

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

Herausgeber: Geobotanisches Institut, Stiftung Rübél (Zürich)

Band: 112 (1993)

Artikel: Kryokonservierung von "Lemnaceae" = Cryopreservation of "Lemnaceae"

Autor: Sauter, Peter Richard

Kapitel: 3: Resultate

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

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 02.11.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

3. RESULTATE

3.1. MORPHOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN

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

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

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

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

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

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

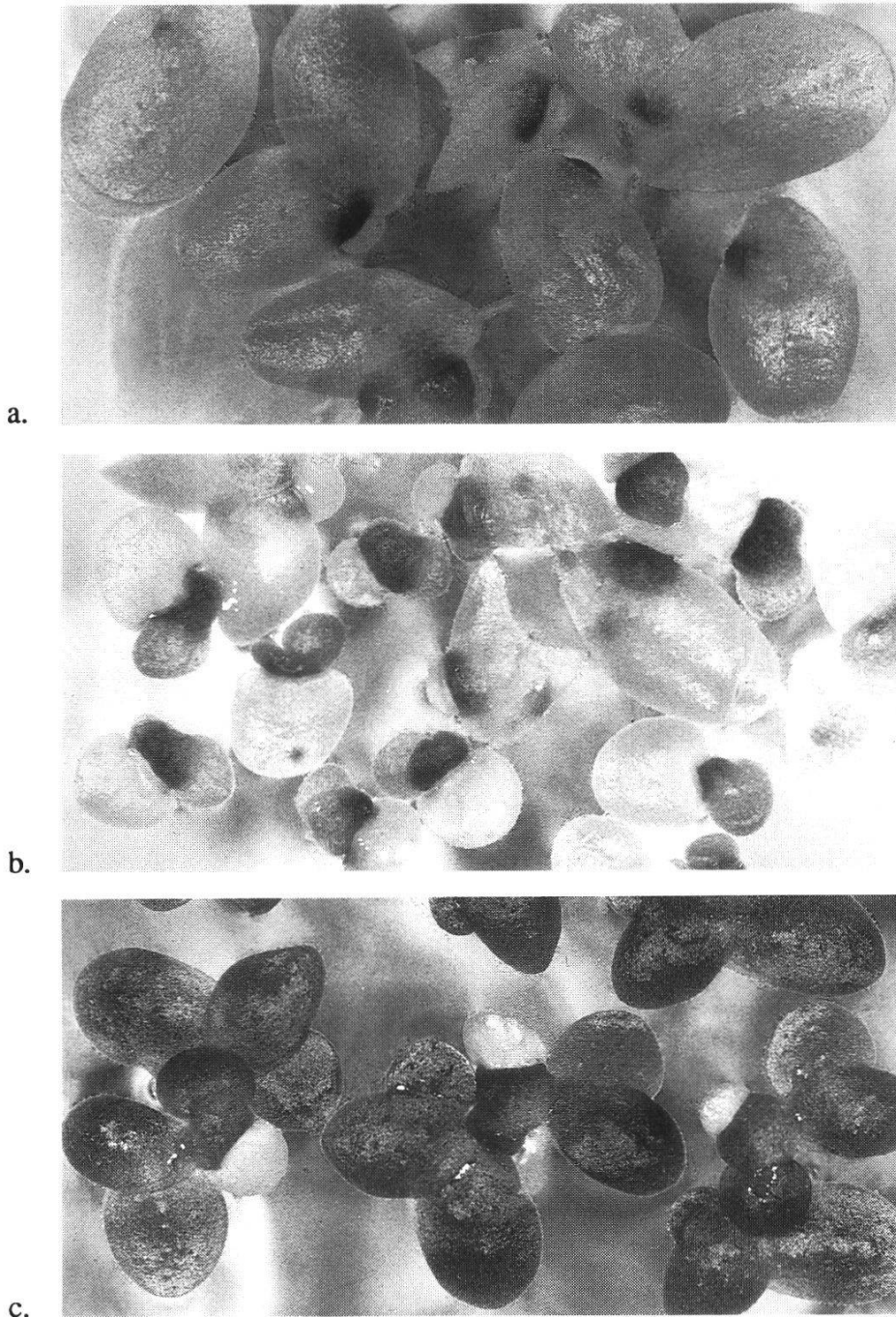


Fig. 5. Auswachsen überlebender Knospen von *Lemna minor* (Stamm 8765) nach dem Auftauen.

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

- a. Einige Tage nach dem Auftauen sind die toten Mutterglieder verblasst und die überlebenden Knospen als dunkle Punkte sichtbar.

A few days after thawing the mother fronds are pale whereas the surviving buds are visible as dark points.

- b. Die überlebenden Knospen beginnen auszuwachsen. – *Surviving buds are growing.*

- c. Aus Knospen neugebildete Pflanzen. Die primär überlebenden Tochterglieder sind oft am abgestorbenen Apikalteil zu erkennen.

Plants reproduced from buds. Primary surviving daughter fronds can be recognized often by their dead apical part.

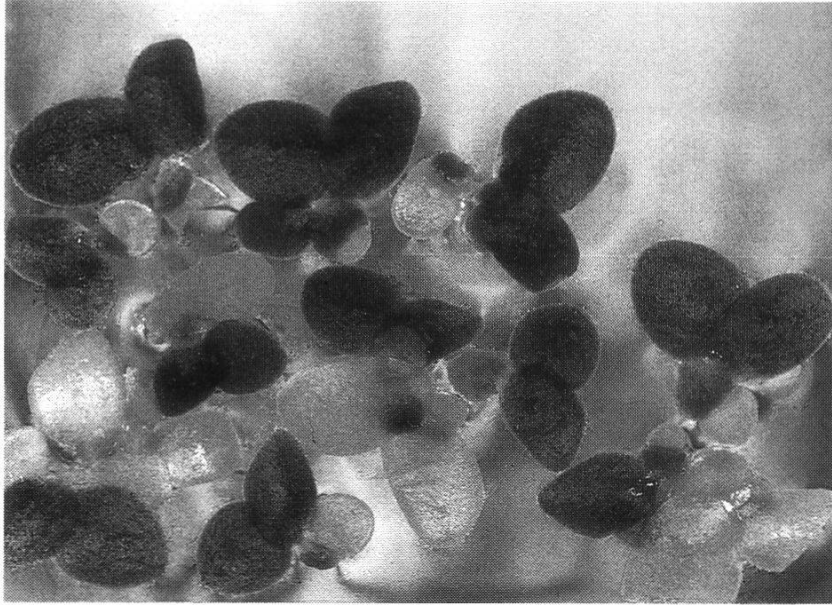


Fig. 6. Frisch ausgewachsene *Lemna japonica*-Pflanzen (Stamm 8339) nach dem Auftauen: Das primär auswachsende Tochterglied bleibt oft deutlich kleiner als die Glieder nachfolgender Generationen.

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

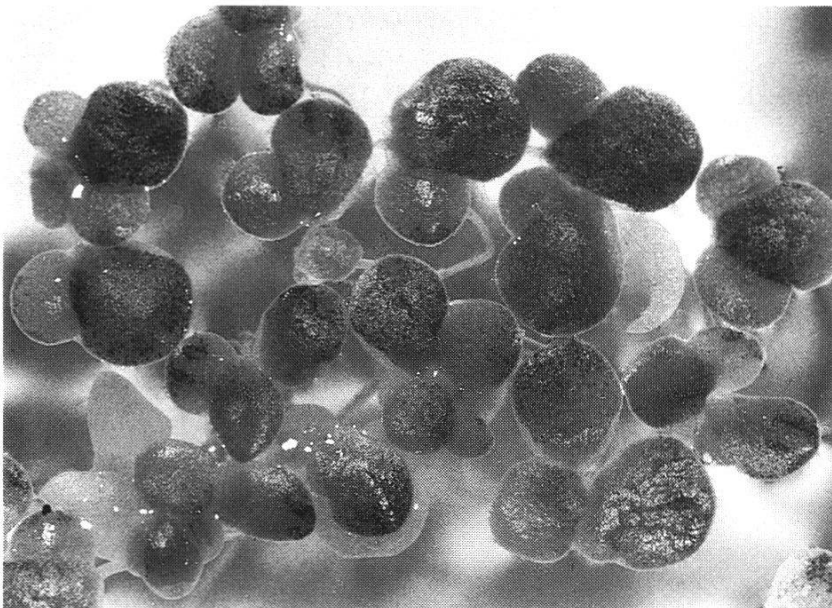


Fig. 7. Anthozyanbildung bei *Lemna gibba*-Pflanzen (Stamm 7262), 30 Tage nach dem Auftauen. Die roten Pigmente sind als dunkle Punkte erkennbar.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tab. 4. Keimraten trockener und gewässelter Radieschensamen [%], die mit dem Gefrierapparat eingefroren wurden, wobei verschiedene Gefrierschutzmittel getestet wurden. Für jedes Experiment wurden mindestens 50 Samen verwendet.

Germination rates of dry and water-soaked radish seeds [%], which were cooled with the freezing apparatus in the presence of different cryoprotectants. At least 50 seeds were used for each experiment.

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

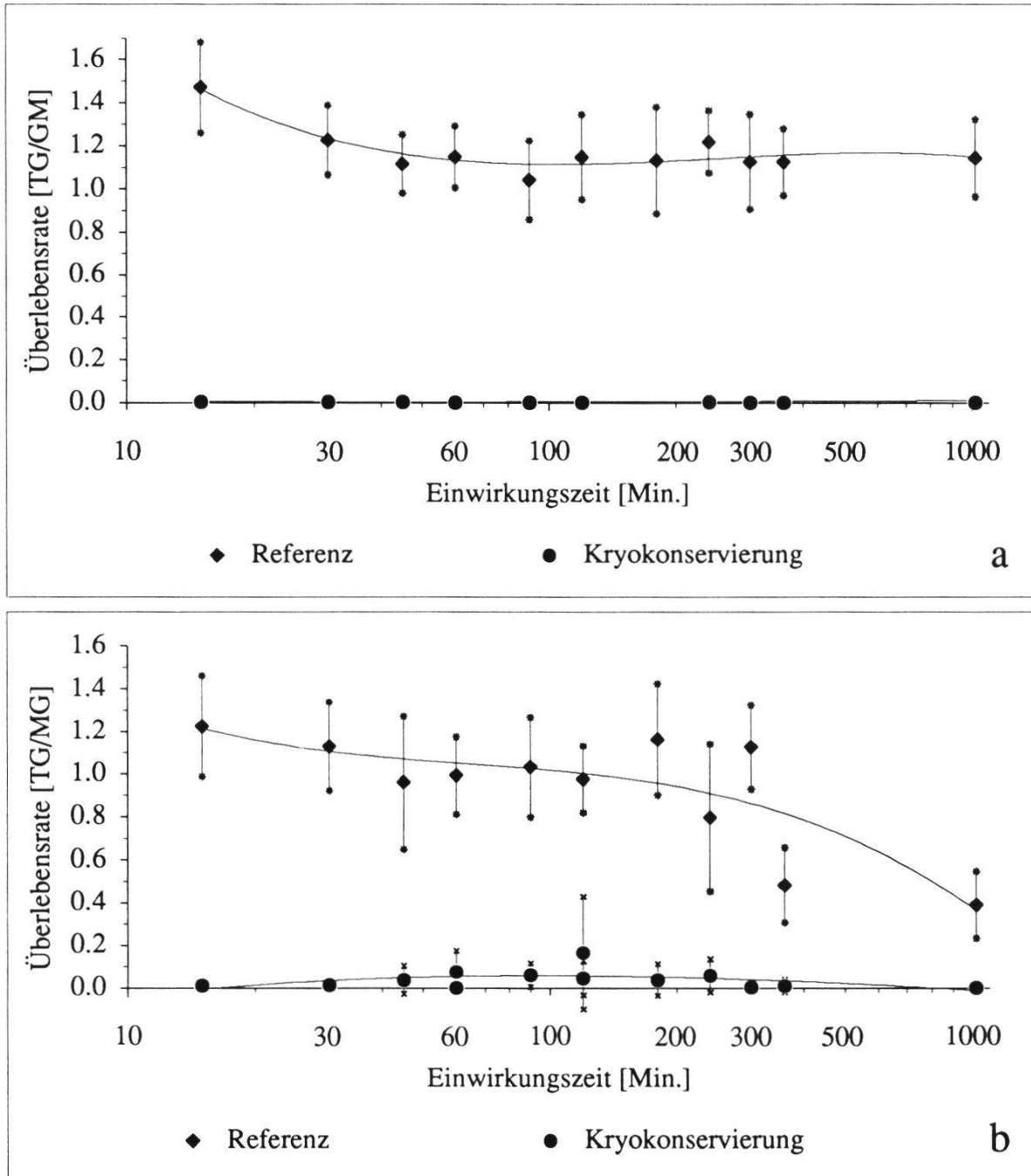


Fig. 8. Einfluss verschieden konzentrierter Glycerinlösungen auf die Überlebensrate nicht tiefgefrorener und mit dem Gefrierapparat eingefrorener *Lemna minor*-Pflanzen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit. Durch die Punkteschar der Mittelwerte wurde ein Polynom 3. Grades gelegt. Die Standardabweichung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

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

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

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

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

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

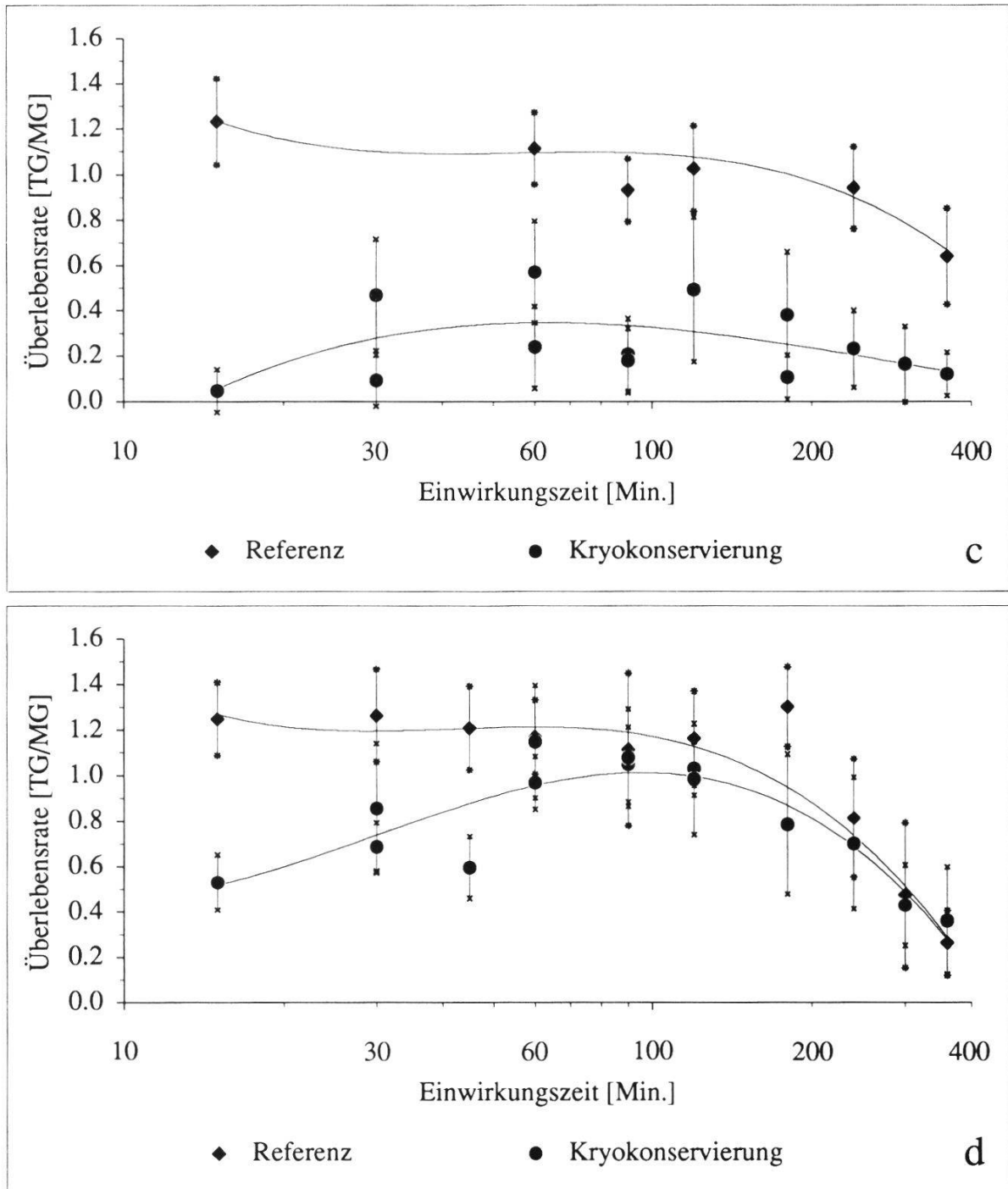


Fig. 8 (Forts. – continued)

