigkeit zu berücksichtigen, wurde die Gesamtembryoanzahl pro Gramm auf 100 % normiert. Der Anteil der Embryos an den drei unterschiedenen Entwicklungsstadien wurde prozentuell angegeben. Differenziert wurde zwischen globulären, weiterentwickelten (umfasst Stadien vom herzförmigen bis zum reifen Embryo) und gekeimten Embryos. Nur Explantate mit Embryobildung wurden in die Ergebnisse einbezogen.

Bevor in den folgenden Unterkapiteln die Effekte von Saccharose, Polyethylenglykol, Genotyp und Alter gesondert von den anderen Faktoren betrachtet werden, soll hier eine kurze Übersicht gegeben werden.

Der prozentuelle Anteil der globulären Embryos war bei Medien mit Polyethylenglykol signifikant höher als beim Standard (MS-Medium). Die Behandlung mit wechselnder Saccharose-Konzentration von 30 g/l zu 60 g/l unterschied sich weder von den Medien mit Polyethylenglykol noch vom Standard MS-Medium mit 30 g/l Saccharose (vgl. Abbildung 9).

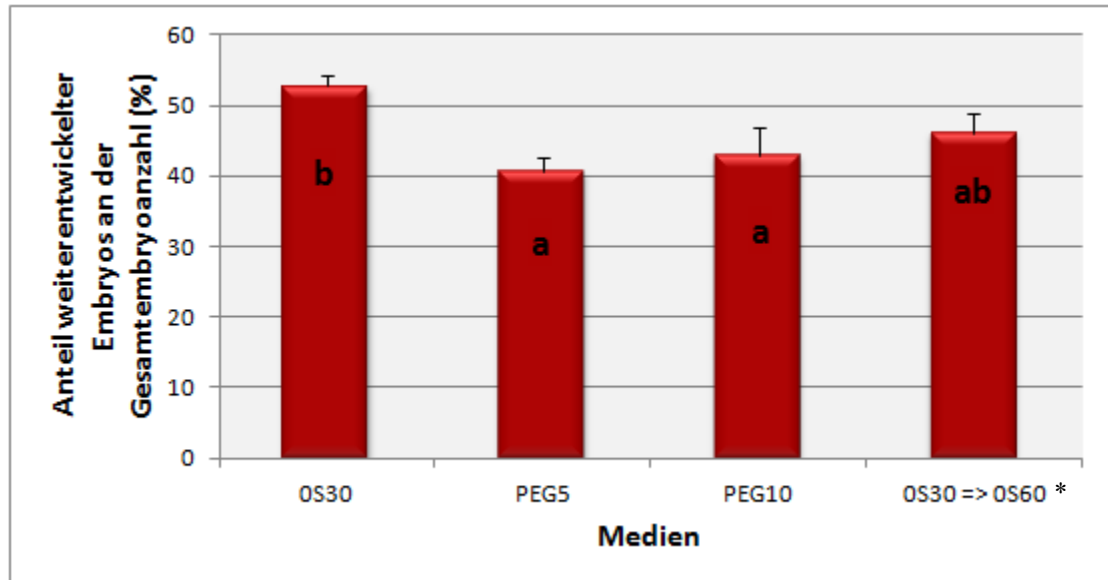


**Abbildung 9:** Einfluss des Nährmediums (siehe Tabelle 3, S. 9) auf die Bildung globulärer Embryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

\* 2 Wochen auf Medium OS30, gefolgt von 4 Wochen auf OS60

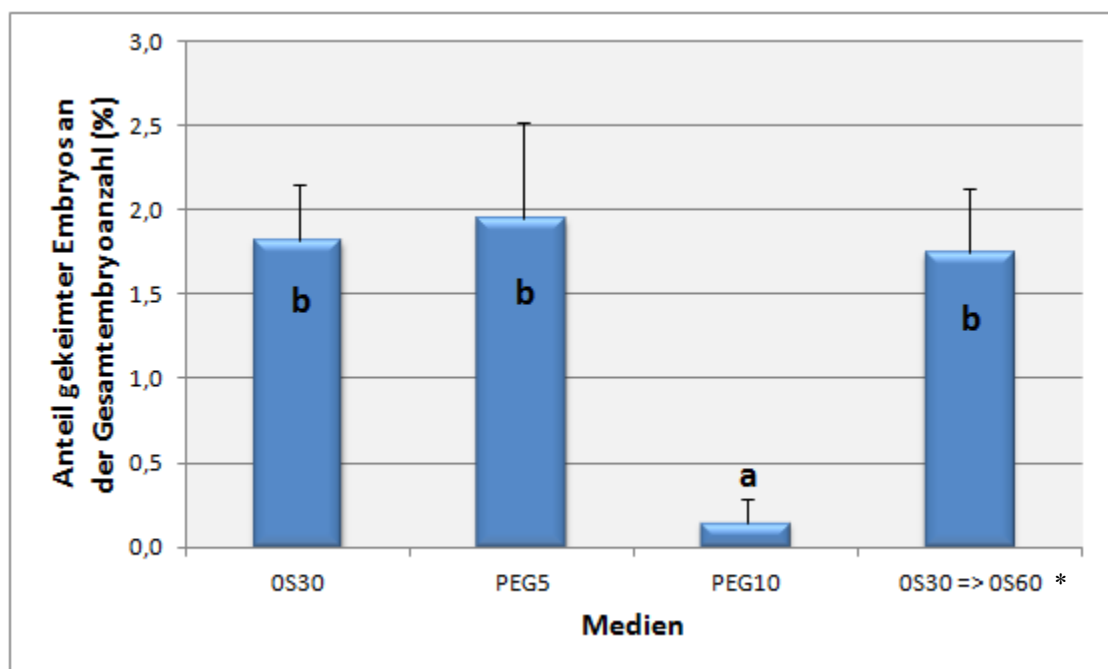
## Ergebnisse

Bezüglich der Anzahl an weiterentwickelten Embryos führte Polyethylenglykol zu signifikant niedrigeren Ergebnissen im Vergleich zum Medium OS30 (vgl. Tabelle 3, S. 9). Die anderen Medien wiesen keine signifikanten Differenzen auf. (vgl. Abbildung 10)



**Abbildung 10:** Einfluss des Nährmediums (siehe Tabelle 3, S. 9) auf die Bildung weiterentwickelter Embryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

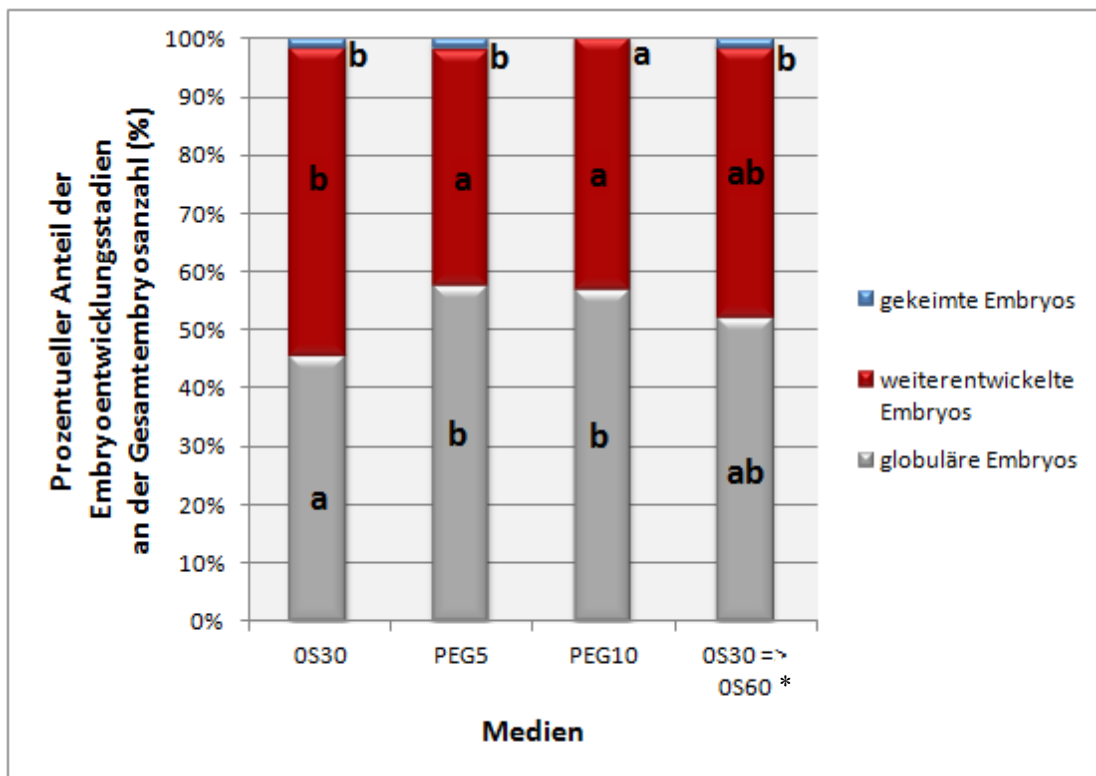
Im Hinblick auf den Anteil an gekeimten Embryos gab es nach sechs Wochen Embryoreifung nur bei 10 % PEG signifikant niedrigere Werte (vgl. Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Einfluss des Nährmediums (siehe Tabelle 3, S. 9) auf die Bildung gekeimter Embryos, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

\* 2 Wochen auf Medium OS30, gefolgt von 4 Wochen auf OS60

Betrachtet man den Einfluss der Nährmedien auf alle Embryo-Entwicklungsstadien, so erwies sich das standardisierte MS-Medium mit 30 g/l Saccharose als das Beste, da es verhältnismäßig am meisten weiterentwickelte Embryos hervorbrachte und auch bei den gekeimten Embryos keine signifikant schlechteren Ergebnisse lieferte. Verglichen damit hatten die Medien mit Polyethylenglykol keine vorteiligen Entwicklungen ergeben. Der Versuch mit einem Wechsel der Saccharose-Konzentration während der Embryoreifung unterschied sich in keinem Stadium der Entwicklung signifikant von den anderen Versuchen. (vgl. Abbildung 12)



**Abbildung 12:** Überblick des Einflusses des Nährmediums (siehe Tabelle 3, S. 9) auf die diversen Embryo-Entwicklungsstadien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )  
 \* 2 Wochen auf Medium OS30, gefolgt von 4 Wochen auf OS60

### 3.3.1. Einfluss von Saccharose

Um mit Saccharose einen osmotischen Effekt zu erzielen, wurde nach zwei Wochen die Saccharose-Konzentration von 30 g/l auf 60 g/l erhöht. Als Referenz diente ein MS-Medium, in dem über die sechs Wochen der Embryoreifung konstant 30 g/l Saccharose enthalten waren (OS30). Wie Abbildung 12 zeigt, wurde das Verhältnis von globulären zu weiterentwickelten Embryos durch die Änderung des Saccharose-Zusatzes auf die Seite der globulären Embryos verschoben. Der Anteil an globulären

