

---

# **BACHELOR- ARBEIT**

---

Frau  
**Charlotte Peiker**

**Etablierung der Methode der  
Kryokonservierung bei *Prunus*  
(Wildkirsche)**

Mittweida, 2022

Fakultät Angewandte Computer- und  
Biowissenschaften

---

## **BACHELORARBEIT**

---

# **Etablierung der Methode der Kryokonservierung bei *Prunus* (Wildkirsche)**

Autor:  
**Frau**

**Charlotte Peiker**

Studiengang:  
**Biotechnologie**

Seminargruppe:  
**BT18wU-B**

Erstprüfer:  
**Herr M. Sc. Dipl.-Ing. (FH) René Kretschmer**  
**Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers**

Zweitprüfer:  
**Frau Dr. rer. nat. Monika Höfer**

weitere Betreuer:  
-

Einreichung:  
**Mittweida, 30.01.2022**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2022**

**Bibliographische Beschreibung:**

Peiker, Charlotte: Etablierung der Methode der Kryokonservierung bei *Prunus* (Wildkirsche). - 2022. – Verzeichnisse: S. I - VII, Inhalt: S. 1 - 53, Anhang: S. 58 – 62, Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2022

**Englischer Titel**

Establishment of a method of cryopreservation for *Prunus* (wild cherry species)

### **Abstract:**

Because of the steady decline in biodiversity on Earth, due to external environmental factors, means must be found to preserve genetic diversity. The process of cryopreservation allows the genetic diversity of particular varieties and wild species to be preserved. Therefore, the method of cryopreservation by means of PVS2 vitrification is to be established at *Prunus* at the JKI in Dresden-Pillnitz. In parallel, the PVS3 method is considered at different incubation times and temperatures. Both PVS2 and PVS3 vitrification have not yet been applied to *Prunus* wild species in the JKI Dresden-Pillnitz. The regeneration rate of PVS2 vitrification was between 5 and 85%, which was achieved mainly after a cold treatment of three weeks. The tests carried out with the PVS3 method have not yet been successful.

### **Kurzbeschreibung:**

Durch die stetige Abnahme der Biodiversität auf der Erde, aufgrund von äußeren Umweltfaktoren, müssen Möglichkeiten zur Erhaltung der genetischen Vielfalt gefunden werden. Mit Hilfe des Verfahrens der Kryokonservierung kann die genetische Vielfalt von besonderen Sorten und Wildarten erhalten werden. Aufgrund dessen soll die Methode der Kryokonservierung mittels PVS2-Vitrifikation bei *Prunus* am JKI in Dresden-Pillnitz etabliert werden. Parallel dazu wird die PVS3-Methode bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen betrachtet. Sowohl die PVS2- als auch die PVS3-Vitrifikation wurden noch nicht bei *Prunus*-Wildarten im JKI Dresden-Pillnitz angewendet. Die Regenerationsrate der PVS2-Vitrifikation betrug zwischen 5 und 85 %, welche überwiegend nach einer Kälteadaptation von drei Wochen erreicht wurde. Die durchgeführten Versuche mit der PVS3-Methode erbrachten noch keinen Erfolg.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Frau Dr. Monika Höfer für Ihre Betreuung und die Möglichkeit, am Julius Kühn-Institut zu forschen, bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Katrin Winkler und Frau Ute Sonntag für Ihre Unterstützung und Einführung in die Arbeiten in der Genbank.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Nationale und internationale Bestimmungen.....	1
1.2 <i>Prunus</i> .....	1
1.2.1 <i>Prunus canescens</i> (PRU0037, PRU0088) .....	2
1.2.2 ( <i>Prunus pseudocerasus</i> ) × ( <i>Prunus canescens</i> × <i>Prunus incisa</i> ) (PRU0027) .....	3
1.2.3 <i>Prunus tomentosa</i> (PRU0135).....	4
1.3 Erhaltungsformen an dem Julius Kühn-Institut.....	5
1.3.1 Aktivsammlung.....	9
1.3.2 In-vitro Erhaltung .....	9
1.4 Kryokonservierung .....	11
1.4.1 Gefrierschutzmittel .....	13
1.4.2 Kälteadaption.....	13
1.4.3 Vorkultur.....	14
1.4.4 Vitrifikation .....	14
1.4.5 Langsames Gefrieren / Slow cooling.....	15
1.4.6 Verkapselte Dehydration .....	15
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>16</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>17</b>
3.1 Pflanzenmaterial .....	17
3.2 Chemikalien.....	17
3.3 Fertigmedium und hergestellte Vermehrungsmedien.....	18
3.4 Verbrauchsmaterial.....	20
3.5 Geräte.....	21
<b>4 Methoden .....</b>	<b>22</b>
4.1 Kultivierung und Vermehrung der in-vitro Sprosskulturen.....	22
4.2 Kälteadaption der Sprosskulturen für die Kryokonservierung und Isolation der Sprossspitzen .....	24

4.3 Kryokonservierung der Sprossspitzen .....	26
4.4 Auslagerung der Sprossspitzen aus der Kryokonservierung .....	27
4.5 Bonituren .....	29
4.6 Statistik .....	29
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
5.1 Ergebnisse PRU0037 .....	30
5.1.1 Präparationskontrolle .....	30
5.1.2 PVS2-Methode .....	30
5.2 Ergebnisse PRU0088 .....	31
5.2.1 Präparationskontrolle .....	31
5.2.2 PVS2-Methode .....	31
5.3 Ergebnisse PRU0027 .....	33
5.3.1 Präparationskontrolle .....	33
5.3.2 PVS2-Methode .....	34
5.4 Ergebnisse PRU0135 .....	35
5.4.1 Präparationskontrolle .....	35
5.4.2 PVS2-Methode .....	35
5.4.3 PVS3-Methode .....	37
5.5 Zusammenfassende Ergebnisse der PVS2-Vitrifikation aller Akzessionen .....	39
5.6 Hyperhydrizität .....	40
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>42</b>
6.1 PVS2-Methode .....	42
6.1.1 Kälteadaption .....	43
6.1.2 Medium mit 5 % DMSO .....	44
6.1.3 Einwirkzeiten von Loading solution, PVS2 und Unloading solution .....	44
6.2 PVS-3-Methode .....	45
6.3 Hyperhydrizität .....	46
<b>7 Ausblick .....</b>	<b>48</b>
7.1 PVS-2-Versuche .....	48
7.2 PVS-3-Versuche .....	49
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>9 Summary .....</b>	<b>52</b>

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>58</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>63</b>



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: PRU0037 Baum in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021 .....	2
Abbildung 2: PRU0088 Baum in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021 .....	3
Abbildung 3: PRU0027 Baum in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021 .....	4
Abbildung 4: PRU0135 Strauch in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021 .....	5
Abbildung 5: Schema zu Erhaltungsformen im JKI [Höfer et al., 2020] .....	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Vitrifikation mit PVS2 und PVS3 bei <i>Prunus</i> .....	22
Abbildung 7: In-vitro Kulturenraum im JKI .....	23
Abbildung 8: Klimaschrank für Kälteadaption im JKI .....	24
Abbildung 9: Spross von PRU0027, Markierung zeigt ungefähren Standort von Sprossspitze, aufgenommen am 06.01.2022 mit Mikroskop SMZ800, bearbeitet mit CombineZP und Paint .....	25
Abbildung 10: Isolierte Sprossspitze mit Meristem und einem Hüllblattpaar, aufgenommen am 06.01.2022 mit Mikroskop SMZ800, bearbeitet mit Paint .....	25
Abbildung 11: Kryoröhrchen mit Sprossspitzen von PRU0027 in PVS2-Lösung .....	26
Abbildung 12: Kryoröhrchen in Fach für den Turm des Stickstofftanks .....	27
Abbildung 13: Sprossspitzen nach der Kryokonservierung auf neuem Nährmedium....	28
Abbildung 14: Gegenüberstellung von brauner (A), grüner (B) und regenerierter Sprossspitze (C), 7-fache Vergrößerung .....	29
Abbildung 15: Regenerationsrate von PRU0037 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen .....	30
Abbildung 16: Regenerationsrate von PRU0088 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen .....	32
Abbildung 17: Regenerationsrate der Präparationskontrolle von PRU0027 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit bei 10 verwendete Sprossspitzen .....	33

Abbildung 18: Regenerationsrate von PRU0027 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen.....	34
Abbildung 19: Regenerationsrate von PRU0135 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen.....	36
Abbildung 20: Grüne Sprossspitzen des PVS3-Versuches mit Inkubationszeit von 2,5 h bei Raumtemperatur und einer Einwirkzeit der Unloading solution von 30 Minuten bei der ersten Bonitur .....	39
Abbildung 21: Gegenüberstellung einer regenerierten Sprossspitze (A) und einer Sprossspitze mit Hyperhydrität im Verlauf der Regeneration nach Kryokonservierung (B).....	40

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Hormongruppen und ihre Eigenschaften auf die Pflanze [Kadereit et al., 2014] .....	10
Tabelle 2: Vergleich der Inhaltsstoffe von PVS2 und PVS3 [Wang et al., 2020].....	14
Tabelle 3: Verwendete Wildarten mit Akzessionsnummer und in-vitro Vermehrungsmedium.....	17
Tabelle 4: Liste der in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Herstellerfirmen.....	17
Tabelle 5: Liste der in der Arbeit verwendeten Materialien und Herstellerfirmen.....	20
Tabelle 6: Liste der in der Arbeit benutzten Geräte und Herstellerfirmen .....	21
Tabelle 7: Übersicht über die verschiedenen Versuchsdurchführungen der PVS3-Versuche .....	27
Tabelle 8: Bonitur von PRU0037, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen .....	31
Tabelle 9: Bonitur von PRU0088, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen .....	32
Tabelle 10: Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen der Präparationskontrolle von PRU0027 .....	34
Tabelle 11: Bonitur von PRU0027, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen .....	35
Tabelle 12: Bonitur der PVS2-Versuche von PRU0135, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen .....	36
Tabelle 13: Bonitur der PVS3-Versuche von PRU0135, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen .....	38
Tabelle 14: Zusammenfassende Ergebnisse der PVS2-Vitrifikation aller Akzessionen	40
Tabelle 15: Ausblick über Optimierungen der einzelnen Versuchsabschnitte von den PVS2-Versuchen.....	48
Tabelle 16: Literaturtabelle 1 .....	58
Tabelle 17: Literaturtabelle 2.....	59
Tabelle 18: Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Versuche .....	60
Tabelle 19: Zeitlicher Ablauf und Werte der ersten und zweiten Bonitur.....	61
Tabelle 20: Zeitlicher Ablauf und Werte der dritten und vierten Bonitur .....	62

**Abkürzungsverzeichnis**

Akzessionsnr.	Akzessionsnummer
Anz.	Anzahl
DGO	Deutsche Genbank Obst
JKI	Julius Kühn-Institut
Kryokons.	Kryokonservierung
Kälteadaptionswo.	Kälteadaptionswochen
L.	Linnaeus (Carl von Linné)
LN	liquid nitrate, Flüssigstickstoff
<i>P.</i>	<i>Prunus</i>
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvenylpyrrolidon
PVS2/PVS3	Plant vitrification solution 2/3
RT	Raumtemperatur
UNCED	United Nations Conference on Environment and Development
Unload.	Unloading solution
var.	Varietät
Wo.	Wochen

## **1 Einleitung**

### **1.1 Nationale und internationale Bestimmungen**

Die Biodiversität nimmt stetig auf der Erde ab [Alscher et al., 2015]. Durch direkte als auch indirekte anthropogene Einflüsse wird in globale Kreisläufe eingegriffen und somit Veränderungen begünstigt. Der Begriff Biodiversität bezeichnet hierbei die Gesamtheit und Variabilität von Populationen, Arten, Ökosystemen und Genen [Thanheiser, 2007]. Die Gefährdung der Biodiversität wurde, unter anderem, auch auf der UNCED (*United Nations Conference on Environment and Development*) von Rio de Janeiro im Jahre 1992 aufgegriffen und diskutiert. Im Rahmen dessen wurde anschließend eine Biodiversitätskonvention ausgehandelt [Thanheiser, 2007]. Ziele dieser Biodiversitätskonvention sind die Erhaltung der biologischen Vielfalt der Arten, deren genetische Vielfalt und der Ökosysteme, die nachhaltige Nutzung ihrer Bestandteile und die ausgewogene und gerechte Verteilung der Vorteile, die aus der Nutzung der genetischen Ressourcen resultieren [Berger, 2013].

Deshalb kommt der Erhaltung der Biodiversität bei Pflanzen große Bedeutung zu, einen wesentlichen Teil stellen die Obstsorten dar, die für die Zukunft erhalten werden müssen. Dabei spielen besonders alte Sorten, welche über 100 Jahre Bestand haben, eine wichtige Rolle. Sorten der Gattungen Kirsche (*Prunus*), Apfel (*Malus*), Birne (*Pyrus*), Erdbeere (*Fragaria*) und einzelne Arten von anderen Gattungen, wie zum Beispiel Eberesche (*Sorbus*) [Lieberei et al., 2012], werden in der „Deutschen Genbank Obst“ (DGO), mit der Koordinationsstelle am Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Züchtungsforschung an Obst, in Dresden-Pillnitz und weiteren Partnern, gesammelt [Höfer et al., 2020]. Ziel dieser Genbank ist die Erhaltung, Nutzung, Erforschung und Entwicklung genetischer Ressourcen im Bereich der Kulturpflanzen, speziell im Bereich des Obstes [Höfer, 2007].

### **1.2 *Prunus***

Zur Gattung *Prunus* gehören Pfirsich (*Prunus persica* (L.) BATSCH), Pflaume (*Prunus* × *domestica* L.), Aprikose (*Prunus armeniaca* L.), Schlehe (*Prunus spinosa* L.), Kirschpflaume (*Prunus cerasifera* EHRH.), Traubenkirsche (*Prunus padus* L.), Mandel (*Prunus dulcis*), Süßkirsche (*Prunus avium* (L.) L.) und Sauerkirsche (*Prunus cerasus* L.)

[Lieberei et al., 2012] und andere. Die Früchte aller *Prunus*-Arten werden als Steinfrüchte bezeichnet und aufgrund dessen „Steinobst“ genannt [Bärtels, 2017].

Die Gattung *Prunus* gehört zu der Familie der *Rosaceae* und deren Unterfamilie der *Prunoideae*. Diese Unterfamilie ist jedoch veraltet und wird heute im Tribus *Amygdaleae* als Unterfamilie der *Spiraeoideae* beschrieben [Lieberei et al., 2012].

*Prunus* umfasst über 200 Arten, welche in weiten Teilen der borealen, meridionalen und nemoralen Zonen auffindbar sind. Davon sind ca. 15 *Prunus*-Arten in Europa anzutreffen, wovon schätzungsweise sechs bis sieben Arten aus Europa stammen. Die restlichen Arten stammen aus Westasien [Bärtels, 2017].

In dieser Arbeit werden ein vier Wildarten der Gattung *Prunus* in die Untersuchungen einbezogen (1.2.1 – 1.2.3).

### 1.2.1 *Prunus canescens* (PRU0037, PRU0088)

Die beiden verwendeten Akzessionen besitzen im JKI die Akzessionsnummern PRU0037 und PRU0088 und gehören beide der Art *Prunus canescens* an.

*Prunus canescens* ist in China beheimatet und wird „Graublättrige Kirsche“ genannt. Sie kann eine Höhe von bis zu 12 m erreichen und besitzt eine glatte, dunkel mahagonibraune Rinde. Ihre zwischen 5-8 cm großen Blätter sind länglich-elliptisch geformt und am Blattrand unregelmäßig gesägt [Bärtels, 2017]. In der Abbildung 1 sind links der Baum und rechts die Blätter der Akzessionsnummer PRU0037 zu sehen.



Abbildung 1: PRU0037 Baum in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021

Die Abbildung 2 zeigt die Akzessionsnummer PRU0088 mit dem Baum (rechts abgebildet) und den Blättern (links abgebildet).



Abbildung 2: PRU0088 Baum in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021

Bei beiden Abbildungen sind deutliche Ähnlichkeiten in Form und Größe, sowohl in der Morphologie der Bäume als auch bei den Blättern, ersichtlich.

### 1.2.2 (*Prunus pseudocerasus*) × (*Prunus canescens* × *Prunus incisa*) (PRU0027)

Bei dieser *Prunus*-Art handelt es sich um einen Hybriden aus *Prunus pseudocerasus* und einem weiteren Hybriden aus *Prunus canescens* und *Prunus incisa*. Diese Art besitzt im JKI die Akzessionsnummer PRU0027.

Bei *Prunus pseudocerasus* handelt es sich um die Ying-Tao-Kirsche. Sie ist in China beheimatet, wo sie eine Höhe von zwischen 2 bis 8 m erreichen kann und ihre Rinde eine grauweiße bis rötlich braune Farbe besitzt. Ihre Triebe sind kahl oder behaart und besitzen an ihrem Ende eine Endknospe und 5-12 cm lange, elliptische Blätter. Die Blattränder sind eingeschnitten oder doppelt gesägt. Die weißen Blüten dieser *Prunus*-Art öffnen sich zwischen den Monaten März und April, und nach ihrer Bestäubung reifen 0,9 bis 1,3 cm große Früchte im Mai oder Juni [Bärtels, 2017].

Details über die Art *Prunus canescens* können im vorherigen Abschnitt 1.2.1 nachgelesen werden.

