

Matthias Schwaiger

EINIGE ASPEKTE
DER IN-VITRO
VERMEHRUNG VON
PFLANZEN

Berlin, 26.08.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	2
2	Gewebekulturtechniken	3
2.1	Meristemkultur.....	3
2.2	Organkultur.....	3
3	Nährmedien	4
3.1	Inhaltsstoffe der Nährmedien	5
3.2	Makronährstoffe.....	5
3.3	Mikronährstoffe.....	5
3.4	Zucker	5
3.5	Vitamine.....	5
3.6	Phytohormone.....	6
3.6.1	Auxine.....	6
3.6.2	Cytokinine.....	6
3.6.3	Gibberelline und Abscisinsäure	7
3.7	Agar.....	7
4	Literaturverzeichnis	8

1 EINLEITUNG

Bei der in-vitro Vermehrung wachsen einzelne Zellen bis hin zu ganzen Pflanzenteilen (Explantate) unter sterilen Bedingungen auf einem Nährmedium. Aus diesen werden anschließend neue und intakte Pflanzen generiert, die entweder als Mutterpflanzen für die nächste Generation dienen oder für die weitere Aufzucht an Gärtnereien ausgeliefert werden. Der entscheidende Vorteil dieser Vermehrungsart ist die hohe Vermehrungsrate. Aus einer Mutterpflanze können eine Vielzahl neuer Pflanzen gezogen werden. Darüber hinaus wachsen die Pflanzen unter sterilen Bedingungen auf. Eine Infektion durch Bakterien, Pilze und anderen unerwünschten Phytopatogene kann somit ausgeschlossen werden.

2 GEWEBEKULTURTECHNIKEN

Im Folgenden werden zwei wichtige Techniken aus dem großen Bereich der in-vitro Vermehrung vorgestellt.

2.1 MERISTEMKULTUR

Die Meristemkultur ist eine Pflanzenzellkultur, welche mit den Wachstumszonen der Pflanzen, den Meristemen, arbeitet (LINDL & GSTRANTHALER, 2008, S. 368). Die Meristeme können primär oder sekundär sein (Sprossspitze, Blattachselknospe). Die Meristemzellen befinden sich in der obersten Sprossspitze und sind noch nicht bzw. kaum ausdifferenziert. Es können daher aus ihnen noch alle Zellen und Gewebe generiert werden. Bei der Meristemkultur wird die noch geringe Differenzierung der Meristemzellen genutzt. Unter sterilen Bedingungen kann an einem isolierten Sprossvegetationspunkt die Weiterentwicklung zur Sprossachse und zur Wurzelbildung induziert werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Gewinnung von virusfreien Pflanzen. Zumeist ist die oberste Sprossspitze virusfrei, da die neu entstandenen Zellen der Sprossspitze noch nicht von Viren befallen wurden. Bei virusanfälligen Pflanzenarten ist die Meristemvermehrung häufig das einzige verfügbare Verfahren zur Gewinnung virusfreier Pflanzen. (NEUMANN, 1995, S.277)

2.2 ORGANKULTUR

Im Unterschied zur Meristemkultur werden der Mutterpflanze nicht nur einzelne meristematische Zellen sondern ganze Organe (Sprosse, Seitentriebe, Knospen etc.) entnommen, oberflächendesinfiziert und unter sterilen Bedingungen auf ein Nährmedium gebracht. Das Ausgangsmaterial sind entweder isolierte Sprossspitzen (Sprossspitzen-Technik) oder isolierte Einzelknoten (Einzelknoten-Technik). (HESS, 1992, S.37)

Auf diese Weise werden genetisch gleiche Pflanzen erzeugt. Die Gesamtheit der genetisch identischen Nachkommenschaft wird bei ganzen Organismen wie auch bei Zellen als Klon bezeichnet. Der Vorteil ist, dass alle erwünschten Eigenschaften der Mutterpflanze auf die Nachkommenschaft (Klone) übertragen werden.