c. 45% Glycerin – 45% glycerol

d. 50% Glycerin – 50% glycerol

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

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

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

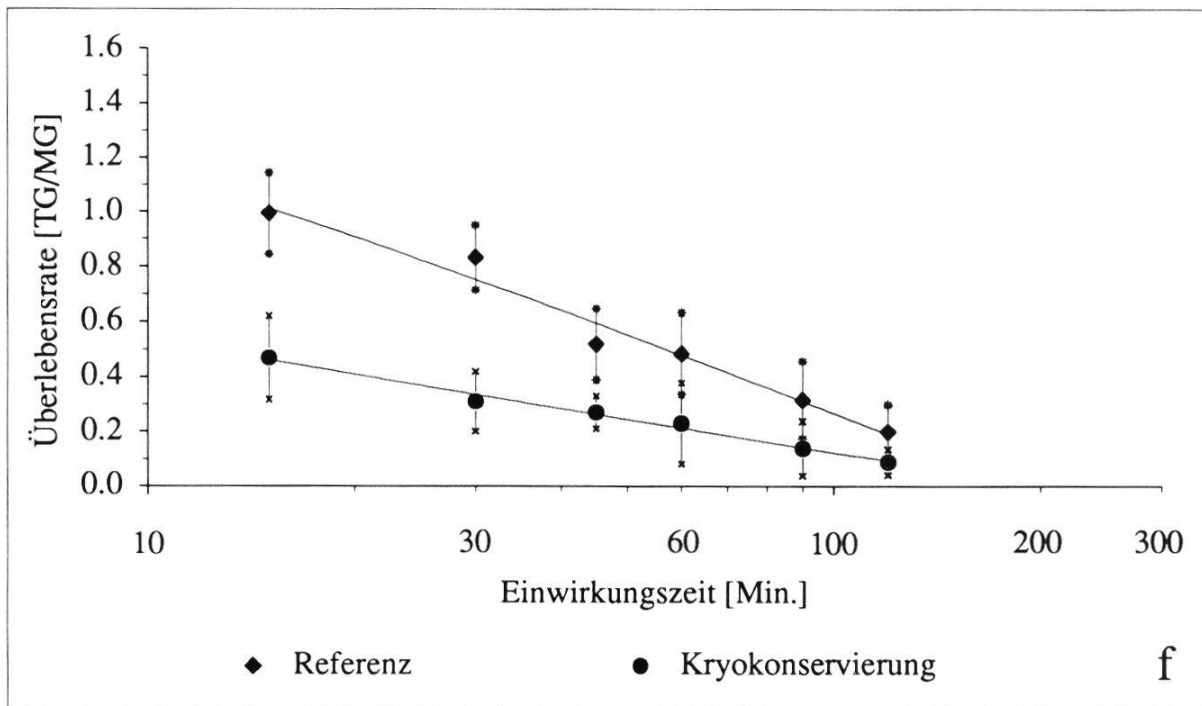
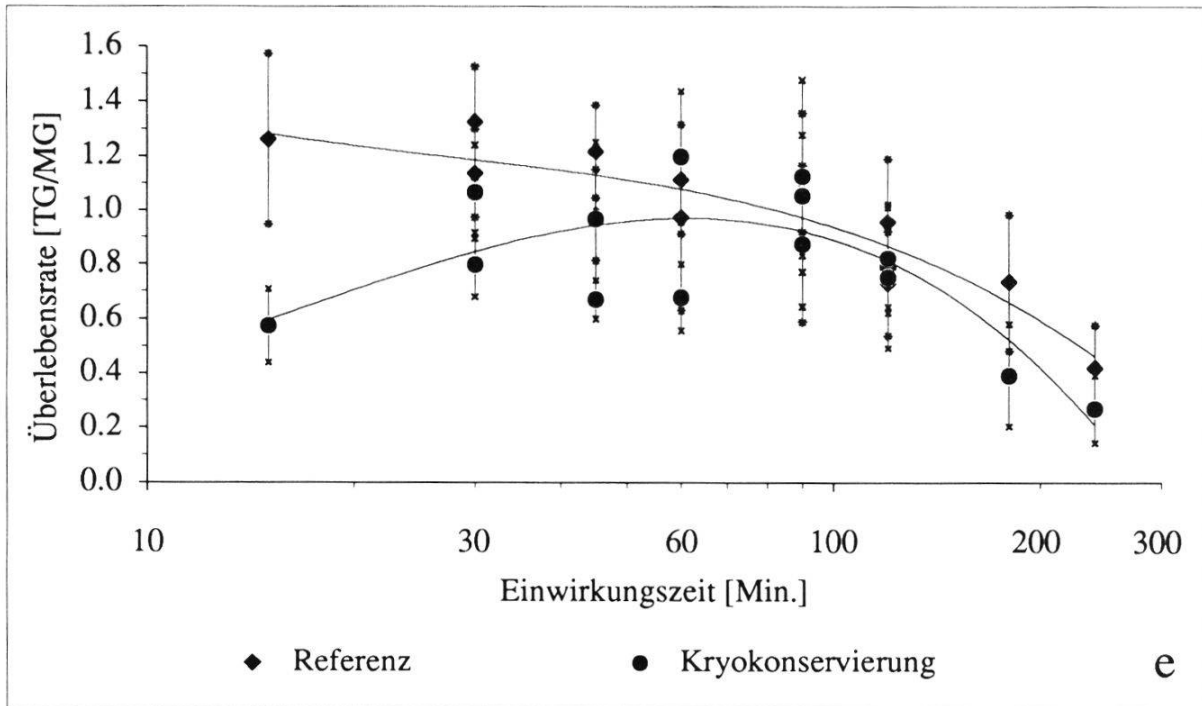


Fig. 8 (Forts. – continued)

e. 60% Glycerin – 60% glycerol

f. 80% Glycerin – 80% glycerol

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

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

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

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

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

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

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

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

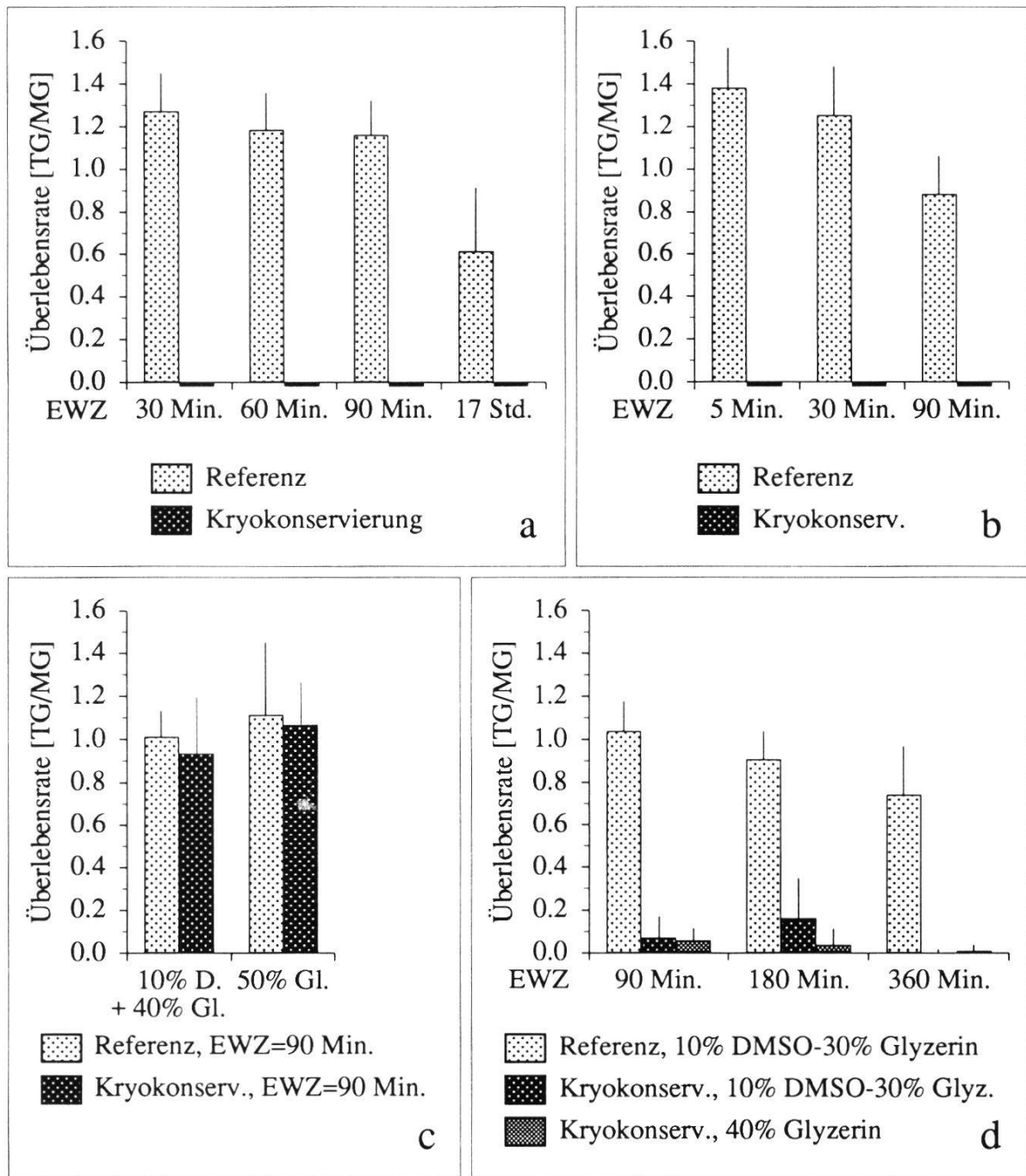


Fig. 9. Einfluss verschiedener Gefrierschutzlösungen auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener *Lemna minor*-Pflanzen. Einfrierexperimente erfolgten mit dem Gefrierapparat.

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

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

b. 60% Polyvinylpyrrolidon – 60% polyvinylpyrrolidone

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

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

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

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

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

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

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

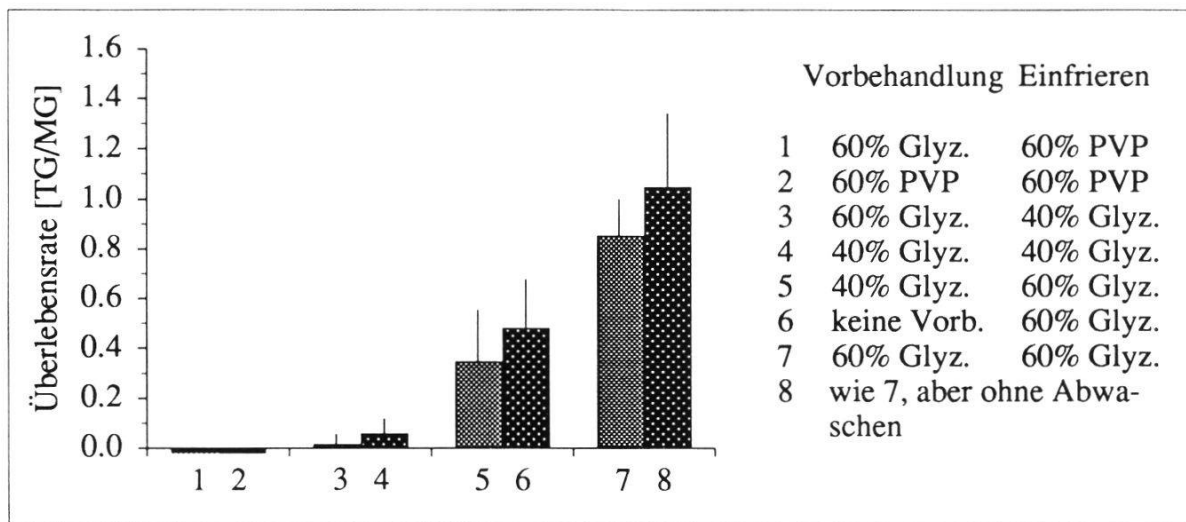


Fig. 10. Einfluss verschiedener Gefrierschutzmittel auf die Überlebensrate von *Lemna minor*, sowohl während der Einwirkungs- wie auch Gefrierphase. Die Proben wurden während 90 Minuten mit einem Gefrierschutzmittel behandelt, danach kurz mit sterilem Wasser abgespült und sofort nach erneuter Gefrierschutzmittelzugabe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

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

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

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

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

3.2.2. Einfluss von Vorkühltemperatur, Gefrier- und Auftaugeschwindigkeit

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

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

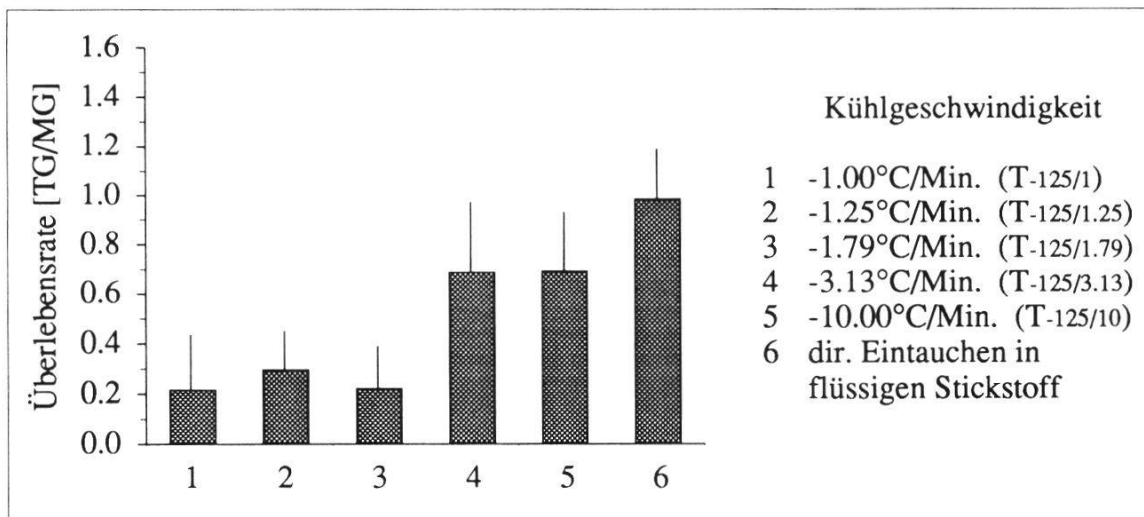


Fig. 11. Einfluss der Kühlgeschwindigkeit auf die Überlebensrate von *Lemna minor*. Als Gefrierschutzmittel wurde 50% Glyzerin verwendet, das 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben wurde.

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

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

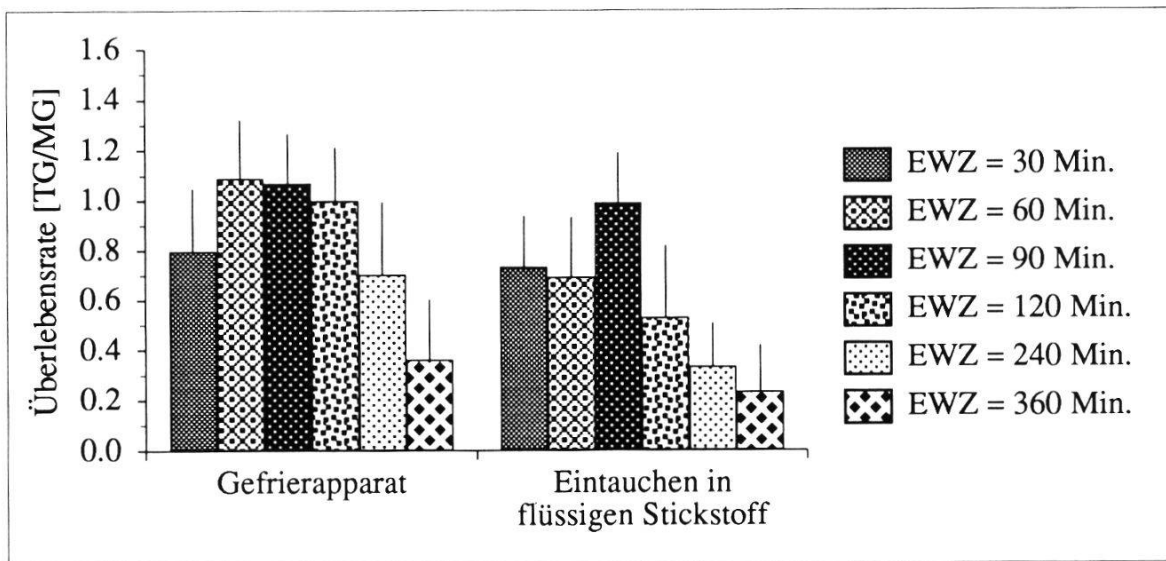


Fig. 12. Überlebensrate von *Lemna minor*-Pflanzen, die entweder mit dem Gefrierapparat oder durch direktes Eintauchen der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff tiefgekühlt wurden. Die Pflanzen wurden nach verschieden langer Vorbehandlung (EWZ) in 50% Glycerin tiefgefroren.

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

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

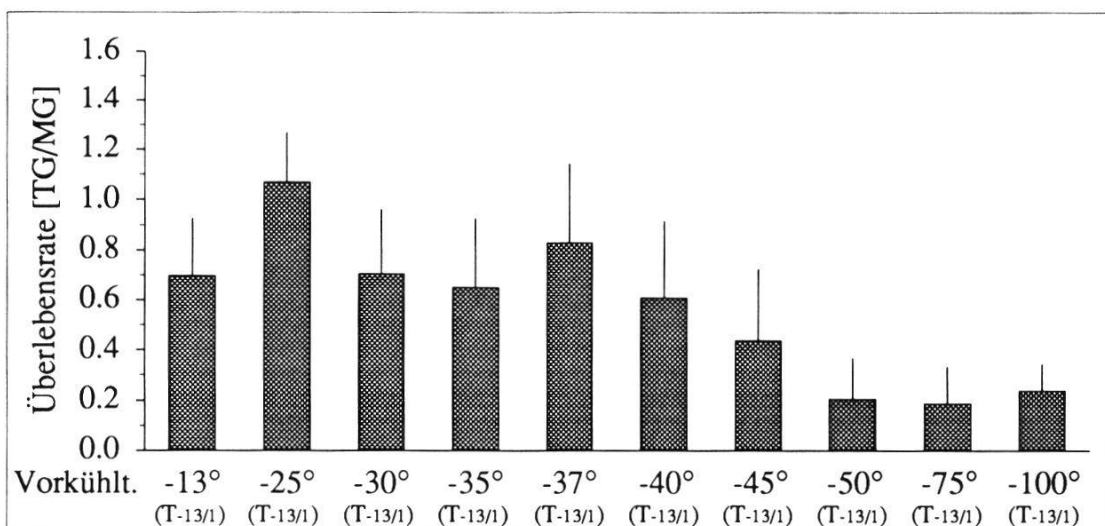


Fig. 13. Einfluss der Vorkühltemperatur auf die Überlebensrate von *Lemna minor*. Als Gefrierschutzmittel wurde 50% Glycerin verwendet, das 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben wurde.

