

**Aus dem Institut für Pflanzenernährung der  
Justus-Liebig Universität Gießen**

**Untersuchungen zum Einfluß von Bor  
auf die somatische Embryogenese  
bei *Daucus carota* L.**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)  
im Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökötrophologie  
und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig Universität Gießen**

**vorgelegt von**

**Kambiz Mashayekhi  
aus dem Iran**

**Gießen 2001**

Dekan: Prof. Dr. P. M. Schmitz

1. Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Neumann  
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Honermeier

Prüfer: Prof. Dr. R. Marquard  
Prüfer: Prof. Dr. K.-H. Kogel

Tag der Disputation: 05.Juli 2001

**VERWENDETE ABKÜRZUNGEN**

<b>ABA</b>	Abscisinsäure
<b>B5</b>	Nährmedium nach GAMBORG <i>et al.</i> (1968)
<b>B5<sup>+</sup></b>	B5-Nährmedium mit 2,4-D
<b>B5<sup>-</sup></b>	B5-Nährmedium ohne 2,4-D
<b>CV</b>	Zellvolumen (in ml nach Sedimentation)
<b>2,4-D</b>	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<b>FG</b>	Frischgewicht
<b>GA<sub>3</sub></b>	Gibberellinsäure
<b>IES</b>	Indol-3-Essigsäure
<b>ZR</b>	Zeatinribosid
<b>DHZ</b>	Dihydrozeatin
<b>IP</b>	Isopentenyladenin
<b>IPR</b>	Isopentenyladenosin
<b>NES</b>	Naphthylessigsäure
<b>NL</b>	Nährlösung nach NEUMANN (1995)
<b>PCV</b>	packed cell volume (in ml nach Zentrifugation)
<b>RpM</b>	Rotationen pro Minute
<b>sE</b>	somatische Embryogenese
<b>Std.</b>	Stunde
<b>TG</b>	Trockengewicht
<b>Var</b>	Variante

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1 Somatische Embryogenese	2
2.2 Bor und Bor-Bedarf von lebenden Systemen, insbesondere für das Pflanzenwachstum	5
2.2.1 Wirkung von Bor auf Kohlenhydrate	8
2.2.2 Wirkung von Bor auf Nukleinsäuren	9
2.2.3 Wirkung von Bor auf Wachstumsregulatoren	10
2.2.4 Einfluß von Bor auf die Zellwandsynthese	14
2.2.5 Borfunktion an Zellmembranen	15
2.2.6 Einfluß von Bor auf den Stickstoffmetabolismus	16
2.3 Anthozyane, insbesondere in Verbindung mit der somatischen Embryogenese	17
2.4 Fragestellung	21
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1 Anzucht der Versuchspflanzen	22
3.2 Nährlösung für die Gewebekultur	23
3.3 Kultivierung isolierten Gewebes von Keimpflanzen	25
3.4 Erstellung und Kultivierung einer B-Mangel-Suspensionskultur	26
3.5 Somatische Embryogenese in Petiolen und Wurzelexplantaten	27
3.6 Somatische Embryogenese in Suspensionskulturen	27
3.7 Bewertungsmethoden der somatischen Embryogenese	27
3.8 Histologische Untersuchungen	28
3.9 Mikroskopische Auswertung	29
3.10 Borbestimmung	29
3.11 Hormonanalysen	30
3.11.1 Die Bestimmung der Phytohormone durch die HPLC	31
3.12 Bestimmung der IAA-Oxidase-Aktivität	33
3.13 Anthozyan- und Chlorophyllmessung	33
3.14 Statistische Auswertung	34
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1 Borbestimmungen in Karottenexplantaten und in der Nährlösung sowie die Freisetzung von Bor aus Glas	35
4.2 Einfluß von Bor auf das Wachstum von Karotten-Keimpflanzen	36
4.3 Einfluß von Bor und Saccharose auf das Wachstum von Karottenpflanzen	39
4.4 Einfluß von Bor auf die somatische Embryogenese	44
4.4.1 Vorversuche mit Petiolenkultur	44
4.4.2 Vorversuche mit Suspensionskultur aus Petiolen	45
4.4.3 Untersuchung von Hormonen im Nährmedium und zum	

	Boreinfluß auf die somatische Embryogenese von Karotten-Petiolenkulturen während der Induktionsphase	47
4.4.4	Die Wirkung besonders hoher Borkonzentrationen während der Induktionsphase auf die Induktion somatischer Embryonen	62
4.4.5	Der Einfluß steigender Bor-Konzentrationen während der Induktionsphase auf den Anthozyan- und Chlorophyllgehalt	63
4.4.6	Borwirkung auf die somatische Embryogenese, Anthozyan- und Chlorophyll-Konzentration während der Realisierungsphase	64
4.4.7	Untersuchung verschiedener, auch höherer Borkonzentrationen, während der Realisierungsphase	65
4.5	Der Boreinfluß auf die Organogenese	77
4.6	Untersuchungen zum Phytohormonsystem der Explantate während der somatischen Embryogenese unter Boreinfluß	81
4.6.1	Einfluß von Bor auf die Konzentrationen einiger Phytohormone während der Induktions- bzw. Vermehrungsphase der somatischen Embryogenese	81
4.6.2	Einfluß von Bor auf die Konzentrationen einiger Phytohormone während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese	87
4.7	Einfluß von Bor auf die IES-Oxidaseaktivität während der somatischen Embryogenese	90
4.7.1	Einfluß von Bor auf die IES- Oxidaseaktivität im Verlauf der Vermehrungsphase der somatischen Embryogenese	90
4.7.2	Einfluß von Bor auf die IES- Oxidaseaktivität im Verlauf der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese	92
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
5.1	Borbestimmungen in Karottenexplantaten und in der Nährlösung sowie die Freisetzung von Bor aus Glas	95
5.2	Boreinfluß auf das Wachstum von Karotten-Keimpflanzen	95
5.3	Einfluß von Bor und Saccharose auf das Wachstum von Pflanzen aus in vitro-Samenkulturen	97
5.4	Einfluß von Bor während der Induktionsphase	98
5.5	Einfluß von Bor während der Realisierungsphase	102
5.6	Einfluß von Bor auf das Wachstum von Adventivwurzeln in Karottenpetiolen	105
5.7	Die Gehalte an Phytohormonen während der Induktions- bzw. Vermehrungsphase	106
5.8	Die Gehalte an Phytohormonen während der Realisierungsphase	107
5.9	Boreinfluss auf die IES-Oxidase	109
5.10	Anthozyane und somatische Embryogenese unter Einfluß von Bor	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>137</b>

## 1 EINLEITUNG

Die bis jetzt über die somatische Embryogenese durchgeführten Versuche haben eine entscheidende Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums für die Kulturen gezeigt. In den ersten Untersuchungen zur somatischen Embryogenese wurde z.B. der Kokosnußmilch als Komponente des Nährmediums eine große Bedeutung beigemessen (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958). Weitere Untersuchungen zeigten, daß sowohl für die Induktion der Embryogenese als auch für die Entwicklung der Embryonen die Kokosnußmilch durch ein genau definiertes Kulturmedium zu ersetzen war (Halperin und Wetherell, 1964). Bereits in diesen frühen Arbeiten wurde neben reduziertem Stickstoff die Bedeutung eines Auxins oder einer auxinähnlichen Substanz für die Induktion der somatischen Embryogenese erkannt (Reinert, 1959; Steward *et al.*, 1970).

In den Anfangsstadien der somatischen Embryogenese und der Gewebekultur fallen alle Einflüsse einer erneuten, sich später ergebenden Differenzierung weg, wodurch neutrales Untersuchungsmaterial, lebende Zellen der höheren Pflanzen im Gewebeverband, zur Verfügung stehen. Die Methode der Gewebekultur fand bisher weitgehend Verwendung in morphologischen und entwicklungsphysiologischen Untersuchungen. Die Tatsache, daß mit diesem Gewebematerial die Möglichkeit gegeben ist, physiologische Fragen unter Ausschaltung von Differenzierung und Transporteinflüssen an Zellen höherer Pflanzen im Gewebeverband zu untersuchen, führte zu dem Ergebnis, daß in der Pflanzenernährung und Pflanzenphysiologie das Problem der Mikronährstoffe an Bedeutung gewonnen hat (Neumann, 1962). Dieses Material ist geeignet, um den Einfluß des Elements Bor auf die pflanzliche Physiologie zu untersuchen, wobei vorerst nicht entschieden werden kann, ob die bei Gewebekulturen erhaltenen Ergebnisse auf die normale lebende Pflanze übertragbar sind.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Somatische Embryogenese

Die Verwendung der Totipotenzphänomene ist seit tausenden von Jahren, seit die asexuelle Vermehrung von Pflanzen durch die Menschen genutzt wird, bekannt.

Obwohl manche Pflanzenarten, wie z.B. *Citrus aurantium*, somatische Embryonen (d.h. die Embryonenentstehung und -entwicklung aus somatischen Zellen und nicht aus einem Fusionsprodukt von Gameten) bzw. apomiktischen Samen natürlicherweise produzieren, veröffentlichte vor ungefähr 90 Jahren Haberlandt (zit. nach Kohlenbach, 1984) seine Erkenntnisse, daß eine Herstellung von somatischen Embryonen aus somatischen Zellen möglich sein sollte, und seine Versuche mit isolierten Blattzellen führten zur Etablierung der in-vitro-Kultur (Kohlenbach, 1984). Daß die somatischen Embryonen, die sich aus somatischen Zellen differenzieren, strukturell und biochemisch den zygotischen Embryonen ähnlich sind, berichteten zum ersten Mal unabhängig voneinander Reinert (1958) und Steward *et al.* (1958). Sie forschten über die Bildung somatischer Embryonen in Suspensionskulturen von Wurzelexplantaten von *Daucus carota*.

Seit dieser Pionierarbeit über die somatische Embryogenese steigt die Anzahl von *in-vitro*-Systemen, in denen die somatische Embryogenese induziert werden kann. Zur Zeit ist die somatische Embryogenese ein weit verbreitetes Untersuchungssystem, und es wird von über 80 Spezies aus 33 Familien von Gymnospermen, Monocotylen und Dicotylen berichtet, die fähig sind, somatische Embryonen zu bilden (Ammirato, 1983; Behrendt, 1994), und die Anzahl der Veröffentlichungen steigt weiter an. Unter den Pflanzenfamilien, bei denen die somatische Embryogenese nachgewiesen wurde, scheinen Pflanzen aus den Familien der *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Ranunculaceae* und *Solanaceae* eine größere Bereitschaft zur somatischen Embryogenese mitzubringen als Gattungen anderer Familien (Raghavan, 1986).

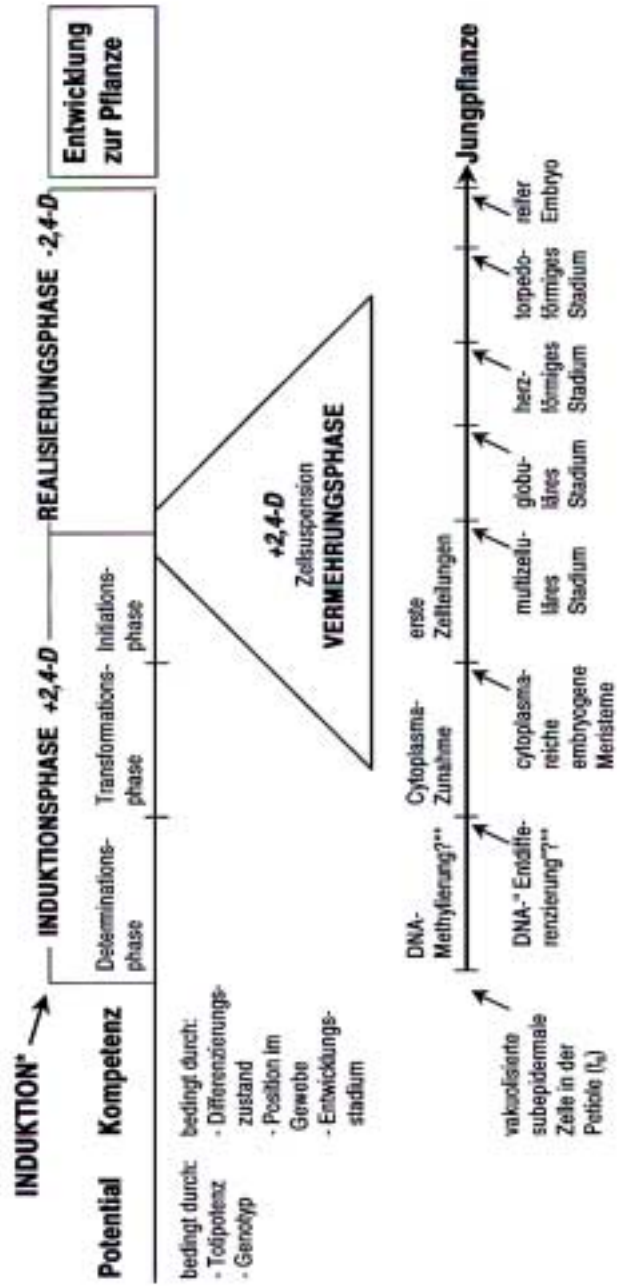
Ausgangsmaterial für embryogene Kulturen sind je nach Pflanzenart unterschiedliche Pflanzenteile bzw. -organe. Es sind dies z.B. für *Daucus carota L.*: Petiole (Fujimura

und Komamine 1975; LI und Neumann 1985; Schäfer et al. 1985), Hypokotyl (Kato 1968; Nomura und Komamine 1985), Blatt (Chen und Holden 1973), Primärwurzeln (Smith und Street 1974), die Vorratswurzel (Ammirato und Steward 1971; Neumann und de Garcia 1974), Blütenstiel (Halperin und Wetherell 1964), zygotische Embryonen (Steward et al., 1964) und auch somatische Embryonen (Ammirato und Steward, 1971). Embryonen können auch aus Axillarknospen, aus Blütenteilen einschließlich befruchteter und unbefruchteter Samenanlage, dem Endosperm, den Antheren und Mikrosporen gebildet werden (Tisserat et al., 1979).

Über die grundlegende Regulation der somatischen Embryogenese ist wenig bekannt. In jedem Fall sind daran verschiedene hormon-kontrollierte Prozesse beteiligt (Raghavan, 1986). Im allgemeinen sind zur Induktion und zur Erhaltung bzw. zur Vermehrung des embryogenen Potentials Auxine essentiell. Dagegen setzt die Embryonalentwicklung ein auxinreduziertes oder auxinfreies Medium voraus (Grieb, 1992; Neumann und Grieb, 1992).

Der Verlauf der somatischen Embryogenese kann in eine Induktionsphase und eine Realisierungsphase unterschieden werden. Zwischen diesen beiden Phasen kann eine Vermehrungs- und Erhaltungsphase eingeschoben werden (Grieb, 1992, Tran Thi, 2000, vgl. Abb. 1). In Anwesenheit von Auxinen setzt die Induktionsphase ein, die in Determinations-, Transformations- und Initiationsphase eingeteilt wird. Unter der Transformationsphase wird der histologisch nachweisbare Prozeß der intensiven Cytoplasmazunahme verstanden (Li und Neumann, 1985). Es gibt für die Determinationsphase keine direkten Nachweise (Mohr und Schopfer, 1992). Während der Initiationsphase teilt sich die transformierte cytoplasmareiche Zelle und folgt entweder einer direkten oder einer indirekten Entwicklung über multizellulare Stadien. Die Überführung der Explantate mit den embryogen kompetenten Zellen in ein auxinfreies Medium oder auxinreduziertes Medium ermöglicht dann die Embryonalentwicklung, an deren Ende der reife Embryo steht (Realisierungsphase) (Grieb, 1992; Grieb und Neumann, 1992).





\* Experimentiernahme und Überführung in ein Nährmedium mit Auxin  
 \*\* LeSchizavo et al. 1989

Abbildung 1: Hypothetisches Schema der somatischen Embryogenese auf zellulärem Niveau in Petiolen-  
 explantaten (NEUMANN und GRIEB 1992). (Die Abstände im Schema sind formal und sollen keine  
 zeitlichen Intervalle angeben.)

## 2.2 Bor und Bor-Bedarf von lebenden Systemen, insbesondere für das Pflanzenwachstum

Bor, dessen Verfügbarkeit in einer ausreichenden Menge für das normale Wachstum der höheren Pflanzen unentbehrlich ist (Rashid *et al.*, 1994; Shelp *et al.*, 1995; Wimmer und Goldbach, 1999), ist ein Mitglied der Gruppe der Metalloide, zu der auch Silizium und Germanium gehören. Diese Elemente stehen nach ihren Eigenschaften zwischen Metallen und Nichtmetallen und deshalb haben die meisten von ihnen viele verschiedene Funktionen in den Pflanzen. Das Boratom ist klein und hat nur drei Valenzen. In wässrigen Lösungen liegt Bor hauptsächlich in Form der schwachen Borsäure  $H_3BO_3$  (oder  $B(OH)_3$ ) vor. Bei dem in Nährlösungen vorherrschenden physiologischen pH-Wert  $<8$  findet man vorwiegend undissoziierte Borsäure, die bei der Aufnahme durch Wurzeln bevorzugt wird (Marschner, 1995). Die Bor-Absorption ist verständlicherweise pH-abhängig. Dementsprechend nimmt die Bor-Verfügbarkeit oberhalb des pH-Werts 6,3 bei weiterem pH Wert - Anstieg ab. Im pH-Bereich  $< 6,3$  hat demgegenüber der pH-Wert keinen Einfluß auf die Verfügbarkeit von Bor (Mengel, 1991).