3 NÄHRMEDIEN

Intakte höhere Pflanzen können grundsätzlich im Licht in der Normalatmosphäre bei ausreichender Wasser- und Nährstoffzufuhr wachsen. Dies gilt aber nicht für einzelne Organe und Gewebe. (NEUMANN, 1995, S.26)

In der in-vitro Kultur muss deshalb ein Nährmedium zur Verfügung gestellt werden. Jede Pflanze benötigt ein speziell für sie abgestimmtes Nährmedium. Dennoch gibt es einige Standardzusammensetzungen, die sich bei der Vermehrung von Pflanzen als erfolgreich erwiesen haben. Allen Nährmedien ist gemeinsam, dass sie dem Explantat die für das Wachstum benötigten Makro- und Mikronährstoffe, Vitamine und Phytohormone zur Verfügung stellen. Folgende Abbildung vergleicht die Inhaltstoffe und Zusammensetzung von zwei gängigen Medien.

	<i>MS*</i>	<i>NN**</i>
A. Mineralstoffe		
Makronährstoffe (g/l)		
KNO ₃	1,9	0,95
NH ₄ NO ₃	1,65	0,72
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,37	0,185
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,44	0,166
KH ₂ PO ₄	0,17	0,068
Mikronährstoffe (mg/l)		
MnSO ₄ *H ₂ O	16,9	25,0
H ₃ BO ₂	6,2	10,0
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	10,0
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	-
KJ	0,83	-
FeNaEDTA	36,7	36,7
B. Vitamine (mg/l)		
Nicotinsäure	50,0	5,0
Pyridoxin	50,0	0,50
Thiamin	10,0	0,50
Biotin	-	0,05
Folsäure	-	0,50
Glycin	2,0	2,0
myo-Inositol	100	-
C. Hormone (mg/l)		
Auxine (z.B.: IES, IBS)	0,1 - 3,0	0,1 - 3,0
Cytokinine(z.B.:BAP, Kin)	0,1 - 3,0	0,1 - 3,0
D. weitere Inhaltsstoffe		
Saccharose (g/l Nährlösung)	30	20
Agar	nach Bedarf	nach Bedarf

*MS: Murashige & Skoog (1962), **NN: Nitsch und Nitsch (1969)

(Quelle: verändert nach Neumann, 1995, S. 29ff)

3.1 INHALTSSTOFFE DER NÄHRMEDIEN

Die Zusammensetzung der Nährmedien ist einer der wichtigsten Faktoren um das Wachstum und den Habitus der Pflanze zu steuern.

3.2 MAKRONÄHRSTOFFE

Die Makronährstoffe beinhalten die Elemente Stickstoff (N), Phosphor (P), Kalium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg) und Schwefel (S). Alle diese Elemente sind in einer mehr oder weniger wichtigen Form am Pflanzenstoffwechsel beteiligt. Für schnelles und gesundes Pflanzenwachstum sind diese unabdingbar. Die optimale Konzentration, um bestmögliches Wachstum zu erreichen, ist sehr artabhängig. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.3 MIKRONÄHRSTOFFE

Die wichtigsten Mikronährstoffe sind Eisen (Fe), Mangan (Mn), Zink (Zn), Bor (B), Kupfer (Cu) und Molybdän (Mo). Eine zu geringe Konzentration oder das Fehlen einer dieser Elemente würde zu Mangelerscheinungen und zu Ertragseinbußen führen. Kobalt (Co) und Iod (I) wird einigen Medien ebenfalls beigefügt. Ihre positive Wirkung auf das Wachstum konnte aber bisher noch nicht eindeutig belegt werden. Natrium (Na) und Chlor (Cl) sind für das Wachstum nicht von Bedeutung. Dennoch werden sie einigen Nährmedien zugesetzt. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.4 ZUCKER

Pflanzen benötigen für ihren Stoffwechsel Kohlenstoff, den sie unter normalen Umständen aus der Luft entnehmen. In-vitro Pflanzen wachsen in steril verschlossenen Gefäßen. Sie können daher nicht auf den atmosphärischen Kohlenstoff als Quelle zurückgreifen. Folglich ist es nötig dem Nährmedium eine Kohlenstoffquelle beizufügen. Die bevorzugte Kohlenstoffquelle ist Zucker in Form von Saccharose. In manchen Fällen wird auch Glukose oder Fruktose verwendet. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.5 VITAMINE