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

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

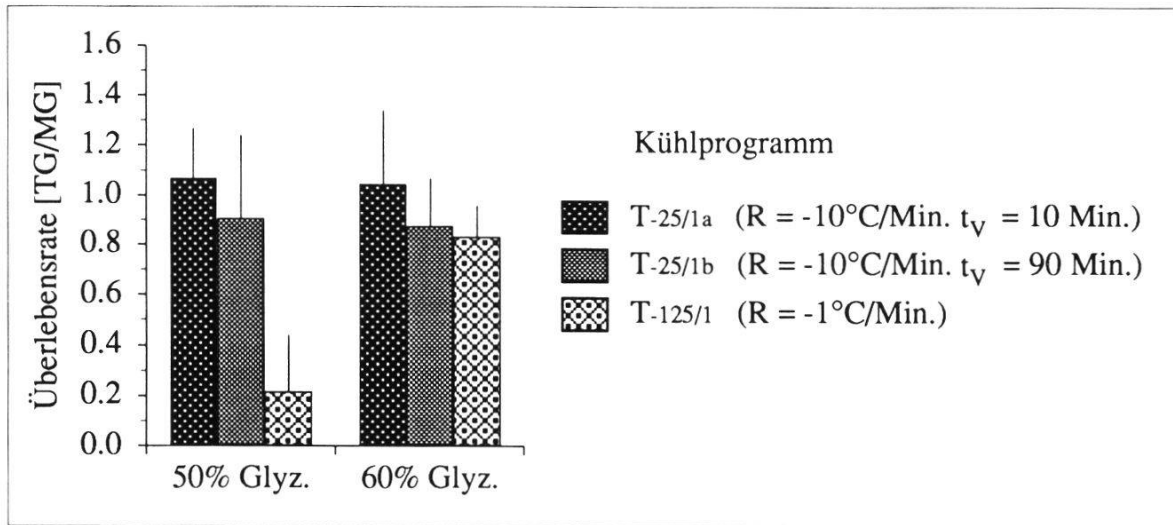


Fig. 14. Einfluss des Glyzeringehalts auf die Überlebensrate von *Lemna minor* unter Anwendung von zwei verschiedenen Kühlraten. (R = Kühlrate im Kristallwachstumsbereich des Gefrierschutzmittels, t_v = Dauer der Ausgleichsphase bei der Vorkühltemperatur). Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 90 Minuten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

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

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

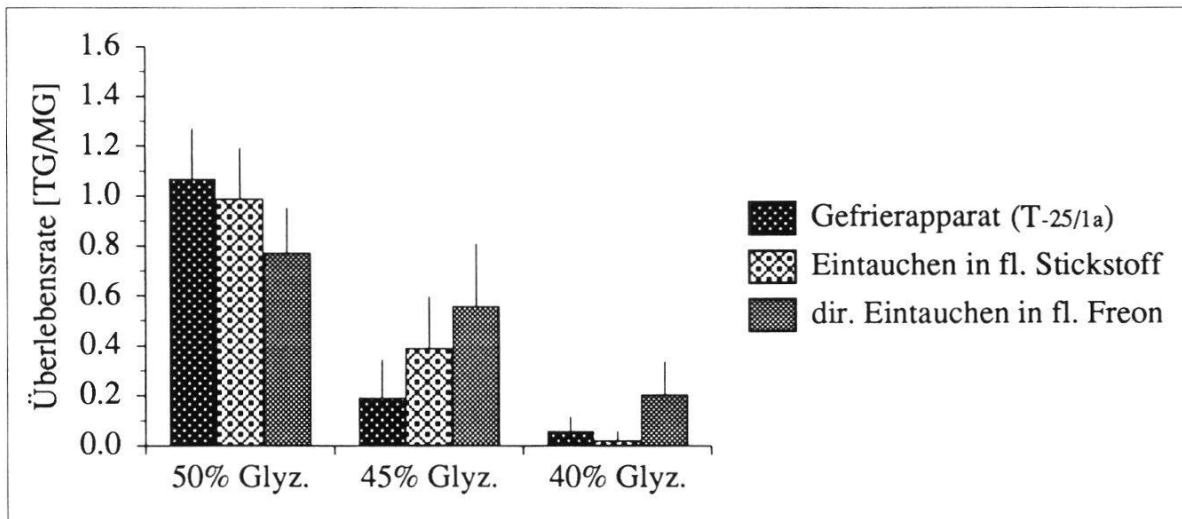


Fig. 15. Einfluss von Gefriermethoden, die sich bezüglich Kühl- und Auftaugeschwindigkeit unterscheiden, auf die Überlebensrate von *Lemna minor*, wenn als Gefrierschutzmittel verschieden konzentrierte Glycerinlösungen verwendet werden. Die Lösungen wurden 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben.

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

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

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

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

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

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

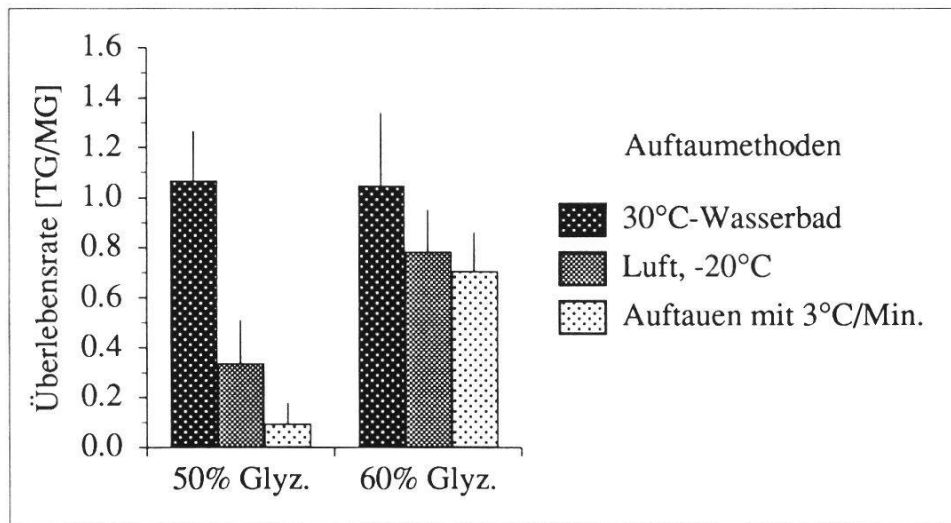


Fig. 16. Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf die Überlebensrate von *Lemna minor* Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden. Als Gefrierschutzmittel wurden 50% und 60% Glycerin verwendet. Die Zugabe erfolgte 90 Minuten vor dem Einfrieren.
Effect of thawing rate on the survival of Lemna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

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

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

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

3.2.3. Einfluss der verwendeten Kulturmedien

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

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

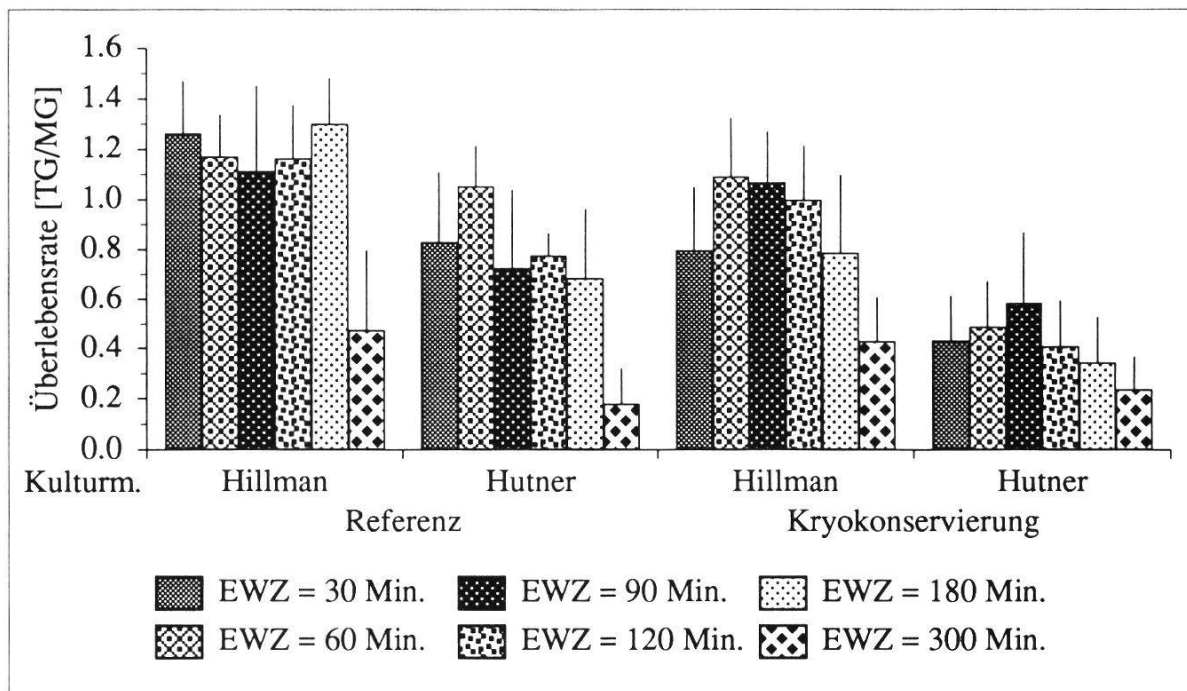


Fig. 17. Verträglichkeit gegenüber 50% Glycerin von *Lemna minor*-Pflanzen, die auf zwei verschiedenen Agar-Nährmedien kultiviert wurden, sowie Einfluss dieser Nährmedien auf die Gefrierresistenz. Die Pflanzen wurden mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin tiefgekühlt.

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

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

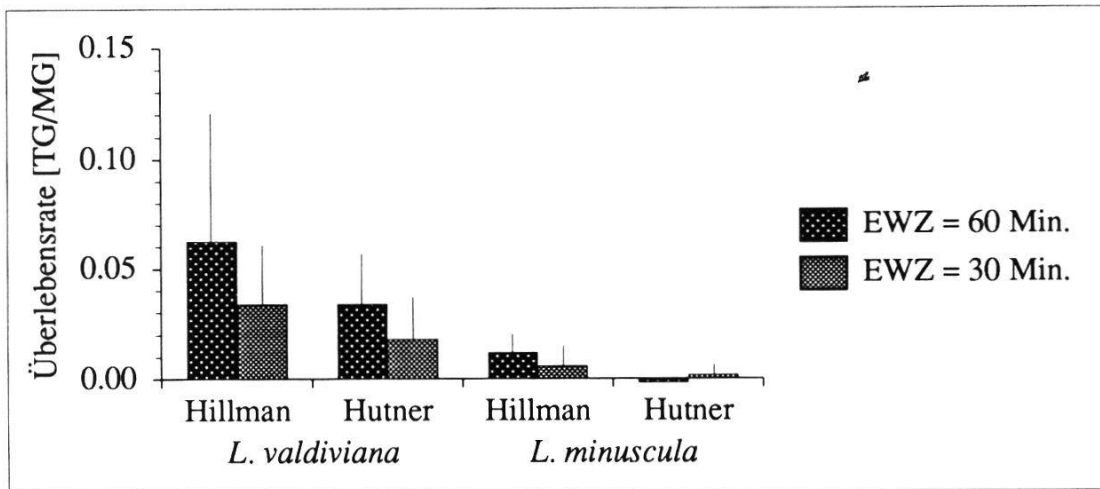


Fig. 18. Einfluss von zwei Agar-Nährmedien auf die Überlebensrate von *Lemna valdiviana*- und *Lemna minuscula*-Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin tiefgefroren wurden. Von jeder Art sind die durchschnittlichen Überlebensraten von je 5 Stämmen dargestellt. Von *Lemna valdiviana* wurden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

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

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

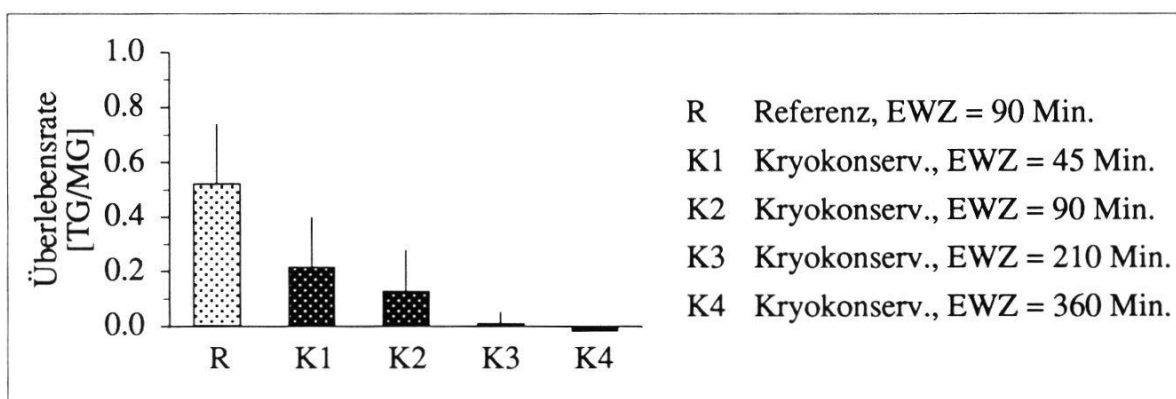


Fig. 19. Verträglichkeit gegenüber 50% Glycerin von *Lemna minor*-Pflanzen, die aus Hutner-Flüssigkulturen stammen (R), sowie Einfluss dieser Nährlösung auf die Gefrierresistenz (K1-K4). Die Pflanzen wurden mit dem Gefrierapparat in 50% Glycerin gekühlt.

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

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

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

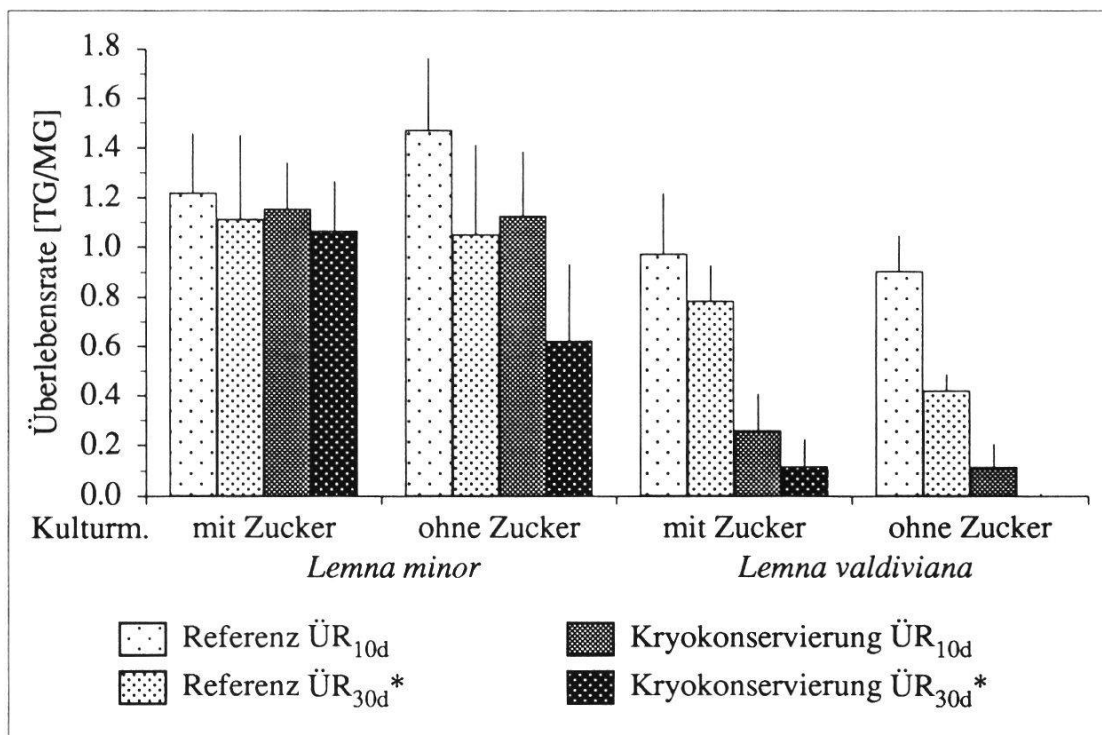


Fig. 20. Einfluss von Saccharose im Weiterzuchtmedium auf das Überleben der Knospen tiefgefrorener (Gefrierapparat) und nicht eingefrorener Pflanzen von *Lemna minor* (8765) und *Lemna valdiviana* (8845). Die Einwirkungszeit des Gefrierschutzmittels (50% Glycerin) betrug bei *Lemna minor* 90, bei *Lemna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

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

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

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

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

3.2.4. Einfluss des Kulturalters

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

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

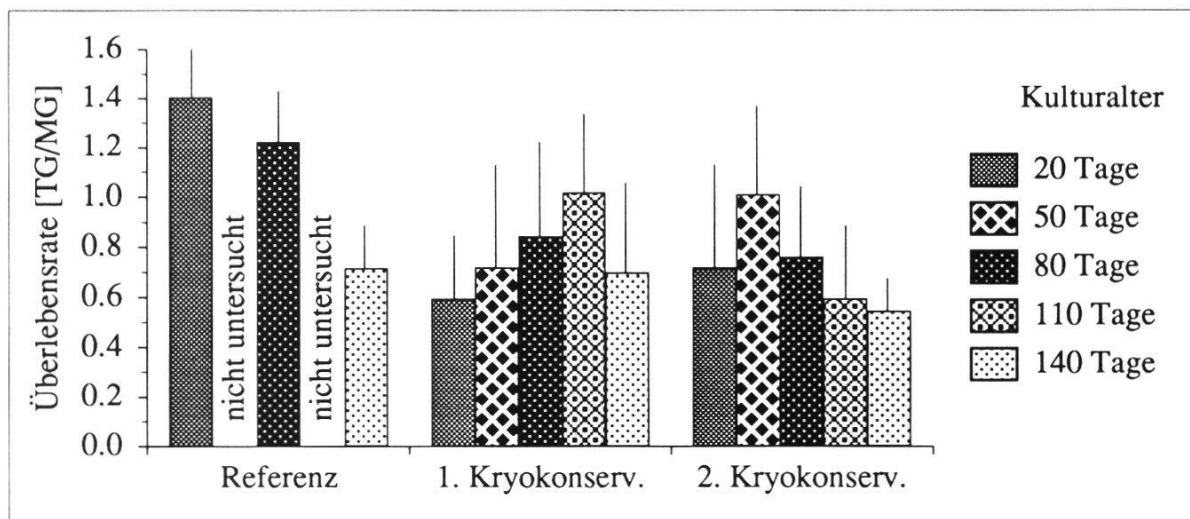


Fig. 21. Überlebensrate eingefrorener (Gefrierapparat) und nicht eingefrorener *Lemna minor*-Pflanzen in Abhängigkeit des Kulturalters. Die Proben wurden während 90 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel (50% Glyzerin) behandelt. Das Einfrierexperiment wurde einmal wiederholt.

