

Bachelorarbeit

zum Erwerb des akademischen Abschlusses

Bachelor of Science (B.Sc.)

eingereicht an der
Hochschule Anhalt (FH)

Studiengang
Biotechnologie/Pflanzenbiotechnologie (dual)

im Fachbereich 7
Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik

von Annmarie-Deetja Rohr,
geboren am 10.06.1992 in Münster (Westfalen)

Thema

Etablierung von Kallus- und Suspensionskulturen bei *Tagetes erecta* L.

1. Gutachter: Frau Dipl.-Chem. Monika Kühne

2. Gutachter: Frau Dr. Sylvia Plaschil

Datum der Abgabe: 20.09.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	v
Tabellen.....	vi
Abbildungen.....	vii
1. Einleitung.....	1
1.1 In-vitro-Kultur	1
1.1.1 Kalluskultur	2
1.1.1.1 Induktion von Kallus	2
1.1.1.2 Aufrechterhaltung der Kalluskultur	3
1.1.1.3 Regeneration von Adventivorganen an Kallus	4
1.1.2 Suspensionskultur	5
1.1.2.1 Eigenschaften von Suspensionskulturen.....	5
1.1.3 Variabilität in Gewebekulturen.....	6
1.1.4 Induzierte Mutagenese	7
1.1.4.1 Praktische Umsetzung der induzierten Mutagenese	8
1.1.5 Nährmedien für die In-vitro-Kultur	8
1.1.5.1 Allgemeine Bestandteile von Nährmedien.....	9
1.1.5.2 Basalmedien.....	9
1.1.5.3 Anpassung von Basalmedien	11
1.2 Phytohormone und Signalstoffe.....	11
1.2.1 Auxine	12
1.2.1.1 Entdeckungsgeschichte der Auxine	12
1.2.1.2 Definition von Auxinen.....	13
1.2.1.3 Biosynthese von Auxinen	13
1.2.1.4 Speicherung und Abbau von Auxinen	14
1.2.1.5 Transport von Auxinen	14
1.2.1.6 Wirkung von Auxinen	15
1.2.1.7 Auxin vermittelte Wachstumsprozesse.....	15
1.2.1.8 Molekularer Wirkungsmechanismus von Auxinen	16
1.2.2 Cytokinine	17
1.2.2.1 Biosynthese der Cytokinine.....	17
1.2.2.2 Transport der Cytokinine.....	18
1.2.2.3 Konjugation und Abbau der Cytokinine.....	18
1.2.2.4 Biologische Wirkungen der Cytokinine.....	19
1.2.2.5 Molekularer Wirkungsmechanismus der Cytokinine.....	20

1.2.3 Gibberelline	20
1.2.3.1 Entdeckungsgeschichte der Gibberelline	20
1.2.3.2 Biologische Wirkungen der Gibberelline.....	21
1.2.4 Brassinosteroide	21
1.2.4.1 Biologische Wirkungen der Brassinosteroide.....	22
1.2.5 Ethylen.....	22
1.2.5.1 Biologische Wirkungen von Ethylen.....	22
1.2.6 Abscisinsäure.....	23
1.2.6.1 Biologische Wirkungen von Abscisinsäure.....	23
1.2.7 Weitere Signalstoffe	24
1.2.8 Wirkgefüge von Phytohormonen	24
1.3 Die Korbblütengewächse (Asteraceae Bercht. & J. Presl).....	25
1.3.1 Taxonomie der Asteraceae.....	25
1.3.2 Die Gattung <i>Tagetes</i> L.....	26
1.4 Sekundäre Metabolite.....	27
1.4.1 Polyphenole.....	28
1.4.2 Flavonoide.....	29
1.4.3 Weitere Pflanzenfarbstoffe	31
1.4.4 Blütenfarbstoffe von <i>Tagetes</i>	31
1.4.4.1 Orange und rot.....	31
1.4.4.2 Gelb und helle Farbtöne.....	32
1.5 Zielstellung.....	34
2. Material und Methoden	34
2.1 Pflanzenmaterial.....	34
2.2 Verwendete Nährmedien	35
2.2.1 Basalmedium	35
2.2.2 Nährmedien für die Kallus- und Suspensionskultur	35
2.3 Sterilaussaat	36
2.4 Explantate.....	37
2.4.1 Kotyledonen und Hypokotyl.....	37
2.4.2 Laubblatt und Petiole	37
2.5 Kalluskultur	38
2.5.1 Kulturbedingungen	38
2.5.2 Subkultivierung	38
2.5.3 Beobachtungsparameter.....	38
2.6 Suspensionskultur.....	39

3. Ergebnisse.....	39
3.1 Kalluskultur	39
3.1.1 Kontrollversuch ohne Phytohormone.....	39
3.1.2 Medium TK 630.....	40
3.1.2.1 Belichtungsvariante I.....	40
3.1.2.2 Belichtungsvariante II.....	42
3.1.2.3 Belichtungsvariante III.....	43
3.1.3 Medium TK 7.....	44
3.1.3.1 Belichtungsvariante I.....	44
3.1.3.2 Belichtungsvariante II.....	46
3.1.3.3 Belichtungsvariante III.....	46
3.1.4 Medium TK 9.....	47
3.1.4.1 Belichtungsvariante I.....	47
3.1.4.2 Belichtungsvariante II.....	48
3.1.5 Medium TK 11	49
3.1.5.1 Belichtungsvariante III.....	49
3.1.6 Medium TK 12	50
3.1.6.1 Belichtungsvariante III.....	50
3.1.7 Medium TK 13	51
3.1.7.1 Belichtungsvariante III.....	51
3.1.8 Medium TK 14	52
3.1.8.1 Belichtungsvariante III.....	52
3.2 Suspensionskultur.....	53
3.2.1 Medium TS 630	53
3.2.2 Medium TS 7	54
3.2.3 Medium TS 13.....	55
3.2.4 Medium TS 14.....	55
3.3 Kontaminationen.....	55
4. Diskussion und Ausblick	56
5. Zusammenfassung.....	60
6. Literaturverzeichnis.....	61
7. Anhang.....	68

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
ABP1	Auxin-bindendes Protein
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	L-Alanin
ARR	<i>Arabidopsis</i> response regulator
Asp	L-Asparaginsäure
ATP	Adenosinriphosphat
AUX1	Influxtranslokator
AXR	Transkriptionsrepressor
BAP	6-Benzylaminopurin
bar	Bar
C	Kohlenstoff
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F1	erste Filialgeneration
F6H	Flavonol-6-hydroxylase
g	Gramm
GA _x	Gibberellinsäure X
gr.	griechisch
h	Stunde, Stunden
H ⁺	Proton
His	L-Histidin
IAA	Indol-3-essigsäure
IAA-	Indol-3-acetat-Anion
IAAH	Indol-3-essigsäure
IPA	Isopentenyladenin
JKI	Julius Kühn-Institut
L	Liter
Leu	L-Leucin
lux	Lux
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute, Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Murashige und Skoog
MSO	Murashige und Skoog ohne Phytohormone
NAA	1-Naphthyllessigsäure
N	Stickstoff
n	Anzahl der Explantate
Pl.	Plural
PVP	Polyvinylpyrrolidon
TK X	Kallusinduktionsmedium X
tRNA	Transfer-RNA
Trp	L-Tryptophan
TS X	Suspensionsmedium X
tZ	trans-Zeatin
w/v	Masse pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

Tabellen

Tab. 1: Zusammensetzung des MS-Mediums nach Murashige & Skoog (1962)

Tab. 2: Einteilung der Polyphenole (Harborne, 1980).

Tab. 3: Die wichtigsten Verbindungsklassen der Flavonoide (Watzl et al., 2005).

Tab. 4: Phytohormonkonzentrationen und -kombinationen in den verwendeten Medien. 1-Naphthyllessigsäure (NAA), Indol-3-essigsäure (IAA), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 6-Benzylaminopurin (BAP), N6-Furfuryladenin (Kinetin), Thidiazuron (TDZ), Gibberellinsäure (GA₃).

Tab. 5: Kontrollversuch zur Kallus- und Adventivwurzelinduktion ohne Phytohormone. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 6: Kallusinduktionsmedium TK 630 mit Belichtungsvariante I (Verdunkelung für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 7: Kallusinduktionsmedium TK 630, Belichtungsvariante III (3.000 lux mit Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte zwei Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 8: Kallusinduktionsmedium TK 7 mit Belichtungsvariante I (Verdunkelung für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 9: Kallusinduktionsmedium TK 7, Belichtungsvariante III (3.000 lux im Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte zwei Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 10: Kallusinduktionsmedium TK 9 mit Belichtungsvariante I (Verdunkelung für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 11: Kallusinduktionsmedium TK 11, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 12: Kallusinduktionsmedium TK 12, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 13: Kallusinduktionsmedium TK 13, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Tab. 14: Kallusinduktionsmedium TK 14, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Abbildungen

Abb. 1: Syntheseweg von Quercetin-7-O-glucosid nach Halbwirth et al., 2004

Abb. 2: Blütenstand *Tagetes erecta* „Antigua Gelb“

Abb. 3: Blütenstand *Tagetes erecta* „Bianca“

Abb. 4: MSO-Medium, Belichtungsvariante II, Petiolenexplantate von „Antigua“, Balken: 10 mm

Abb. 5: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Kotyledonenexplantate von „Antigua“, Balken: 10 mm

Abb. 6: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Kotyledonenkallus von „Antigua“, Balken: 10 mm

Abb. 7: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, lockerer Kotyledonenkallus von „Antigua“, Balken: 10 mm

Abb. 8: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Hypokotylkallus von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

Abb. 9: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Laubblattexplantate von „Bianca“ mit Anthocyanbildung, Balken: 10 mm

Abb. 10: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Laubblattkallus von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

Abb. 11: Medium TK 630, Belichtungsvariante II, Petiolenkallus von „Bianca“ mit etiolierten Adventivsprossen, Balken: 10 mm

Abb. 12: Medium TK 630, Belichtungsvariante III, Hypokotylexplantate von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

Abb. 13: Medium TK 630, Belichtungsvariante III, Petiolenexplantate von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

Abb. 14: Medium TK 7, Belichtungsvariante I, Kotyledonenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 15: Medium TK 7, Belichtungsvariante I, Hypokotylkallus von „Antigua“, Balken: 10 mm

Abb. 16: Medium TK 7, Belichtungsvariante I, verbräunte Petiolenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 17: Medium TK 7, Belichtungsvariante III, Petiolenexplantate von „Bianca“ mit Anthocyanbildung, Balken: 10 mm

Abb. 18: Medium TK 9, Belichtungsvariante I, Kotyledonenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 19: Medium TK 9, Belichtungsvariante I, kallöse Strukturen an Kotyledonenexplantaten von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 20: Medium TK 11, Belichtungsvariante III, Kotyledonenexplantate von „Bianca“ mit Kallus und Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

Abb. 21: Medium TK 11, Belichtungsvariante III, starke Adventivwurzelbildung an Laubblattexplantaten von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 22: Medium TK 12, Belichtungsvariante III, verbräunte Kotyledonenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 23: Medium TK 12, Belichtungsvariante III, Hypokotylexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 24: Medium TK 13, Belichtungsvariante III, Kotyledonenexplantate von „Antigua“ mit Adventivsprossbildung, Balken: 10 mm

Abb. 25: Medium TK 13, Belichtungsvariante III, Hypokotylexplantate von „Bianca“ mit Kallus und Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

Abb. 26: Medium TK 14, Belichtungsvariante III, Kallus an Hypokotylexplantaten von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 27: Medium TK 14, Belichtungsvariante III, Laubblattexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

Abb. 28: Medium TS 630, lockerer Petiolenkallus von „Bianca“ in Suspension, Balken: 10 mm

Abb. 29: Medium TS 7, Hypokotylkallus von „Antigua“ mit Adventivwurzeln in Suspension, Balken: 10 mm

Abb. 30: Medium TS 7, lockerer Petiolenkallus von „Bianca“ in Suspension, Balken: 10 mm

Abb. 31: Medium TS 14, Hypokotylkallus von „Bianca“ in Suspension, Balken: 10 mm

1. Einleitung

1.1 In-vitro-Kultur

„Bei Gewebekulturen handelt es sich um die Kultur von mikrobefreiem Pflanzenmaterial in steriler Umgebung, in der Regel auf oder in sterilisierten Nährmedien“ (Biotechnologie der Pflanzen, 1992). Diese Definition der Gewebekultur von Heß muss dahingehend ergänzt werden, dass Gewebekulturen nicht immer frei von Mikroben sein müssen. Für bestimmte Fragestellungen werden den Kulturen definierte Mikroorganismen beigefügt. Ebenfalls können Endophyten in Pflanzenteilen vorkommen. Pathogene Endophyten stellen ein Problem für die In-vitro-Kultur von Pflanzen dar. Auch nicht pathogene Endophyten können das jeweilige Kultursystem stören. Mit dem Kenntnisstand, dass pflanzliche Kulturen selten absolut mikrobefrei sind, wird heute der Begriff In-vitro-Kultur mit semisterilen Bedingungen anstatt von Sterilkultur verwendet.

Bei dem Pflanzenmaterial für die In-vitro-Kultur kann es sich um ganze Pflanzen oder -teile wie Embryonen, Organe (Achselknospen, Wurzeln, Sprosse), Gewebe (wie Meristeme), Einzelzellen oder Protoplasten handeln.

Die Gewebekultur umfasst die Samenkeimung *in vitro*, die Embryonenkultur, die klonale Vermehrung über Achselknospen, die Meristemkultur, Adventivbildungen an Explantaten, die Kallus-, Suspensions- und Einzelzellkultur, somatische Embryogenese und die Protoplastenkultur.

Einsatzgebiete der Gewebekulturtechnik sind die Erhaltungszüchtung und klonale Vermehrung sowie die Neuzüchtung. In der Pflanzenbiotechnologie wird die Gewebekultur für Produktionszwecke von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen genutzt.

Für die Erhaltungszüchtung ist die klonale Massenpropagation *in vitro* von großer Bedeutung. Seltene Genotypen, die aufgrund ihrer Farbe, Blütenmorphologie und Inhaltsstoffe von Interesse sind, machen eine Erhaltung *in vitro* notwendig.

Techniken wie Haploidenkultur, In-vitro-Befruchtung, somatische Hybridisierung und Gentechnik sind für die Neuzüchtung von Bedeutung. Von großem Vorteil sind die Verkürzung der Generationszeit und die Eliminierung von Pathogenen durch die Kultur *in vitro*. Die Technik Embryo Rescue muss *in vitro* durchgeführt werden. Eine Methode der Neuzüchtung ist die Nutzung der genetischen Variabilität (siehe Kapitel 1.1.3) von In-vitro-Kulturen. Sie stellt jedoch eine Schwierigkeit für die Erhaltungszüchtung dar.

In der Forschung haben sich Gewebekulturen aufgrund ihrer Standardisierbarkeit zur Klärung von Fragen der Biosynthese von sekundären Pflanzenstoffen durchgesetzt. Gewebekulturen sind unabhängig von biotischen Störfaktoren. Dazu zählen endogene pflanzliche Faktoren wie langsames Wachstum, Rhythmen der Stoffproduktion oder die Beschränkung der Stoffproduktion auf bestimmte Gewebe. Zu den exogen biotischen Faktoren zählen Pathogene und Fraßfeinde. Abiotische Stressfaktoren wie Klima, Wetter, Jahres- und Tageszeit werden ausgeschlossen.

Für die Gewebekultur muss das verwendete Pflanzenmaterial vor Inkulturnahme sterilisiert werden oder bereits steril sein. Die Sterilisation erfolgt oberflächlich mithilfe von Chemikalien. Eine vollständige Beseitigung aller Keime auf diesem Weg stellt eine Herausforderung dar, insbesondere wenn sich Bakterien in den Pflanzen, in den Interzellularen oder im Xylem befinden. Diese Mikroorganismen werden bei der Oberflächensterilisation nicht erfasst. Allgemein findet daher eine Oberflächensterilisation der Samen statt. Die erhaltenen Pflanzen werden unter sterilen Bedingungen herangezogen (Heß, 1992).

1.1.1 Kalluskultur

Als Kallus (Pl. Kalli oder Kallusse) werden im weitesten Sinne Zell- und Gewebeformen bezeichnet, die von differenzierten Geweben und Organen als Folge einer Verwundung gebildet werden. Es können verschiedene Typen von Kalli unterschieden werden. Der in der Gewebekultur verwendete Typ zeichnet sich durch ein unbegrenztes Teilungswachstum aus, ohne eine geregelte Einstellung von Teilungsebenen.

Kalli können mehr oder weniger weitgehende Differenzierungen aufweisen. Auch treten genetische Veränderungen während der Kultur auf. Ältere Kalli sind daher im Phänotyp wie im Genotyp heterogen. Dies muss bei allen Verfahren mit Kalluskulturen berücksichtigt werden.

1.1.1.1 Induktion von Kallus

Kallus kann an Wundflächen beliebiger Pflanzenorgane induziert werden. Bei der Verwendung von adulten Pflanzen aus nicht-sterilen Bedingungen können Probleme bezüglich der Sterilität auftreten. Zudem kann ein fortgeschrittenes Alter der Pflanze die Fähigkeit zur Kallusbildung beeinträchtigen. Am besten geeignet sind Keimlinge oder junge Pflanzen, die

in vitro aus oberflächensterilen Samen herangezogen wurden. Seltener werden Embryonen als Ausgangsmaterial verwendet.

Als Explantate werden häufig Teile der Blattspreite oder von Internodien verwendet. Wenn meristematisches Gewebe in dem Explantat vorliegt, geht die Kallusbildung von diesen Zellen aus. Andernfalls erfolgt zunächst eine Dedifferenzierung des Gewebes. Häufig geht die Kallusbildung dann von parenchymatischen Zellen aus (Heß, 1992). Die Explantate werden auf ein Nährmedium aufgelegt, welches geeignete organische Zusätze und Phytohormone enthält. Häufig wird das Medium nach Murashige und Skoog als Grundlage verwendet (Murashige & Skoog, 1962).

Das synthetische Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) besitzt eine starke Wirkung bezüglich Dedifferenzierung und Kallusinduktion. Jedoch führt der Einsatz von 2,4-D oft zu genetischen Veränderungen. Alternativ können andere Auxine wie Indol-3-essigsäure oder 1-Naphthylessigsäure in Kombination mit einem Cytokinin eingesetzt werden. Welche Phytohormonkombinationen in welchen Konzentrationen zur Kallusinduktion geeignet sind, ist abhängig von der jeweiligen Pflanzenart, dem Explantattyp und insbesondere dessen endogenen Hormonspiegel. Die Feinabstimmung der Hormonzusätze auf die jeweilige Pflanze, das vorliegende Gewebe und dessen Entwicklungszustand ist sehr aufwendig.

1.1.1.2 Aufrechterhaltung der Kalluskultur

Der an den Explantaten gebildete Kallus muss subkultiviert werden. Die Subkultivierung dient der Vermehrung des Materials für weitere Experimente. Es sollten im Kallus keine Reste des ursprünglichen Explantates mehr vorhanden sein, da die Reste stören und Ergebnisse verfälschen können.

Der Kallus wird vom Explantat abgetrennt und auf frischem Medium in regelmäßigen Abständen subkultiviert. Bei hinreichender Größe kann er bei der Subkultivierung in Teilstücke zerlegt werden. Häufig wird dasselbe Medium wie für die Kallusinduktion verwendet. Wiederholte Subkultivierung kann zu einer Habituation des Kallus führen, das heißt er wächst wie pflanzliches Tumorgewebe auch ohne einen Zusatz von Hormonen weiter. Es ist nicht hinreichend geklärt, ob eine Habituation auf genetische Veränderungen oder auf eine physiologische Umstellung zurück geht (Heß, 1992).

Die Kulturbedingungen beeinflussen die Geschwindigkeit des Kalluswachstums aber auch sein Aussehen. Kallus kann ein lockeres oder festes Gefüge und verschiedene Differenzie-

rungen aufweisen. In älterem Kallus liegen oft lignifizierte Zellen sowie Elemente des Leitungssystems vor.

Verschiedene Färbungen können auftreten. Bei einer Kultivierung unter Lichtausschluss nimmt Kallus eine weißliche bis gelbe Färbung an, während unter Lichteinfluss gebildetes Chlorophyll eine grüne Färbung hervorruft. Durch die Anreicherung von Anthocyanen oder Betacyanen können rote Farbtöne auftreten. Ein bräunliches Aussehen ist ein Hinweis auf die Oxidation phenolischer Inhaltsstoffe. Die Zellen befinden sich in diesem Fall kurz vor dem Absterben oder sind bereits tot. Eine rasche Subkultur ist nötig.

1.1.1.3 Regeneration von Adventivorganen an Kallus

Kallus und Explantate können Meristeme aus differenzierten Zellen rekonstruieren. Durch Dedifferenzierung entstehen Adventivmeristeme für Sprosse und Wurzeln. Aus diesen Meristemen bilden sich Adventivknospen, welche zu Adventivsprossen bzw. Adventivwurzeln auswachsen können. Dieser Prozess wird als Organogenese bezeichnet.

Bei einer Kalluskultur bestimmen die Art und das Mengenverhältnis der eingesetzten Phytohormone im Medium, ob ein Kallus mit oder ohne Organogenese wächst. Bereits 1957 führten Skoog und Miller Untersuchungen an Tabak zur hormongesteuerten Organogenese durch. Explantate aus dem Mark von Tabak wurden auf Medien gesetzt, die die Phytohormone Indol-3-essigsäure (Auxin) und Kinetin (Cytokinin) in verschiedenen Konzentrationen enthielten. Ein bestimmtes Verhältnis dieser Phytohormone führte zur Induktion und zum Wachstum von Kallus. Bei hoher Auxin- und geringer Cytokininkonzentration im Medium bildeten die Explantate Adventivwurzeln, beim umgekehrten Verhältnis wurden Adventivsprosse gebildet (Skoog & Miller, 1957).

Diese Beobachtungen haben sich in der Gewebekultur für viele weitere Pflanzen als zutreffend erwiesen. Die optimalen Absolutwerte für die Phytohormone müssen dennoch bei jeder Pflanzenart erneut ermittelt werden. Bei einigen Pflanzen ist bisher keine Regeneration mittels Organogenese gelungen.

Nach Subkultivierungen über lange Zeiträume kann ein Kallus seine morphogenetische Potenz zur Ausbildung von Adventivorganen verlieren. Dies kann durch genetische Veränderungen oder durch morphologische Umstellungen bedingt sein. Das Regenerationsvermögen von Sprossen ist offensichtlich sensibler als das von Wurzeln (Hess & Leipoldt, 1979).

Für Vermehrungszwecke werden die Adventivsprosse abgetrennt und mithilfe eines weiteren Nährmediums bewurzelt. Aus den bewurzelten Sprossen werden ganze Pflanzen herangezogen. Ein zweiter Weg der Regeneration von intakten Pflanzen ist über die Bildung von Embryoiden, sogenannten somatischen Embryonen, möglich.

1.1.2 Suspensionskultur

Ausgehend von Kallus können Suspensionen angelegt werden. Zu diesem Zweck wird der Kallus soweit wie möglich zerkleinert und die entstandenen Zellkomplexe werden in einen Erlenmeyerkolben in Flüssigmedium überführt. Suspensionskulturen werden ständig leicht bewegt. Im Labormaßstab werden Rotationsschüttler eingesetzt, auf denen die Kolben platziert werden.

In der Suspension liegen hauptsächlich Zellaggregate vor. Mit zunehmendem Alter der Kultur können Zellklumpen entstehen. Einzelzellen können sich bisweilen durch die andauernde Bewegung herauslösen.

Suspensionen lassen sich auf festem Nährmedium ausplattieren. Im Idealfall wächst aus den Zellaggregaten und Einzelzellen der Suspension wieder Kallus. Dieser Kallus kann zur Regeneration von Pflanzen verwendet werden. In der Suspension können sich somatische Embryonen bilden, die auf festem Nährmedium auswachsen können.

1.1.2.1 Eigenschaften von Suspensionskulturen

Aufgrund der schnellen Vermehrung des Zellmaterials besitzt die Suspensionskultur deutliche Vorteile gegenüber der Kalluskultur auf festem Nährmedium. Auf diesem kann der Kallus Nährstoffe nur über den Teil seiner Oberfläche aufnehmen, der dem Medium aufliegt. Ein flüssiges Medium ermöglicht die Nährstoffaufnahme über die gesamte Oberfläche. Zudem ist die relative Oberfläche bei Zellaggregaten deutlich größer als bei einem massiven Kallus. In der Suspension entstehen keine lokalen Erschöpfungen der Nährstoffe durch die ständige Bewegung. Weiterhin lässt sich das Medium leicht wechseln und bestimmte Stoffe können den Suspensionen leicht zugesetzt werden. Suspensionen sind besser zur Kryokonservierung als Kalluskulturen geeignet und aus ihnen können gut somatische Embryonen oder Protoplasten gewonnen werden.

Suspensionskulturen wurden bereits von den verschiedensten Pflanzenarten etabliert. Mit ihnen können in Bioreaktoren sekundäre Metabolite für Medizin, Landwirtschaft, Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie produziert werden.

1.1.3 Variabilität in Gewebekulturen

Larkin & Scowcroft (1981) definierten alle in In-vitro-Kulturen auftretenden Veränderungen als somaklonale Variation. Evans et al. (1984) ergänzten, dass der Begriff der gametoklonalen Variation für Veränderungen an haploidem Material aus Antheren und Samenanlagen treffender sei. Bei Pflanzen können Soma und Keimbahn nicht voneinander getrennt werden. Folglich sind beide Bezeichnungen gleichermaßen unzutreffend (Heß, 1992). Dennoch sind beide Bezeichnungen allgemein gängig. Veränderungen, die aus In-vitro-Kulturen resultieren, können genetisch, epigenetisch oder physiologisch bedingt sein. In der Praxis sind jedoch genetische und epigenetische Veränderungen kaum zu unterscheiden.

Bei dem Prozess der Neubildung von Meristemen sind immer wieder **genetische Veränderungen** festzustellen. Diese können auch dann auftreten, wenn ausgehend von Primärregeneraten eine multiple Sprossbildung induziert wird. Vermehrt treten Veränderungen jedoch bei Regeneraten aus der Kallus-, Suspensions- und Protoplastenkultur auf. Der Weg der Regeneration – über Organogenese oder Embryoidbildung – ist dabei unbedeutend. Die Häufigkeit von Mutationen wird zudem durch die Konzentration und Art der angewandten Phytohormone sowie von der Dauer der Kultur beeinflusst.