*Prunus incisa*, auch Fuji-Kirsche genannt, besitzt ihre Heimat in Mitteljapan, wo sie grobkörnige vulkanische Böden besiedelt. Der Baum besitzt viele Verzweigungen und

wird in der Regel 3 bis 5 m hoch. Sie besitzt 3,5 bis 5 cm lange, eiförmige Blätter, welche an ihrem Blattrand eingeschnitten und doppelt gesägt sind. Im März und April blüht *Prunus incisa* und besitzt in dieser Zeit weiße bis hellrosa Blüten. Nach der Bestäubung reifen 6 bis 8 cm lange, eiförmig-kugelige Früchte heran [Bärtels, 2017].

In der Abbildung 3 ist dieser Wildarten-Hybrid zu sehen. Links ist der Baum von PRU0027 und rechts die Blätter dieser Wildart abgebildet.



**Abbildung 3: PRU0027 Baum in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021**

Dieser Hybrid besitzt vereinzelte Merkmale dieser unterschiedlichen Arten. Der Baum in der Abbildung zeigt eine grauweiße Rinde, viele Verzweigungen und kahle Äste. An den Ästen befinden sich elliptische Blätter, welche eingeschnitten und doppelt gesägt sind.

### **1.2.3 *Prunus tomentosa* (PRU0135)**

*Prunus tomentosa* besitzt im JKI die Akzessionsnummer PRU0135. Sie wird auch als „Japanische Mandelkirsche“ bezeichnet und in Japan „Yusura-Ume“ genannt. Sie kommt hauptsächlich im Himalaya, Korea und den nord- und westchinesischen Provinzen in Wäldern, an Waldrändern, Berghängen und im offenen Grasland vor. Diese Akzession gehört zu den sehr früh blühenden *Prunus*-Arten und beginnt bereits im März ihre Blüten zu öffnen. Es handelt sich dabei nicht um einen Baum, wie bei den vorherigen Arten, sondern um einen sehr breiten und aufrecht wachsenden Strauch, welcher eine Wuchshöhe von zwei bis drei Metern erreichen kann [Bärtels, 2017].





**Abbildung 4: PRU0135 Strauch in der Genbank (links) und Zweig mit Blättern (rechts), aufgenommen am 25.08.2021**

Wie in der Abbildung zu erkennen, besitzt *Prunus tomentosa* 2-7 cm große, eiförmig-elliptisch und spitz zulaufende Blätter. Des Weiteren sind sie am Blattrand grob gesägt und besitzen auf ihrer Oberseite eine dunkelgrüne Farbe. Sowohl Die Unterseite der Blätter als auch die graubraunen Zweige sind filzig behaart. Nach der Blütenöffnung im März und der anschließenden Bestäubung, reifen ab Juni die ersten Früchte heran. Sie sind rot, nahezu kugelförmig, sauer und besitzen eine Größe von 5-12 mm

### **1.3 Erhaltungsformen an dem Julius Kühn-Institut**

An dem Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an Obst in Dresden-Pillnitz werden sowohl Sorten als auch Wildarten-Akzessionen in der Obstgenbank erhalten. Eine Genbank dient zur Sammlung und Erhaltung von genetischen Ressourcen, insbesondere derer von Kulturpflanzen und deren Wildarten, um zur Erhaltung der Diversität beizutragen. Es existieren weltweit verschiedenste Genbanken. Die größte Genbank in Deutschland besitzt das Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben. Dort wird der größte Teil des Saatgutes in speziellen Kühlräumen bei Temperaturen von -18 °C gelagert. Das *Global Seed Vault* auf Spitzbergen, siehe Abbildung 5, verfolgt das gleiche Ziel. Hier lagern die weltweit wichtigsten, und für die Landwirtschaft nützlichsten, genetischen Ressourcen von Kulturpflanzen. Das Saatgut wird, wie im IPK in Gatersleben, bei Temperaturen von

-18 °C gelagert. Eine Besonderheit an dem *Global Seed Vault* ist der Standort. Es liegt 100 Meter tief in einem Berg und zusätzlich auf Permafrostboden mit konstanten Temperaturen von -3 bis -4 °C, ungeachtet dessen ist eine zusätzliche Kühlung notwendig, um die geforderte konstante Temperatur von -18 °C zu erreichen [Höfer et al., 2020].

Das JKI in Dresden-Pillnitz besitzt keine Obstgenbank, um Saatgut, sondern um Kulturpflanzensorten und Wildarten-Akzessionen ex-situ als Aktivsammlung zu erhalten. Obstsorten und deren Wildarten-Akzessionen werden vegetativ vermehrt, um deren genetische Integrität zu erhalten.

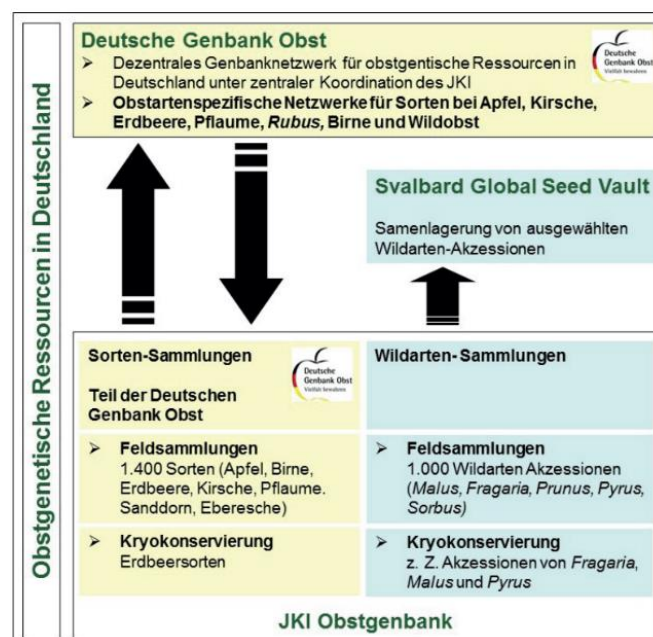


Abbildung 5: Schema zu Erhaltungsförm im JKI [Höfer et al., 2020]

Die Deutsche Genbank Obst (DGO) wurde im Jahre 2009 gegründet und bildet, wie in der Abbildung 5 zu sehen, ein nationales und dezentrales Netzwerk, um die Sortensammlungen bei Obst in Deutschland nachhaltig und effizient zu erhalten. Sie besitzt ihre Koordinationsstelle am JKI in Dresden-Pillnitz. Das Ziel der DGO ist es, die deutschen Sorten und Sorten mit soziokulturellem und historischem Bezug in Deutschland, an mindestens zwei verschiedenen Standorten in Deutschland zu sichern [Höfer et al., 2020].

Da die DGO zur Erhaltung von Sorten dient, wie in Abbildung 5 dargestellt, besitzt das JKI in Dresden-Pillnitz noch weitere Möglichkeiten, um die Wildartensammlungen zu sichern.

### **1.3.1 Aktivsammlung**

Die Wildarten-Akzessionen der Wildartensammlung sind als permanente Feldsammlung, sogenannte Aktivsammlung, angelegt, was eine Form der Ex-situ-Sammlung ist. [Höfer et al., 2020].

Die Obstsorten und Wildarten-Akzessionen werden dabei mit jeweils zwei Bäumen in der Genbank erhalten [Höfer, 2007]. Durch die Erhaltung aufgrund von vegetativer Vermehrung, ist diese Erhaltungsmethode sehr arbeitsaufwendig, jedoch stellt diese Methode permanent Ausgangsmaterial für den Austausch, die Obstzüchtung und die Evaluierung zur Verfügung. Allerdings sind diese Aktivsammlungen ständigen biotischen- und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Dies kann zu Verlusten der genetischen Ressourcen in dieser Aktivsammlung führen. Aufgrund dessen ist es von Nöten sogenannte Duplikatsammlungen anzulegen [Höfer et al., 2020].

Zu Sicherungszwecken befinden sich diese Duplikatsammlungen an einem anderen Standort.

### **1.3.2 In-vitro Erhaltung**

Eine Möglichkeit einer Duplikatsammlung ist die Erhaltung mittels in-vitro-Kulturen. Ausgangsmaterial hierfür sind die Sprossspitzen der Baum- und Strauchobstarten. Diese Sprossspitzen besitzen wenig Blätter, jedoch enthalten sie laterale und terminale Knospen in den Blattachsen. Die Ausgangspflanzen sollten im besten Falle in einer möglichst keimarmen Umgebung aufgewachsen sein, beispielsweise einem Gewächshaus, und sich in einem wüchsigen Zustand befunden haben, bevor die vegetativen Knospen entnommen werden. Bei Apfelsorten werden beispielsweise während der Ruhephase, im Winter, Zweige mit vegetativen Knospen entnommen und bei Raumtemperatur vorgetrieben. Bei Erdbeersorten werden jedoch im Juni die Sprossspitzen von den Stolonen entnommen [Hanke et al., 2017].

Nach dem Vortreiben der Knospen werden aseptische Kulturen etabliert. Hierfür sind die vegetativen Knospen oder Sprossspitzen am besten geeignet, da Meristeme benötigt werden. Sie werden entnommen, in Wasser und Desinfektionsmittel gespült, um Pathogene abzutöten, und anschließend werden die Sprossspitzen isoliert. Diese werden im Anschluss auf ein Nährmedium transferiert. Bei Obstbaumarten besteht jedoch immer die Gefahr, dass das Pflanzenmaterial vernichtet wird, da sie phenolische Substanzen

absondern. Aufgrund dessen müssen die Sprossspitzen nach kurzer Zeit innerhalb des Mediums umgesetzt werden [Hanke et al., 2017].

Die Zusammensetzung des Nährmediums, auf welchem sich die Sprossspitzen befinden, ist außerordentlich wichtig für die Weiterverwendung des Pflanzenmaterials. Das Nährmedium muss eine Stickstoffquelle (N-Quelle), eine Kohlenstoffquelle (C-Quelle), Vitamine, Spurenelemente und Hormone enthalten [Schmid, 2016]. Bei den Hormonen kann zwischen fünf Gruppen, wie in Tabelle 1 zu erkennen, unterschieden werden, wobei jede Gruppe eine andere Auswirkung auf das Wachstum der Pflanze hat.

**Tabelle 1: Hormongruppen und ihre Eigenschaften auf die Pflanze [Kadereit et al., 2014]**

<b>Hormongruppe</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Vertreter</b>
<u>Auxine</u>	Förderung des Streckenwachstums von Zellen und des Längenwachstums von Spross und Wurzel	Indol-3-essigsäure (IAA), Indol-3-buttersäure (IBA)
<u>Cytokinine</u>	Zellteilungsfördernd, Regeneration von Wurzeln, Verzögerung von Alterungsprozessen (z.B. in Blättern), starke Wechselwirkung mit Auxinen	N <sup>6</sup> -Isopentenyladenin (IPA), Benzylaminopurin (BAP)
<u>Gibberelline</u>	Förderung des Internodienwachstums und des Blütenwachstums	Gibberellin A <sub>1</sub> (GA <sub>1</sub> ), Gibberellin A <sub>4</sub> (GA <sub>4</sub> ), Gibberellinsäure (GA <sub>3</sub> )
<u>Abscisinsäure</u>	Begünstigung von Blatt- und Fruchtabwurf (nachteilig), Auslösen von Dormanz (Ruhezustand), Regulation des Wasserhaushalts	Abscisinsäure (ABA)

<u>Ethylen</u>	Hemmung des Wurzel- und Streckungswachstums	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC)
----------------	---	--

Die Auxine, Cytokinine und/oder Gibberelline sind üblicherweise in Nährmedien enthalten, wobei die Konzentrationen sehr variabel sind.

Die Hormone initiieren verschiedene Zellteilungs- und Wachstumsprozesse in dem Meristem und bewirken die Bildung von Axillarsprossen und die Bildung von neuen Sprossen. Durch den Verbrauch der im Medium enthaltenen Nährstoffe, benötigen die Sprosse nach einer gewissen Zeit frisches Medium und die Teilung der gebildeten Sprossbüschel. Der Prozess des Mediumwechsels kann beliebig oft wiederholt werden, bis genügend Pflanzenmaterial zur Verfügung steht, um diese für andere Versuche zu verwenden oder um sie anschließend zu bewurzeln und in die natürliche Umwelt zu überführen [Hanke et al., 2017]. Bei der in-vitro Erhaltung werden die Sprosse auf dem Medium erhalten. Dieser Prozess ist jedoch sehr aufwendig, da ständig darauf geachtet werden muss, dass die Sprosse frische Nährstoffe bekommen und vor Kontaminationen geschützt werden [Reed, 2000]. Alternativ kann die in-vitro Erhaltung in einem sogenannten Depot durchgeführt werden. Hier werden die Stoffwechselprozesse der Pflanze herabgesetzt, indem sie bei 4 °C, auf nährstoffärmerem Medium und unter geringem Licht gelagert werden. Die Lagerdauer hängt hierbei von dem Genotypen und den gewählten Kulturbedingungen ab [Höfer et al., 2011].

#### **1.4 Kryokonservierung**

Eine andere Möglichkeit, um eine Dublikatsammlung zu führen, ist mittels der Kryokonservierung.

Der Begriff „Kryo“ leitet sich von dem griechischen Wort „*Kryos*“ ab und bedeutet im Deutschen „Kälte“ [Schmitz, 2020]. Die Methode der Kryokonservierung dient zur Langzeitlagerung von Pflanzengeweben und -zellen. Hierbei können unterschiedliche Teile der Pflanze genutzt werden, wie zum Beispiel Pollen, Wurzelspitzen, dormante Knospen und Meristemgewebe [Reed, 2008].

Das Pflanzengewebe wird bei dieser Methode in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196 °C und unter Verwendung von Kryoprotektiva eingefroren. Mit Hilfe der Kryokonservierung kann die Vitalität der Zellen nahezu unbegrenzt erhalten werden [Höfer et al., 2020]. Diese Variante erweist sich allerdings nur dann als effektiv,

wenn das konservierte Gewebe nach dem Auftauprozess wieder lebensfähig ist [Schmitz, 2020]. Es existieren viele unterschiedliche Methoden der Kryokonservierung. Die drei wesentlichen Methoden sind die Vitrifikation, die verkapselte Dehydration und das langsame Gefrieren [Reed, 2000]. Es existiert jedoch keine Methode, welche immer und für alle Pflanzengewebe geeignet ist. Oft sind es Kombinationen, denn jede Kulturart benötigt andere Bedingungen. Für eine unbefristete Konservierung der Pflanzenmaterialien ist es wichtig die Stabilität der genetischen Informationen zu bewahren. Das Gewebe von Sprossspitzen hat sich dabei am besten bewährt [Reed, 2008].

Zellen bestehen zu einem Großteil aus Wasser, welches beim Einfrieren in den festen Aggregatzustand übergeht. Bei diesem Übergang, bei Temperaturen von -2 bis -15 °C, können Eiskristalle im extrazellulären Raum entstehen. Diese Eiskristalle können die einzelnen Pflanzenzellen beschädigen oder komplett zerstören. Ab einer Temperatur von -130 °C kommen viele zelluläre Reaktionen zum Erliegen und bei einer Temperatur von -196 °C steht der vollständige Stoffwechsel einer Zelle still. Die Vitalität kann jedoch erhalten bleiben. Diese Temperaturen können mit Hilfe von flüssigem Stickstoff (*liquid nitrate*, LN) erreicht werden. Der Siedepunkt von LN liegt, bei Normaldruck, genau bei -196 °C. Die Temperatur von -196 °C wird in der Flüssigphase des Stickstoffes erreicht. In der Gasphase können, im Kryocontainer, Temperaturen von -178 °C bis -150 °C erreicht werden [Schmitz, 2020].

Wird beispielsweise ein Pflanzenmaterial in Flüssigmedium langsam heruntergekühlt und eingefroren, so gefriert zunächst die Flüssigkeit im extrazellulären Raum, da außerhalb der Zelle weniger gelöste und damit weniger gefrierpunktsenkende Stoffe enthalten sind [Heß, 1992]. Es folgt ein Konzentrationsunterschied zwischen der noch nicht gefrorenen extrazellulären Flüssigkeit und dem intrazellulären Raum, welcher ebenfalls noch nicht gefroren ist. Daraufhin versucht die Zelle diesen Konzentrationsgradienten auszugleichen, indem intrazelluläres Wasser ausströmt und außerhalb gefriert. Das hat zur Folge, dass die Zelle, durch eine niedrige Kühlrate, dehydriert [Schmitz, 2020]. Andererseits gefriert bei einer hohen Kühlrate die intrazelluläre Flüssigkeit schneller und es besteht die Gefahr der Eiskristallbildung und damit die Zerstörung der Zelle. Aufgrund dessen muss die optimale Kühlrate bestimmt werden [Schmitz, 2020]

### **1.4.1 Gefrierschutzmittel**

Um die vorher beschriebenen Probleme, besonders das der Kristallbildung, zu minimieren, kommt es zum Einsatz von Gefrierschutzmitteln oder sogenannter Kryoprotektiva. Es kann hierbei zwischen den penetrierenden und nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln unterschieden werden [Schmitz, 2020].

Penetrierende Kryoprotektiva dringen aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes in den Intrazellularraum ein. Damit verhindert es die Dehydrierung der Zelle. Das Eindringen in die Zelle hängt von der Temperatur, der Beschaffenheit der Zelloberfläche, dem Konzentrationsunterschied zwischen Intra- und Extrazellularraum und dem Permeabilitätskoeffizienten der Zelle zu einem Kryoprotektivum ab [Schmitz, 2020].