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

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

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

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

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

3.2.5. Stickstofflagerung über längere Zeiträume

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

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

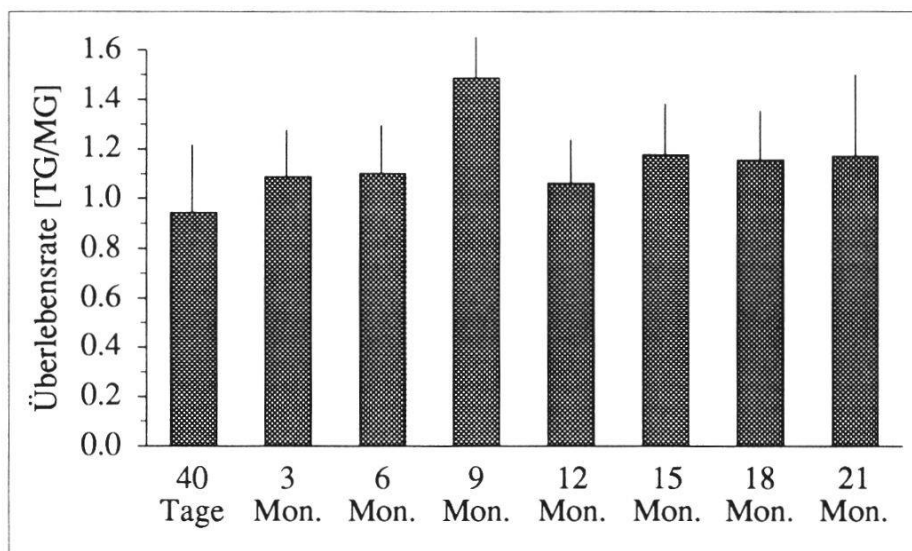


Fig. 22. Einfluss der Lagerdauer (40 Tage bis 21 Monate) in flüssigem Stickstoff auf die Überlebensrate von *Lemna minor*. Als Gefrierschutzmittel wurde 50% Glycerin verwendet, das 90 Minuten vor dem Einfrieren dazugegeben wurde. Alle Proben wurden gleichzeitig mit dem Gefrierapparat tiefgefroren.

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

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

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

3.3. ANWENDUNG VIELVERSPRECHENDER METHODEN BEI VERSCHIEDENEN ARTEN UND STÄMMEN

3.3.1. Testung sämtlicher *Lemnoideae*-Arten

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

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

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

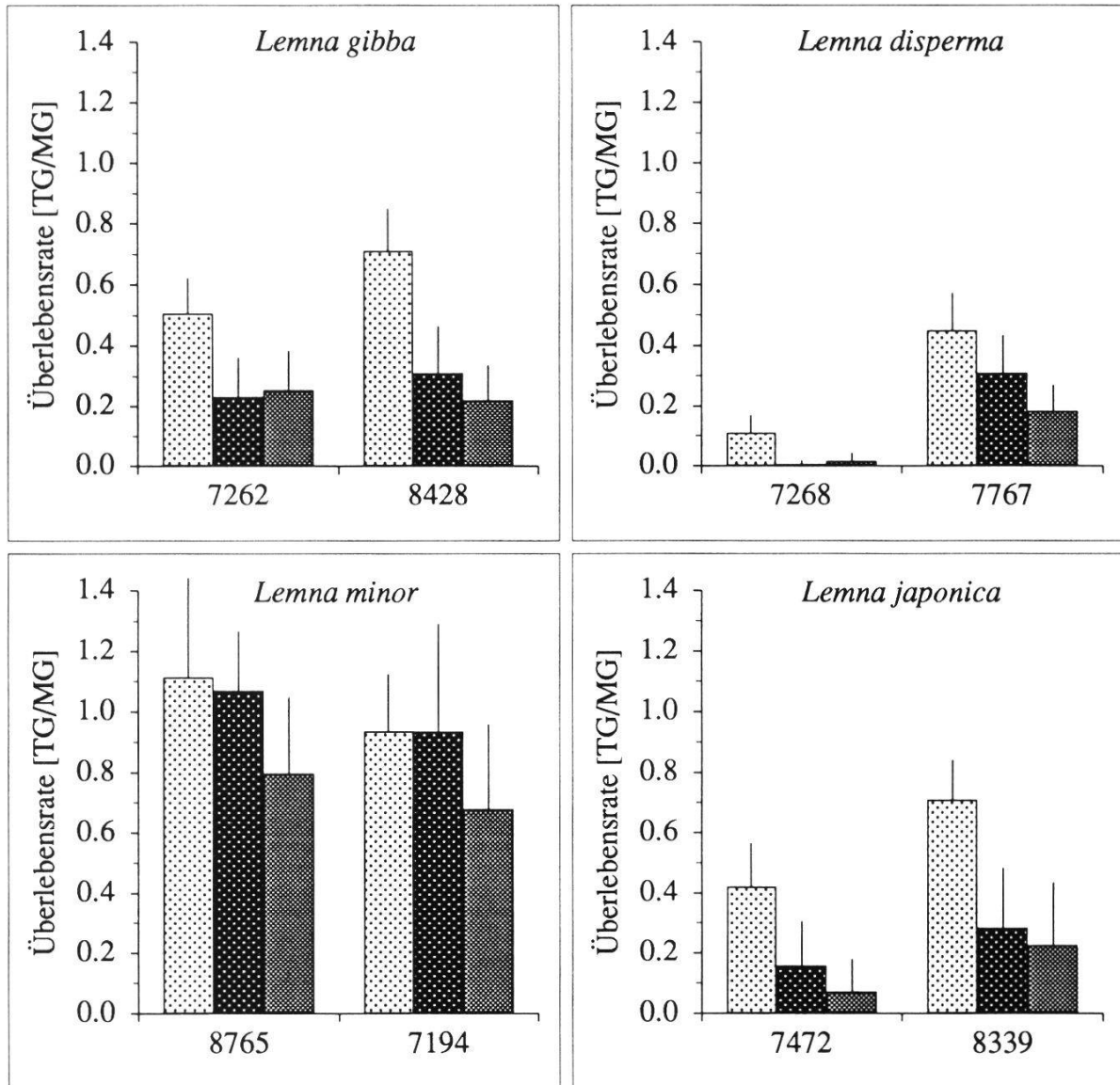


Fig. 23. Testung aller *Lemnoideae*-Arten – Testing of all *Lemnoideae* species.

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

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

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

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

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

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

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

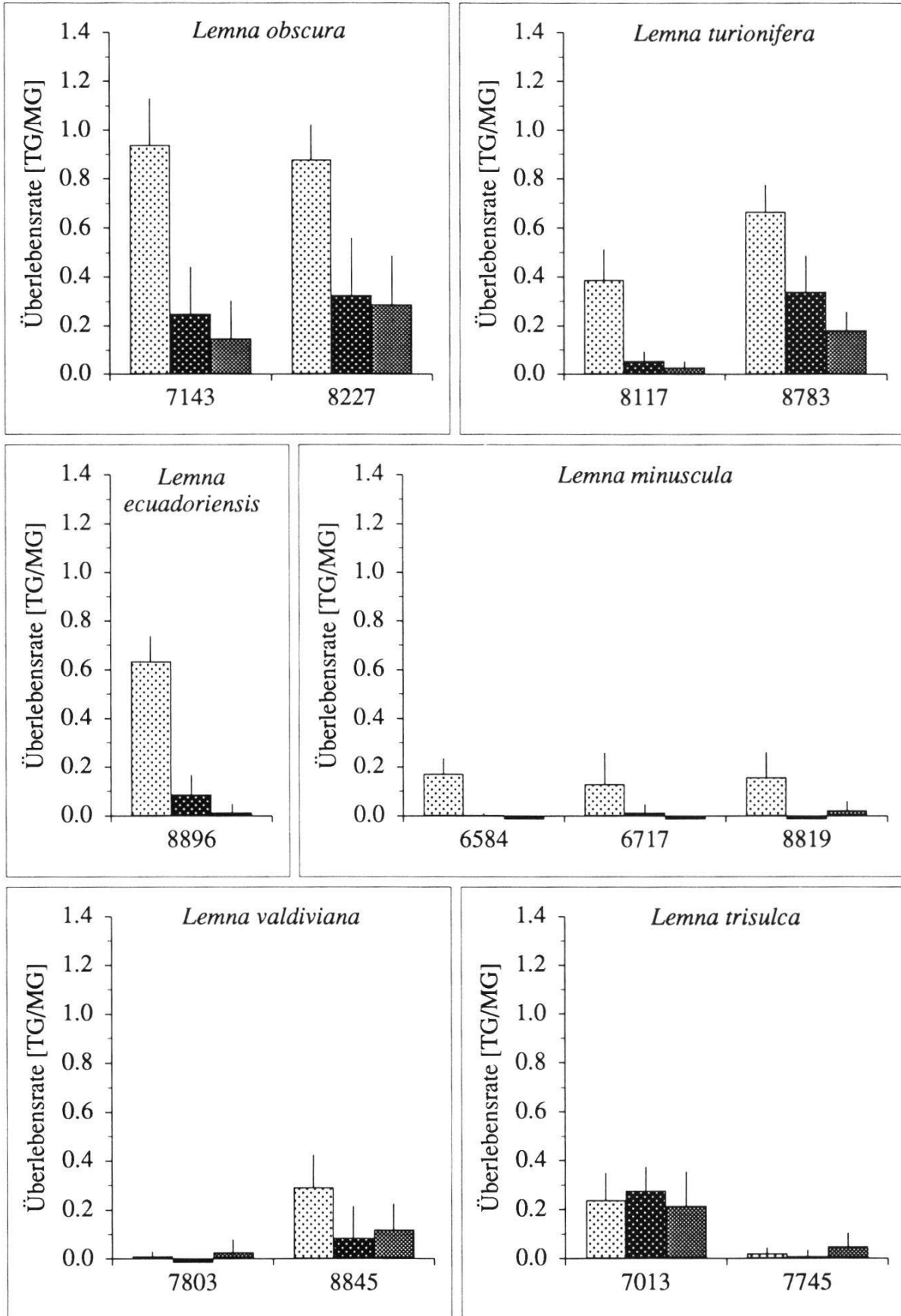


Fig. 23 (Forts. – continued)

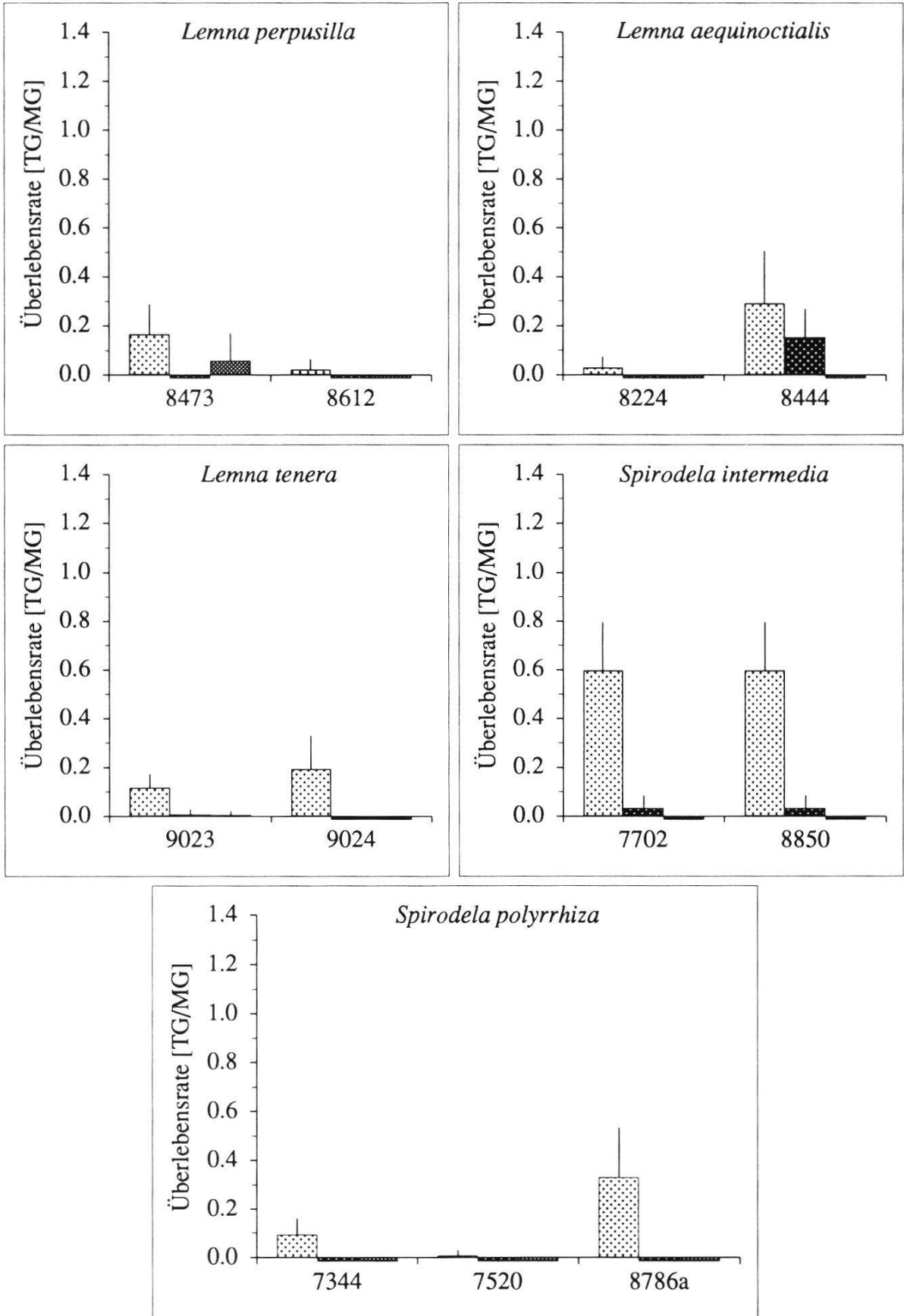


Fig. 23 (Forts. – continued)

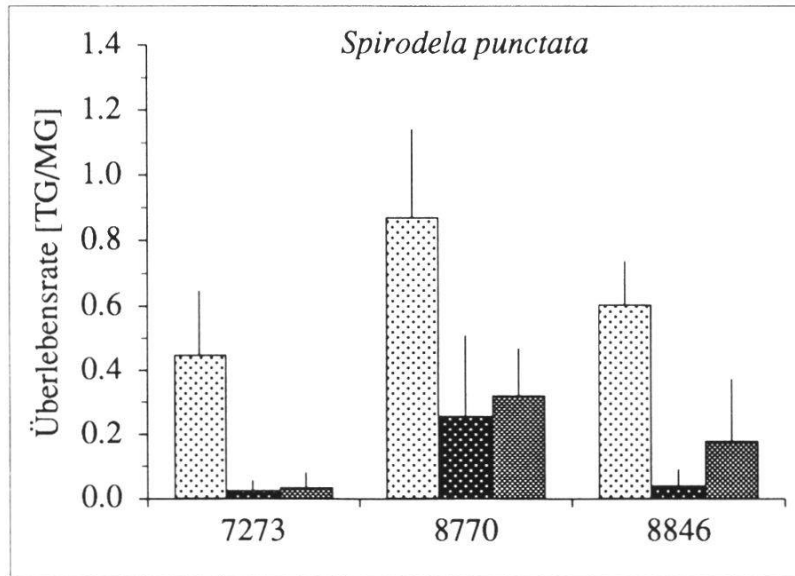


Fig. 23 (Forts. – continued)

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

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

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

Tab. 5. Überlebensraten (ÜR) von *Lemnoideae*-Stämmen, die mit dem Gefrierapparat eingefroren wurden. Als Gefrierschutzmittel wurde Glycerin in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Survival (ÜR) of Lemnoideae clones cooled with the freezing apparatus. Glycerol of different concentrations was used as cryoprotectant.

+ < 0.1 TG/MG +++ 0.2 - 0.4 TG/MG

++ 0.1 - 0.2 TG/MG ++++ > 0.4 TG/MG

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

Art	Stamm	Anzuchtmedium	Glycerin [%]	EWZ [Min.]	ÜR
<i>Spirodela intermedia</i>	8818	Hillman	50	30	+
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	7520	Hillman	50	30/60	neg./+
	8759	Hillman	50	30/60	+ / neg.
	8786a	Hillman	50	30/60	neg./+
<i>Spirodela punctata</i>	8757	Hillman	50	30/60	++ / +++
<i>Lemna gibba</i>	7179	Hillman	50	30	++
	8760	Hillman	50	30/60	+++ / ++++
	8761	Hillman	50	30/60	+++ / ++++
<i>Lemna minor</i>	8785	Hillman	50	30/60	++++ / ++++
<i>Lemna trisulca</i>	7172	Hillman	50	30/60	+++ / ++
	7192	Hillman	50	30/60	neg./neg.
<i>Lemna valdiviana</i>	7515	Hutner	100	5	neg.
	7546	Hillman	50	30/60	neg./neg.
	7653	Hutner	50	30	neg.
	7703	Hillman	50	60	+
	7996	Hutner	100	5	+
	8411	Hutner	50	30/60	+ / +
	8621	Hutner	50	30/60	neg./+
	8658	Hutner	100	5	+
	8662	Hillman	100	5	neg.
	8699	Hutner	50	60	neg.
	8800	Hillman	50	30	+
	8821	Hillman	50	30/60	+ / +++
	8831	Hillman	50	30	++
	8836	Hutner	50	30/60	neg./neg.
	8839	Hutner	50	30/60	neg./neg.
	8843	Hillman	50	30/60	+ / neg.
	8880	Hillman	100	5	neg.
	8900	Hillman	100	5	+
<i>Lemna minuscula</i>	6589	Hillman	100	5	neg.
	8022	Hillman	50	30/60	+ / neg.
	8065	Hillman	100	5	+
	8686	Hutner	100	5	neg.
	8804	Hillman	50	30/60	+ / +
	8810	Hutner	50	30/60	neg./neg.
	8835	Hutner	100	5	+
	8857	Hillman	50	30/60	neg./neg.
	8860	Hillman	50	60	+
	8879	Hutner	50	30/60	neg./neg.
	8899	Hutner	50	30/60	neg./neg.

