

Somatische Embryogenese in den Kulturen der Chrysantheme (*Chrysanthemum x grandiflorum*) (Ramat.) Kitam)

Zusammenfassung

Die großblumige Chrysantheme (*Chrysanthemum x grandiflorum*) (Ramat. Kitam) ist eine der beliebtesten Zierpflanzen. Alle Chrysanthemensorten werden auf eine herkömmliche Art und Weise oder mit Hilfe von Mikrostecklingen in *In-vitro*-Kulturen vermehrt. Da der Bedarf an Setzlingen dieser Pflanze sehr groß ist, wird es stets nach Methoden der Vermehrung von Pflanzen dieser Pflanzenart gesucht, die eine große Anzahl von Setzlingen in einer verhältnismäßig kurzen Zeit gewinnen lassen. Ein solches Verfahren bildet die somatische Embryogenese, bei dem die Bildung von Embryonen aus somatischen Zellen in *In-vitro*-Kulturen erfolgt. Trotz potentieller Möglichkeiten ist es jedoch ein Prozess, der von vielen Umweltfaktoren abhängt und in großem Maße mit dem Genotyp der vermehrten Pflanzen korreliert. Da es an einer gut erarbeiteten Methode zur Gewinnung somatischer Embryonen für eine derart wirtschaftlich bedeutende Pflanze wie Chrysantheme fehlt, wird hier ein Versuch unternommen, die maximale Anzahl von Faktoren zu bestimmen, die den Verlauf des Prozesses beeinflussen.

Das Ziel der Arbeit stellt die Wahl des für die Bildung und Vermehrung von Kalluskulturen der großblumigen Chrysantheme optimalsten Nährmediums dar, mit einer besonderen Berücksichtigung der bisher selten verwendeten Auxine Picloram und Dicamba. Bei den Untersuchungen wird auch versucht, den Einfluss der Wachstumsregulatoren auf die Induktion der indirekten somatischen Embryogenese in Kalluskulturen und der direkten somatischen Embryogenese mit einer besonderen Berücksichtigung der Auswirkung von Polyaminen (Putrescin, Spermin, Spermidin) auf den Verlauf des Prozesses zu bestimmen. Das Kallusgewebe wurde auf Agar-Nährböden mit Zusatz der Auxine 2,4-D, NAA, IBA, IAA, PIK und DIC, des Zytokins BAP und der Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin induziert. Der induzierte Kallus wurde in der ersten Phase der Untersuchungen auf festen Nährböden mit Zusatz der erwähnten Auxine, des BAP und der Polyamine vermehrt. Gleichzeitig wurde der Einfluss der Mineralstoffe und des Lichts auf die Vermehrung des Kallusgewebes in flüssigen Nährmedien in einem Bioreaktor bestimmt.

Das in flüssigen und festen Nährmedien vermehrte Kallusgewebe sowie Blatteile wurden als Explantate in der nächsten Phase der Untersuchung verwendet; es wurden somatische Embryonen gebildet, die dann im Rahmen einer Etappe auf Nährmedien mit Zusatz von Kohlenhydraten, Caseinhydrolysat und Aktivkohle in verschiedenen Gehaltsverhältnissen regeneriert wurden. Es wurde auch der Einfluss des Weichens in ABA auf die Konversion von Embryonen untersucht. Bestimmt wurde auch die Auswirkung der Mineralstoffzusammensetzung des Nährbodens und der organischen Zusätze auf die Regeneration soma-

tischer Embryonen. Während aller Etappen der Untersuchung wurde insbesondere der Lichteinfluss auf den Verlauf der Kaulogenese und somatischen Embryogenese beobachtet.