Zu den penetrierenden Gefrierschutzmitteln gehören Glycerin und DMSO (Dimethylsulfoxid) [Schmitz, 2020]. Glycerin ist nicht toxisch für die Zelle, dringt jedoch nicht so schnell in die Zelle ein wie das DMSO [Shah, 1983]. DMSO wirkt allerdings bei Raumtemperatur zelltoxisch [Schmitz, 2020].

Nicht penetrierende Kryoprotektiva entfalten ihre Schutzwirkung nur im Extrazellularraum. Sie eignen sich für besonders hohe Kühlraten, weisen eine geringere Toxizität auf als penetrierende Kryoprotektiva und können in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden. Als nicht penetrierende Gefrierschutzmittel werden bevorzugt Sucrose, Trehalose, Ficoll, Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) eingesetzt [Schmitz, 2020].

### **1.4.2 Kälteadaption**

Die Kälteadaption wird zur Vorkonditionierung genutzt, um den Widerstandsmechanismus von Obstbäumen aus gemäßigten Klimazonen gegen Kälte auszulösen. Verschiedene Referenzen belegen, dass dieser Schritt wesentlich zur Regeneration der Pflanze, nach der Kryokonservierung, beitragen kann, da die Pflanzenzellen so eine höhere Stresstoleranz besaßen [Reed, 2008].

Die Anforderungen variieren auch hier je nach Pflanzenart und Kultursorte. In-vitro Sprosskulturen können bei wechselhaften Temperaturen kultiviert werden, welche beispielsweise 22 °C für 8 Stunden am Tag und -1 °C für 16 Stunden in der Nacht

betragen. Jedoch können diese auch bei beispielsweise konstanten 4 °C oder bei Raumtemperatur kultiviert werden. Je nach Kultivierungstemperatur ergeben sich unterschiedliche Widerstandsfähigkeiten gegenüber Kälte [Reed, 2008].

#### 1.4.3 Vorkultur

Das Kryoprotektivum DMSO wird für die Behandlung der Vorkultur verwendet nachdem die Sprosskulturen präpariert wurden. Die Kulturen werden oft auf einem 5 %-igem DMSO-Medium für 48 Stunden vorkultiviert. Abgewandelt können auch 5 % DMSO und 5 % Prolin für das Medium verwendet werden. Diese Zusammensetzung erzielte bei *Prunus* Arten in Abhängigkeit von der Kultursorte eine Überlebensrate zwischen 60 – 80 % [Reed, 2008].

#### 1.4.4 Vitrifikation

Die Methode der Vitrifikation wurde in den späten 1980er Jahren von Sakai entwickelt und wurde bis heute bei über 200 verschiedenen Pflanzenarten angewendet [Popova et al., 2015]. Hierbei wird das Prinzip der Dehydration oder Konditionierung verwendet. Die Dehydration erfolgt mittels Vitrifikationslösungen, welche hochkonzentriert sind und teilweise toxisch (PVS2) auf die Pflanzenzellen wirken. Die bekanntesten Vitrifikationslösungen sind PVS2 (*Plant vitrification solution 2*) und PVS3 (Tabelle 2). Die PVS2-Lösung beinhaltet Ethylenglykol, Glycerin, DMSO und Saccharose. Die PVS3-Lösung im Vergleich dazu Glycerin und Saccharose. Diese Kombination bewirkt keine Kristallisation bei einem sofortigen Eintauchen in den Flüssigstickstoff, was sehr vorteilhaft ist [Reed, 2000].

**Tabelle 2: Vergleich der Inhaltsstoffe von PVS2 und PVS3 [Wang et al., 2020]**

Bestandteile	PVS2	PVS3
Glycerin	30 % (w/v)	50 % (w/v)
Saccharose	0,4 M	50 % (w/v)
Ethylenglykol	15 % (w/v)	-
DMSO	15 % (w/v)	-



Nach der Kryokonservierung ist ein Auftauen der Kulturen ein obligatorischer Schritt. Dieser Auftauprozess sollte möglichst schnell vollzogen werden, da die Kryoprotektiva, welche im PVS2 enthalten sind, bei Raumtemperatur zelltoxisch wirken.

Vorteilhaft an der Vitrifikation ist die geringe Geräteausstattung, die dabei benötigt wird, jedoch sind die zu verwendeten Substanzen toxisch für die Pflanzenzellen [Reed, 2000].

#### **1.4.5 Langsames Gefrieren / Slow cooling**

Das Verfahren basiert auf dem Prinzip der kälteinduzierten Dehydration [Popova et al., 2015]. Es erfordert Sprossspitzen, welche zuvor auf einem Medium mit DMSO herangezogen wurden. Anschließend werden mildere Kryoprotektiva hinzugefügt, um somit eine Dehydration herbeizuführen. Nun erfolgt die langsame Kühlung, bei der die Kühlungsrate in der Regel weniger als 1 °C pro Minute beträgt [Reed, 2000]. Dies geschieht so lange, bis eine Temperatur zwischen -35 °C und -40 °C erreicht ist. Nachfolgend wird das zu kultivierende Gewebe in LN getaucht. Währenddessen tritt eine Kristallisation im Intrazellularraum auf. Aufgrund dessen ist ein schnelles Auftauen für eine Regeneration der Zellen notwendig [Reed, 2000].

Vorteilhaft an dieser Methode ist die hohe Überlebensrate der Genotypen und die leichte Modifikation des Prozesses, um gegebenenfalls bessere Überlebensraten zu erhalten. Nachteilig ist jedoch die Notwendigkeit eines teuren Gefrierschranks, welcher die Kühlungsrate steuert [Reed, 2000].

#### **1.4.6 Verkapselte Dehydration**

Bei diesem Verfahren findet ein Zelleinschluss mittels Alginat statt. Hierfür werden Sprossspitzen benötigt. Diese werden mit der Alginatlösung vermischt und anschließend mit Hilfe einer Pipette vorsichtig in hochkonzentrierte Kalziumlösung getropft. Die Sprossspitzen befinden sich nun eingeschlossen in einem Ca-Alginattropfen. Sie werden über Nacht in konzentrierter Saccharoselösung gelagert, in welcher die Meristeme dehydrieren. Eine zusätzliche Dehydration kann auch mittels Lufttrocknung erfolgen. Nach der Dehydration erfolgt eine Überführung in LN. Bei Wiederverwendung der Zellen werden sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Ein erneutes Wachstum ist nach ca. 1-2 Wochen zu erkennen. Vorteilhaft ist das problemlose Auftauverfahren, jedoch ist der Gesamtprozess dieses Verfahrens sehr umfangreich, da jeder Alginattropfen separat behandelt werden muss [Reed, 2000].

## **2 Zielstellung**

Ziel der Versuche ist, die Methode der Kryokonservierung mittels PVS2-Vitrifikation bei *Prunus* zu etablieren. Dabei wird Bezug zur PVS2-Methode genommen, welche an dem Julius Kühn-Institut routinemäßig für die Kryokonservierung für die Erdbeere (*Fragaria*) angewandt wird. Diese Methode soll auf vier *Prunus*-Wildart-Akzessionen übertragen und angepasst werden. Parallel dazu wird die Dauer der Kälteadaptation variiert. Des Weiteren wird die PVS3-Methode bei der *Prunus*-Wildart PRU0135 bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen betrachtet, um den Einfluss dieser Vitrifikationslösung auf die Regenerationsrate der Sprossspitzen zu untersuchen.

### **3 Material**

#### **3.1 Pflanzenmaterial**

Die Kryokonservierung wurde mit in-vitro-Kulturen von folgenden Prunus Wildarten-Akzessionen durchgeführt:

**Tabelle 3: Verwendete Wildarten mit Akzessionsnummer und in-vitro Vermehrungsmedium**

<b>Name</b>	<b>Akzessionsnummer</b>	<b>Medium</b>
<i>Prunus canescens</i>	PRU0037, PRU0088	AKV-1
<i>(P. pseudo-cerasus) × (P. canescens × P. incisa)</i>	PRU0027	AKV-1
<i>Prunus tomentosa</i>	PRU0135	AKV-1

#### **3.2 Chemikalien**

**Tabelle 4: Liste der in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Herstellerfirmen**

6-Benzylaminopurine (BAP) C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. KG; Heidelberg, Deutschland	
Difco Agar, Bacteriological	Becton Dickinson and Company™; USA	Lot. Nr.: 0119214
Dimethylsulfoxid (DMSO) C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Charge: 189286236
Ethylenglykol C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Charge: 349284915
Glycerin, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Charge: 410301122

Indol-3-buttersäure (IBA) C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. KG; Heidelberg, Deutschland
Sorbitol C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Duchefa Biochemie B. V.; Charge: 180640 Haarlem, Niederlande
Sucrose Grade II	Sigma-Aldrich Chemie Lot. Nr.: SLBC7175V GmbH; USA

### 3.3 Fertigmedium und hergestellte Vermehrungsmedien

#### Fertigmedium

#### **Murashige & Skoog Medium Including Vitamins (242)**

- Lot. Nr.: P05647.01

- Duchefa Biochemie B. V.; Haarlem, Niederlande

#### **Enthaltene Mikroelemente**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
FeEDDHA	96,00 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/l
KI	0,83 mg/l
MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	16,90 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	8,60 mg/l

#### **Enthaltene Vitamine**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Glycine	2,00 mg/l
Myo-Inositol	100,00 mg/l
Nicotinic acid	0,50 mg/l
Pyridoxine HCl	0,50 mg/l
Thiamine HCL	0,10 mg/l

#### **Enthaltene Makroelemente**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
CaCl <sub>2</sub>	332,02 mg/l

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00 mg/l
KNO <sub>3</sub>	1900,00 mg/l
MgSO <sub>4</sub>	180,54 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00 mg/l

### **Hergestellte Vermehrungsmedien**

#### **Vermehrungsmedium AKV-1 (nach Hanke, pers. Mitteilung)**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Murashige & Skoog Medium (242)	4,464 g/l
Sorbitol	30 g/l
BAP	1 mg/l
IBA	1 mg/l
Agar	8,8 g/l
pH-Wert	5,8

#### **Vermehrungsmedium + 5 % DMSO**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Vermehrungsmedium AKV-1	95 % (v/v)
DMSO	5 % (v/v)

#### **Loading solution**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Glycerin	18,42 g/100 ml
Sucrose Grade II	17,00 g/100 ml
AKV-1 zum Auffüllen	
pH-Wert	5,7

#### **Unloading solution**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Sucrose Grade II	41,076 g/100 ml
AKV-1 zum Auffüllen	
pH-Wert	5,7

#### **Sucrose-Vermehrungsmedium**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Sucrose Grade II	13,7 g/100 ml
AKV-1 zum Auffüllen	

**Plant Vitrification Solution 2 (PVS2)**

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>
Glycerin	30 % (w/v)
DMSO	15 % (w/v)
Ethylenglycol	15 % (w/v)
Sucrose-Vermehrungsmedium	40 % (v/v)

**Plant Vitrification Solution 3 (PVS3)**

<u>Komponenten</u>	
Glycerin	50 % (w/v)
Sachharose	50 % (w/v)

**3.4 Verbrauchsmaterial****Tabelle 5: Liste der in der Arbeit verwendeten Materialien und Herstellerfirmen**

Nalgene® Rapid-Flow™ Filters, 50 mm, Porengröße 0,45 µm, 150 ml	Thermo Fisher Scientific Inc.; USA	Lot. Nr.: 1264792
Kryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific Inc.; USA	Lot. Nr.: 119272
Kultivierungsgefäße, Sturzglas 370 ml	J. Weck GmbH & Co. KG; Wehr-Öflingen, Deutschland	
Omnifix®-Spritzen, steril, 30 ml	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland	Lot. Nr.: 9L30048
Petrischalen Polystyrol 50 mm	Corning Incorporated, Corning Gosselin; Borre, Frankreich	Lot. Nr.: 751309
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Lot.Nr.: R8SA63442

### 3.5 Geräte

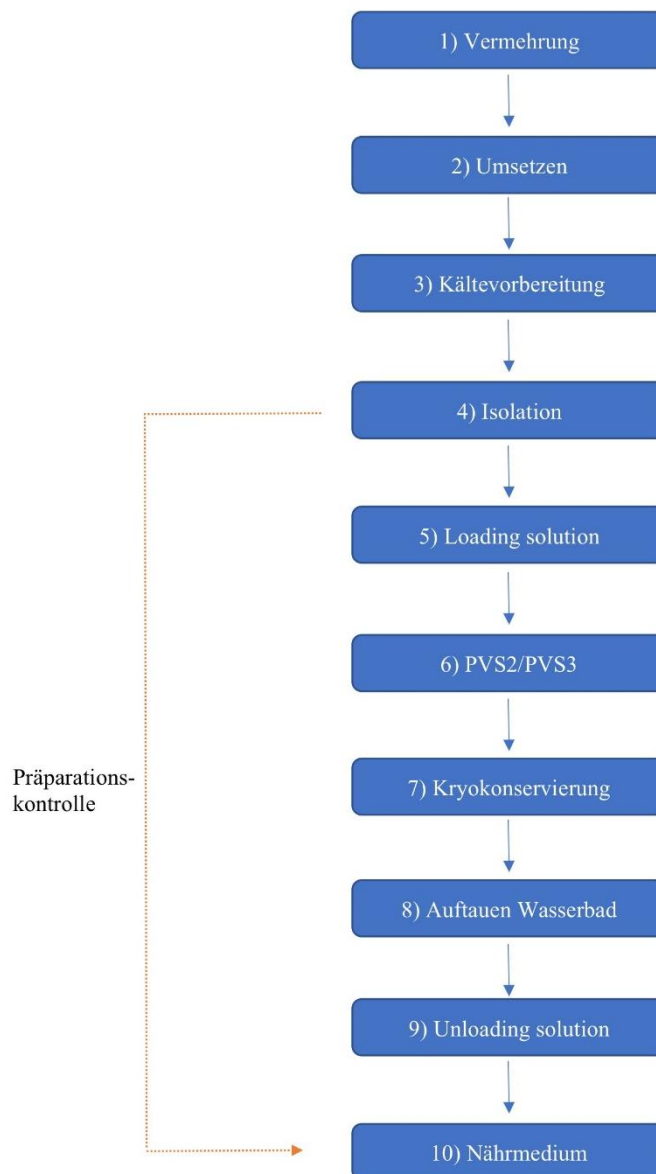
**Tabelle 6: Liste der in der Arbeit benutzten Geräte und Herstellerfirmen**

Inkubator (Kulturschrank zur Kältevorbehandlung)	Sanyo	Modell: MIR-553
Leuchtstoffröhren	Osram GmbH; München, Deutschland	Modell: L 36W/840, Luminux, Cool white
Lagertank für Kryokonservierung	Cryotherm GmbH & Co. KG; Kirchen/Sieg, Deutschland	Modell: Chronos®200 Seriennummer: 51711
Lager- und Transporttank für Flüssigstickstoff	Cryotherm GmbH & Co. KG; Kirchen/Sieg, Deutschland	Modell: Apollo®200
PHOENIX Instrument Waterbath	Phoenix Instrument GmbH; Garbsen, Deutschland	Modell: WB-12
Sicherheitswerkbank Hera guard	Heraeus Holding GmbH	Modell: HPH 18
Stereomikroskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland	Modell: Stemi SV11
Stereomikroskop für Aufnahmen	Nikon Metrology GmbH; Düsseldorf, Deutschland	Modell: SMZ800

## 4 Methoden

### 4.1 Kultivierung und Vermehrung der in-vitro Sprosskulturen

In der folgenden Abbildung ist der Ablauf der Vitrifikation mit PVS2 und PVS3 schematisch dargestellt (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Vitrifikation mit PVS2 und PVS3 bei *Prunus*

Die Abbildung veranschaulicht den Ablauf der PVS2-Methode, beginnend mit der in-vitro Kultivierung der Sprosskulturen, sowie den Ablauf der Kontrolle für die Präparation (links, orangener Pfeil). Auf die einzelnen Punkte wird im Nachfolgenden eingegangen.



Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Kryokonservierung ist das Vorhandensein von ausreichend gesundem Pflanzenmaterial. Die Sprosskulturen wurden hierfür in drei- bis vierwöchigen Intervallen geteilt und auf das entsprechende Nährmedium (Tabelle 3) transferiert (siehe Punkt 1 in Abbildung 6).

Um die in-vitro-Kulturen teilen zu können, mussten sie aus dem vorherigen Medium entfernt und mittels Skalpell sowie Pinzette vorsichtig präpariert werden. Hierzu wurden der Kallus und ältere Blätter an dem Spross abgetrennt und verworfen. Im Falle, dass sich neugebildete Sprosse an einer Pflanze befanden, konnten diese vereinzelt werden. Anschließend wurden die geteilten Sprosse vorsichtig auf frisches Nährmedium gesetzt. Pro Glas befanden sich zwischen 10 und 13 Pflanzen. Anschließend wurden die etablierten Sprosskulturen in einem in-vitro Kulturenraum (Abbildung 7) gelagert, welcher einen Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Temperatur von ca. 22 °C für 16 h am Tag und 17 °C für 8 h in der Nacht simuliert.