Eine genetische Veränderung wird durch sexuelle Fortpflanzung weiter gegeben und kann durch Kreuzung oder Selbstung nachgewiesen werden. Mit einer karyologischen Analyse werden Genommutationen, die sich in einer Änderung der Chromosomenzahl äußern, belegt. Aus polyploiden oder aneuploiden Explantaten regenerierte Pflanzen besitzen dieselbe Chromosomenzahl wie die an der Regeneration beteiligten Zellen. Aufgrund dessen können die Zellen des Regenerates auch mixoploid sein, das heißt sie besitzen verschiedene Chromosomenzahlen. Mixoploide Pflanzen können auch aufgrund von Mutationen während der Regeneration entstehen.

Regeneratpflanzen besitzen wiederholt einen euploiden Chromosomensatz, obwohl auf Ebene der Gewebekultur Abweichungen festgestellt worden sind. Diploide oder polyploide Pflanzen haben offenbar einen Selektionsvorteil gegenüber aneuploiden Pflanzen während der Regeneration.

Chromosomenmutationen sind Veränderungen der Struktur einzelner Chromosomen, während Genmutationen einzelne Gene betreffen. Chromosomen- oder Genmutationen werden molekular, das heißt auf Ebene der DNA, mithilfe von molekularen Markern nachgewiesen.

In der Züchtung von Zier- und Nutzpflanzen können Somaklone nützlich sein. Es bestehen aber Nachteile bei der Selektion auf bestimmte Eigenschaften: Die gewünschte Variation wird oftmals von nachteiligen Mutationen begleitet. Die gewünschten Pflanzen können unter Umständen nur vegetativ vermehrt werden und eine weiterführende Züchtung ist bei Sterilität nicht möglich. Zudem können sich die Zellen *in vitro* anders verhalten als die aus ihnen regenerierten Pflanzen. Die genetische Basis der Veränderungen bleibt häufig unklar. Zahlreiche Vorteile bieten Mutationsversuche *in vitro*. Auf kleinstem Raum können große Versuchszahlen realisiert werden. Die Mutationsrate durch somaklonale Variation ist sehr hoch. Gleichzeitig steigt die Wahrscheinlichkeit von ungewünschten Mutationen. Dominante Mutationen, die Wachstum, Differenzierung und Regeneration betreffen, werden bei dem Verfahren unweigerlich eliminiert, da derartige Defekte keine Regeneration ermöglichen.

Epigenetische Variation betrifft die Expression des genetischen Materials. Differenzierungsprozesse, Außenfaktoren und die Expression anderer Gene bedingen sich gegenseitig. Das Wechselspiel der Pflanzenzellen mit verschiedenen Außenfaktoren führt zu der Einstellung eines **physiologischen Zustandes**. Zwei identische Genotypen können sich daher je nach Bedingungen verschieden verhalten. Auch in der In-vitro-Kultur sind die Versuchsbedingungen nie identisch.

1.1.4 Induzierte Mutagenese

Unter induzierter Mutagenese wird die Anwendung bekannter mutagener Faktoren mit dem Ziel der Auslösung von Mutationen bezeichnet. Physikalisch können Mutationen mit Gamma-, Röntgen-, Protonen- und kurzwelliger UV-Strahlung ausgelöst werden. Oehlkers (1943) entdeckte, dass auch bestimmte Chemikalien mutagen wirken. Bei den chemischen Mutagenen werden drei Gruppen unterschieden.

Basenanaloga wie 5-Bromuracil wirken durch ihren Einbau in die DNA mutagen oder beeinflussen die an der Replikation beteiligten Enzyme. Die zweite Gruppe bilden **methylierende Agenzien** wie Ethylmethansulfonat (EMS). Die Alkylgruppen (eine Methylgruppe bei EMS) werden an die Phosphat- und Stickstoffatome in den Basen der DNA abgegeben. Alky-

lierende Agenzien wirken im Vergleich zu Basenanaloga stark mutagen. Darüber hinaus werden **mitosehemmende Agenzien** wie Colchicin, Oryzalin, Trifluralin oder Amiprofos-Methyl zur Polyploidisierung eingesetzt.

1.1.4.1 Praktische Umsetzung der induzierten Mutagenese

Die Zellen werden den Mutagenen für eine bestimmte Zeit ausgesetzt. Wie von Oehlkers (1943) beschrieben, können mutagene Chemikalien dem Medium zugesetzt werden, sodass sie über den Spross in die Pflanze oder durch Diffusion in den Kallus aufgenommen werden. Sie wirken in den Zellen, vor allem während der Mitose und Meiose. Wenn Mutationen in den Gameten auftreten, werden sie vererbt.

In der konventionellen Mutationsauslösung werden häufig mutagene Strahlen eingesetzt. Ziele sind die Zellen der Apikalmeristeme. Es werden Samen und vegetative Pflanzenteile bestrahlt. Werden nicht alle Zellen eines Meristems verändert, können Chimären entstehen. Die Chimärenbildung kann mithilfe der In-vitro-Kultur verhindert werden, indem die Adventivbildung von einer einzelnen Zelle ausgeht. Über 1.200 Sorten von Kulturpflanzen wurden bisher durch induzierte Mutagenese erhalten, fast alle durch Bestrahlung von Samen (Heß, 1992).

1.1.5 Nährmedien für die In-vitro-Kultur

Die intakte Pflanze betreibt Photosynthese und ist daher autotroph. Dies trifft jedoch nicht auf isolierte Gewebeteile oder Organe zu. Pflanzliche In-vitro-Kulturen sind daher heterotroph und benötigen spezielle Nährstoffe und geeignete physikalische Voraussetzungen für ihr Wachstum.

Das Kulturmedium stellt Substanzen bereit, die von der intakten Pflanze über das Bodenwasser aufgenommen werden oder in ihren differenzierten Organen und Geweben gebildet werden. Dabei ist die optimale Zusammensetzung stark von der Art der Pflanze und den kultivierten Zellen und Geweben abhängig und muss auf jedes Pflanzenmaterial neu abgestimmt werden (Neumann, 1995). Der Erfolg von Gewebekulturen ist zu einem sehr großen Teil von dem gewählten Nährmedium abhängig (George et al., 2008).

Jede Pflanzenart besitzt individuelle Ansprüche. Daneben bedingt der jeweilige Explantatyp bzw. der Ursprung des Explantates das Verhalten *in vitro*. Mit den geeigneten Chemikalien in entsprechenden Formulierungen und in passender Kombination könnte praktisch jede Pflanze *in vitro* kultiviert werden (Huang & Murashige, 1977).

Pflanzen benötigen relativ große Mengen einiger anorganischer Elemente, die sogenannten Makroelemente und geringere Mengen anderer Elemente, die Mikroelemente. Diese nehmen die Pflanzen *in vivo* aus dem Boden auf.

Makroelemente sind Ionen von Stickstoff (N), Kalium (K), Calcium (Ca), Phosphor (P), Magnesium (Mg) und Schwefel (S). Zu den **Mikroelementen** gehören Ionen von Eisen (Fe), Nickel (Ni), Chlor (Cl), Mangan (Mn), Zink (Zn), Bor (B), Kupfer (Cu) und Molybdän (Mo). Zusammen mit Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O) und Wasserstoff (H) sind das die 17 essentiellen Elemente für Pflanzen (George et al., 2008).

1.1.5.1 Allgemeine Bestandteile von Nährmedien

Ein übliches Nährmedium enthält neben Wasser die folgenden Bestandteile:

- Makroelemente (immer enthalten)
- Mikroelemente (fast immer enthalten, teilweise Anzahl der Elemente reduziert)
- Zucker (fast immer enthalten)
- Phytohormone (fast immer enthalten)
- Vitamine (immer enthalten, Konzentration variiert)
- Verfestigende Zusätze (nach Bedarf)
- Aminosäuren und andere Stickstoffverbindungen (selten)
- undefinierte Substanzen (tragen zu den übrigen Komponenten bei, selten)
- Puffersubstanzen (selten)

Für eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Nährmedienbestandteile vergleiche George et al. (2008).

1.1.5.2 Basalmedien

Folgende Zusammensetzungen von Medien werden in der Pflanzengewebekultur häufig eingesetzt. Diese Medien mit ihren Makro- und Mikroelementen sowie Vitaminen können in Pulverform als Fertigmischungen, zum Teil auch in modifizierter Zusammensetzung, erworben werden:

- MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962)
- LS-Medium (Linsmaier & Skoog, 1965)
- B5-Medium (Gamborg et al., 1968)
- NN-Medium (Nitsch & Nitsch, 1969)
- N6-Medium (Chu et al., 1975)

Am häufigsten wird das Nährmedium nach Murashige und Skoog (MS-Medium, 1962, siehe Tabelle 1) verwendet, das speziell für ein optimales Wachstum von Tabakkallus entwickelt wurde.

Tab. 1: Zusammensetzung des MS-Mediums nach Murashige & Skoog (1962)

Verbindung	Konzentration in mg/L
Makroelemente	
NH ₄ NO ₃	1650,000
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440,000
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
KNO ₃	1900,000
Mikroelemente	
H ₃ BO ₃	6,200
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,800
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,300
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,250
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,600
Na ₂ x EDTA	37,200
Vitamine und organische Verbindungen	
myo-Inositol	100,000
Niacin	0,500
Pyridoxin x HCl	0,500
Thiamin x HCl	0,100
Indol-3-essigsäure	1,0 – 30,000
Kinetin	0,04 – 10,000
Glycin	2,000
Ethylendiamin	1,000

Das Medium enthält darüber hinaus 10 g/L Agar und 30 g/L Saccharose. Der pH-Wert wird auf 5,7 eingestellt.

1.1.5.3 Anpassung von Basalmedien

Wenn ein Basalmedium für einen Versuch ausgewählt wird, muss es in der Regel angepasst werden. Meist werden die Phytohormone, insbesondere Auxine und Cytokinine, variiert. Ebenso wird die Gesamtkonzentration der Makro- und Mikroelemente häufig modifiziert. Das Hauptproblem bei der Veränderung anorganischer Nährstoffe sind Ausfällungserscheinungen. Diese treten häufig nach dem Autoklavieren auf (George et al. 2008). Ausgehend von der elementaren Zusammensetzung der untersuchten Pflanzenart ist eine Anpassung des Mediums möglich. So kann oftmals ein deutlich verbessertes Wachstum erreicht werden (Rugini et al., 1987; Bouman & Tiekstra, 2005).

1.2 Phytohormone und Signalstoffe

Pflanzen besitzen wie andere hochentwickelte Organismen ein differenziert entwickeltes Hormonsystem. Phytohormone sind extrazelluläre, niedermolekulare Botenstoffe. Sie kontrollieren die pflanzliche Entwicklung, ermöglichen die Kommunikation verschiedener Pflanzen und dienen als Reaktion auf Umweltsignale. Bildungs- und Wirkort liegen in der Regel auseinander. Einige Phytohormone werden von den Empfängerzellen selbst gebildet. Die Empfängerzellen besitzen Rezeptor- und Signaltransduktionssysteme. Phytohormone sind in kleinsten Mengen wirksam ($\leq 10^{-6}$ M) (Nover, 2008). Sie haben selten einen Einfluss auf den differenzierten Organismus, sondern vielmehr auf das Wachstum und die Differenzierung selbst. Darüber hinaus besitzen sie eine – im Vergleich zu tierischen Hormonen – geringe Organ- und Gewebespezifität. Daher existiert ein multiples Wirkungsspektrum: Die Phytohormone sind die Auslöser von Reaktionen, aber die Art der Reaktion ist abhängig von dem jeweiligen Differenzierungszustand der Empfängerzelle. Verschiedene Organe können verschiedene Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Phytohormonen aufweisen. (Bresinsky et al., 2008).

Die Wirkung wird zusätzlich durch den Transport und die Verteilung reguliert, da die am Wirkort vorliegende Konzentration entscheidend für die Reaktion ist. Aufgrund dessen muss die Phytohormonkonzentration am Wirkort strikt reguliert werden durch Synthese

und Abbau, aber auch durch Konjugation und Speicherung sowie durch den An- und Abtransport.

Bei Pflanzen und Tieren sind einige Hormone und Signalstoffe identisch wie Steroide, Peptidhormone, Oxylipine (Jasmonsäure), Salicylsäure, Stickstoffmonoxid (NO), Calciumionen (Ca^{2+}). Pflanzenspezifisch sind zum Beispiel Auxine, Cytokinine, Gibberellinsäure und Ethylen (Nover, 2008). Neben den „klassischen“ Phytohormonen, auf die im Folgenden eingegangen wird, existieren zahlreiche weitere hormonartige Signalstoffe, die oft nur bei Stress oder Pathogenbefall gebildet werden.

1.2.1 Auxine

1.2.1.1 Entdeckungsgeschichte der Auxine

In den Jahren 1860 bis 1870 führte der Pflanzenphysiologe Julius Sachs umfangreiche Untersuchungen zu Blühinduktion, Knollenbildung, Apikaldominanz und weiteren Gebieten durch. Er vermutete, dass es spezifische Signalstoffe gibt, die eine Organbildung in Pflanzen bewirken.

An abgeschnittenen Weidenzweigen, die er in einer feuchten Kammer inkubierte, beobachtete er eine Regeneration von Wurzeln und Sprossen. Auch wenn er die räumliche Anordnung der Zweige änderte, entsprachen Spross- und Wurzelpol immer der ursprünglichen Orientierung in der intakten Pflanze. Wurden die Zweige erneut geteilt, entstand an den Schnittstellen der durchtrennten Phloembahnen ein neuer Spross- bzw. Wurzelpol. Heute ist bekannt, dass ein Auxingradient die Bildung von Wurzeln oder Sprossen bestimmt (Nover, 2008).

Unabhängig von Sachs untersuchten Charles Darwin und sein Sohn Francis (1880) die lichtabhängige Krümmung von Gräserkoleoptilen. Sie beobachteten, dass die Koleoptile Licht wahrnimmt. Dies löst im subapikalen Bereich ein Signal aus, welches zur Krümmung der Koleoptile und dem zum Licht gerichteten Wachstum führt.

Später (1926) entwickelte der holländische Student Frits Went in Anlehnung an Darwins Versuche einen Biotest mit Haferkoleoptilen. Er entfernte die Spitze der Keimlinge und setzte Agarblöckchen auf den Stumpf. Wurde das Blöckchen nach einiger Zeit auf einen anderen Koleoptilenstumpf aufgesetzt, bewirkte es dort eine Krümmung. Went nannte die Substanz, die für die Krümmung der Koleoptile verantwortlich war, Auxin (von gr. auxein

„wachsen“). Die chemische Struktur des von ihm untersuchten Auxins wurde von Kogl und Haagen-Smit (1931) als Indol-3-essigsäure identifiziert.

1.2.1.2 Definition von Auxinen

Auxine fördern das Streckungswachstum von Zellen und damit das Längenwachstum von Spross und Wurzel. In höheren Konzentrationen besitzen sie eine wachstumshemmende Wirkung. Die Definition der Auxine richtet sich demnach nicht nach ihrer Struktur sondern nach den charakteristischen Wirkungen.

Das in Pflanzen am weitesten verbreitete Auxin ist Indol-3-essigsäure (IAA, engl.: indoleacetic acid). Es kommt wahrscheinlich in allen Pro- und Eukaryoten vor, agiert aber nur in Embryophyten als Signalstoff. Weitere natürliche Auxine mit geringerer Bedeutung sind Indolacrylsäure, Phenyllessigsäure (bei Tabak) und halogenierte Derivate der IAA (bei Leguminosen).

In der Gewebekultur häufig verwendete synthetische Auxine sind 1-Naphthyllessigsäure (NAA, engl.: 1-naphthaleneacetic acid), Indol-3-buttersäure (IBA, engl.: indole-3-butyric acid) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D).

1.2.1.3 Biosynthese von Auxinen

Auxine werden in embryonalen Geweben (Meristeme, Embryonen) und in Organen mit Photosyntheseaktivität (vor allem wachsende Laubblätter) sowie im Wurzelsystem gebildet. Für IAA existieren sechs unterschiedliche Synthesewege in Mikroorganismen und Pflanzen. Vier dieser Wege sind pflanzenspezifisch, während zwei mikrobielle Synthesewege nach Infektion und Gentransfer von *Agrobacterium tumefaciens* ablaufen. Die Biosynthese beginnt meistens mit der Aminosäure L-Tryptophan (Trp) als Ausgangspunkt. Daneben ist ein Trp-unabhängiger Weg in Pflanzen weit verbreitet, der von einer Vorstufe aus dem Trp-Syntheseweg ausgeht.

Gebildet werden Auxine hauptsächlich in den Geweben in der Nähe von Meristemen im Spross. Der Hauptbildungsort ist das junge Gewebe unterhalb des Sprossapikalmeristems. Daneben synthetisieren die Gewebe oberhalb der Meristeme der Haupt- und Seitenwurzeln sowie sich entwickelnde Blätter, Blüten, Samen und Pollen Auxine.

1.2.1.4 Speicherung und Abbau von Auxinen

IAA liegt zu etwa 99 % konjugiert vor. Den größten Anteil haben Amidkonjugate mit Aminosäuren (Ala, Leu und Asp). Es gibt zudem Esterkonjugate mit Zuckern (Glucose oder Inosit). Die Konjugate sind biologisch inaktiv und dienen der Speicherung, dem Transport und der Entfernung des aktiven Wirkstoffes. In einigen Samen wie bei *Arabidopsis* Heynh. und *Vicia* L. existieren spezielle Speicherformen, bei denen IAA mit Speicherproteinen verknüpft wird.

Die kontrollierte und bedarfsgerechte Freisetzung der Phytohormone ist entscheidend für die Homöostase der Gewebe. In der Zellkultur zugeführte Auxine werden rasch in Zuckerkonjugate überführt. Nach heutigem Erkenntnisstand dienen diese der Speicherung und langfristigen Versorgung der Gewebe mit Auxinen.

Der Abbau von IAA erfolgt oxidativ. Je nach Pflanzenart gibt es verschiedene Reaktionsfolgen. Verbreitet ist der Abbau durch eine relativ unspezifische Monooxygenase („IAA-Oxidase“). Die IAA-Oxidase kann synthetische Auxine wie NAA oder 2,4-D nicht abbauen. Daraus resultiert die Stabilität von synthetischen Auxinen. Der Abbau durch Peroxidasen hat eine geringere Bedeutung in Pflanzen.

1.2.1.5 Transport von Auxinen

Bei den Auxinen können Bildungs- und Wirkort weit auseinander liegen. Der Transport erfolgt im Phloem mit dem Assimilatstrom. Charakteristisch sind ein basipetaler Gradient im Spross und ein akropetaler Gradient (zur Wurzelspitze hin) in den Wurzeln. Der Kurzstreckentransport erfolgt polar durch die parenchymatischen Zellen. Auf diese Weise entstehen lokale Auxingradienten, die eine entscheidende Voraussetzung für die Zelldifferenzierung und -entwicklung sind.

Im Modell funktioniert der Transport wie folgt: Die Zellen nehmen auf einer Seite die ungeladene (hydrophobe) Indol-3-essigsäure (IAAH) auf. Auf der anderen Seite der Zelle erfolgt die Abgabe als Indol-3-acetat-Anion (IAA⁻) plus H⁺. Der Influxtranslokator ist der IAAH/H⁺-Symporter AUX1. So wird der Influx durch den Protonengradienten zwischen der Zellwand und dem Cytoplasma angetrieben. Der Effluxtranslokator ist ein Vertreter der PIN-Proteine. Der notwendige Protonengradient wird durch ATP-getriebene Protonenpumpen in der Plasmamembran erzeugt. Die Richtung des polaren Transports von IAA ist stark vom Influxtranslokator AUX1 abhängig.

Das synthetische Analogon NAA besitzt stärkere hydrophobe Eigenschaften als IAA und kann nahezu ungehindert durch die Plasmamembran diffundieren. Da NAA zudem eine deutlich höhere Stabilität als IAA besitzt, weisen beide Verbindungen große Unterschiede in ihrer Wirkung auf (Nover, 2008).

1.2.1.6 Wirkung von Auxinen

Auxinwirkungen sind in Organismen sehr verschieden und können je nach Entwicklungszustand der Gewebe sogar gegensätzlich sein. Die folgende Übersicht gibt einen Einblick in die Vielzahl an Prozessen mit Auxinbeteiligung:

Förderung der Zellstreckung, Entstehung von Blattanlagen sowie Phyllotaxis, Anlage von Seitenwurzeln, Entstehung von Adventivwurzeln, Hemmung des Wurzelwachstums, Steuerung der Embryonalentwicklung und Organanlage, Gefäßentwicklung und ausgewogene Anlage von Phloem- und Xylemzellen, Phototropismus, Gravitropismus, Kontrolle des Zellzyklus zusammen mit weiteren Hormonen, Entwicklung von Lateralmeristemen (Kambium und Korkkambium), Förderung der Fruchtentwicklung sowie von Samen und Früchten, Förderung der Ethylenbildung und damit Frucht- und Blattabfall bei hohen Auxinkonzentrationen, Apikaldominanz durch Hemmung des basipetalen Transports von Cytokininen. Details zu den einzelnen Wirkungen können in der Fachliteratur (beispielsweise bei Bresinsky et al., 2008) nachgelesen werden. Im Folgenden soll lediglich die Wirkung von Auxinen auf das Streckungswachstum beschrieben werden.

1.2.1.7 Auxin vermittelte Wachstumsprozesse

Anders als während der Mitose verlaufen durch Auxine vermittelte Wachstumsprozesse nicht isodiametrisch. Stattdessen wird die Primärwand vergrößert und die Zelle streckt sich entlang einer Längsachse. Bei der Auxin-vermittelten Zellstreckung verläuft das Wachstum in zwei Phasen.

Zuerst laufen **schnelle Reaktionen** ab, die auch als Säurewachstumsreaktion bezeichnet werden. Die H⁺-Konzentration im Apoplast erhöht sich temporär, da IAA ATP-abhängige Protonenpumpen in der Zellwand aktiviert. Die daraus resultierende Hyperpolarisation bewirkt den nachfolgenden Einstrom von Kalium- und Chloridionen. Dies führt zu erhöhter Wasseraufnahme in die Vakuole und damit zum Anstieg des Turgors.

Durch die Ansäuerung der Zellwand werden zudem Expansine aktiviert, die an die Cellulosemikrofibrillen der Zellwand binden und deren Wasserstoffbrückenbindungen zu

den Xyloglucanen (Hemicellulosemolekülen) lösen. Gleichzeitig werden auch kovalente Bindungen in den Zellwandpolymeren gelockert, sodass ein Auseinandergleiten der Zellwandkomponenten ermöglicht wird. Durch den Einstrom von Wasser durch Osmose erfolgt eine rasche Dehnung, die innerhalb von Sekunden bis Minuten abläuft.

Es folgen die **langsamen Reaktionen**, bei denen die Stabilität der Zellwand durch den Einbau von neuem Zellwandmaterial wieder hergestellt wird. Aufgrund der notwendigen Genexpressionsprozesse dauert diese Phase mehrere Stunden. Der Prozess kann durch die Anwesenheit von Gibberellinen stark gefördert werden. Das Golgi-System liefert neues Material für die Zellwand (Pektine, Hemicellulosen, Extensine) an. Zudem findet eine Synthese von Cellulose an der Plasmamembran statt. Wahrscheinlich sind Transglycosidasen an diesem Prozess beteiligt, die kovalente Bindungen zwischen Zellwandbestandteilen lösen und neu knüpfen können.

Eine Förderung des Wachstums durch exogene Applikation von IAA ist bei intakten Pflanzen kaum zu beobachten. Die in der Regel beobachtete hemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum ist in der bereits optimalen IAA-Versorgung intakter Gewebe begründet. Spross- und Koleoptilensegmente reagieren dagegen mit einem deutlichen Streckungswachstum, das von der jeweils applizierten IAA-Konzentration abhängig ist (Bresinsky et al., 2008).

1.2.1.8 Molekularer Wirkungsmechanismus von Auxinen

Die Wirkungsweisen der Auxine lassen auf mindestens zwei verschiedene beteiligte Rezeptoren schließen. Seit mehr als 30 Jahren ist ein kleines Glycoprotein bekannt, welches sich hauptsächlich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet. Dieses Auxinbindende Protein wird ABP1 (engl.: auxin binding protein) genannt. In kleinen Mengen kommt es auch an der Plasmamembran vor und ist möglicherweise an ein Transmembranprotein gebunden (Nover, 2008).

Die typischen Reaktionen während der ersten durch IAA ausgelösten Wachstumsphase konnten bei Protoplasten durch Antikörper gegen ABP1 blockiert werden (Napier, 2004). Ein Knock-Out des ABP1-Gens bei *Arabidopsis* führt zu einer fatalen Störung früherer Entwicklungsstadien, sodass der Embryo abstirbt.

Für die zweite Wachstumsphase ist ABP1 nicht bedeutsam. Zur Klärung des Mechanismus wurden viele Mutanten von *Arabidopsis* untersucht. Vereinfacht beruht die Auxinwirkung

auf dem Abbau eines Repressors (AXR, nach der Mutante engl.: auxin resistant), welcher den Transkriptionsfaktor ARF (engl.: auxin responsive factor) inaktiviert.

In *Arabidopsis* wurden bisher 29 Repressor-Gene des AXR-Typs gefunden und 23 Gene für den Transkriptionsfaktor ARF. Mutationsanalysen lassen auf eine gewebetyp- und entwicklungsstandabhängige Kombination von Repressor und Aktivator in den Zellen schließen (Nover, 2008).

1.2.2 Cytokinine

Cytokinine sind Derivate des Adenins, die einen Substituenten am Stickstoffatom 6 besitzen. Anhand des Substituenten lassen sich zwei Grundtypen unterscheiden.

Isoprenoid-Cytokinine besitzen einen Isopren- oder Hydroxyisoprenrest als Seitenkette. Vertreter dieser Gruppe sind Isopentenyladenin (IPA), trans-Zeatin (tZ) und cis-Zeatin (cZ). Die Cytokinine tZ und IPA sind weit verbreitet. Cis-Zeatin liegt in einigen tRNAs in der Umgebung zum Anticodon vor. Ob das frei werdende cZ beim Abbau der tRNA eine Wirkung als Phytohormon besitzt, ist fraglich (Buchanan, 2000). **Aromatische Cytokinine** besitzen einen Benzyl- oder m-Hydroxybenzylrest als Seitenkette. Zu ihnen gehören zum Beispiel 6-Benzylaminopurin (BAP) und meta-Topolin (mT) (Nover, 2008).