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

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

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

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

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

3.3.2. Methodische Abänderungen bei vier Arten

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Spirodela polyrrhiza (Fig. 24)

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

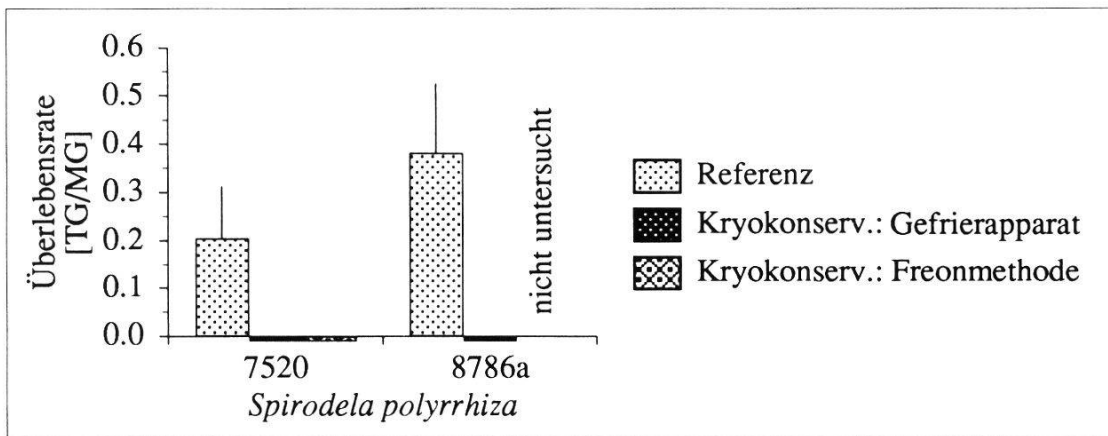


Fig. 24. *Spirodela polyrrhiza*: Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht eingefrorener Pflanzen, die während 30 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel behandelt wurden. Die Pflanzen wurden mit dem Gefrierapparat oder durch direktes Eintauchen in flüssiges Freon gekühlt.

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

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

Lemna ecuadoriensis (Fig. 25, 26)

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

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

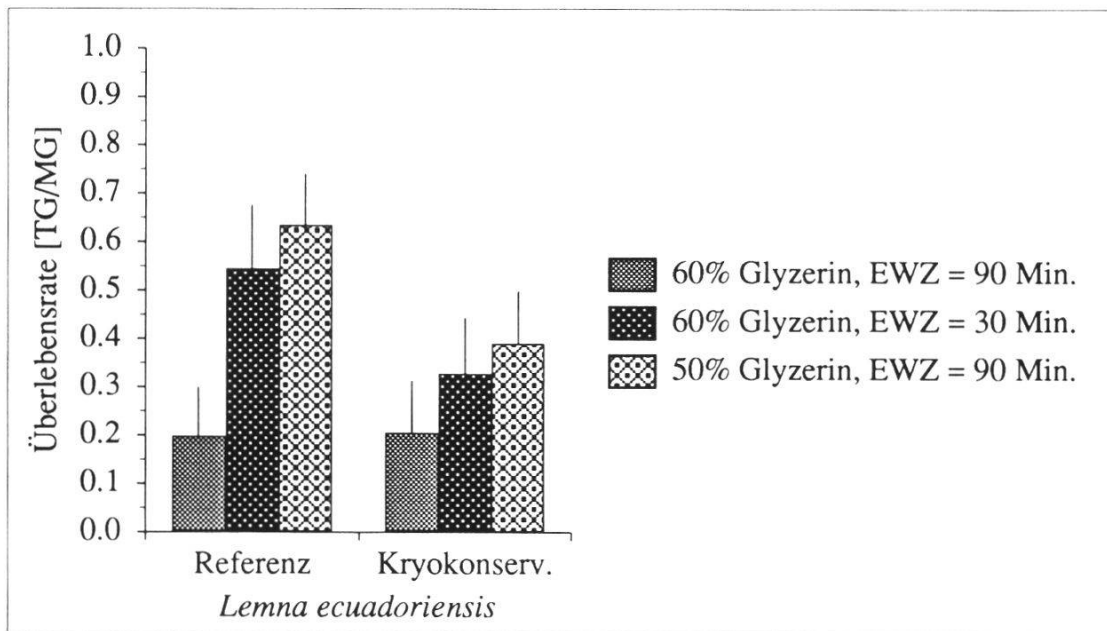


Fig. 25. *Lemna ecuadoriensis*: Vergleich der Überlebensraten von Pflanzen, die mit dem Gefrierapparat in 60% Glyzerin tiefgefroren wurden, mit der Überlebensrate von ultraschall eingefrorenen und aufgetauten Pflanzen unter Verwendung von 50% Glyzerin. Im ersten Block sind die entsprechenden Referenzwerte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

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

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

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

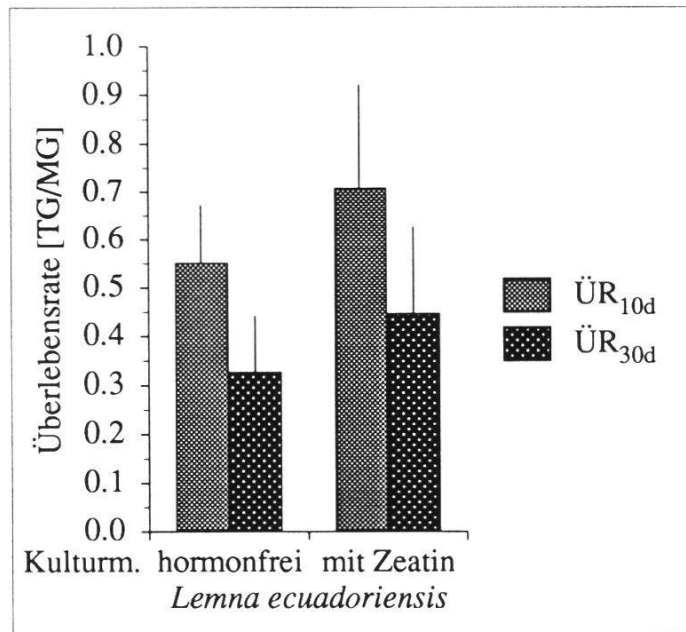


Fig. 26. Einfluss von Zeatin (10^{-3} mM) im Weiterzuchtmedium auf die Überlebensrate von *Lemna ecuadoriensis*-Pflanzen die mit dem Gefrierapparat in 60% Glycerin tiefgekühlt wurden. Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 30 Minuten vor dem Einfrieren.

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

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

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

Lemna tenera (Fig. 27)

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

Lemna valdiviana (Fig. 28 bis 33)

Bei dem untersuchten Stamm gelang keine wesentliche Verbesserung der Ge-

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

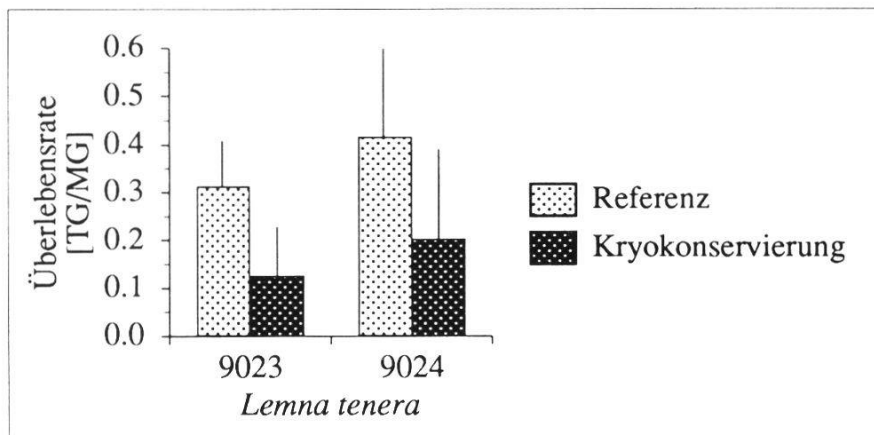


Fig. 27. *Lemna tenera*: Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht eingefrorener Pflanzen, die während 30 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel behandelt wurden. Einfrierexperimente wurden mit dem Gefrierapparat durchgeführt.

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

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

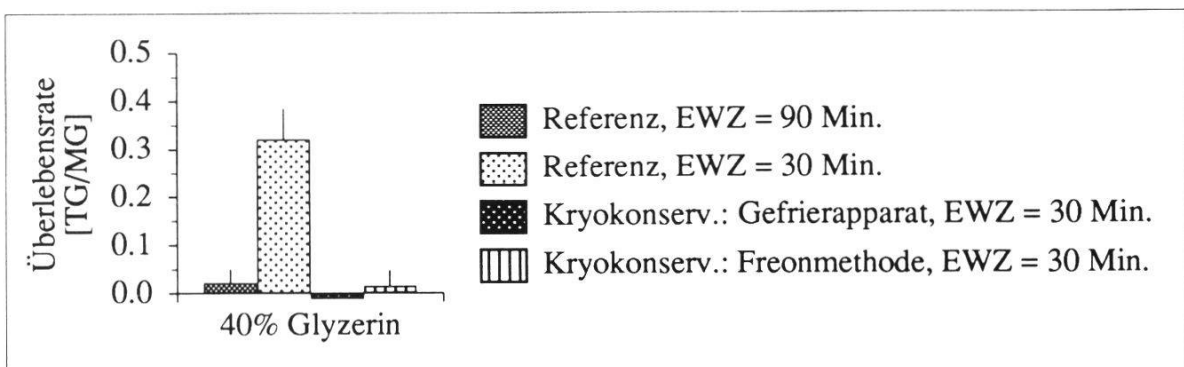


Fig. 28. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Referenz- und Einfrierversuche (Gefrierapparat und Freonmethode) unter Verwendung von 40% Glycerin als Gefrierschutzmittel.

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

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

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

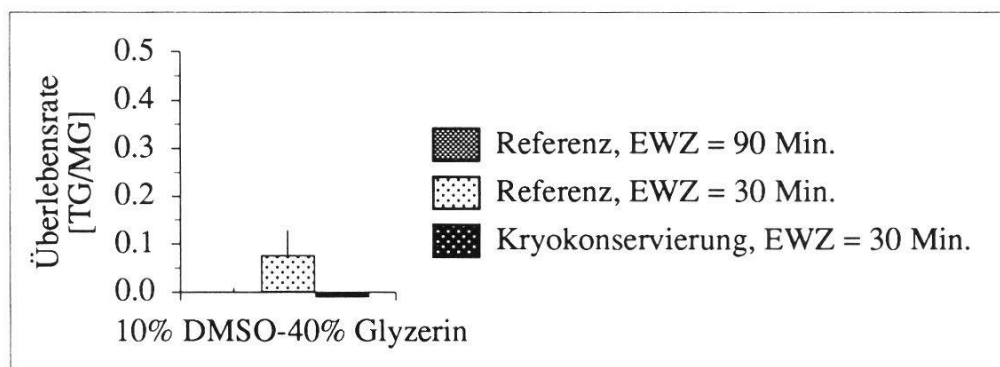


Fig. 29. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Referenz- und Einfrierversuche (Gefrierapparat) bei der Verwendung von 10% DMSO-40% Glycerin als Gefrierschutzmittel.

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

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

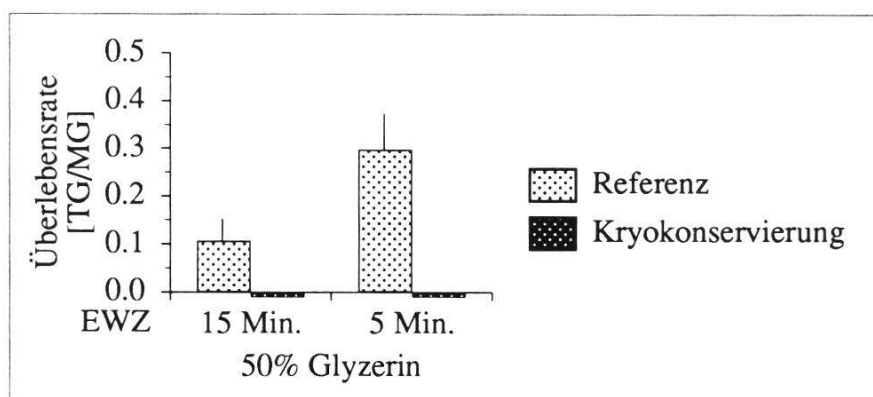


Fig. 30. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Einfluss einer nur kurzen Behandlung (15 und 5 Minuten) mit 50% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener (Gefrierapparat) und nicht eingefrorener Pflanzen.

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

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

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

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

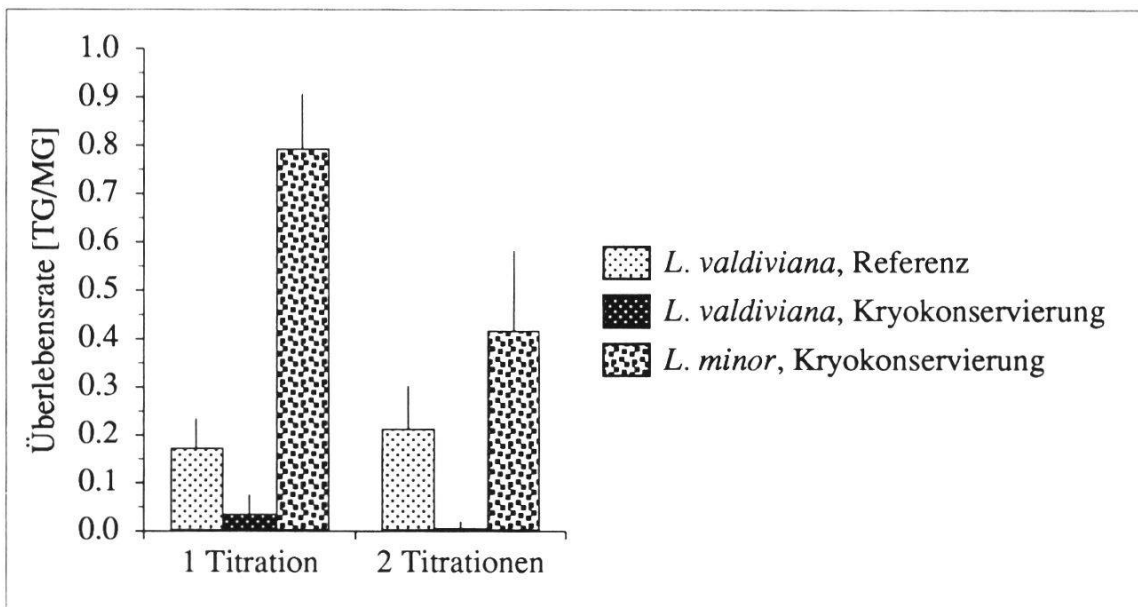


Fig. 31. Einfluss von 50% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener Pflanzen von *Lemna valdiviana* (Stamm 7803) und *Lemna minor* (Stamm 8765), wenn die Gefrierschutzmittelkonzentration schrittweise erhöht wird (1. Block). Bei einem zweiten Experiment wurde zusätzlich das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

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

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

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

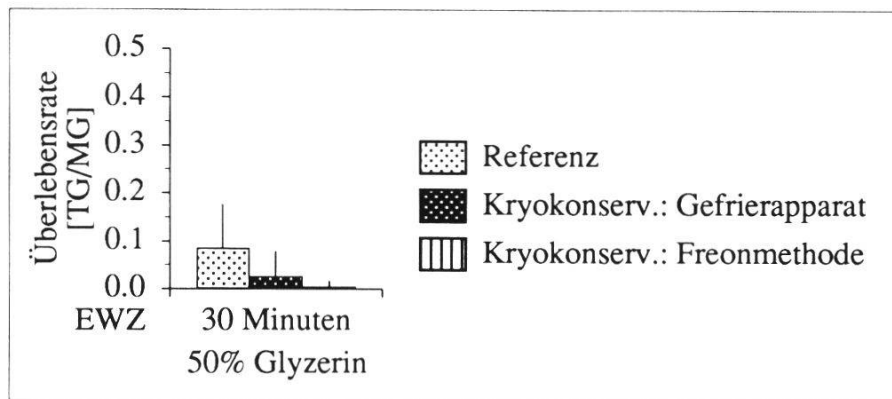


Fig. 32. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Vergleich zwischen den Überlebensraten von Pflanzen, die in 50% Glycerin entweder mit dem Gefrierapparat oder durch direktes Eintauchen in flüssiges Freon tiefgefroren wurden. Die Gefrierschutzmittelzugabe erfolgte 30 Minuten vor dem Kühlen. Die Überlebensrate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

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

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

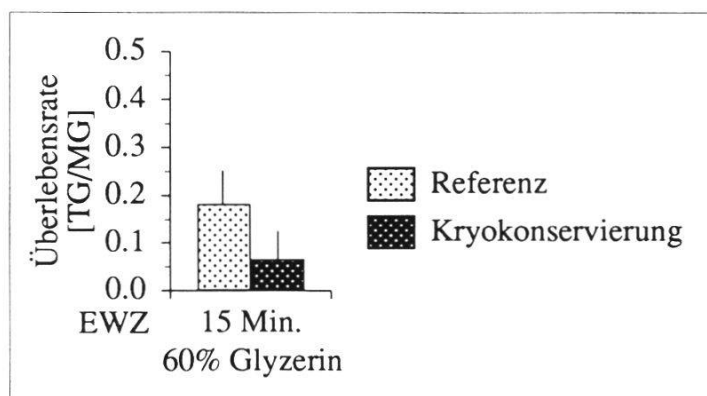


Fig. 33. *Lemna valdiviana*, Stamm 7803: Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate tiefgefrorener und nicht tiefgefrorener Pflanzen, die während 15 Minuten mit dem Gefrierschutzmittel behandelt wurden. Einfrierexperimente wurden mit dem Gefrierapparat durchgeführt.