**Abbildung 7: In-vitro Kulturenraum im JKI**

## 4.2 Kälteadaptation der Sprosskulturen für die Kryokonservierung und Isolation der Sprossspitzen

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wurden die benötigten Kulturen nach einer ausreichenden Kultivierung einer Kälteadaptation in einen Klimaschrank unterzogen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Klimaschrank für Kälteadaptation im JKI**

Dazu wurden die Sprosskulturen 14 Tage nach dem letzten Mediumtransfer in den Klimaschrank gestellt (siehe Punkt 2 und 3 in Abbildung 6). Dieser simuliert ebenfalls einen Tag-Nacht-Rhythmus, jedoch mit einer Temperatur von 22 °C für 8 h am Tag und -1 °C für 16 h in der Nacht.

In der Phase der Kälteadaptation befanden sich die Sprosskulturen bis zu 28 Tage, sodass die Varianten zwei Wochen, drei Wochen und vier Wochen nach der Kältevorbehandlung des Ausgangsmaterials bearbeitet werden konnten.

Nach Ablauf der Kältevorbehandlung konnten die Sprossspitzen unter der Laminar Flow Werkbank mittels Stereomikroskop, Skalpell und Pinzette isoliert werden (siehe Punkt 4 in Abbildung 6). Hierfür wurden umliegende Blätter vorsichtig mit dem Skalpell abgetragen und das Meristem mit einem Hüllblattpaar isoliert. Die Abbildung 9 zeigt einen Spross an welchem die Sprossspitze isoliert werden kann.



**Abbildung 9: Spross von PRU0027, Markierung zeigt ungefähren Standort von Sprossspitze, aufgenommen am 06.01.2022 mit Mikroskop SMZ800, bearbeitet mit CombineZP und Paint**

Der markierte Bereich zeigt wo ungefähr das Meristem mit dem Hüllblattpaar liegt. Die umliegenden Blätter werden so lange abgetragen, bis das Meristem mit einem Hüllblattpaar übrig ist. Die Abbildung 10 zeigt das nun freiliegende Meristem mit einem Hüllblattpaar.



**Abbildung 10: Isolierte Sprossspitze mit Meristem und einem Hüllblattpaar, aufgenommen am 06.01.2022 mit Mikroskop SMZ800, bearbeitet mit Paint**

Unter den isolierten Sprossspitzen wurden 10 Stück verwendet, um zu kontrollieren, ob die Präparation optimal durchgeführt wurde (Präparationskontrolle; siehe orangener Pfeil in Abbildung 6).

### 4.3 Kryokonservierung der Sprossspitzen

Die isolierten Sprossspitzen wurden anschließend auf Petrischalen mit 50 mm Durchmesser gesetzt, welche AKV-1 Medium mit 5 % DMSO enthielten. Im Anschluss wurden die Petrischalen für insgesamt 48 h erneut in den Klimaschrank gestellt, wobei nach 24 h die Position der Sprossspitzen im Nährmedium geändert wurde, um das Abtöten derselben durch Phenolausscheidungen zu verhindern.

Nach Ablauf von weiteren 24 h wurden die Sprossspitzen in 1,8 ml Kryotubes überführt. Hierzu wurden jeweils 5 Sprossspitzen für 15 Minuten in einem Kryotube mit 750  $\mu$ l Loading Solution bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Punkt 5 in Abbildung 6) (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Kryoröhrchen mit Sprossspitzen von PRU0027 in PVS2-Lösung**

Anschließend wurde diese Loading Solution vorsichtig abpipettiert und durch 750  $\mu$ l PVS2 oder PVS3 Lösung ersetzt. Die befüllten Kryoröhrchen wurden daraufhin für 2,5 h auf Eis inkubiert (für PVS2-Versuche) (siehe Punkt 6 in Abbildung 6). Bei der PVS3-Methode wurden unterschiedliche Inkubationszeiten und Temperaturen verwendet, welche in der folgenden Tabelle verdeutlicht sind.

Tabelle 7: Übersicht über die verschiedenen Versuchsdurchführungen der PVS3-Versuche

Inkubationszeit PVS3 (in Stunden)	Temperatur	Inkubationszeit Unloading solution (in Minuten)
2,5	auf Eis	20
3,5	auf Eis	20
3,5	auf Eis	30
2	Raumtemperatur	20
2,5	Raumtemperatur	30

Sowohl die Kryoröhrchen von der PVS2-, als auch die der PVS3-Methode wurden nach Ablauf der Inkubationszeit unmittelbar in die Flüssigphase des Stickstoffs eingelagert (siehe Punkt 7 in Abbildung 6) (siehe Abbildung 12). In dieser Kryo-Phase befanden sich die Sprossspitzen ein bis sieben Tage.

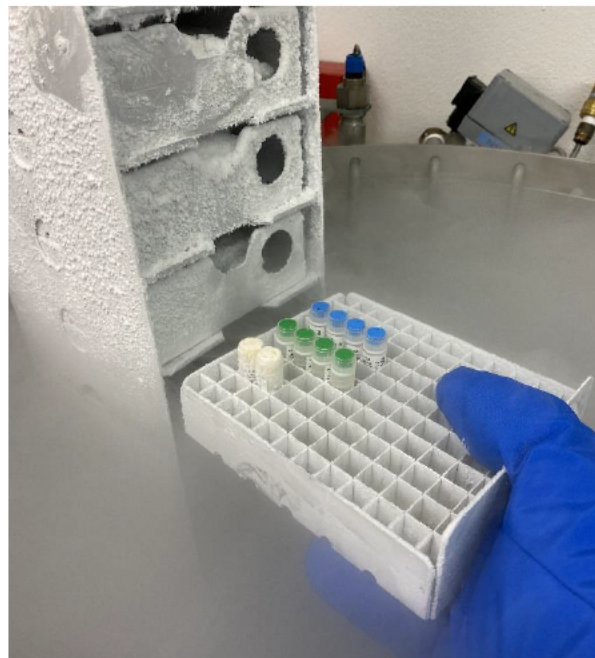


Abbildung 12: Kryoröhrchen in Fach für den Turm des Stickstofftanks

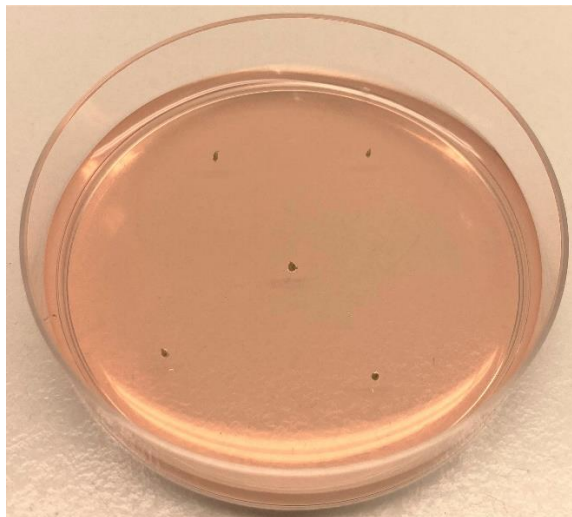
#### 4.4 Auslagerung der Sprossspitzen aus der Kryokonservierung

Bevor die Sprossspitzen aus dem Kryolagertank ausgelagert wurden, musste ein Wasserbad vorbereitet werden. Hierzu wurden kleine Gläser mit 100 ml Fassungsvermögen auf ca. 80 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und in ein

Wasserbad gestellt (siehe Punkt 8 in Abbildung 6). Das Wasserbad hatte eine Temperatur von 40 °C. Nun konnten die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff im Tank entnommen und für 1,5 Minuten im Wasserbad aufgetaut werden. Anschließend wurde ca. die Hälfte der Vitrifikationslösung abpipettiert und diese fehlende Hälfte durch die Unloading Solution ersetzt (siehe Punkt 9 in Abbildung 6). Diese beiden Lösungen wurden vermischt und anschließend vorsichtig und komplett mittels Pipette abgezogen. Anschließend wurden 750 µl Unloading Solution in die Kryoröhrchen mit den Kontrollen gegeben und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde ein kleiner Teil der Unloading Solution abpipettiert und der Rest der Flüssigkeit einschließlich Sprossspitzen auf sterilem Filterpapier ausgeleert. Die Sprossspitzen wurden auf dem Filterpapier abgetupft und anschließend mittels Skalpells und Pinzette auf 50 mm Petrischalen, wie in Abbildung 13 zu erkennen, mit AKV-1 Medium gesetzt (siehe Punkt 10 in Abbildung 6). Um die Sprossspitzen optimal auf das Medium zu setzen, wurde ein Stereomikroskop verwendet.

Anschließend wurden die Petrischalen inklusive Sprossspitzen in den in-vitro-Kulturenraum in eine Box gestellt (Dunkelheit) und nach 7 Tagen in den Tag-Nacht-Rhythmus (22 °C für 16 h mit Licht und 17 °C für 8 h ohne Licht) eingegliedert.



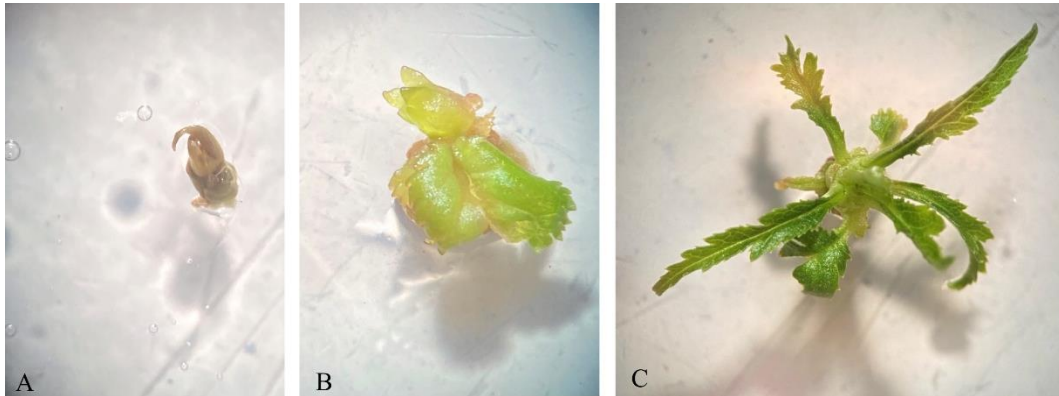
**Abbildung 13: Sprossspitzen nach der Kryokonservierung auf neuem Nährmedium**

Nach Ablauf von 24 h wurden die Sprossspitzen innerhalb des Mediums versetzt, um eine Schädigung durch die Phenolausscheidungen zu vermeiden.

Nach sieben Tagen wurden die Petrischalen in das Licht und somit in den Tag-Nacht-Rhythmus des in-vitro-Kulturenraumes überführt.

#### 4.5 Bonituren

Die Bonitur beschreibt die Kontrolle und Beurteilung des Pflanzenmaterials nach Ablauf von drei, sechs bzw. neun Wochen nachdem die Kulturen in das Licht gestellt wurden. Bei dieser Begutachtung wurde unterschieden zwischen grünen, regenerierten und braunen, somit toten, Sprossspitzen (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Gegenüberstellung von brauner (A), grüner (B) und regenerierter Sprossspitze (C), 7-fache Vergrößerung**

Eine Sprossspitze, wurde als „grün“ gewertet, wenn diese grün aussieht, jedoch kein oder kaum Blattwuchs/ Streckung der Sprossachse aufzeigte (B, Abbildung 14). Eine regenerierte Sprossspitze zeigte eine sehr deutliche Streckung und damit verbundenes Wachstum sowohl der Blätter, als auch der Sprossachse (C, Abbildung 14). Die Sprossspitze durfte dabei nicht „glasig“ erscheinen, ansonsten wurde sie als „grün“ bewertet.

Sprossspitzen, welche als „braun“ bewertet wurden, zeigten gar kein Wachstum (A, Abbildung 14). Es wurde davon ausgegangen, dass sie nicht mehr überlebensfähig waren. Des Weiteren wurde eine Sprossspitze als „braun“ bezeichnet, wenn ein verstärktes Kalluswachstum auftrat, welches die komplette Sprossspitze überwucherte.

#### 4.6 Statistik

Insgesamt wurden pro Versuch 20 Sprossspitzen der Wildarten PRU0027, PRU0037, PRU0088 und PRU0135 verwendet. Aufgrund der begrenzten Zeit, wurden die Versuche jeweils nur einmalig durchgeführt. In dem Ergebnisteil wurden, sowohl die absoluten Zahlen der Regenerate, als auch der prozentuale Anteil berechnet.

## 5 Ergebnisse

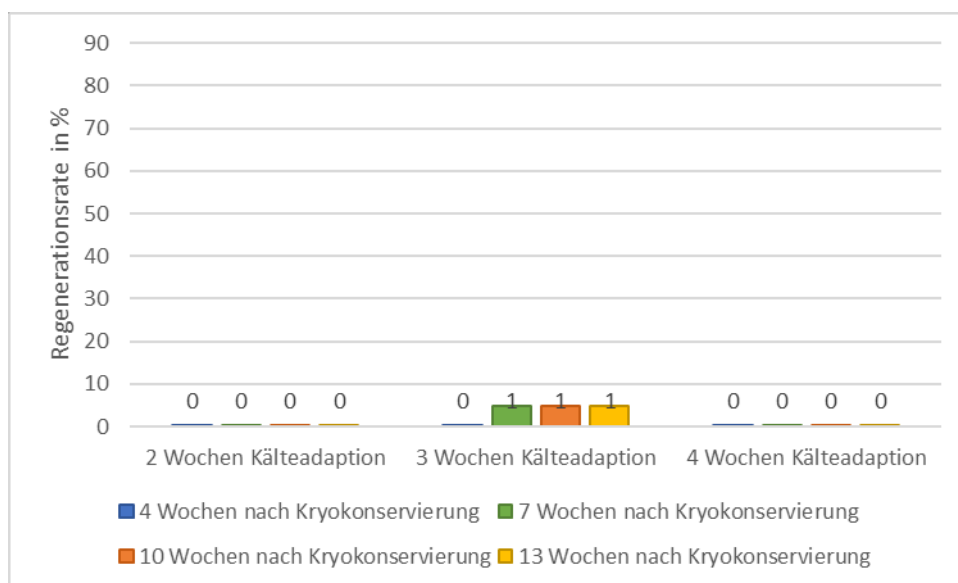
### 5.1 Ergebnisse PRU0037

#### 5.1.1 Präparationskontrolle

Aufgrund von geringem Pflanzenmaterial war die Präparationskontrolle nicht durchführbar.

#### 5.1.2 PVS2-Methode

Abbildung 15 veranschaulicht die Regenerationsrate von PRU0037 in Abhängigkeit von den durchgeführten Kälteadaptionswochen. Gleichzeitig sind diese Regenerationsraten nach vier, sieben, zehn und dreizehn Wochen, bei der Bonitur, ersichtlich.



**Abbildung 15: Regenerationsrate von PRU0037 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen**

Sowohl nach zwei, als auch nach vier Wochen Kälteadaptation wurden keine Regenerate aufgezeichnet. Lediglich nach drei Wochen Kälteadaptation war eine Regenerationsrate von 5 % zu erkennen. Diese entsprach somit einer Sprossspitze.

Die Tabelle 8 zeigt noch nähere Informationen zu den einzelnen durchgeführten Bonituren.



Tabelle 8: Bonitur von PRU0037, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen

PRU0037		4 Wo. nach Kryokons.			7 Wo. nach Kryokons.			10 Wo. nach Kryokons.			13 Wo. nach Kryokons.		
Anz. Kälteadap- tionswo.	Anz. Spross- spitzen	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert
2 Wo.	20	9	11	0	4	16	0	4	16	0	3	17	0
3 Wo.	20	3	17	0	2	17	1	2	17	1	0	19	1
4 Wo.	20	4	16	0	0	20	0	-	-	-	-	-	-

Bei allen Kälteadaptionswochen überwiegt die Anzahl der braunen Sprossspitzen gegenüber den grünen Sprossspitzen. Nach vier Wochen Kälteadaptation waren bereits alle Sprossspitzen nach sieben Wochen in der Regenerationsphase (bei der zweiten Bonitur) nicht mehr überlebensfähig. Die Tabelle zeigt noch einmal deutlich, dass nach drei Wochen Kälteadaptation eine Sprossspitze regenerierte.

## 5.2 Ergebnisse PRU0088

### 5.2.1 Präparationskontrolle

Aufgrund von geringem Pflanzenmaterial war die Präparationskontrolle nicht durchführbar.

### 5.2.2 PVS2-Methode

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der PVS2-Methode bei der Akzession PRU0088 nach zwei und drei Wochen Kälteadaptation. Aufgrund von ungenügendem Pflanzenmaterial, konnte kein Versuch nach vier Wochen Kälteadaptation vollzogen werden.