Die erste gut untersuchte Verbindung mit starker Cytokininwirkung war Furfuryladenin (Kinetin). In der Natur kommt Kinetin nicht in Pflanzen vor. Es entsteht beim Autoklavieren von DNA durch Hydrolyse, Phosphatabspaltung und Umlagerung der Desoxyribose unter Wasserabspaltung. Kinetin wurde auch im menschlichen Harn nachgewiesen (Bresinsky et al., 2008). Synthetische Cytokinine werden aufgrund ihrer Stabilität in der Zellkulturtechnik bevorzugt eingesetzt. Auch BAP und tZ weisen eine hohe Stabilität auf.

1.2.2.1 Biosynthese der Cytokinine

Der erste Schritt der Cytokininbiosynthese erfolgt in den Plastiden. Dort wird eine Isoprenoideinheit durch die Isopentenyltransferase von Isopentenylidiphosphat auf ADP übertragen. Die Hydroxygruppe in der Seitenkette des tZ wird auf Nucleotidstufe durch eine Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase eingeführt.

Der zweite Schritt findet am ER statt. An der Plastidenhülle muss daher ein Cytokinin-Nucleotid-Transporter existieren, der noch nicht identifiziert werden konnte. Obwohl die Biosynthese maßgeblich auf der Nucleotidstufe abläuft, sind nur die freien Basen, IPA und tZ, biologisch wirksam.

Der Hauptsyntheseort der Cytokinine ist die Wurzel, vor allem die Columellazellen der Wurzelspitzen, die Markzellen und die Phloemgeleitzellen. Darüber hinaus werden Cytokinine überall dort gebildet, wo Zellteilung stattfindet oder neu beginnt, das heißt in jungen Blättern und Stängeln, Blütenknospen, grünen Schoten und sich entwickelnden Samen (Bresinsky et al., 2008). Die Synthese der aromatischen Cytokinine ist noch unklar.

Die in den Wurzeln gebildeten Cytokinine sind maßgeblich für die Ausbildung der pflanzlichen Gestalt im Allgemeinen und speziell für die Balance zwischen der Ausprägung von Spross- und Wurzelsystem verantwortlich.

1.2.2.2 Transport der Cytokinine

Der Transport der Cytokinine aus den Wurzeln in den Spross erfolgt als Nucleoside im Xylem. Es ist noch nicht geklärt, wie viel Cytokinin aus den Wurzeln angeliefert wird und welche Menge in den Sprossgeweben selbst gebildet wird. Da kein polarer Cytokintransport in den Geweben existiert, erfolgt die Verteilung über kurze Distanzen wahrscheinlich über Diffusion (Bresinsky et al., 2008).

1.2.2.3 Konjugation und Abbau der Cytokinine

Eine Konjugation der Cytokinine findet im Wesentlichen als Glycosylierung an den Ringstickstoffatomen 3, 7 und 9 statt sowie an der Hydroxygruppe der Seitenkette. Glycosylierte Cytokinine stellen meist inaktive Speicherformen dar. Das Ribosid des tZ dient dem Transport (Bresinsky et al., 2008).

Der Abbau des Zeatins zu Adenin und 3-Hydroxymethylbutenal erfolgt durch die Cytokinin-Oxidase. Aus IPA entstehen auf demselben Weg Adenin und 3-Methyl-2-butenal und die entsprechenden Glucoside (Nover, 2008). Bei den aromatischen Cytokininen ist der Abbaumechanismus noch nicht bekannt.

1.2.2.4 Biologische Wirkungen der Cytokinine

Wie die übrigen Phytohormone sind Cytokinine in zahlreiche physiologische Prozesse eingebunden und es existieren vielseitige Wechselwirkungen mit anderen Hormonen. Cytokinine sind die klassischen Hormone der Zellteilung (Cytokinese) und nach ihr benannt. Sie sind deutlich von den Cytokinen der Tiere zu unterscheiden. Obwohl Cytokine ebenfalls die Zellteilung fördern, handelt es sich bei ihnen um Peptidhormone.

Wirkungen von Cytokininen sind immer bei Wachstumsprozessen mit Zellteilung festzustellen. Sie haben eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle des Zellzyklus neben weiteren Hormonen. Die Stabilität der Meristemzone (Meristemhomöostase), das heißt die Balance zwischen Zellerneuerung und Differenzierung, wird durch Cytokinine kontrolliert. Die Knospentwicklung steht in Verbindung mit dem Einfluss von Cytokininen auf die Meristeme. In erhöhten Konzentrationen wirken sie der Apikaldominanz entgegen und bewirken das Austreiben der Knospen. Antagonisten bei diesem Prozess sind insbesondere Auxine.

Cytokinine wirken Seneszenzprozessen entgegen. Ein klassischer Versuch mit abgeschnittenen Tabakblättern nach Mothes (1960) zeigt die Bedeutsamkeit der Cytokinerversorgung aus den Wurzeln. Die Blätter altern sehr schnell, wenn sich keine neuen Wurzeln an den Blattstielen bilden, die die Cytokinerversorgung übernehmen. Isolierte, aber bewurzelte Blätter sind prinzipiell unsterblich. Ein gealtertes und vergilbtes Blatt kann experimentell durch Besprühen mit Cytokininlösung wieder zum Ergrünen gebracht werden, indem die entstandenen Gerontoplasten wieder zu Chloroplasten gebildet werden.

Die Anwesenheit von Cytokininen macht die Zellen zu einem Sink für die Anlieferung von Metaboliten aus den umgebenden Zellen und Geweben, sodass Zellen mit einer Unterversorgung an Cytokininen sterben, während die übrigen überleben. Dies wird als Attraktionswirkung oder Retentionswirkung der Cytokinine bezeichnet.

Auf molekularer Ebene induzieren Cytokinine die Akkumulation des Enzyms Zellwandinvertase. Dies führt zu einer verstärkten Saccharosespaltung und damit zu einer besseren Versorgung der Gewebe mit Hexosen. Gleichzeitig wird Saccharose verstärkt aus dem Phloem entladen. Ein Cytokininmangel führt zu Zellverarmung und Verkümmern neu angelegter Organe. Ein Überschuss führt zu Hypertrophie.

Der wichtigste Biotest für die Cytokininaktivität ist der Tabakmarkkallustest: Auf einem definierten Nährboden ist die Gewichtszunahme von steril herangezogenem Kallusgewebe proportional zu der applizierten Cytokininkonzentration. Der Nährboden enthält eine definierte Menge Auxin, die die Wirkung der Cytokinine unterstützt (Bresinsky et al., 2008).

1.2.2.5 Molekularer Wirkungsmechanismus der Cytokinine

Die Wirkung der Cytokinine wird über ein sogenanntes Phosphorelay-System gesteuert. Ein Rezeptor im Plasmalemma, eine ligandenabhängige Proteinkinase, bindet das Cytokinin und löst eine Kaskade von Phosphorylierungen aus. Die Besonderheit des Phosphorelay-Systems besteht darin, dass ein Phosphatrest innerhalb von Proteinketten jeweils zwischen zwei Domänen mit einem zentralen Histidin (His)- bzw. Asparaginsäure (Asp)-Molekül weitergegeben wird. Bei der Übertragung vom His- zum Asp-Rest findet im Gegensatz zu den MAP-Kinase-Kaskaden (MAP, engl. mitogen-activated protein) keine Amplifikation des Signals statt (Nover, 2008). Die Ziele der Reaktionskette sind Response-Regulatorproteine (ARR, engl.: *Arabidopsis* response regulator) im Zellkern. Es existieren zwei Typen mit unterschiedlichen Funktionen:

ARR-Typ-B besitzen eine komplexe Struktur mit einer N-terminalen Empfängerdomäne mit dem charakteristischen Asp-Rest für die Übernahme des Phosphatrestes vom His-Rest des AHP (engl.: *Arabidopsis* histidine phosphotransfer protein). Daneben besitzen ARR-B-Proteine eine zentrale DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Aktivator-domäne. Im unphosphorylierten Zustand sind ARR-B-Proteine inaktiv, weil die Aktivator-domäne durch die Empfängerdomäne abgeschirmt wird.

ARR-Typ-A besitzen nur eine Empfängerdomäne und können daher nicht an DNA binden. Die Expression der ARR-A-Proteine steigt unter Einwirkung von Cytokinin stark an. Bei Mangelmutanten von ARR-A lösen bereits geringe Mengen an Cytokinin starke Antworten aus. Daraus ist zu schließen, dass ARR-A-Proteine Repressoren der Hormonantwort sind (Nover, 2008).

1.2.3 Gibberelline

Zu der Gruppe der Gibberelline zählen nach der chemischen Struktur über 130 Verbindungen. Die biologisch aktiven Gibberelline sind allein die Gibberellinsäuren GA₁, GA₃, GA₄ und GA₇ (GA, engl.: gibberellic acid). Die übrigen Verbindungen sind zumeist Intermediate aus der Biosynthese oder dem Abbau der wenigen aktiven Formen.

1.2.3.1 Entdeckungsgeschichte der Gibberelline

In Japan ist den Reisbauern die Gibberellinwirkung bereits seit langem im Zusammenhang mit einem phytopathologischen Problem bekannt. Bei Bakanae, der „Krankheit der verrückten Keimlinge“, zeigen die Reispflanzen ein unverhältnismäßiges Streckungswachstum

und fallen um, da das Festigungsgewebe nicht hinreichend schnell nachgebildet wird. Ausgelöst wird die Krankheit durch den Pilz *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw., einer imperfekten Form von *Fusarium moniliforme* J. Sheld.. Der Pilz bildet einen Stoff, der 1935 von einem japanischen Forscher als Gibberellinsäure bezeichnet wurde und heute GA₃ heißt (Nover, 2008).

GA₃ kommt in höheren Pflanzen im Vergleich zu GA₁ und GA₄ selten vor. Dennoch können viele gibberellinregulierte Prozesse damit ausgelöst werden. Da GA₃ durch Fermentationsprozesse mit Stämmen von *Gibberella fujikuroi* in größeren Mengen aus dem Kulturfiltrat gewonnen werden kann, ist es das am häufigsten für Experimente verwendete Gibberellin. Bisher ist keine synthetische Herstellung biologisch aktiver Gibberelline möglich.

1.2.3.2 Biologische Wirkungen der Gibberelline

Gibberelline sind an zahlreichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt. Zu diesen zählen insbesondere die Förderung des Streckungswachstums des Sprosses sowie der Samenkeimung und der Blütenentwicklung. Die Wirkung der Gibberelline auf das Streckungswachstum ist eng mit der Auxinwirkung verbunden. Die Anwesenheit von Auxinen fördert zudem die Synthese und hemmt den Abbau von Gibberellinen.

Wenn die Samenkeimung mit der Wasseraufnahme beginnt, wird die Neusynthese von Gibberellinen im Embryo induziert. Die Gibberelline sind ein Signal für die Samenkeimung und lösen an den Aleuronschichten komplexe Entwicklungsprozesse aus. Gleichzeitig wird der durch Abscisinsäure bedingte Ruhezustand aufgehoben. Mutanten mit Defekten im Gibberellinstoffwechsel weisen einen starken Zwergwuchs auf. Bei einigen Halbzwegsorten von Getreide werden diese Defekte genutzt (Bresinsky et al., 2008).

1.2.4 Brassinosteroide

In ihrer Struktur und Biosynthese gehören Brassinosteroide zu den Triterpenen bzw. Steroidhormonen. Erstmals wurden Brassinosteroide in der Pflanzengattung *Brassica* L. nachgewiesen und nach ihr benannt.

Es existieren etwa 50 Verbindungen mit dieser Struktur. Es sind jedoch nur wenige der Verbindungen biologisch aktiv. Zu den biologisch wirksamen Brassinosteroiden gehören Brassinolid und Castasteron. Sie kommen in allen niederen und höheren Pflanzen vor, jedoch wurde ihre Wirkung bisher nur bei Samenpflanzen untersucht.

1.2.4.1 Biologische Wirkungen der Brassinosteroide

Brassinosteroide werden vermehrt in stark wachstumsaktiven Geweben von Spross und Wurzel sowie in sich entwickelnden Blütenknospen, Pollen und Samen gebildet. Dort begünstigen sie das Zellwachstum und die Zellteilung. Ihre Wirkung ist von der Anwesenheit geringer Mengen an Auxin abhängig.

Mutanten, die Defekte in der Brassinosteroidsynthese, -rezeption oder -signaltransduktion aufweisen, zeichnen sich durch Zwergwuchs aus. Bei einer Zellgröße von etwa 10 bis 20 % des Wildtyps besitzen sie dieselbe Anzahl an Chloroplasten. Daher erscheinen ihre Blätter dunkelgrün. Zudem zeigen derartige Mutanten eine stark verzögerte Entwicklung, die mit Fertilitätsproblemen einher geht.

Brassinosteroide besitzen eine antagonistische Wirkung zu Auxinen bei der Steuerung von Photo- und Gravitropismus. Darüber hinaus werden einige Auxinrepressoren durch die Anwesenheit von Brassinosteroiden gefördert (Nover, 2008).

1.2.5 Ethylen

Die Wirkung von Ethylen (Ethen) als Phytohormon wurde durch den jungen russischen Botaniker Dimitri Neljubow (1901) entdeckt, der Erbsenkeimlinge beobachtete, die ihre Sprossachsen horizontal statt vertikal ausrichteten. Grund für dieses Phänomen war Ethylen, welches sich im Gas für die Laborbeleuchtung befand. Von den Biologen wurde Ethylen erst etwa 70 Jahre später als Phytohormon anerkannt (Nover, 2008).

Aufgrund seiner Flüchtigkeit kann Ethylen nicht nur als Hormon (innerhalb des Organismus) wirken sondern auch als Pheromon (zwischen Individuen einer Art) oder Kairomon (zwischen Individuen verschiedener Arten). Es wird zu jeder Zeit in geringen Mengen von Pflanzen gebildet (Bresinsky et al., 2008).

1.2.5.1 Biologische Wirkungen von Ethylen

Ethylen ist in eine Vielzahl von physiologischen Prozessen eingebunden. Es lassen sich drei Hauptkategorien unterscheiden.

Ethylen wirkt als **Reifungshormon** und fördert die Fruchtreife und den Fruchtabfall sowie die Blattalterung und den Blattabfall. Bereits nach der Befruchtung wird die Alterung der Blütenorgane angeregt. Antagonist in dieser Wirkung sind Auxine. In geringeren Konzentrationen verhindern sie einen frühzeitigen Fruchtabfall. Auf der anderen Seite werden stark wirkende Auxine als Herbizide eingesetzt, die zu einer frühzeitigen Ethylenbildung

und Alterung führen. Durch Ethylenzugabe kann bei vielen Arten die physiologisch bedingte Dormanz der Samen, Zwiebeln oder Achselknospen aufgehoben werden.

Die wachstumsbeeinflussende Wirkung von Ethylen ist unter dem Namen **Triple Response** (Dreifachantwort) bekannt. Das durch Auxine bewirkte Streckungswachstum von Spross und Wurzel wird reduziert, die Sprossachse wird verdickt und die Krümmung des Hypokotylhakens bei den Keimlingen wird verstärkt. Mechanische Belastungen, wie etwa das Antreffen eines Widerstandes beim Wachsen, lösen ebenfalls eine Ethylenproduktion aus. Auf diese Weise können Keimlinge Hindernisse im Boden umwachsen.

Eine große Bedeutung kommt Ethylen als **Stresshormon** zu. Während vieler Stresssituationen, insbesondere bei Sauerstoff- und Wassermangel sowie bei Hitze- und Trockenstress, bilden Pflanzen große Mengen an Ethylen.

1.2.6 Abscisinsäure

Bei Abscisinsäure (ABA, engl.: abscisic acid) handelt es sich um ein Derivat des Isoprenstoffwechsels. Der Name ist entdeckungsgeschichtlich bedingt und aus heutiger Sicht irreführend. Der den frühzeitigen Abwurf (engl.: abscission) von Bauwollkapseln auslösende Stoff wurde Abscissin II genannt. Heute ist bekannt, dass Ethylen die Abtrennung bestimmter Pflanzenteile wie Früchte und Blätter induziert. Der Dormanz auslösende Faktor bei Ruheknospen wurde als Dormin bezeichnet. Die spätere Strukturaufklärung ergab die chemische Identität von Abscissin II und Dormin und wurde als ABA bezeichnet. ABA kommt in allen niederen und höheren Pflanzen, sowie in Algen, Pilzen und Cyanobakterien vor.

1.2.6.1 Biologische Wirkungen von Abscisinsäure

Die biologischen Wirkungen von ABA sind zwei großen Kategorien zugehörig: die Auslösung von Ruhezuständen (Dormanz) von Pflanzenorganen sowie die Regulation des Wasserhaushaltes in Stresssituationen.

Dormanz. ABA hemmt die Blühinduktion und die Samenentwicklung. Bei der durch ABA induzierten und aufrechterhaltenen Samenruhe werden Speicherproteine und Dehydrine im Samen eingelagert. Letztere schützen den Embryo vor Schäden durch Wasserentzug bei Austrocknung des Samens. Wenn das letzte Stadium der Ruhephase erreicht ist, wird ein vorzeitiges Auskeimen durch eine relativ hohe ABA-Konzentration verhindert, bis die

Keimruhe durch Licht- oder Kälteeinflüsse und Wasseraufnahme aufgehoben wird. In vielen Fällen sind Gibberelline für die Aufhebung der Keimruhe verantwortlich. Bei diesem Prozess ist oftmals das Konzentrationsverhältnis wichtiger als die absoluten Konzentrationen.

Stressantwort. Die ABA-Synthese ist eng verbunden mit Störungen im Wasserhaushalt, Trockenstress, osmotischem Stress, Salzstress, Kälte und Pathogenbefall. Bei Wassermangel ist die durch ABA bewirkte Schließung der Stomata von besonderer Bedeutung. Die natürliche Regulierung durch Änderung der Lichteinwirkung und der CO₂-Konzentration wird in diesem Fall von ABA überlagert.

Darüber hinaus erhöht ABA die hydraulische Wasserleitfähigkeit der Wurzeln, fördert das Wurzelwachstum und hemmt gleichzeitig das Sprosswachstum. Letzteres ist auch als eine Anpassung an einen chronischen Wassermangel zu sehen. Auxin ist ein Gegenspieler der ABA, der die Anlage und Entwicklung von Seitenwurzeln hemmt. Bei Stressantwort wird ABA über weite Strecken im Xylem transportiert.

1.2.7 Weitere Signalstoffe

Neben den zuvor beschriebenen sogenannten klassischen Phytohormonen gibt es weitere Signalstoffe, die eine hormonähnliche Wirkung besitzen oder zentrale Rollen in Signaltransduktionsprozessen erfüllen. Dazu gehören Jasmonsäure, Polyamine, Calciumionen und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). In den letzten Jahren wurden etliche weitere physiologisch hochwirksame Substanzen in Pflanzen identifiziert. Durch diese Forschungen wird deutlich, dass sich Tiere und Pflanzen in der Komplexität ihrer Signalsysteme sowie in der Art der verwendeten Signale und Vermittler sehr ähnlich sind.

1.2.8 Wirkgefüge von Phytohormonen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die einzelnen Phytohormone eher isoliert betrachtet. In der Realität sind Wachstum und Entwicklung immer von einer Kombination der verschiedenen Phytohormone bedingt. Es liegen unterschiedliche Konzentrationen an verschiedenen Orten vor und das Verhältnis wird dynamisch an die Außenfaktoren angepasst. Pflanzen weisen eine beachtliche Anpassungsfähigkeit in ihrem Wachstum auf. Grund dafür ist die Komplexität der pflanzlichen Signale und die große Flexibilität ihrer Synthese und Verteilung.

1.3 Die Korbblütengewächse (Asteraceae Bercht. & J. Presl)

Die Studentenblume (*Tagetes* sp.) gehört der Pflanzenfamilie der Korbblütengewächse (Asteraceae oder Compositae) an. Zu der Familie Asteraceae zählen 1.620 Gattungen und mehr als 23.600 Spezies. Sie ist die größte Familie der Blütenpflanzen neben den Familien der Poaceae (Süßgräser) und Orchidaceae (Orchideengewächse).

Arten der Asteraceae sind weltweit mit Ausnahme der Antarktis verbreitet. Die höchste Diversität ist in den Tropen und Subtropen zu finden. Die Mehrheit der Vertreter besitzt einen krautigen Wuchs aber auch wichtige Sträucher und einige in den Tropen beheimatete Bäume zählen zu der Asteraceae (Panero & Crozier, 2012).

Namensgebend im Deutschen für die Familie ist der Blütenstand, der als Korb oder Körbchen bezeichnet wird. Ein Korb kann einige bis mehrere hundert Einzelblüten beinhalten. Die Einzelblüten werden nach ihrer Morphologie in Zungen- und Röhrenblüten unterschieden.

1.3.1 Taxonomie der Asteraceae

Die erste Klassifikation der Familie wurde von Cassini (1819) durchgeführt, indem er die Gattungen in Stämme einteilte. Die Stämme wurden später, unterstützt durch molekularbiologische Daten, in Unterstämme unterteilt. Carlquist und Wagenitz begannen 1976, den Begriff der Unterfamilien anhand morphologischer Unterschiede zu definieren. Als Kriterien der Unterscheidung wurden Unregelmäßigkeiten der Blüte, Antheren und Styli herangezogen. Die Familie Asteraceae ist heute in zwölf Unterfamilien gegliedert. Die größten Unterfamilien sind die Cichorioideae Chev. und die Asteroideae Lindl.

Vertreter der Asteroideae besitzen sowohl Zungen- als auch Röhrenblüten in ihrem Blütenstand und beinhalten mehr als 70 % der Arten der Familie. Ihre Arten haben echte Zungenblüten und ihre Röhrenblüten weisen kurze Kronzipfel auf. Bei der Mehrzahl sind die zygomorphen Zungenblüten am Rand des Körbchens angeordnet, während die radiären Röhrenblüten mittelständig sind. Die Oberfläche an den Narbenästen ist leicht durch zwei Linien getrennt, die teilweise an den Apices zusammenlaufen. Sie zeichnen sich durch die chemische Beschaffenheit ihrer sekundären Metabolite aus.

Eine weitere Unterteilung der Asteroideae wurde nach den Ergebnissen molekularbiologischer Studien über das Chloroplastengenom vorgenommen (Kim & Jansen, 2005; Panero & Funk, 2008).

Die bekanntesten Gattungen der Asteroideae sind *Achiella* L. (Schafgarbe), *Arnica* L. (Arnika), *Artemisia* L. (Beifuß und Wermut), *Aster* L. (Aster), *Bellis* L. (Gänseblümchen), *Calendula* L. (Ringelblume), *Callistephus* Cass. (Sommeraster), *Chrysanthemum* L. (Chrysanthe), *Dahlia* Cav. (Dahlie), *Echinacea* Moench (Sonnenhut), *Helianthus* L. (Sonnenblume und Topinambur), *Inula* L. (Alant), *Leontopodium* R. Br. ex Cass. (Edelweiß), *Leucanthemum* Mill. (Margerite), *Matricaria* L. (Kamille), *Parthenium* L. (Guayule), *Petasites* Mill. (Pestwurz), *Senecio* L. (Greiskraut), *Solidago* L. (Goldrute), *Tagetes* L. (Studentenblume), *Tanacetum* L. (Pyrethrum, Insektenblume, Rainfarn, Wucherblume) und *Tussilago* L. (Huflattich). Für diese Arbeit ist die Gattung *Tagetes* von besonderem Interesse.

1.3.2 Die Gattung *Tagetes* L.

Die Gattung *Tagetes* beinhaltet 56 Spezies. Von diesen Arten sind 29 ausdauernd, die übrigen sind einjährig (Soule, 1993). Es handelt sich um beliebte Freiland- und Zierpflanzen, die auch unter dem Namen Studentenblumen bekannt sind. Weltweit erfreuen sich vier ausdauernde Arten als Zierpflanzen großer Beliebtheit: *T. erecta* L., *T. patula* L., *T. lunulata* Ort. und *T. tenuifolia* Cav.. In Deutschland werden die ausdauernden Arten einjährig kultiviert, da sie nicht frosthart sind. Mit der Kultivierung dieser Arten wurde vor über zwei Jahrtausenden in der Region des heutigen Mexikos begonnen.

Zwei weitere einjährige Arten sind im gartenbaulichen Anbau: *T. filifolia* Lag. und *T. minuta* L. (Lawrence, 1985; Soule, 1993). Drei weniger bekannte aber regional beliebte ausdauernde Arten sind *T. lucida* Cav., *T. lemmonii* A. Gray und *T. palermi* A. Gray (Soule, 1996).

Die natürliche Verbreitung der Studentenblume reicht vom Südwesten der heutigen USA bis nach Argentinien. In Süd- bis Zentral-Mexiko liegt die größte Vielfalt vor. Aufzeichnungen über die Nutzung durch eingeborene Stämme reichen bis in das Eroberungszeitalter zurück (Sahagun, 1938; Gates, 1939).

Die Ureinwohner Amerikas hielten die Studentenblume für eine lebensrettende Pflanze mit magischen Eigenschaften. Es gab verschiedenste von religiösen bis weltlichen Anwendungsgebiete. Zu dieser Zeit wurden unangenehm riechende Pflanzen mit einer giftigen Wirkung assoziiert. Pflanzen mit scharfen und würzigen Aromen wurden oft als Heilmittel eingeschätzt. Folglich wurden die Arten von *Tagetes* viel von Kräuterkennern und Medizinmännern genutzt. Beinahe jede Art von *Tagetes* wurde praktisch eingesetzt, zum Beispiel in Form von Tränken, Aufgüssen oder Absuden aus den Blütenköpfen oder Blättern (Gerarde et al., 1597; Guenther, 1952). Eingesetzt wurden diese Extrakte als Schmerzmit-

tel, Antiseptika und als verdauungsfördernde, harntreibende, austreibende und anregende Mittel. Der Befall mit Schädlingen und Parasiten wurde ebenfalls behandelt (Neher, 1986). *T. patula* und *T. erecta* werden in Lateinamerika mit Allerheiligen (1. November) und Allerseelen (2. November) assoziiert. Mit den Blüten werden Altare und Gräber geschmückt. *Tagetes* wird dort auch als Blume der Toten („*flor del muerto*“) bezeichnet. Im Hinduismus hingegen dienen die Blumen der Dekoration zum Erntefest (Harlan, 1963). Kurz nach der Einführung nach Europa, Asien und Afrika wurden Spezies von *Tagetes* in bedeutsame Kräuterbücher als Heilpflanzen aufgenommen (Fuchs, 1542). Gerarde schrieb 1597, dass *Tagetes* mit Bedacht eingesetzt werden soll aufgrund ihres starken Geruches. In den letzten vier Jahrhunderten wurden stark beißend riechende, sekundäre Inhaltsstoffe durch Züchtung in den Sorten reduziert. Gleichzeitig fand eine Selektion auf die Größe und Anzahl der Blütenstände statt (Soule, 1996). Die heutige Pharmakologie hat die Effektivität von *Tagetes* als Heilpflanze herabgesetzt. Einige biochemisch wirksame Substanzen sind in den Pflanzen in hohen Konzentrationen vorhanden und haben Auswirkungen auf die menschliche Homöostase. Die Blüten von *Tagetes* sind daher offiziell im mexikanischen Arzneibuch gelistet (Neher, 1986).