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

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

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

3.3.3. Versuche mit *Wolffioideae*-Arten

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

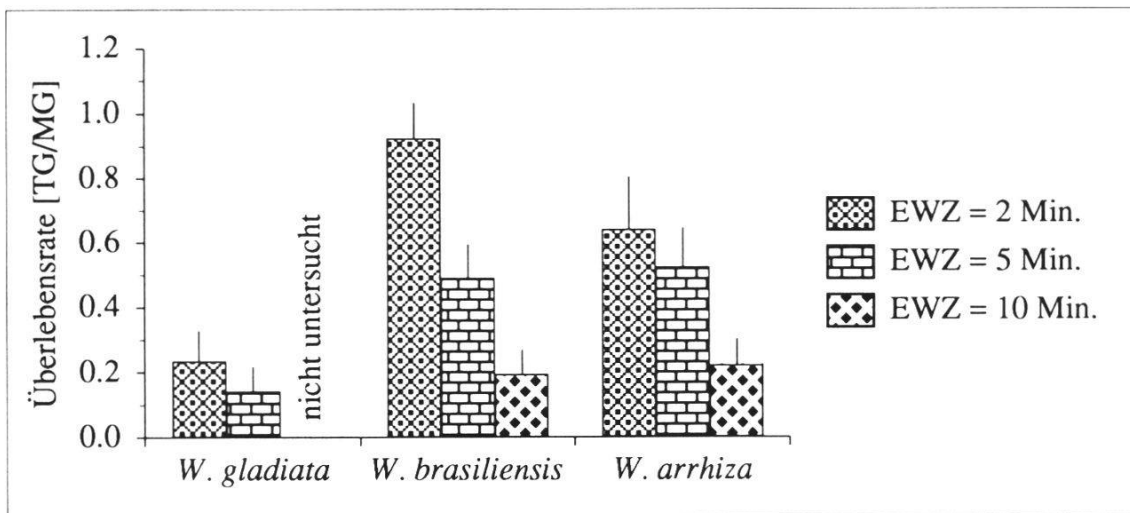


Fig. 34. Einfluss von 60% Glycerin auf die Überlebensrate nicht eingefrorener Pflanzen von *Wolffiella gladiata* (7173), *Wolffia brasiliensis* (7663) und *Wolffia arrhiza* (7421) nach verschieden langer Einwirkung.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5. ANZAHL VORHANDENER TOCHTERGLIEDER PRO MUTTERGLIED EINIGER ARTEN

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

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

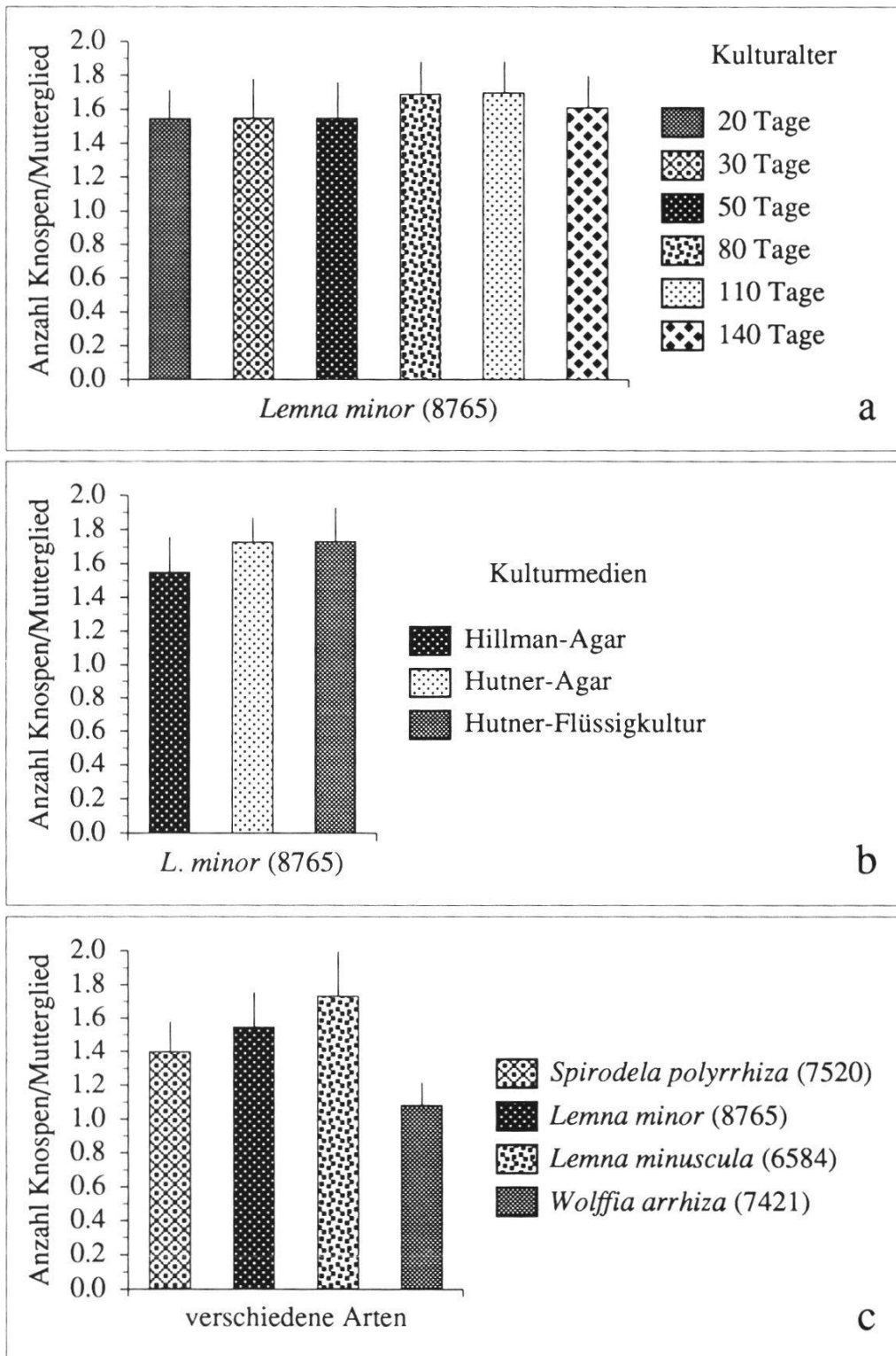


Fig. 35. Durchschnittliche Zahl der Knospen und jungen Tochterglieder pro Mutterglied.
Average number of buds and young daughter fronds per mother frond.

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

Lemna minor, clone 8765: cultures of various age.

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

Lemna minor, clone 8765: different culture media.

c. Verschiedene Arten – different species.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

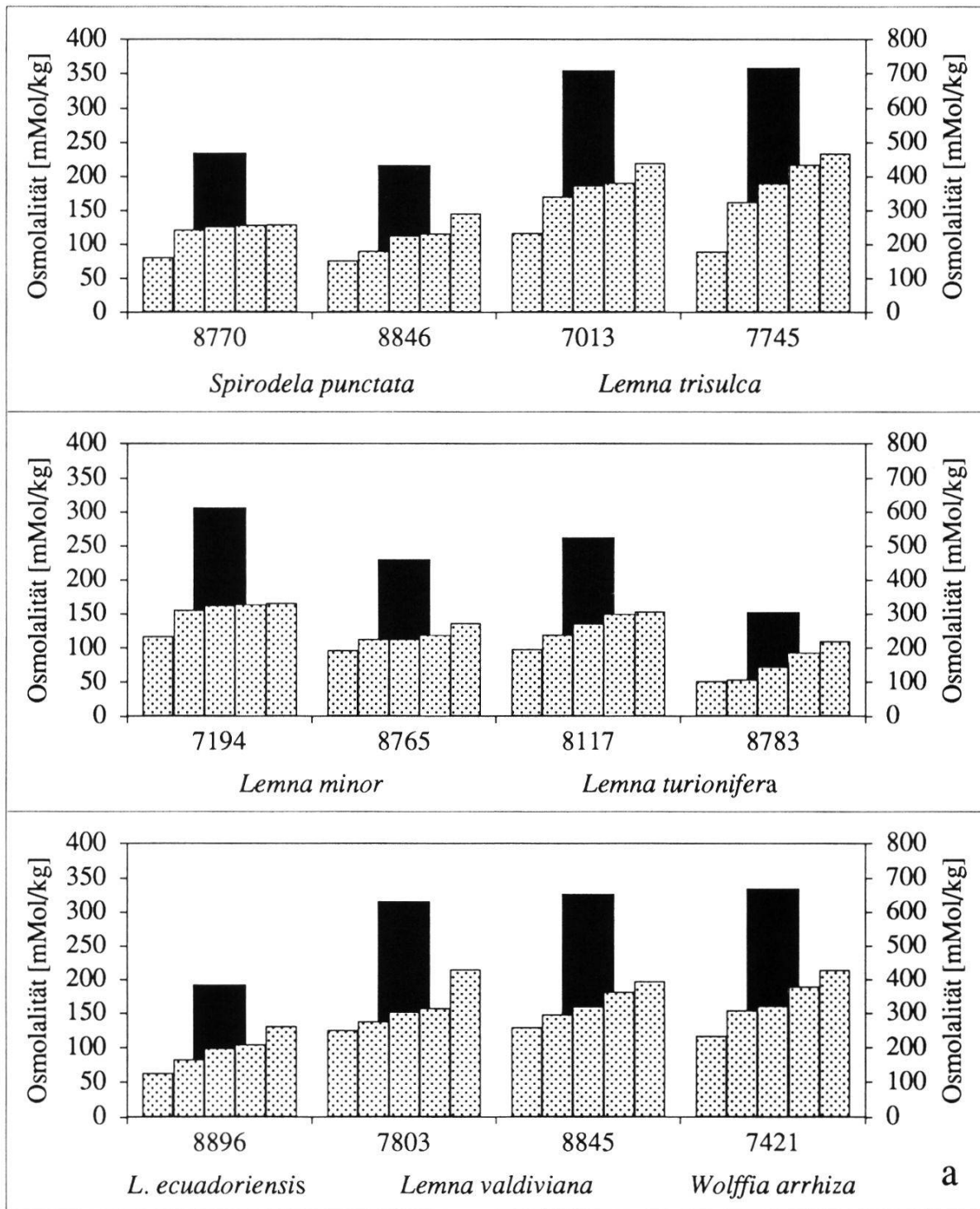


Fig. 36. Osmolalität [mMol/kg] von *Lemnaceae*-Zellsäften. Für jede Messreihe wurden fünf Kulturen untersucht, deren Werte in aufsteigender Reihenfolge dargestellt sind (graue Säulen). Die daraus resultierenden Mittelwerte (schwarze Säulen) sind entsprechend der linken Werteskala in doppelter Grösse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

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

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

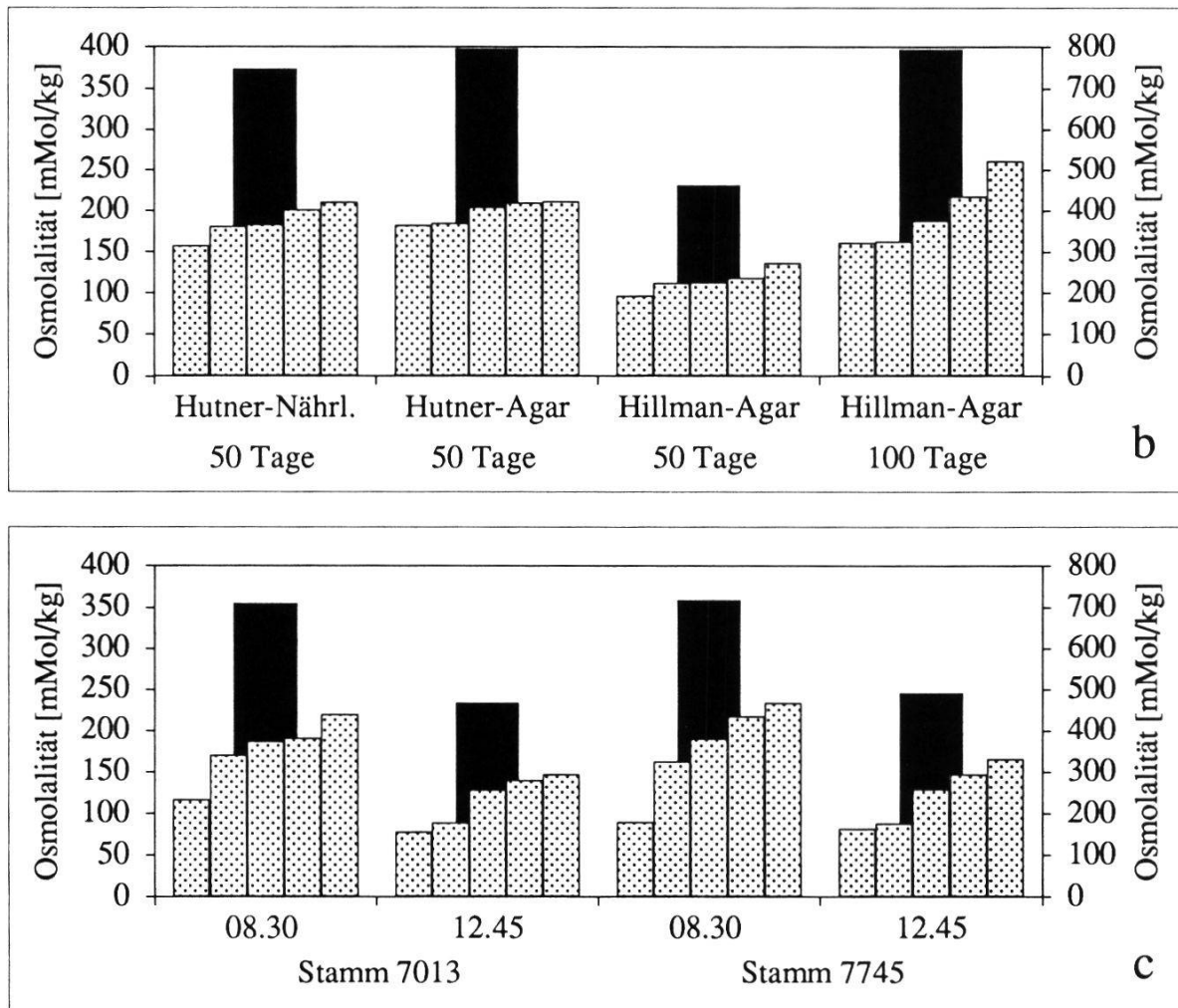


Fig. 36 (Forts. – continued)

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

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

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

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

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

Knospen in den täglichen Rhythmus der Stoffwechselfvorgänge miteinbezogen sind.

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

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

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

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

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

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

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

3.7. PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN GEFRIERSCHUTZMITTEL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

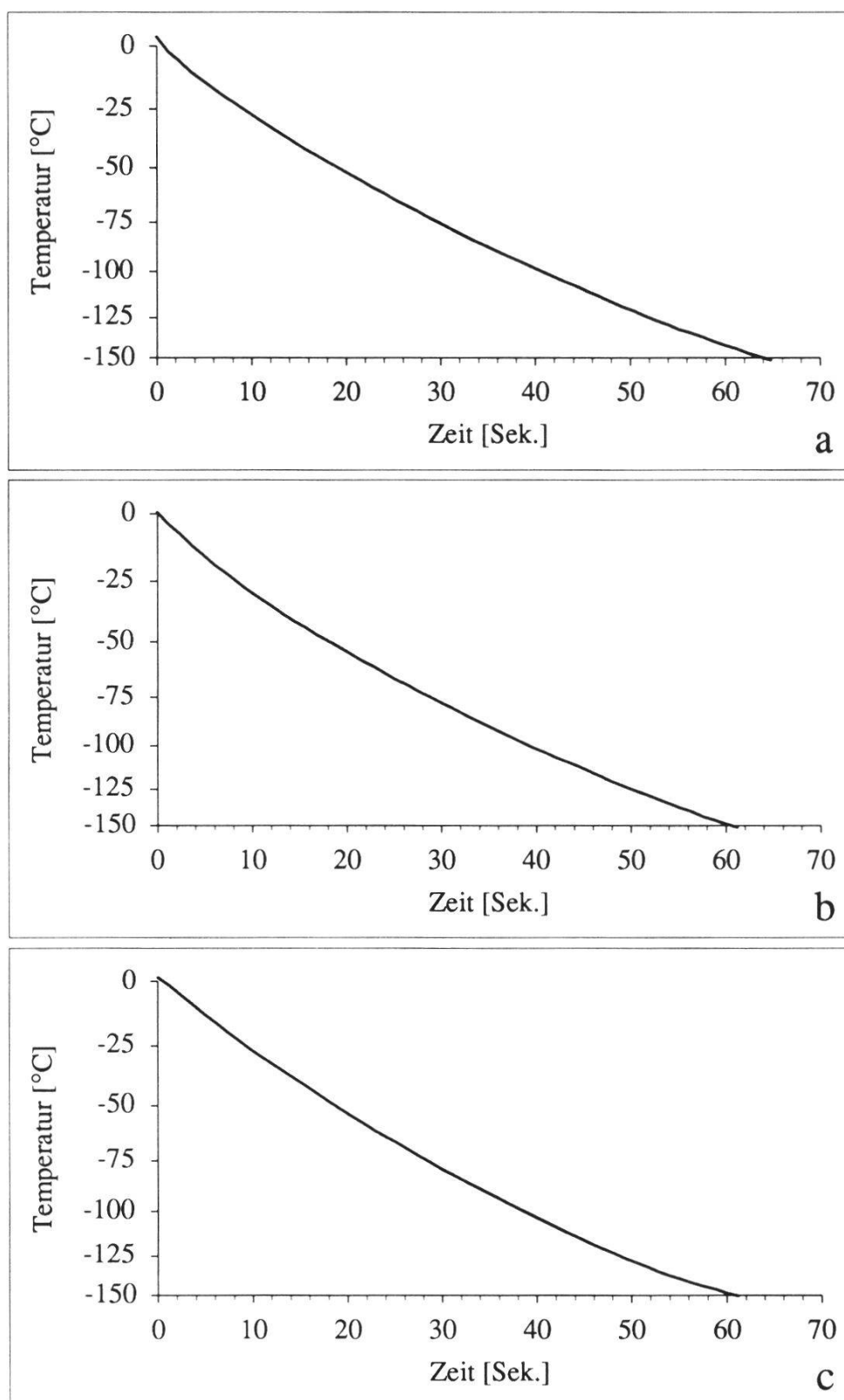


Fig. 37. Einfrierkurven von Glycerinlösungen, die durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff rasch tiefgekühlt wurden.