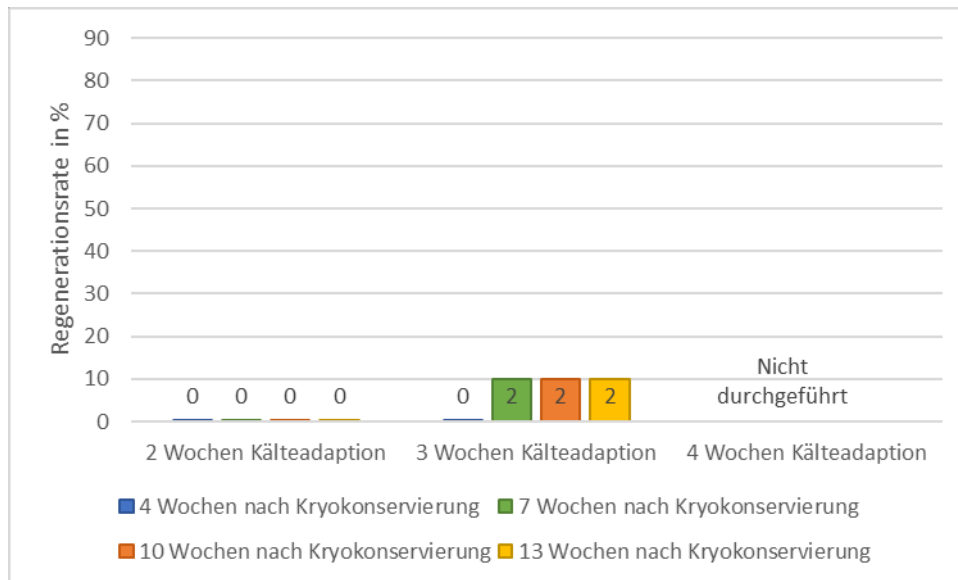


Abbildung 16: Regenerationsrate von PRU0088 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen

Wie in dem Diagramm ersichtlich, sind nach zwei Wochen Kälteadaptation keine Regenerate verzeichnet worden. Lediglich nach drei Wochen Kälteadaptation war eine Regenerationsrate von 10 %, sieben Wochen nach der Kryokonservierung, erkennbar. Diese stagnierte für die restlichen Bonituren.

In der folgenden Tabelle sind weitere Informationen zu den einzelnen Bonituren aufgelistet.

Tabelle 9: Bonitur von PRU0088, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen

PRU0088		4 Wo. nach Kryokons.			7 Wo. nach Kryokons.			10 Wo. nach Kryokons.			13 Wo. nach Kryokons.		
Anz. Kälteadaptionswo.	Anz. Sprossspitzen	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert
		2 Wo.	20	0	20	0	-	-	-	-	-	-	-
3 Wo.	20	5	15	0	2	16	2	1	17	2	0	18	2
4 Wo.	20	Nicht durchgeführt											

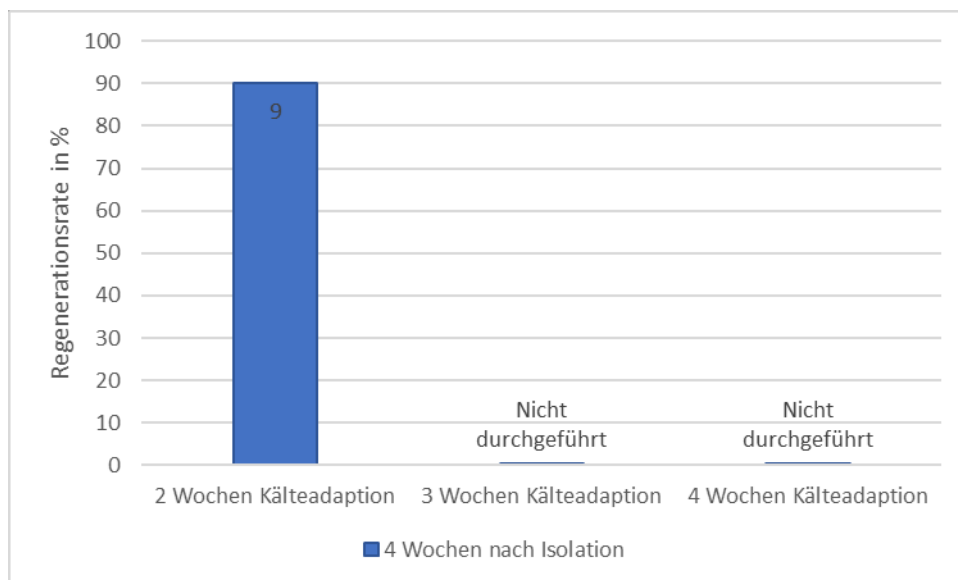
In der Tabelle 9 sind neben den regenerierten, auch die grünen und braunen Sprossspitzen aufgeführt. Bei einer Kälteadaptation von zwei Wochen waren bereits nach vier Wochen alle Sprossspitzen braun. Die Sprossspitzen nach einer Kälteadaptation von drei Wochen zeigten von Beginn überwiegend keine Überlebensfähigkeit. Lediglich fünf der insgesamt 20 Sprossspitzen zeigten eine grüne Färbung. Zwei dieser fünf Sprossspitzen regenerierten sieben Wochen nach der Kryokonservierung. Bei den anschließenden

Bonituren blieb es bei diesen zwei regenerierten Sprossspitzen und die restlichen grünen starben im weiteren Verlauf ab.

### 5.3 Ergebnisse PRU0027

#### 5.3.1 Präparationskontrolle

In Abbildung 17 ist die Regenerationsrate der isolierten Sprossspitzen zu sehen, welche einer Kälteadaptation von 2 Wochen unterzogen wurden. Für die Präparationskontrolle wurden insgesamt zehn Sprossspitzen verwendet.



**Abbildung 17: Regenerationsrate der Präparationskontrolle von PRU0027 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit bei 10 verwendete Sprossspitzen**

Nach zwei Wochen Kälteadaptation betrug die Regenerationsrate bei der Präparationskontrolle von PRU0027 90 %. Lediglich eine Sprossspitze wurde als „braun“ und somit als nicht überlebensfähig eingeschätzt.

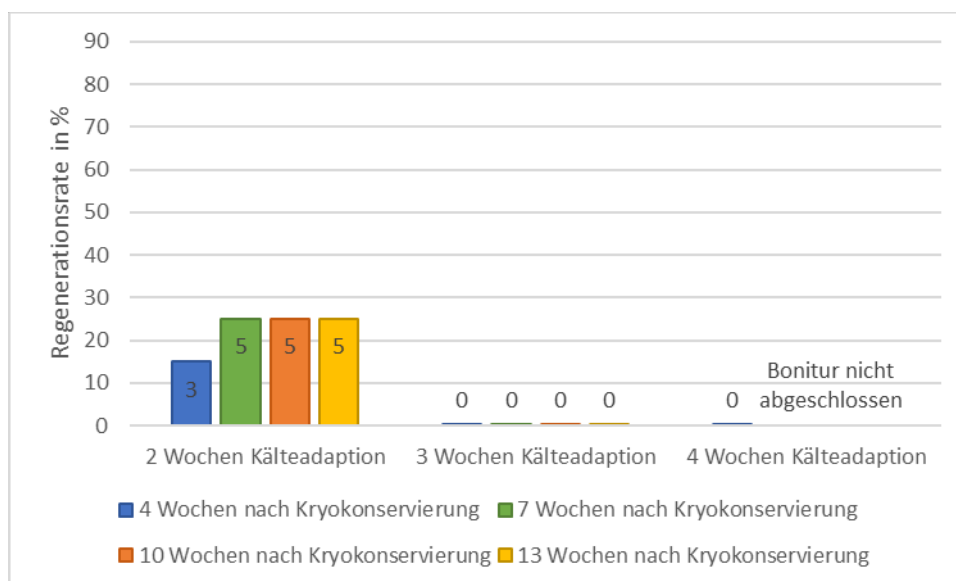
Die folgende Tabelle veranschaulicht die Zahlen der braunen, grünen und regenerierten Sprossspitzen erneut.

**Tabelle 10: Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen der Präparationskontrolle von PRU0027**

PRU0027		4 Wochen nach Isolation			7 Wochen nach Isolation		
Anzahl Kälteadaptions wochen	Anz. Sprossspitzen	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert
2 Wochen	10	0	1	9	-	-	-
3 Wochen	Nicht durchgeführt						
4 Wochen							

### 5.3.2 PVS2-Methode

Abbildung 18 veranschaulicht die Regenerationsrate von der Wildarten-Akzession PRU0027 nach zwei, drei und vier Wochen Kälteadaptation.



**Abbildung 18: Regenerationsrate von PRU0027 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen**

Die besten Ergebnisse zeigten sich nach zwei Wochen Kälteadaptation. Dort betrug die Regenerationsrate 15 % nach vier Wochen und 25 % sieben Wochen nach der Kryokonservierung. Diese 25 % stagnierten und änderten sich aufgrund dessen in den weiteren Bonituren (10 Wochen und 13 Wochen nach der Kryokonservierung) nicht.

In der folgenden Tabelle 11 sind nähere Informationen zu den Sprossspitzen bei den jeweiligen Bonituren ersichtlich.

Tabelle 11: Bonitur von PRU0027, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen

PRU0027		4 Wo. nach Kryokons.			7 Wo. nach Kryokons.			10 Wo. nach Kryokons.			13 Wo. nach Kryokons.		
Anz. Kälteadap-tionswo.	Anz. Spross-spitzen	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert
2 Wo.	20	11	6	3	9	6	5	3	12	5	0	15	5
3 Wo.	20	12	7	0	10	10	0	0	20	0	-	-	-
4 Wo.	20	6	14	0	Bonitur nicht abgeschlossen								

Bei zwei Wochen Kälteadaption waren alle restlichen 15 von insgesamt 20 Sprossspitzen nach Ablauf von 13 Wochen nach der Kryokonservierung braun und somit nicht mehr überlebensfähig.

Nach drei Wochen Kälteadaption sind keine Sprossspitzen regeneriert. Sie starben schrittweise innerhalb von 10 Wochen nach der Kryokonservierung ab.

Die Sprossspitzen nach vier Wochen Kälteadaption sind aus zeitlichen Gründen noch nicht vollständig ausgewertet. Es wurde hier lediglich eine Bonitur vollzogen und zeigte, dass 14 von 20 Sprossspitzen braun und somit der Großteil der insgesamt 20 Sprossspitzen nach der Kryokonservierung nicht überlebensfähig waren.

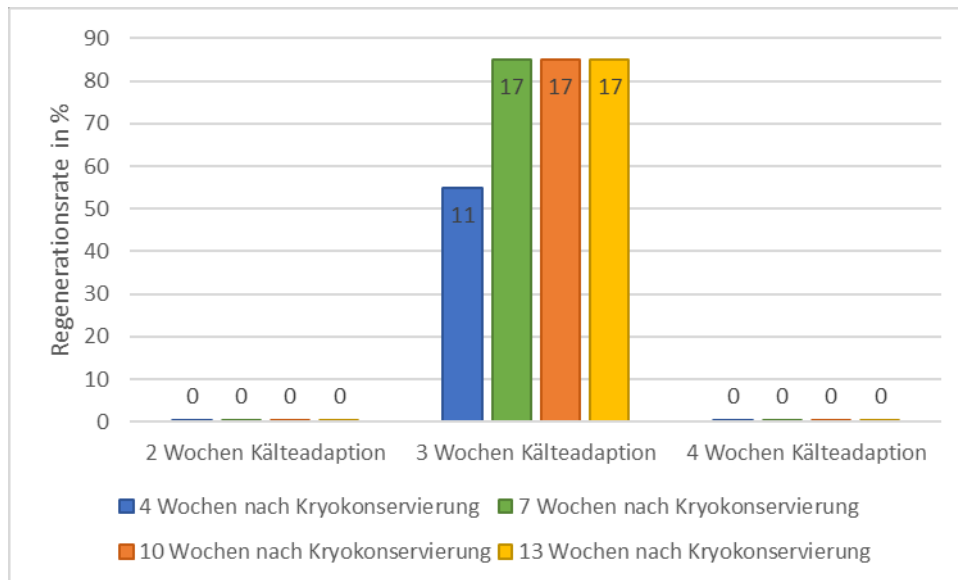
## 5.4 Ergebnisse PRU0135

### 5.4.1 Präparationskontrolle

Aufgrund von geringem Pflanzenmaterial war die Präparationskontrolle nicht durchführbar.

### 5.4.2 PVS2-Methode

In Abbildung 19 werden die Regenerationsraten der PVS2-Vitrifikation bei der Akzession PRU0135 dargestellt. Diese Regenerationsraten werden in Abhängigkeit von verschiedenen Kälteadaptionswochen (zwei, drei und vier Wochen) betrachtet. Des Weiteren werden die verschiedenen Bonituren farblich veranschaulicht.



**Abbildung 19: Regenerationsrate von PRU0135 in Abhängigkeit von der Kälteadaptionszeit, pro Versuch 20 verwendete Sprossspitzen**

Wie aus dem Diagramm zu entnehmen, wurden nach zwei und vier Wochen Kälteadaption keine Regenerate verzeichnet. Die besten Ergebnisse erzielte die Versuchsdurchführung nach drei Wochen Kälteadaption. Bereits vier Wochen, nach dem Prozess der Kryokonservierung, konnte eine Regenerationsrate von 55 % verzeichnet werden, was einer Anzahl von 11 Sprossspitzen entsprach. Diese Anzahl erhöhte sich bei der nachfolgenden Bonitur, welche sieben Wochen nach der Kryokonservierung stattfand. Zu diesem Zeitpunkt erhöhte sich die Regenerationsrate auf 85 %. Dies entsprach einer Anzahl von 17 Regeneraten. Im Laufe der weiteren Bonituren änderte sich die Anzahl der Regenerate nicht.

Tabelle 12 verdeutlicht die genaueren Zahlen von den jeweiligen Bonituren.

**Tabelle 12: Bonitur der PVS2-Versuche von PRU0135, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen**

PRU0135		4 Wo. nach Kryokons.			7 Wo. nach Kryokons.			10 Wo. nach Kryokons.			13 Wo. nach Kryokons.		
Kälteadap- tionswo.	Anz. Spross- spitzen	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert
		2 Wo.	20	0	20	0	-	-	-	-	-	-	-
3 Wo.	20	9	0	11	1	2	17	1	2	17	0	3	17
4 Wo.	20	5	15	0	1	19	0	1	19	0	0	20	0

Wie in der Tabelle zu sehen, waren, nach einer Kälteadaption von zwei Wochen, bereits bei der ersten Bonitur alle Sprossspitzen nicht mehr überlebensfähig. Bei einer

Kälteadaptation von vier Wochen überwog schon nach der ersten Bonitur die Anzahl der braunen Sprossspitzen über die der grünen. Im Laufe der weiteren Bonituren hatte sich herausgestellt, dass alle Sprossspitzen nicht überlebensfähig waren. Wie schon in dem vorherigen Diagramm aufgezeigt wurde, entwickelten sich die meisten Regenerate nach drei Wochen Kälteadaptation.

#### **5.4.3 PVS3-Methode**

Die PVS3-Methode wurde ausschließlich bei der *Prunus*-Art PRU0135 durchgeführt. Betrachtet wurden hierbei unterschiedliche Inkubationszeiten der verwendeten PVS3-Lösung und, nach dem Prozess der Kryokonservierung und des Auftauens, eine unterschiedliche Einwirkzeit für die Unloading solution.

Folgende Varianten wurden bearbeitet: (1) PVS3- Inkubationszeiten von 2,5 Stunden und 3,5 Stunden auf Eis sowie 2 Stunden und 2,5 Stunden bei einer Raumtemperatur von 25 °C (2) gleichzeitige Variation der Einwirkzeiten der Unloading solution für 20 Minuten und 30 Minuten.

In Tabelle 13 sind die genauen Variationen von PVS3-Inkubationszeit und Unloading solution-Einwirkzeit aufgelistet.

**Tabelle 13: Bonitur der PVS3-Versuche von PRU0135, Anzahl der grünen, braunen und regenerierten Sprossspitzen**

PVS3 PRU0135		4 Wo. nach Kryokons.			7 Wo. nach Kryokons.			10 Wo. nach Kryokons.			13 Wo. nach Kryokons.			
Unload.)	Variante (PVS3 / Anz. Sprossspitzen	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	Grün	Braun	Regeneriert	
Min.	2,5 h Eis / 20	20	2	18	0	1	19	0	0	20	0	-	-	-
Min.	3,5 h Eis / 20	20	6	14	0	1	19	0	Bonitur nicht abgeschlossen					
Min.	3,5 h Eis / 30	20	4	16	0	0	20	0	-	-	-	-	-	-
Unload.)	2 h RT / 20 Min.	20	3	17	0	0	20	0	-	-	-	-	-	-
Min.	2,5 h RT / 30	20	9	11	0	Bonitur nicht abgeschlossen								

Bei einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden auf Eis und einer Einwirkzeit von 20 Minuten Unloading solution sahen zum Zeitpunkt der ersten Bonitur 18 der insgesamt 20 Sprossspitzen braun aus und waren nicht mehr überlebensfähig. Die restlichen zwei Sprossspitzen sind im Laufe der nächsten zwei Bonituren abgestorben. Nach zehn Wochen waren alle Sprossspitzen nicht mehr überlebensfähig.

Bei der Durchführung mit einer PVS3-Inkubationszeit von 3,5 Stunden auf Eis und einer Einwirkzeit der Unloading solution von 20 Minuten wurden die Ergebnisse, aus zeitlichen Gründen, für die ersten beiden Bonituren ausgewertet. Zum Zeitpunkt der ersten Bonitur waren sechs der insgesamt 20 Sprossspitzen grün und 14 Stück braun. Bis zum Eintreten der zweiten Bonitur starben weitere 5 Sprossspitzen ab. Somit waren zur zweiten Bonitur 19 der insgesamt 20 Sprossspitzen braun und eine Sprossspitze blieb grün.

Die 3. Variante betrachtete, wie die vorherige, eine Inkubationszeit von 3,5 Stunden auf Eis mit einer längeren Einwirkzeit der Unloading solution von 30 Minuten. Nach vier Wochen waren 16 der insgesamt 20 Sprossspitzen nicht mehr überlebensfähig und vier waren grün. Diese starben jedoch bis zum Eintreten der zweiten Bonitur (sieben Wochen nach der Kryokonservierung) ab. Somit waren sieben Wochen nach der Durchführung der Kryokonservierung alle Sprossspitzen braun.