1.4 Sekundäre Metabolite

Der Begriff sekundäre Metabolite wurde erstmals 1891 durch den Pflanzenphysiologen und Nobelpreisträger Albrecht Kossel verwendet. Bis heute existiert aber weder eine einheitliche Definition von sekundären Metaboliten noch gibt es allgemeine Kriterien zur Unterscheidung primärer und sekundärer Stoffwechselprodukte (Mothes, 1960). An dieser Stelle möchte ich Heß zitieren: „Bei sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich um Substanzen mit den verschiedensten, oft zentral wichtigen Funktionen im Leben einer Pflanze, die in ihrer Biogenese vom Primärstoffwechsel, das heißt vom Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren abgeleitet werden“ (Heß, 1992).

Sekundäre Metabolite werden von Zwischenprodukten des primären Stoffwechsels abgeleitet wie zum Beispiel Shikimisäure oder aromatische Aminosäuren. Sie werden in deutlich geringeren Mengen als Produkte des primären Stoffwechsels gebildet, können aber bis zu mehreren Gewichtsprozenten bezogen auf die Trockenmasse ausmachen. Sie variieren von Familie und Spezies und sind daher ein wichtiges taxonomisches Merkmal. Bei Pflanzen tragen sie maßgeblich zu den spezifischen Gerüchen, Geschmacksstoffen und Farben bei (Bennett & Wallsgrove, 1994).

Die Bezeichnung sekundäre Metabolite ist aus heutiger Sicht unpassend gewählt und kann missverstanden werden. Es werden unter diesem Begriff einerseits sehr unterschiedliche und nicht miteinander verwandte Stoffe zusammengefasst. Andererseits implementiert das Wort sekundär eine untergeordnete Rolle dieser Stoffe (Bennett & Wallsgrave, 1994).

Es ist bekannt, dass sekundäre Metabolite eine aktive und wirksame Abwehr gegen Krankheiten und Schädlinge darstellen und als Wachstumsregulatoren agieren (Teuscher, 1990). Sie können eine Speicherfunktion besitzen, die die Pflanze vor osmotischem Stress schützen oder allelopathisch wirken (Bennett & Wallsgrave, 1994). Als Farb- und Lockstoffe sind sie von großer Bedeutung für die Vermehrung und Verbreitung von Pflanzen (Leopold & Ardrey, 1972).

Die Einteilung der sekundären Metabolite kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Anhand der chemischen Struktur lassen sich drei Hauptkategorien bilden (Nabors, 2007):

- Polyphenole,
- Alkaloide und
- Terpenoide.

Im Rahmen dieser Arbeit wird nur auf die Kategorie der Polyphenole näher eingegangen.

1.4.1 Polyphenole

Diese Gruppe beinhaltet Substanzen, die auf der Struktur des Phenols basieren, das heißt sie enthalten mindestens einen aromatischen Ring, der durch eine oder mehrere Hydroxygruppen substituiert ist. Diese können ihrerseits substituiert sein. Polyphenole sind zyklische Kohlenwasserstoffe, die keinen Stickstoff enthalten. Sie umfassen strukturell verschiedene Metabolite und sind keine einheitliche Stoffgruppe (Wong, 1973).

Zirka 40 % des Kohlenstoffs, der in der Biosphäre zirkuliert, liegt in Polyphenolen vor (Nabors, 2007). Eine Unterteilung der Polyphenole ist beispielsweise nach der Anzahl der Kohlenstoffatome (C-Atome) möglich (Harborne, 1980; siehe Tabelle 2):

Tab. 2: Einteilung der Polyphenole (Harborne, 1980).

Struktur	Stoffgruppe	Beispiel
C6	Phenole	Catechol
C6-C1	Phenolsäuren	Gallussäure
C6-C3	Hydroxycimtsäuren	Kaffeesäure, Ferulasäure
C6-C3	Cumarine	Umbelliferon
C6-C3-C6	Flavonoide, Isoflavonoide	Quercetin, Genistein
(C6-C3) ₂	Lignane	Secoisolariciresinol
(C6-C3) _n	Lignine	Lignin

Die Biosynthese von Polyphenolen erfolgt hauptsächlich über den Shikimatweg sowie über davon abgeleitete Synthesewege. Zudem sind der Acetat-Malonat- und der Terpenoid-syntheseweg von Bedeutung (Bresinsky et al., 2008).

Phenolische Verbindungen stärken die Pflanze und schützen sie vor Pilzen, Bakterien und Nematoden. Sie können als Antifeedanzien und Enzyminhibitoren wirken (Friend, 1981; Siqueira et al., 1991). Polyphenole befinden sich typischerweise in den Zellwänden und Vakuolen und sind in den Randschichten von Pflanzen konzentriert (Nabors, 2007).

Die Geschwindigkeit und Menge der *de novo* synthetisierten phenolischen Verbindungen ist bei der Pathogenabwehr bedeutsamer als die vorhandenen konstitutiven Phenole (Bennett & Wallsgrove, 1994). Ausgelöst wird die *de novo* Synthese meist durch Verletzungen, die zum Beispiel durch Fraß entstehen (Kielkiewicz & Van de Vrie, 1990; Inoe et al., 1985). Die Untergruppe der Flavonoide wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

1.4.2 Flavonoide

Die Gruppe der Flavonoide umfasst Tausende wasserlösliche Substanzen, die typisch für viele Früchte und Gemüse sind. Flavonoide bilden die größte Gruppe der Pflanzenfarbstoffe. Darüber hinaus schrecken sie Pflanzenfresser ab, schützen vor bakterieller Zersetzung und Oxidationsprozessen durch UV-Strahlung und kurzwelliges Licht (Luckner, 1990).

In der Medizin werden Flavonoide zur Kontrolle und zum Schutz vor Krebs- und Gefäßkrankungen sowie als antibakterielle, antifungale oder antivirale Wirkstoffe angewendet. Flavonoide liegen zumeist in den Epidermiszellen von Pflanzen in glykosylierter Form vor (Herrmann, 1992). Die Flavonoide werden nach der Struktur des sauerstoffhaltigen Heterozyklus eingeteilt. Die wichtigsten Verbindungsklassen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Die wichtigsten Verbindungsklassen der Flavonoide (Watzl et al., 2005).

Klasse	Beispiele	Bedeutung
Anthocyanidine	Malvidin, Cyanidin	rote, orange, blaue, violette Pigmente
Flavanole	Epicatechingallat, Epigallocatechin	adstringierende Wirkung
Flavanone	Naringin, Hesperidin	Bitterstoff
Flavone	Apigenin, Luteolin	hellgelbe Pigmente
Flavonole	Quercetin, Kaempferol	hellgelbe Pigmente
Isoflavone	Genistein, Daidzein	Phytoöstrogen

Alle Flavonoide besitzen ein Flavangrundgerüst. Die Biosynthese beginnt mit p-Cumaroyl-Coenzym A („aktivierte“ Cumarsäure), welches aus dem Shikimatweg abgeleitet ist. Neben dem Shikimatweg können aromatische Ringe in Pflanzen mithilfe des Acetat-Malonat-Weges oder der Terpenoidbiosynthese gebildet werden.

Anthocyanidine bewirken die sichtbare rote, blaue oder rosa Färbung vieler Blüten, Blätter und Früchte, die Insekten und andere Organismen zur Bestäubung und Verbreitung der Samen anlockt (Nabors, 2007). In den Blütenblättern werden die Anthocyane durch die Anwesenheit von Flavonen und/oder Flavonolen stabilisiert. In höheren Konzentrationen bewirkt die Anwesenheit von Flavonen und Flavonolen eine Verschiebung der Blütenfarbe in den blauen Bereich.

Seltener bedingen Flavonole eine gelbe Blütenfarbe. Flavonole wie Quercetagenin und Gossypetin geben *Gossypium hirsutum* L., *Primula vulgaris* Huds. und einigen Arten der Asteraceae ihre gelbe Blütenfärbung. Bei der Asteraceae liegen gelbe Flavonole oftmals gemeinsam mit Carotinoiden vor, die ebenfalls eine sichtbare gelbe Färbung hervorrufen. Eine hellgelbe bis weiße Blütenfarbe ist fast immer durch Flavone oder Flavonole bedingt (Harborne, 1988). Weitere Klassen von Flavonoiden wie Chalcone und Aurone können ebenfalls eine gelbe Blütenfarbe bedingen.

1.4.3 Weitere Pflanzenfarbstoffe

Die Pflanzenfarbstoffe Xanthophylle und Carotine gehören zu den Tetraterpenoiden. Als Pflanzenpigmente sind die Carotinoide seit vielen Jahren bekannt (Goodwin & Britton, 1988). Für die meisten gelben oder orangen Blütenfarben von vielen Zierpflanzen sind Carotinoide verantwortlich. Hier können *Tagetes*, *Narcissus* L., *Freesia* Eckl. ex Klatt, *Gerbera* L., *Rosa* L., *Lilium* L. und *Calendula* L. genannt werden. Wenn Carotinoide gemeinsam mit roten oder violetten Anthocyanen vorliegen, kann dies in einer braunen oder bronzenen Färbung resultieren (Forkmann, 1991). Gelb-orangefarbenes Gemüse enthält hauptsächlich Carotinoide, während in grünblättrigem Gemüse vor allem Xanthophylle vorhanden sind. Xanthophylle sind im Gegensatz zu Carotinoiden sauerstoffhaltig.

Es existieren zahlreiche weitere sekundäre Pflanzenstoffe, deren Beschreibung den Rahmen dieser Arbeit jedoch sprengen würde.

1.4.4 Blütenfarbstoffe von *Tagetes*

1.4.4.1 Orange und rot

Die Blütenblätter von *Tagetes* beinhalten große Mengen des Carotinoids Lutein sowie Fettsäureester von Lutein. Über 90 % der Pigmente gehören zu diesen Verbindungen (Quackenbush, 1973). Luteinpalmitat wurde als Hauptkomponente der Xanthophylle in den Blütenblättern nachgewiesen. Es ist pharmakologisch wirksam und kann in der Augenheilkunde eingesetzt werden (Gau et al., 1983).

Luteinester sind besser als synthetische Carotinoide in Gemüseölen löslich und eignen sich daher gut als Lebensmittelfarbstoffe (Philip & Berry, 1975). Getrocknete Blütenblätter und Extrakte aus den Blüten werden traditionell zum Färben von Geflügelhaut und Eiern eingesetzt. In der Europäischen Union ist Lutein als Lebensmittelfarbstoff mit dem Kürzel E 161 b zugelassen (Piccaglia et al., 1998).

Hinsichtlich ihres Carotinoidgehaltes untersuchten Piccaglia et al. (1998) sieben verschiedene Sorten und Populationen von *T. erecta* und verglichen sie mit drei Sorten von *T. patula*. Die untersuchten Pflanzen von *T. erecta* besaßen etwa die Hälfte des Carotinoidgehaltes von *T. patula*. Zudem wurden in Pflanzen mit hellen Blütenblättern (gelb oder hellgelb) geringere Konzentrationen an Carotinoiden nachgewiesen als bei Pflanzen mit dunklen Blüten (orange oder dunkelorange).

Die von Valadon und Mummery (1967) untersuchten orangefarbenen Sorten von *T. erecta* unterschieden sich von gelben Sorten durch ihren Gesamtcarotinoidgehalt um etwa das Dreifache. Diese Sorten enthielten keine Anthocyane. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die orange Blütenfärbung ausschließlich durch verschiedene Carotinoide hervorgerufen wurde. Von den elf untersuchten Spezies und Sorten der Asteraceae enthielt *T. erecta* die höchste Vielfalt an Carotinoiden.

Aus roten Blütenblättern von *T. patula* konnte ein Glycosid extrahiert werden, welches Patuletin genannt wurde (Rao & Seshadri, 1941). Dieses Glycosid ist ein Isomer zu Quercetin und Herbacetin. In der nahe verwandten Art *T. erecta* wurde Quercetagetin nachgewiesen, welches Hydroxygruppen an den Positionen 5 und 6 besitzt und Patuletin daher im Reaktionsverhalten sehr ähnlich ist. Patuletin ist wie Quercetagetin ein Flavonol und ruft bei der Reaktion mit Laugen eine Gelbfärbung hervor. In Position 6 ist Patuletin methyliert.

1.4.4.2 Gelb und helle Farbtöne

Eine gelbe Blütenfärbung wird bei der Asteraceae durch Carotinoide, einige Flavonoide (gelbe Flavonole), Chalcone und Aurone bewirkt (Halbwirth et al., 2000). Die vorherrschende Meinung ist, dass gelbe Blüten mehr Xanthophyll enthalten, während in orangen überwiegend Carotine vorliegen.

Über Flavonoide, die zu einer gelben Blütenfärbung höherer Pflanzen beitragen, ist wenig bekannt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Mehrheit gelbblütiger Pflanzen Flavonoide neben Carotinoiden enthält (Harborne, 1965). Die 3- und 7-Glucoside von dem Flavonol Myricetin wurden in vier Spezies von *Tagetes* nachgewiesen (Vasudevan et al., 1997).

Flavonole können die alleinige Ursache gelber Blütenfarbe sein. Dies wurde bei *Rhododendron* L. nachgewiesen, bei dem sechs von neun gelbblütigen Arten Quercetagetin-Galaktosid beinhalten, das bei den sieben untersuchten weißblütigen Sorten fehlte (Harborne, 1965). Daraus wurde geschlossen, dass ein Quercetagetinvorkommen mit einer gelben Blütenfarbe korreliert. Aber es besteht kein Zusammenhang zu der Carotinoidbiosynthese, das heißt von dem Vorhandensein von Quercetagetin kann nicht auf das Vorkommen von Carotinoiden in einer Gattung geschlossen werden.

Die hauptsächlich vorkommenden Flavonole (z.B. Kaempferol, Quercetin oder Myricetin) tragen nicht zu einer Gelbfärbung bei. Bei dem in Pflanzenzellen vorliegenden pH-Wert besitzen sie einen weißen, elfenbein- oder cremefarbenen Farbton. Die deutlich gelb gefärbten Chalone und Aurone kommen vergleichsweise selten vor.

Damit ein Flavonol gelb erscheint, muss es strukturell verschieden von dem Grundgerüst von z.B. Kaempferol oder Quercetin sein. Nach Hydroxylierung von Quercetin an Position 6 entsteht Quercetagetin, welches sichtbares Licht absorbiert (Harborne, 1965). Derivate von Quercetagetin wurden als Hauptkomponenten der gelben Blütenfarbe in *Rhododendron campylocarpum* Hook. F., *Primula vulgaris* und verwandten Arten sowie in einigen Leguminosen und *Tagetes* identifiziert. Bei *T. erecta* wurden die Quercetagetinderivate auch in geringen Mengen in den Blättern nachgewiesen. Dabei handelte es sich um das 3-Glucosid (Tagetiin) und das 7-Glucosid (Quercetagitrin) (Rao & Seshadri, 1941).

Üblich ist eine Hydroxylierung von Flavonolen am B-Ring des aromatischen Grundgerüsts (Anzellotti & Ibrahim, 2000; Latunde-Dada et al., 2001). Die Flavonol-6-hydroxylase (F6H) katalysiert die Hydroxylierung von Quercetin an Position 6 (Halbwirth et al., 2004). Das Produkt dieser Reaktion ist 6-Hydroxyquercetin oder Quercetagetin. Quercetagetin wurde in den Blütenblättern verschiedener Sorten von *T. patula* und *T. erecta* sowie in zehn weiteren Pflanzenfamilien nachgewiesen. Meist lag es in methylierter Form vor (Harborne, 1976).

Von Halbwirth et al. (2004) wurden drei Sorten von *T. patula* („Yellow Boy“, „Orange Boy“ und „Bonanza Bee“) und vier Sorten von *T. erecta* („Inca Gelb“, „Inca Orange“, „Bianca“ und „Vanilla“) untersucht. Diese Sorten besitzen verschiedene Blütenfarben und die F6H konnte bei allen Sorten nachgewiesen werden. Folgender Hauptsyntheseweg wird anhand der beobachteten Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten für das Quercetagetin-7-O-glucosid angenommen (siehe Abbildung 1).

Von der Blütenfarbe kann bedingt auf eine F6H-Aktivität geschlossen werden. Moehs et al. (2001) untersuchten die hellblütige Sorte „French Vanilla“ (*T. erecta*). Sie stellten fest, dass „French Vanilla“ eine verminderte Expression aller Gene für die Carotinoidbiosynthese aufweist und es sich daher eher um eine regulatorische Mutation als um den Ausfall eines einzelnen Enzyms handelte.

1.5 Zielstellung

Diese Arbeit soll im Rahmen eines Kooperationsforschungsvorhabens des Julius Kühn-Institutes in Quedlinburg und der Technischen Universität Wien einen Beitrag zur Aufklärung des Syntheseweges von gelben Flavonolen in der Pflanzengattung *Tagetes* leisten. Angesiedelt ist dieses Forschungsvorhaben im Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen (JKI) und im Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften (TU Wien).

Im Mittelpunkt steht dabei die Aufklärung des Syntheseweges von gelben Flavonolen (Halbwirth et al., 2004). Innerhalb dieses Synthesewegs ist die Hydroxylierung von Quercetin zu Quercetagetin durch das Enzym Flavonol-6-hydroxylase (F6H) von besonderem Interesse. Die für die F6H kodierenden Gene könnten zum Beispiel anhand einer Pflanze lokalisiert werden, die aufgrund einer Mutation keine F6H-Aktivität aufweist. Bisher wurden keine derartigen Mutanten bei *Tagetes* gefunden.

Für Mutationsversuche zur Klärung von Fragen der Biosynthese oder des Abbaus von sekundären Pflanzenstoffen sind Gewebekulturen besonders geeignet (Heß, 1992). Für die weitere Forschung sollen im Rahmen dieser Arbeit Kalluskulturen von den *Tagetes erecta*-Sorten „Antigua“ und „Bianca“ etabliert werden. Sieben Kulturmedien und vier Explantattypen wurden von der Autorin ausgewählt und sollen hinsichtlich der Kallusinduktion getestet werden. Der Einfluss von drei Belichtungsvarianten auf die Kallusinduktion wird untersucht.

Der etablierte Kallus soll in Suspension überführt werden. Die Suspensionskulturen können für molekularbiologische Arbeiten, Mutationsversuche sowie Versuche zur Flavonolsynthese verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für die Versuche wurden die Sorten „Antigua Gelb“ und „Bianca“ (Austro Saat, Wien) von *Tagetes erecta* verwendet. Das Präzisionssaatgut wurde von der Technischen Universität Wien bereit gestellt.

Bei dem Pflanzenmaterial handelt es sich um F1-Sorten mit kräftigem, aufrechtem Wuchs und breiter Verzweigung. Die Blätter sind einfach gefiedert und gegenständig. Die Blütenkörbchen sind kugelförmig, endständig und groß. „Antigua Gelb“ ist eine Zwergsorte mit kompaktem Wuchs und besitzt eine zitronengelbe Blütenfarbe (siehe Abbildung 2). Die Blütenfarbe von „Bianca“ ist cremeweiß (siehe Abbildung 3). Das Saatgut wurde dunkel bei 4 °C gelagert und die Keimschutzpackung erst unmittelbar vor Verwendung geöffnet.

2.2 Verwendete Nährmedien

2.2.1 Basalmedium

Als Basalmedium wurde ein MS-Medium als Fertigmischung mit enthaltenen Vitaminen (Duchefa Biochemie) verwendet. Es wurde mit 30 g/L Saccharose (Serva) ergänzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit Natronlauge auf 5,8 eingestellt. Für die Kalluskultur wurden 8 g/L Agar-Agar (Carl Roth) hinzugegeben. Dieses Medium wird im Folgenden als MSO-Medium bezeichnet. Das Medium wurde für 15 min bei 121 °C und 2 bar im Autoklav (Varioklav, HP Medizintechnik) sterilisiert.

Anfänglich wurden die Kallusinduktionsmedien mit 5 g/L Polyvinylpyrrolidon 10 (PVP 10, Duchefa Biochemie) zur Absorption phenolischer Verbindungen hergestellt. Da keine positive Auswirkung auf das Kalluswachstum festgestellt wurde, wurden die Medien später ohne PVP 10 hergestellt. Es wurden keine Unterschiede bezüglich Kallusinduktion und -wachstum beobachtet.

2.2.2 Nährmedien für die Kallus- und Suspensionskultur

Steril filtrierte Phytohormonlösungen wurden dem Basalmedium nach dem Autoklavieren für die Kallus- und Suspensionskultur beigefügt. Die Medien für die Kallusinduktion wurden mit TK und für die Suspensionskultur mit TS bezeichnet (siehe Tabelle 4). Am Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen (JKI) waren bereits Vorversuche mit den Medien TK 1 bis 5 sowie TK 8 durchgeführt worden, die sich für die Kalluskultur von *Tagetes erecta* nicht eigneten (nicht Bestandteil dieser Arbeit).

Tab. 4: Phytohormonkonzentrationen und -kombinationen in den verwendeten Medien. 1-Naphthylethylsäure (NAA), Indol-3-essigsäure (IAA), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 6-Benzylaminopurin (BAP), N6-Furfuryladenin (Kinetin), Thidiazuron (TDZ), Gibberellinsäure (GA₃).

Medium	Auxin	mg/L	Cytokinin	mg/L	weitere	mg/L	Literatur
1	IAA	1,0	BAP	1,0	-	-	Mohamed et al., 1999
2	NAA	1,0	BAP	1,0	-	-	Mohamed et al., 1999
3	NAA	1,0	TDZ	0,009	-	-	Klocke et al., unveröffentlicht
4	-	-	BAP	2,0	-	-	Shukla et al., 2000
5	-	-	BAP	0,226	GA ₃	3,46	Misra & Datta, 2001, modif.
630	NAA	0,5	BAP	5,0	-	-	Poli et al., 1992, modif.
7	IAA	3,0	BAP	10,0	-	-	Mohamed et al., 2000
8	2,4-D	1,0	-	-	-	-	Sarin, 2004
9	2,4-D	7,0	Kinetin	10,0	-	-	Osman et al., 2008
11	NAA	0,5	-	-	-	-	Hussain & Latif, 2012
12	-	-	BAP	1,0	-	-	Hussain & Latif, 2012
13	NAA	0,2	BAP	2,0	-	-	Zheng et al., 2012
14	2,4-D	2,0	BAP	2,0	-	-	Vanegas-Espinoza et al., 2012

2.3 Sterilaussaat

Eine Oberflächensterilisation des Saatgutes wurde mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (4 % aktives Chlor) für 20 min unter ständiger Bewegung durchgeführt. Als Detergenz wurde Tween 20 verwendet. Die Samen wurden anschließend an der Sterilwerkbank drei Mal mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und auf MSO-Medium gesetzt. Da *Tages* Dunkelkeimer sind, wurden die Aussaaten für zwei bis drei Tage verdunkelt. Anschließend wurden sie in der Klimakammer bei 25 °C und mit dem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei 3.000 lux kultiviert.

2.4 Explantate

Das für die Explantatentnahme verwendete Pflanzenmaterial wurde in werkssterilen Kunststoffboxen auf MSO-Medium herangezogen. Die Pflanzen wurden, sofern keine Explantatentnahme stattfand, alle vier bis sechs Wochen auf neues Medium gesetzt. Die folgenden vier Explantattypen wurden für die Kallusinduktion ausgewählt.

2.4.1 Kotyledonen und Hypokotyl

Die Explantate wurden zwei Wochen nach Aussaat von den Keimlingen genommen. Die Kotyledonen wurden in rechteckige Stücke geschnitten und wurden mit der abaxialen Seite auf dem jeweiligen Kallusinduktionsmedium platziert. Aus dem Hypokotyl wurden Sektoren von 5 mm Länge aufgesetzt. Das Epikotyl wurde auf MSO-Medium aufgesetzt, sodass die Pflanzen weiter wuchsen und sich Folgeblätter für weitere Explantate bildeten.

2.4.2 Laubblatt und Petiole

Abhängig von der Geschwindigkeit des Pflanzenwachstums wurden weitere Explantate etwa vier Wochen nach der Aussaat genommen. Zu späteren Zeitpunkten wurden weitere Explantate von den Folgeblättern genommen. Die Fiederblätter sollten eine Mindestlänge von 4 mm für die Explantatentnahme erreicht haben. Die Blättchen wurden abgetrennt und wie die Kotyledonen rechteckig zugeschnitten. Von der Petiole wurden Segmente mit einer Länge von etwa 5 mm geschnitten. Beide Explantattypen wurden mit der abaxialen Seite auf dem Medium platziert.

Es wurden stets zehn Explantate in eine werkssterile Kunststoffpetrischale mit Belüftungsnocken (ø 55 mm, Carl Roth) gesetzt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und in die Klimakammer gestellt.

2.5 Kalluskultur

2.5.1 Kulturbedingungen

Für die Kallusinduktion wurden die Nährmedien TK 630, 7, 9, 11, 12, 13 und 14 (siehe Tabelle 4) getestet. Für den Kontrollversuch wurde MSO-Medium verwendet. Jeder Versuchsansatz wurde mit einer Mindestanzahl von 20 Explantaten mit drei Wiederholungen angesetzt. Die Explantate für die Kallusinduktion wurden bei 25 °C kultiviert. Der Einfluss der Belichtung auf die Kallusinduktion wurde anhand von drei Varianten untersucht.

Variante I: Verdunkelung (Dunkelheit 24 h) für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h (Plaschil et al., unveröffentlicht).

Variante II: Verdunkelung (Dunkelheit 24 h) über den gesamten Kulturzeitraum (nach Osman et al., 2008).

Variante III: Belichtung mit 3.000 lux bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h über den gesamten Kulturzeitraum (nach Mohamed et al., 2000; Poli et al., 1992).