Mit den Untersuchungen wurde auch die Bestimmung des Bereichs der Variabilität von Regeneranten in Abhängigkeit von Regenerationsbedingungen bezweckt. Es wurde die DNS analysiert, die aus einem einen Monat bis ein Jahr lang auf Agar-Nährböden sowie in flüssigen Nährmedien vermehrten Kallusgewebe aus Pflanzen isoliert wurde, die aus Embryonen im Rahmen einer direkten und indirekten Embryogenese auf dem oben erwähnten Kallusgewebe regeneriert wurden. Bestimmt wurde auch das Variabilitätsniveau von 50 Regeneranten, die im Rahmen der indirekten und direkten SE nach dem für die Zwecke der Arbeit erarbeiteten Protokoll gewonnen wurden.

Auf der Grundlage der durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Stoffe Picloram und Dicamba für die Induktion von Kalluskulturen und somatischer Embryogenese verwendet werden können, wobei jedoch ihre Wirksamkeit gering ist. Der Zusatz von Spermidin beeinflusst positiv den Verlauf der Kaulogenese und Bildung somatischer Embryonen in zusätzlich beleuchteten Kulturen. Die Anwendung eines Wachstumsregulators in der Phase der Kallusinduktion bewirkt die Bildung einer großen Menge Kallusgewebe mit embryogenem Charakter und in der Phase der Einleitung somatischer Embryogenese wirkt sie sich günstig auf die Anzahl der sich herausbildenden Embryonen aus.

Die Lichtbedingungen der Kulturzucht haben einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung von Pflanzen in *In-vitro*-Kulturen. Die zusätzliche Rotlichtbeleuchtung der Kulturen trägt zur Steigerung des Gewichtes des Kallusgewebes und der Häufigkeit somatischer Embryonen bei. Das Blaulicht bewirkt das Absterben von Kalluskulturen und hemmt die Bildung somatischer Embryonen. Der Lichtbedarf war in den einzelnen Etappen der durchgeführten Untersuchungen unterschiedlich. Das Kallusgewebe kann sogar sechs Monate lang in Dunkelheit induziert und vermehrt werden. Zwar ist die Bildung somatischer Embryonen ohne Licht nicht möglich, die Dunkelheit wirkt sich aber positiv auf ihre Keimung, nachdem sie das richtige Entwicklungsstadium erreicht haben.

Die Kalluskulturen, die in einem flüssigen Nährmedium mit dem Spuren- und Makroelementgehalt nach Murashige und Skoog (1962) mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA und $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP in einem Bioreaktor gezüchtet werden, lassen eine große Menge des Kallusgewebe innerhalb einer kurzen Zeit gewinnen. Das unter solchen Bedingungen entstandene Gewebe eignet sich jedoch nicht für die Induktion der somatischen Embryogenese.

Das vorgeschlagene Protokoll zur Vermehrung der Chrysantheme umfasst die Induktion des Kallusgewebes auf dem MS-Nährmedium mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA und BAP und $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Spermidin, seine spätere Vermehrung auf einem Nährmedium mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP, die Induktion der somatischen Embryogenese auf einem Nährmedium mit Zusatz von $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP und $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Spermidin. Die Konversion der auf diesem Wege gewonnenen Embryonen soll auf einem Nährmedium, dessen Zusammensetzung der 1/2 der Mineralstoffzusammensetzung des Nährmediums

nach Murashige und Skoog (1962) entspricht, mit Zusatz von $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ Saccharose in Dunkelheit durchgeführt werden.

Eine große Anzahl somatischer Embryonen kann man gewinnen, indem man Teile von Blattspreiten in ein Nährmedium mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP und $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Spermidin gibt und dann die Embryonen auf einem Nährmedium, dessen Zusammensetzung der 1/2 der Mineralstoffzusammensetzung des MS-Nährmediums entspricht, mit Zusatz von $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ Saccharose in Dunkelheit regeneriert. Auf der Grundlage der Beurteilung der genetischen Homogenität von Regeneraten mit der ISSR-PCR-Methode konnte festgestellt werden, dass das vorgeschlagene Regenerationssystem Nachkommenpflanzen ohne Risiko der genetischen Instabilität der Regenerate gewinnen lässt.