Bei einer PVS3-Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur und einer Einwirkzeit der Unloading solution von 20 Minuten starben, innerhalb von vier Wochen, 17 Sprossspitzen bis zu der ersten Bonitur und final alle 20 zum Zeitpunkt der zweiten Bonitur ab.

Der 4. Versuch betrachtete eine PVS3-Inkubationszeit von 2,5 Stunden bei Raumtemperatur und eine Einwirkzeit der Unloading solution von 30 Minuten. Aus zeitlichen Gründen konnte bisher nur eine Bonitur nach vier Wochen ausgewertet werden. Bei dieser Bonitur sind, im Vergleich zu den vorherigen PVS3-Versuchen, die meisten grünen Sprossspitzen erhalten geblieben. Lediglich 11 Sprossspitzen starben nach dieser Zeit ab. Die neun grünen Sprossspitzen wiesen bei der Bonitur eine gute Qualität auf (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Grüne Sprossspitzen des PVS3-Versuches mit Inkubationszeit von 2,5 h bei Raumtemperatur und einer Einwirkzeit der Unloading solution von 30 Minuten bei der ersten Bonitur**

Wie in der Abbildung 20 zu erkennen, besaßen die Sprossspitzen eine grüne Färbung und zeigten vereinzelt Blattwachstum (linke Sprossspitze).

### **5.5 Zusammenfassende Ergebnisse der PVS2-Vitrifikation aller Akzessionen**

In Tabelle 14 sind die relevanten Ergebnisse der PVS2-Vitrifikation zusammenfassend dargestellt.

Betrachtet wird hier die Dauer der Kälteadaptation, die erreichte Regenerationsrate in % und die Anzahl der Wochen, nach der Kryokonservierung bis die maximale Regenerationsrate erreicht wurde.

Tabelle 14: Zusammenfassende Ergebnisse der PVS2-Vitrifikation aller Akzessionen

Akzessionsnr.	Dauer der Kälteadaption	Maximale Regenerationsrate	Zeit bis zur maximalen Regenerationsrate
<u>PRU0037</u>	3 Wochen	5 %	7 Wochen
<u>PRU0088</u>	3 Wochen	10 %	7 Wochen
<u>PRU0027</u>	2 Wochen	25 %	7 Wochen
<u>PRU0135</u>	3 Wochen	85 %	7 Wochen

Die Regenerationsrate der PVS2-Vitrifikation betrug zwischen 5 und 85 %, welche überwiegend nach einer Kälteadaption von drei Wochen erreicht wurde. Die maximale Regenerationsrate wurde bei allen verwendeten Akzessionen nach sieben Wochen (2. Bonitur) erreicht.

### 5.6 Hyperhydrizität

Sowohl bei den Bonituren der Versuchsdurchführungen mit PVS2- als auch bei Verwendung von PVS3 trat während der Regeneration zum Teil ein unregelmäßiges Wachstum der Sprossspitzen auf, was final zu keiner erfolgreichen Regeneration führte. Einige der als „grün“ eingeschätzten Sprossspitzen waren sehr porös, glasig und wiesen eine hohe Wassereinlagerung auf. Dieser Zustand wird als Hyperhydrizität bezeichnet. In Abbildung 21 ist ein Vergleich zwischen einer regenerierten Sprossspitze (A) und einer Sprossspitze mit Hyperhydrizität (B) zu erkennen.



Abbildung 21: Gegenüberstellung einer regenerierten Sprossspitze (A) und einer Sprossspitze mit Hyperhydrizität im Verlauf der Regeneration nach Kryokonservierung (B)

Die regenerierte Sprossspitze wies ein vermehrtes Spross- und Blattwachstum auf. Die Sprossspitze mit Hyperhydrizität wies dies zwar gleichermaßen auf, jedoch besaß diese eine blasse Farbe, erhöhte Wasseransammlung und starre Blätter, welche sehr porös waren und daher empfindlich auf Berührung reagierten. Der erhöhte Wassergehalt machte sich besonders bemerkbar, sobald der Kallus vorsichtig entfernt wurde und die Sprossspitze auf neues Medium transferiert wurde. Auf dem neuen Medium trat das Wasser teilweise aus und sammelte sich um die Sprossspitze.

Dennoch wurden diese Sprosse als „grün“ bonitiert. In den meisten Fällen starben diese Sprossspitzen jedoch ab und wurden anschließend als „braun“ bonitiert.

## **6 Diskussion**

### **6.1 PVS2-Methode**

Im JKI Dresden-Pillnitz wurde die PVS2-Vitrifikation bisher an *Fragaria*- [Höfer, 2016] und *Pyrus*-Arten durchgeführt [Steinhardt, 2019]. Des Weiteren wurden dormante Knospen von *Malus*- [Höfer, 2015] und *Pyrus*-Arten [Lenk, 2020] mittels des langsamen Gefrierens kryokonserviert.

Sowohl die PVS2- als auch die PVS3-Vitrifikation wurden noch nicht bei *Prunus*-Wildarten im JKI Dresden-Pillnitz angewendet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser erstmaligen Etablierung diskutiert und Schlussfolgerungen für eine weitere Arbeit an der Kryokonservierung von *Prunus* abgeleitet.

Bei allen verwendeten Wildarten-Akzessionen sind positive Ergebnisse bei der PVS2-Vitrifikation zu erkennen (Tabelle 14). Damit kann davon ausgegangen werden, dass diese Methode der Kryokonservierung bei *Prunus* durchführbar ist. Jedoch liegt die Regenerationsrate bei allen *Prunus*-Arten, bis auf PRU0135, unter 30%. Aufgrund dessen muss davon ausgegangen werden, dass die Erfolgsrate der Methode auf die jeweils verwendete Wildarten-Akzession zurückzuführen ist. Diese Genotyp-Abhängigkeit wurde auch bei den durchgeführten Versuchen mit *Malus* [Höfer, 2015] und *Pyrus* [Lenk, 2020] am JKI, Institut für Züchtungsforschung an Obst in Dresden Pillnitz, beobachtet. Alle verwendeten Akzessionen stammen aus Asien. Aufgrund der Größe dieses Kontinentes herrschen unterschiedlichste Klimazonen. PRU0027 ist ein Hybrid aus mehreren Arten, welche teils in Japan und teils in China ansässig sind. Die Akzessionen PRU0037 und PRU0088 stammen aus China. PRU0135 ist hauptsächlich in Japan, Korea und in dem Himalaya beheimatet. In diesen Regionen herrschen unterschiedlichste Klimaverhältnisse, weshalb nicht genau darauf zurückgeführt werden kann, welche der Wildarten aus kälteren oder wärmeren Regionen stammt und diesbezüglich besser oder schlechter nach der Kryokonservierung regeneriert.

Die Methode muss aufgrund dessen in weiterführenden Arbeiten optimiert und Wiederholungen durchgeführt werden.

### 6.1.1 Kälteadaption

Bei PRU0037, PRU0088 und PRU0135 sahen die Sprosse vor der Kälte Vorbereitung gesund aus, jedoch veränderte sich ihr Zustand nach Ablauf der durchgeführten Kälte Vorbereitungswochen. Sie zeigten zu diesen Zeitpunkten vermehrte Wassereinlagerungen. Unabhängig davon wurden die Versuche durchgeführt, um auch diesen Einfluss zu bewerten.

Die Ursache für das Absterben der Präparate könnte mit der Dauer der Kälteadaption zusammenhängen.

Bei den Untersuchungen von Barraco et al. [2012], an zwei Sorten von *Prunus cerasus*, wurde eine Kälteadaption von drei Wochen durchgeführt, jedoch fand diese bei mindestens 3 °C (20 °C für 8 h mit Licht, 3 °C für 16 h ohne Licht) statt. Eine ähnliche Dauer der Kälteadaption war auch bei den Forschungen von Channuntapipat et al. [2000] zu erkennen. Die verwendeten *Prunus*-Sorten und ein Mandel/Pfirsich-Hybrid wurden ebenfalls einer dreiwöchigen Kälteadaption bei einer Temperatur von 4 °C unterzogen. Beide Forschungen erreichten mit ihrer Methode eine höhere Regenerationsrate (Tabelle 16, siehe Anhang)

Andere Forschungen, wie zum Beispiel von Carlo et al. [2000] an *Prunus domestica*, Boucaud et al. [2002] an *Prunus persica* und Brison et al. [1994] an *Fereley-Jaspi* zeigten, dass eine Kälteadaption von einem Tag und bis zu sechs Tagen ausreichen können. Die Temperaturen lagen bei allen drei Forschungsarbeiten zwischen 3 und 4 °C. Carlo erreichte bei den Versuchsdurchführungen eine Regenerationsrate von 57 % und Brison zwischen 69 und 74 % (Tabelle 16 und 17, siehe Anhang).

Aufgrund dieser Betrachtungen und der Wasseransammlung in den Sprossen nach der Kälteadaption, könnte die Dauer dieser, genotypabhängig und zu lang sein. Des Weiteren könnte die Möglichkeit bestehen, dass die Temperaturen (22 °C für 8 h mit Licht und -1 °C für 16 h ohne Licht) nicht optimal für die hier verwendeten *Prunus*-Wildarten waren und aufgrund dessen die Sprossspitzen nach der Kryokonservierung abgestorben sind.

Die Präparationskontrolle der Wildarten-Akzession PRU0027 zeigte eine Regenerationsrate von 90 % [Abbildung 17, Tabelle 10]. Somit kann eine fehlerhafte Isolation der Sprossspitzen ausgeschlossen werden. Aufgrund von ungenügendem

Pflanzenmaterial konnten keine Präparationskontrollen an den Akzessionen PRU0037, PRU0088 und PRU0135 durchgeführt werden.

Für die weiterführenden Arbeiten sollten diese mit durchgeführt werden.

### **6.1.2 Medium mit 5 % DMSO**

Das Wachstumsmedium mit zusätzlich 5 % DMSO wurde nach der Isolation der Sprossspitzen verwendet, um die Sprossspitzen für 48 Stunden in dem Wachstumsschrank zu kultivieren, in welchem die vorherige Kälteadaptation stattfand (22 °C für 8 h mit Licht und -1 °C für 16 h ohne Licht). In der Forschungsarbeit von Boucaud et al. [2002] und Brison et al. [1994] betrug die Länge der Inkubation auf dem DMSO haltigem Medium 24 Stunden. Die Inkubation fand bei einer Temperatur von 4 °C statt. Des Weiteren wurde bei Brison et al. ein Medium verwendet, welches sowohl 5 % DMSO, als auch 2 % Prolin enthielt.

Die Anwendung von Prolin im Medium bei der Vorbereitung der Sprossspitzen dokumentieren auch zwei Arbeiten von Helliott et al. [1997]. Das Medium beinhaltete, in beiden Arbeiten, 5 % DMSO und eine Prolin-Konzentration von 20 %. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei einer Temperatur von 4 °C.

Prolin ist eine Aminosäure und nimmt bei Pflanzen eine essenzielle Rolle ein. Sie gehört zu den osmoprotektiven Substanzen (OPS) und schützt Membranen und Proteine vor irreversiblen Schäden durch zum Beispiel Dehydratisierung, erhöht das osmotische Potential der Pflanzenzellen, wirkt sich daher positiv auf die Wasseraufnahme derer aus und kann als penetrierendes Gefrierschutzmittel verwendet werden [Weiler, 2008].

Basierend auf diesen Betrachtungen sollte für nachfolgende Versuche eine Änderung der Zusammensetzung des Mediums (mit 2% Prolin) und/oder die Länge und Temperatur des Inkubationsschranks Berücksichtigung finden.

### **6.1.3 Einwirkzeiten von Loading solution, PVS2 und Unloading solution**

Bei den durchgeführten Versuchen betragen die Einwirkzeiten 15 Minuten für die Loading solution bei Raumtemperatur (RT), 2,5 Stunden für die PVS2-Lösung auf Eis und 20 Minuten für die Unloading solution bei RT.

Die hohe Anzahl an braunen Sprossspitzen kann möglicherweise mit der Inkubationszeit und/oder der Temperatur der verwendeten Lösungen begründet werden.

Bei der Forschungsarbeit von Channuntapipat et al. [2000] wurde lediglich eine PVS2-Lösung und eine Unloading solution verwendet. Die Sprossspitzen wurden dazu in 1 ml PVS2 überführt und für 2,5 Stunden bei 25 °C (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch 0,5 ml frische PVS2-Lösung ersetzt und in den Flüssigstickstoff für drei Tage eingelagert. Nach der Kryokonservierung wurden die Sprossspitzen in einem 30 °C warmen Wasserbad aufgetaut und zwei Mal mit einer Unloading solution gewaschen.

In den Versuchen von Barraco et al. [2012] wurde gleichfalls zu den eigenen Versuchen eine Loading solution verwendet. Die Sprossspitzen befanden sich für 25 Minuten bei RT in dieser Lösung. Anschließend wurde diese durch PVS2-Lösung ersetzt und bei 0 °C für 4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation kamen die Sprossspitzen in den Flüssigstickstoff. Der Auftauprozess verlief in zwei Schritten. Zuerst waren die Sprossspitzen inklusive Kryoröhrchen in einem 42 °C warmen Wasserbad für 1 Minute und anschließend für 10 Sekunden in einem Wasserbad mit 20 °C. Die PVS2-Lösung wurde durch eine Unloading solution ersetzt und drei Mal gespült. Bei dem letzten Spülvorgang verweilten die Sprossspitzen für 3 Minuten darin. Nachfolgend wurden sie, wie in den Versuchen in dieser Arbeit, auf Filterpapier geben und im Anschluss auf neues Medium gesetzt (Tabelle 16, siehe Anhang).

Diese zwei Forschungsarbeiten zeigen, dass unterschiedlichste Methoden verwendet werden können. Aufgrund der, zwar geringen, aber dennoch positiven Ergebnisse bei den verwendeten *Prunus*-Wildarten sollte das Verfahren hinsichtlich PVS2 bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen getestet werden (Tabelle 15).

Gleichzeitig können Vergleichsvarianten für jeden Genotyp realisiert werden, wo der Ablauf der Versuche alle Schritte außer der Überführung in den Kryotank enthält. Damit könnte der toxische Einfluss des PVS2 auf die einzelnen Genotypen unabhängig von der Kryolagerung untersucht werden.

## 6.2 PVS-3-Methode

Die PVS3-Methode wurde, so wie die PVS2-Methode, noch nicht an *Prunus*-Arten im JKI in Dresden-Pillnitz angewendet. In den Versuchen wurden verschiedene Inkubationszeiten und Temperaturen betrachtet. Die Durchführung, bei welcher die Sprossspitzen für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur in der PVS3-Lösung inkubiert wurden, zeigten nach der ersten Bonitur das größte Potential einer möglichen

Regeneration. Nach dem Prozess der Kryokonservierung wurden diese für 30 Minuten in der Unloading solution inkubiert.

Die Forschungsarbeit von Kim et al. [2005] führte die Vitrifikation mittels PVS3 bei *Allium sativum* Sprossspitzen (Knoblauch) adäquat durch. Kim lies die Sprossspitzen für 2,5 Stunden bei 23 °C und unter konstantem Schütteln bei 90 rpm inkubieren. Anschließend wurden die Sprossspitzen in 1 ml frischer PVS3-Lösung in den Flüssigstickstoff überführt. Nach diesem Prozess wurden die Sprossspitzen in einem Wasserbad bei 37 °C für 1 Minute aufgetaut und im Anschluss daran für 40 Minuten in eine Unloading solution gegeben [Kim et al., 2005].

Makowska et al. [1999] führte eine PVS3-Methode bei Knollen von *Allium sativum* durch. Es wurden zunächst die Knollen für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer Loading solution inkubiert. Anschließend kamen diese in Kryoröhrchen mit 0,5 ml PVS3-Lösung und verblieben 0 bis 300 Minuten darin, bevor sie in Flüssigstickstoff eingelagert wurden. Zum Schluss wurden die Knollen für 10 Minuten in Unloading solution inkubiert [Makowska et al., 1999].

Die Forschungsarbeit von Senula et al. [2018] führte die Vitrifikation sowohl mittels PVS3, als auch mittels PVS2 an verschiedenen *Mentha*-Arten durch. Die Versuche mit PVS3 zeigten dabei eine bessere Regeneration, als die, welche mit PVS2 kryokonserviert wurden.

Aus den dargelegten Ergebnissen mit PVS3 bei verschiedenen Pflanzenarten geht hervor, dass der Einsatz von PVS3 durchaus zur erhöhten Regeneration beitragen kann. Dennoch sollte bei weiterführenden Arbeiten mit *Prunus* zunächst die weitere Testung von PVS3 nicht im Vordergrund stehen.

### **6.3 Hyperhydrizität**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Wildarten-Akzessionen zeigten Sprossspitzen mit einer sogenannten Hyperhydrizität, oder Vitrifikation genannt (Abbildung 21). Dabei handelt es sich um eine physiologische Störung des Pflanzenmaterials. Diese reduziert die Vermehrung und führt im schlimmsten Falle zum kompletten Absterben des Pflanzengewebes [Rojas-Martinez et al., 2010].

Diese Störung kann verschiedene Ursachen besitzen, jedoch liegt die naheliegendste darin, dass die Sprossspitzen bereits während der Kälteadaptation und nach der



Kryokonservierung hohem oxidativem Stress ausgesetzt sind. Dieser Stress führt zu einer Hypoxie, wobei sich Staunässe in den Apoplasten bildet [Rojas-Martinez et al., 2010]. Besonders nach der Kältevorbereitung zeigten sich die ersten größeren Wassereinlagerungen [siehe 6.1.1].