2.5.2 Subkultivierung

Der Kallus wurde von den Explantaten mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und auf frisches Medium in oben genannten Petrischalen umgesetzt. Adventivbildungen wurden abgetrennt und verworfen und große Kallusstücke wurden geteilt. Verbräunter Kallus wurde abgetrennt und nicht umgesetzt. Für die Subkultivierung wurde jeweils dasselbe Medium wie für die Kallusinduktion verwendet. Anfangs wurde der Kallus in einem Intervall von vier Wochen subkultiviert (Mohamed et al., 2000; Osman et al., 2008). Das Intervall wurde auf zwei bis drei Wochen abhängig von dem Wachstum und dem Zustand des Kallus verkürzt (Poli et al., 1992).

2.5.3 Beobachtungsparameter

Beim Subkultivieren wurden folgende Parameter zur Bewertung des Kalluswachstums aufgenommen: Volumenzunahme, Färbung (dunkelgrün, hellgrün, grün-gelb, gelb, braun und weiß), Konsistenz (kompakt oder locker) sowie Adventivbildungen (Wurzeln und Sprosse). Die Volumenzunahme wurde visuell im Vergleich zu dem voran gegangenen Volumen bewertet. Bei Adventivbildungen wurden die Anzahl der betroffenen Explantate sowie das Ausmaß anhand der Wurzel- bzw. Sprosslänge dokumentiert.

2.6 Suspensionskultur

Ausgehend von dem Kallus wurden Suspensionen angelegt. Der Kallus wurde mit einem Skalpell zerkleinert und in Erlenmeyerkolben (300, 250 oder 200 mL) aus Glas eingewogen. Durchschnittlich wurden 2,09 g Kallus eingewogen. Es wurde das jeweilige Kallusinduktionsmedium ohne Zusatz von Agar verwendet. Die Füllmenge mit Medium betrug ein Viertel bis ein Sechstel des Kolbenvolumens. Das zugegebene Volumen richtete sich nach der Masse an eingewogenem Kallus. Die Kolben wurden auf einem Orbitalschüttler (HS 501 D, IKA Labortechnik) bei 95 rpm, 25 °C und 3.000 lux (16/8 h Tag/Nacht) platziert. Das Medium der Kulturen wurde in einem Rhythmus von sieben Tagen gewechselt. Dazu wurde das alte Medium mit den Zellaggregaten in eine sterile Glaspetrischale überführt. Die Aggregate wurden zerkleinert und in einen neuen Kolben gegeben. Wurzeln oder verbräunte Teile wurden abgetrennt und verworfen. Dann wurde frisches Medium hinzugegeben. Bei dem Wechsel des Mediums wurden dieselben Parameter wie bei der Subkultivierung des Kallus bonitiert (siehe 2.5.3).

3. Ergebnisse

3.1 Kalluskultur

3.1.1 Kontrollversuch ohne Phytohormone

Aufgrund der hohen Tendenz der Explantate zur Adventivwurzelbildung in den Vorversuchen wurde ein Kontrollversuch angesetzt. Es wurden je Sorte und Explantattyp 20 Explantate auf MSO-Medium gesetzt. Dazu wurden die Explantattypen Kotyledone, Laubblatt und Petiole von Pflanzenmaterial aus je zwei verschiedenen Aussaaten verwendet. Nach 14 Tagen erfolgte die Auswertung bezüglich der Wurzelbildung.

Ohne Phytohormonzusätze bildeten sich an allen Explantattypen Adventivwurzeln. An jedem Explantat wurden in der Regel mehrere Wurzeln angelegt. In diesem Versuchsansatz wiesen Petiolenexplantate von „Antigua“ (siehe Abbildung 4) und Laubblattexplantate von „Bianca“ die meisten Adventivwurzeln auf (100 % bzw. 75 %, siehe Tabelle 5). Ohne Hormonzusätze fand keine Kallusinduktion statt.

Tab. 5: Kontrollversuch zur Kallus- und Adventivwurzelinduktion ohne Phytohormone. n = Anzahl der Explantate.

Sorte und Explantattyp	Explantate mit Kallus (%)	Explantate mit Adventivwurzeln (%)	n
„Antigua“ Kotyledone ¹	0	20	20
„Antigua“ Laubblatt ²	0	60	20
„Antigua“ Petiole ¹	0	100	20
„Bianca“ Hypokotyl ¹	0	15	20
„Bianca“ Laubblatt ²	0	75	20
„Bianca“ Petiole ¹	0	45	20

¹ Belichtungsvariante II (permanente Verdunkelung), ² Belichtungsvariante III (3.000 lux, 16/8 h Tag/Nachtrhythmus)

3.1.2 Medium TK 630

3.1.2.1 Belichtungsvariante I

Kotyledone. Die Explantate wölbten sich an den Rändern und innerhalb von 14 Tagen nach dem Aufsetzen auf das Medium war eine Kallusbildung an der Unterseite der Explantate zu beobachten. Der Kallus war weiß und kompakt. An den meisten Explantaten wurde/n eine bis mehrere Adventivwurzeln gebildet (siehe Abbildung 5). Die Kotyledonenexplantate bildeten die meisten Adventivwurzeln im Vergleich zu den anderen Explantattypen (88,3 % bei „Antigua“ bzw. 42,2 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 6). An den Explantaten von „Bianca“ war eine Anthocyanbildung sichtbar.

Nach etwa 14 Tagen wiesen die Explantate Nekrosen an der Unterseite auf. Das Kallusgewebe begann abzusterben und es wurden phenolische Verbindungen in das Medium abgegeben. Das verbräunte Gewebe wurde abgetrennt und der Kallus subkultiviert. An den Schnittstellen war vereinzelt eine Neubildung von hellem Kallus zu beobachten. Nach der Vereinzelung begann der helle Kallus zu verbräunen. An braunem Gewebe konnte ein Wachstum von neuem weißlichem oder hellgrünem Gewebe beobachtet werden. Dieses Gewebe zeigte nach der zweiten Subkultivierung erneut Absterbeerscheinungen. An dem Kallus wurden häufig Adventivwurzeln und vereinzelt Adventivsprosse gebildet.

Von „Antigua“ konnte über drei und fünf Monate vitaler Kallus kultiviert werden. Dieser Kallus war kompakt und hellgrün und wies Differenzierungen in Form von kurzen Adventivwurzeln und -sprossen auf (siehe Abbildung 6). Es konnte zudem lockerer, hellgrüner Kallus von „Antigua“ mit Ansätzen von Adventivsprossen etabliert werden (siehe Abbildung 7).

Hypokotyl. Die Explantate bildeten während der ersten 14 Tage weißlichen, kompakten Kallus an der gesamten Oberfläche und teilweise an den Schnittflächen. Bei etwa dem gleichen prozentualen Anteil an Explantaten beider Sorten wurden Adventivwurzeln gebildet (14,9 % bei „Antigua“ und 15,2 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 6). Aber es lagen deutlich weniger Wurzeln als bei den Kotyledonenexplantaten vor. Bei „Bianca“ war eine leichte Anthocyanbildung zu beobachten.

Nach etwa 14 Tagen war eine leichte Verbräunung der Explantate an der Unterseite vorhanden. Bei der Subkultivierung wurden die braunen Zellen abgetrennt und neuer, heller Kallus wuchs an den Schnittstellen. Ein drei- bis vierwöchiger Subkultivierungsrhythmus der Hypokotylexplantate führte zum Absterben des Kallus und zur Abgabe phenolischer Verbindungen in das Medium.

Etwa sieben Tage nach der Subkultivierung wies der Kallus nekrotische Veränderungen auf. An dem braunen Gewebe wuchs neuer Kallus, welcher unter Lichteinfluss über mehrere Wochen Chlorophyll bildete. Es wurde ein hellgrüner, kompakt gefügter Kallus erhalten. Dieser bildete nach jeder Subkultivierung kurze Adventivwurzeln. Der Kallus von „Bianca“ starb nach vier bis sechs Wochen ab. Von „Antigua“ konnte Hypokotylkallus über mehr als fünf Monate subkultiviert werden (siehe Abbildung 8).

Laubblatt. Die Explantate wölbten sich auf und es kam vereinzelt zur Aufhellung des Blattes. Eine Kallusbildung erfolgte an der Unterseite oder an den Schnittflächen, die Kontakt zu dem Medium hatten. Der Kallus war weißlich, wenn er an den Schnittträndern gebildet wurde und teilweise hell- oder dunkelgrün, wenn er an der abaxialen Seite gebildet wurde. Es handelte sich um kompaktes Kallusgewebe. Eine Kallusinduktion erfolgte bei 73,3 % („Antigua“) bzw. 88,3 % („Bianca“) der Explantate (siehe Tabelle 6). Bei den Explantaten von „Bianca“ wurden zudem vereinzelt Anthocyane gebildet (siehe Abbildung 9). Eine starke Adventivwurzelbildung war bei beiden Sorten zu beobachten. Die Explantate von „Antigua“ wiesen eine stärkere Wurzelbildung als von „Bianca“ auf.

Nach etwa 14 Tagen wurden dieselben Absterbeerscheinungen wie bei den übrigen Explantattypen beobachtet. An verbräuntem Kallusgewebe wuchs neuer, grüner Kallus. Vereinzelt wuchsen Adventivsprosse. Der neu gebildete Kallus verbräunte nach Abtrennung und Subkultivierung. Es wurden nach der Subkultivierung weitere Adventivwurzeln gebildet.

Der Kallus war bei beiden Sorten überwiegend kompakt und kugelförmig. Bei „Bianca“ trat in einer von drei Wiederholungen ein Explantat mit lockerem Kallus auf. Über mehr als fünf Monate konnte kompakter Laubblattkallus von „Antigua“ kultiviert werden (siehe Abbildung 10). Es wurde weniger Kallus als von den Kotyledonen- und Hypokotylexplantaten etabliert.

Petiole. An den Petiolenstücken wurde weißlicher, lockerer Kallus an der Explantatunterseite innerhalb von 14 Tagen nach Explantatentnahme gebildet. Vereinzelt wurden Adventivwurzeln angelegt (15,0 % bei „Antigua“ bzw. 3,3 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 6). Das Kallusgewebe verbräunte an der Unterseite bereits geringfügig vor Beginn der Belichtungsperiode. Die Nekrosen nahmen nach Beginn der Belichtung zu.

Tab. 6: Kallusinduktionsmedium TK 630 mit Belichtungsvariante I (Verdunkelung für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung	Wurzelbildung	n	Kallusbildung	Wurzelbildung	n
	(%)	(%)		(%)	(%)	
Kotyledone	83,1	88,3	77	87,8	42,2	90
Hypokotyl	77,0	14,9	87	85,7	15,2	112
Laubblatt	73,3	48,3	60	88,3	26,7	60
Petiole	65,0	15,0	20	50,0	3,3	60

3.1.2.2 Belichtungsvariante II

Alle vier Explantattypen verhielten sich in den ersten 14 Tagen wie unter 3.1.2.1 beschrieben. Es wurden Kallus sowie Adventivwurzeln und -sprosse gebildet. Es waren nach 14 Tagen bereits leichte nekrotische Veränderungen an dem Kallusgewebe zu erkennen.

Nach einem Monat wiesen die Explantate sowie der bereits subkultivierte Kallus Absterbererscheinungen auf. Die Nekrosen waren stärker als bei Belichtungsvariante I ausgeprägt. Die Adventivsprosse waren etioliert und wiesen ein deutliches Wachstum auf (siehe Abbildung 11). An dem subkultivierten Kallus wurden weitere Adventivwurzeln gebildet.

3.1.2.3 Belichtungsvariante III

Kotyledone. Die Explantate beider Sorten waren dunkelgrün und zeigten Anthocyanbildung an der Explantatoberseite. An der Unterseite wurde grüner, kompakter Kallus gebildet (72,0 % der Explantate bei „Antigua“ bzw. 80,0 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 7). Im Vergleich zu den Belichtungsvarianten I und II waren an der Unterseite des Kallus kaum Verbräunungen vorhanden. An den Explantaten beider Sorten lagen Adventivorgane (Wurzeln und wenige Sprosse) vor.

Hypokotyl. Die Explantate beider Sorten waren weißlich oder hellgrün und wiesen Adventivwurzeln auf (siehe Abbildung 12). Die Wurzelbildung an den Explantaten von „Antigua“ war stärker als die von „Bianca“, obgleich weniger Explantate betroffen waren (46,9 % bzw. 55,0 %, siehe Tabelle 7). Die Explantate von „Bianca“ wiesen darüber hinaus vereinzelt Anthocyane auf. Locker gefügter, weißlicher oder hellgrüner Kallus war an der gesamten Explantatoberfläche und an den Schnittflächen vorhanden (78,1 % bei „Antigua“ und 90,0 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 7). Nach 14 Tagen war eine leichte Verbräunung der Kallusunterseiten sichtbar.

Während der Subkultivierung konnte von „Antigua“ feiner, hellgrüner, organogener Kallus etabliert werden. Bei beiden Sorten traten erneute Nekrosen an dem Kallus nach der Subkultivierung auf.

Laubblatt. Die Explantate beider Sorten waren dunkelgrün und aufgewölbt. An Explantaten von „Antigua“ wuchsen viele Adventivwurzeln (66,7 % der Explantate, siehe Tabelle 7). Die Explantate von „Bianca“ bildeten Anthocyane. An den Schnittkanten entwickelte sich weißlicher, kompakter Kallus mit leichten Verbräunungen an der Unterseite.

Von „Bianca“ konnte Kallus über einen Zeitraum von mehr als sechs Wochen subkultiviert werden (Subkultivierung alle zwei bis drei Wochen).

Petiole. Die Explantate beider Sorten waren dunkel- oder hellgrün mit einer deutlichen Kallusbildung (92,8 % bei „Antigua“ bzw. 78,8 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 7). Der Kallus war locker gefügt, hellgrün bis weiß und wurde an der Unterseite gebildet. Es lagen viele Adventivwurzeln vor (siehe Abbildung 13). Bei „Antigua“ wurden mehr Wurzeln als bei „Bianca“ gebildet. Bei „Antigua“ traten darüber hinaus Adventivsprosse auf. Dieser Kallus ließ sich sehr gut von den Explantaten lösen und subkultivieren.

Tab. 7: Kallusinduktionsmedium TK 630, Belichtungsvariante III (3.000 lux mit Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte zwei Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n
Kotyledone	72,0	76,0	50	80,0	37,0	40
Hypokotyl	78,1	46,9	96	90,0	55,0	60
Laubblatt	70,0	66,7	60	92,5	12,5	40
Petiole	92,8	57,8	180	78,8	33,1	160

3.1.3 Medium TK 7

3.1.3.1 Belichtungsvariante I

Kotyledone. Die Explantate wölbten sich auf und wiesen leichte Chlorosen auf. An der abaxialen Seite der Blattsegmente wurde innerhalb von 14 Tagen weißlicher, kompakter Kallus gebildet. Der Kallus von „Bianca“ bildete geringe Mengen an Anthocyanen. Der Kallus wies nach etwa zwei Wochen starke Verbräunungen an der Unterseite auf (siehe Abbildung 14). Bei beiden Sorten wurden Adventivwurzeln gebildet. Die Neigung zur Adventivwurzelnbildung war bei „Antigua“ deutlich höher als bei „Bianca“ (86,9 % bzw. 5,5 %, siehe Tabelle 8).

Nach der Subkultivierung wurden erneut Adventivwurzeln gebildet. Der weiße, kompakte Kallus starb ab. Vereinzelt wurde an verbräuntem Kallusgewebe erneut heller Kallus gebildet. Die Ansätze konnten drei Monaten in Kultur gehalten werden.

Hypokotyl. An den Explantaten wurde Kallus an der gesamten Oberfläche und an den Schnittstellen gebildet (80,8 % bei „Antigua“ bzw. 92,0 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 8). Der Kallus war kompakt und weißlich oder hellgrün. Er besaß mitunter eine leichte Rosafärbung. An der Unterseite des Kallus waren nach zwei Wochen deutliche Nekrosen sichtbar. Vereinzelt wurden Adventivwurzeln gebildet (24,2 % bei „Antigua“ bzw. 13,0 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 8).

Nach der Subkultivierung wurden neue Adventivwurzeln gebildet und der Kallus verbräunte stark. An dem dunklen Gewebe wuchs mitunter neuer kugelig und heller Kallus. Von „Antigua“ konnte Hypokotylkallus über sechs Monate kultiviert werden unter Verkürzung der Subkultivierungszeit auf zwei bis drei Wochen (siehe Abbildung 15).

Laubblatt. Die Explantate wölbten sich und an über der Hälfte der Explantate (65,0 %, siehe Tabelle 8) wuchs weißlicher kompakter Kallus. Der Kallus wies an der Kontaktfläche zum Medium eine leichte Braunfärbung auf. Es wurden Adventivwurzeln gebildet (17,5 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 8).

Bei der Subkultivierung verbräunte das Gewebe schnell und neuer Kallus wuchs an dem nekrotisierten Gewebe. Es wurden neue Adventivwurzeln gebildet. Die Kulturen von „Bianca“ waren bis zu acht Wochen vital.

Petiole. An den Unterseiten nahezu aller Petiolensegmente (94,3 %, siehe Tabelle 8) wuchs heller kompakter Kallus. Dieser wies nach 14 Tagen deutliche Verbräunungen an der Unterseite auf (siehe Abbildung 16). Sehr wenige Explantate (4,3 %, siehe Tabelle 8) bildeten Adventivwurzeln. Nach der Subkultivierung starben die Zellen innerhalb kurzer Zeit ab. Auf dem toten Zellmaterial wurde hellgrüner Kallus gebildet, welcher nicht erfolgreich weiter kultiviert werden konnte.

Tab. 8: Kallusinduktionsmedium TK 7 mit Belichtungsvariante I (Verdunkelung für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n
Kotyledone	86,9	46,7	122	71,8	5,5	110
Hypokotyl	80,8	24,2	120	92,0	13,0	100
Laubblatt	-	-	-	65,0	17,5	80
Petiole	-	-	-	94,3	4,3	70

3.1.3.2 Belichtungsvariante II

Während der ersten 14 Tage nach Explantatentnahme wurde an allen Explantattypen Kallus gebildet. Es waren keine Abweichungen zu den unter 3.1.3.1 aufgeführten Beobachtungen festzustellen. An einigen Explantaten bildeten sich Adventivwurzeln. Der helle Kallus wies bereits zu der ersten Auswertung nach 14 Tagen leichte Verbräunungen an der Unterseite auf.

Nach der Subkultivierung traten weitere Nekrosen und Adventivwurzelbildungen auf. An dem abgestorbenen Gewebe der Hypokotyl- und Laubblattexplantate wurde wenig heller Kallus gebildet, der bis zu zwei Monaten kultiviert werden konnte und dann abstarb.

3.1.3.3 Belichtungsvariante III

Kotyledone. Die Explantate waren dunkelgrün und wiesen Anthocyane auf. An der Unterseite von 57,5 % der Explantate war grüner oder weißlicher, kompakter Kallus (siehe Tabelle 9). Der Kallus wies Nekrosen an der Kontaktfläche zum Medium auf. Es wurde wenig Kallus gebildet. An dem Kallus waren wenige Adventivwurzeln vorhanden. Nach der Subkultivierung wurden viele Adventivwurzeln an dem Kallus gebildet und das Gewebe starb nach etwa einem Monat.

Hypokotyl. Die Explantate waren grün, an einem Ende keulenförmig verdickt und wiesen Anthocyane auf. An der Unterseite von 32,5 % der Explantate war wenig weißer Kallus vorhanden (siehe Tabelle 9). Bei dem Vergleichsansatz (Belichtungsvariante I) waren die Explantate ebenfalls einseitig verdickt ohne sichtbare Kallusbildung. An den Hypokotylexplantaten lagen die meisten Adventivwurzeln im Vergleich mit den anderen Explantattypen vor (35,0 %, siehe Tabelle 9).

Laubblatt. Die Explantate waren dunkelgrün und aufgewölbt. Einige Explantate zeigten eine Anthocyanbildung. An den kurzen Schnittkanten bildete sich bei 30,0 % der Explantate in geringer Menge kompakter, weißlicher Kallus. Der Kallus wies Verbräunungen an der Unterseite auf und starb bereits vor der Subkultivierung ab.

Petiole. Die Petiolensegmente waren hellgrün, mit Anthocyanen an der Oberseite. An der Unterseite lag heller, locker gefügter Kallus vor. An der Kontaktfläche zum Kulturmedium wies der Kallus Verbräunungen auf (siehe Abbildung 17).

Tab. 9: Kallusinduktionsmedium TK 7, Belichtungsvariante III (3.000 lux im Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte zwei Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung	Wurzelbildung	n	Kallusbildung	Wurzelbildung	n
	(%)	(%)		(%)	(%)	
Kotyledone	-	-	-	57,5	7,5	40
Hypokotyl	-	-	-	32,5	35,0	40
Laubblatt	-	-	-	30,0	12,5	40
Petiole	-	-	-	25,0	0,0	80

3.1.4 Medium TK 9

3.1.4.1 Belichtungsvariante I

Kotyledone. Die Explantate wiesen eine Oberflächenvergrößerung und Wölbung nach zwei Wochen auf (siehe Abbildung 18). An den Schnittkanten war keine Kallusinduktion erkennbar (siehe Tabelle 10). Die Farbe der Blattsegmente veränderte sich von der zweiten zur vierten Woche von grün zu hellgrün, gelb und hellbraun. Die Explantate waren weich. Im Gegensatz zu TK 630 und TK 7 traten an den Explantaten keine Nekrosen und Adventivwurzeln auf.

Alle Explantate wurden in der Mitte geteilt und subkultiviert. Nach zirka sechs Wochen bildeten sich dunkelbraune, kugelförmige Auswüchse an den Explantatoberflächen (siehe Abbildung 19). Diese ließen sich nicht isoliert kultivieren. Am Explantat wiesen sie ebenfalls kein Wachstum auf, sodass die Ansätze verworfen wurden. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Sorten festgestellt.

Hypokotyl. Die Hypokotylsegmente reagierten mit einer Farbveränderung von hellgrün zu hellbraun. An der Oberfläche der Explantate wurde eine dünne Schicht aus hellen Zellen beobachtet. Die Explantate waren weich und es wurde kein Kalluswachstum beobachtet (siehe Tabelle 10). Nekrosen oder Adventivbildungen wurden nicht festgestellt.

An den Hypokotylsegmenten bildeten sich wie bei den Kotyledonen nach etwa sechs Wochen dunkelbraune, kallöse Strukturen. In einer von drei Wiederholungen wurden an Explantaten von „Antigua“ hellbraune Kugeln gebildet. Diese konnten nicht isoliert vermehrt werden und wiesen auch am Explantat kein Wachstum auf.

Laubblatt. Die Fiederblätter zeigten eine sehr ähnliche Reaktion wie die Kotyledonen. Die Explantate wiesen eine Oberflächenvergrößerung und Aufhellung auf. Es traten keine Nekrosen und Adventivbildungen auf (siehe Tabelle 10). Nach zirka sechs Wochen zeigten die Explantate kugelförmige Auswüchse. Zwischen den Sorten wurden keine Unterschiede festgestellt.

Petiole. Die Explantate waren nach vier Wochen hellbraun, weich und aufgequollen. Es konnte kein eindeutiges Kalluswachstum festgestellt werden. Es traten keine Nekrosen oder Adventivbildungen auf. Nach etwa sechs Wochen wurden an den Explantaten dunkelbraune kugelförmige Auswüchse festgestellt, die kein weiteres Wachstum aufwiesen. Zwischen den Sorten gab es keine Unterschiede (siehe Tabelle 10).

Tab. 10: Kallusinduktionsmedium TK 9 mit Belichtungsvariante I (Verdunkelung für 14 Tage, anschließende Belichtung mit 3.000 lux). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n
Kotyledone	0	0	104	0	0	94
Hypokotyl	0	0	80	0	0	82
Laubblatt	0	0	40	0	0	60
Petiole	0	0	40	0	0	60

3.1.4.2 Belichtungsvariante II

Während der ersten 14 Tage nach Explantatentnahme waren keine Abweichungen in der Reaktion der Explantate zu Belichtungsvariante I festzustellen. Es wurden keine Adventivorgane gebildet. An den Kotyledonen- und Laubblattexplantaten wurden braune, kugelförmige Auswüchse nach vier Wochen gebildet. Alle Explantate nahmen eine hellbraune Färbung an und wiesen anschließend keine Veränderungen über mehrere Wochen auf.

3.1.5 Medium TK 11

3.1.5.1 Belichtungsvariante III

Kotyledone. Die Explantate von „Antigua“ wiesen chlorotische Aufhellungen auf. An etwa der Hälfte der Explantate wurde sehr wenig heller, kompakter Kallus gebildet (siehe Tabelle 11). Sehr viele der Explantate wiesen eine äußerst starke Adventivwurzelbildung auf. Der Kallus starb nach dem Subkultivieren ab.

Die Explantate von „Bianca“ wurden chlorotisch und anschließend nekrotisch. An der Unterseite der Schnittkanten entstand in geringen Mengen weißer, kompakter Kallus (siehe Tabelle 11 und Abbildung 20). Nach dem Umsetzen bildeten sich an dem Kallus viele Adventivwurzeln. Anschließend wurde kein weiteres Kalluswachstum beobachtet.

Hypokotyl. Von den Hypokotylexplantaten konnte kein Kallus etabliert werden. Die Explantate waren grün und wiesen eine Anthocyanbildung auf. Es wurden bei 78,8 % der Explantate Adventivwurzeln gebildet (siehe Tabelle 11).

Laubblatt. Die Blattstücke wölbten sich auf und vergilbten. Eine geringe Verfärbung durch Anthocyane wurde festgestellt. Alle Explantate (100,0 %) wiesen eine äußerst starke Adventivwurzelbildung auf (siehe Abbildung 21). An den kurzen Schnittkanten der Explantate wurde weißlicher, kompakter Kallus gebildet (siehe Tabelle 11). Nach der Subkultivierung des Kallus traten Verbräunungen auf und das Gewebe starb ab.

Petiole. Die Explantate waren dunkelgrün und bildeten Anthocyane sowie viele Adventivwurzeln (93,3 %, siehe Tabelle 11). Wenige Explantate waren vergilbt und abgestorben. An der Unterseite von 48,3 % der Explantate wurde lockerer, weißlicher Kallus gebildet. Er konnte nicht subkultiviert werden.

Tab. 11: Kallusinduktionsmedium TK 11, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n
Kotyledone	51,7	80,0	60	91,7	11,7	60
Hypokotyl	-	-	-	0,0	78,8	80
Laubblatt	-	-	-	41,7	100,0	60
Petiole	-	-	-	48,3	93,3	60

3.1.6 Medium TK 12

3.1.6.1 Belichtungsvariante III

Kotyledone. Bei beiden Sorten verbräunten die Explantate nach dem Aufsetzen auf das Medium. Es wurden keine Adventivwurzeln gebildet. An den Schnittkanten von 15,0 % („Antigua“) bzw. 28,6 % („Bianca“) der Explantate wurde wenig kompakter, heller Kallus gebildet (siehe Tabelle 12 und Abbildung 22). Nach der Subkultivierung wuchsen an dem Kallus viele Adventivwurzeln und das Gewebe starb ab.