Bor wird wahrscheinlich in undissoziierter Form von der Pflanze als  $H_3BO_3$  aufgenommen. Seine akropetale Beweglichkeit ist gut, wird aber erheblich von der Transpirationsintensität beeinflusst (Dell und Huang, 1997). Im Phloemsaft kommt Bor nicht vor, aus diesem Grund wird es aus den oberirdischen Pflanzenteilen nicht basipetal transportiert; Bor-Mangel tritt deshalb zuerst an den apikalen Meristemen auf. Bei überreicherlicher Bor-Ernährung wird Bor mit dem Transpirationswasser bis in die Spitzen und Ränder der Blätter transportiert. Hier kann es sich bis zur Toxizität anreichern. Junge Pflanzen sind befähigt, dieses überschüssige Bor mit den Guttationstropfen abzuscheiden (Mengel, 1991). Es ist bei den meisten Pflanzen einfach, durch Reduktion der Borgaben Bormangelsymptome zu induzieren, seine Funktion im pflanzlichen Stoffwechsel ist aber nicht restlos geklärt (Wimmer und Goldbach, 1999).

Zum ersten Mal wurde im Jahr 1923 ein Borbedarf bei der Ackerbohne durch Warington entdeckt. Danach bestätigten die Arbeiten von anderen Forschern, daß diese Erkenntnisse allgemein für die höheren Pflanzen gelten (Schilling, 2000). Durchschnittlich benötigen Dikotyledonen mehr Bor als Monokotyledonen (Pagel *et al.*, 1982). Ein typisches Bormangelsymptom ist in jedem Fall eine

Entwicklungsschädigung von meristematischen und jungen Pflanzenteilen. Bormangel zeigt sich zuerst als abnormales oder zurückgebliebenes Wachstum bei den apikalen Wachstumspunkten. Die Folge ist eine Schädigung der Vegetationskegel und der damit offenbar ausfallenden Apikaldominanz (Brown, 1979; Dell und Malajczuk, 1994, Ramirez und Linares, 1995). Bormangel beeinflusst das Wurzelwachstum und in einem Nährmedium ohne Bor ist das Wurzelwachstum gehemmt. Charakteristisch sind für Bormangelpflanzen gedrungene, verdickte Wurzeln mit nekrotischen Spitzen (Dell und Huang, 1997). Das klarste und beste Beispiel für Bormangel ist "die Herz- und Trockenfäule" bei Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) und Rettich (*Raphanus sativus*). Die Symptome beginnen mit einer anatomischen Veränderung der apikalen Wachstumspunkte. Die jungen Blätter krümmen sich nach innen und verfärben sich braun bis schwarz, ihr Wachstum wird geringer. Danach werden die älteren Blätter beeinflusst, die Hauptwachstumspunkte sterben ab (Mengel, 1987; Shelp *et al.*, 1995; Schilling, 2000). Bormangel bei Blättern zeigt sich wie folgt: Eingekrümmte, kleine, unregelmäßig geformte und verdickte, dunkel blaugrün gefärbte Blätter, manchmal unregelmäßige Chlorose zwischen den Intercostalvenen, Stauchung und Absterben der Vegetationskegel und das Austreiben von Achselknospen. Teile, die zu Beginn des Mangels schon voll ausgebildet sind, werden erst viel später, wahrscheinlich sekundär, geschädigt (Mengel, 1991; Dell und Malajczuk, 1994; Marschner, 1995).

Die Schädigung der Spitzenmeristeme und ihr frühzeitiges Absterben durch fortgeschrittenen Bormangel muß sich auch auf die generativen Teile der Pflanze auswirken. Bei schwächerem oder später eintretendem Mangel werden die generativen Teile wie Blüten und Früchte (Obst) geschädigt, die Samenbildung wird reduziert (Dell und Huang, 1997). Die Samen selber sind zwar relativ arm an Bor, im allgemeinen enthalten die generativen Organe der höheren Pflanzen aber relativ viel davon (Rerkasem *et al.*, 1997). Hier ist es dann wiederum der Pollen, der den größten Borgehalt aufweist. Bor hat einen starken Einfluß auf die Pollenkeimung und die Pflanzen, die in Bormangelmedium wachsen, zeigen eine Störung bei der Pollenkeimung und beim Fruchtansatz (Nyomora *et al.*, 1997). Bereits 1935 beobachtete Schmucker an tropischen Seerosen, daß für Keimung und Wachstum von Pollen Bor notwendig ist. O'Kelley (1957) stellte fest, daß Bor die Sauerstoff- und Zuckeraufnahme keimender Pollen fördert. Auch Vasil (1964) schreibt dem Bor eine Rolle in der Zuckerabsorption keimender Pollen zu. Bis heute bestätigen durchgeführte Untersuchungen die Erkenntnis von der Unentbehrlichkeit des Bors für das

Pollenschlauchwachstum (Obermeyer *et al.*, 1996; Dell und Huang, 1997; Shorrocks, 1997). Nach anderen Versuchen wurde deutlich, daß Verwendung von Borsäure als Spray (Benetzung der Blätter) oder über den Boden den Fruchtansatz fördert und dadurch der Ertrag von Beeren, Blumenkohl, Erdnüssen, Raps, Senf, Weizen, *Zizyphus mauritiana* LAMK und *Psidium guajava* L. steigert (Keerati *et al.*, 1993; Dahiya *et al.*, 1993; Kamble *et al.*, 1994; Nyomora *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Falls Pflanzen unter Bormangelbedingungen Früchte bilden, sind diese sehr klein und von niedriger Qualität (Gärtel, 1974; Marschner, 1995; Dell und Huang, 1997).

Ob auch niedere Pflanzen Bor brauchen, ist noch umstritten. Diatomeen und manche Spezies von Grünalgen benötigen Bor, für Pilze und Bakterien scheint es aber nicht notwendig zu sein (Dugger, 1983; Loomis und Durst, 1992). Es gibt hier die Ausnahme, daß einige Spezies der Cyanobakterien, die von der N<sub>2</sub>-Fixierung abhängig sind, Bor benötigen (Marschner, 1995).

Bei Mensch und Tier ist die Frage nach der Notwendigkeit von Bor besonders schwer zu entscheiden. Sie sind auf eine komplexe Kost angewiesen, aus der Bor nur schwierig zu entfernen ist. Neuere Versuche haben bewiesen, daß Bor ein wichtiger und notwendiger Nährstoff für Mensch und Tier ist (Nielsen, 1993; Nielsen, 1994; Fort, 1999). Es spielt eine wichtige Rolle sowohl im menschlichen als auch im tierischen Metabolismus sowie deren Physiologie und hat ebenfalls einen Einfluß auf die menschliche Psyche. Darüberhinaus beeinflusst es die Steroidhormone und den Mineralstoffmetabolismus. Besonders bedeutend ist es für den Calciummetabolismus und auch dafür, den Verlust von Calcium aus den Knochen zu verhindern, der häufig bei Frauen nach der Menopause und bei älteren Männern auftritt und Arthritis verursacht (Nielsen *et al.*, 1988; Nielsen, 1990; Newnham, 1991; Nielsen und Shuler, 1992; Naghii Und Samman, 1993; Nielsen, 1993; Nielsen, 1994; Penland, 1995; Penland, 1998; Fort, 1999).

Neben den Untersuchungen über die Auswirkung des Bormangels auf die Morphologie und Anatomie von Pflanzen wurden in den letzten Jahren zunehmend Arbeiten veröffentlicht, in denen versucht wurde, die Physiologie der Borwirkung aufzuklären (Blevins und Lukaszewski, 1994; Tanada, 1995; Goldbach, 1997; Cakmak und Romheld, 1997; Wang *et al.*, 1999; Schilling, 2000). Dabei wurde die Funktion des Bors im besonderen mit den Stoffgruppen und Zellbestandteilen, die in den nachfolgenden Kapiteln besprochen werden, in Verbindung gebracht.

### 2.2.1 Wirkung von Bor auf Kohlenhydrate

Die allgemeine Bedeutung der Borfunktion für den Kohlenhydratmetabolismus zeigt sich insbesondere bei der Synthese von Zellwandmaterial und beim Zuckertransport (Dugger, 1983; Hu et al., 1997; Matoh, 1997; Matoh und Kobayashi, 1998). Im Jahre 1953 beschrieben zum ersten Mal Gauch und Dugger, daß Bor bei höheren Pflanzen eine wichtige Rolle beim Zuckertransport durch Borat-Zucker-Komplexe spielt. Bormangelercheinungen wären nach ihrer Hypothese Ausdruck von Zuckermangel. Obwohl daraufhin zu diesem Thema viel geforscht wurde und manche Ergebnisse bis heute diese Hypothese unterstützen, ist es nicht sicher, daß Bor diese Funktion in jedem Fall erfüllt. Dugger et al. (1957) hielten es für wahrscheinlich, daß der verstärkte Zuckertransport bei Anwesenheit von Bor auf einer Herabsetzung der Stärkesynthese in den Syntheseorten beruht. Yih und Clark (1965) konnten bei Tomatenwurzeln keine Korrelation zwischen Kohlenhydraten und durch Bormangel unterbundenem Längenwachstum feststellen. Iwata et al. (1969) fanden auch keine Abhängigkeit im Zuckergehalt der Blätter vom Borangebot. So erhöht etwa nach den Untersuchungen von Dixon et al. (1989) Bordünger den Gehalt an Kohlenhydraten in den Wurzeln und dadurch auch die Ausscheidung von Kohlenhydraten durch die Wurzeln. Bei *Citrus jambhiri* Lush führt dies zu einer höheren Wurzelkolonisation mit Mycorrhiza. Dies ist aber nicht unbedingt so zu interpretieren, daß Bor einen direkten Einfluß auf den Zuckertransport hat, sondern es ist denkbar, daß Bor Veränderungen beim Phenol- oder IES- Metabolismus in der Wirtspflanze bewirkt (Mitchell *et al.*, 1986). Dadurch wird die Erkennung zwischen Wirtspflanze und Mikroben beeinflusst und die Symbiose ermöglicht.

Wegen der schwachen Bindungskräfte zwischen Bor und Saccharose wurde jedoch eher die These akzeptiert, daß die Zuckerverteilung in den Pflanzen auf einen direkten Einfluß von Bor auf die Saccharosesynthese als auf eine Beeinflussung des Transports zurückzuführen ist (Mengel und Kirkby, 1987). Auf der anderen Seite kommt Bor, dessen akropetale Beweglichkeit gut ist, im Phloemsaft nicht vor und wird deshalb aus den oberirdischen Pflanzenteilen nicht oder nur wenig basipetal transportiert (Oertli und Richardson, 1970). Kürzlich wurde demonstriert, daß die Mobilität von Bor in verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich ist (Brown und Hu, 1996 ). Z.B. wurde durch Loria *et al.* (1999) berichtet, daß Bor in *Coffea arabica* phloemmobil ist. Kürzlich

wurde durch verschiedene Forscher berichtet, daß *Phaeophyta*- und *Fraxinus*spezies Mannitol und *Malus*-, *Prunus*-, *Pyrus* und *Sorbusspezies* Sorbitol transportieren, deshalb können diese Pflanzen Bor (als *cis-diol*-Verbindung) besser transportieren. Bei den meisten Gefäßpflanzen, die Saccharose, Raffinose o.a. transportieren, erfolgt der Bortransport nicht so leicht (Raven, 1980; Hanson, 1991 a&b; Picchioni *et al.*, 1995; Brown und Hu,1996; Hu *et al.*, 1997; Brown und Hu,1998; Brown *et al.*,1999).Trotz der zuvor angeführten Untersuchungen ist der Mechanismus des Bor-Sorbitol-Komplex-Transports noch nicht genau bekannt.

### **2.2.2 Wirkung von Bor auf Nukleinsäuren**

Eine Abnahme der Nukleinsäuregehalte und eine Verminderung ihrer Synthese einige Tagen nach dem Beginn eines Bormangels, sind ein deutlich dokumentiertes Phänomen nach Sholnik (1974). Eine DNA-Synthese-Hemmung wurde als primäres oder sekundäres Bormangel- Phänomen durch Ali und Jarvis (1988) beobachtet. Schon 1965 berichtete Albert, daß bei Bormangel der Gehalt an RNA (aber nicht der DNA-Gehalt) abnimmt. Abrol (1966) erklärt die RNA-Abnahme bei Bormangel durch eine erhöhte RNase-Aktivität, wie er sie in Sonnenblumenblättern finden konnte. Einen deutlichen Anstieg in der RNase-Aktivität bei Bormangel stellten auch Dave und Kannan (1980) fest. Mit Heparin, einem Inhibitor der RNase, wurde in Versuchen von Timashov (1969) jedoch das Auftreten von Bormangelsymptomen nur kurzfristig verzögert, das Absterben der Vegetationskegel wurde aber nicht verhindert. Johnson und Albert (1967) konnten durch den Zusatz von Purin- und Pyrimidinbasen die sonst von ihnen gefundene RNA-Abnahme und den Wachstumsstillstand bei Tomatenwurzeln unter Bormangelbedingungen unterdrücken. Hundt *et al.* (1970) konnten durch nachträgliche Borgaben zu Mangelpflanzen eine Aktivierung sowohl der DNA- als auch der RNA-Synthese induzieren. Auf die Zusammensetzung der RNA bezüglich der Basenanteile hat Bormangel aber offenbar keinen Einfluß (Hundt und Neubert, 1971). Für eine Rolle des Bors im Nukleinsäurestoffwechsel sprechen auch die Versuche von Shkolnik *et al.* (1965). Sie behandelten Sonnenblumensamen mit 8-Azaguanin. Die Keimpflanzen, die sich aus den so behandelten Samen entwickelten, sahen aus, als hätten sie Bormangel. Albert (1968) induzierte "Bormangelsymptome", wie beeinträchtigt Längenwachstum von Wurzeln, herabgesetzter RNA-Gehalt von Wurzelspitzen und morphologische

Veränderungen von Wurzel und Sproß, durch Gaben von 2-Thiouracil oder 6-Azauracil und auch durch Barbitursäure. Birnbaum *et al.* (1977) und Shelp (1993) konnten nachweisen, daß Zugaben von Uracil oder auch Orotsäure, einem Vorläufer des Uracils, Bormangel abschwächt. Da Pyrimidinbasen wie Uracil, Cytosin und Thymin direkte Bausteine für RNA und DNA sind, konnte Bormangel auch die Synthese der Nucleinsäuren hemmen. Nach Untersuchungen von Hundt *et al.* (1970), zeigte sich, daß die Borunterversorgung besonders den Anteil an RNA erniedrigte. Bei der Borwirkung auf DNA handelt es sich wahrscheinlich um einen sekundären Effekt, da auch nach Einstellung des Längenwachstums aufgrund von Bormangel die DNA-Synthese für ein paar Stunden weiterläuft. RNA wird dagegen schnell und stark durch Bormangel beeinflusst (Cohen und Albert, 1974). Über geringere RNA-Gehalte bei Bormangelgewebe aufgrund einer Erhöhung der RNase-Aktivität haben Dave und Kannan (1980) berichtet.

Nach Betrachtung der aufgeführten Versuche ist die Schlußfolgerung zu treffen, daß in den zitierten Arbeiten am häufigsten eine Abnahme des RNA-Gehalts in Bormangelpflanzen gefunden wurde, entweder als Folge herabgesetzten Aufbaus oder verstärkten Abbaus durch erhöhte RNase-Aktivität. Die DNA-Gehalte in den Bormangelpflanzen waren erhöht, erniedrigt oder unverändert. Die primäre Rolle von Bor im DNA- und RNA- Metabolismus ist kaum vergleichbar mit der sehr langsamen Hemmung der Wurzelelongation bei Gramineen-Species nach Einstellung der Borzufuhr (Shelp, 1993). Nach einem Bericht von Bonilla *et al.* (1997) war RNA in Bormangel-Wurzelknöllchen von *Phaseolus vulgaris* L. vorhanden. Aufgrund der teilweise widersprüchlichen Einzelergebnisse bei den Untersuchungen zur Auswirkung von Bormangel auf den DNA- oder RNA-Gehalt von Pflanzen erscheint die direkte Beziehung von Bor zum Nucleinsäurestoffwechsel nicht klar erkennbar. Offenbar ist die primäre Bor-Wirkung in einer Hemmung der Uracil-Synthese zu sehen (s. S.10).