Embryos lag bei 52,1 %, demgegenüber fand man auf Medium OS30 nur 45,4 %. Auf OS30-Medium hatten sich um 6,9 % mehr weiterentwickelte Embryos gebildet. Es kam durch eine höhere Konzentration an Saccharose also zu einer Verzögerung der Embryoreifung. Der prozentuelle Anteil an gekeimten Embryos blieb dadurch praktisch unbeeinflusst bei 1,7 % (vgl. Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Einfluss der verschiedenen Medien auf die Bildung der unterschiedlichen Entwicklungsstadien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

\* 2 Wochen auf Medium OS30, gefolgt von 4 Wochen auf OS60

| Nährmedien     | globuläre Embryos (%) | weiterentwickelte Embryos (%) | gekeimte Embryos (%) |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------|
| OS30           | 45,4 ± 1,6            | 52,8 ± 1,6                    | 1,8 ± 0,3            |
| PEG5           | 57,4 ± 2,1            | 40,6 ± 2,0                    | 1,9 ± 0,6            |
| PEG10          | 56,8 ± 3,8            | 43,0 ± 3,8                    | 0,1 ± 0,1            |
| OS30 => OS60 * | 52,1 ± 2,7            | 46,1 ± 2,6                    | 1,7 ± 0,4            |

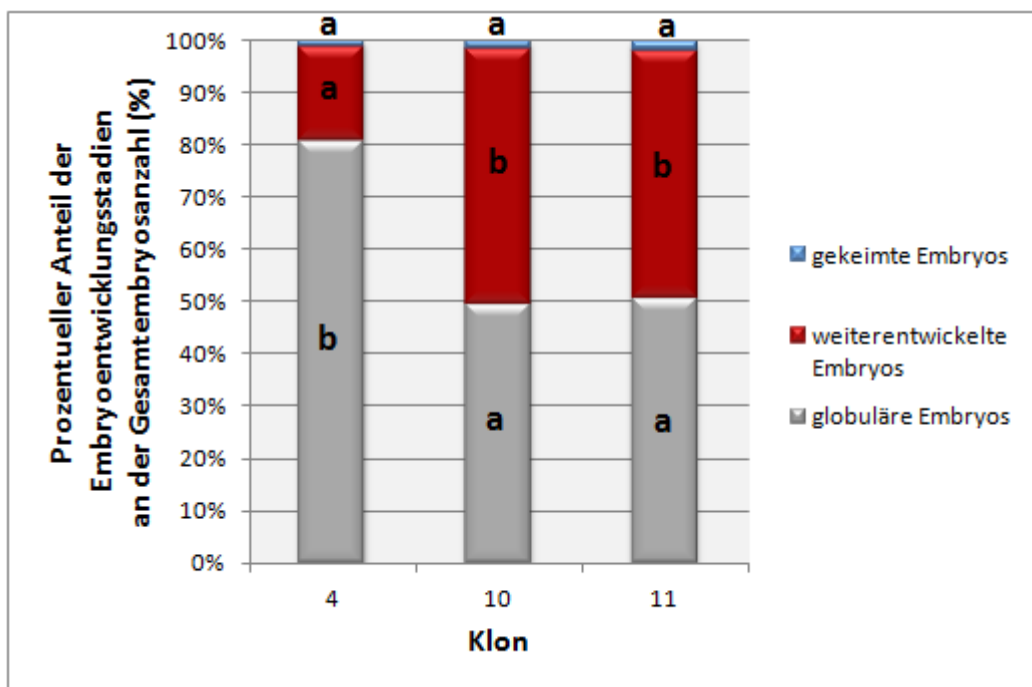
### 3.3.2. Einfluss von Polyethylenglykol

Zum Einsatz kamen Konzentrationen von 5 und 10 % Polyethylenglykol. Zusammengefasst zeigten die Medien mit Polyethylenglykol-Zusatz keine positiven Auswirkungen auf die Embryoreifung. Mehr als 56 % aller Embryos befanden sich nach sechs Wochen noch im globulären Embryostadium (vgl. Tabelle 5). Auch durch Erhöhung der Polyethylenglykol-Konzentrationen waren nicht signifikant mehr weiterentwickelte Embryos zu finden. Zwischen 40,6 und 43 % der Embryos waren in diesem Entwicklungsstadium. Auffallend war hingegen, dass nach sechs Wochen auf Medium mit 10 % Polyethylenglykol nur 0,1 % der Embryos gekeimt waren. Das ist dadurch zu begründen, dass die Embryos durch die hohe Konzentration an Polyethylenglykol unter zu großem osmotischen Stress standen, um zu keimen.

### 3.3.3. Einfluss von Genotyp und Alter der Kalluskulturen

Um den Einfluss der verschiedenen Klone auf die Embryoreifung zu betrachten, wurden die Ergebnisse der prozentuellen Anteile an den diversen Embryo-Entwicklungsstadien der einzelnen Genotypen miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass sich Klon 4 signifikant von den anderen Klonen abhob. Der Hauptanteil der gebildeten Embryos befand sich im globulären Entwicklungsstadium. Mit Klon 10 und 11 verglichen, wies er einen höheren Prozentsatz an globulären und gleichzeitig einen niedrigeren Teil an weiterentwickelten Embryos auf. Die Reifung der Embryos fand bei Klon 4 wesentlich langsamer statt. Bei den gekeimten Embryos konnte jedoch kein Unterschied nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 13).

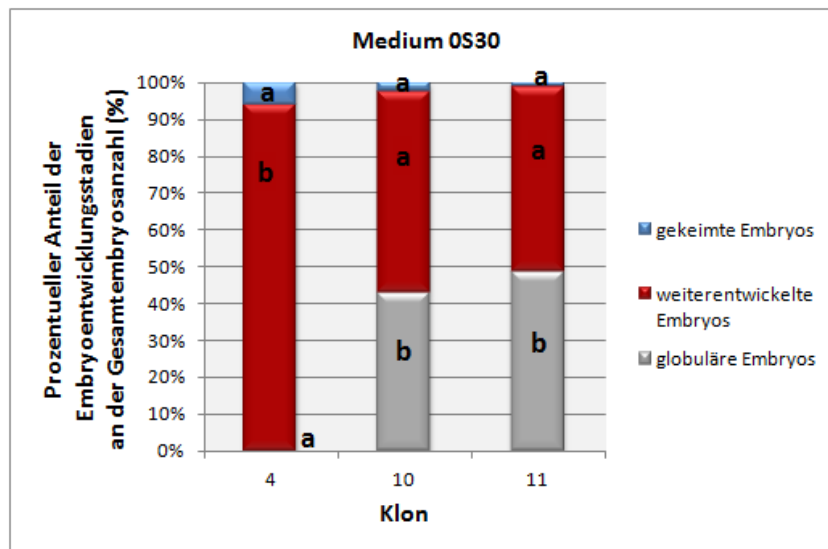


**Abbildung 13:** Überblick des Einflusses der unterschiedlichen Klone auf die verschiedenen Entwicklungsstadien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Da eine Auswirkung von unterschiedlichen Genotypen auf die Entwicklung und das Wachstum der Embryos bereits in den vorangegangenen Arbeiten von Winter (2009) und Hartl (2012) beobachtet werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk auf eventuelle Unterschiede im Embryoreifungsverhalten der verschiedenen Klone gelegt. Hierfür wurde der Einfluss der drei verwendeten Klone auf die verschiedenen Embryo-Entwicklungsstadien nicht nur im Überblick,

sondern auch separat für die einzelnen Versuche betrachtet. Klon 11 und Klon 10 sollte hierbei mehr Gewicht beigemessen werden, da bei Klon 4 durch die besonders geringe Gesamtembryoanzahl (vgl. Abbildung 6, S. 18) die prozentuellen Anteile an den einzelnen Entwicklungsstadien verzerrt erscheinen können. Die Gesamtembryoanzahl pro Gramm wurde für die Ermittlung der prozentuellen Anteile auf 100 % normiert, um ausschließlich Effekte auf die Embryoreifung zu sehen.

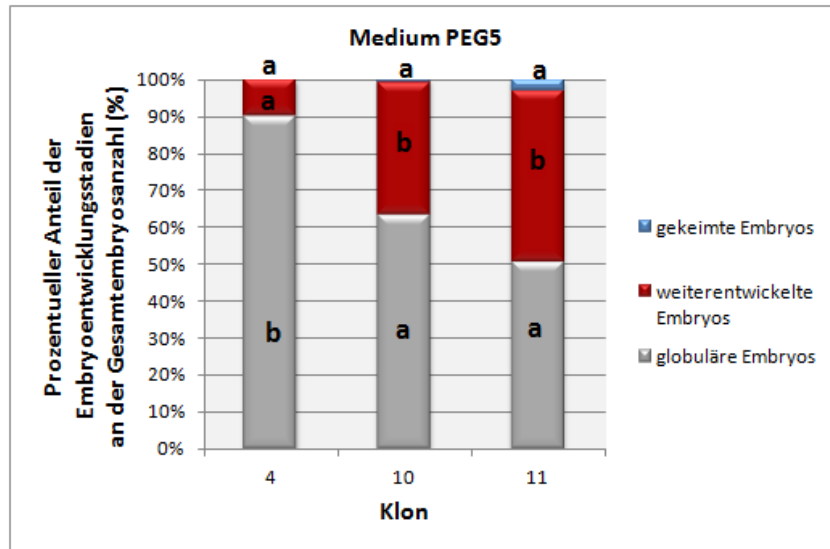
Medium OS30 führte bei Klon 4 zu einer signifikant höheren Entwicklung von weiterentwickelten Embryos als bei Klon 10 und 11. Diese beiden wiesen auch einen hohen Anteil an weiterentwickelten Embryos auf (mehr als 50 %), unterschieden sich untereinander aber nicht (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Einfluss der unterschiedlichen Klone auf die verschiedenen Entwicklungsstadien bei Medium OS30, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

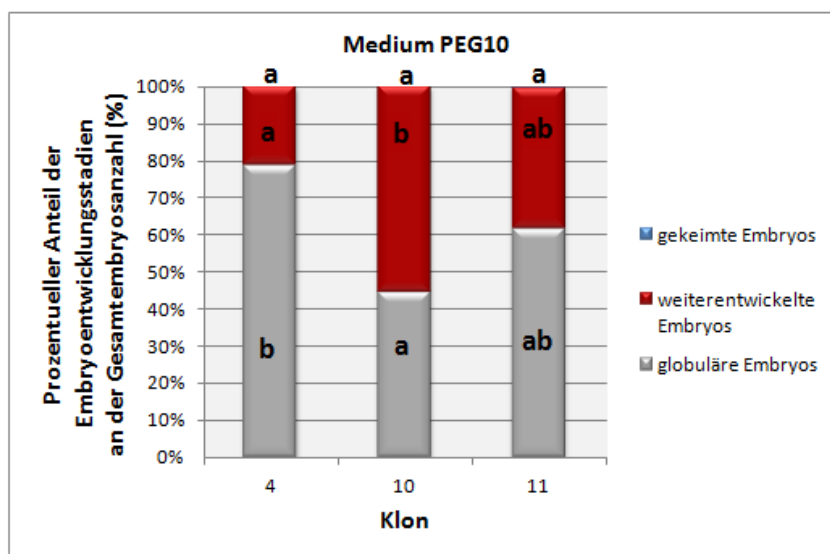
Auf Nährmedium mit 5 % Polyethylenglykol war der größte Teil der Embryos globulär. Bei den Klonen unterschied sich Klon 4 signifikant von den anderen dadurch, dass er beinahe 90 % globuläre Embryos enthielt. Klon 10 und 11 hatten mehr weiterentwickelte und weniger globuläre Embryos vorzuweisen. In Bezug auf gekeimte Embryos waren keine Abweichungen bei den verschiedenen Genotypen zu erkennen (vgl. Abbildung 15, S. 26).