Hypokotyl. Die Segmente waren grün und wiesen eine leichte Rosafärbung auf. An jeweils einem Ende des Explantates lag eine keulenförmige Verdickung vor. An der Unterseite von 7,5 % der Explantate (siehe Tabelle 12) wuchs eine dünne Schicht aus hellgrünem bis weißlichem, kompaktem Kallus (siehe Abbildung 23). Nach der Subkultivierung war kein weiteres Wachstum festzustellen und das Gewebe starb ab.

Laubblatt. Die Explantate waren aufgewölbt und dunkelgrün mit einer Anthocyanbildung an den Rändern. Etwa die Hälfte der Explantate wies Chlorosen auf. Es wurde kein Kallus gebildet.

Petiole. Die Explantate waren dunkelgrün mit Anthocyanbildung. An der Unterseite lag wenig weißlicher Kallus vor. Der Kallus konnte durch Subkultivierung nicht vermehrt werden. An 26,7 % der Explantate wuchsen Adventivwurzeln (siehe Tabelle 12).

Tab. 12: Kallusinduktionsmedium TK 12, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n	Kallusbildung (%)	Wurzelbildung (%)	n
Kotyledone	15,0	0,0	60	28,6	0,0	77
Hypokotyl	-	-	-	7,5	16,3	80
Laubblatt	-	-	-	8,3	10,0	60
Petiole	-	-	-	8,3	26,7	60

3.1.7 Medium TK 13

3.1.7.1 Belichtungsvariante III

Kotyledone. Die Keimblätter wiesen eine dunkelgrüne Färbung und Anthocyanbildung auf. Sie waren aufgewölbt und an den Explantatunterseiten wurde hellgrüner und weißlicher, kompakter Kallus gebildet (91,7 % bei „Antigua“ bzw. 90,0 % bei „Bianca“, siehe Tabelle 13). Zudem waren die Unterseiten leicht verbräunt. Adventivsprosse wurden an Explantaten beider Sorten gebildet (siehe Abbildung 24). Die Explantate von „Antigua“ wiesen ein stärkeres Adventivwurzelwachstum auf als die Explantate von „Bianca“ (18,3 bzw. 15,0 %, siehe Tabelle 13).

Nach der Subkultivierung verbräunte der Kallus. An dem abgestorbenen Gewebe wurde neuer grüner und weißlicher, kompakter Kallus gebildet. Aus dem Kallus wuchsen Adventivsprosse- und -wurzeln.

Hypokotyl. An der Oberfläche und den Schnittflächen von 40,0 % der Explantate wuchs weißlicher, kompakter Kallus (siehe Tabelle 13). Zellen der Explantatunterseite waren braun gefärbt. Es wurden Adventivwurzeln von über einem Drittel der Explantate gebildet (siehe Abbildung 25). Nach der Subkultivierung verstärkte sich die Absterbereaktion. Es wuchs neuer, hellgrüner Kallus an dem abgestorbenen Gewebe, der über zwei Monate subkultiviert werden konnte. Der subkultivierte Kallus wies jedoch eine starke Adventivbildung (Wurzeln und Sprosse) auf.

Laubblatt. Die Explantate waren dunkelgrün und aufgewölbt. Es wurden Anthocyane gebildet. An den Schnittkanten von 91,4 % der Explantate (siehe Tabelle 13) befand sich weißlicher und grüner, kompakter Kallus mit Verbräunungen an der Unterseite. Die Explantate sowie der subkultivierte Kallus zeigten eine hohe Tendenz zur Adventivspross- sowie -wurzelbildung.

Petiole. Die Explantate waren dunkelgrün und aufgewölbt mit Anthocyanbildung. An der Unterseite von 43,8 % der Explantate wurde weißlicher, locker gefügter Kallus gebildet (siehe Tabelle 13). Verbräunungen waren an der Unterseite des Kallus vorhanden. Nach der Subkultivierung verbräunte der Kallus und es wuchs neuer heller Kallus an dem abgestorbenen Gewebe. An dem subkultivierten Kallus wurden Adventivorgane gebildet.

Tab. 13: Kallusinduktionsmedium TK 13, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung	Wurzelbildung	n	Kallusbildung	Wurzelbildung	n
	(%)	(%)		(%)	(%)	
Kotyledone	91,7	18,3	60	90,0	15,0	60
Hypokotyl	-	-	-	40,0	38,3	60
Laubblatt	-	-	-	91,4	30,0	70
Petiole	-	-	-	43,8	12,5	80

3.1.8 Medium TK 14

3.1.8.1 Belichtungsvariante III

Hypokotyl. Die Segmente von „Bianca“ zeigten eine Volumenzunahme und Farbveränderung von hellgrün zu hellbraun. An den Schnittflächen aller Explantate befand sich hellbrauner, weicher Kallus (siehe Tabelle 14 und Abbildung 26). Wie bei dem Medium TK 9 (siehe 3.1.4) wurden keine Adventivwurzeln gebildet. Der Kallus wuchs nach der Subkultivierung weiter und zeigte keine Nekrosen.

Kotyledon und Laubblatt. Die Explantate zeigten eine Volumenzunahme und eine Farbveränderung von dunkelgrün zu gelb und hellbraun. Es war kein Kalluswachstum erkennbar (siehe Tabelle 14). Durch die Flüssigkeitsaufnahme waren die Explantate weich. Es wurden keine Adventivorgane gebildet (siehe Abbildung 27). Es war keine Veränderung der Explantate zu beobachten, nachdem sie geschnitten und subkultiviert wurden.

Petiole. Die Petiolensegmente nahmen an Volumen zu. Es trat eine Farbveränderung von grün zu gelb und hellbraun auf. Durch die Flüssigkeitsaufnahme waren die Explantate weich. Es wurden weder Kallus noch Adventivorgane gebildet (siehe Tabelle 14). Nach dem erneuten Schneiden und der Subkultivierung blieben die Explantate unverändert.

Tab. 14: Kallusinduktionsmedium TK 14, Belichtungsvariante III (3.000 lux, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 h). Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach Explantatentnahme. n = Anzahl der Explantate.

Explantat	„Antigua“			„Bianca“		
	Kallusbildung	Wurzelbildung	n	Kallusbildung	Wurzelbildung	n
	(%)	(%)		(%)	(%)	
Kotyledone	0,0	0,0	60	0,0	0,0	60
Hypokotyl	-	-	-	100,0	0,0	60
Laubblatt	-	-	-	0,0	0,0	60
Petiole	-	-	-	0,0	0,0	60

3.2 Suspensionskultur

Aufgrund des zur Verfügung stehenden Kallusmaterials wurde insbesondere mit den Medien TS 630 und 7 und Kallus von Petiolenexplantaten gearbeitet. Es wurden einzelne Suspensionen mit TS 13 und 14 angesetzt.

3.2.1 Medium TS 630

Hypokotyl. Es wurden fünf Mal Suspensionen mit Hypokotylkallus von „Antigua“ angesetzt. Die Reaktion des Kallus war ähnlich wie auf dem Kallusinduktionsmedium. Der in Suspension überführte Kallus wies nach einer Woche Verbräunungen auf. In dem Medium waren braune Schwebeteilchen vorhanden, bei denen es sich wahrscheinlich um abgestorbene Zellen handelte. Der Kallus wies Adventivwurzeln und -sprosse auf. Es wurden mehr Wurzeln als Sprosse gebildet.

An dem braunen Kallus wurde innerhalb eines Zeitraumes von sieben bis 14 Tagen weißlicher, kompakter Kallus gebildet. Wenn der helle Kallus nicht von dem alten Material getrennt wurde, nekrotisierte er und das Gewebe starb. Aufgrund dessen wurde der weißliche Kallus isoliert weiter kultiviert. Das isolierte Material zeigte wie zuvor Absterbescheinungen innerhalb einer Woche. Es konnte ein Wachstum von weiterem weißem Kallus festgestellt werden. Der junge Kallus wies keine Bildung von Adventivorganen auf.

Petiole. Mit Kallus von Petiolenexplantaten wurden sechs Mal Suspensionen von „Antigua“ und sieben Mal Suspensionen von „Bianca“ angesetzt. Der angeschüttelte Kallus wies nach sieben bis 14 Tagen Verbräunungen auf. In dem Medium lagen abgestorbene Zellen vor. Der Kallus bildete Adventivwurzeln und -sprosse. Es wurden mehr Wurzeln als Sprosse

gebildet. An dem verbräunten Kallus wuchs neuer, weißlicher Kallus. Der weiße Kallus war kompakt gefügt. Bei „Bianca“ wurde bei drei von sieben Suspensionen lockerer, weißer Kallus gebildet (siehe Abbildung 28).

Der neue Kallus zeigte die bereits beschriebenen Absterberscheinungen, wenn er an dem braunen Kallus verblieb. Daher wurde der helle Kallus isoliert und weiter kultiviert. An dem isolierten, weißen Kallus wurden in der Regel Verbräunungen nach einer Woche beobachtet. Es wurde festgestellt, dass weniger Nekrosen an dem weißen Kallus auftraten, wenn das Material großzügig von dem braunen Kallus abgetrennt worden war. Der etablierte, lockere Kallus wies eine deutliche Volumenzunahme mit jeder Kulturwoche auf. Das Material wurde nach vier Wochen auf zwei Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Die Kultur konnte über einen Zeitraum von mehr als sechs Wochen aufrecht erhalten werden. Der weiße Kallus bildete keine Adventivorgane. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Sorten festgestellt.

3.2.2 Medium TS 7

Hypokotyl. Mit dem vorhandenen Kallusmaterial wurde von beiden Sorten jeweils eine Suspension angesetzt. Bei „Antigua“ verbräunte der angeschüttelte Kallus leicht, jedoch war nach einer Woche das Wachstum von neuem, kompaktem, hellgrünem Kallus festzustellen. Der angeschüttelte Kallus bildete Adventivwurzeln und -sprosse (siehe Abbildung 29).

Der Kallus von „Bianca“ wurde im flüssigen Medium ebenfalls braun. Es lagen braune Schwebeteilchen in der Suspension vor. Nach einer Woche wurde lockerer, weißer Kallus gebildet. Dieser wurde isoliert weiter kultiviert und wies ein deutliches Wachstum auf. Diese Kultur konnte für mehr als sechs Wochen in Suspension subkultiviert werden.

Petiole. Von „Antigua“ wurde eine Suspension und von „Bianca“ wurden sechs Mal Suspensionen angesetzt. Der Kallus wies bei beiden Sorten Verbräunungen sowie Adventivwurzeln- und -sprosse auf. Nach sieben bis 14 Tagen wurde weißlicher, locker gefügter, neuer Kallus gebildet (siehe Abbildung 30). Dieser ließ sich von dem braunen Kallus trennen und einzeln bis zu vier Wochen weiter kultivieren.

3.2.3 Medium TS 13

Petiole. Es wurde eine Suspension mit Petiolenkallus von „Bianca“ mit TS 13 angesetzt. Nach einer Woche war der Kallus leicht verbräunt. Es befanden sich abgestorbene Zellen im Medium. Bei dieser Suspension wurden keine Adventivwurzeln und ein Adventivspross gebildet. Nach einer Woche lag heller, kompakter Kallus an dem leicht verbräunten Kallus vor.

3.2.4 Medium TS 14

Hypokotyl. Es konnten zwei Mal Suspensionen mit Hypokotylkallus von „Bianca“ angesetzt werden. Von dem hellbraunen Kallus lösten sich in der Suspension viele Zellen. Die kleinen Zellaggregate ließen das Medium hellbraun erscheinen (siehe Abbildung 31). Nach einer Woche konnte ein Wachstum des Kallus festgestellt werden.

3.3 Kontaminationen

Während der In-vitro-Kultur traten wiederholt Mikroorganismen in dem Pflanzenmaterial auf. Nach der Oberflächensterilisation war beim Auskeimen der Samen vereinzelt das Wachstum von Pilzen oder Bakterien zu beobachten. Die betroffenen Pflanzen wurden aus der Kultur entfernt.

Bei der Kallusinduktion kamen insbesondere bei „Antigua“ Bakterien in der Kultur vor. Die betroffenen Explantate wurden innerhalb der ersten 14 Tage nach der Entnahme braun und bildeten keinen Kallus. Um das betroffene Explantat war Bakterien Schleim sichtbar. Pilze waren sehr selten an den Explantaten sichtbar. Die Bakterien traten vermehrt in Explantaten der Folgeblätter (Laubblatt und Petiole) auf. Selten waren die Kotyledonen oder das Hypokotyl betroffen. Da die Bakterien das Kalluswachstum beeinflussten, wurden die betroffenen Ansätze nicht in die Auswertung einbezogen. Aus diesem Grund wurden von den Versuchen bei „Antigua“ häufig mehr Wiederholungen angesetzt.

Bei den Suspensionen wurden Kontaminationen mit Bakterien oft wenige Tage nach dem Ansetzen der Kultur sichtbar. Höchstwahrscheinlich waren die Bakterien latent in den Explantaten vorhanden. Die betroffenen Kulturen wurden umgehend verworfen.

4. Diskussion und Ausblick

Die verschiedenen Kallusinduktionsmedien führten zu sehr unterschiedlichen Reaktionen der Explantate. Das Medium TK 630 war für die Kallusinduktion bei *Tagetes* am besten geeignet. Die Medien TK 630, 7 und 13 ergaben vergleichbare Ergebnisse (weißliches, kompaktes Kalluswachstum mit Verbräunungen nach etwa zwei Wochen). Wie beispielsweise Bresinsky et al. (2008) schreiben, ist das Verhältnis von Auxinen zu Cytokinen in der Regel bedeutungsvoller für die Kallusinduktion als die absoluten Konzentrationen. In den Medien TK 630 und 13 liegt dasselbe Verhältnis von NAA zu BAP (1:10, w/w) vor, wobei TK 630 die 2,5-fache Phytohormonkonzentration gegenüber TK 13 aufweist. Die niedrigere Konzentration bei TK 13 führte zu einer höheren Neigung zur Organogenese, insbesondere zur Bildung von Adventivsprossen. TK 7 enthält Auxin und Cytokinin im Verhältnis von 3:10 (IAA:BAP, w/w). NAA und IAA besitzen fast dieselbe molare Masse. Das synthetische Auxin NAA besitzt eine stärkere Auxinwirkung als IAA. Daher könnte die höhere IAA-Konzentration im Medium TK 7 zu einer ähnlichen Reaktion wie bei TK 630 führen. Wie bei Poli et al. (1992) und Mohamed et al. (2000) beschreiben, konnte gelblich-grüner Kallus mit den Medien TK 630 und 7 erhalten werden.

Es wurde von der Autorin angenommen, dass die nekrotischen Veränderungen des Kallus auf den abrupten Wechsel der Belichtung zurückzuführen sind. Poli et al. (1992) setzten das Medium TK 630 mit 2 % (m/v) Saccharose für die Kallus- und Suspensionskultur bei *T. patula* „Petit Gold“ ein. Sie führten einen regelmäßigen Wechsel von Belichtung (5.000 lux, 16/8 h) und Verdunkelung (24 h) durch. Es wurden keine negativen Auswirkungen auf die Kalluskultur durch den Wechsel der Belichtung festgestellt. Osman et al. (2008) beschreiben, dass das Kalluswachstum bei *T. erecta* durch Verdunkelung verbessert werden kann. Letzteres konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Verbräunungen des Kallus traten auch bei permanenter Verdunkelung des Materials auf. Daher ist der Lichteinfluss als Ursache der Nekrosen auszuschließen. Die beste Kallusinduktion bei *Tagetes* konnte wie bei Mohamed et al. (2000), Hussain & Latif (2012), Zheng et al. (2012) und Vanegas-Espinoza et al. (2012) beschrieben ohne eine langzeitige Verdunkelung erzielt werden.

Die Kontaktflächen des Kallus mit dem Medium (Medien TK 630, 7 und 13) waren besonders von den Verbräunungen betroffen. Deshalb ist anzunehmen, dass das Medium noch nicht optimal an die Kallusinduktion bei *T. erecta* angepasst ist. Wie Poli et al. (1992) beschrieben, konnte das Kalluswachstum auf TK 630 (modifiziert) bei *T. patula* „Petit Gold“ durch zweiwöchiges Subkultivieren über mehr als 15 Wochen aufrecht erhalten werden.

Der von vielen Autoren (Mohamed et al., 2000; Osman et al., 2008) vorgeschlagene vierwöchige Rhythmus für eine Subkultivierung kann aufgrund der Nekrosen bei den Medien TK 630, 7 und 13 nicht durchgeführt werden.

Die Medien TK 9 und 14 führten zu ähnlichen Reaktionen bei den Blattexplantaten, ohne deutliche Kallusinduktion. Bei diesen Medien unterscheiden sich die Phytohormonzusammensetzungen deutlich. In beiden Medien ist 2,4-D als starkes, synthetisches Auxin enthalten. TK 9 enthält sowohl 2,4-D als auch Kinetin in hohen Konzentrationen. Die von Osman et al. (2008) beschriebene, deutliche Verbesserung des Kalluswachstums bei verschiedenen Explantattypen von *T. erecta* auf TK 9 im Dunklen konnte nicht bestätigt werden. In TK 14 ist BAP als Cytokinin enthalten. An den Hypokotylexplantaten wurde ein deutlicher Unterschied bei der Kallusinduktion zwischen den Medien TK 9 und 14 beobachtet: Wie Osman et al. (2008) beschreiben, war kaum eine Veränderung der Hypokotylexplantate von *T. minuta* auf TK 9 festzustellen. Auf TK 14 wurde dagegen ein deutliches Kalluswachstum erzielt, wie von Vanegas-Espinoza et al. (2012) beschrieben.

Hussain & Latif (2012) konnten bei Laubblatt-, Petiolen-, Nodien- und Internodienexplantaten von *T. erecta* eine deutliche Kallusinduktion mit den Medien TK 11 und 12 erzielen. In dieser Arbeit wurde bei beiden Medien ein geringes Kalluswachstum beobachtet. Der Kallus starb nach der Subkultivierung ab. Auf TK 11 wurden deutlich mehr Adventivwurzeln an allen Explantattypen gebildet als auf den übrigen sechs getesteten Medien. Die exzessive Wurzelbildung beruht wahrscheinlich auf der Applikation des Auxins NAA (0,5 mg/L) ohne Zugabe eines Cytokinins. Sehr wenige Wurzeln wurden dagegen bei TK 12 gebildet. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf BAP (1 mg/L) als einziges zugegebenes Phytohormon. Es wurde wenig Kallus bei TK 12 gebildet, der nach der Subkultivierung abstarb. Wahrscheinlich ist bei *Tagetes* wie bei dem Tabakmarkkallustest (Nover, 2008) die Zugabe einer geringen Konzentration an Auxin für das Kalluswachstum notwendig. Die unter 3.1.3.3 beschriebenen abweichenden Reaktionen der Explantate auf TK 7 ähnelten stark der Reaktion auf TK 12. Es ist anzunehmen, dass die in dem Medium TK 7 enthaltene, instabile IAA während der Lagerung des MSO-Mediums abgebaut wurde obwohl das Medium kühl und dunkel gelagert wurde. Der Abbau von IAA wird neben Licht durch die Anwesenheit von MS-Nährsalzen gefördert (Dunlap et al., 1986; Dunlap & Robacker, 1988).

Die Farbe und Konsistenz des Kallus waren von dem jeweiligen Explantattyp abhängig. Explantate der Kotyledonen, Hypokotyle und Laubblätter bildeten kompakten Kallus, während Petiolenexplantate locker gefügten Kallus bildeten. Diese Beobachtung wird durch die

Untersuchungen von Hussain & Latif (2012) bestätigt. Die Kallusinduktion ist wahrscheinlich maßgeblich auf die verschiedenen, endogenen Phytohormonspiegel in den Explantaten zurückzuführen (George et al., 2008). Des Weiteren wird die Fähigkeit zur Kallusbildung wahrscheinlich durch das Alter des Materials beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde das Alter der für die Explantate verwendeten Laubblätter und Petiolensegmente nicht berücksichtigt. Poli et al. (1992) verwendeten in ihren Versuchen sieben bis acht Wochen alte Blätter von *T. patula* für die Kallusinduktion. Bei Hussain & Latif (2012) waren Laubblatt-explantate von *T. erecta* besser für die Kallusinduktion geeignet als Explantate der Nodien, Internodien, Petiolen und Wurzeln.

Die starke Neigung aller Explantattypen zur Organogenese, insbesondere zur Adventivwurzelbildung wurde auch bei Ketel (1984) beschrieben. In Ketels Versuchen wurden an den Explantaten und dem Kallus von *T. erecta* sehr schnell Adventivorgane gebildet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kontrollversuche zeigen, dass die Adventivbildungen nicht auf die applizierten Phytohormone zurückzuführen sind, sondern auf den Stoffwechsel der Explantate. Die Sorte „Antigua“ wies eine höhere Tendenz zur Adventivwurzelbildung als „Bianca“ auf. Benavides & Caso (1993) stellten eine Abhängigkeit zwischen der Tendenz zur Adventivwurzelbildung und dem Explantatursprung bei *Tagetes mendocina* Phil. fest. Blattexplantate wiesen demnach eine höhere Adventivwurzelbildung als andere Explantate auf. Diese Beobachtung kann in den hier vorliegenden Versuchen für *T. erecta* bestätigt werden. Die an Hypokotylexplantaten gebildeten Adventivwurzeln könnten bereits vor Explantatentnahme angelegt gewesen sein. Aufgrund der übermäßigen Adventivbildungen und der nekrotischen Veränderungen des Kallus wurde das Kalluswachstum visuell beurteilt.

Bereits viele Autoren haben die Kallusinduktion bei *Tagetes* untersucht. Zahlreiche *Tagetes*-Arten, Explantattypen und Phytohormonkonzentrationen bzw. -kombinationen wurden beschrieben. Die Ergebnisse der einzelnen Quellen widersprechen sich zum Teil stark. In der vorliegenden Arbeit konnten wenige Ergebnisse reproduziert werden. Es wurden sortenspezifische Unterschiede festgestellt. Die unterschiedlichen Reaktionen können zum Teil auf das Ausgangsmaterial (Art und Sorte) zurückgeführt werden. In den Veröffentlichungen wurde zumeist keine Sortenangabe für das Pflanzenmaterial gemacht. Die übrigen Versuchsbedingungen waren ähnlich aber nicht identisch.

Über Suspensionskulturen von *Tagetes* liegen wenige Veröffentlichungen vor. Während der Suspensionskultur fand eine Aufhellung des Kallus statt. George et al. (2008) schreiben,

dass bei hohen Zuckerkonzentrationen im Medium – insbesondere Saccharose – keine Chloroplasten gebildet werden. Die Zellen benötigen keine Photosynthese, da sie den Kohlenstoff aus dem Medium beziehen können. Die besten Ergebnisse konnten mit Petiolenkallus und dem Medium TS 630, sowie mit Hypokotylkallus und TS 7 erzielt werden. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit sollten mehr Versuche durchgeführt werden.

Darüber hinaus sollte das Kallusinduktionsmedium TK 630 für die weiterführenden Arbeiten weiter angepasst werden. Der Schwerpunkt liegt in der Verminderung der nekrotischen Reaktion des Kallus sowie der Reduktion von Adventivbildungen an den Explantaten. Bei *Chrysanthemum* wurden Adventivsprosse durch die hohe Stickstoffkonzentration im MS-Medium begünstigt (Roest & Bokelmann, 1975). Daher könnte eine Verminderung des Gesamtstickstoffes zu einem geringeren Adventivwachstum führen. Das Weglassen von Ammoniumnitrat in den Miller-Salzen förderte bei *Lactuca sativa* L. das Kalluswachstum stark (Doerschug & Miller, 1967). In einer Forschungsarbeit von Welander (1977) konnte eine Kallusinduktion bei *Begonia* L. durch eine Verminderung der Mikroelementkonzentration verstärkt werden. Ähnliche Adaptionen des MS-Mediums könnten bei *Tagetes* erfolgreich sein.

Bei einer Veränderung der Phytohormonkonzentration bietet es sich an, das Konzentrationsverhältnis von NAA zu BAP beizubehalten. Da eine verringerte Konzentration in TK 13 zu verstärkter Adventivprossbildung führte, sollte eine Erhöhung der Konzentration erprobt werden. Osman et al. (2008) erzielten eine Kallusinduktion bei *T. erecta* mit einem modifizierten MS-Medium mit 7 mg/L NAA und 10 mg/L BAP. Der zweiwöchige Subkultivierungsrhythmus kann beibehalten werden. Das angepasste Medium kann wie in dieser Arbeit beschrieben für die Suspensionskultur verwendet werden.

Die Kallus- und Suspensionskulturen können für die weitere Erforschung der Biosynthesewege von gelben Flavonolen eingesetzt werden. Mithilfe induzierter Mutagenese könnten Mutanten erhalten werden, bei denen einzelne Funktionen der Flavonolbiosynthese außer Kraft gesetzt sind. Auf den gewünschten „Chemotyp“ muss selektiert werden. Sorten mit sehr hellen Blüten wie „French Vanilla“ weisen eine verminderte Expression aller Gene für die Carotinoidbiosynthese auf (Moehs et al., 2001), wobei das Carotinoid Lutein das Hauptpigment in den Blüten von *Tagetes* ist (Quackenbush, 1973). Bei hellblütigen Mutanten kann es sich daher um regulatorische Mutationen anstatt eines Ausfalls einzelner Enzyme handeln. Zudem verhalten sich viele Mutationen rezessiv. Mit einer Selbstung können derartige Mutanten nach der Mendelschen Spaltungsregel identifiziert werden.

Bei der Identifizierung der für die Flavonol-6-hydroxylase (F6H) kodierenden Gene kann von der Aminosäuresequenz des Enzyms begrenzt auf die Gensequenz geschlossen werden. Die Gensequenz für die F6H ist bei der Sojabohne (*Glycine max* L.) bekannt (Latunde-Dada et al., 2001) und könnte für die Identifizierung des Gens in *Tagetes* verwendet werden.