### **2.2.3 Wirkung von Bor auf Wachstumsregulatoren**

Bormangel ist mit einigen morphologischen Veränderungen verbunden und verursacht Veränderungen bei der Gewebedifferenzierung (Lukaszewski und Blevins, 1996; LeNoble *et al.*, 1996). Ebenso wie für die Pollenkeimung ist Bor auch für alle anderen im Wachstum befindlichen Zellen unentbehrlich (Hu *et al.* 1996; Dell und Huang, 1997;

Wang *et al.*, 1999). Bereits 1923 beobachtete Warington bei der Ackerbohne das Anschwellen von Kambiumzellen und die Beendigung der Ausdifferenzierung zu Xylemgefäßen, wenn die Borversorgung unzureichend war. Auch Palser und McIlrath (1956) beobachteten bei Bormangel eine Zellveränderung im Kambium von Tomaten, Rüben und Baumwollpflanzen. Bei 49 getesteten Pflanzenarten konnte Bussler (1964) an allen außer Mais, Roggen, Weizen, Hafer und Kartoffeln Zellanhäufungen in der Kambiumregion beobachten. Eine gestörte Differenzierung von Kambiumderivaten zu Phloem und Xylem stellten Blaser *et al.* (1967) fest. Bei Abwesenheit von Bor im Substrat stellten Whittington (1957) und Neales (1959) an Wurzeln eine Abnahme bzw. das Aufhören von Zellteilungen fest. Ein anderes Beispiel ist die Arbeit von Robertson und Loughman (1974), die beobachteten, daß Bormangel eine Verminderung beim Längenwachstum zusammen mit Veränderungen bei der Zellteilung von Wurzeln verursacht. Bussler (1964) berichtet von einer Veränderung der Zellteilung in radialer Richtung, einer Veränderung bei der Vermehrung von Kambiumzellen und einer geschädigten Xylemdifferenzierung bei subapikalen Knospen von Bormangelpflanzen. Birnbaum *et al.* (1974) beobachteten, ähnlich wie bei der Wurzelverlängerung durch Borüberschuß, auch bei Baumwoll-Samenanlagen *in vitro* einen positiven Zusammenhang zwischen dem Längenwachstum der Baumwoll-Epidermalzellen und der Borkonzentration. Mikroskopische Untersuchungen bei Bohnenwurzeln (*Phaseolus vulgaris* L.) mit Bormangel zeigten drastische anatomische Veränderungen, vor allem im Bereich der Parenchyma (Bonilla *et al.*, 1997). Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß Bor bei der Zellstreckung eine größere Rolle spielt als bei der Zellteilung. Eine durch Bormangel verursachte anomale Anhäufung neu entstandener Zellen (im Kambiumbereich) kann nicht zu der Annahme führen, daß Bormangel die Zellteilung im allgemeinen fördert, sondern daß er einen indirekten Einfluß auf die Zellteilung bei kambialem Sproßgewebe hat und zu einer Schädigung oder Verhinderung der Xylemdifferenzierung führt. Ähnliche Symptome können auch bei mechanischer Schädigung des Sproß-Apikalmeristems auftreten (Marschner, 1995). Die Ähnlichkeit von Bormangel- und Überschusssymptomen mit der Wirkung von Pflanzenwachstumsregulatoren kann zu der Annahme führen, daß diese eine Widerspiegelung der Erhöhung oder Verminderung der Konzentrationen von endogenen Pflanzenhormonen darstellen. Eine andere Deutung sucht daher die primäre Rolle des Bors im Auf- und Abbau von Wachstumsregulatoren. Eaton (1940) berichtet, er habe an jungen Baumwollpflanzen die Wirkung von Bor in einem gewissen Ausmaß durch Indolylessigsäure ersetzen



können, und stellt die Hypothese auf, daß Bor zur Auxinsynthese notwendig sei. Brandenburg (1949) deutete Bormangel sogar als Folge von Auxinüberschuß. Bussler (1964) sah in den Symptomen an Sonnenblumen unter Bormangel eine Bestätigung dieser Deutung. Jaweed und Scott (1967) führten die Abnahme des RNA-Gehaltes von Sonnenblumenkeimpflanzen unter Bormangel auf eine Zunahme von IES zurück. Auch Slack und Coke (1966) hielten es für wahrscheinlich, daß Bormangel durch eine herabgesetzte Oxidation von IES deren Anreicherung verursacht. In vitro förderte  $H_3BO_3$  tatsächlich die Oxidation von IES durch Peroxidase in Meerrettichpflanzen. Auch das spricht gegen eine Herabsetzung der IES-Konzentration durch Bormangel. Jedoch fanden Jaweed und Scott (1967) bei Sonnenblume unter Bormangelbedingungen eine Senkung des Gehalts an Auxinen und erst sekundär eine Herabsetzung oder Veränderung der Indolylessigsäure-Oxidase-Aktivität. Bei einer Veränderung des Borgehaltes in Pflanzengewebe zeigt sich eine Veränderung der Aktivität oxydativer Enzyme, und eine höhere Aktivität der Polyphenol-Oxidase (Blevins und Lukaszewski, 1994; Marschner, 1995). Nach einer Arbeit über *Cucurbita pepo* L von Bohnsack und Albert (1977) hat sich gezeigt, daß sich im apikalen und subapikalen Wurzelbereich nach 6-9 Stunden ohne Borzufuhr die IES-Oxidase-Aktivität erhöht. Nach 24 Stunden lag die Oxidase-Aktivität im apikalen Teil 20 mal höher als in Pflanzen ohne Bormangel. IES-Verwendung bei Pflanzen mit Bor erhöht die IES-Oxidase-Aktivität im apikalen und subapikalen Bereich, behindert daher die Wurzelverlängerung und verursacht die gleichen Symptome wie Bormangel (Robertson und Lougham, 1974; Bohnsack und Albert, 1977; Goldbach, 1990; Bondok, 1996). Trotzdem ist es schwer, den genauen Zusammenhang zwischen Phytohormonen und der Borkonzentration zu erfassen, weil auch andere Faktoren einen ähnlichen Einfluß zeigen, z.B. hat das Flavonoid Quercetin einen hemmenden Einfluß auf den IES-Transport und beeinflusst damit dessen Konzentration im Gewebe. Außerdem hat Bor einen Einfluß auf den Phenolmetabolismus in dem Sinne, daß Phenol nicht nur die Zellstreckung behindert, sondern auch die radiale Zellteilung stimuliert und deshalb eine anatomische Veränderung verursacht, genauso wie sie bei IES zu beobachten ist (Svensson, 1971; Lewis, 1980; Pilbeam und Kirkby, 1983; Tang und De La Funte, 1986). Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß Unklarheiten in den Ergebnissen über Wechselbeziehungen zwischen Bor und Wachstumsregulatoren herrschen. Bei ausgeprägtem Bormangel werden nämlich die Vegetationskegel, die Syntheseorte für Wachstumsstoffe sind,

irreversibel geschädigt. Außerdem sind auch unsere Kenntnisse über die Rolle von Wachstumsregulatoren noch sehr lückenhaft.

Im Vergleich mit Auxin sind über die anderen Phytohormone im Hinblick auf Bor bisher erst wenige Untersuchungen veröffentlicht worden. In diesem Zusammenhang steht die Untersuchung von Skok (1968), in der Bor mit anderen pflanzlichen Regulatoren in Verbindung gebracht wurde. Hierbei ergab sich bei GA-Applikation an dekapitierten Tabakpflanzen eine geförderte Xylemproduktion, während sie durch Bormangel deutlich gehemmt wurde. Parmar und Hammond (1971) konnten durch GA und Bor das Altern von Blattstücken verlangsamen, wobei sich die Wirkung der beiden Substanzen addierte. Nowak und Czapla (1995) haben hohe Bor-Konzentrationen mit Gibberellinsäure in Verbindung gebracht. Hierbei ergab sich bei GA-Applikation an Sojabohnenpflanzen ein gefördertes Wachstum, während es durch Bor-Toxizität gehemmt wurde. Die Ergebnisse eines durch Bondok (1996) durchgeführten Versuches über den Cytokinin-Gehalt bei Zuckerrüben (unter Verwendung des Gurken-Cotyledonen-Essay) haben gezeigt, daß die Cytokinin-Konzentration im Wurzelextrakt zweimal höher war als im Sproßextrakt, und sowohl im Sproß als auch in den Wurzeln bei Erhöhung der Borkonzentration eine Cytokininsteigerung beobachtet wurde. Von dem gleichen Autor durchgeführte Untersuchungen (nach dem *Lactuca sativa*-Keimtest) kamen zu dem Ergebnis, daß bei Zuckerrüben in jedem Fall die ABA-Konzentration in den Sprossen höher war als in den Wurzeln und eine Steigerung der Borkonzentration sowohl in den Sprossen als auch in den Wurzeln eine starke Verminderung der ABA-Konzentration bewirkte. Nicht unwesentlich erscheint in diesem Zusammenhang auch der Einfluß des Bors auf die Bildung von Uracil. Uracil ist Baustein von RNA, woraus sich die bei Bormangel gehemmte RNA- und Proteinbildung erklärt. Die dadurch gestörte Meristemaktivität führt in der Wurzel zur Herabsetzung der Cytokininbildung. Dagegen scheint die häufig in älteren Teilen anzutreffende Erhöhung der IES-Gehalte bei Bormangel eine Folge der durch Phenole gehemmten Auxinoxidaseaktivität zu sein. So wird deutlich, daß Bor das Verhältnis Cytokinin/IES in der Pflanze erheblich beeinflusst (Schilling, 2000).

#### 2.2.4 Einfluß von Bor auf die Zellwandsynthese

Bei Bormangelpflanzen verändern sich die Zellwände deutlich (Matoh, 1997; Fleischer *et al.*, 1998). Die Entwicklung einer schuppigen Oberfläche und die interne und externe Ausbildung von korkähnlichem Material sind Bormangelsymptome bei vielen Pflanzen wie Tomate, Blumenkohl, Citrus und Apfel (Mengel und Kirkby, 1987). Als erster beobachtete Spuer (1957) eine Veränderung der Zellwände von Bormangelpflanzen; er fand dünnere Wände im Kollenchym und dickere im Phloem- und Grundparenchym. Die Zellwanddicken und der Anteil ihrer Bestandteile am totalen Trockengewicht waren bei Bormangelgewebe hoch (Rajaratnam und Lowry, 1974; Hirsch und Torrey, 1980 ). Starke Veränderungen in der Wandstruktur der Blattmesophyllzellen vor dem Auftreten sichtbarer Symptome ließen elektronenoptische Untersuchungen von Sonnenblumen erkennen (Lee und Aronoff, 1966). Die primären Zellwände bei Bormangelzellen sind nicht glatt, bedingt durch Verlagerung von vesikulären Aggregationen, vermischt mit Membranmaterialien (Hirsch und Torrey, 1980 ). Eine Dichtlagerung von Palisaden und Schwammparenchym beobachteten Kamali und Childers (1967). Hohe Konzentrationen an Pektinsubstanzen und hohe Glucose-Inkorporation in  $\beta$ -1,3-Glucan waren bei Bormangelpflanzen die Hauptbestandteile des Kallus, der durch Akkumulation in den Siebröhren den Phloemtransport verhinderte (Rajarantan und Lowry, 1974; Venter und Curries, 1977; Dugger und Palmer, 1985; Schilling, 2000). Auf eine erschwerte Trennung von Zellwänden mag auch die von Trellier (1963) beschriebene verlangsamte Loslösung der Tochterpflanzen bei *Lemna minor* beruhen. Bei Tomatenwurzeln zeigten die Zellenwände nach 8 Stunden ohne Borzugabe Veränderungen. Es zeigte sich, daß Bor nicht nur einen starken Komplex mit den Zellwänden bildet, sondern daß Bor auch für den Aufbau von Boratestern (Querverbindungen) für die Strukturentwicklung notwendig ist (Kouchi und Kumazawa, 1976). Die Funktionen des Bors in den Pflanzen lassen sich offenbar mit der Fähigkeit der Borsäure in Verbindung bringen, Mono- und Diester mit cis-Diolen zu bilden (Cakmak und Romheld, 1997). Da die Bindungen innerhalb dieser Querverbindungen nicht stark sind, lösen sie sich evtl. während der Zellstreckung auf und bilden negative Ladungen für Ioneninteraktionen, z.B. mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Die enge Beziehung zwischen Bor und Ca in den Zellwänden ist notwendig für das Wachstum (Matoh und Kobayashi, 1998). Oder die schwachen Bindungskräfte verursachen eine Veränderung der Ca-Bindungsformen in den Wurzeln von Bormangelpflanzen und stören dadurch den Ca-Transport zum Sproß (Ramon *et al.*,

1990; Loomis und Durst, 1992). Gute Borversorgung führt daher sowohl über die gesteigerte Cellulose-, Hemicellulose- und Pektinbildung als auch über die Ligninbiosynthese zu stabilen Zellwänden (Schilling, 2000). Nach der Arbeit von Loomis und Durst (1991), in der Bor durch andere Ionen, wie z.B. Germanium, ersetzt wurde, scheint die Rolle von Bor in den Zellwänden eher strukturell als katalytisch oder regulatorisch zu sein.

### **2.2.5 Borfunktion an Zellmembranen**

Seit langer Zeit ist ein Einfluß von Bor auf die Entwicklung und Funktion von Zellplasmamembranen nachgewiesen, seine Wirkung auf die Membranen der Zellorganellen, wie z.B. Tonoplast oder Chloroplasten, ist jedoch unklar (Marschner, 1995). Es hat sich gezeigt, daß sich der Aufbau und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials durch Infrarotlicht oder eine bestimmte Bor-Minimalkonzentration steigern lassen (Tanada, 1978). Daher beeinflußt Bor die turgor-regulierte nyktinastische Bewegung in *Albizzia*-Blättchen (Tanada, 1982) und verursacht Rb-Influx und Stomata-Öffnung bei *Cammelina communis* (Roth-Bejerano und Itai, 1981). Goldbach (1985) hat berichtet, daß die Phosphoraufnahme bei Bohnen- und Maispflanzen in den Wurzelspitzen bei Bormangelpflanzen geringer ist als bei ausreichend mit Bor versorgten Pflanzen. Wenn nach einem Mangelzustand Bor zugeführt wurde, hatte dies bei Bohnenpflanzen auf die Aufnahme von Phosphor, Chlorid und Rubidium in den Wurzeln einen größeren Einfluß als bei Maispflanzen. Außerdem zeigte sich, daß auch die Aktivität der Membran-ATPase in den Wurzeln von Maispflanzen geringer als bei Bohnen war. Somit wird deutlich, daß der Einfluß von Bor auf die Ionen-Aufnahme ein direkter oder indirekter Einfluß auf die plasmamembrangebundene ATPase ist. Durch nochmalige Borgabe auch zu in vitro gewachsenen Sonnenblumen-Mangelpflanzen wird eine Veränderung bei der Netto-Protonenausscheidung bewirkt und ein negatives Membranpotential erzeugt (Ferrol *et al.*, 1993). Es war zu beobachten, daß in Wurzelzellen unter Bormangel der H-Transport sehr gering war und sich innerhalb von 20 - 120 Minuten nach einer Borgabe erhöhte (Blaser-Grill *et al.*, 1989; Schon *et al.*, 1990). Obwohl Bor einen direkten Einfluß auf die plasmamembrangebundene ATPase haben mußte, scheint es sich hierbei um einen indirekten Effekt zu handeln, z.B. durch Komplexbildung mit cis-Diol-Gruppen von

Plasmamembran­komponenten (wie Glycoproteinen oder Glycolipiden). Dadurch wirkt es als Stabilisator und Struktur­faktor, der notwendig für die Entwicklung und Funktion der Plasmamembranen ist (Tanada, 1983; Blevins und Lukaszewski, 1998).

### **2.2.6 Einfluß von Bor auf den Stickstoffmetabolismus**

Das Pflanzenwachstum ist abhängig von einer ausreichenden Stickstoffversorgung, um Aminosäuren, Proteine, Nucleinsäuren und andere Zellbestandteile, die für das Wachstum notwendig sind, aufzubauen. Für die meisten Pflanzen ist anorganischer Stickstoff im Boden in Form von  $\text{NO}_3^-$  verfügbar. Der erste Schritt im  $\text{NO}_3^-$ -Assimilationsprozeß ist die Nitratreduktion, die durch Nitratreduktase katalysiert wird (Huber *et al.*, 1996). In vielen Pflanzenarten sind die Blätter die wichtigsten Orte des  $\text{NO}_3^-$ -Reduktionsprozesses und bei manchen Pflanzen, z. B. bei Tabak erfolgt mehr als 80% der Reduktion in den Blättern (Wakhloo und Staudt, 1988). Die Akkumulation von  $\text{NO}_3^-$  ist eines der Hauptprobleme, die bei Pflanzen auftreten. Die Pflanzen akkumulieren das  $\text{NO}_3^-$ , wenn die Aufnahme dieses Anions größer als seine Verwertung ist (Mackown *et al.*, 1990). Die  $\text{NO}_3^-$ -Reduktion zu  $\text{NO}_2^-$  durch Nitratreduktase vermeidet oder vermindert die Akkumulation dieses Ions bei Pflanzen, die viel Stickstoff für ihr Wachstum brauchen. Während der  $\text{NO}_3^-$ -Assimilation wird das von Pflanzen aufgenommene und zu  $\text{NO}_2^-$  reduzierte  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NH}_3$  und  $\text{NH}_4^+$  und weiter in organische Verbindungen umgewandelt (Migge und Becker, 1996; Sivasankar und Oaks, 1996). Viele Faktoren, z.B. die vorhandene Nitratmenge, Wachstumsregulatoren, Licht und andere physiologische und Umweltparameter regulieren die Nitratassimilation (Campbell, 1988; Lillo, 1994; Crawford, 1995; Padgett und Leonard, 1996; Sivasankar und Oaks, 1996).