## Ergebnisse



**Abbildung 15:** Einfluss der unterschiedlichen Klone auf die verschiedenen Entwicklungsstadien bei Medium PEG5, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

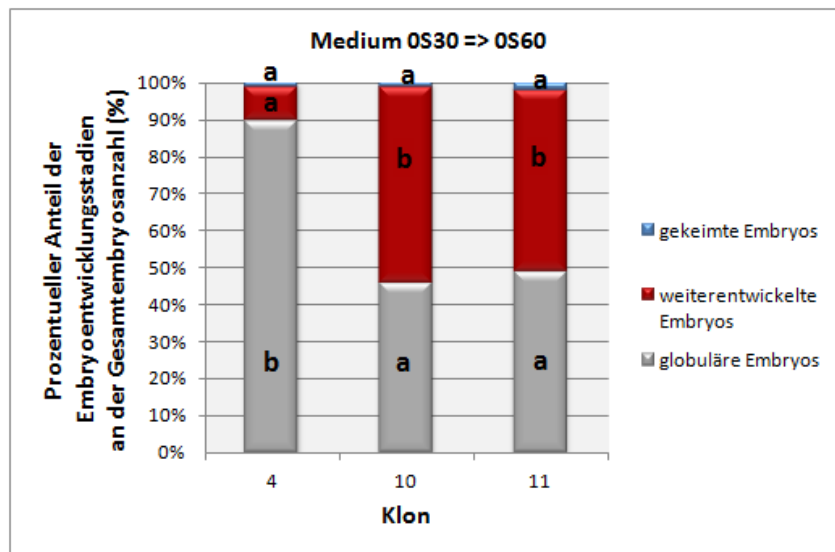
Auf Medium PEG10 unterschieden sich Klon 10 und Klon 4 bei den Anteilen an globulären und weiterentwickelten Embryos signifikant voneinander. Bei Klon 10 war die Reifung weiter fortgeschritten. Klon 11 hingegen wies weder im Vergleich zu Klon 10 noch zu Klon 4 signifikante Unterschiede auf. Gekeimte Embryos hatten sich bei allen Genotypen praktisch keine entwickelt, was sich durch die starke osmotische Aktivität von 10 % Polyethylenglykol begründen lässt (vgl. Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Einfluss der unterschiedlichen Klone auf die verschiedenen Entwicklungsstadien bei Medium PEG10, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

## Ergebnisse

Durch einen Wechsel der Saccharose-Konzentration im Nährmedium von 30 g/l zu 60 g/l nach zwei Wochen Kultivierung, konnten bei Klon 10 und Klon 11 hohe Anteile an weiterentwickelten Embryos erzeugt werden. Gegensätzlich war die Entwicklung bei Klon 4. Hier lag der Anteil an globulären Embryos bei  $89,6 \pm 7,0$  %. Bei den gekeimten Embryos lieferten die Genotypen keine signifikanten Unterschiede, was aber vor allem durch die generell niedrige Keimungsrate nach sechs Testwochen zu begründen ist. (vgl. Abbildung 17)

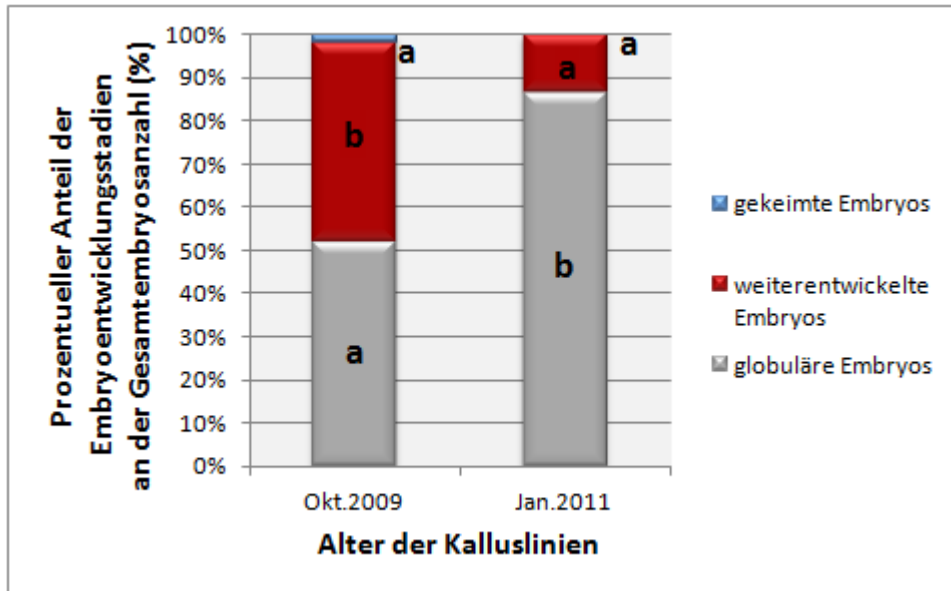


**Abbildung 17:** Einfluss der unterschiedlichen Klone auf die verschiedenen Entwicklungsstadien bei Medienwechsel von OS30 zu OS60, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Innerhalb der neuen Kalluslinie zeigten die Klone 6, 18 und 110 weder positive noch negative Auswirkungen auf die Embryoreifung. In keinem der differenzierten Embryostadien unterschieden sich die Resultate der drei Genotypen signifikant voneinander.

Korreliert man allerdings die Ergebnisse der Linien, die im Oktober 2009 induziert wurden, mit der neueren Klonlinien vom Jänner 2011, dann waren folgende Unterschiede zu erkennen (vgl. Abbildung 18, S. 28): Obwohl die frischen Kalluskulturen, wie in Unterkapitel 3.3.3. (S. 24) gezeigt wurde, eine höhere Anzahl an Embryos gebildet hatten, kam es gemessen an älteren Kalluslinien nach sechs Wochen zu einer signifikanten Reifungsverzögerung. Der Anteil an weiterentwickelten Embryos betrug lediglich  $13,4 \pm 1,6$  %. Bei den 2009 etablierten

Kulturen waren nach sechs Wochen Kultivierung bereits  $46,1 \pm 2,6$  % weiter als globulär entwickelt. Auffallend war auch, dass in dieser Zeit keine gekeimten Embryos bei den neuen Kalluslinien zu finden waren. Die alten Klone unterschieden sich hier nicht signifikant, wiesen aber schon  $1,7 \pm 0,4$  % gekeimte Embryos auf.



**Abbildung 18:** Überblick des Einflusses des Alters der Kalluskultur (Mittelwert aller Klone) auf die verschiedenen Entwicklungsstadien, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

### 3.4. Untersuchungen zu Embryokeimung und Konversion

Nachdem sich in der Vorarbeit von Hartl (2012) bestätigt hatte, dass eine normale Pflanzenentwicklung aus den Embryos von *Glycyrrhiza glabra* L., die mittels indirekter somatischer Embryogenese auf Kallus induziert wurden, möglich war, sollten in der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Behandlungen und ihre etwaigen Auswirkungen auf Embryokeimung und die nachfolgende Konversion hin zur Pflanze untersucht werden. Dafür wurden diverse Gibberellinsäure-Konzentrationen kombiniert mit oder ohne Indolylessigsäure erprobt. Zusätzlich sollten MS- und MS  $^{1/2}$  - Medien mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Saccharose ausgetestet werden.

Für die Versuche wurden dieselben Kulturen verwendet wie zuvor bei der Embryoreifung. Explantate, bei denen sich besonders wenige Embryos gebildet

## Ergebnisse

hatten, konnten nicht für die Weiterkultivierung auf Keimungsmedium genutzt werden. Aus diesem Grund wurden alle Kulturen von Klon 4 und auch die resultierenden Embryos, die auf MS-Medium mit 10 % Polyethylenglykol induziert wurden, nicht weiter verwendet. Die Versuche mit den neuen Kalluslinien endeten auch hier, da in der gegebenen Zeit nicht ausreichend neues Kallusmaterial gebildet werden konnte, um die Untersuchungen bis zur Embryo-Keimung und Konversion weiterzuführen.

Es wurden also die Genotypen 10 und 11, die auf den Medien OS30, PEG5 und OS30 kombiniert mit OS60 kultiviert wurden (vgl. Tabelle 3, S. 9), für die Experimente zur Konversion herangezogen.

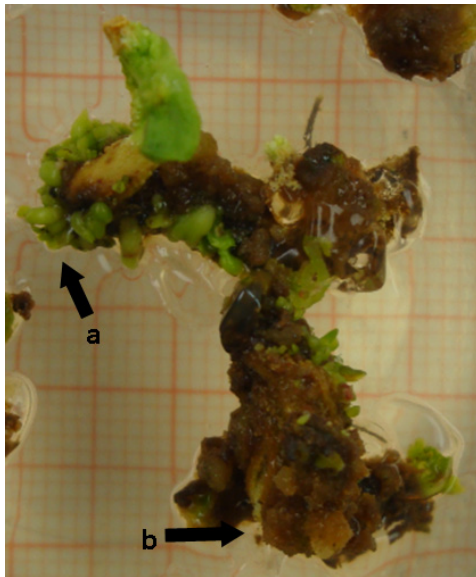
Nach sechs Wochen auf Embryoreifungsmedium wurden die Kulturen auf die diversen Keimungsmedien (vgl. Tabelle 4, S. 10) passagiert. Nach fünf Wochen Kultivierung darauf wurden die Embryos vom Kallus getrennt und ausschließlich die Embryos für weitere fünf Wochen auf die Keimungsmedien überimpft. Danach wurden die Embryos auf MS  $\frac{1}{2}$  - Medium übergeführt. Hier blieben die Embryos erneut für fünf Wochen, bevor die Versuche ausgezählt wurden.