5. Zusammenfassung

Für die Kallusinduktion bei Explantaten der *Tagetes erecta*-Sorten „Antigua“ und „Bianca“ wurden sieben Nährmedien getestet. Es wurden die Explantattypen Kotyledone, Hypokotyl, Laubblatt und Petiole eingesetzt. Der Einfluss der Belichtung wurde anhand von drei Varianten untersucht. Die beste Kallusinduktion wurde mit einem modifizierten Nährmedium nach Murashige und Skoog erzielt. Das Basalmedium wurde mit 30 g/L Saccharose, 0,5 mg/L 1-Naphthylelessigsäure und 5 mg/L 6-Benzylaminopurin ergänzt und mit Agar-Agar (8 g/L) verfestigt. Eine Belichtung von 3.000 lux mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h war für die Kallusinduktion am besten geeignet.

Es wurde eine Abhängigkeit zwischen der Kalluskonsistenz und dem verwendeten Explantattyp festgestellt. Explantate der Kotyledonen, Hypokotyle und Laubblätter bildeten kompakten Kallus, während Petiolenexplantate locker gefügten Kallus bildeten. Alle Explantattypen wiesen ein starkes Adventivwurzelwachstum auf, welches auf den Stoffwechsel der Explantate zurückgeführt werden konnte. Die Sorte „Antigua“ wies eine höhere Tendenz zur Adventivwurzelbildung als „Bianca“ auf.

Ausgehend von den Kalluskulturen wurden Suspensionskulturen mit dem jeweiligen Kallusinduktionsmedium ohne Agarzusatz angesetzt. Der Kallus wurde in der Suspension nekrotisch. Geringe Mengen an vitalem, weißem Kallus wurden gebildet, die über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden konnten.

6. Literaturverzeichnis

- Anzellotti, D. und Ibrahim, R. K. 2000.** Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: affinity purification, characterization, and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000, Bd. 382, S. 161-172.
- Benavides, M. M. und Caso, O. H. 1993.** Plant regeneration and thiophene formation in tissue cultures of *Tagetes mendocina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993, Bd. 35, 3, S. 211-215.
- Bennett, R. N. und Wallsgrave, R. M. 1994.** Tansley Review No. 72 - Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 1994, Bd. 127, 4, S. 617-633.
- Bouman, H. und Tiekstra, A. 2005.** Adaptations of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. [Buchverf.] A. K. Hvostlef-Eide und W. Preil. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. s.l.: Springer, 2005, S. 493-505.
- Bremer, K. 1994.** *Asteraceae: Cladistics and Classification*. s.l.: Timber Press, 1994.
- Bremer, K. und Gustafsson, M. H. G. 1997.** East Gondwana ancestry of the sunflower alliance of families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, Bd. 94, S. 9188-9190.
- Bresinsky, A., et al. 2008.** *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*. s.l.: Spektrum Akademischer Verlag, 2008. ISBN-10: 3827414555.
- Brettel, R., et al. 1986.** Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. *Molecular & general genetics*. 1986, Bd. 202, S. 235-293.
- Carlquist, S. 1976.** Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae. *Aliso*. 1976, Bd. 8, S. 465-492.
- Cassini, H. 1819.** Suite du sixième mémoire sur la famille des Synanthérées, contenant les caractères des tribus. *Journal de physique, de chimie, d'histoire naturelle et des arts*. 1819, Bd. 88, S. 189-204.
- Chu, C. C., et al. 1975.** Establishment of an efficient medium for anther culture in rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*. 1975, Bd. 18, S. 659-668.
- de Fossard, R. 1976.** Tissue culture for plant propagation. *Armidale: University of New England*. 1976.
- De Klerk, G. J. und Wijnhoven, F. 2005.** Water retention capacity of tissue cultured plants. *Propagation of Ornamental Plants*. 2005, Bd. 5, S. 14-18.
- Doerschug, M. R. und Miller, C. O. 1967.** Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. *American Journal of Botany*. 1967, Bd. 54, S. 410-413.
- Dunlap, J. R. und Robacker, K. M. 1988.** Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant Physiology*. 1988, Bd. 88, S. 379-382.
- Dunlap, J. R., Kresovich, S. und McGee, R. E. 1986.** The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiology*. 1986, Bd. 81, S. 934-936.

- Evans, D., Sharp, W. und Medina-Filho, H. 1984.** Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany*. 1984, Bd. 71, S. 759-774.
- Forkmann, G. 1991.** Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding*. 1991, Bd. 106, S. 1-26.
- Friend, J. 1985.** Phenolic substances and plant disease. *Annual Proceedings of the Phytochemical Society*. 1985, Bd. 25, S. 367-392.
- , **1981.** Plant phenolics, lignification and plant disease. [Buchverf.] L. Rheinhold, J. B. Harborne und T Swain. *Progress in phytochemistry*. s.l.: Pergamon Press, 1981, Bd. 7, S. 197-261.
- Fuchs, L. 1542.** *Historia stirpium*. s.l.: Officina Isingriniana, 1542.
- Fukami, T. und Hildebrandt, A. C. 1967.** Growth and chlorophyll formation in edible green plant callus tissues *in vitro* on media with limited sugar supplements. *Botanical Magazine (Tokyo)*. 1967, Bd. 80, S. 199-212.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. und Ojima, K. 1968.** Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968, Bd. 50, S. 15-158.
- Gates, W.. 1939.** The de la Cruz-Badiano Aztec Herbal of 1552. *The Maya Society*. 1939, S. 26, 78-79, 91-128.
- Gau, W., Ploschke, H. J. und Wünsche, C. 1983.** Mass spectrometric identification of xantophyll fatty acid esters from Marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high performance liquid chromatography and Craig counter current distribution. *Journal of Chromatography*. 1983, Bd. 262, S. 277-284.
- Gautheret, R. J. 1942.** *Manuel Technique de Culture des Tissue Végétaux*. s.l.: Masson et Cie, 1942.
- George, E. F., Hall, M. A. und De Klerk, G.-J. 2008.** *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3. Edition. s.l.: Springer, 2008. S. 65-115. Bd. I. ISBN 978-1-4020-5005-3.
- Gerarde, J. und Johnson, Th. 1597.** *The herball or generall historie of plantlets*. London : Gerald Howe, 1597.
- Goodwin, T. W. und Britton, G. 1988.** Distribution and analysis of carotenoids. [Buchverf.] T. W. Goodwin. *Plant Pigments*. s.l. : Academic Press, 1988, S. 61-132.
- Guenther, E. 1952.** *The essential oils*. s.l.: D. van Nostrand Co., 1952.
- Halbwirth, H., et al. 2000.** Biosynthesis of yellow flower pigments belonging to flavonoids and related compounds. [Buchverf.] R. M. Mohan. *Research Advances in Phytochemistry vol. 1*. s.l.: Global Research Network, 2000, S. 35-49.
- Halbwirth, H., Forkmann, G. und Stich, K. 2004.** The A-ring specific hydroxylation of flavonols in position 6 in *Tagetes* sp. is catalyzed by a cytochrome P450 dependent monooxygenase. *Plant Science*. 2004, Bd. 167, S. 129-135.
- Harborne, J. B. 1976.** *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. s.l.: Academic Press, 1976.

- , 1988. Introduction to ecological chemistry. *Academic Press*. 1988.
- , 1965. Plant polyphenols XV: Flavonols as yellow flower pigments. *Phytochemistry*. 1965, Bd. 4, S. 647-657.
- , 1980. Plant Phenolics. [Buchverf.] E. A. Bell und B. V. Charlwood. *Encyclopedia of Plant Physiology*. s.l.: Springer-Verlag, 1980, Bd. 8, S. 329-395.
- Harlan, J. R. 1963.** Biosystematics of cultivated plants. s.l.: unveröffentlicht, 1963.
- Harris, E. M. 1995.** Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts. *Botanical Review* 61. 1995. S. 93-278.
- Herrmann, K. 1992.** Über die Gehalte der hauptsächlichen Pflanzenphenole im Obst. *Fluss Obst*. 1992, Bd. 59, S. 66-70.
- Heß, D. und Leipoldt, G. 1979.** Regeneration of shoots and roots from isolated mesophyll protoplasts of *Nemesia strumosa*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1979, Bd. 174, S. 411-417.
- Heß, D. 1992.** *Biotechnologie der Pflanzen*. Stuttgart: Ulmer, 1992. ISBN 3-8001-2644-3.
- , 2005. *Systematische Botanik*. s.l.: Eugen Ulmer Stuttgart, 2005. S. 206-212. ISBN 3-8252-2673-5.
- Hirschberg, J. 2001.** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2001, Bd. 4, S. 210-18.
- Huang, L.-C. und Murashige, T. 1977.** Plant tissue culture media: Major constituents, their preparation and some applications. *Methods in Cell Science*. 1977, Bd. 3, 1, S. 539-548.
- Hussain, A. und Latif, M. 2012.** In vitro studies in *Tagetes erecta* (marigold) under auxins (IAA, NAA) and cytokinins (BAP, Kinetin) effect for callus formation by different explants. *Biologia (Pakistan)*. 2012, Bd. 58, 1-2, S. 41-46.
- Inoe, M., et al. 1985.** Change of phenylalanine ammonia-lyase in strawberry leaves infested with the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Applied Entomology & Zoology*. 1985, Bd. 20, S. 348-349.
- Ketel, D. H. 1984.** Differentiation and dedifferentiation in *Tagetes* species in relation to secondary metabolism of cultured plant cells. *Acta Botanica Neerlandica*. 1984, Bd. 33, 3, S. 377.
- Kielkiewicz, M. und Van de Vrie, M. 1990.** Within-leaf differences in nutritive value and defence mechanisms in *Chrysanthemum* by the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Experimental and Applied Acarology*. 1990, Bd. 10, S. 33-43.
- Kim, K.-J. und Jansen, R. K. 1995.** ndhF sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, Bd. 92, S. 10379-10383.
- Kim, K.-J., Choi, K. S. und Jansen, R. K. 2005.** Two chloroplast DNA inversions originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (Asteraceae). *Molecular Biology and Evolution*. 2005, Bd. 22, S. 1783-1792.
- Koch, K. E. 1996.** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1996, Bd. 47, S. 509-540.

- Laibach, F. 1925.** Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Zeitschrift für Botanik*. 1925, Bd. 17, S. 417-459.
- Larkin, P. und Scowcroft, W. 1981.** Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. 1981, Bd. 60, S. 197-214.
- Larsson, S., et al. 1986.** Effects of light and nutrient stress on leaf phenolic chemistry in *Salix dasyclados* and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera). *Oikos*. 1986, Bd. 47, S. 205-210.
- Latunde-Dada, A. O., et al. 2001.** Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, Bd. 276, S. 1688-1695.
- Lawrence, B. M. 1985.** A review of the world production of essential oils (for 1984). *Perfumer and Flavorist*. 1985, Bd. 10, 5, S. 1-16.
- Leopold, C. A. und Ardrey, R. 1972.** Toxic substances in plants and the food habits of early man. *Science*. Mai 1972, Bd. 176, S. 512-514.
- Linsmaier, E. M. und Skoog, F. 1965.** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1965, Bd. 18, S. 100-127.
- Luckner, Martin. 1990.** *Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals*. s.l.: VEB Gustav Fischer Verlag, 1990. S. 406-415. ISBN 3-334-00322-1.
- Moehs, C. P., et al. 2001.** Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology*. 2001, Bd. 45, S. 281-293.
- Mohamed, M. A.-H., Harris, P. J. C. und Henderson, J. 1999.** An efficient in vitro regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1999, Bd. 55, S. 211-215.
- , 2000. In vitro selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science*. 2000, Bd. 159, S. 213-222.
- Morel, G. 1960.** Producing virus-free cymbidiums. *American Orchid Society Bulletin*. 1960, Bd. 29, S. 459-497.
- Morel, G. und Martin, C. 1952.** Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. 1952, Bd. 235, S. 1324-1325.
- , 1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladie à virus. *Comptes-rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*. 1955, Bd. 41, S. 472-475.
- Moes, K. 1960.** Nebenwege des Stoffwechsels bei Pflanze, Tier und Mikrobe. *Mitteilungen Chemische Gesellschaft*. 1960, Bd. 27, S. 2-10.
- Muir, W. H., Hildebrandt, A. C. und Riker, A. J. 1954.** Plant tissue cultures produced from single isolated cells. *Science*. 1954, Bd. 119, S. 877-878.
- Murashige, T. und Skoog, F. A. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962, Bd. 15, S. 473-479.
- Nabors, M. W. 2007.** *Botanik*. s.l.: Pearson Studium, 2007. S. 189-191. ISBN 978-3-8273-7231-4.

- Neher, R. T. 1986.** The ethnobotany of Tagetes. *Economic Botany*. 1986, Bd. 22, S. 317–325.
- Neumann, K.-H. 1995.** *Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen*. s.l.: Utb, 1995. ISBN-10: 3825218694.
- Nitsch, J. P. und Nitsch, C. 1969.** Haploid plants from pollen grains. *Science*. 1969, Bd. 163, S. 85- 87.
- Nover, L. 2008.** Phytohormone und Signalstoffe. [Buchverf.] E. Weiler und L. Nover. *Allgemeine und molekulare Botanik*. s.l.: Thieme, 2008, S. 589-668.
- Oehlkers, F. 1943.** Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*. 1943, Bd. 81, S. 313-341.
- Osman, H. A., et al. 2008.** Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*: 1- in vitro studies on callus induction from marigold plants *Tagetes erecta* L. *Egyptian Journal of Phytopathology*. 2008, Bd. 36, 1-2, S. 19-32.
- Panero, J. L. und Funk, V. A. 2008.** The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008, Bd. 47, S. 757-782.
- Panero, J. L. und Crozier, B. S. 2012.** Asteraceae. Sunflowers, daisies. *The Tree of Life Web Project*. [Online] 27. Januar 2012. [Zitat vom: 5. Februar 2014.]
<http://tolweb.org/Asteraceae/20780/2012.01.27>.
- Philip, T. und Berry, J. W. 1975.** Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers. *Journal of Food Science*. 1975, Bd. 40, S. 1089-1090.
- Piccaglia, R., Marotti, M. und Grandi, S. 1998.** Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops and Products*. 1998, Bd. 8, S. 45-51.
- Pierik, R. L. M. 1999.** *In vitro culture of higher plants*. s.l.: Springer, 1999. ISBN-10: 079235267X.
- Poli, F., et al. 1992.** Production of thiophenes in calli and suspension cultures of *Tagetes patula* L. as influenced by light/dark succession. *Phyton (Horn)*. 1992, Bd. 31, 2, S. 257-262.
- Quackenbush, F. W. 1973.** Use of heat to saponify xanthophyll esters and speed analysis for carotenoids in feed material: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1973, Bd. 56, S. 748–753.
- Rajalakshmi, R. und Jose, J. 2004.** Karyomorphometrical analysis and chemical polymorphism in *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *Philippine Journal of Science*. 2004, Bd. 133, 2, S. 135-144.
- Rao, P. S. und Seshadri, T. R. 1941.** The colouring matter of the flowers of *Tagetes patula*: Isolation of a new flavonol, patuletin and its constitution. *Proceedings of The Indian Academy of Sciences-mathematical Sciences*. 1941, Bd. 14, 6, S. 643-647.
- Robinson, H. 2004.** New supertribes *Helianthodae* and *Senecionodae*, for the subfamily Asteroideae (Asteraceae). *Phytologia*. 2004, Bd. 86, S. 116-120.
- , 2005. Validation of the supertribe *Asterodae*. *Phytologia*. 2005, Bd. 87, S. 72-88.

- Roest, S. und Bokelmann, G. S. 1975.** Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Scientia Horticulturae*. 1975, 3, S. 317-330.
- Rugini, E., Tarini, P. und Rossodivita, M. E. 1987.** Control of shoot vitrification of almond and olive grown in vitro. *Acta Horticulturae*. 1987, Bd. 212, S. 177-183.
- Saad, A. I. M. und Elshahed, A. M. 2012.** Plant Tissue Culture Media. [Buchverf.] A. Leva und L. M. R. Rinaldi. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. s.l.: InTech, 2012.
- Sahagun, Fr. Bernardino de. 1938.** Historia general, de los cosas de Nueva Espania. *Editorial Pedro Robredo*. 1938, Bd. 468, 3, S. 234-273.
- Sarin, R. 2004.** Insecticidal activity of callus culture of *Tagetes erecta*. *Fitoterapia*. 2004, Bd. 75, S. 62-64.
- Sefidkon, F., et al. 2004.** The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*. 2004, Bd. 19, S. 579-581.
- Siqueira, J. O., et al. 1991.** Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Review in Plant Sciences*. 1991, Bd. 10, S. 63-121.
- Skoog, F. und Miller, C. 1957.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1957, Bd. 11, S. 118-130.
- Soule, J. A. 1993.** A potential new herbal product from a South American species of *Tagetes*. [Buchverf.] J. Janick und J. Simon. *New crops*. s.l.: Wiley, 1993, S. 649-654.
- , 1993. Medicinal and beverage uses of *Tagetes* (*Tageteae: Compositae*). *American Journal of Botany*. 1993, Bd. 80, 6, S. 177.
- , 1993. Systematics of *Tagetes* (*Asteraceae-Tageteae*). *Dissertation*. s.l.: University of Texas at Austin, 1993.
- , 1996. Novel annual and perennial *Tagetes*. [Buchverf.] J. Janick. *Progress in new crops*. s.l.: ASHS Press, 1996, S. 546-551.
- Teuscher, B. 1990.** *Pharmazeutische Biologie*. s.l.: Vieweg Verlag, 1990.
- Timberlake, C.F. und Henry, B.S. 1986.** Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*. 1986, Bd. 10, S. 31-36.
- Valadon, L. R. G. und Mummery, R. S. 1967.** Carotinoids of certain compositae flowers. *Phytochemistry*. 1967, Bd. 6, S. 983-988.
- Vanegas-Espinoza, P. E., et al. 2012.** Analysis of callus development and transient expression in *Tagetes erecta*. [Buchverf.] G. Groening. *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Advances in Ornamentals, Landscape and Urban Horticulture*. 2012.
- Vasil, V. und Hildebrandt, A. 1965.** Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. *Science*. 1965, Bd. 150, S. 889-992.

—. 1967. Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco in vitro. *Planta*. 1967, Bd. 75, S. 139-151.

Vasudevan, P., Kashyap, S. und Sharma, S. 1997. *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioresource Technology*. 1997, Bd. 62, S. 29-35.

Wagenitz, G. 1976. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*. 1976, Bd. 125, S. 29-46.

Watzl, B. und Leitzmann, C. 2005. *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln: Ernährung und Immunologie*. s.l.: Hippokrates-Verlag, 2005. ISBN-13: 978-3830453086.

Welander, T. 1977. In vitro organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia hiemalis*. *Physiologia Plantarum*. 1977, Bd. 41, S. 142-145.

Wong, E. 1973. Plant Phenolics. [Buchverf.] G. W. Butler und R. W. Bailey. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. s.l.: Academic Press, 1973, S. 265-322.

Zheng, J., Li, S.-Q. und Huang, H.-M. 2012. Study on the tissue culture system of *Tagetes erecta* L. *Northern Horticulture*. 2012.

7. Anhang

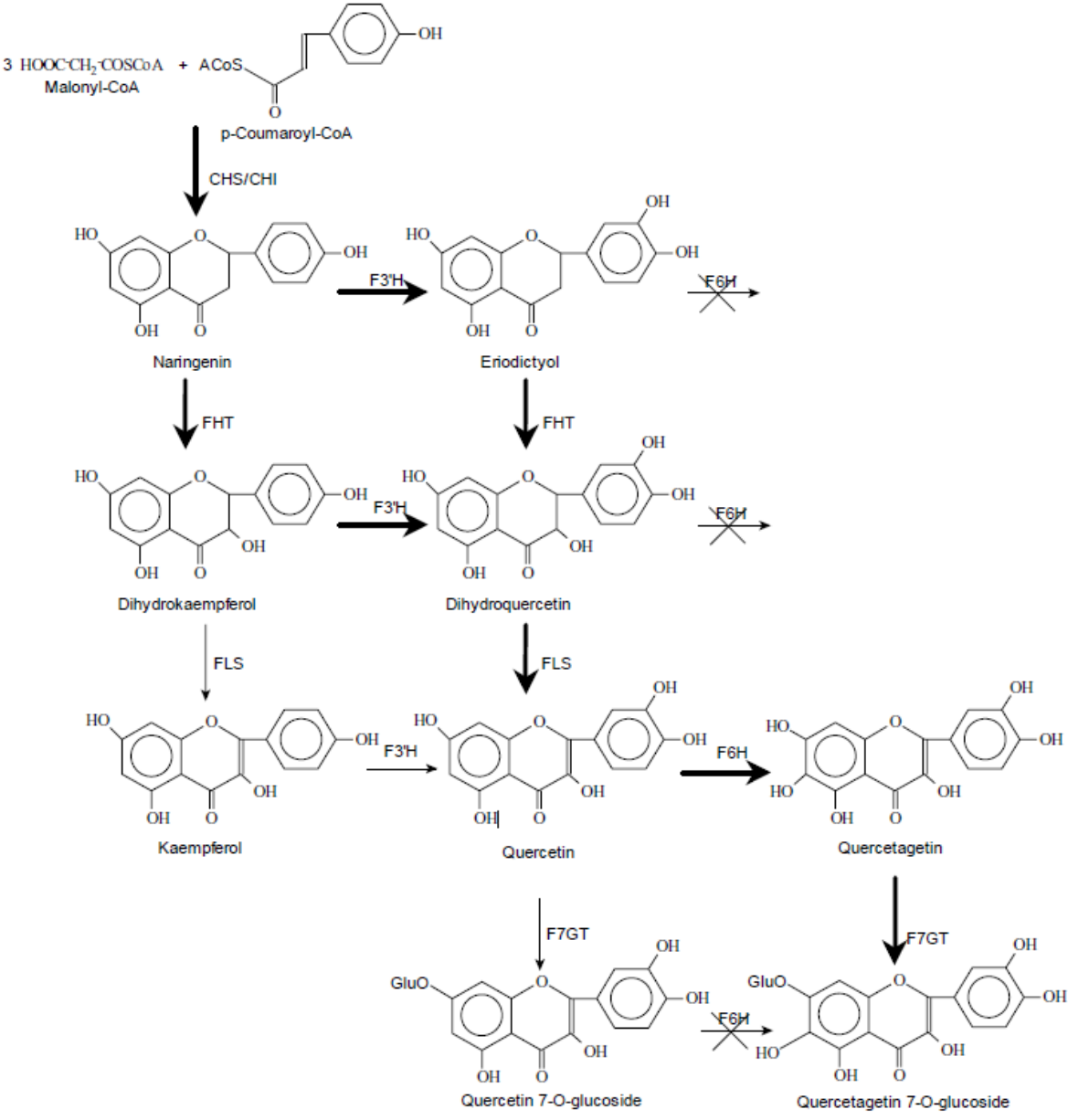


Abb. 1: Syntheseweg von Quercetin-7-O-glucosid nach Halbwirth et al., 2004



Abb. 2: Blütenstand *Tagetes erecta* „Antigua Gelb“



Abb. 3: Blütenstand *Tagetes erecta* „Bianca“

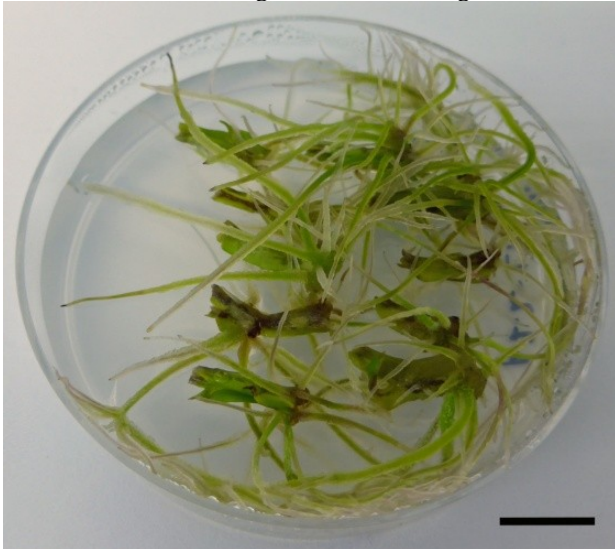


Abb. 4: MSO-Medium, Belichtungsvariante II, Petiolelexplantate von „Antigua“, Balken: 10 mm

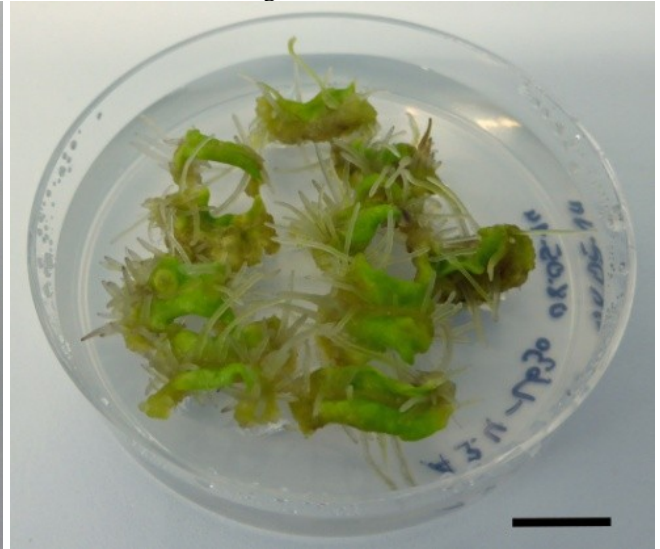


Abb. 5: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Kotyledonenexplantate von „Antigua“, Balken: 10 mm

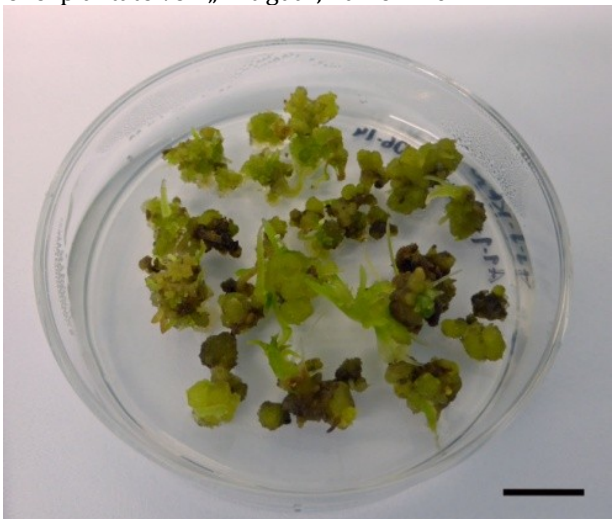


Abb. 6: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Kotyledonenkallus von „Antigua“, Balken: 10 mm