Eine Funktion von Bor ist sein Einfluß auf den Stickstoffmetabolismus. Es ist bewiesen, daß Bor für die  $\text{N}_2$ -Fixierung bei autotrophen Cyanobakterien notwendig ist (Mateo *et al.*, 1986; Garcia-Gonzalez *et al.*, 1991). Bei höheren Pflanzen, z. B. bei der Tomate und Sonnenblume, vermindert sich die Nitratreduktaseaktivität durch Bormangel, deshalb wurde eine Erhöhung des  $\text{NO}_3^-$ -Gehaltes beobachtet (Kastori und Petrovic, 1989; Ramon *et al.*, 1989). Der Boreinfluß auf Sojabohnenwachstum, Knöllchenentwicklung und Stickstofffixierung ist untersucht worden, und man fand, daß Bormangel dem Knöllchenwachstum schadet sowie das Trockengewicht und die

Aktivität der Stickstofffixierung vermindert (Yamagishi und Yamamoto, 1994). Nach von Ruiz et al. (1998) durchgeführten Versuchen mit Tabakpflanzen war ein positiver Borkonzentrationseinfluß (wahrscheinlich durch eine Aktivierung von Enzymen, die an der  $\text{NO}_3^-$ -Assimilation in den Blättern beteiligt sind) auf die Erhöhung der Aminosäure- und Proteinmenge beobachtbar. Shelp (1988, 1990) hat gezeigt, daß in Pflanzen mit ausreichend hoher Borkonzentration eine Erhöhung der Nitratreduktaseaktivität zu beobachten ist. Ruiz *et al.*, (1998) haben gezeigt, daß die Erhöhung der Borkonzentration für die zur  $\text{NO}_3^-$ -Assimilation gehörende Enzymsynthese erforderlich ist, und dadurch die Aktivität der NR-, NIR-, GS- und GOGAT- Enzyme erhöht wird. Die Endprodukte der  $\text{NO}_3^-$ -Assimilation sind im Prinzip Aminosäuren und Proteine (Barneix und Causin, 1996), deshalb hat Bor durch die Erhöhung der Aminosäure- und Proteinkonzentration eine wichtige Funktion während des Pflanzenwachstums.

### **2.3 Anthozyane, insbesondere in Verbindung mit der somatischen Embryogenese**

Bei den meisten Pflanzenarten gehören rote, blaue und violette wasserlösliche Farbpigmente zu den Anthozyangruppen. Diese Komponenten sind sekundäre Umsetzungsprodukte der Pflanzen und gehören zur Stoffgruppe der Glucoside. Anthozyane bestehen aus Kohlenhydraten und Anthozyaniden, die zyklisch-aromatische Struktur haben. Die Kohlenhydratbestandteile der Anthozyane sind Glucose, Ramnose und Gentiobiose (Mochioka *et al.*, 1995). Die Anthozyane sind in sauren Lösungen rot und werden bei höherem pH-Wert violett und blau. Die Anthozyansynthese ist durch Umweltbedingungen beeinflusst. Es hat den Anschein, daß die Anthozyansynthese meistens mit einer Kohlenhydratakkumulation einhergeht. Jeder der Umweltfaktoren, z.B. Lichtstärke, niedrige Temperatur, P- und N-Mangel und andere Faktoren, die die Kohlenhydratakkumulation im Pflanzengewebe erhöhen, erhöhen auch die Anthozyansynthese (Mohr und Sitte, 1971; Richter, 1996).

Zellkultursysteme haben es ermöglicht, den Einfluß von Umweltfaktoren und Streß auf Pflanzengewebe und den sekundären Metabolismus bzw. die Anthozyansynthese unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Z.B. Neumann (1962 und 1995), Ibrahim *et al.* (1971), Sugano und Hayashi (1976), Dougall *et al.* (1980) berichteten, daß manche Karottenzellen während der Zellkultur Anthozyan synthetisieren können. Es wurde gefunden, daß die größeren Zellaggregate bei Zellkulturen von Wildkarotten eine

größere Anthozyanproduktion aufweisen als kleine (Kinnersley und Dougall, 1981). Zhang *et al.*, (1997) haben berichtet, daß die Temperatur das Wachstum und die Anthozyanproduktion in Suspensionskulturen von Erdbeierzellen (*Fragaria ananassa*) beeinflusst, d. h. daß bei den in diesem Versuch verwendeten höheren Temperaturen maximales Wachstum und bei niedrigen Temperaturen höherer Anthozyangehalt beobachtet wurden. Alfermann und Rheinhard (1971) haben gezeigt, daß die Anthozyansynthese nicht unbedingt an das Vorhandensein von Licht gebunden ist. Der Callus von *Daucus carota* bildet auch im Dunkeln Anthozyan, wenn das Nährmedium 2,4-D, IES oder NES enthält. Schmitz und Seitz (1972) haben berichtet, daß *Daucus carota*-Zellen im künstlichen Nährmedium große Mengen an Anthozyan akkumulieren, und daß Gibberellinsäure (GA3) die Anthozyansynthese hemmt. Die genannten Forscher fanden, daß die Kalluszellen von *Daucus carota* zwei Arten von Anthozyan bilden, in denen Glucose und Xylose die Zuckerkomponenten waren (Ozeki und Komamine, 1981; Ozeki und Komamine, 1986). Es wurde klar, daß bei *Daucus carota*-Zellkulturen, wenn die Zellen aus einem Medium mit Auxin in ein Medium ohne Auxin umgesetzt werden, die Anthozyansynthese induziert wird und Zeatin im Medium ohne Auxin die Anthozyansynthese fördert, während 2,4-D mit hoher Konzentration sie ganz hemmt. Bei Anwesenheit von Zeatin und Abwesenheit von Auxin war eine starke Korrelation zwischen Embryogenese und der Anthozyansynthese beobachtbar. Sie haben auch vermutet, daß die Induktion der Anthozyansynthese sowie die Induktion der Flavonoidumsetzung durch UV-Strahlung oder Elicitor-Verwendung in ihrem Karottenkultursystem keine Reaktion auf Streß war, sondern ein Zeichen der Differenzierung der Umsetzungsprozesse. In anderen Versuchen wurde die Anthozyansynthese in Karottenzellsuspension bei 2,4-D-Abwesenheit induziert und bei 2,4-D-Anwesenheit unterdrückt. Nach dem Transfer in Medium ohne 2,4-D hat sich die Anthozyankonzentration verringert, während die Enzymprotein- und mRNA-Konzentrationen für Phenylalaninammonialyase- und Chalconsynthase gestiegen sind. Deshalb wurde vermutet, daß vielleicht Anthozyan-Induzierung und Unterdrückung während der Transskription durch 2,4-D reguliert werden (Ozeki *et al.*, 1990). Im Jahr 1996 hat Ozeki gefunden, daß Phenylalaninammonialyase und Chalconsynthase eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Anthozyansynthese spielen. Er hat festgestellt, daß es bei Karotten zwei Gene für Phenylalaninammonialyase gibt, das eine wird durch Streß kurz und schnell aktiv, das andere Gen wird normalerweise während der Regulation der Anthozyansynthese aktiviert. Im Jahr 1994 berichteten Dell und

Malajczuk, daß Blätter von *Eukalyptus urophylla* während der Bormangelbedingungen Anthozyane synthetisiert haben, aber bisher gibt es jedoch nur sehr wenige Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Bor und der Anthozyansynthese.

Bei der Betrachtung des Zusammenhanges zwischen der somatischen Embryogenese und der Anthozyansynthese taucht die Frage auf, welches Verhältnis zwischen dem sekundären Metabolismus bzw. der Anthozyansynthese zur Erkennung des morphologisch-physiologischen Zustands auf der einen Seite und dem Einfluß der Mikroelemente als Umweltfaktoren während der somatischen Embryonendifferenzierung auf der anderen Seite bestehen könnte.

Aus den vorhergehenden Publikationen ist abzuleiten, daß Bor essentiell für alle Pflanzen ist. Die Spitzenmeristeme, besonders aktive Teilungszentren, werden bei starkem Bormangel geschädigt, so daß Wechselwirkungen mit den Phytohormonen möglich erscheinen. Wie aus der vorhergehenden Literaturübersicht entnommen werden kann, ist der Boreinfluß bis heute, wie auch die Zelldifferenzierung generell, auf Molekularerbasis immer noch nicht vollständig verstanden. Wenn also der Bormangel bei intakter Pflanzenzellteilung eine direkte Veränderung und Schädigung verursacht, müßte diese Veränderung und Schädigung unter in-vitro-Bedingungen bzw. während der somatischen Embryogenese deutlicher werden.

Definitionsgemäß entsteht ein Embryo aus einer Zelle. In vielen Untersuchungen konnte die Entwicklung somatischer Embryonen aus einer Zelle gezeigt werden. Aufgrund empirischer Untersuchungen zur somatischen Embryogenese wird durch eine Interaktion von exogenen und endogenen Faktoren die somatische Embryogenese induziert (Grieb, 1992). Daß Bor für die Zellteilung erforderlich ist, hat für die somatische Embryogenese somit eine wichtige Bedeutung. Daher kann die Gewebekultur und die somatische Embryogenese bei der Kultur von Bor-Manglexplantaten ein ausbaufähiges Modellobjekt für die Untersuchung der Bor-Funktion in pflanzlichen Geweben darstellen. Über die Funktion von Bor ist im Vergleich mit anderen Microelementen wenig Information vorhanden, insbesondere über seinen Einfluß bei Gewebekulturen. Bis jetzt gibt es nur eine Untersuchung über den Einfluß von Bor während der somatischen Embryogenese (Behrendt, 1994). Darin wird konstatiert, daß der unterschiedliche Einfluß der Kulturmedien auf die Entwicklung von Protoplasten und den Suspensor in der somatischen Embryogenese von *Larix decidua* allein auf die verfügbare Menge an Bor zurückzuführen ist (Behrendt, 1994; Behrendt und Zoglauer, 1996).



Aus der Literatur ist abzuleiten, daß Borbedarf von den Pflanzenarten abhängig ist und während der somatischen Embryogenese verschiedene Pflanzenarten eine unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit vom Nährmedium zeigen. Da vor allem *Daucus carota* einerseits ein gutes Objekt zur Untersuchung der somatischen Embryogenese ist und andererseits wenig Informationen über den Bor-Einfluß auf die somatische Embryogenese im besonderen vorhanden sind, soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Bor auf den Prozeß der somatischen Embryogenese untersucht werden. Dabei soll die Induktion und Entwicklung der somatischen Embryonen im Vordergrund stehen, weil Bor bei diesen physiologischen Abläufen eine besondere Rolle spielen könnte.

## 2.4 FRAGESTELLUNG

Wie bereits ausgeführt, können bei Bormangel die pflanzlichen Organe geschädigt werden. Diese Schäden findet man insbesondere an den Sexualorganen höherer Pflanzen (Dahiya *et al.*, 1993; Kamble *et al.*, 1994; Yun *et al.*, 1995). Es stellt sich jedoch die Frage, wenn Bormangel hier eine direkte Schädigung der Zellteilung verursacht, müßte dieses Element auch *in vitro* eine ähnliche Wirkung auf die somatische Embryogenese ausüben. Zu dieser Frage ist bisher wenig geforscht worden. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Punkte untersucht werden:

- 1- Wachsen isolierte Petiolenexplantate bei Bormangel? Wie ist Bormangel bei Petiolen zu charakterisieren? Kann das Wachstum von Petiolen in Gewebekultur durch Bormangel unterdrückt werden?
- 2- Können Petiolen und Zellen aus Suspensionkulturen unter Bormangelbedingungen somatische Embryonen bilden?
- 3- Wenn sich unter Bormangelbedingungen somatische Embryonen bilden, wie sehen diese aus?
- 4- Besteht eine Beziehung zwischen Bor und pflanzlichen Hormonen bei der somatischen Embryogenese?
- 5- Besteht ein Zusammenhang zwischen Bor und der Anthozyanbildung unter Gewebekulturbedingungen? Welche Relation kann man zwischen diesem und der somatischen Embryoproduktion finden?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Anzucht der Versuchspflanzen

Aus Karotten (*Daucus carota*.L) Var. Rotin wurde Gewebe zur Durchführung von Gewebekultur-Versuchen entnommen. Von der Karotte stammende Kulturen tendieren im Gegensatz zu vielen anderen Pflanzenarten zur Ausdifferenzierung von Organen. Wenn Bor eine Funktion bei der Ausdifferenzierung ganzer Organe hat, so kann man erst recht einen Einfluß auf die Ausdifferenzierung von Zellen erwarten. In der Gewebekultur ist Sterilität unerlässlich, weil die verwendeten Lösungen durch organische Zusätze ein idealer Nährboden für Mikroorganismen sind. Diese würden die relativ langsam wachsenden Gewebe schnell überwuchern. Deswegen müssen zunächst die Pflanzenteile, die man in Kultur zu nehmen beabsichtigt, keimfrei gemacht werden. Bei sehr zartem Gewebe riskiert man allerdings dabei auch, die benötigten Zellen zu schädigen. Deswegen wurden die im Glas aus Samen gewachsenen Karottenpflanzen als Versuchsmaterial benutzt, denn die Samen lassen sich auch gut steril kultivieren, wodurch man sie schon früh für Gewebekulturen verwenden kann (sehr kleine Pflanzenteile sind schwer sterilisierbar). Deswegen wurden alle Explantate aus steril angezogenen Pflänzchen isoliert. Aus den steril kultivierten Karottenpflänzchen kann man aber nicht nur leicht Gewebekulturen anlegen, sie bilden auch selber ein gutes Versuchsobjekt, weil sie nicht viel Pflege benötigen. Außerdem kann man ihr Medium bzw. die Nährstoffgehalte gut kontrollieren, was im Boden schwer zu erreichen ist. Durch diese Methoden kann man die Bormenge in den Explantaten bis auf ein Minimum reduzieren und dadurch in Gewebekulturen in jedem Fall schnell Bormangel induzieren. Für die sterile Anzucht wurden die Samen zunächst zur besseren Benetzbarkeit 1 Minute in 70%-igem Ethanol eingelegt, anschließend zur eigentlichen Sterilisation ca. 1,5 Stunden unter Rühren mit einem Magnetrührer mit einer 1:1,5 verdünnten Natrium-Hypochlorit-Lösung (ca. 5% aktives Chlor) und einem Tropfen Tween behandelt. Unter sterilen Bedingungen wurde der Samen dann mehrmals mit

sterilem A.dest. gewaschen und auf einem entsprechenden Nähmedium, meist auf B5<sup>-</sup>-Nährlösung mit Agar, ausgelegt.

Etwa 100 ml fassende Kulturgefäße wurden mit 50 ml Medium befüllt. Die Gefäße wurden mit 3-lagiger Aluminiumfolie so verschlossen, daß der notwendige Gasaustausch gewährleistet war.

Das Nährmedium für die Keimpflanzen unterschied sich von dem für die Gewebekulturen nur durch das Fehlen von Bor und der organischen Zusätze mit Ausnahme von Saccharose, die bei im Licht gehaltenen, grünen Pflanzen zwar überflüssig ist, aber in halber Konzentration zugesetzt wurde, um eventuell stärkere Pflanzen herzustellen und Infektionen erkennbar zu machen.

Die so angezogenen Kulturen wurden für ca. 4-6 Wochen bei 22°C und einer Dauerbeleuchtung mit ca. 4000 Lux (Osram, Lumilux white) gehalten.

### 3.2 Nährlösung für die Gewebekultur

Bei Versuchen wurden eine B5-Nährlösung nach Gamborg *et al.*(1968) mit 2,4-D (=B5<sup>+</sup>) bzw. ohne 2,4-D (=B5<sup>-</sup>) und NL-Nährlösung nach Neumann (1995) verwendet (s. Tab. a).

Die Nährmedien wurden vollständig angesetzt und dann der pH-Wert eingestellt. Die anschließende Sterilisation des Nährmediums und anderer Flüssigkeiten erfolgte durch Autoklavieren bei 134°C und 2,1 bar für 20 min.

**Tab. a:** Zusammensetzung des Nährmediums.

Nährmedium	B5 <sup>+</sup>	B5 <sup>-</sup>	NL2
Saccharose (g)	20	20	20
Caseinhydrolysat (mg)	250	250	200
Stammlösung B5 (ml)	100	100	-
Stammlösung NL (ml)	-	-	100
Fe-Lösung (ml)	10	10	10
Mg-Lösung (ml)	7	7	30
Vitamin-Lösung (ml)	1	1	1
Inosit-Lösung (ml)	10	10	10
Kinetin-Lösung (ml)	**5	**5	-
IES-Lösung (ml)	-	-	1
2,4-D-Lösung (ml)	**5	-	-
Gelrite (g)	-	4,2	-
pH-Wert	5,72	5,72	5,72

*Aqua dest. ad 1L.*

\*\* variiert je nach Versuch und Fragestellung

Die für die unterschiedlichen Nährmedien angegebenen Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Tab. b:** Stammlösung B5 (Gamborg et al . 1968).