Die Auswertung erfolgte somit im Anschluss an ca. 110 Tage Kultivierung auf den diversen Keimungsmedien und MS  $\frac{1}{2}$ . Da sich die Embryoanzahl während dieser Zeit stark vermehrt und sich auch viele sekundäre Embryos gebildet hatten, hätte es den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt, alle entstandenen Embryos erneut zu zählen und in die zuvor differenzierten Entwicklungsstadien einzuteilen. Folglich wurden zur Beurteilung der Konversion die entstandenen Pflanzen (vgl. Abbildung 19) ausgezählt.

Sekundäre Embryogenese kam unabhängig vom verwendeten Reifungs- und Keimungsmedium bei nahezu allen Kulturen vor (vgl. Abbildung 20, S. 30).



**Abbildung 19:** aus somatischem Embryo entstandene Pflanze, Balken = 1 cm

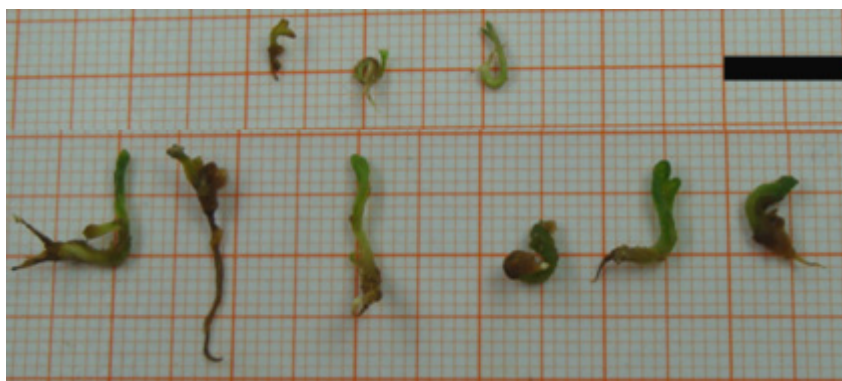


**Abbildung 20:** Sekundäre Embryos (a) und Kallusbildung (b)

Sekundäre Embryos traten in allen Entwicklungsstadien auf.

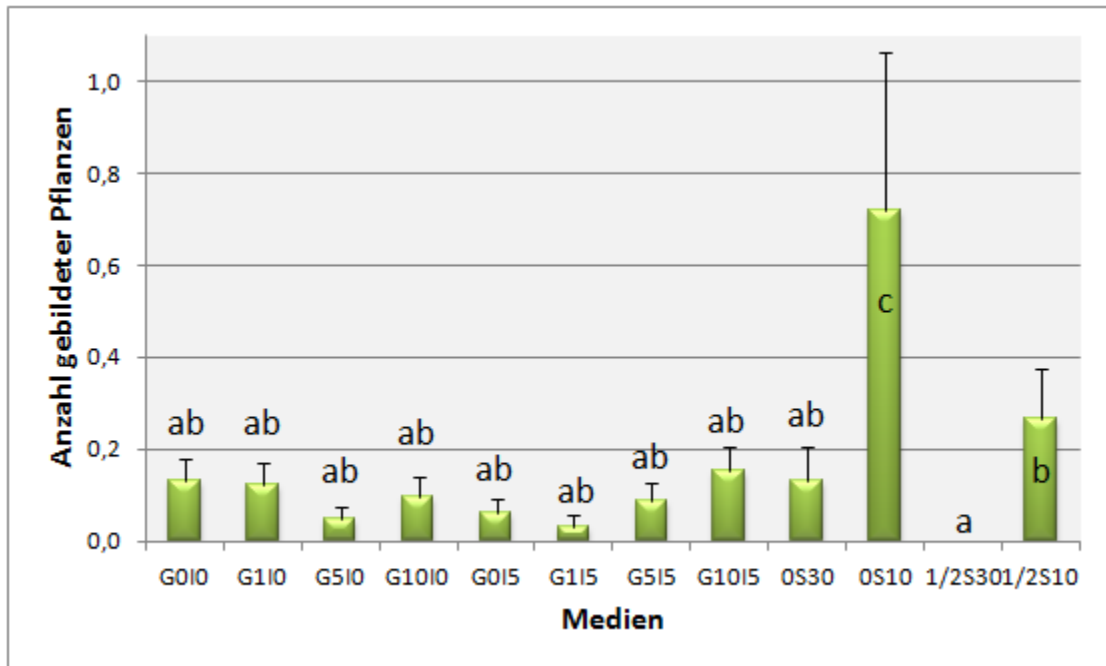
Eine weitere Entwicklung, die häufig auftrat, war Kallusbildung an den somatischen Embryos (vgl. Abbildung 20). Zum Teil überzog der Kallus große Teile der Embryos und des Öfteren bildeten sich an diesem erneut Embryos. Vor allem bei Embryos, die von Kulturen auf Medium mit Polyethylenglykol stammten, zeigte sich Kallusentwicklung. Aber auch bei den anderen Versuchen war dieses Phänomen keine Seltenheit.

Die Anzahl gebildeter Pflanzen zum Zeitpunkt der Auswertung war relativ gering, dies gilt es bei der Gewichtung der Resultate zu bedenken. Im Gegensatz zur Auszählung nach sechs Wochen Embryoreifung waren viele der Embryos in einem weiterentwickelten Stadium beziehungsweise bereits gekeimt. Eine Tendenz, dass auf bestimmten Keimungsmedien häufiger als bei anderen gekeimte Embryos gebildet wurden, war allerdings nicht zu erkennen. Eine Auswahl gekeimter Embryos ist in Abbildung 21 zu sehen.



**Abbildung 21:** Gekeimte Embryos, Balken = 1 cm

Das Diagramm in Abbildung 22 (S. 31) soll einen Überblick über den Einfluss der Keimungsmedien auf die Bildung von Pflanzen geben, unabhängig davon, auf welchem Medium die Embryos induziert und gereift waren.



**Abbildung 22:** Einfluss der getesteten Keimungsmedien (siehe Tabelle 4, S.10) auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Werte mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ ).

Die meisten Pflanzen lieferten die Kulturen auf Medium OS10, ein MS-Medium mit 10 g/l Saccharose. Verglichen mit den Resultaten der restlichen Keimungsmedien hatten sich hierauf mehr als dreimal so viele Pflanzen entwickelt. Damit unterschied es sich signifikant von allen anderen Nährmedien. Auffallend ist, dass das zweitbeste Ergebnis ebenfalls auf einem Medium mit stark reduzierter Konzentration an Saccharose erzielt wurde. Medium 1/2S10 war ein MS  $1/2$  - Medium mit der halben Dosis an Makroelementen und einer Konzentration von 10 g/l Saccharose. Beide Medien waren zudem wuchsstofffrei. Das einzige Medium, auf dem sich in den 110 Tagen am Keimungsmedium keine Pflanze gebildet hatte, war das Medium 1/2S30. Die Entwicklung von Pflanzen auf Medien, denen die Wuchsstoffe Gibberellinsäure und Indolyllessigsäure beigelegt worden waren, wies zum Zeitpunkt der Auszählung noch keine signifikanten Unterschiede auf.

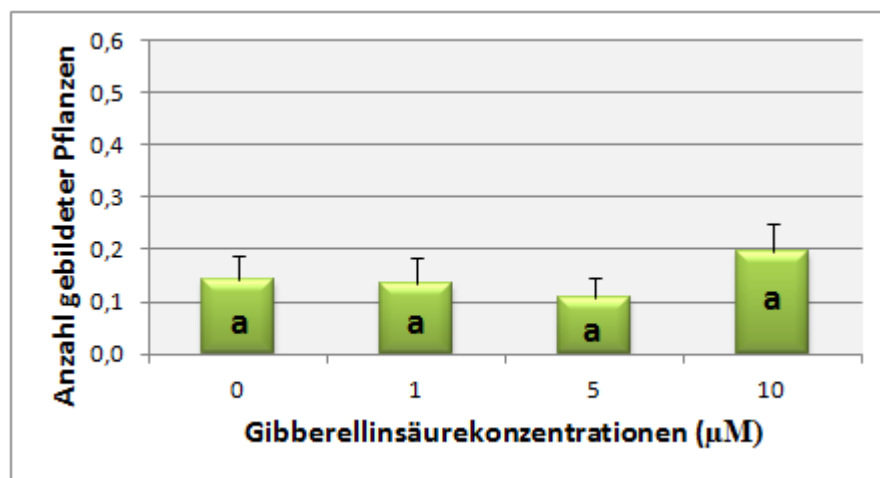
In den folgenden Unterkapiteln soll die Auswirkung eines jeden Faktors auf die Konversion der Embryos im Einzelnen beurteilt werden.

### 3.4.1. Einfluss von Gibberellinsäure und Indolylessigsäure

Gibberellinsäure wurde den Keimungsmedien in den Konzentrationen 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Um noch eine zusätzliche Vergleichsmöglichkeit zu bekommen, wurde darüber hinaus eine Versuchsreihe ohne Gibberellinsäure angesetzt. Den zweiten zu testenden Wuchsstoff lieferte Indolylessigsäure. Hier wurden 5  $\mu\text{M}$  verwendet und mit 0, 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  Gibberellinsäure kombiniert.

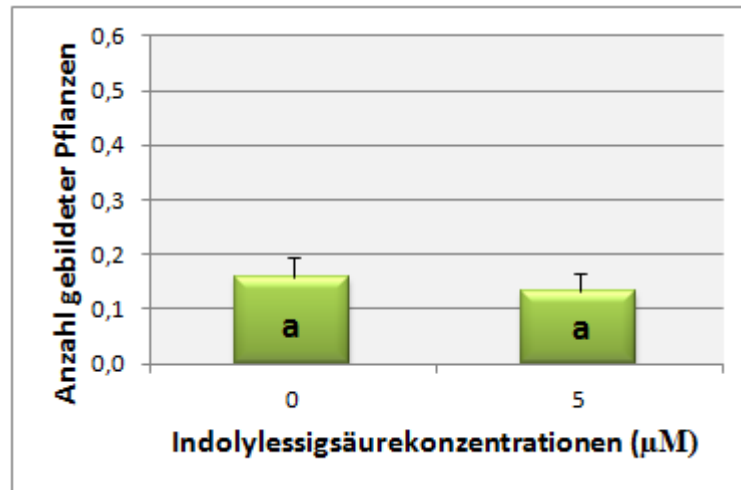
Pflanzenbildung konnte in allen acht Medien mit Wuchsstoff-Zusatz nachgewiesen werden.