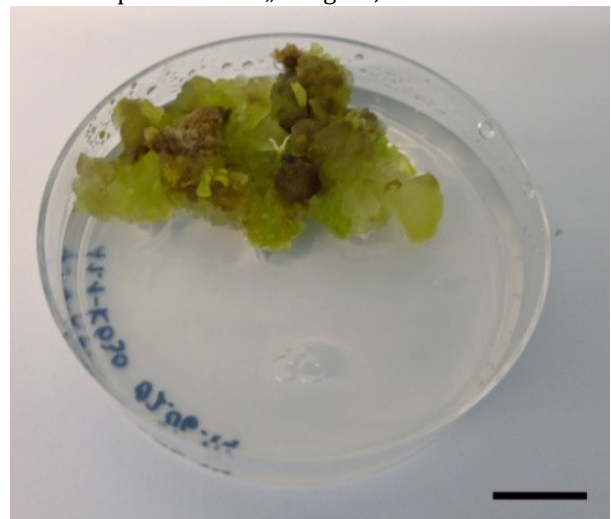


Abb. 7: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, lockerer Kotyledonenkallus von „Antigua“, Balken: 10 mm



Abb. 8: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Hypokotylkallus von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

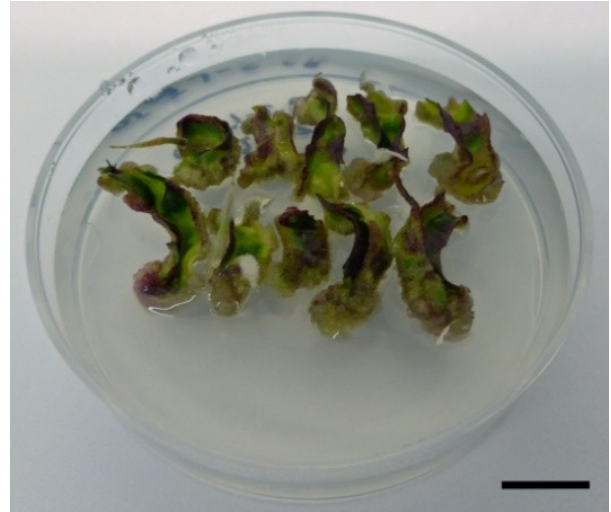


Abb. 9: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Laubblattexplantate von „Bianca“ mit Anthocyanbildung, Balken: 10 mm

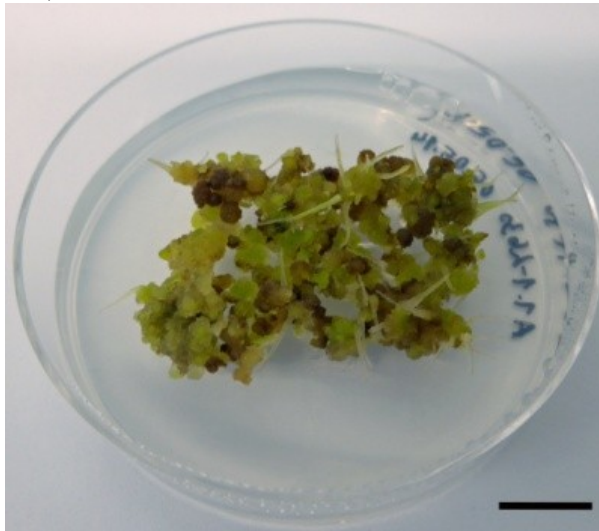


Abb. 10: Medium TK 630, Belichtungsvariante I, Laubblattkallus von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

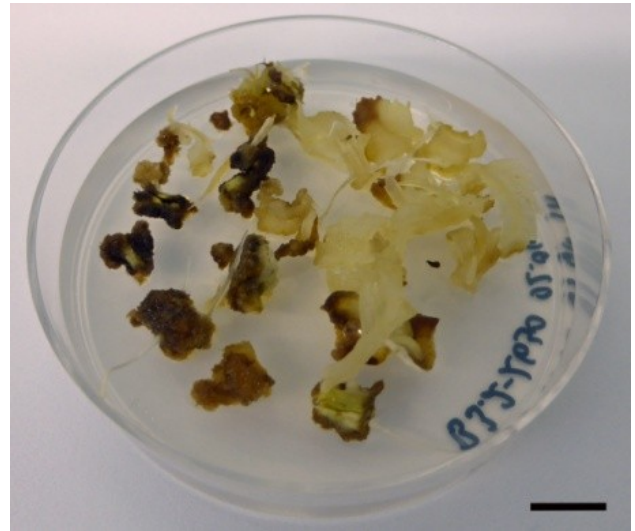


Abb. 11: Medium TK 630, Belichtungsvariante II, Petiolenkallus von „Bianca“ mit etiolierten Adventivsprossen, Balken: 10 mm

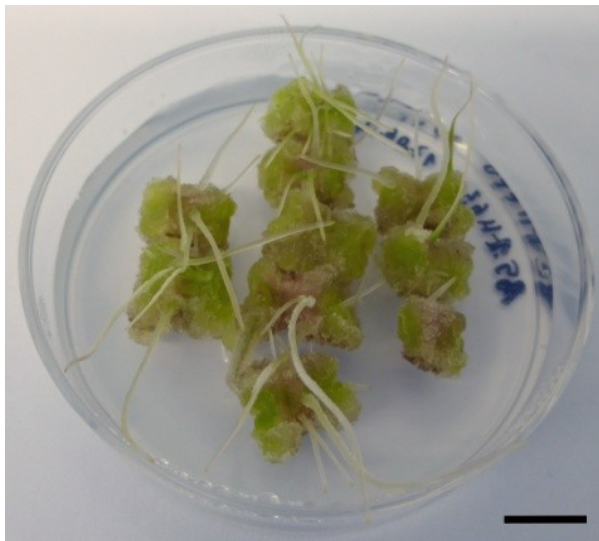


Abb. 12: Medium TK 630, Belichtungsvariante III, Hypokotylexplantate von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

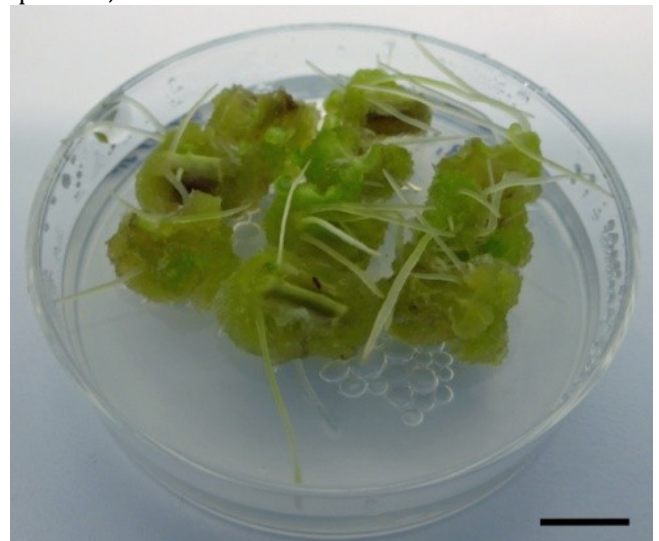


Abb. 13: Medium TK 630, Belichtungsvariante III, Petiolenexplantate von „Antigua“ mit Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

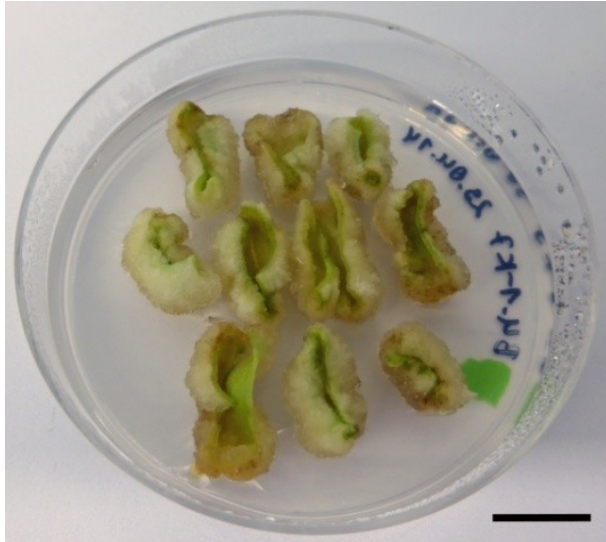


Abb. 14: Medium TK 7, Belichtungsvariante I, Kotyledonenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm



Abb. 15: Medium TK 7, Belichtungsvariante I, Hypokotylkallus von „Antigua“, Balken: 10 mm



Abb. 16: Medium TK 7, Belichtungsvariante I, verbräunte Petiolenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

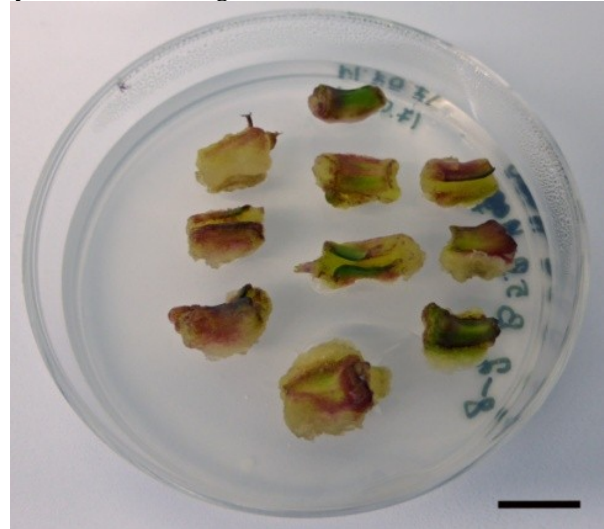


Abb. 17: Medium TK 7, Belichtungsvariante III, Petiolenexplantate von „Bianca“ mit Anthocyanbildung, Balken: 10 mm

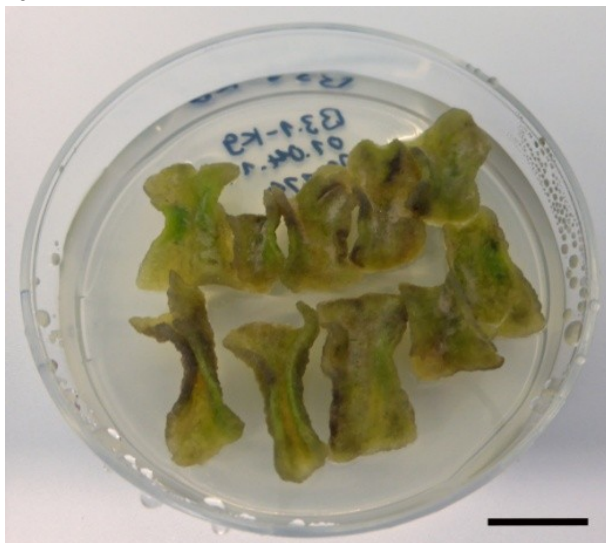


Abb. 18: Medium TK 9, Belichtungsvariante I, Kotyledonenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

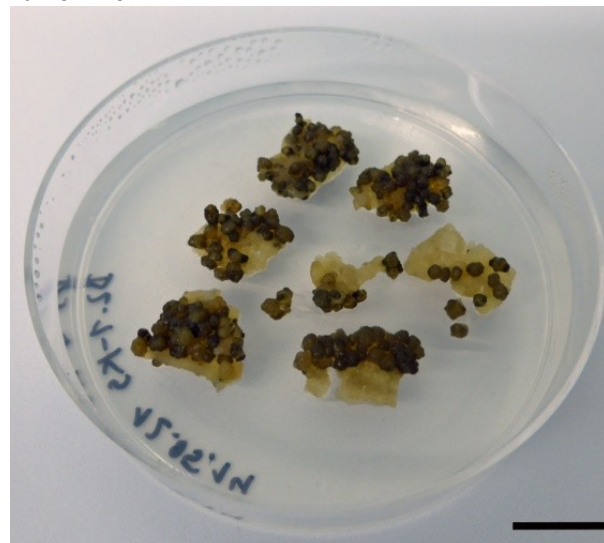


Abb. 19: Medium TK 9, Belichtungsvariante I, kallöse Strukturen an Kotyledonenexplantaten von „Bianca“, Balken: 10 mm

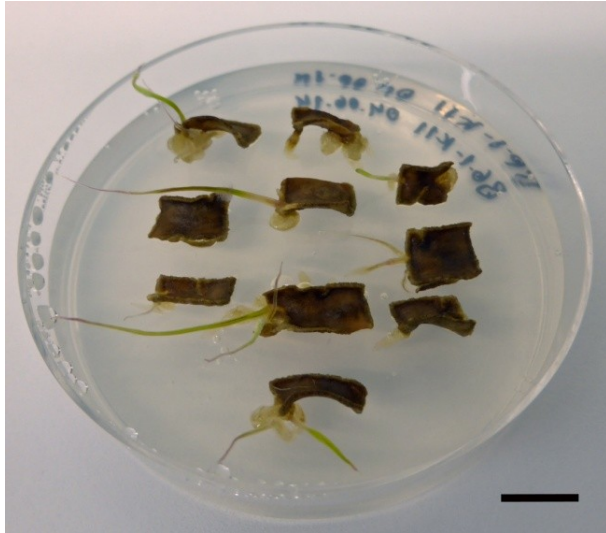


Abb. 20: Medium TK 11, Belichtungsvariante III, Kotyledonenexplantate von „Bianca“ mit Kallus und Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

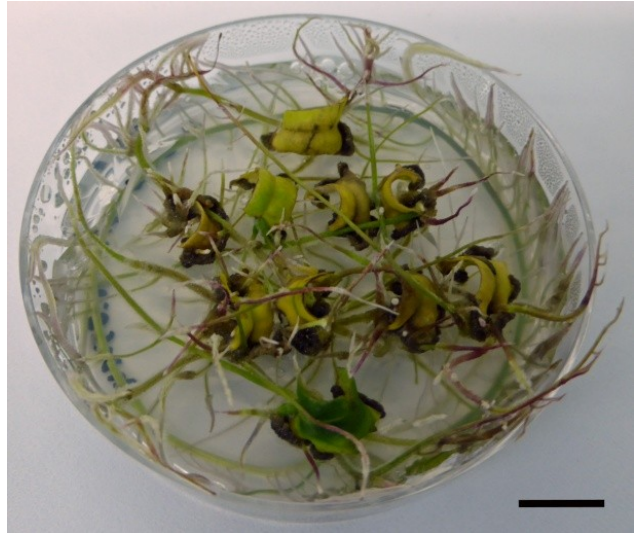


Abb. 21: Medium TK 11, Belichtungsvariante III, starke Adventivwurzelbildung an Laubblattexplantaten von „Bianca“, Balken: 10 mm

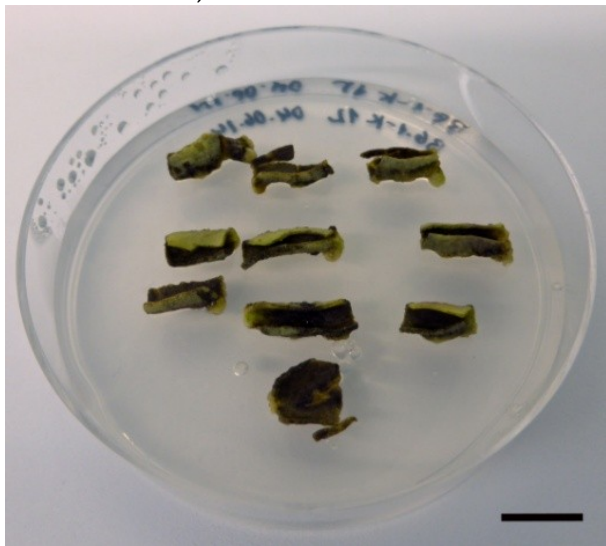


Abb. 22: Medium TK 12, Belichtungsvariante III, verbräunte Kotyledonenexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

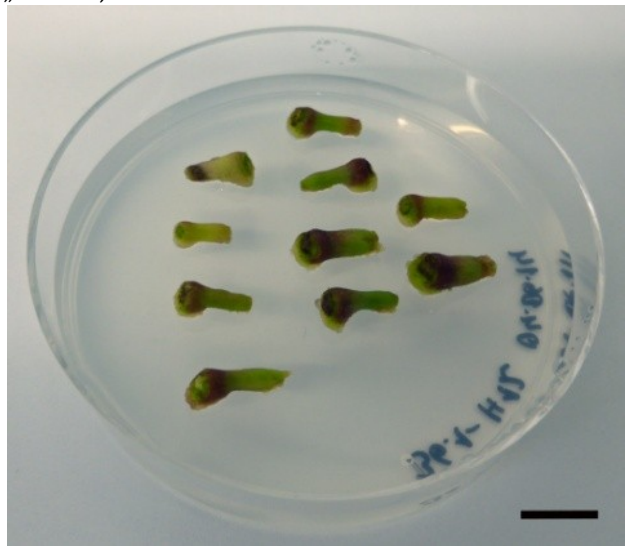


Abb. 23: Medium TK 12, Belichtungsvariante III, Hypokotylexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

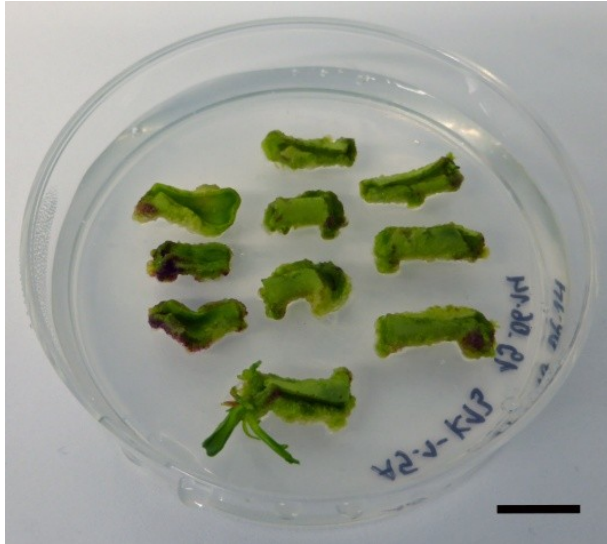


Abb. 24: Medium TK 13, Belichtungsvariante III, Kotyledonenexplantate von „Antigua“ mit Adventivprossbildung, Balken: 10 mm

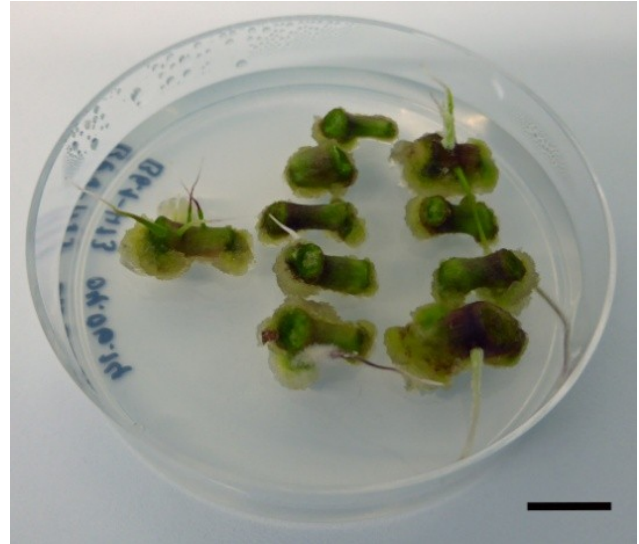


Abb. 25: Medium TK 13, Belichtungsvariante III, Hypokotylexplantate von „Bianca“ mit Kallus und Adventivwurzeln, Balken: 10 mm

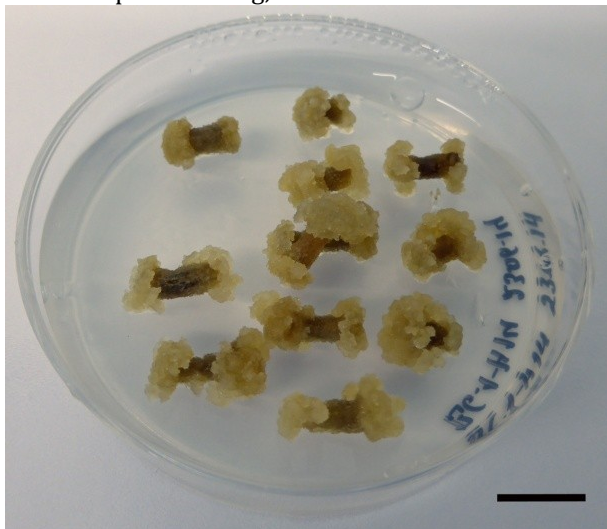


Abb. 26: Medium TK 14, Belichtungsvariante III, Kallus an Hypokotylexplantaten von „Bianca“, Balken: 10 mm

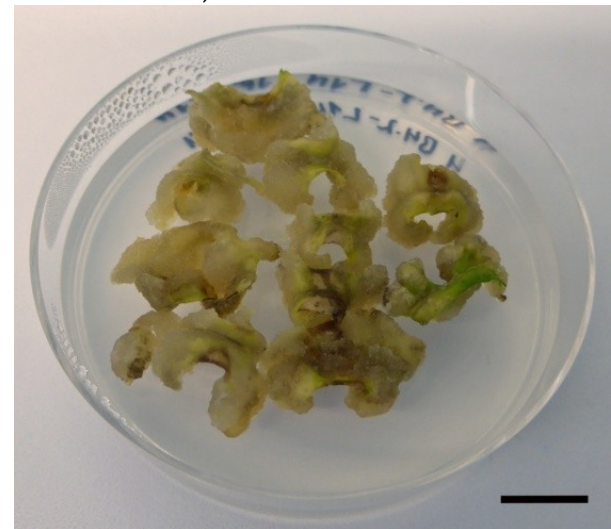


Abb. 27: Medium TK 14, Belichtungsvariante III, Laubblattexplantate von „Bianca“, Balken: 10 mm

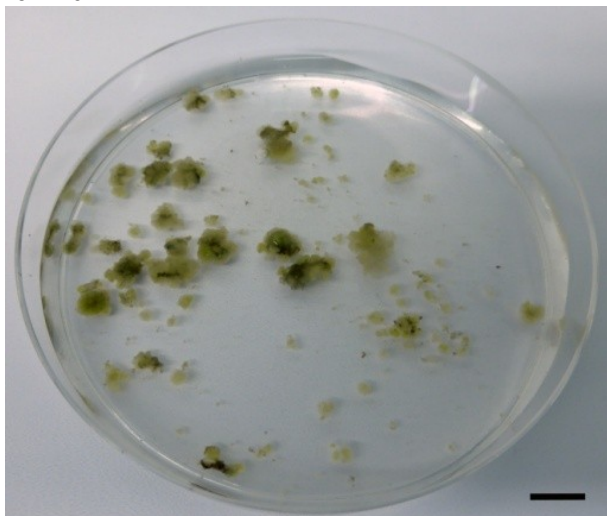


Abb. 28: Medium TS 630, lockerer Petiolenkallus von „Bianca“ in Suspension, Balken: 10 mm

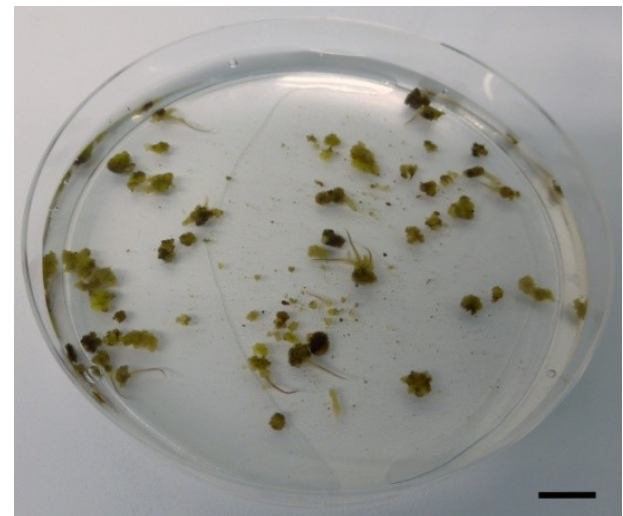


Abb. 29: Medium TS 7, Hypokotylkallus von „Antigua“ mit Adventivwurzeln in Suspension, Balken: 10 mm

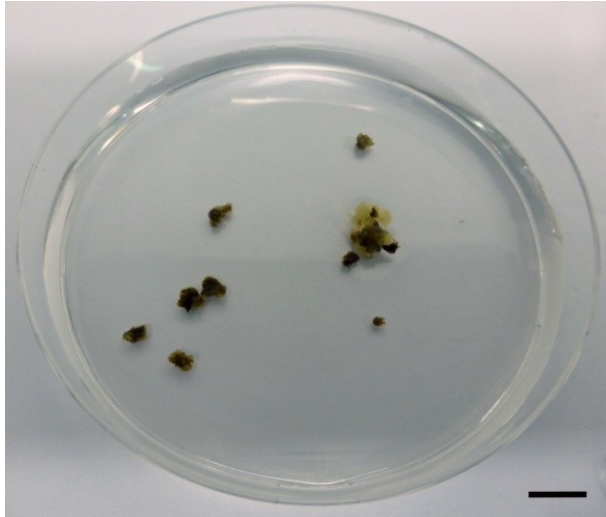


Abb. 30: Medium TS 7, lockerer Petiolenkallus von „Bianca“ in Suspension, Balken: 10 mm

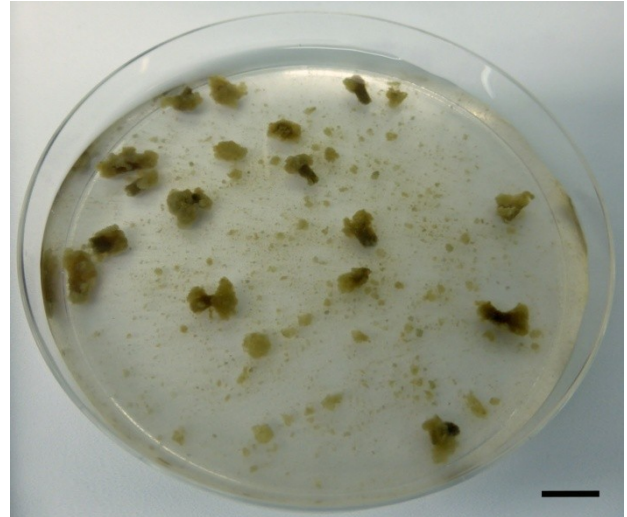


Abb. 31: Medium TS 14, Hypokotylkallus von „Bianca“ in Suspension, Balken: 10 mm

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, die Bachelorarbeit selbstständig und ausschließlich unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit noch nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

Annmarie-Deetja Rohr