**I:**

<i>Makroelemente</i>	<i>g/l Aqua dest.</i>
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,5
$\text{KNO}_3$	30,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,34
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,50

**II:**

<i>Mikroelemente</i>	<i>mg/l Aqua dest. **</i>
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100,00
$\text{H}_3\text{BO}_3$	30,00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,00
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,50
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
<b>KJ</b>	7,5

\*\* variiert je nach Versuch und Fragestellung

**Tab. c:** Stamlösung NL (Neumann, 1995).

**I:**

<i>Makroelemente</i>	<i>g/l Aqua dest.</i>
$\text{KNO}_3$	8,72
<b>KCl</b>	0,65
$\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,34
$\text{Na}_2 \text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	2,45
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,88

**II:**

<i>Mikroelemente</i>	<i>mg/l Aqua dest.</i>
$\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	35,80
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,60
$\text{H}_3\text{BO}_3$	15
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,34
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6,20
<b>KJ</b>	7,50

**III:**

<i>Fe-Lösung</i>	<i>g/l Aqua dest.</i>
<b>Fe-EDTA</b>	4,63

**III:**

<i>Mg-Lösung</i>	<i>g/l Aqua dest.</i>
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36,00

V:

<i>Vitamin-Lösung</i>	<i>mg/100 ml Aqua dest.</i>
<b>Nikotinsäure</b>	50,00
<b>Thiamin</b>	10,00
<b>Pyridoxin</b>	10,00

VI:

<i>Hormon-Lösungen</i>	
<b>myo-inosit</b>	500,00 mg/100ml*
<b>Kinetin</b>	10,00 mg/100ml*
<b>IES</b>	200,00 mg/100ml*
<b>2,4-D</b>	100.00 mg/100 ml *

(\*Aqua dest.)

### 3.3 Kultivierung isolierten Gewebes von Keimpflanzen

Von den 4-6 Wochen alten steril angezogenen Pflänzchen wurde die Lamina abgeschnitten und die Petiolen und Wurzeln in steriles Aqua dest. gelegt. Anschließend wurden die Explantate in 1 cm-Stücke geschnitten. Danach wurden die Explantate in B5<sup>+</sup> ( $\pm$ Bor) Medium für Suspensions- oder für direkte Petiolen- und Wurzel-Kulturen umgesetzt.

Zur Auslösung der Embryogenese wurden die o.g. Explantate 30-60 Min. mit auxinfreiem B5-Medium (B5<sup>-</sup>) gewaschen und dann in Kolben mit B5<sup>-</sup>-Nährlösung transferiert. Die Kulturdauer im B5<sup>+</sup>- und B5<sup>-</sup>-Nährmedium ist ebenfalls bei den verschiedenen Versuchen im Ergebnisteil angegeben.

In je 15 ml Nährlösung wurden ca. 6 Explantatstücke kultiviert. Je nach Fragestellung zur somatischen Embryogenese wurden sowohl die Konzentrationen von Bor als auch von den anderen Nährmediumbestandteilen variiert.

Petiolen, Zellsuspensionen und andere Schüttelkulturen wurden auf einer Schüttelplatte mit 90 RpM unter o.g. Bedingungen gehalten.

Die Kulturen wurden bei 28 °C unter Dauerlicht [ca. 4000 Lux (Osram, Lumilux white)] kultiviert.

Wegen des Freisetzens von Bor durch Glasgefäße (Mengel und Kirkby, 1987; Asad *et al.*, 1997) bestanden die Kulturgefäße in den meisten Versuchen aus Polycarbonerlenmyerkolben (50 ml und 250 ml ) mit 15 ml bzw. 80 ml Nährlösung.

### 3.4 Erstellung und Kultivierung einer Bor-Mangel-Suspensionskultur

Als Ausgangsmaterial für Suspensionkulturen dienten ebenfalls Petiolenexplantate. Die Etablierung einer Suspensionskultur ging von dem bereits oben beschriebenen Verfahren aus oder aber von Petiolenkulturen auf B5<sup>+</sup> mit 0,5 ppm 2,4-D. Nach 21 Tagen Kulturzeit wurde die in der Tube gebildete Suspension in eine Flüssigkultur mit B5<sup>+</sup> (-Bor) mit 0,5 ppm 2,4-D überführt.

Kultiviert wurde meist in Polycarbonerlenmeyerkolben (250 ml). Zur Erhaltung einer Suspensionskultur genügte ein durchschnittlich alle 2 Wochen stattfindender Nährmedienwechsel. Dazu wurde die Zellsuspension durch ein handelsübliches Kaffeesieb in ein Becherglas gesiebt. Nach dem Sedimentieren der Zellen wurde ca. 2/3 des alten Nährmediums abdekantiert, die Zellen einschließlich des restlichen alten Nährmediums wurde in einen Polycarbonkolben mit neuer B5<sup>+</sup>- (-B) Nährlösung überführt. Zur Herstellung von Stammkulturen zu Versuchszwecken wurden die Erhaltungssuspensionskulturen durch ein 90µm Nylonsieb in ein Becherglas gesiebt, nach Sedimentation abdekantiert und in einen Meßzylinder überführt. Nach ca. 30min. waren die Zellen soweit sedimentiert, daß das Zellvolumen (PCV) in ml bestimmt und entsprechend neu eingestellt werden konnte. Die Stammkulturen wurden alle 20 Tage nach dem gleichen Verfahren subkultiviert. Die Zelldichte für eine neue Kultur in Erlenmeyerkolben betrug ca. 10% der ursprünglich in der Stammkultur vorliegenden Zelldichte.

Für die Versuche wurde eine in B5<sup>+</sup> (-B) kultivierte Stammkultur unter dreimaligem Waschen mit neuer Nährlösung über ein 90µm Nylonsieb gegeben. Nach 10 minütiger Zentrifugation des Filtrates bei 300×g (HARAEUS-CHRIST-Zentrifuge) wurde der Überstand abdekantiert und das Sediment mit B5<sup>+</sup> aufgenommen. Sollte in unterschiedlichen Medien weiter kultiviert werden, so wurde das aufgenommene Sediment geteilt und jede Variante 3 mal mit dem jeweiligen Medium durch Zentrifugation gewaschen. Nach Aufnahme des Sedimentes erfolgte eine Bestimmung des gepackten Zellvolumens(PCV). Die weitere Kultivierung erfolgte für die Vermehrungsphase in Polycarbonkolben mit einer Kulturdichte von 5% PCV und für die Realisierungsphase mit einer Kulturdichte von 0,5% PCV in Polycarbonkolben.

### **3.5 Somatische Embryogenese in Petiolen und Wurzelexplantaten**

In Versuchen zur Induktions- und/oder Realisierungsphase der somatischen Embryogenese wurden die Explantate, wie zuvor beschrieben, in Kultur genommen (s. S. 25).

Für die Untersuchungen zum Einfluß von Bor im B5<sup>+</sup>-Medium wurden die Explantate je nach Fragestellung für 14 bis 30 Tage in B5<sup>+</sup> mit den unterschiedlichen Bor-Konzentrationen kultiviert und anschließend nach Waschen mit auxinfreiem Medium in B5<sup>-</sup>-Nährlösung für mindestens 14 Tage in Kolben unter den üblichen Bedingungen weiter kultiviert. Abweichungen von dieser Vorgehensweise sind in der Darstellung der Ergebnisse jeweils angegeben. Wurden die Wirkungen anderer Faktoren wie Kinetin und Auxin untersucht, werden Details dazu jeweils im Ergebnisteil angegeben.

### **3.6 Somatische Embryogenese in Suspensionskulturen**

Die somatische Embryogenese in Suspensionkultur verläuft nach einem ähnlichen Prozeß wie bei der Petiolenkultur (s. S. 26): Eine vorher in B5<sup>+</sup> kultivierte Zellsuspension wird im B5<sup>-</sup> Medium weiter kultiviert.

Von der mit B5<sup>+</sup> kultivierten und mit einem 90 µm Sieb gesiebten Zellsuspension wurde das PCV bestimmt. Dieses Sediment wurde mehrmals durch Zentrifugation bei 300×g für 7 Minuten gewaschen und ein Aliquot mit 0,08 ml PCV (ca. 3.100000 Zellen) in 15 ml B5<sup>-</sup>-Nährlösung überführt, so daß die Kulturichte 0,5% des PCV betrug.

### **3.7 Bewertungsmethoden der somatischen Embryogenese**

Die qualitative und quantitative Auswertung erfolgte sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch in bestimmten Zeitabschnitten, die ebenfalls bei den verschiedenen Versuchen im Ergebnisteil angegeben sind.

In den meisten Fällen (außer einigen Ausnahmen, die ebenfalls im Ergebnisteil kenntlich gemacht sind), wurden die Versuche nach der Methode von Wake *et al.*(1995) für die Bewertung der somatischen Embryogenese bei Karotten ausgewertet.



Jede Variante der somatischen Embryonen wurde in Flüssigkultur durch 3 übereinandergelegte Siebe (90µm, 425µm und 800µm) gegeben. Davon wurden je 3 nach Größe bzw. Stadium der Embryonen (wie in der Tab. d angegeben) unter dem Binokular ausgezählt:

**Tab. d:** Einteilung der Embryostadien nach Wake et al. (1995).

<b>Größe</b>	<b>Stadien des Embryonen</b>
<b>90µm-425µm:</b>	globulärer und herzförmiger Embryo
<b>425µm-800µm:</b>	kleiner somatischer Embryo (torpedoförmig)
<b>&gt;800µm:</b>	großer somatischer Embryo (Pflänzchen).

### 3.8 Histologische Untersuchungen

Die kultivierten Petiolenexplantate wurden sofort nach der Ernte bei Zimmertemperatur in Ethanol/Eisessig (3:1) fixiert. Anschließend konnten sie für unbegrenzte Dauer in 70%-igem Ethanol aufbewahrt werden. Das Material wurde nach der Entwässerungsreihe (s.Schema) in flüssiges Paraffin eingebettet.

**Tab. e:** Schema zur Herstellung von Paraffinpräparaten für histologische Untersuchungen:

<b><u>Fixieren:</u></b>	<b>48 Std.</b>	<b>Ethanol/Eisessig (3:1)</b>
<b><u>Entwässern:</u></b>	<b>4 Std.</b>	<b>Ethanol (70 %ig)</b>
	<b>2 Std.</b>	<b>Wasser/Ethanol/Tert. Butanol (15 : 50 :35)</b>
	<b>2 Std.</b>	<b>Ethanol/Tert. Butanol (45:55)</b>
	<b>2 Std.</b>	<b>Isopropanol/Tert. Butanol (25:75)</b>
	<b>ca. 12 Std.</b>	<b>Tert. Butanol</b>
<b><u>Einbetten:</u></b>	<b>ca. 48 Std.</b>	<b>Tert. Butanol/Paraffin (1:1) (60°C)</b>
<b>(bis kein Butanolgeruch mehr vorhanden)</b>		

#### **In Paraffinschalen einbetten**

Mit einem Mikrotom (Serienschnitt-Mikrotom 1510, Fa.Leitz) wurden 12 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Eiweiß-Glycerin bei 40°C für 4 Stunden auf einem Objektträger aufgeklebt und für ca. 12 Stunden bei 30°C geglättet und getrocknet wurden.

Die Cytoplasmafärbung wurde mit Hämatoxylin nach Heidenhain (Gerlach, 1977) durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte nach 2 maliger Entparaffinierung in Xylol und dem Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe, wie nachfolgend angegeben, gefärbt und anschließend in Malinol eingeschlossen.

**Tab. f:** Arbeitsschritte zur Cytoplasmafärbung mit Hämatoxylin und zur Herstellung mikroskopiegerechter Präparate.

5	Min.	Xylol
5	Min.	Xylol
5	Min.	96%-iger Ethanol
5	Min.	70%-iger Ethanol
5	Min.	50%-iger Ethanol
5	Min.	unter fließendem Wasser wässern
12	Std.	3 %-ige wässrige Fe-Alaun-Beize
10	Min.	unter fließendem Wasser wässern
3,5	Std.	Hämatoxylin nach HEIDENHAIN
10	Min.	unter fließendem Wasser wässern
1	Std.	0,6 %-ige Pikrinsäure-Lösung
10	Min.	unter fließendem Wasser wässern
5	Min.	1 %-ige Ammoniak- Lösung
5	Min.	unter fließendem Wasser wässern
5	Min.	50%-iger Ethanol
5	Min.	70%-iger Ethanol
5	Min.	96%-iger Ethanol
15	Min.	Xylol

.  
Mit Malinol eindecken

### 3.9 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Leitz MPV 1-Mikroskop. Zur Dokumentation der sichtbaren histologischen Veränderungen wurden die Schnittpräparate fotografiert.

### 3.10 Borbestimmung

Die in diesem Versuch angewendete Methode zur Bestimmung von Bor in Lösungen und in verschiedenen Explantaten (Petiolen, Embryonen u.a.) war die Borbestimmungsmethode mit **Azomethin-H** mittels des Spektrophotometers (Cottenie *et al.*, 1982).

### Reagens :

**-1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

**-Pufferlösung:** 250 g NH<sub>4</sub>Ac in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen, 125 ml 99% Essigsäure, 6,7g Na<sub>2</sub>-EDTA und 6 ml 80% Thioglycolsäure hinzufügen.

**-Azomethin-Reagens (muß vor der Benutzung vorbereitet werden):** 0,9 g Azomethin-H (Merck Nr. 11962) und 2 g Ascorbinsäure werden in wenig A.dest. gelöst und auf 100 ml mit A.dest. aufgefüllt.

**-1000 ppm Borstammlösung:** 0,5706 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> wird in 100 ml A.dest. gelöst.

### Eichkurve:

Es wurde eine Serie von Testtuben mit je 2ml Bor-Standardlösung (Bor-Konzentration 0-5-10-15 µg/ml) vorbereitet und weiterhin so verfahren, wie anschließend für eine Probe erklärt wird.

### Messung:

1g trockenes Pflanzenmaterial wurde mit 100 mg CaO vermischt und bei 450°C verascht.

Die Asche wurde in 10 ml 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst und zentrifugiert, danach werden 2 ml Überstand in die Testtuben pipettiert, 4 ml Pufferlösung dazugegeben und nach Schütteln noch 2 ml Azomethin-Reagens hinzugefügt. Nach erneutem Schütteln und 2 Stunden Wartezeit wurde die Absorption bei 410 nm gemessen.

## **3.11 Hormonanalysen**

Nach Paasch (1994) und Grieb *et al.* (1997) wurde die Probe entsprechend einem Frischgewicht von 4 g abgewogen und mit 40 ml 80%-igem Methanol (entspricht 10ml/g Frischgewicht) zweimal für 1 Stunde und einmal für 3 Stunden im Kühlraum auf dem Schüttler extrahiert. Als Antioxidanz enthielt das 80%-ige Methanol 2 % 2,6-Diterbutyl-4-methylphenol. Der gewonnene Extrakt wurde bei 3500 RpM

abzentrifugiert und durch ein Faltenfilter in einen dunkelbraunen Rundkolben filtriert. Dunkle Glasgefäße wurden verwendet, um Zerstörungen der IES und ABA durch Licht zu vermeiden. Diese Extraktion wurde noch zweimal nach jeweils einer Stunde wiederholt.

Die vereinigten Extrakte wurden bis auf einen wässrigen Rückstand (2-3 ml) am Rotationsverdampfer bei 35 °C eingengt und quantitativ mit 70%-igem Methanol in ein eisgekühltes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Um Pigmente und lipophile Substanzen aus den Proben zu entfernen, wurden die Proben mit Preßluft durch zwei hintereinander geschaltete Octadecyl-Silan-Säulen (c-18-Säulen, Baker-Bond spe) gepreßt. Die Säulen wurden zuvor mit 70%-igem Methanol equilibriert.

Unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom wurde der Extrakt im Wasserbad bei 35 °C auf 0,5-1 ml abgedampft.

Eine weitere Vorreinigung der Extrakte erfolgte durch eine nochmalige Chromatographie mittels Octadecyl-Silan-Säule (Baker-Bond spe, 6ml). Die Probe aus dem vorhergehenden Schritt wurde auf die zuvor mit 40 mM TEAA-Puffer (Triethylaminacid-Puffer) konditionierte Säule pipettiert und mit TEAA-Puffer (pH 3,5, 50 mM) gespült. Anschließend konnten die Hormone mit 6 ml 60%-igem Methanol eluiert werden. Das Eluat wurde im Wasserbad bei 35 °C unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom bis auf ein Volumen von unter 1 ml abgedampft, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bis zur Trockene unter den oben genannten Bedingungen eingedampft. Die so gereinigten Proben wurden bei -80°C bis zu weiteren Reinigungsschritten aufbewahrt.

### **3.11.1 Die Bestimmung der Phytohormone durch die HPLC**

Um alle in diesem Zusammenhang wichtigen Hormone zu messen, wurde die Probe nach der Methode von Paasch (1994) und Grieb *et al.* (1997) in 50 µl Methanol vorgelöst. Dann wurden 100 µl TEAA-Puffer (40mM, pH 3,5) dazugegeben. Die Lösung wurde in ein ultrafree-MC (Millipore) Reaktionsgefäß überführt und in einer Eppendorfzentrifuge geklärt. Mit einer Hamiltonspritze wurde das Gesamtvolumen der Probe bestimmt.

Die Proben wurde in einer Lichrosphere RP-18-Säule (RP-18, 250-4 mm, 10µm, Fa. Merck) durchgeführt. Die Temperatur betrug im Säulenofen 35°C. Als Laufmittel dienten Methanol und 40 mM TEAA-Puffer (40mM, pH 3,5), wobei die Methanolkonzentration im Verlauf der Chromatographie von 35% auf 98 % erhöht wurde (s. Tab. g).