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

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

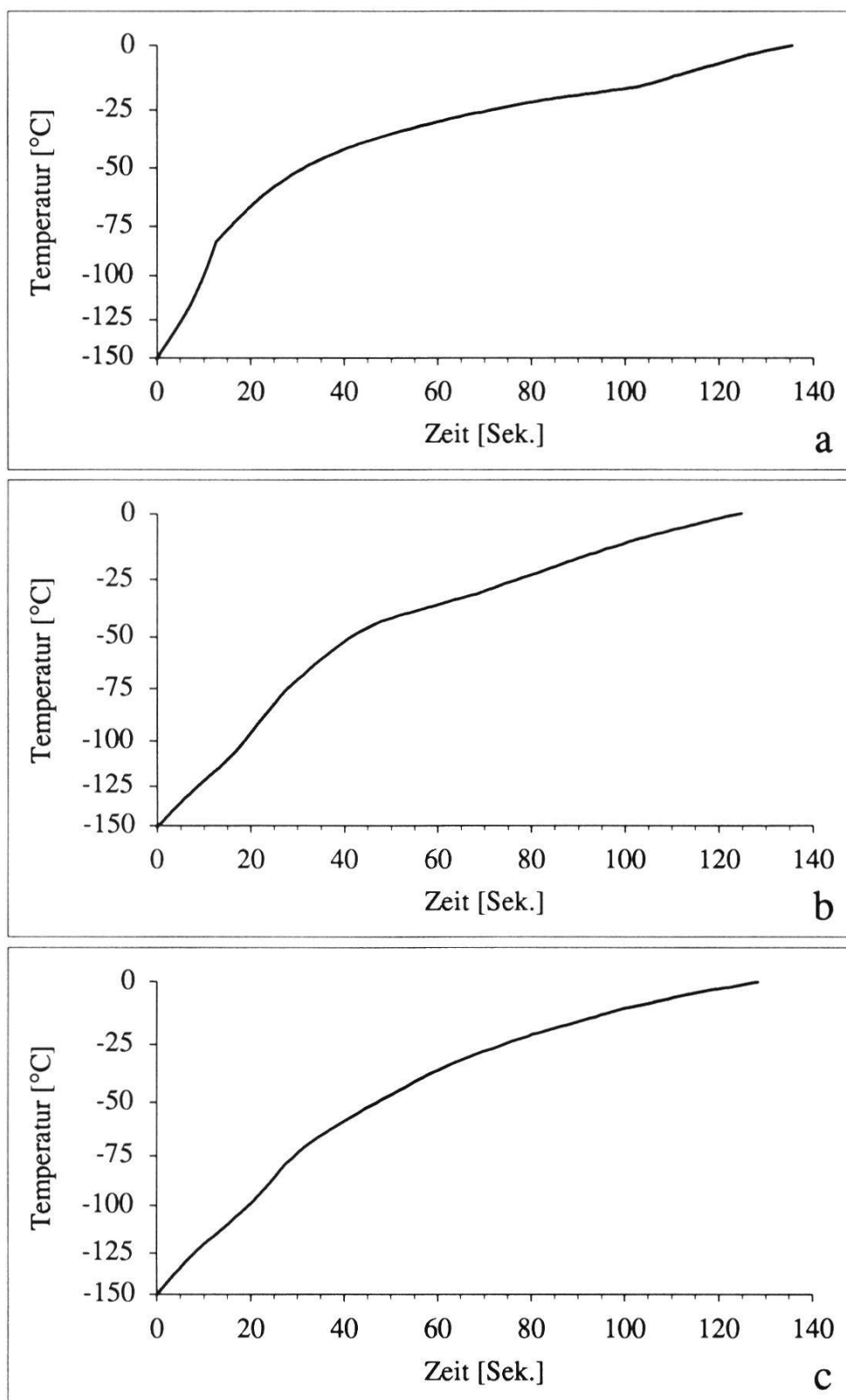


Fig. 38. Auftaukurven von im 30°C-Wasserbad rasch erwärmten Glycerinlösungen, die zuvor durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff tiefgekühlt wurden.
Rewarming curves of glycerol solutions rapidly thawed in a 30°C waterbath following cooling by direct immersion in liquid nitrogen.
a. 40% Glycerin,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

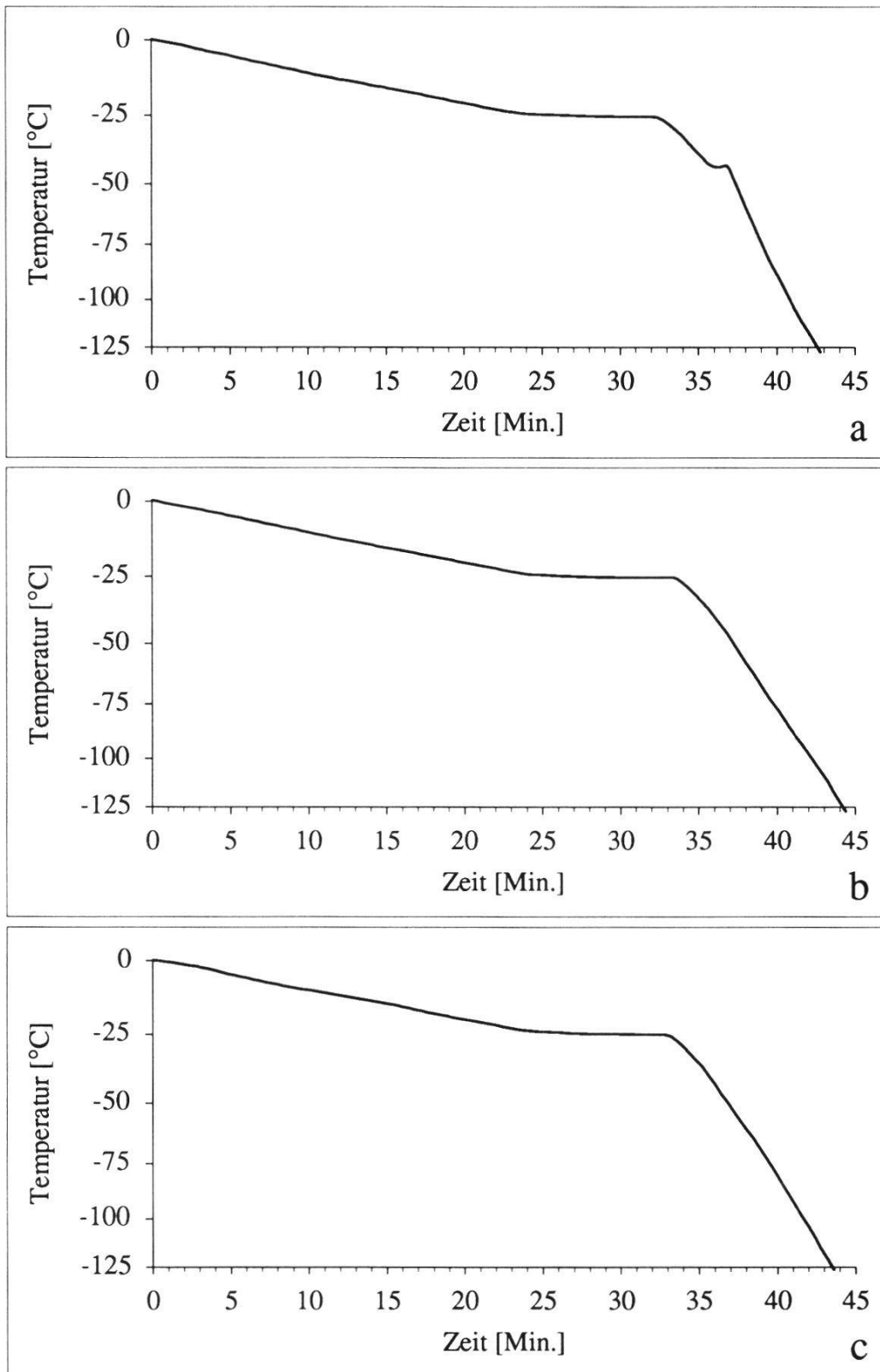


Fig. 39. Einfrierkurven von Glycerinlösungen, die mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Freezing curves of glycerol solutions cooled with the freezing apparatus.

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

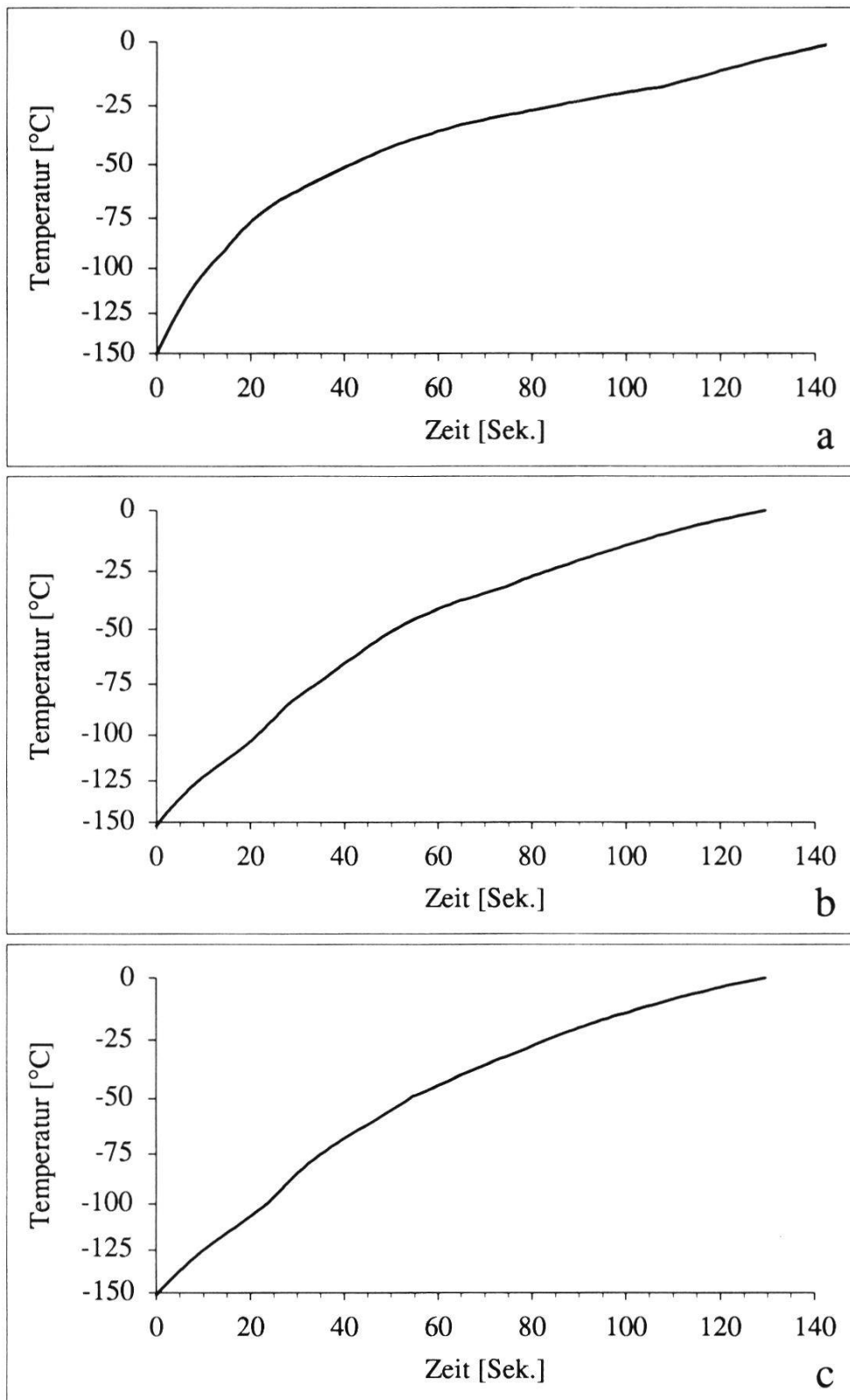


Fig. 40. Auftaukurven von im 30°C-Wasserbad rasch erwärmten Glycerinlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

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

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

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

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

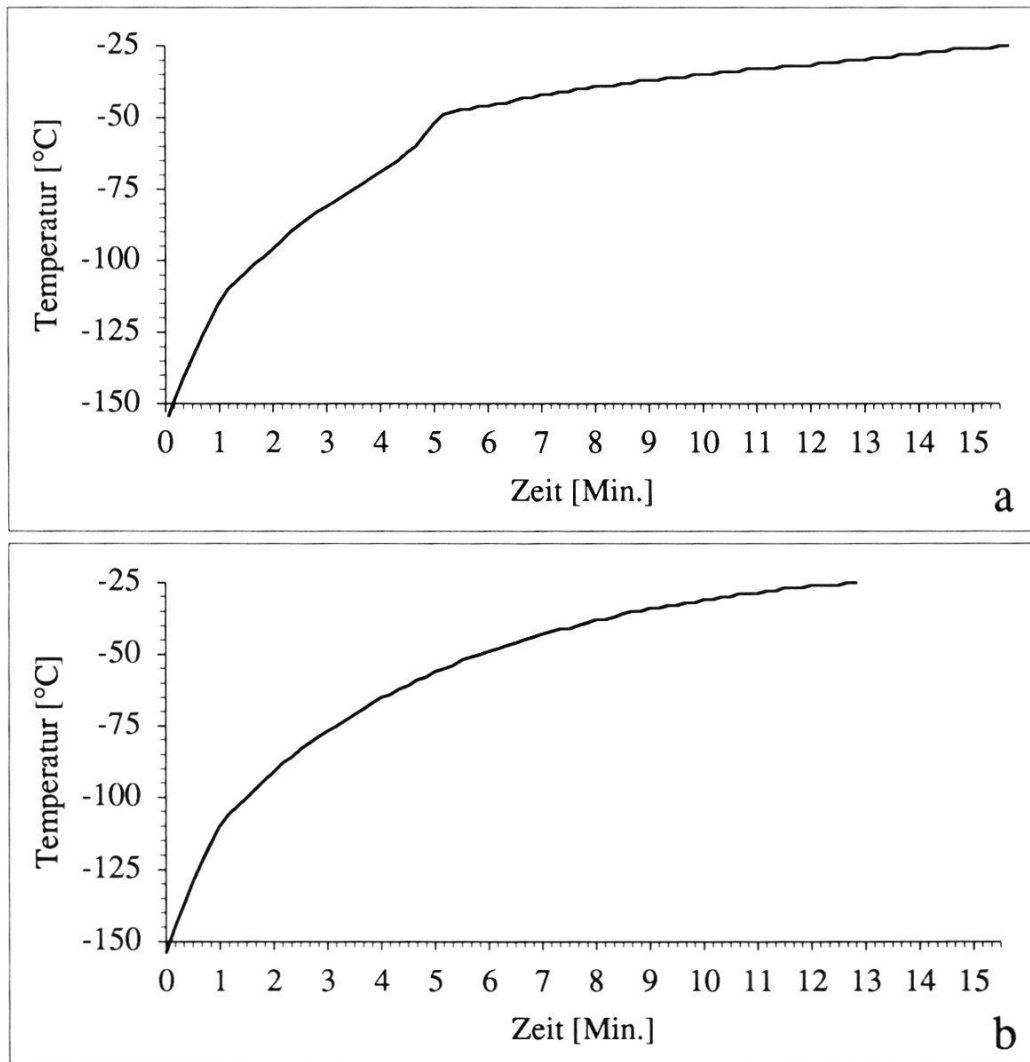


Fig. 41. Auftaukurven von in Luft bei -20°C erwärmten Glyzerinlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