## 7 Ausblick

### 7.1 PVS-2-Versuche

Die Kryokonservierung der Sprossspitzen von den verwendeten *Prunus*-Wildarten ist grundsätzlich möglich. Um die Regenerationsrate zu steigern, muss die Methode in zukünftigen Arbeiten jedoch optimiert werden.

In der folgenden Tabelle sind alle derzeit möglichen Optimierungsvorschläge, welche im Abschnitt 6 diskutiert wurden, zusammengefasst.

**Tabelle 15: Ausblick über Optimierungen der einzelnen Versuchsabschnitte von den PVS2-Versuchen**

<u>Versuchsabschnitt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zusammensetzung</u>
<u>Kälteadaption</u>	1-7 Tage	22 °C für 8 h bei Licht, -1 °C für 16 h ohne Licht  22 °C für 8 h bei Licht, 4 °C für 16 h ohne Licht	-
<u>Medium mit DMSO</u>	48 h  24 h  24h	-	5 % DMSO, 2 % Prolin  5 % DMSO  5 % DMSO, 2 % Prolin
<u>Loading solution</u>	15 Minuten	Raumtemperatur	wie in Versuchsdurchführung
<u>PVS2</u>	2,5 h  2,5 h	Raumtemperatur  Eis	wie in Versuchsdurchführung
<u>Unloading solution</u>	2 x spülen  3 x spülen  20 Minuten	Raumtemperatur	wie in Versuchsdurchführung

Für eine zukünftige Weiterarbeit an dieser Thematik, sollten, wie in der oberen Tabelle dargestellt, die Abschnitte Kälteadaption, das Medium für die Vorbereitung der Sprossspitzen und die Inkubationszeiten, beziehungsweise die Temperaturen, der verwendeten Vitrifikationslösungen und der Unloading solution verändert werden. Jedoch sollten diese Anpassungen vorerst einzeln und nicht in Kombination miteinander bearbeitet werden, da die verwendeten Wildarten sehr empfindlich auf kleinste Veränderungen reagieren.

Die Versuche sollten mit den in dieser Arbeit verwendeten Wildarten-Akzessionen und den Optimierungsvorschlägen wiederholt und gegebenenfalls mit weiterer Genotypen durchgeführt werden.

## **7.2 PVS-3-Versuche**

Die durchgeführten Versuche mit der PVS3-Methode erbrachten noch keinen Erfolg. Lediglich die letzte Methode mit einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden bei Raumtemperatur und einer Einwirkzeit der Unloading solution von 30 Minuten könnte erfolgreicher als die vorherigen Versuche sein. Um eine genauere Aussage dazu treffen zu können, müssen weitere Bonituren bei diesem Versuch durchgeführt werden.

Für zukünftige Versuche an der PVS3-Methode, kann in Erwägung gezogen werden, die Inkubationszeit von der PVS3-Lösung mittels einem Schüttler bei 90 rpm zu unterstützen. Des Weiteren könnte die Inkubationszeit der Unloading solution verlängert werden. Die Versuche mit der PVS3-Methode und den aufgezählten Optimierungsvorschlägen sollten an PRU0135 wiederholt und gegebenenfalls mit weiteren Genotypen durchgeführt werden.

## **8 Zusammenfassung**

Durch die stetige Abnahme der Biodiversität auf der Erde, aufgrund von direkten und indirekten anthropogenen Einflüssen, müssen Möglichkeiten zur Erhaltung der genetischen Vielfalt gefunden werden. Mit Hilfe des Verfahrens der Kryokonservierung kann die Vitalität der Zellen nahezu unbegrenzt erhalten bleiben und bewahrt somit die genetische Vielfalt von besonderen Sorten und Wildarten. Dieses Ziel verfolgt das JKI in Dresden-Pillnitz. Das Pflanzengewebe wird bei dieser Methode in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von  $-196\text{ °C}$  und unter Verwendung von Kryoprotektiva konserviert. Diese Variante erweist sich allerdings nur dann als effektiv, wenn das konservierte Gewebe nach dem Auftauprozess wieder lebensfähig ist.

Ziel der Versuche ist, die Methode der Kryokonservierung mittels PVS2-Vitrifikation bei *Prunus* zu etablieren. Dabei wird die Dauer der Kälteadaption variiert. Parallel dazu wird die PVS3-Methode bei der *Prunus*-Wildart PRU0135 bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen betrachtet. Bei beiden Methoden wird der Einfluss auf die Regenerationsrate der Sprossspitzen untersucht. Pro Versuch wurden 20 Sprossspitzen der Wildarten PRU0027, PRU0037, PRU0088 und PRU0135 verwendet. Nach der Kryokonservierung wurden diese auf neues Nährmedium gesetzt.

Die PVS2-Versuche wurden bei allen vier Wildarten-Akzessionen durchgeführt. Dabei betrug die Regenerationsrate insgesamt zwischen 5 und 85 %. Die erfolgreichsten Ergebnisse wurden nach zwei und drei Wochen Kälteadaption erzielt. PRU0027 zeigte eine Regenerationsrate von 25 % nach einer Kälteadaption von zwei Wochen. Die parallel mitgeführte Präparationskontrolle von PRU0027 zeigte eine Regenerationsrate von 90 %. Somit kann eine fehlerhafte Isolation der Sprossspitzen ausgeschlossen werden.

Die *Prunus*-Wildart PRU0037 erreichte eine Regenerationsrate von 5 % nach drei Wochen Kälteadaption. PRU0088 erzielte nach drei Wochen Kälteadaption eine Regenerationsrate von 10 %.

Die besten Ergebnisse erzielte der Versuch an der Wildarten-Akzession PRU0135. Hier lag die Regenerationsrate, nach einer Kälteadaption von drei Wochen, bei 85 %.

Die durchgeführten PVS3-Versuche zeigten bei den bisher durchgeführten Bonituren keine Erfolge. Lediglich die erste Bonitur des Versuches, mit einer Inkubationszeit des PVS3 von 2,5 Stunden bei Raumtemperatur und einer Einwirkzeit der Unloading solution

von 30 Minuten, zeigt grüne Sprossspitzen mit beginnendem Blattwachstum. Die Bonituren dieses Versuches müssen weitergeführt werden, um mögliche Entwicklungen zu erkennen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Wildarten-Akzessionen zeigten Sprossspitzen mit einer sogenannten Hyperhydrität. Besonders nach der Kälte Vorbereitung zeigten sich die ersten größeren Wassereinlagerungen in den verwendeten Sprossen. Aufgrund dieser Beobachtungen in den Sprossen nach der Kälteadaptation, könnte die Dauer dieser, genotypabhängig und zu lang sein.

Sowohl die PVS2- als auch die PVS3-Versuche sollten in weiteren Forschungen wiederholt werden und gegebenenfalls auf weitere Genotypen erweitert werden. Des Weiteren können Optimierungen in der Kälteadaptation, dem Medium und den Inkubationszeiten der verwendeten Lösungen zu einem positiven Ergebnis beitragen.

## **9 Summary**

Because of the steady decline in biodiversity on Earth, due to direct and indirect anthropogenic influences, means must be found to preserve genetic diversity. With the help of the cryopreservation process, the vitality of the cells can be maintained almost indefinitely, thus preserving the genetic diversity of special varieties and wild species. This is the aim of the JKI in Dresden-Pillnitz. This method preserves plant tissue in liquid nitrogen at -196 °C using cryoprotective agents. However, this variant only proves to be effective if the conserved tissue is viable again after the thawing process.

The aim of the experiments is to establish the method of cryopreservation by means of PVS2 vitrification in *Prunus*. The duration of the cold adaptation is varied. Parallel to this, the PVS3 method is examined in *Prunus* wild species PRU0135 at different incubation times and temperatures. In both methods the influence on the regeneration rate of the shoot tips is investigated. For each experiment, 20 stem tips of wild species PRU0027, PRU0037, PRU0088 and PRU0135 were used. After cryopreservation, they were placed on a new medium.

The PVS2 trials were conducted at all four wild species accessions. The overall regeneration rate was between 5 and 85%. The most successful results were obtained after two and three weeks of cold-hardening. PRU0027 showed a 25% regeneration rate after two weeks of cold-hardening. The parallel preparation control of PRU0027 showed a regeneration rate of 90%. Thus, a faulty insulation of the shoot tips can be excluded. *Prunus* wild species PRU0037 achieved a regeneration rate of 5% after three weeks of cold-hardening. PRU0088 achieved a regeneration rate of 10% after three weeks of cold-hardening.

The best results were obtained by the experiment on the wild species accession PRU0135. Here, the rate of regeneration, after a cold-hardening of three weeks, was 85%. The PVS3 tests carried out did not show any success with the credit ratings carried out so far. Only the first bonitur of the experiment, with an incubation time of the PVS3 of 2,5 hours at room temperature and an incubation of the unloading solution of 30 minutes, shows green shoots with beginning leaf growth. The ratings of this experiment must be continued in order to identify possible developments.

All wild species accessions used in this work showed shoot tips with a so-called hyperhydricity. Especially after the refrigeration preparation, the first large water retention in the sprouts used appeared. Based on these observations in the sprouts after cold-hardening, the duration of cold-hardening may be genotype-dependent and too long. Both the PVS2 and PVS3 experiments should be repeated in further research and, if necessary, extended to additional genotypes. Furthermore, optimizations in the cold-hardening, the medium and the incubation times of the solutions used can contribute to a positive result.

## Literaturverzeichnis

Alscher, Annika; Berger, Gert; Bethwell, Claudia; Brühl, Carsten A.; Graef, Freider; Hahn, Melanie et al. (2015): *Protection of Biodiversity in the Risk Management of Pesticides (Plant Protection Products & Biocides) with a Focus on Arthropods, Soil Organisms and Amphibians*. Online verfügbar unter [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte\\_76\\_2015\\_protection\\_of\\_biodiversity\\_in\\_the\\_risk\\_management\\_of\\_pesticides.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte_76_2015_protection_of_biodiversity_in_the_risk_management_of_pesticides.pdf), zuletzt geprüft am 02.08.2021.

Barraco, Giuseppe; Chatelet, Philippe; Balsemin, Emilie; Decourcelle, Thibaut; Sylvestre, Isabelle; Engelmann, Florent (2012): *Cryopreservation of Prunus cerasus through vitrification and replacement of cold hardening with preculture on medium enriched with sucrose and/or glycerol*. In: *Scientia Horticulturae* 148, S. 104–108. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.09.034.

Bärtels, Andreas (2017): *Steinobst. Blüten und Früchte*. 1. Auflage. Bern: der sachbuchverlag ott-verlag ag.

Berger, A. (2013): UNCED - RÖMPP, Thieme. Hg. v. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. Online verfügbar unter <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-21-00451?context=keyword&contextId=RD-02-01509#>, zuletzt aktualisiert am 09.08.2021, zuletzt geprüft am 09.08.2021.

Boucaud, Marie-Thérèse de; Brison, Marthe; Heliott, Bertrand; Hervé-Paulus, Valérie (2002): *Cryopreservation of Prunus*. In: Leigh E. Towill und Y. P. S. Bajaj (Hg.): *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer eBook Collection, 50), S. 287–311.

Brison, Marthe; Boucaud, Marie-Thérèse de; Dosba, Françoise (1995): *Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific Prunus rootstocks*. In: *Plant Science* 105 (2), S. 235–242. DOI: 10.1016/0168-9452(94)04045-1.

Carlo, A. de; Benelli, C.; Lambardi, M. (2000): *Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (Prunus domestica L.) cryopreservation*. In: *Cryo letters* 21 (4), S. 215–222. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12148038/>.

Channuntapipat, Chockpisit; Collins, Graham; Bertozzi, Terry; Sedgley, Margaret (2000): *Cryopreservation of in vitro almond shoot tips by vitrification*. In: *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75 (2), S. 228–232. DOI: 10.1080/14620316.2000.11511228.



Hanke, Magda-Viola; Flachowsky, Henryk (2017): *Obstzüchtung und wissenschaftliche Grundlagen*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (Lehrbuch).

Helliot, Bertrand; Boucaud, Marie-Thérèse de: *Effect of various parameters on the survival of cryopreserved prunus Ferlenain in vitro plantlets shoot tips*. In: *Cryo letters* 1997 (18), S. 133–142. Online verfügbar unter <https://iifir.org/en/fridoc/effect-of-various-parameters-on-the-survival-of-cryopreserved-prunus-109367>, zuletzt geprüft am 26.01.2022.

Helliot, Bertrand; Brison, Marthe; Boucaud, Marie-Thérèse de (1997): *Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of an interspecific Prunus rootstock by slow prefreezing method*. In: *Hort. Biotech. In Vitro Cult. and Breeding* 1997 (447).

Heß, Dieter (1992): *Biotechnologie der Pflanzen. Eine Einführung*. Stuttgart: Ulmer (UTB für Wissenschaft Große Reihe Biologie, Agrarwissenschaften).

Höfer, M. (2007): *Obstzüchtung: Kirschen - Vielfalt erhalten*. In: *Obst & Garten* (8), S. 290–292.

Höfer, M.; Flachowsky, H. (2021): *Preservation of fruit genetic resources in Germany*. In: *Acta Hort.* 1307 (1307), S. 163–170. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1307.26.

Höfer, M.; Hanke, Magda-Viola (2014): *10 Jahre Obstgenbank Dresden-Pillnitz in der Verantwortlichkeit der Bundesforschung*. In: *JfK* 66 (4), S. 117–129. Online verfügbar unter <https://ojs.openagrar.de/index.php/Kulturpflanzenjournal/article/view/12512>.

Höfer, Monika (2010): *Cryoconservation strategy of fruit genetic resources in Germany*. In: *Cryo-letters* 31 (1), S. 83–84. Online verfügbar unter [https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00008676](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00008676).

Höfer, Monika (2016): *Cryopreservation of in vitro shoot tips of strawberry by the vitrification method - establishment of a duplicate collection of Fragaria germplasm*. In: *Cryo letters* 37 (3), S. 163–172. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27393953/>.

Höfer, Monika; Flachowsky, Henryk (2020): *Erhaltungskonzept der Wildartensammlungen der Obstgenbank Dresden-Pillnitz – Aktivsammlung, Kryokonservierung, Global Seed Vault*. 466-472 Seiten / *Journal für Kulturpflanzen*, Bd. 72 Nr. 9 (2020). In: *Journal für Kulturpflanzen* 72 (9). DOI: 10.5073/JfK.2020.09.02.

- Höfer, Monika; Reed, B. (2011): *Cryopreservation of strawberry genetic resources in Germany*. In: IIIrd International Symposium on Plant Genetic Resources; Lisbon, Portugal; 2010.08.22-27, S. 139–146. Online verfügbar unter [https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00008528](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00008528).
- Kadereit, Joachim W.; Körner, Christian; Kost, Benedikt; Sonnewald, Uwe (2014): *Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*. 37. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Kim, Jung-Bong; Kim, Haeng-Hoon; Baek, Hyung-Jin; Cho, Eun-Gi; Kim, Yong-Hwan; Engelmann, Florent (2005): *Changes in sucrose and glycerol content in garlic shoot tips during freezing using PVS3 solution*. In: *Cryo letters* 26 (2), S. 103–112. Online verfügbar unter [https://www.researchgate.net/publication/7843482\\_Changes\\_in\\_sucrose\\_and\\_glycerol\\_content\\_in\\_garlic\\_shoot\\_tips\\_during\\_freezing\\_using\\_PVS3\\_solution](https://www.researchgate.net/publication/7843482_Changes_in_sucrose_and_glycerol_content_in_garlic_shoot_tips_during_freezing_using_PVS3_solution).
- L. I. Rojas Martinez; Richard G. F. Visser; Klerk de G. J. M (2010): *The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause*. In: *PROPAGATION OF ORNAMENTAL PLANTS* 10 (4), S. 169–175. Online verfügbar unter [https://www.researchgate.net/publication/241869171\\_The\\_hyperhydricity\\_syndrome\\_Waterlogging\\_of\\_plant\\_tissues\\_as\\_a\\_major\\_cause](https://www.researchgate.net/publication/241869171_The_hyperhydricity_syndrome_Waterlogging_of_plant_tissues_as_a_major_cause).
- Lenk, Erik: *Optimierung der Methode der Kryokonservierung bei Pyrus (Wildbirne)*. - 2020. – Verzeichnisse: S. I – VII, Inhalt: S. 1 – 47, Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2020
- Lieberei, Reinhard; Reisdorff, Christoph; Franke, Wolfgang (2012): *Nutzpflanzen*. 118 Tabellen. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Makowska, Z.; Keller, J.; Engelmann, Florent (1999): *Cryopreservation of apices isolated from garlic (Allium sativum L.) bulbils and cloves*. In: *Journal of the american mosquito control association* (15). Online verfügbar unter [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_6/b\\_fdi\\_49-50/010018253.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_49-50/010018253.pdf), zuletzt geprüft am 23.01.2022.
- Popova, Elena; Shukla, Mukund; Kim, Haeng Hoon; Saxena, Praveen K. (2015): *Plant Cryopreservation for Biotechnology and Breeding*, S. 63–93. DOI: 10.1007/978-3-319-22521-0\_3.
- Reed, Barbara M. (2000): *Genotype consideration in temperate fruit crop cryopreservation*. Online verfügbar unter [https://www.researchgate.net/publication/222714468\\_Genotype\\_consideration\\_in\\_temperate\\_fruit\\_crop\\_cryopreservation](https://www.researchgate.net/publication/222714468_Genotype_consideration_in_temperate_fruit_crop_cryopreservation).