Korreliert man ausschließlich die Gibberellinsäure-Konzentration mit der Embryokonversion zu Pflanzen, so zeigte sich kein signifikanter Effekt (vgl. Abbildung 23). Weder ein positiver noch ein negativer Einfluss konnte beobachtet werden. Auch bei höheren  $\text{GA}_3$ -Konzentrationen konnten sich nicht mehr gekeimte Embryos entwickeln.



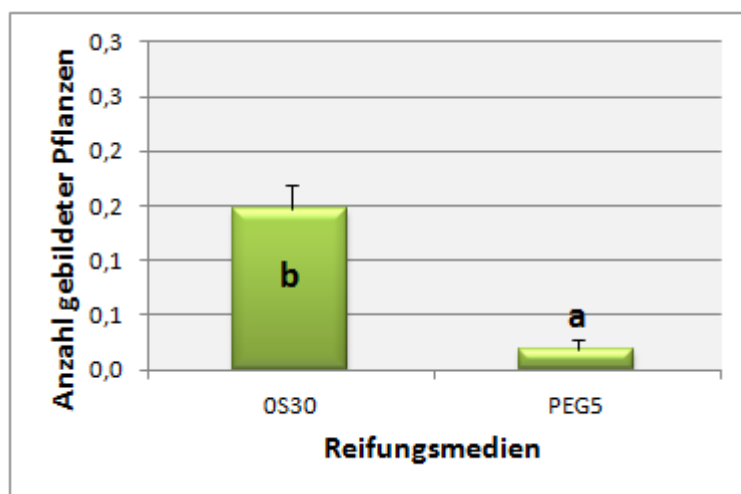
**Abbildung 23:** Einfluss von Gibberellinsäure auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

Richtet man das Augenmerk auf die Indolylessigsäure-Konzentrationen, so war zu erkennen, dass Medien mit Indolylessigsäure weniger Konversion von Embryos zu Pflanzen bewirkt hatten. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie sich damit nicht signifikant von Medien ohne Indolylessigsäure abgehoben hatten (vgl. Abbildung 24, S. 33).



**Abbildung 24:** Einfluss von Indolylessigsäure auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

Als Ausgangsmaterial für die Versuche mit wuchsstoffhaltigen Keimungsmedien dienten Embryos, die auf zwei verschiedenen Medien herangereift waren. Zum Einsatz kamen Embryos von Kulturen auf OS30-Medium und Medium PEG5. Alle acht Keimungsmedien wurden mit den Embryos beider Ursprünge ausgetestet. Pro Keimungsmedium und Genotyp (Klon 10 und 11) wurden 20 Explantate angesetzt. In Abbildung 25 wird die Anzahl gebildeter Pflanzen bezogen auf das Reifungsmedium der Ausgangsembryos dargestellt. Wie in dem Diagramm ersichtlich ist, besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Resultaten der beiden Reifungsmedien.



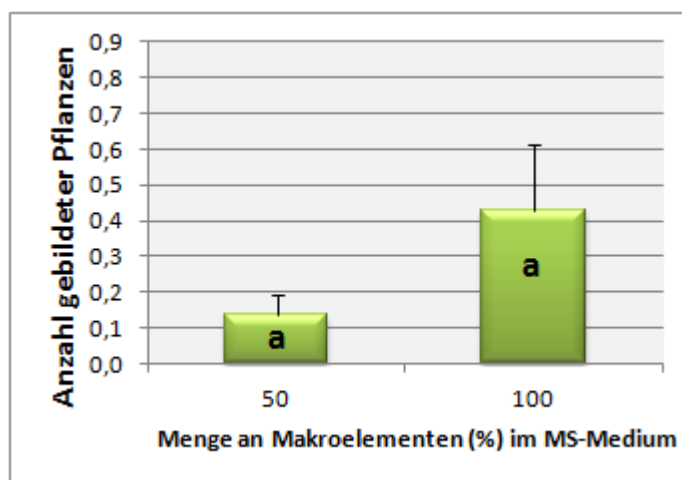
**Abbildung 25:** Einfluss der Reifungsmedien auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterschieden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Betrachtet man nun aber die Ergebnisse für jedes Reifungsmedium separat und kombiniert es mit den Resultaten aus den Kapiteln zur Embryoinitiation und Embryoreifung, so lässt sich dieser Effekt dadurch erklären, dass bei Medium PEG5 weniger Embryos, die überdies auch weniger weit entwickelt waren, für die Untersuchung herangezogen werden konnten. Demnach hatte Polyethylenglykol zwar keinen direkten Einfluss auf die Pflanzenbildung, führte allerdings zu einer Reifungsverzögerung und niedrigeren Gesamtembryoanzahl und folgedessen auch zu weniger Pflanzen.

### 3.4.2. Einfluss von Saccharose und der Menge an Makroelementen

In Bezug auf MS-Medien mit unterschiedlichen Mengen an Makroelementen und Saccharose-Konzentrationen kamen vier Keimungsmedien zum Einsatz. Die Saccharosegehalte 30 g/l und 10 g/l wurden jeweils mit MS - und MS  $^{1/2}$  - Medien kombiniert. In dieser Gruppe der Keimungsmedien wurden sowohl die besten Werte, aber auch das schlechteste Ergebnis erzielt.

In Abbildung 26 ist der Einfluss der Menge an Makroelementen im Nährmedium auf die Anzahl gebildeter Pflanzen zusammengefasst. Auf MS-Medien mit vollen Makroelementen konvertierten mehr Embryos zu Pflanzen. Die Ergebnisse unterschieden sich jedoch nicht signifikant.



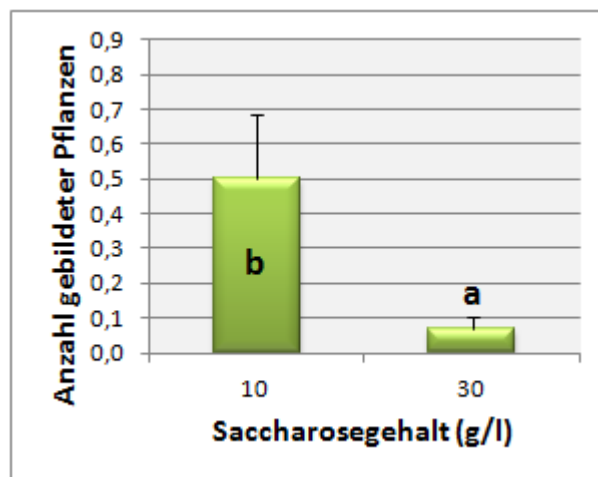
**Abbildung 26:** Einfluss der Konzentration an Makroelementen im MS-Medium auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

## Ergebnisse

Wegen der nicht signifikant differierenden Resultate konnte zum Zeitpunkt der Auswertung kein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an Makroelementen und der Anzahl gebildeter Pflanzen nachgewiesen werden.

In der Vorarbeit von Hartl (2012) wurde eine Tendenz ersichtlich, dass eine Relation zwischen dem Saccharosegehalt des Mediums und der Konversionsrate hergestellt werden kann. In besagter Arbeit wurde Saccharose in den Konzentrationen von 30, 40, 50 und 60 g/l verwendet, wobei die Anzahl an Pflanzen mit sinkendem Saccharosegehalt anstieg. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Beziehung hergestellt zwischen Medien mit 30 g/l Saccharose und Nährmedien mit einer Konzentration von 10 g/l Saccharose.

Korreliert man nun den Saccharosegehalt des Keimungsmediums mit der Zahl gebildeter Pflanzen, so ist ein klarer Zusammenhang zu erkennen (vgl. Abbildung 27). Signifikant mehr Pflanzen konnten auf Medien mit 10 g/l Saccharose gefunden werden. Ein positiver Effekt von niedriger Saccharose-Konzentration auf die Konversion somatischer Embryos zu Pflanzen kann somit bestätigt werden.



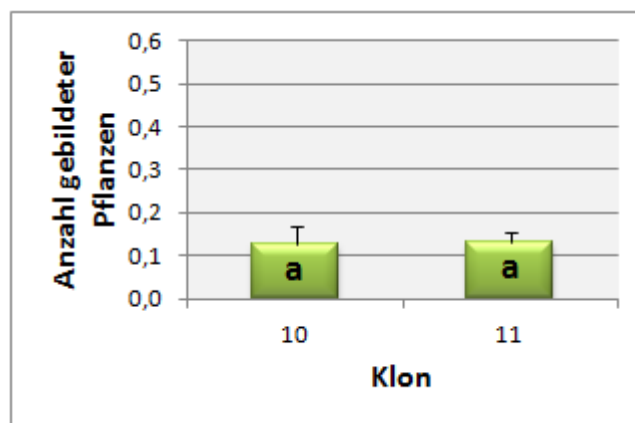
**Abbildung 27:** Einfluss der Saccharose-Konzentration auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterschieden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Da alle Versuche mit verschiedenen Mengen an Makroelementen und Saccharosegehalten mit demselben Ausgangsmaterial, nämlich Embryos, die zwei Wochen auf OS30 und danach vier Wochen auf OS60 Medium gereift waren, gemacht worden waren, konnte hier kein Bezug zum Reifungsmedium hergestellt werden.

### 3.4.3. Einfluss vom Genotyp

Sämtliche Untersuchungen zu Keimung und Konversion wurden mit zwei Genotypen durchgeführt. Klon 10 und Klon 11 wurden für diesen Zweck verwendet. Klon 4 musste von weiteren Versuchen ausgeschlossen werden, da nur sehr wenige Embryos gebildet worden waren, und somit die Stichprobengröße bei diesem Klon wesentlich kleiner ausgefallen wäre als bei den anderen beiden Genotypen. Das hätte die Ergebnisse folglich verfälscht.

Bewertet man nun den Einfluss der beiden Genotypen auf die Anzahl gebildeter Pflanzen, so kann man sagen, dass kein Unterschied zwischen den beiden Klonen besteht. Klon 10 und Klon 11 haben annähernd gleich viele Pflanzen entwickelt (vgl. Abbildung 28). Es konnte dementsprechend kein Einfluss des Genotyps auf die Konversion von Embryos zu Pflanzen beobachtet werden.



**Abbildung 28:** Einfluss des Genotyps auf die Konversion zu Pflanzen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler

## 4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weiterführende Untersuchungen zur indirekten somatischen Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L. durchzuführen. Es sollten die Auswirkungen der Osmotika Saccharose und Polyethylenglykol (PEG 4000) auf den Reifungsprozess somatischer Embryos getestet werden. Weiters sollten die Effekte der Wachstumsstoffe Gibberellinsäure und Indolyllessigsäure sowie die Einflüsse von Saccharosegehalt und der Menge an Makroelementen im Nährmedium auf die Embryokeimung und anschließende Konversion zu Pflanzen untersucht werden. Zusätzlich wurden neue Kalluskulturen etabliert, um etwaige Beeinflussungen von Embryobildung und -reifung durch das Alter der Kalli zu erkennen. In Zuge dessen sollte auch eine niedrige Saccharose-Konzentration während der Kallusinduktion getestet werden, um bereits in dieser frühen Phase der Embryogenese mögliche Auswirkungen der Saccharose auf Kallusbildung und die spätere Embryoentwicklung zu analysieren.