**Tab. g:** Bedingungen für die Trennung von Hormonextrakten in der HPLC

Säule: Lichrosphere RP-18, 250-4 mm, 10µm

Säulentemperatur: 35°C

**Laufmittel:**     **A**= Methanol  
                           **B**= TEAA-Puffer,40 mM, pH 3,5

<b>Gradient: Zeit (Min)</b>	<b>Laufmittel-A</b>	<b>Laufmittel-B</b>	<b>Fluß (ml/Min)</b>
0	35	65	1
10	60	40	1
12	95	5	1
13	98	2	1
18	98	2	1
20	98	2	1

Die Phytohormone wurden nach den Retentionszeiten von Standardsubstanzen und nach dem Verfahren der Standardaddition identifiziert und ihre durch Integration gewonnenen Peakflächenanteile bestimmt. Anhand von Hormonstandardpräparaten [Zeatin (SIGMA Z-0500), Zeatinribosid (SIGMA Z-0375), Dihydrozeatin (SIGMA D-713), Isopentenyladenin (SIGMA D-0636), Isopentenyladenosin (SIGMA D-7036), Indol-3-Essigsäure (SIGMA 1-1250) und Abscisinsäure (SIGMA A-1012)] wurden Eichkurven mit genau definierten Konzentrationen erstellt und die konzentrationsabhängigen Integrale zur Umrechnung der Peakflächen in Konzentrationen der Hormonproben herangezogen.

### **3.12 Bestimmung der IAA-Oxidase-Aktivität**

Die IAA-Oxidase-Aktivität der Explantate wurde bestimmt, indem eine modifizierte Technik von Galston und Dalberg (Galston und Dalberg, 1954; Bohnsack und Albert, 1977 ) angewandt wurde.

Es wurden Explantate jeder Variante aus dem Nährmedium herausgenommen, gewogen und in einen gekühlten Mörser eingefüllt, wobei letzterer eine kleine Menge Meersand und kalten Puffer [Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 5,6)] beinhaltet. Damit wurde die Probenmasse im Mörser zerrieben. Die zerriebenen Explantate wurden sofort in einen 10 ml-Kolben mit 2,4-Dichlorphenol ( $10^{-5}$  M), IAA (40  $\mu\text{g}$  /ml) und Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 5,6)] gegeben. Die Kolben wurden in einen Wasserbadschüttler (30°C mit 130 RpM für 1 Stunde) gesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kolben aus dem Wasserbad herausgenommen und die Lösungen auf die zurückgebliebene IAA-Menge getestet. Dafür wurden die Extrakte aus den Explantaten in Reagenzgläser mit Salkowski-Reagenz (50 ml 35% Perchlorsäure und 1 ml 0,5 M  $\text{FeCl}_3$  ) gefüllt und eine Stunde stehen gelassen, um die Reaktion wirken zu lassen. Nach dem Zentrifugieren mit 300 RpM wurde die Absorption mit einem Spektrophotometer gemessen (450 nm Wellenlänge). Die übriggebliebenen IAA-Mengen wurden mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Anhand der Berechnung der abgebauten IAA-Menge ( $\mu\text{g/g}$  FG/Stunde) wurde die IAA-Oxidase-Aktivität ermittelt.

### **3.13 Anthozyan- und Chlorophyllmessung**

Um den Zusammenhang zwischen somatischer Embryogenese, Anthozyan- und Chlorophyllsynthese zu bestimmen, wurden nach Auswertung der Embryogenesefähigkeit die Anthozyan- und Chlorophyllgehalte der Varianten gemessen.

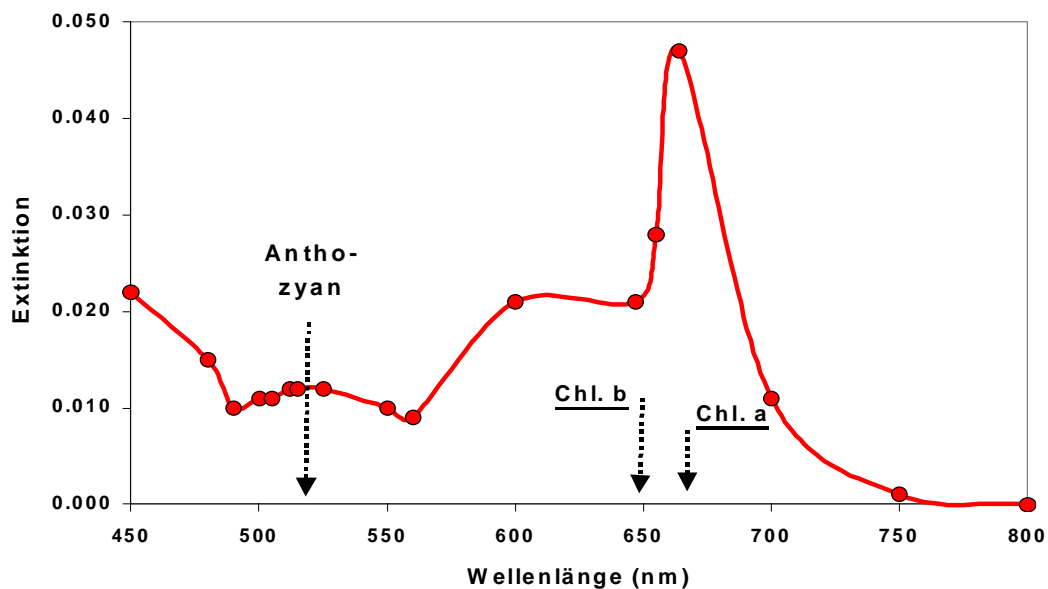
Die geernteten Explantate (verschiedene Embryonenstadien zusammen mit Resten der Explantate) wurden gewogen. Anschließend wurden sie in gleichen Volumina einer Lösung, bestehend aus Methanol +1% HCl gegeben und nach der Abdeckung mit Aluofolie sofort für 12-24 Stunden in einem Dunkelkühlschrank gelagert (Anthozyane sind instabil und verlieren ihre Farbe durch neutrale oder alkalische Lösungen und Licht). Anschließend wurden die Proben aus dem Kühlschrank genommen, sofort

filtriert und ihre Anthozyan- und Chlorophyllgehalte im Vergleich zueinander (quantitativer Vergleich) durch ein Spectrophotometer gemessen (Neumann, 1962). Die Extinktionen der Chlorophyll-Messungen wurden nach Schopfer (1970) in Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Konzentrationen ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) umgerechnet.

**Tab. h:** Wellenlängen für die Spectrophotometer-Messung.

<b>Anthozyan</b>	512 nm
<b>Chlorophyll a</b>	664 nm
<b>Chlorophyll b</b>	647 nm

Die gemessenen Daten wurden entsprechend der jeweiligen Probengewichte umgerechnet. Ein typisches Probenspektrum zwischen 450 nm und 800 nm ist in der Abb. II zu ersehen.



**Abbildung II:** Typisches Probenspektrum zur Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll a und b sowie von Anthozyan.

### 3.14 Statistische Auswertung

Für die Bewertung des Boreinflusses auf die somatische Embryogenese und die Zusammenhänge zwischen somatischer Embryogenese und anderen Faktoren, die in diesen Versuchen eine Rolle spielen, wurden die Daten aller Versuchsgruppen mit Hilfe eines t-Tests, des Duncan-Tests (Vergleich der Mittelwerte) und eines Korrelationstests auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Borbestimmungen in Karottenexplantaten und in der Nährlösung sowie die Freisetzung von Bor aus Glas

Wie aus der Literatur bekannt ist (Mengel und Kirkby, 1987; Asad *et al.*, 1997), ist ein Faktor, der bei der Untersuchung des Einflusses von Bor zu verfälschten Schlußfolgerungen führen kann, die Freisetzung von Bor aus Glas. Dadurch kann in Glasgefäßen kein Bor-Mangel entstehen. Daher sind Untersuchungen mit Bor schwierig. Wegen des Freisetzens von Bor durch Glasgefäße bestanden die Kulturgefäße in den meisten Versuchen aus Polycarbonerlenmeyerkolben. Durch die generelle Verwendung von Polycarbongefäßen anstatt von Glas-t-Tuben kann die Freisetzung von Bor verhindert werden (Tab.1).

**Tabelle 1:** Unterschiede der Borkonzentration in t-Tuben mit dest.Wasser (nach 0 und 20 Tagen) bzw. in Polycarbonerlenmeyerkolben mit B5<sup>-</sup> oder B5<sup>+</sup>-Nährlösung (nach 0 und 20 Tagen). Zusätzlich wurde die Borkonzentration in B5<sup>+</sup>-Nährlösung mit Explantaten (nach 150 Tagen) bestimmt bzw. die Borkonzentration in den Explantaten direkt gemessen (nach 150 Tagen).

Variante	Borkonzentration		
	t <sub>0</sub>	t <sub>20</sub>	t <sub>150</sub>
A. dest. in t-Tuben	0,00 (µg/l)	102,00 (µg/l)	-
B5 <sup>-</sup> -Nährlösung (ohne Bor) in Polycarbonerlenmeyer	4,20 (µg/l)	3,40 (µg/l)	-
B5 <sup>+</sup> -Nährlösung (ohne Bor) in Polycarbonerlenmeyer	4,80 (µg/l)	4,80 (µg/l)	-
B5 <sup>+</sup> -Nährlösung (ohne Bor) mit Explantaten in Polycarbonerlenmeyer	-	-	2,70 (µg/l)
Explantate in B5 <sup>+</sup> -Nährlösung (ohne Bor) in Polycarbonerlenmeyer	-	-	0,30 (µg /g TG) bzw. ca. 0,001(µg/Gefäß)

Die Daten in Tabelle 1 machen deutlich, daß nach mehrmaligem Umsetzen in Polycarbonkolben, welche Nährmedien ohne Bor enthielten, der Borgehalt in den Explantaten abnahm. Gegenüber einem Borgehalt von 17.2 µg/g TG in Karottensamen bzw. einem Borgehalt von 7.3µg/g TG in Petiolen von Karottenpflanzen aus Samen in Agar ohne Bor-Zusatz zeigen diese Werte (Tab. 1) eine deutliche Abnahme des Borgehaltes durch die fünfmonatige Vorkultur der Petiolen-Explantate. Das damit



erhaltene Gewebematerial stellt damit eine ideale Voraussetzung für weitere Versuche mit Bor dar.

#### 4.2 Einfluß von Bor auf das Wachstum von Karottenkeimpflanzen

In diesem Versuch wurde die Reaktion aus Samen angezogener Karottenpflanzen auf verschiedene Borkonzentrationen untersucht. Die Samen wurden in Glasgefäße mit Agar und verschiedenen Borkonzentrationen unter sterilen Bedingungen ausgesät. Die nach der Ernte ermittelten Meßergebnisse der verschiedenen Wachstumsfaktoren sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Einfluß von Bor auf Wachstum und morphologische Reaktionen, z.B. Blätteranzahl, Petiolenlänge, Hauptwurzellänge, Nebenwurzellänge und Hypokotyllänge intakter Karottenpflanzen (Karottensamen auf Agar mit B5-Nährlösung (ohne 2,4-D, mit 10 g/l Saccharose), mit verschiedenen Borkonzentrationen, für 4 Wochen kultiviert.

Bor-Konzentration (ppm)	Blätteranzahl ***	Petiolenlänge (cm)***	Hauptwurzellänge (cm)***	Nebenwurzellänge (cm)***	Hypokotyllänge (cm)***
0	1,32 c <sup>§</sup>	0,83 c	4,26 c	0,00 cd	1,31 c
0,5	2,14 a	5,35 a	8,17 b	3,80 a	1,99 a
5	2,35 a	4,89 a	11,49 a	1,09 b	1,16 cd
10	2,20 a	4,77 a	10,08 ab	1,33 b	1,34 c
20	1,90 ab	3,03 b	9,42 b	0,87 bc	1,64 b
40	1,60 bc	3,15 b	8,70 b	0,43 cd	0,98 de
80	0,55 d	0,49 c	2,55 c	0,00 d	0,79 e

Mittelwerte aus vier Wiederholungen

Die Daten für die Nebenwurzellänge beziehen sich jeweils auf die oberste Nebenwurzel (soweit vorhanden)

\*\*\*Signifikanter Unterschied mit  $p=1\%$

Duncan-Test (Signifikanzniveau 95%):

<sup>§</sup> a, b, c ≡ Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

Nach den Daten in Tabelle 2 hat Bor einen signifikanten Einfluß auf alle gemessenen Wachstumsfaktoren. Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, besteht für das Wachstum und die Entwicklung der einzelnen Organe von *Daucus carota* L. ein Bor-Konzentrationsoptimum zwischen 0,5 und 5,0 ppm im Medium. Hierbei zeigt sich bei der Blattanzahl und der Petiolenlänge ein breiteres Optimum-Gebiet von etwa 0,5 bis

10,0 ppm, während für die Nebenwurzel und die Hypokotyllänge ein ausgeprägtes Bor-Optimum bei 0,5 ppm zu beobachten ist.

Bei den Karottenpflanzen auf Agar mit Nährmedium (5 ppm Bor) waren die Nebenwurzeln länger, schmaler und brauner als bei den Varianten mit 0 ppm Bor.

In allen Fällen hat eine Konzentration von 80 ppm Bor den negativsten Einfluß.

Aus den Daten in Tab.2. läßt sich entnehmen, daß die Bor-Toxizität ungefähr ab einer Konzentration von 40 ppm beginnt und mit steigender Konzentration zunimmt.

Als Symptome einer Bor-Toxizität traten in dieser Untersuchung allgemeine Chlorosen auf, die in den Blättern begannen und sich bis in die Petiolen fortsetzten. Der Unterschied zwischen den Symptomen von Bortoxizität und -mangel liegt darin, daß bei Bormangel zuerst die Petiolen (genau unter der Blattlamina) schmaler werden. Danach legt sich die Blattlamina zusammen. Anschließend treten Nekrosen in Petiolen und Blattlamina auf. Kastori *et al.* (1995) berichten über verminderte photosynthetische O<sub>2</sub>-Entwicklung in den Blättern von Sonnenblumen mit Bormangel und einen damit verbundenen verminderten Chlorophyllgehalt in den Lamina. Bor-Toxizität äußert sich dagegen in allgemeinen Chlorosen, ohne daß die Blätter sich zusammenlegen, und ohne daß die Petiolen schmaler werden.

Ein anderes Symptom für Bor-Toxizität besteht in einer Reduzierung von Entwicklung und Wachstum der Hauptwurzel und Nebenwurzeln (Tab. 2 und Abb. 1.1).

In den Abbildungen 1.1 bis 1.9 ist der Habitus der Karottenpflänzchen bei einzelnen Borstufen dargestellt.



**Abbildung 1.1:** Unterschiede des Wachstums von Karottenpflanzen auf Agar mit 0, 5, 10 bzw. 80 ppm Bor (rechts). Die zusammengefalteten Blätter bei 0 ppm Bor (s. Markierung) sind ein deutliches Bormangel-Symptom. Bei 80 ppm Bor war das Pflanzenwachstum sehr gering (s. Markierung).



**Abbildung 1.2:** Karottenpflanzen auf Agar mit 0,5 ppm Bor (üblich).



**Abbildung 1.3:** Vergleich zwischen Karottenpflanzen, die auf Agar mit 0,5 ppm Bor bzw. ohne Bor (rechts) gewachsen sind.



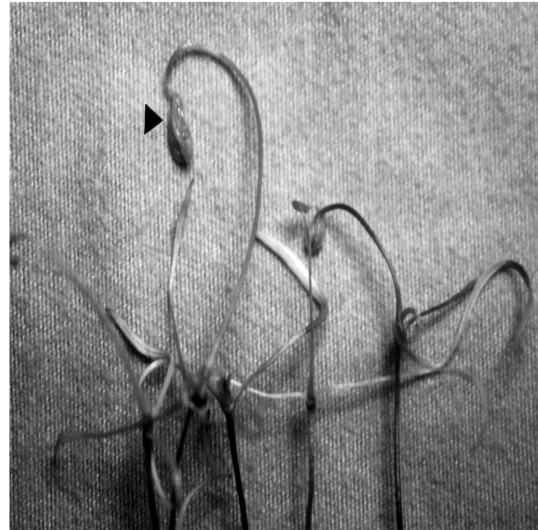
**Abbildung 1.4:** Primärblätter von Karottenpflanzen, bevor Bormangelsymptome sichtbar werden.



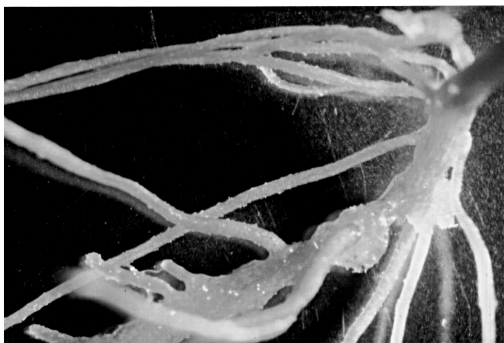
**Abbildung 1.5:** Chlorotische, direkt unter der gekrümmten Blattlamina verschmälerte und gebogene Petiolen (s. Markierung) als Merkmale des Bormangels.