- Reed, Barbara M. (2008): *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York, NY: Springer.
- Schmid, Rolf D. (2016): *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Unter Mitarbeit von Ruth Hammelehle. Dritte Auflage 2016. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Schmitz, Sabine (2020): *Der Experimentator: Zellkultur*. 4th ed. 2020. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer Spektrum (Experimentator).
- Schopfer, Peter; Brennicke, Axel (2010): *Pflanzenphysiologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Senula, A.; Büchner, D.; Keller, E. R. J.; Nagel, M. (2018): *An Improved Cryopreservation Protocol for Mentha spp. Based on PVS3 as the Cryoprotectant*. In: *Cryo letters* 39 (6), S. 345–353.
- Steinhardt, Samantha: *Etablierung der Methode der Cryokonservierung bei Pyrus (Wildbirne)*. - 2019. – 13, 53, 26 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2019
- Thanheiser, M. (2007): biologische Vielfalt - RÖMPP, Thieme. Hg. v. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. Online verfügbar unter <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-02-01509?context=keyword&contextId=RD-02-01402#>, zuletzt geprüft am 09.08.2021.
- Wang, Min-Rui; Zhang, Zhibo; Zámečník, Jiří; Bilavčík, Alois; Blystad, Dag-Ragnar; Haugslie, Sissel; Wang, Qiao-Chun (2020): *Droplet-vitrification for shoot tip cryopreservation of shallot (Allium cepa var. aggregatum): effects of PVS3 and PVS2 on shoot regrowth*. In: *Plant Cell Tiss Organ Cult* 140 (1), S. 185–195. DOI: 10.1007/s11240-019-01721-4.
- Weiler, Elmar W.; Nover, Lutz; Nultsch, Wilhelm (2008): *Allgemeine und molekulare Botanik*. 30 Tabellen. Stuttgart: Thieme.

Anhang

Tabelle 16: Literaturtabelle 1

Literatur	Art	Material	Kältevorbehandlung	Cryo-Methode	Einfrieren	Auftauen	Ergebnisse
Channuntajapat et al., 2000	2 Mandelsorten und 1 Mandel/Pfirsich Hybrid	3 Wochen alte in-vitro Kultur in (1) <b>MS-Medium</b> (Murashige and Skoog, 1962) mit 0,01 mg/l IBA, 1 mg/l BAP, 0,088 M Saccharose und 0,7% (w/v) Agar oder (2) AP-Medium (Almeidi and Parfitt, 1986) mit 0,049 µM IBA, 3,1 µM BAP, 0,058 M Saccharose und 0,7% (w/v) Agar	<b>3 Wochen bei 4 °C</b>	(one-step) vitrification	(1) Sprossspitzen isolieren nach Niino 1992, 1997 (2) in <b>1 ml PVS2</b> geben (in Cryotubes) und bei <b>25 °C für 150 Min.</b> inkubieren (3) danach Sprossspitzen in <b>0,5 ml PVS2 transferieren</b> und anschließende Lagerung in LN (für 3 Tage)	(1) <b>Wasserbad 30 °C</b> und <b>2x waschen</b> mit MS- oder AP-Medium (mit 1 M Saccharose) (2) restliche Lösung an Sprossspitzen mit Filterpapier entfernen (3) auf Medium setzen	87,5 % bei 45 Min. Inkubation in PVS2; 30 % ohne Inkubation; Regenerationsrate zwischen <b>60 und 87,5 %</b>
Carlo et al., 2000	<i>Prunus domestica</i> L. (Pflaume)	<b>QP-Medium</b> mit 0,09 M Saccharose, 0,7 mg/l BA, 0,05 mg/l GAs und 0,05 mg/l NAA, Kultivierung bei 23 °C (± 1) bei einer 16 h Photoperiode	<b>2 Tage bei 4 °C</b> auf 0,09 M Saccharose enthaltenes Quorin und Le Poivre Medium	(one-step) vitrification	-	-	<b>57%</b>
Barraco et al., 2012	2 Sorten von <i>Prunus cerasus</i> L.	<b>MS-Medium</b> mit 30 g/l Saccharose, 7 g/l Agar, 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GAs	(1) 3 Wochen bei 20 °C für 8 h und 3 °C für 16 h (2) danach Sprossspitzenisolation und Transfer auf Woody Plant Medium mit 0,8 M Glycerin für <b>3 Tage bei 4 °C</b>	Vitrification	(1) 10 - 12 Spitzen in Cryotube geben und mit <b>1 ml loading solution</b> für 25 Min. bei RT lagern (2) danach in PVS2 für <b>240 Min bei 0 °C</b> (3) anschließend in LN	(1) <b>1 Min.</b> in Wasserbad bei <b>42 °C</b> (2) <b>10 s</b> in Wasserbad bei <b>20 °C</b> (3) PVS2 abpipettieren und <b>3 Mal mit Unloading solution</b> spülen (4) <b>3 Minuten</b> in der letzten Spülung verweilen (5) auf Filter abtupfen und auf Medium setzen (6) <b>3 Tage Dunkelheit</b> , anschließend Licht	zwischen <b>41 und 63 %</b>

Tabelle 17: Literaturtabelle 2

Literatur	Art	Material	Kältevorbehandlung	Cryo-Methode	Einfrieren	Auftauen	Ergebnisse
Boucaud et al. 2002	<i>Prunus persica</i> (Pfirsich)	MS-Medium mit 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA <sub>3</sub> und 30 g/l Saccharose und 7 g/l Agar, pH 5,6	(1) 1-2 Wochen nach Mediumwechsel für 1-6 Tage in Kältevorbereitung bei 4 °C (2) nach Sprossspitzenisolation 24 h bei 4 °C auf Medium mit 5 % DMSO	Two-step cooling, Encapsulation-dehydration, Vitrification	-	-	40-74 %
Brison Boucaud et al. 1994	<i>Ferrey-Iaspi, Ferrenain-Plumina</i>	MS-Medium mit 1 mg/l BAP, 0,05 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA <sub>3</sub> , 30 g/l Saccharose, 7 g/l Agar und pH 5,4	(1) 2 Wochen nach Mediumwechsel für 6 Tage in Kältevorbereitung bei 23 °C Tag und 4 °C in der Nacht (2) Isolation der Sprossspitzen und Inkubation für 24 h bei selben Bedingungen auf Medium (4,4 µM BAP, 4,9 µM IBA) mit 5 % DMSO und 2 % Prolin	Vitrification	(1) 12-15 Sprossspitzen in 1 ml Cryotube auf Eis mit abgeändeter PVS2 Lösung (12,5 % DMSO, 15 % Ethylenglycol, 25 % Glycerin, 3 % Polyethylen glycol und 0,4 M Saccharose), 20-40 Minuten bei RT (2) 0,5 ml entfernen und direkt in Flüssigstickstoff geben ODER two-step cooling bei 0,5 - 1 °C/min bis -40 °C und dann in LN	(1) Wasserbad bei 40 °C für 1 Min. und anschließend mit 1/2 MS Medium mit 1,2 M Saccharose gespült (2) ausgespülte Sprossspitzen auf Wachstumsmedium mit 0,0875 mg/l IBA (3) 48 h ins Dunkel, danach leichte Belichtung	69-74 %
Helliot et al. 1997	Ferrenain-Plumina	verändertes MS Medium (keine weitere Angaben), 23 °C für 16 h tagsüber, 18 °C für 8 h nachts, neues Medium aller 1 Monat	24 h bei 4 °C auf MS-Medium mit 5 % DMSO und 20 % Prolin	Slow Prefreezing Method	(1) PVS2 Lösung mit 5 % Prolin auf die Sprossspitzen geben und für 45 Min bei 4 °C einwirken lassen (ungenaue Angaben in Paper) (2) 5 °C/min herunterkühlen bis -40 °C und halten bis 45 Min. Einwirkzeit abgelaufen sind (3) in LN	(1) direkt in Wasserbad bei 40 °C erwärmen (keine zeitlichen Angaben) (2) zwei mal mit 1,2 M Saccharose Lösung spülen (3) auf MS-Medium setzen und 4-5 Tage in Dunkelheit stellen	keine Angaben
Helliot Boucaud 1997	Ferrenain Plumina	MS-Medium mit 1 mg/l BAP, 0,05 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA <sub>3</sub> , pH 5,3	24 h bei 4 °C auf MS-Medium mit 5 % DMSO und 20 % Prolin	Slow Prefreezing Method	(1) 1 ml PVS2 Lösung mit 5 % Prolin für 45 Min bei 4 °C (2) 5 °C/min herunterkühlen bis -40 °C (3) nun in LN	(1) in Wasserbad bei 40 °C erwärmen (2) zwei mal mit Saccharose Lösung (1,2 M) spülen (3) auf MS-Medium setzen und 2-3 Tage in Dunkelheit stellen	50-60 %

Tabelle 18: Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Versuche

Genotyp	Medium	Anz. Gläser in Schrank	Umsetzen	In Schrank stellen (Datum fragen)	Anz. Wochen	Isolieren	In Cryo	Kontrollen aus Cryo	Kontrollen in Kulturraum ohne Licht	Kontrollen in Kulturraum ins Licht	
1. Woche (16. Aug.)	PRU0037	AKV1	1	16. Juli	02. Aug	2	17. Aug	19. Aug	26. Aug	26. Aug - 02. Sep	02. Sep
2. Woche (23. Aug)	PRU0037	AKV1		16. Juli	02. Aug	3	24. Aug	26. Aug	02. Sep	02. Sep - 09. Sep	09. Sep
	PRU0088	AKV1	1	23. Juli	06. Aug	3	30. Aug	01. Sep	02. Sep	02. Sep - 09. Sep	09. Sep
3. Woche (30. Aug.)	PRU0135	AKV1	4	23. Juli	06. Aug	3	30. Aug	01. Sep	02. Sep	02. Sep - 09. Sep	09. Sep
4. Woche (6. Sep)	PRU0135	AKV1		23. Juli	06. Aug	4	06. Sep	08. Sep	09. Sep	09. Sep - 16. Sep	16. Sep
5. Woche (13. Sep.)	PRU0135	AKV1	3	19. Aug	01. Sep	2	13. Sep	15. Sep	23. Sep	23. Sep - 30. Sep	30. Sep
6. Woche (20. Sep)	PRU0027	AKV1	2	25. Aug	06. Sep	2	20. Sep	22. Sep	23. Sep	23. Sep - 30. Sep	30. Sep
	PRU0027	AKV1		25. Aug	06. Sep	3	20. Sep	29. Sep	30. Sep	30. Sep - 07. Okt	07. Okt
7. Woche (27. Sep.)	PRU0027	AKV1	2	25. Aug	06. Sep	3	27. Sep	29. Sep	30. Sep	30. Sep - 07. Okt	07. Okt
8. Woche (04. Okt.)											
9. Woche (11. Okt.)	PRU0037	AKV1	1	01. Sep	14. Sep	4	11. Okt	13. Okt	14. Okt	14. Okt - 21. Okt	21. Okt
10. Woche (18. Okt.)	PRU0088	AKV1	2	21. Sep	04. Okt	2	18. Okt	20. Okt	21. Okt	21. Okt - 28. Okt	28. Okt
11. Woche (25. Okt.)	PRU0135	AKV1	2	04. Okt	20. Okt	2	02. Nov	04. Nov	11. Nov	11. Nov - 18. Nov	18. Nov
12. Woche (01. Nov.)											
13. Woche (08. Nov.)	PRU0135	AKV1	2		01. Nov	2	16. Nov	18. Nov	25. Nov	25. Nov - 02. Dez	02. Dez
14. Woche (15. Nov.)											
15. Woche (22. Nov.)											
16. Woche (29. Nov.)	PRU0135	AKV1	1		15. Nov	2	29. Nov	01. Dez	02. Dez	02. Dez - 09. Dez	09. Dez
17. Woche (06. Dez.)	PRU0027	AKV1	1	25. Okt	08. Nov	4	07. Dez	09. Dez	16. Dez	16. Dez - 23. Dez	23. Dez
18. Woche (13. Dez)	PRU0135	AKV1	2		29. Nov	2	13. Dez	15. Dez	16. Dez	16. Dez - 23. Dez	23. Dez

Tabelle 19: Zeitlicher Ablauf und Werte der ersten und zweiten Bonitur

	Genotyp	Medium	Anz. Wochen	1. Bonitur 3 +1 Wochen	Anzahl gesamt	Braun (viel Kallus)	Grün	regeneriert	% regeneriert	2. Bonitur 7 Wochen	Anzahl	Braun	Grün	regeneriert	% regeneriert
1. Woche (16. Aug.)	<b>PRU0037</b>	AKV1	2	23. Sep	20	11	9	0	0,00	14. Okt	20	16	4	0	0,00
2. Woche (23. Aug.)	<b>PRU0037</b>	AKV1	3	30. Sep	20	17	3	0	0,00	21. Okt	20	17	2	1	5,00
3. Woche (30. Aug.)	<b>PRU0088</b>	AKV1	3	30. Sep	20	15	5	0	0,00	21. Okt	20	16	2	2	10,00
4. Woche (6. Sep.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	3	30. Sep	20	0	9	11	55,00	21. Okt	20	2	1	17	85,00
5. Woche (13. Sep.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	4	07. Okt	20	15	5	0	0,00	28. Okt	20	19	1	0	0,00
6. Woche (20. Sep.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2	21. Okt	20	20	0	0	0,00	ausgeschlossen					
7. Woche (27. Sep.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	2	21. Okt	20	6	11	3	15,00	11. Nov	20	6	9	5	25,00
8. Woche (04. Okt.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	Präparation	28. Okt	10	1	0	9	90,00						
9. Woche (11. Okt.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	3	28. Okt	20	7	12	0	0,00	18. Nov	20	10	10	0	0,00
10. Woche (18. Okt.)	<b>PRU0037</b>	AKV1	4	11. Nov	20	16	4	0	0,00	02. Dez	20	20	0	0	0,00
11. Woche (25. Okt.)	<b>PRU0088</b>	AKV1	2	18. Nov	20	20	0	0	0,00	ausgeschlossen					
12. Woche (01. Nov.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2	09. Dez	20	18	2	0	0,00	30. Dez	20	19	1	0	0,00
13. Woche (08. Nov.)			PVS3 Methode (20 St.) 2,5 h Eis, 20 Min. Unloading												
14. Woche (15. Nov.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2												
15. Woche (22. Nov.)			PVS3 Methode, 3,5 h Eis, 30 min. Unloading	23. Dez	20	16	4	0	0,00	13. Jan	20	20	0	0	0,00
16. Woche (29. Nov.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2	30. Dez	20	14	6	0	0,00	20. Jan	20	19	1	0	0,00
17. Woche (06. Dez.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	PVS3, 3,5 h auf Eis, 20 min. Unloading (20 St.) PVS3, 2 h RT, 20 min. Unloading (20 St.)		20	17	3	0	0,00		20	20	0	0	0,00
18. Woche (13. Dez.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	4	13. Jan	20	14	6	0	0,00	03. Feb					
	<b>PRU0135</b>	AKV1	2	13. Jan	20	11	9	0	0,00	03. Feb					
			PVS3 Methode, 2,5 h RT, 30 min. Unloading		20	11	9	0	0,00						

Tabelle 20: Zeitlicher Ablauf und Werte der dritten und vierten Bonitur

	Genotyp	Medium	Anz. Wochen	3. Bonitur 10Wochen	Anzahl	Braun	Grün	regeneriert	% regeneriert	4. Bonitur 13Wochen	Anzahl	Braun	Grün	regeneriert	% regeneriert
1. Woche (16. Aug.)	<b>PRU0037</b>	AKV1	2	04. Nov	20	16	4	0	0,00	25. Nov	20	17	3	0	0,00
2. Woche (23. Aug.)	<b>PRU0037</b>	AKV1	3	11. Nov	20	17	2	1	5,00	02. Dez	20	19	0	1	5,00
3. Woche (30. Aug.)	<b>PRU0088</b>	AKV1	3	11. Nov	20	17	1	2	10,00	02. Dez	20	18	0	2	10,00
4. Woche (6. Sep.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	3	11. Nov	20	2	1	17	85,00	02. Dez	20	3	0	17	85,00
5. Woche (13. Sep.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	4	18. Nov	20	19	1	0	0,00	09. Dez	20	20	0	0	0,00
6. Woche (20. Sep.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	2	02. Dez	20	12	3	5	25,00	23. Dez	20	15	0	5	25,00
7. Woche (27.Sep.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	3	09. Dez	20	20	0	0	0,00						
8. Woche (04. Okt.)															
9. Woche (11. Okt.)	<b>PRU0037</b>	AKV1	4												
10. Woche (18. Okt.)	<b>PRU0088</b>	AKV1	2												
11. Woche (25. Okt.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2	20. Jan						10. Feb					
12. Woche (01. Nov.)					20	20	0	0	0,00						
13. Woche (08. Nov.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2												
14. Woche (15. Nov.)															
15. Woche (22. Nov.)															
16. Woche (29. Nov.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2	10. Feb											
17. Woche (06. Dez.)	<b>PRU0027</b>	AKV1	4												
18. Woche (13. Dez.)	<b>PRU0135</b>	AKV1	2												



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 30.01.2022

A solid black rectangular box used to redact the signature of the author.

Charlotte Peiker