Als erster Untersuchungsaspekt diente die Kallusinitiation. Auf vorangegangenen Diplomarbeiten aufbauend erfolgte die Etablierung von embryogenen Kalluskulturen wie bei Winter (2009) beschrieben. Hierfür wurden Samen von *Glycyrrhiza glabra* L. sterilisiert, für sieben Tage auf Medium MS  $1/2$  (vgl. Tabelle 4, S. 10) im Licht zum Keimen gebracht und aus den entstandenen Keimlingen Kotyledonenexplantate herauspräpariert, die für die Induktion des embryogenen Kallus verwendet wurden. Hier sollte zusätzlich zum Medium TDZ1, das sich in der Vergangenheit bei Winter (2009) und Kazianka (Diplomarbeit in Vorbereitung) bewährt hatte, auch Medium TDZ2 (vgl. Tabelle 3, S. 9), das die niedrige Konzentration von 5 g/l Saccharose (anstelle der üblichen 30 g/l) enthielt, getestet werden. Nach neun Wochen der Kallusinduktion sollte genug Kallus vorhanden sein, um weiterführende Versuche damit zu starten. Bei den Kulturen auf TDZ1-Medium mit 30 g/l Saccharose war bereits nach sechs Wochen ausreichend Kallus gebildet worden, um diesen von den Kotyledonen zu trennen und alleine weiter zu vermehren. Die Kotyledonenexplantate auf TDZ2-Medium hingegen hatten nach neun Wochen kaum

Kallus gebildet und ihre Ränder hatten sich braun verfärbt (vgl. Abbildung 2, S. 14). Auch drei weitere Wochen Kultivierung führten zu keiner Verbesserung. Eine Konzentration von 5 g/l Saccharose reichte nicht aus, um ausreichend viel Kallus zu produzieren. Somit konnten von den neuen Kalluslinien nur solche Linien, die auf Medium TDZ1 induziert worden waren, für weitere Untersuchungen und ausschließlich zur Beurteilung möglicher Zusammenhänge zwischen dem Alter der Kalluskulturen und Embryobildung und -reifung herangezogen werden. Drei Klone der neu etablierten Kalluskulturen wurden hierfür ausgewählt.

Der nächste Untersuchungsaspekt dieser Arbeit war die Embryobildung. Es wurde der Einfluss unterschiedlicher Nährmedien auf die Kultivierung von embryogenem Kallus und in weiterer Folge auf die Embryoinitiation untersucht. Nachdem in vorangegangenen Arbeiten (Kazianka in Vorbereitung, Winter 2009, Hartl 2012) Faktoren wie Abscisinsäure, Adeninsulfat, Aktivkohle und Thidiazuron erprobt worden waren, lag das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit darin, die Osmotika Saccharose und Polyethylenglykol 4000 auszutesten. Es wurden MS-Medien mit 5 und 10 % Polyethylenglykol, ein Wechsel von MS-Medium mit 30 g/l Saccharose nach zwei Wochen auf ein osmotisch aktiveres mit 60 g/l Saccharose und als Referenz das gängige MS-Medium mit 30 g/l verwendet.

Im Gegensatz zur zygotischen Embryoentwicklung ist für somatische Embryos kontinuierliches Wachstum charakteristisch. Im zygotischen Embryo kommt es während der späten Phase der Embryoreifung zur Austrocknung und zum Entwicklungsstillstand, was für die Pflanze die Grenze zwischen Embryoreifung und -keimung darstellt (Thomas 1993). Bei Pflanzen wie *Daucus carota* und *Nicotiana tabacum* behindert das den somatischen Embryo in Wachstum und Entwicklung nicht, während in anderen Fällen, wie bei *Glycine max* (Barwale et al., 1986), *Medicago sativa* (Lai und McKersie 1994) und *Vitis vinifera* (Goebel-Tourand et al., 1993), das kontinuierliche Wachstum zur Bildung abnormer Strukturen und zu einer niedrigen Konversionsrate zu Pflanzen führt (Faure et al. 1998).

Polyethylenglykol wird bei somatischen Embryos als Osmotikum verwendet, um eine Austrocknungsphase zu erzielen, wie sie auch während der zygotischen

Embryoentwicklung vorkommt. Positive Auswirkungen von Polyethylenglykol auf die Weiterentwicklung und Reifung von Embryos wurden bereits bei anderen Fabaceen beobachtet. Denchev et al. (1991) berichteten bei *Medicago falcata* von einer verbesserten Weiterentwicklung globulärer Embryos zum torpedoförmigen Entwicklungsstadium durch Zugabe von PEG. Bei Walker und Parrott (2001) zeigten sich die höchsten Embryo-Keimungsraten von *Glycine max* auf Medium mit 10 % Polyethylenglykol. Auch bei Langhansová et al. (2004) und Maruyama (2009) konnten Vorteile für die somatische Embryoentwicklung durch Medien, denen Polyethylenglykol zugesetzt worden war, erzielt werden.

Als zweites Trockenstress-auslösendes Osmotikum diente in der vorliegenden Arbeit Saccharose. Bei einem üblichen Gehalt von 30 g/l Saccharose zeigt sich kaum osmotische Aktivität. Ob eine Erhöhung oder eine Senkung der Saccharose-Konzentration eine Verbesserung der Embryobildung und -reifung verursacht, hängt von der Spezies ab (George et al. 2008). Da sich die Vorarbeit von Hartl (2012) bereits mit Versuchen zur Erhöhung von Saccharose bei somatischer Embryogenese von *Glyzyrrhiza glabra* L. auseinandergesetzt hatte, wurde in dieser Arbeit der Kallus für zwei Wochen auf Medium mit 30 g/l kultiviert und danach ein Wechsel auf MS-Medium mit 60 g/l Saccharose vollzogen. Diese Behandlung hatte bei Komatsuda et al. (1992) die besten Ergebnisse für die Zunahme des Embryofrischgewichtes und die Embryoreifung geliefert.

Dass Osmotika nicht nur positive Effekte auf Embryoentwicklung und -reifung haben, zeigte sich bei Ozudogru et al. (2006). Hier wurde postuliert, dass die Erhöhung der Konzentration von osmotisch wirkenden Substanzen zu exzessivem Stress für die Pflanzen führte und die Entwicklung von somatischen Embryos bei *Camellia sinensis* L. hemmte.

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass Medien mit Polyethylenglykol signifikant weniger Embryos hervorbrachten als Medien ohne den Zusatz von Polyethylenglykol (vgl. Abbildung 3, S. 15). Ersichtlich war auch, dass eine Steigerung der PEG-Konzentration von 5 % auf 10 % eine Reduktion der Gesamtembryozahl pro Gramm von  $51,0 \pm 4,4$  auf  $11,9 \pm 1,6$  mit sich zog. Zum Vergleich brachte das Referenzmedium OS30 (vgl. Tabelle 3, S. 9)  $88,2 \pm 5,7$

Gesamtembryos pro Gramm hervor. Polyethylenglykol zeigte also einen signifikant negativen Effekt auf die Embryobildung, der sich bei zunehmender Konzentration verstärkte. Das lässt sich (wie bei Ozudogru et al. 2006) durch den hohen osmotischen Stress erklären, der durch Polyethylenglykol verursacht wurde.

Der Wechsel des Saccharosegehalts in Nährmedien von 30 g/l zu 60 g/l konnte die Embryoinitiation bei Süßholz ebenfalls nicht verbessern. Im Gegensatz zu Polyethylenglykol wurde die Anzahl gebildeter Embryos aber nicht gesenkt. Die Gesamtembryoanzahl pro Gramm unterschied sich hier nicht signifikant vom Medium OS30.

Um eine bestmögliche Embryobildung zu erreichen, sollte den vorliegenden Ergebnissen zufolge keine osmotische Behandlung während der Embryoinitiationsphase erfolgen.

Da schon die vorangegangenen Arbeiten von Hartl (2012) und Winter (2009) einen Einfluss des Genotyps bei der Embryogenese von *Glycyrrhiza glabra* L. beschrieben, wurden in der vorliegenden Arbeit alle Versuche zur Embryoinitiation und -reifung mit drei Genotypen (Klon 4, 10 und 11) von Kalluskulturen aus dem Jahr 2009 durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass unabhängig vom Kultivierungsmedium stets Klon 4 signifikant die niedrigste Gesamtembryoanzahl pro Gramm aufwies. Zwischen Klon 10 und 11 war kein signifikanter Unterschied festzustellen. Auffallend war hierbei, dass Klon 4 auf Vermehrungsmedium TDZ1 ein weitaus stärkeres Kalluswachstum als die anderen beiden Genotypen gezeigt hatte, das sich während der Embryoinitiationsphase fortgesetzt hatte. Ähnliche Beobachtungen konnten auch schon bei Hou und Jia (2004) gemacht werden, wo sich bei Untersuchungen zur indirekten somatischen Embryogenese bei *Astragalus melilotoides* Pall. keine embrogene Potenz bei stark- und schwachwachsenden Kalluskulturen, sondern ausschließlich bei mittelstarkem Wachstum zeigte. Während in der Diplomarbeit von Hartl (2012) Klon 4 noch mehr Embryos hervorbrachte, hatte er jetzt seine Fähigkeit, Embryos zu bilden, beinahe verloren. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wären somatoklonale Variationen. Es könnte aber auch eine Folge des zunehmenden Alters der Klonlinie sein. Beim Vergleich der Resultate der Kalluskulturen, die 2009 etabliert wurden, mit denen der neueren Kalluslinien von 2011 fanden wir mehr als

doppelt so viele Embryos pro Gramm bei den jüngeren Kulturen. Hier hatte Klon 110 signifikant mehr Embryos gebildet als Klon 6 und 18. Selbst Klon 18, der die niedrigste Gesamtembryoanzahl der neuen Kalluslinie aufwies, hatte mehr Embryos gebildet als die Linien der älteren Kulturen. Ein positiver Einfluss jüngerer Kulturen auf die Embryoinitiation war zu erkennen.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Embryoreifung. Wie im Literaturüberblick oben erwähnt, sollte diese durch Polyethylenglykol und den Wechsel der Saccharose-Konzentration verbessert werden. Es wurden dieselben Nährmedien untersucht wie zur Embryoinitiation (vgl. Tabelle 3, S. 9). Für die Auswertung wurden die prozentuellen Anteile der globulären, weiterentwickelten und gekeimten Embryos auf den verschiedenen Medien miteinander verglichen.