Die für die Entwicklung und Wachstum benötigten Vitamine werden normalerweise von der Pflanze selbstständig synthetisiert. Vitamine

werden von der Pflanze als Katalysator für verschiedenste Stoffwechselprozesse benötigt. Die häufigsten Vitamine, die in der in-vitro Vermehrung verwendet werden sind Thiamin, Nikotinsäure, Pyridoxin und myo-Inositol. Thiamin wird hauptsächlich für das Zellwachstum benötigt. Nikotinsäure und Pyridoxin scheinen in den meisten Fällen keinen essentiellen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben. Dennoch werden sie oft dem Medium beigefügt. Myo-Inositol zählt streng genommen nicht zu den Vitaminen. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.6 PHYTOHORMONE

Der Einsatz von Phytohormonen in der in-vitro Vermehrung ist unumgänglich. Durch Phytohormone können bestimmte Prozesse wie zum Beispiel Wurzelbildung, Sprossbildung, Verzweigungen etc. gezielt gesteuert werden. Vier Phytohormone sind für die in-vitro Vermehrung von entscheidender Bedeutung; Auxine, Cytokinine, Gibberelline und Abscisinsäure. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.6.1 AUXINE

Für gewöhnlich werden als Auxine *1H-indole-3-acetic acid* (IAA), *1H-indole-3-butric acid* (IBA), *2,4-dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) und *1-naphtaleneacetic acid* (NAA) verwendet. Auxine regen das Zellwachstum, Sprosswachstum und Wurzelwachstum an. Entscheidend für die Wirkung und Art der Anregung ist hierbei die Konzentration und das Mengenverhältnis gegenüber anderen Phytohormonen. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.6.2 CYTOKININE

Die häufigsten verwendeten Cytokinine sind *6-benzylaminopurine* (BAP), *6-benzyladenine* (BA), *6- γ - γ -dimethylaminopurine* (2iP), *N-(2-furanylmethyl)-1H-puring-6-amine* (Kinetin) und *6-(4-hydroxy-3mehty-trans-2-butenylamino)purine* (Zeatin). Cytokinine sind im allgemeinen für die Zellteilung, Sprossausbildung und Knospenausbildung verantwortlich. Außerdem verhindern sie die Wurzelbildung. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.6.3 GIBBERELLINE UND ABSCISINSÄURE

Gibberelline (GA) und Abscisinsäure (ABA) sind im Vergleich zu den Auxinen und Cytokininen von geringerer Bedeutung. Sie werden nur gelegentlich in Nährmedien verwendet. In-vitro-Kulturen wachsen auch ohne Zugabe dieser Hormone. Für manche Pflanzen können sie aber sehr wohl zu einem stärkeren und schnelleren Wuchs beitragen. (PhytoTechnology Laboratories, Inc, 2003)

3.7 AGAR

Agar wird aus den Zellwänden einiger Algenarten hergestellt. In der in-vitro Vermehrung wird es als Gelierungsmittel für Nährlösungen eingesetzt. Da es sich um ein maritimes Naturprodukt handelt, können teilweise Salze enthalten sein. Auf die Nährstoffversorgung der Pflanze hat Agar keinen oder nur sehr geringen Einfluss.

4 LITERATURVERZEICHNIS

HESS, D. (1992). *Biotechnologie der Pflanzen*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer (UTB).

LINDL, T., & GSTRAUNTHALER, G. (2008). *Zell- und Gewebekultur* (6. Ausg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

NEUMANN, K. (1995). *Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer (UTB).

PhytoTechnology Laboratories, Inc. (2003): Product Information Sheet, *Tissue Culture Media-Composition*,
<http://www.phytotechlab.com/pdf/TissueCultureMediaComposition.pdf>,
Zugriff am 26.08.2011.