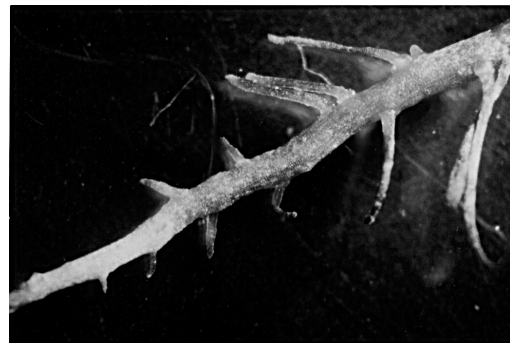
**Abbildung 1.6:** Karottenpflanzen unter Bormangelbedingungen. Im Vergleich mit der Abbildung (1.4), zeigen sich deutliche Symptome, wie z.B. gekrümmte Blattlamina und unter ihnen schmale Petiolen (s. Markierung), die als typische Merkmale für Bormangel gelten



**Abbildung 1.7:** Karottenpflanzen auf Agar mit 0 ppm Bor. Die schmalen Petiolen unter der Blattlamina und die zusammengefaltete Lamina (s. Markierung) sind in diesem Versuch ein deutliches Symptom für Bormangel.



**Abbildung 1.8:** Wurzelwachstum bei Karottenpflanzen auf Agar mit 0,5 ppm Bor



**Abbildung 1.9:** Wurzelwachstum bei Karottenpflanzen auf Agar mit 0 ppm Bor. Als Bormangelsymptome zeigten sich in diesem Versuch gestörtes Wurzelwachstum und verdickte Wurzeln mit abgestorbenen Wurzelspitzen.

### 4.3 Einfluß von Bor und Saccharose auf das Wachstum von Karottenpflanzen

Für Untersuchungen über den Zusammenhang bzw. synergistische und antagonistische Wirkungen zwischen Bor und Saccharose auf das Wachstum von Karottenpflanzen wurden Karottensamen auf Agar ohne und mit 0,5 ppm Bor und mit und ohne 20 g/l

Saccharose (B5<sup>-</sup>-Medium) kultiviert. Aus den Daten in Tab.3 läßt sich entnehmen, daß maximales Wachstum der Karottenpflanzen bei den Varianten auftritt, die sowohl Bor als auch Saccharose erhielten. Bei den anderen Varianten zeigten sich bezüglich der verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. des Organwachstums der Karottenpflanzen unterschiedliche Reaktionen, z.B. ein Maximum beim Wachstum der Petiolen bei (+B-Sacch.), das Maximum des Wurzelwachstums lag bei (-B-Sacch.), das des Hypokotylwachstums bei (-B+Sacch.).

**Tabelle.3:** Einfluß von Bor und Saccharose auf das Wachstum und die morphologischen Reaktionen z.B. Blätteranzahl, Petiolenlänge, Wurzellänge, Hypokotylenlänge. Daten wurden von intakten Karottenpflanzen erhoben. Karottensamen wurden für 4 Wochen auf Agar mit B5<sup>-</sup>-Nährlösung (ohne 2,4-D) kultiviert. Die Nährmedien wurden mit verschiedenen Kombinationen von Bor (0 bzw. 0,5 ppm) und/oder Saccharose (0 bzw. 20 g/l) angesetzt].

Saccharose-Varianten	- Sacch.				+Sacch.				
	Bor-Varianten	Blätteranzahl	Petiolenlänge (cm)	Wurzellänge (cm)	Hypokotylenlänge (cm)	Blätteranzahl	Petiolenlänge (cm)	Wurzellänge (cm)	Hypokotylenlänge
- Bor		1,58	1,09	5,33	1,03	1,32	0,83	4,26	1,31
+ Bor		1,56	2,17	4,53	1,23	2,17	4,35	8,17	1,99

*Mittelwerte aus vier Wiederholungen*

Die in diesem Versuch gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß bei der Variante (-B-Sacch.) im Vergleich zu der Variante (-B+Sacch.) die Anzahl der Blätter erhöht war (Tab. 3). Bei der Variante (-B+Sacch.) im Vergleich zu der Variante (-B-Sacch.) waren die Wurzeln stärker (s. Abb. 2.1).

Im Vergleich zu den Varianten (-B+Sacch.), (+B+Sacch.) und (-B-Sacch.) war das Hypokotylwachstum bei der Variante (-B-Sacch.) gering (Tab. 3, Abb. 2.1 und 2.2). Bei der Variante (+B-Sacch.) waren (Abb. 2.2) die Pflanzen schwach, die ganzen Pflanzen und besonders die Wurzeln, waren schmal, zart und gebrechlich. Bei dieser Variante wurden fast keine Nebenwurzeln entwickelt.

**Tabelle.3.1:** Die Bestimmung der Anthozyankonzentration bei Petiolen, Hypokotylen und Wurzeln, sowie die Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll-a und -b bei Petiolen, Hypokotylen, Wurzeln [Alle Daten wurden von intakten Karottenpflanzen erhoben. Karottensamen wurden für 4 Wochen auf Agar mit B5-Nährlösung (ohne 2,4-D) kultiviert. Nährmedien wurden mit verschiedenen Kombinationen von Bor (0 bzw. 0,5 ppm) und/oder Saccharose (0 bzw. 20 g/l) angesetzt].

Saccharose-Varianten	- Sacch.						+Sacch.					
	Anthozyan <sup>×</sup>			Chlorophyll a/b (mg.l <sup>-1</sup> )			Anthozyan <sup>×</sup>			Chlorophyll a/b (mg.l <sup>-1</sup> )		
Bor-Varianten	Petio- len	Hypo- koty- len	Wur- zeln	Petio- len	Hypo- koty- len	Wur- zeln	Petio- len	Hypo- koty- len	Wur- zeln	Petio- len	Hypo- koty- len	Wur- zeln
- Bor	0,04	0,03	0,01	1,40/ 1,20	0,50/ 0,40	0,19/ 0,15	0,02	0,03	0,01	0,41/ 0,32	0,35/ 0,26	0,10/ 0,08
+ Bor	0,03	0,02	0,01	1,40/ 1,10	0,37/ 0,35	0,11/ 0,10	0,02	0,03	0,03	0,70/ 0,67	0,30/ 0,27	0,19/ 0,18

Mittelwerte aus vier Wiederholungen

× (Extinktionen gegen die Extraktionsmedien, s. Kap. 3.13)

Bei der Variante (-B-Sacch.) waren nach Tab. 3.1 die Anthozyangehalte der Petiolen am höchsten, während die Variante (+B+Sacch.) die höchste Anthozyankonzentration in Hypokotyl und Wurzeln zeigte. Die Petiolen und Wurzeln von Pflanzen, die im Medium (-B+Sacch.) wuchsen, bildeten nur wenig Anthozyan, während bei der Variante (+B-Sacch.) die Hypokotyle einen geringen Anthozyangehalt aufwiesen.

Der höchste Chlorophyllgehalt zeigte sich in den Petiolen und Hypokotylen bei der Variante (-B-Sacch.), an zweiter Stelle lag die Variante (+B-Sacch.). Die Variante (-B+Sacch.) hatte die geringste Chlorophyllkonzentration. Man kann also feststellen, daß die Karotten in Medien ohne Saccharose eine höhere Chlorophyllkonzentration zeigten. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit Befunden von Bender et al. (1987).

Aus der Varianzanalyse (Tab.3.2) ergibt sich, daß sowohl Bor als auch Saccharose auf die Petiolenlänge einen signifikanten Einfluß haben, und daß auch die Interaktion zwischen Bor und Saccharose hoch signifikant ist. Das bedeutet, daß die Wirkung eines Faktors von der Anwesenheit oder Abwesenheit des anderen Faktors abhängig ist.

**Table 3.2:** Varianzanalyse der Petiolenlänge, von Karottenpflanzen (Agar-Kultur) unter dem Einfluß von Bor und Saccharose

Faktoren	Quadrat-Summe	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>BOR</b>	21,25210	1	21,25210	40,13838	0,00004
<b>SACCHAROSE</b>	3,70562	1	3,70562	6,99873	0,02136
<b>BOR * SACCHAROSE</b>	5,92923	1	5,92923	11,19840	0,00582
<b>Fehler</b>	6,35365	12	0,52947		

Auch der Einfluß von Bor und Saccharose auf die Anzahl der Blätter pro Pflanze und die Wurzel- bzw. Nebenwurzellänge ist in jedem Fall signifikant (Tab. 3.3; 3.4; 3.5).

**Tabelle 3.3:** Varianzanalyse der Blattanzahl pro Pflanze von Karottenpflanzen (Agar-Kultur) unter dem Einfluß von Bor und Saccharose.

Faktoren	Quadrat-Summe	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>BOR</b>	0,68890	1	0,68890	14,9536	0,00224
<b>SACCHAROSE</b>	0,12960	1	0,12960	2,81306	0,11933
<b>BOR * SACCHAROSE</b>	0,74823	1	0,74823	16,2405	0,00167
<b>Fehler</b>	0,55285	12	0,04607		

**Tabelle 3.4:** Varianzanalyse der Wurzellänge von Karottenpflanzen (Agar-Kultur) unter dem Einfluß von Bor und Saccharose.

Faktoren	Quadrat-Summe	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>BOR</b>	9,62551	1	9,62551	16,00533	0,00176
<b>SACCHAROSE</b>	6,59206	1	6,59206	10,96130	0,00622
<b>BOR * SACCHAROSE</b>	22,16056	1	22,16056	36,84866	0,00006
<b>Fehler</b>	7,21672	12	0,60139		

**Tabelle 3.5:** Varianzanalyse der Nebenwurzellänge, von Karottenpflanzen (Agar-Kultur) unter dem Einfluß von Bor und Saccharose.

Faktoren	Quadrat-Summe	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>BOR</b>	9,63037	1	9,63037	143,31876	1,1918E-07
<b>SACCHAROSE</b>	11,66587	1	11,66587	173,61099	4,42461E-08
<b>BOR * SACCHAROSE</b>	9,63037	1	9,63037	143,31876	1,19198E-07
<b>Fehler</b>	0,73915	11			

Die Daten aus den Varianzanalysentabellen (Tab. 3.2 bis 3.5) zeigen, daß, abgesehen von der positiven Interaktion zwischen Bor und Saccharose, auch jeder einzelne dieser beiden Faktoren separat einen Einfluß auf die Physiologie und Morphologie von Karotten hat.

In den Abbildungen 2.1 bis 2.4 ist der Habitus der Karottenpflanzen in Agar-Kultur mit unterschiedlicher Bor-Applikation dargestellt.

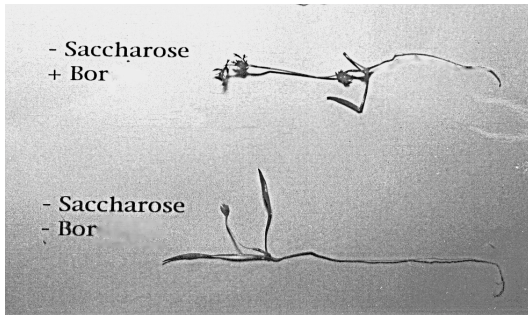


**Abbildung 2.1:** Unterschiede zwischen auf Agar gewachsenen Karottenpflanzen mit Saccharose und ohne Bor (-B+S) und ohne Saccharose und ohne Bor (-B-S) (rechts).

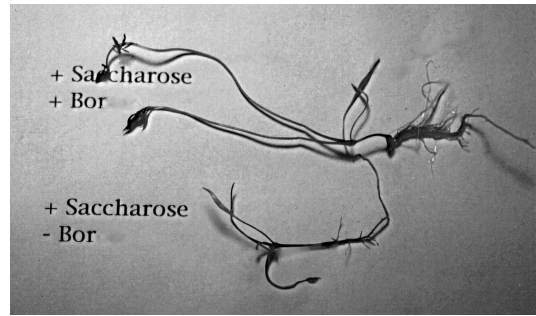


**Abbildung 2.2:** Unterschiede zwischen auf Agar gewachsenen Karottenpflanzen mit Bor und ohne Saccharose (+B-S) und mit Bor und Saccharose (+B+S) (rechts).





**Abbildung 2.3:** Unterschiede zwischen auf Agar gewachsenen Karottenpflanzen, ohne Saccharose (-Sacch.) und ohne Bor (-Bor) bzw. mit Bor (+Bor).



**Abbildung 2.4:** Unterschiede zwischen auf Agar gewachsenen Karottenpflanzen mit Saccharose (+Sacch.) und ohne Bor (-Bor) bzw. mit Bor (+Bor).

## 4.4 Einfluß von Bor auf die somatische Embryogenese

### 4.4.1 Vorversuche mit Petiolenkultur

Der erste Versuch, mit dem der Einfluß von Bor auf die somatische Embryogenese untersucht wird, besteht aus Petiolenkulturen in  $B5^+$ -Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen. Nach zwei Wochen Kultivierung wurden die Explantate in  $B5^-$ -Nährlösungen mit der vorherigen Borkonzentration umgesetzt und dort nach zwei bzw. vier Wochen auf das Vorhandensein von somatischen Embryonen geprüft (siehe Tab. 4).

**Tabelle 4:** Die Wirkung verschiedener Borkonzentrationen auf die Differenzierung somatischer Embryonen von Petiolenexplantaten (Anteil globulärer, herzförmiger und torpedoförmiger Embryonen) und auf die morphologischen Reaktionen [Embryonenwurzelwachstum (WW.) und Embryonenkotyledonenwachstum (KW)] während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese in Petiolenexplantaten aus im Boden gewachsenen-Karottenpflanzen (14 Tage in B5<sup>+</sup>-Nährlösungen und anschließend für 14 bzw. 24 Tage in B5<sup>-</sup>-Nährmedium).

B5 <sup>+</sup> (14 Tage)	B5 <sup>-</sup>	Realisierungsphase (14 Tage)					Realisierungsphase (24 Tage)					
		Bor (ppm)	Bor (ppm)	Glo- bulär	herz- förmig	tor- pedo- förmig	WW	KW	Glo- bulär	herz- förmig	tor- pedo- förmig	WW
0,25	0,25		+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	++
0,50	0,50		++	++	+++	+	++	+	+	++++	++	+++
1,00	1,00		++	++	++++	+	++++	+	+	++++	++	+++
2,00	2,00		+	+	++	+	++++	+	+	+	+	+++
3,00	3,00		+	+	+	+	++++	+	+	+	-	++++

Bonitierungsklassen:

+, ++, +++, +++++: relative Mengenangabe  
(+) = wenig, (+++++) = viel, - = keine

Die in Tabelle 4 ausgeführten Ergebnisse zeigen, daß im Falle aller Borkonzentrationen Embryogenese vorkommt, auch bei der Variante mit 0,25 ppm Bor wurden Embryonen in verschiedenen Stadien beobachtet. Nach Bonitierung der Kulturen wurde nach 14 Tagen zunächst festgestellt, daß die Embryonen im Globulär- und im Herzstadium bei 0,25 ppm Bor in höchster Zahl vorkommen, während bei einer Borkonzentration von 1 ppm die Anzahl der torpedoförmigen Embryonen am größten war. Bis zum Bonitierungstermin nach 24 Tagen ist aus Tabelle 4 zu entnehmen, daß die Embryonenentwicklung das Globulär- und Herzstadium durchlaufen und bereits höhere Stadien erreicht hatte.

Das beste Wurzelwachstum war nach 24 Tagen Kultivierung bei der Variante mit 0,25 ppm Bor sichtbar, während das ausgeprägteste Cotyledonenwachstum nach 2 und 4 Wochen bei der Variante mit 3 ppm Bor erreicht wurde.

#### 4.4.2 Vorversuche mit Suspensionskultur aus Petiolen

Zur Untersuchung der Frage, ob bei einer Borkonzentration von 0 ppm in Kulturen von Karottensuspensionen Embryogenese möglich ist, wurde ein Versuch nach den Angaben von Tab. 5 durchgeführt.

**Tabelle. 5:** Die Wirkung verschiedener Borkonzentrationen auf die somatische Embryonendifferenzierung (Anteil globulärer, herzförmiger und torpedoförmiger Embryonen) und auf die morphologischen Reaktionen (Embryonenwurzelwachstum und Embryonencotyledonenwachstum) während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese in Petiolenzellsuspensionen aus Bor-freien B5<sup>+</sup>-Nährlösungen, die 23 Tage in B5<sup>-</sup>-Nährmedien kultiviert wurden.