Hier konnten die Kulturen auf Medien mit 5 und 10 % Polyethylenglykol ähnlich ungünstige Ergebnisse wie bei der Embryoinitiation vorweisen. Sie brachten signifikant mehr globuläre und gleichzeitig weniger weiterentwickelte Embryos hervor als der Standard (MS-Medium mit 30 g/l Saccharose). Hinsichtlich der gekeimten Embryos fand man nur bei 10 % Polyethylenglykol signifikant niedrigere prozentuelle Anteile. Weder die Embryoinitiation noch die Embryoreifung konnten folglich durch den Zusatz von Polyethylenglykol zum Nährmedium optimiert werden. Betrachtet man im Vergleich dazu die Ergebnisse der Behandlung mit 30 und 60 g/l Saccharose, so führte diese zwar zu besserer Embryoreifung als Polyethylenglykol, eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu Medium OS30 konnte aber auch hier nicht erzielt werden. Bei keinem der differenzierten Embryostadien gab es signifikante Unterschiede zu erkennen (vgl. Abbildung 12, S. 22 und Tabelle 5, S. 23). Die einzelnen Kalluslinien lieferten auch hinsichtlich der Embryoreifung verschiedene Resultate. Klon 4 hatte im Überblick über alle Reifungsmedien prozentuell die meisten globulären und die wenigsten weiterentwickelten Embryos gebildet. Betrachtet man die Ergebnisse für jedes verwendete Nährmedium separat, so war dieses Verhältnis auf Medium OS30 umgekehrt. Hier zeigte sich bei Klon 4 der größte Anteil an weiterentwickelten Embryos. Korreliert man diese Werte allerdings mit den Gesamtembryoanzahlen, so lässt sich diese Entwicklung dadurch erklären, dass durch

die sehr geringe Gesamtembryoanzahl von durchschnittlich  $0,8 \pm 0,7$  pro Gramm auf Medium OS30 die prozentuellen Auswertung bei Klon 4 stark verzerrt wurde. Dem Einfluss auf die Embryoreifung von Klon 10 und 11 sollte hier also mehr Gewichtung beigemessen werden. Diese beiden Linien unterschieden sich nicht signifikant voneinander und spiegelten auch dieselben Ergebnisse wie ohne Berücksichtigung der Klone wieder.

Interessante Resultate waren beim Einfluss des Kallus-Alters auf die Anteile an den Entwicklungsstadien zu finden. Nachdem sich in den neueren Kalluskulturen bedeutend mehr Embryos gebildet hatten, zeigte sich bezüglich Embryoreifung ein negativer Effekt auf die Entwicklung der Embryos. Der Anteil an weiterentwickelten Embryos betrug lediglich  $13,4 \pm 1,6$  %. Die Embryos der jüngeren Kalluslinie waren in ihrer Reifung folglich stark verzögert. Nach sechs Wochen Kultivierung der Klone des Jahres 2011 konnten keine gekeimten Embryos gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlungen mit osmotisch aktiven Substanzen in dieser Arbeit im Rahmen von indirekter somatischer Embryogenese bei *Glycyrrhiza glabra* L. keine Verbesserung der Embryoinitiation oder -reifung hervorbrachte.

Abschließende Untersuchungen galten der Embryokeimung und der Konversion von Embryos zu Pflanzen. Für diesen Zweck wurden 12 verschiedene Medien ausgetestet. Alle Embryos von Klon 10 und 11, die auf den Medien OS30, PEG5 und OS30 kombiniert mit OS60 induziert worden waren, wurden für die Versuche zur Embryokeimung und Konversion herangezogen. Als Keimungsmedien kamen wuchsstofffreie und wuchsstoffhältige Medien zum Einsatz. In der Gruppe der mit Wuchsstoffen versetzten Nährmedien wurde Gibberellinsäure in Konzentrationen von 0, 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$ , kombiniert mit Indolylessigsäure (0 und 5  $\mu\text{M}$ ), verwendet. Medien ohne Wuchsstoffe waren MS  $\frac{1}{2}$  - und MS-Medien mit jeweils 10 und 30 g/l Saccharose. Nach zehn Wochen auf den Keimungsmedien wurden die Explantate noch weitere fünf Wochen auf MS  $\frac{1}{2}$  - Medium kultiviert, bevor die entstandenen Pflanzen ausgezählt wurden.

Das Phytohormon Gibberellinsäure zeigte meist hemmende Wirkung auf die Embryogenese (George 1993). In einigen Fällen konnte es aber auch mit Erfolg verwendet werden, um die Embryokeimung und auch die Konversion zur Pflanze zu fördern. Bei Langhansová (2004) wurden bei somatischen Embryos von *Panax ginseng* die besten Ergebnisse zur Pflanzenbildung auf MS  $^{1/2}$  - Medium mit 28.87  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> erzielt. Bei San und Dumanoglu (2007) erwiesen sich 8,6  $\mu\text{M}$  Gibberellinsäure ebenfalls als bestes Hilfsmittel, um die Keimung bei somatischen Embryos von *Juglans regia* zu optimieren. Weitere positive Effekte wurden von Kim et al. (2007), Kuo et al. (2002) und Nadolska-Orczyk (1992) beschrieben. Zur Stimulation des Wurzelwachstums und einer Begünstigung der Embryokeimung wird Gibberellinsäure häufig kombiniert mit dem Auxin Indolylessigsäure eingesetzt (George 1993). Diese Kombination wurde auch in der Arbeit von Singh und Chaturvedi (2009) verwendet.

Bevor Wachstumsstoffe zur Verbesserung der Keimung eingesetzt werden, testet man zuvor meist wachstumsstofffreie Nährmedien aus. Zur besseren Bewurzelung werden häufig Medien mit halbiertem Konzentration an Makroelementen oder niedrigem Saccharosegehalt angewendet. Bei Sholi et al. (2009) werden die gekeimten Embryos für die Konversion zur Pflanze und Bewurzelung auf MS-Medium mit 1 % Saccharose kultiviert. Die meisten Sämlinge bei Lai und McKersie (1995) wurden auf MS  $^{1/2}$  - Medium mit 1 % Saccharose gefunden.

Die Anzahl an Pflanzen war zum Zeitpunkt der Auswertung nach 110 Tagen auf Keimungsmedien sehr gering, deshalb können die Resultate nur als Tendenzen angesehen werden, die es in weiterführenden Arbeiten zu bestätigen gilt.

Aufgrund von ausgeprägter sekundärer Embryogenese konnte eine neuerliche Auszählung aller Embryos und Einteilung in die differenzierten Entwicklungsstadien nicht durchgeführt werden. Ebenso kam es häufig zur erneuten Bildung von Kallus an den Embryos, die auf die Keimungsmedien überimpft worden waren. Es konnte aber beobachtet werden, dass, im Gegensatz zur Auszählung nach sechs Wochen Embryoreifung, viele der Embryos sich in einem weiterentwickelten Stadium befanden beziehungsweise bereits gekeimt (vgl. Abbildung 21, S. 30) waren. Die signifikant meisten Pflanzen waren auf Medium OS10 zu finden. Es handelt sich dabei

um ein MS-Medium mit einem Gehalt an 10 g/l Saccharose. Auf diesem Medium hatten sich mehr als dreimal so viele Pflanzen entwickelt als bei den anderen Keimungsmedien. Auffallend ist, dass die Kulturen des einzigen Mediums mit ebenfalls 10 g/l Saccharose (1/2S10) das zweitbeste Ergebnis lieferte. Beide Medien waren zudem wuchsstofffrei. Es wurden Analysen durchgeführt, bei denen die eingesetzten Faktoren ohne Berücksichtigung der anderen mit der Anzahl an Pflanzen korreliert wurden. Diese hatten zur Folge, dass einzig die niedrige Saccharose-Konzentration von 10 g/l signifikante Ergebnisse in Bezug auf die entstandenen Pflanzen hervorbrachte. Betrachtete man die Auswirkungen auf die Konversion von Gibberellinsäure, Indolylessigsäure oder die Menge an Makroelementen separat, lieferten alle ungefähr die gleichen Zahlen. Auf den Medien mit Gibberellinsäure und Indolylessigsäure hatten sich ebenfalls Pflanzen entwickelt. Das einzige Medium, auf dem sich in der Zeit am Keimungsmedium keine Pflanze gebildet hatte, war Medium 1/2S30. Dieses MS  $\frac{1}{2}$  - Medium mit 30 g/l Saccharose unterschied sich dadurch aber nicht signifikant von den wuchsstoffhaltigen Keimungsmedien.

Eine mögliche Erklärung für die niedrige Anzahl an Pflanzen könnte eine Erkenntnis von Hartl (2012) liefern. In ihrer Arbeit beschreibt sie, dass zwischen einer Auswertung am 121. Tag auf Keimungsmedium und der Auszählung der Pflanzen am Tag 135 die Konversion von Embryos zu Pflanzen nochmal deutlich zugenommen hatte. Eine höhere Anzahl an Pflanzen nach längerer Kultivierung wäre auch in der hiervorliegenden Arbeit aufgrund der vielen gekeimten Embryos, die vorgefunden wurden, zu erwarten gewesen. Für weitere Arbeiten ist anzumerken, dass eine längere Zeit für die Embryokonversion von Nöten sein wird, um aussagekräftige Daten zu erhalten.

Ein etwaiger Grund für das schlechte Abschneiden der Keimungsmedien mit GA<sub>3</sub> und IAA könnte auch die lange Dauer von zehn Wochen sein, die die Embryos den Wuchsstoffen ausgesetzt waren. Viele Arbeiten bevorzugten eine Behandlung mit Gibberellinsäure für zwei bis vier Wochen (Kim et al. 2007, Komatsuda et al. 1992, Nadolska-Orczyk 1992). Ebenso wäre zu empfehlen, nicht alle gebildeten Embryos im Anschluss an sechs Wochen Embryoreifung auf Keimungsmedien zu überimpfen. Zu

## Diskussion

diesem Zeitpunkt war der Prozentsatz an globulären Embryos noch sehr groß (vgl. Abbildung 12, S. 22). Da Wachstumsstoffe wie Gibberellinsäure meist als Hemmstoffe auf die Embryogenese einwirken (George 1993) und Indolylessigsäure vor allem zur Förderung des Wurzelwachstums eingesetzt wird, sollten ausschließlich weit entwickelte bzw. reife Embryos mit diesen Faktoren behandelt werden.