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

a. 50% Glyzerin, b. 60% Glyzerin

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

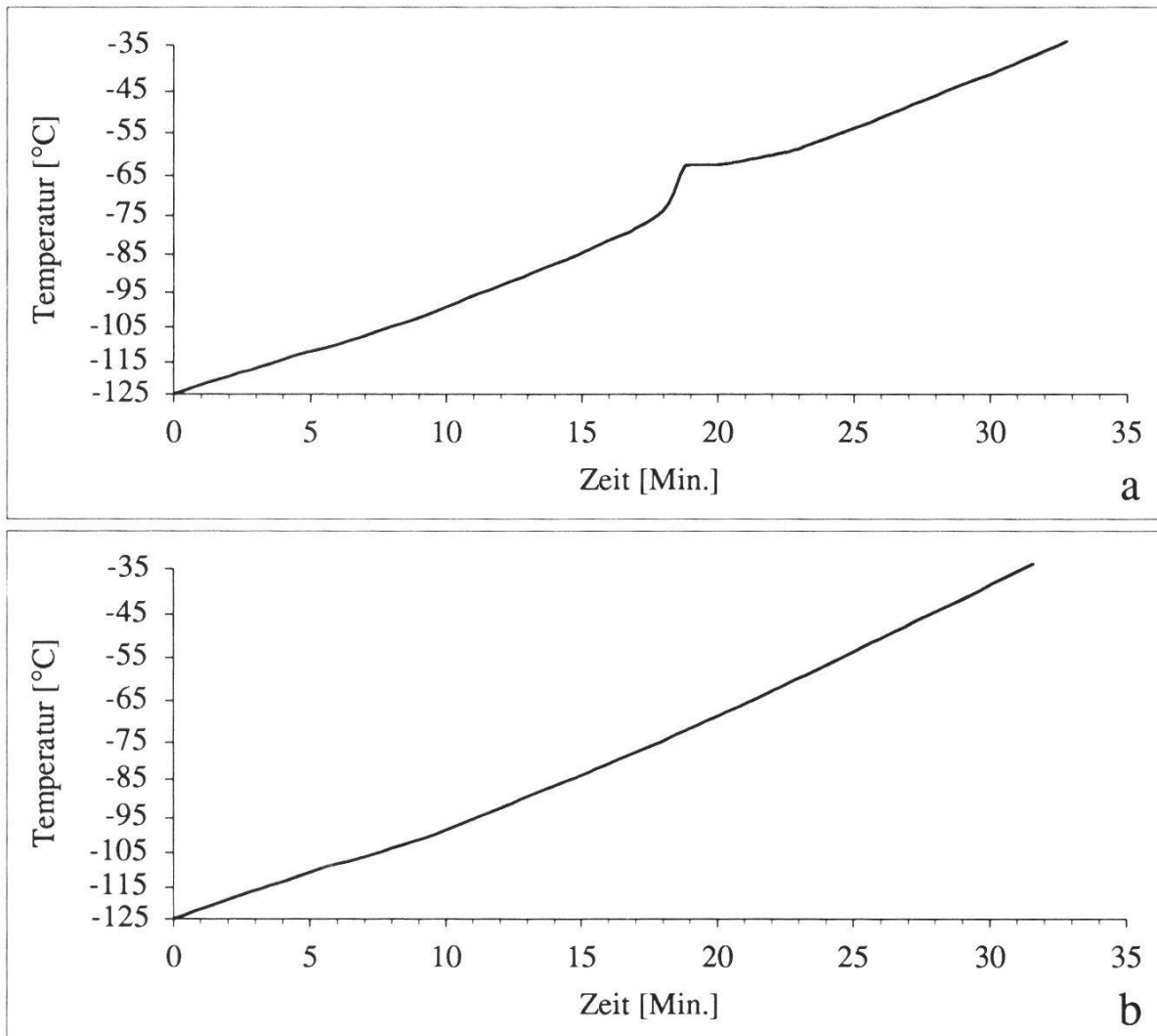


Fig. 42. Auftaukurven von mit 3°C/Min. erwärmten Glycerinlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

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

a. 50% Glycerin, b. 60% Glycerin

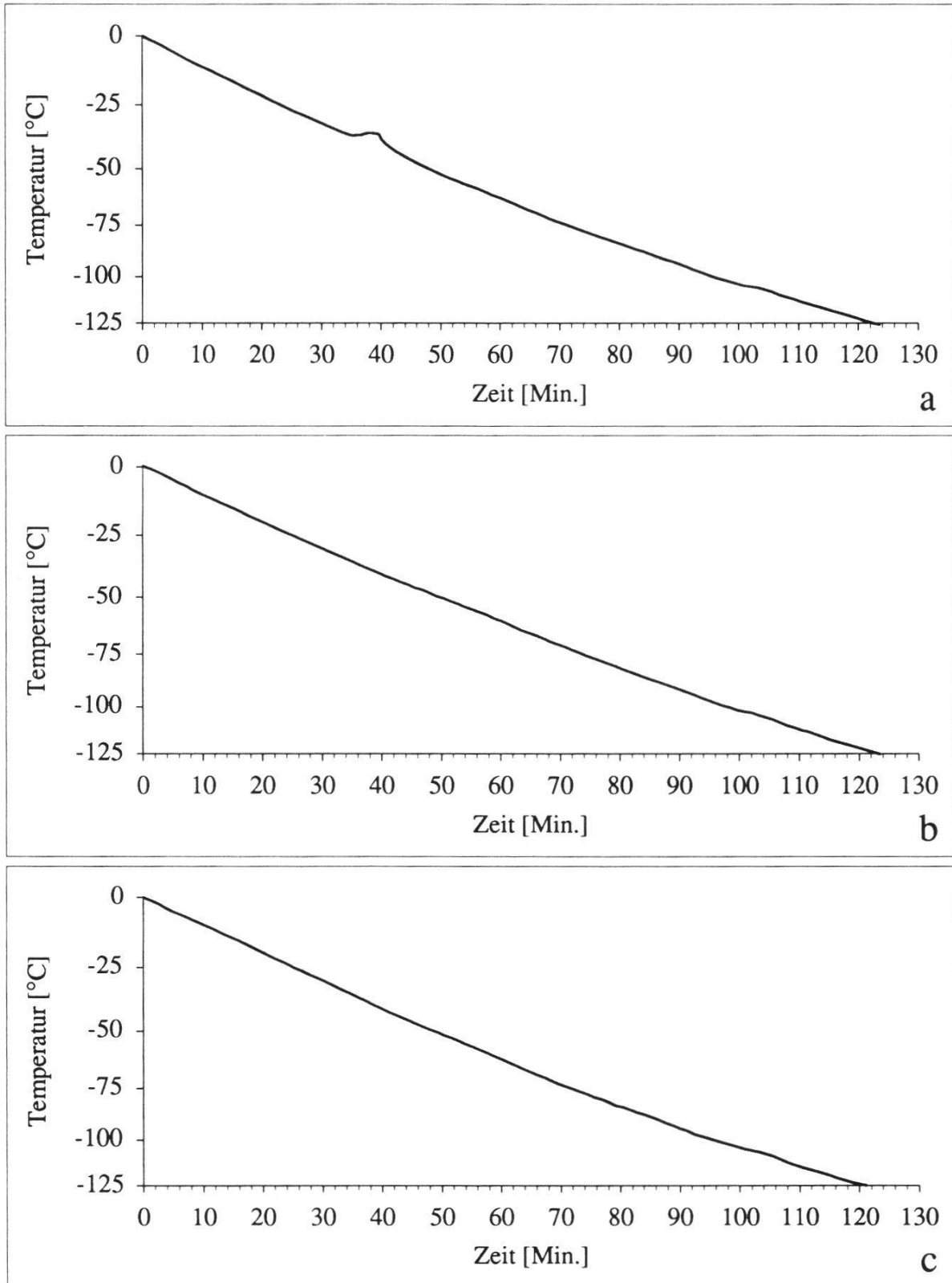


Fig. 43. Einfrierkurven von Glycerinlösungen, die mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ tiefgekühlt wurden.
Freezing curves of glycerol solutions cooled at $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$
a. 40% Glycerin, b. 50% Glycerin, c. 60% Glycerin

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

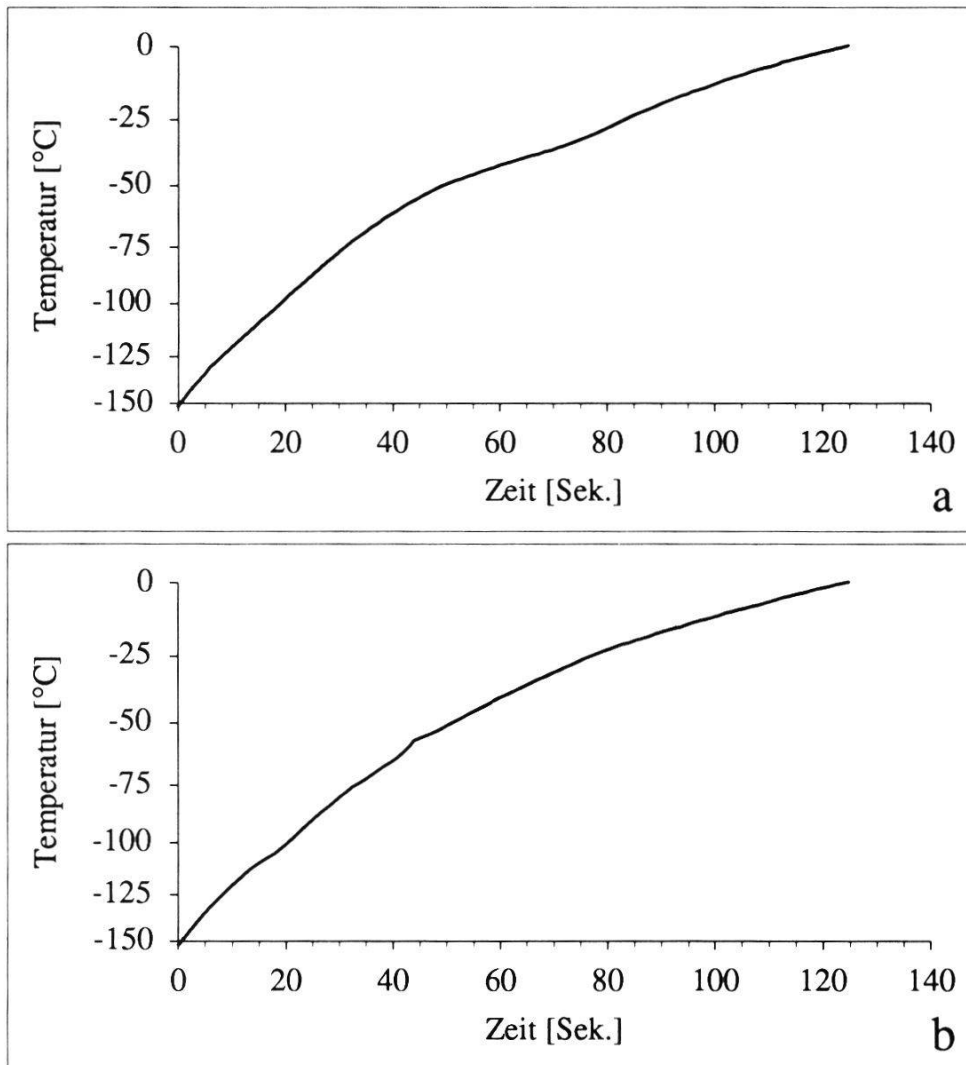


Fig. 44. Auftaukurven von im 30°C -Wasserbad rasch erwärmten Glyzerinlösungen, die zuvor mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Min}$. tiefgekühlt wurden.
Rewarming curves of glycerol solutions rapidly thawed in a 30°C waterbath following cooling at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
a. 50% Glyzerin, b. 60% Glyzerin

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

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

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

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

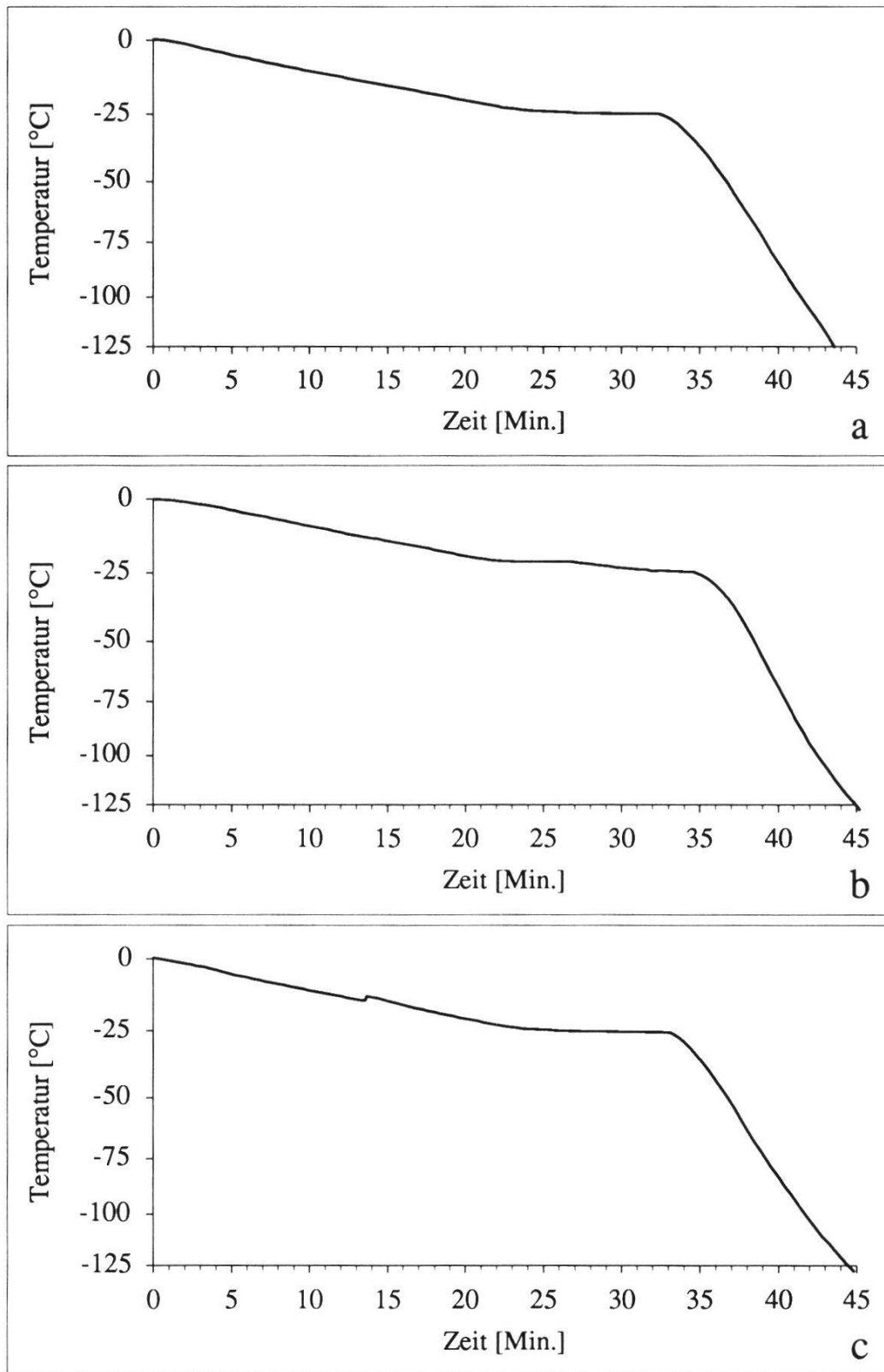


Fig. 45. Einfrierkurven von verschiedenen Gefrierschutzlösungen, die mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

Freezing curves of different cryosolutions cooled with the freezing apparatus.

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

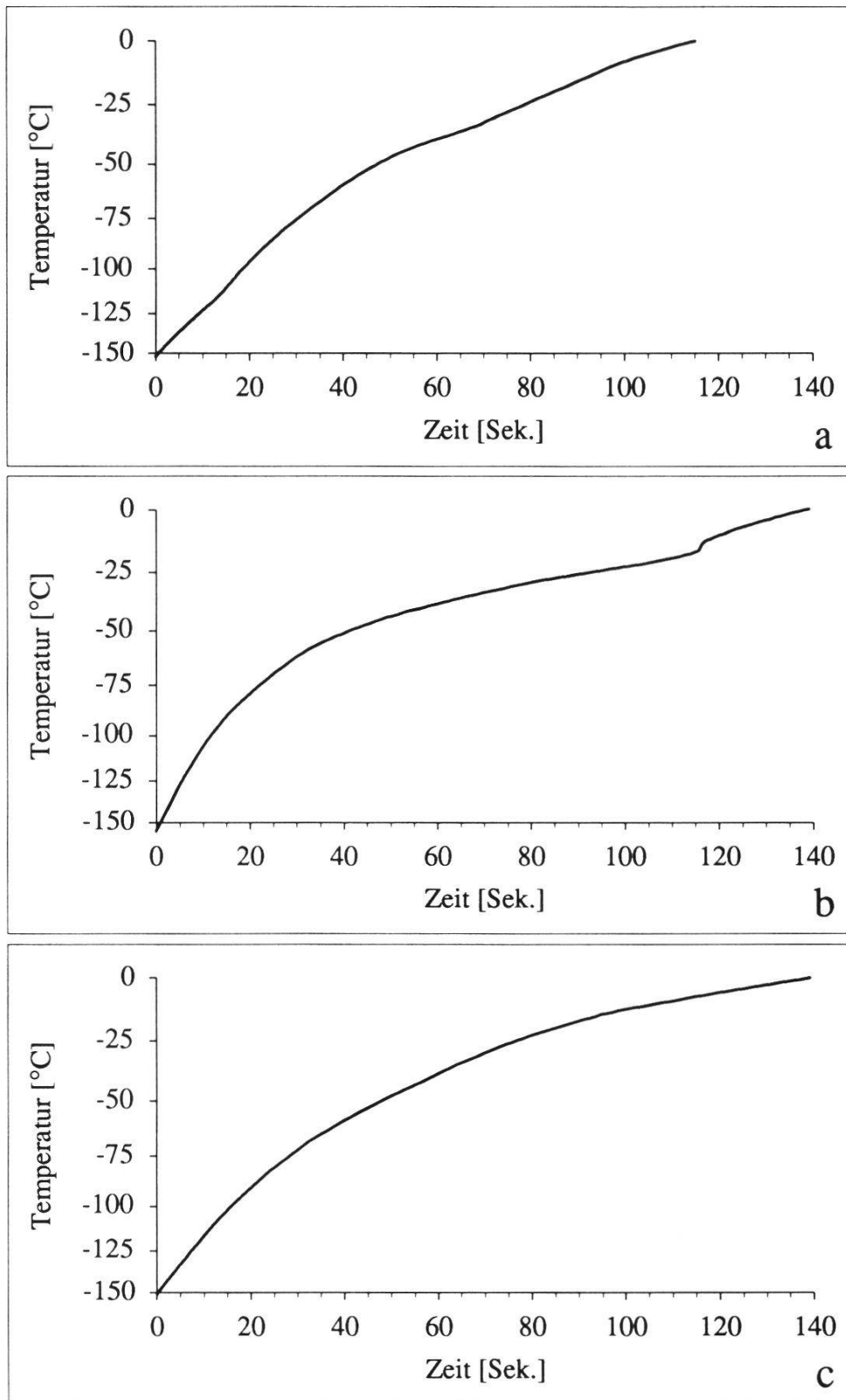


Fig. 46. Auftaukurven von verschiedenen, im 30°C-Wasserbad rasch erwärmten Gefrierschutzlösungen, die zuvor mit dem Gefrierapparat tiefgekühlt wurden.

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

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

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

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