Abschließend kann für das Vermehrungsprotokoll von *Glycyrrhiza glabra* L. mittels indirekter somatischer Embryogenese zur Embryoinitiation und Embryoreifung ausschließlich das Medium OS30 empfohlen werden. Zusätzlich wäre eine Verlängerung der Embryoreifungsphase anzudenken, da sich nach sechs Wochen beinahe 50 % der Embryos in einem globulären Stadium befanden und zu diesem Zeitpunkt die Embryos noch nicht vollständig vom Kallus getrennt werden konnten. Für die Keimung und Konversion zu Pflanzen sollten ausschließlich weit entwickelte oder reife Embryos und Medien mit einem Saccharosegehalt von 10 g/l verwendet werden. Da bei Hartl (2012) ebenfalls eine Senkung der Saccharose-Konzentration zu größeren Gesamtembryozahlen und guter Reifung geführt hatte, wäre ein Einsatz von 10 g/l Saccharose bereits während der Embryoreifung für weitere Untersuchungen in Erwägung zu ziehen.

## *Diskussion*

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Versuche zur indirekten somatischen Embryogenese bei Süßholz (*Glycyrrhiza glabra* L.) durchgeführt. Das Hauptziel der Untersuchungen war es, den Einfluss der Osmotika Polyethylenglykol und Saccharose auf die Bildung, Reifung und Keimung somatischer Embryos zu ermitteln. Weiters wurden die Effekte von Gibberellinsäure, Indolylessigsäure, Saccharose und halb dosierten Makroelementen im Zuge der Embryokeimung und Konversion bestimmt. Um etwaige Auswirkungen des Alters der Kalluskulturen auf die Initiation und Reifung der Embryos zu beurteilen, wurden auch neue Kalluslinien etabliert.

Die besten Resultate bezüglich Bildung und Reifung von Embryos konnten auf MS-Medium mit 30 g/l Saccharose erzielt werden. Hier waren die Gesamtembryoanzahl pro Gramm und der prozentuelle Anteil an weiterentwickelten Embryos am höchsten. Bei Einsatz von Polyethylenglykol oder 60 g/l Saccharose konnte keine Verbesserung der Ergebnisse beobachtet werden.

Neu etablierte Kalluskulturen zeigten signifikant höhere Gesamtembryozahlen, jedoch im Vergleich zu ein Jahr älteren Kalluslinien eine stark verzögerte Embryoreifung.

Bei den Versuchen zu Keimung und Konversion der Embryos kamen Gibberellinsäure in Konzentrationen von 0, 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$ , kombiniert mit Indolylessigsäure (0 und 5  $\mu\text{M}$ ), sowie MS- und MS  $^{1/2}$ -Medien mit jeweils 10 g/l und 30 g/l Saccharose zum Einsatz. Die besten Ergebnisse lieferten MS- und MS  $^{1/2}$ -Medien mit 10 g/l Saccharose. Auf diesen Medien bildeten sich signifikant mehr Pflanzen. Gibberellinsäure und Indolylessigsäure zeigten weder positive noch negative Effekte auf die Keimung und Konversion von somatischen Embryos.

Es konnten somit geeignete Saccharose-Konzentrationen für die Bildung und Konversion somatischer Embryos von *Glycyrrhiza glabra* L. gefunden und positive Effekte von Polyethylenglykol und hohen Konzentrationen Saccharose auf die Embryobildung und -reifung ausgeschlossen werden.

## *Zusammenfassung*

## 6. SUMMARY

The present study deals with further investigations on indirect somatic embryogenesis in liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). The main aim was to evaluate the influence of osmotically active substances like polyethylen glycole and sucrose on initiation, maturation and germination of somatic embryos. Also effects of gibberellic acid, indole acetic acid, sucrose and half-strength major salts in semi-solid MS media on embryos germination and conversion have been tested. To check out the impact of callus age on embryo initiation and maturation new callus cultures were established.

The best results in embryo initiation and maturation were achieved with MS media containing 30 g/l sucrose. Significantly more total embryos per gram were formed and also a higher percentage of developed embryos were observed. Polyethylene glycole or 60 g/l sucrose could not improve these results.

Newly established callus cultures produced more total embryos but compared to older cultures embryo ripening was deferred.

Concerning the germination and conversion of somatic embryos media supplemented with different concentrations of GA<sub>3</sub> (0, 1, 5 or 10 µM) combined with IAA in concentrations of 0 and 5 µM, and as well MS media with full-strength or half-strength major salts combined with 10 g/l and 30 g/l sucrose were tested. MS media containing full-strength or half-strength major salts and 10 g/l resulted in significantly enhanced embryo conversion to plants. Neither positive nor negative effects of gibberellic acid or indole acetic acid on embryo germination and conversion could be observed.

To summarise, suitable concentrations of sucrose for the formation and conversion of somatic embryos in *Glycyrrhiza glabra* L. were found, whereas any beneficial effects of polyethylene glycole and higher concentrations of sucrose on embryo formation and maturation could be ruled out.

## *Summary*

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Akao T., Terasawa T., Hiai S., Kobashi K. (1992), Inhibitory effects of glycyrrhetic acid derivatives on 11 $\beta$ - and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases of rat liver, Chem Pharm Bull **40**: 3021-3024

Asl M. N., Hosseinzadeh H. (2008), Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds, Phytother Res **22**: 709-724

Barwale U. B., Kerns H. R., Widholm J. M. (1986), Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis, Planta **167**: 473-481

Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J. (2000), Herbal Medicine: Expanded Comission E Monographs, American Botanical Council: Newton, 233-236

Cooke W. M., Baron J. H. (1971), Metabolic studies of deglycyrrhizinised liquorice in two patients with gastric ulcer, Digestion **4**: 264-268

Denchew P., Velcheva M., Atanassov A. (1991), A new approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*, Plant Cell Rep **10**: 338-341

Faure O., Dewitte W., Nougarede 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., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D., Bielenberg J. (2008), Antiviral effects of *Glycyrrhiza* species, Phytother Res **22**: 141-148

Fursova E. (2006), In vitro-Vermehrung von *Glycyrrhiza glabra* L. über Nodienkultur, Diplomarbeit, Universität Wien

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

George E. F., Hall M. A., De Klerk G. (2007), Plant Propagation by Tissue Culture, 3. Auflage, Springer, Dordrecht, S. 115-175

Goebel-Tourand I., Mauro M. C., Sossountzov L., Miginiac E., Deloire A. (1993), Arrest of somatic embryo development in grapevine: Histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development, Plant Cell Tissue Organ Cult **33**: 91-103

Hänsel R., Sticher O. (2010), Pharmakognosie Phytopharmazie, 9. Auflage, Springer, Heidelberg, S. 877-883

Hartl D. (2012), Untersuchungen zur Bildung und Reifung von somatischen Embryos bei *Glycyrrhiza glabra* L., Diplomarbeit, Universität Wien

Hou D., Jia J. (2004), High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis, Plant Cell Tissue Cult **79**: 95-100

Isbrucker R. A., Burdock G. A. (2006), Risk and safety assessment on the consumption of licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin, Regulatory Toxicol Pharmacol **46**: 167-192

Kageyama Y., Suzuki H., Saruta T. (1992), Glycyrrhizin induces mineralocorticoid activity through alterations in cortisol metabolism in the human kidney, J Endocrinol **135**: 147-152

Kato H., Kanaoka M., Yano S., Kobayashi M. (1995), 3-Monoglucuronylglycyrrhetic acid is a major metabolite that causes licorice-induced pseudoaldosteronism, J Clin Endocrinol Metab **80**: 1929-1933

Kazianka C., Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung

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

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

Kuo C. L., Sagare A. P., Lo S. F., Lee C. Y., Chen C. C., Tsay H. S. (2002), Absciscic acid promotes development of somatic embryos on converted somatic embryos of *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae), J Plant Physiol **159**: 423-427

Lai F. M., McKersie B. D. (1994), Regulation of storage protein synthesis by nitrogen and sulfur nutrients in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, Plant Sci **103**: 209-221

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

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

Larkworthy W., Holgate P. F. (1975), Deglycyrrhizinised liquorice in the treatment of chronic duodenal ulcer. A retrospective endoscopic survey of 32 patients, Practitioner **215**: 787-792

Maruyama T. E. (2009), Polyethylene glycol improves somatic embryo maturation in big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae), Bulletin of FFPRI **412**: 167-173

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

Nadolska-Orczyk A. (1992), Somatic embryogenesis of agriculturally important lupine species (*Lupinus angustifolius*, *L. Albus*, *L. mutabilis*), Plant Cell Tissue Organ Cult **28**: 19-25

Ozudogru E. A., Ozden-Tokatli Y., Akcin A. (2006), Effect of Mannitol and ABA on Induction of Somatic Embryogenesis in Tea (*Camellia sinensis* L.), In vitro Culture and Hort. Breeding **725**: 411-416

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 camalduensis*, Nat Prod Res **21**: 1234-1241

San B., Dumanoglu H. (2007), Effect of desiccation, cold storage, and gibberellic acid on germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia*), New Zealand J Crop Hort Sci **35**: 73-78

Sholi J. Y., Chaurasia A., Agrawal A., Sarin N. B. (2009), ABA enhances plant regeneration of somatic embryos derived from cell suspension cultures of plantain cv, Spambia (*Musa* sp.), Plant Cell Tiss Organ Cult **99**: 133-144

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

Walker D. R., Parrott W. A. (2001), Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion, *Plant Cell Tissue Organ Cult* **64**: 55-62

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

Yu X.-Q., Xue C. C., Zhou Z.-W., Li C.-G., Du Y.-M., Liang J., Zhou S.-F. (2008), In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanism of glabridin, a major active isoflavan from *Glycyrrhiza glabra* (licorice), *Life Sci* **82**: 78-78



# Lebenslauf

## Barbara WEINSTABL



### Persönliche Daten

|                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| <b>Geburtsdatum:</b> | 19.11.1986                            |
| <b>Geburtsort:</b>   | Waidhofen an der Thaya                |
| <b>Nationalität:</b> | Österreich                            |
| <b>Adresse:</b>      | Forsthausgasse 16-20/18/23, 1200 Wien |
| <b>Email:</b>        | barbaraweinstabl@gmx.at               |

### Ausbildung

|                          |                                                                                     |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>09/1992 - 06/1996</b> | Volksschule, 3860 Heidenreichstein                                                  |
| <b>09/1996 - 06/2004</b> | Bundesrealgymnasium Waidhofen a. d. Thaya                                           |
| <b>Seit 10/2004</b>      | Universität Wien, Studium der Pharmazie<br>an der Fakultät für Lebenswissenschaften |

### Praktische Erfahrung

|                          |                                                                                                              |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>07/2008 - 04/2011</b> | Leonhardus Apotheke, 1200 Wien                                                                               |
| <b>10/2010 - 05/2011</b> | Durchführung des praktischen Teils der<br>Diplomarbeit am Department für<br>Pharmakognosie, Universität Wien |