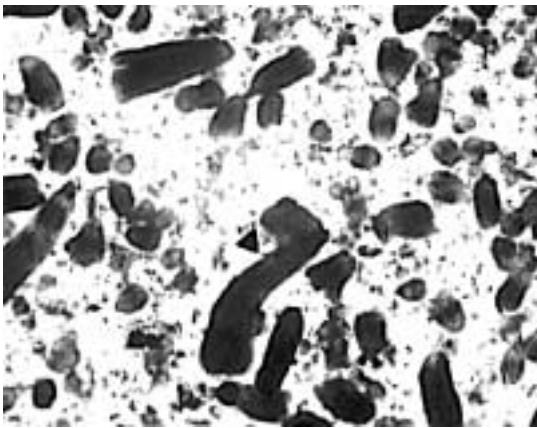
Borkonzentrationen (ppm)	Globulär	herzförmig	torpedoförmig	Embryonenwurzelwachstum	Embryonencotyledonenwachstum
0	+++	+++	+++	++++	+
0,25	+++	+++	+++	+++	+
0,5	+++	+++	+++	++	++
1	++	++	++	++	++
2	++	++	++	+	++
3	+	+	+	+	++

Bonitierungsklassen:

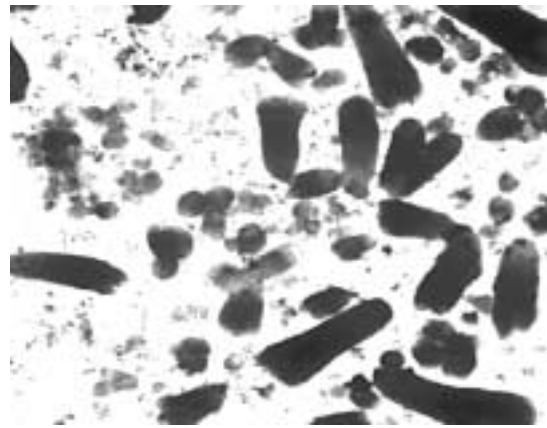
+, ++, +++, +++++: relative Mengenangabe

(+) = wenig, (+++++) = viel

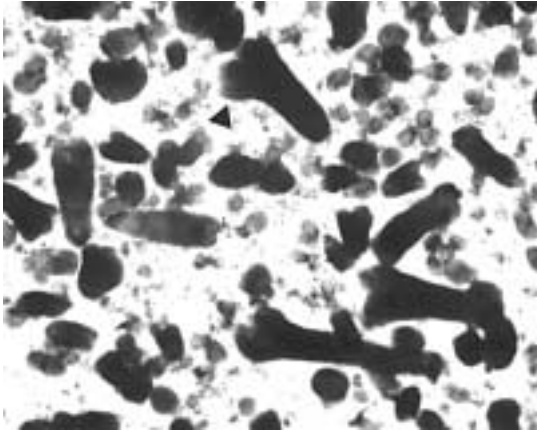
Aus der Tabelle 5 und den folgenden Abbildungen 3.1 bis 3.6 ist ersichtlich, daß bei verschiedenen Bor-Varianten Embryonen in unterschiedlichen Stadien entstehen. Der vorgestellte Versuch hat gezeigt, daß die Embryogenese auch bei 0 ppm Bor möglich ist, Bormangel scheint sogar einen positiven Einfluß auf die Anzahl der entstandenen Embryonen zu haben. Ein anderes Ergebnis des Versuches war die Beobachtung des Einflusses von Bor auf das Wachstum der Embryonenwurzeln und -cotyledonen. Bei niedrigeren Borgehalten kam es zu stärkerem Wurzelwachstum und bei höheren Borkonzentrationen zu stärkerem Cotyledonenwachstum.



**Abbildung 3.1:** Karottenembryonen in B5-Nährlösung mit 0ppm Bor nach 14 Tagen (Die Markierung zeigt bei 0 ppm Bor ein im Vergleich zu den anderen Bor-Konzentrationen ein vergleichsweise stärkeres Wurzelwachstum und ein schwächeres Cotyledonenwachstum).



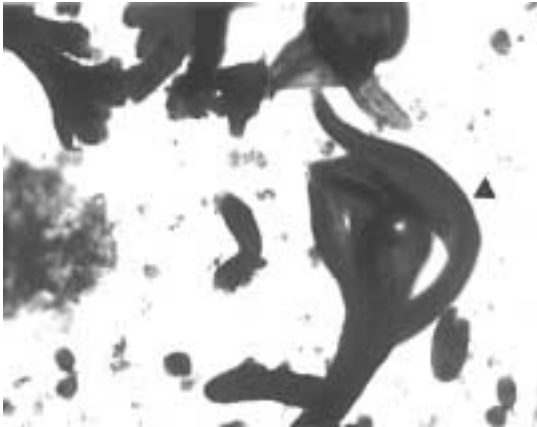
**Abbildung.3.2:** Karottenembryonen in B5-Nährlösung mit 0,25ppm Bor nach 14 Tagen.



**Abbildung 3.3:** Karottenembryonen in B5-Nährlösung mit 0,5ppm Bor nach 14 Tagen (Markierung: das Cotyledonenwachstum ist besser als bei der Variante mit 0 ppm Bor).



**Abbildung 3.4:** Karottenembryonen in B5-Nährlösung mit 1ppm Bor nach 14 Tagen (Markierung: das Wurzelwachstum ist schwächer als das der Cotyledonen).



**Abbildung 3.5:** Karottenembryonen in B5-Nährlösung mit 2ppm Bor nach 14 Tagen (Markierung: das Cotyledonenwachstum ist stark).



**Abbildung 3.6:** Karottenembryonen in B5-Nährlösung mit 3ppm Bor nach 14 Tagen (Die Markierungen zeigen einen Zusammenhang zwischen Bor und Cotyledonenwachstum).

#### 4.4.3 Untersuchung von Hormonen im Nährmedium und zum Boreinfluß auf die somatische Embryogenese von Karotten-Petiolenkulturen während der Induktionsphase

Wie die bisher durchgeführten Versuche gezeigt haben, führt das zu beobachtende Embryonenwachstum zu der Annahme, daß die Wirkung von Bor auf die somatische Embryogenese durch pflanzliche Hormone zustande kommt, deren Wirkung dem

Einfluß von Bor ähnlich ist. Daher wurde ein Versuch mit verschiedenen Wachstumsregulatoren mit und ohne Bor während der Induktionsphase (14 Tage) mit nachfolgender Realisierungsphase angelegt, wo die Explantate ohne und mit Bor 20 Tage wachsen konnten. Die Ergebnisse der Tabelle 6.1a und 6.1b zeigen, daß im Falle der Varianten ohne 2,4-D im allgemeinen keine somatischen Embryonen zu beobachten waren. Kinetin konnte nicht statt 2,4-D eingesetzt werden, um somatische Embryonen zu induzieren, es hatte sogar einen negativen Einfluß auf die Anzahl der entstandenen Embryonen, d.h. Kinetin scheint ein Inhibitor in Bezug auf die Induzierung der somatischen Embryogenese zu sein.

**Tabelle 6.1:** Der Einfluß von **Bormangel** und **0,5 mg/l Bor** während der **Induktionsphase** (14 Tage) bei verschiedenen Kombinationen von 2,4-D (5 mg/l) und Kinetin (0,01 mg/l) mit nachfolgender Kultur mit und ohne Bor während der Realisierungsphase (20 Tage) auf die somatische Embryogenese von Petiolenexplantaten (6 Petiolen pro Kulturgefäß) von *Daucus carota* L., bezogen auf die Embryonenzahl nach der Realisierungsphase, sowie die nach Wake et al. (1995) einzuteilenden Embryonenstadien [Anteil der globulären und herzförmigen Embryonen (90-425µm), Anteil der Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm) und Anteil der großen Embryonen (>800 µm)].

Induktionsphase (14 Tage)																
B5 (-Bor)																
+ 2.4-D																
- 2.4-D																
Realisierungsphase (20 Tage)	+Kinetin				-Kinetin				+Kinetin				-Kinetin			
	Embryonalstadium (%)				Embryonalstadium (%)				Embryonalstadium (%)				Embryonalstadium (%)			
B5 (□Bor)	Anzahl-Embryonen	90-420µm	425-800µm	>800µm	Anzahl-Embryonen	90-420µm	425-800µm	>800µm	Anzahl-Embryonen	90-420µm	425-800µm	>800µm	Anzahl-Embryonen	90-420µm	425-800µm	>800µm
-Bor	9,1	71,96	28,03	0,00	524	76,8	11,33	11,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
+Bor	16	43,18	24,08	32,54	648	73,06	14,06	12,66	0,00	0,00	0,00	0,00	2,3	0,00	0,00	100
B5 (+ 0,5 ppm Bor)																
-Bor	3,3	60,60	30,30	9,09	690	80,70	10,00	9,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
+Bor	102	76,47	11,76	11,76	290	61,89	17,49	20,6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

B5 (+B oder -B) = B5-Nährlösung ( mit 0,5 ppm oder ohne Bor)

Die Daten zeigen, daß bei Bor-Mangel (Tab. 6.1) in der Induktionsphase eine größere Anzahl Embryonen gebildet wurde. Es ist ein Indiz dafür, daß Bor-Mangel während der Induktionsphase keinen negativen Einfluß auf die Induktion der somatischen Embryogenese ausüben kann. Aus diesem Versuch geht auch hervor, daß zur Induktion von Embryonen 2,4-D erforderlich ist. Die Kinetin-Applikation führt nur dann zur Bildung von Embryonen, wenn 2,4-D während der Induktionphase und eine zusätzliche Bor-Dosis während der Realisierungsphase appliziert werden, so daß bei 2,4-D Gegenwart Kinetin und Bor eine synergistische Wirkung ausüben können.

Die Ergebnisse der Varianzanalyse über den Einfluß der in diesem Versuch benutzten Varianten auf die Bildung somatischer Embryonen sind den Tabellen 6.1.1 bis 6.1.4. zu entnehmen.

**Tabelle 6.1.1:** Ergebnis der Varianzanalyse zur Aufklärung der Varianz der gemessenen Embryonenzahl im Hinblick auf die Bor- und Hormon-Applikation in der Induktionsphase sowie die Bor-Applikation während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.

Faktoren	Summe-Quadrate	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>Bor-Ind.-Phase</b>	27507	1	27507	0,194	0,660
<b>Hormon-Ind.-Phase</b>	8668537	3	2889512	20,414	0,000
<b>Bor-Real.-Phase</b>	6536	1	6536	0,399	0,528
<b>Fehler</b>	9068368 19392040	5 137	1813674 141548	12,813	0,000
<b>Gesamt</b>	28460408	142	200425		

**Tabelle 6.1.2:** Ergebnis der Varianzanalyse zur Aufklärung der Varianz der Bildung von Embryonen mit der Größe 90 - 425µm, im Hinblick auf die Bor- und Hormon-Applikation in der Induktionsphase sowie die Bor-Applikation während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.

Faktoren	Summe-Quadrate	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>Bor-Ind.-Phase</b>	17016	1	17016	0,147	0,7023
<b>Hormon-Ind.-Phase</b>	5527808	3	1842602	15,881	0,000
<b>Bor-Real.-Phase</b>	70249	1	70249	0,605	0,4378
<b>Fehler</b>	5820776 15895976	5 137	1164155 116029	10,033	0,000
<b>Gesamt</b>	21716752	142	152934		

**Tabelle 6.1.3:** Ergebnis der Varianzanalyse zur Aufklärung der Varianz der Bildung von Embryonen mit der Größe 425-800  $\mu\text{m}$ , im Hinblick auf die Bor- und Hormon-Applikation in der Induktionsphase sowie die Bor- Applikation während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.

Faktoren	Summe-Quadrate	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>Bor-Ind.-Phase</b>	1015	1	1015	0,711	0,4005
<b>Hormon-Ind.-Phase</b>	123128	3	41042	28,746	0,000
<b>Bor-Real.-Phase</b>	46	1	46	0,033	0,8571
<b>Fehler</b>	126345 195602	5 137	25269 1427	17,698	0,000
<b>Gesamt</b>	321948	142	2267		

**Tabelle 6.1.4:** Ergebnis der Varianzanalyse zur Aufklärung der Varianz der Bildung von Embryonen mit der Größe  $>800 \mu\text{m}$ , im Hinblick auf die Bor- und Hormon-Applikation in der Induktionsphase sowie die Bor- Applikation während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.

Faktoren	Summe-Quadrate	FG	Mittlere-Quadrate	F-Statistik	Signifikanz
<b>Bor-Ind.-Phase</b>	12	1	12	0,061	0,8059
<b>Hormon-Ind.-Phase</b>	58766	3	19588	94,755	0,000
<b>Bor-Real.-Phase</b>	418	1	418	2,024	0,1571
<b>Fehler</b>	62504 28322	5 137	12500 206	60,469	0,000
<b>Gesamt</b>	90826	142	639		

Nach den Ergebnissen der Varianzanalyse für die Gesamtzahl der gebildeten Embryonen ist festzustellen, daß der Boreinfluß weder in der Induktionphase, noch in der Realisierungsphase signifikant ist, sondern daß nur die Hormonkombination während der Induktionsphase einen signifikanten Effekt ausgeübt hat. Wie den Tabellen 6.1.2 bis 6.1.4 zu entnehmen ist, gilt diese allgemeine Tendenz auch für die Embryonenzahl in verschiedenen Entwicklungsstadien nach Wake et al. (1995). Um den Zusammenhang zwischen der Borkonzentration und den bei dieser Untersuchung gemessenen Faktoren im Laufe der Realisierungsphase charakterisieren zu können, wurden Korrelationskoeffizienten berechnet (s. Tab. 6.1.5).



**Tabelle 6.1.5:** Korrelationskoeffizienten zwischen den gemessenen Faktoren [Borkonzentration (0 und 0,5 mg/l) in der Realisierungsphase (Real.Bor), totale Embryonenzahl, Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), Anteil der Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm), Anteil der großen Embryonen (>800 µm)] im Laufe der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese in Petiolenexplantaten [Induktionsphase (14 Tage Kulturdauer) und Realisierungsphase (20 Tage Kulturdauer)]

	<b>Bor-Ind. phase</b>	<b>Bor-Real. phase</b>	<b>Embryonenzahl</b>	<b>90-425 µm</b>	<b>425-800 µm</b>	<b>&gt;800 µm</b>
<b>Bor-Ind. phase</b>	-					
<b>Bor-Real. phase</b>	0,00	-				
<b>Embryonenzahl</b>	-0,08	-0,11	-			
<b>90-425 µm</b>	-0,07	-0,01	0,99	-		
<b>425-800 µm</b>	-0,01	0,07	0,88	0,85	-	
<b>&gt;800 µm</b>	-0,07	0,12	0,20	0,14	0,37	-

Aus der Tabelle 6.1.5 ist eine schwach negative Korrelation zwischen der Borkonzentration in der Realisierungsphase und der Embryonenzahl ableitbar, auch zeigt Bor eine negative Wirkung auf die Anzahl der Embryonen und auf die Anzahl globulär-, herzförmigen und torpedoförmigen Embryonen in jeder Variante im Laufe der Induktionsphase. Der Einfluß der Borkonzentration im Laufe der Realisierungsphase zeigt sich in der schwach negativen Wirkung auf die Anzahl von globulär- und herzförmigen (90-425 µm) und der positiven Wirkung auf die Zahl großer torpedoförmiger (>800 µm) Embryonen.

Aus der Tabelle ist weiterhin eine positive Korrelation zwischen der Anzahl globulär- und herzförmiger Embryonen und der Zahl größerer bzw. torpedoförmiger Embryonen ableitbar, was mit Veränderung ihrer Anteile (%) in den verschiedenen Stadien während der Realisierungsphase in Verbindung steht (s. Tab. 6.1).

Aus der Tabelle 6.1 ist ersichtlich, daß die Kinetinverwendung im Laufe der Induktionsphase die Induktion somatischer Embryonen bedeutend hemmt und eine starke Senkung der Embryonenzahl verursacht.

**Tabelle 6.1.6:** Korrelationskoeffizienten zwischen Bor bzw. Kinetin und den gemessenen Prüfmerkmalen [Embryonenanzahl, Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), Anteil der Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm), Anteil der großen Embryonen (>800 µm)], während der Induktionsphase der somatischen Embryogenese in Karottenpetiolenexplantaten

Varianten	Anzahl-Embryonen	90-425µm	425-800µm	> 800 µm
0 <sup>+</sup> <sub>+K</sub>	-0,99	-0,65	0,97	0,18

0<sup>+</sup><sub>+k</sub> = B5 (-Bor + 2,4-D + Kinetin) = B5-Nährlösung mit 2,4-D und Kinetin und ohne Bor

**Tabelle 6.1.7:** Korrelationskoeffizienten zwischen Bor bzw. Kinetin und den gemessenen Prüfmerkmalen [Embryonenanzahl, Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), Anteil der Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm), Anteil der großen Embryonen (>800 µm)], während der Induktionsphase der somatischen Embryogenese in Karottenpetiolenexplantaten

Varianten	Anzahl-Embryonen	90-425µm	425-800µm	>800µm
0,5 <sup>+</sup> <sub>+K</sub>	-0,83	-0,16	0,46	-0,47

0,5<sup>+</sup><sub>+k</sub> = B5 (+Bor + 2,4-D + Kinetin) = B5-Nährlösung mit 2,4-D, Bor und Kinetin

Die Daten aus den Tabellen 6.1.6 und 6.1.7 zeigen einen Unterschied in der Embryonenanzahl bzw. eine Verminderung der Embryonenanzahl, wenn in der Induktionsphase Kinetin mit/ohne Bor verwendet wurde. Deshalb scheinen Cytokinine hemmende Faktoren für die Induzierung somatischer Embryonen zu sein. Borverwendung mit Kinetin in der Induktionsphase erhöht die Embryonenzahl nicht signifikant, während der Anteil der größeren Embryonen (besonders die mit >800 µm) sich vermindert. Der beobachtete synergistische Effekt zwischen der Bor- und der Kinetinwirkung während der Induktionsphase ist schwer zu interpretieren, da die Auswirkung des Kinetins bis zu der Realisierungsphase dauern kann. Während dieser Phase fördert diese weitergehende Wirkung dieses Cytokinins in einer der verwendeten B5<sup>-</sup>-Nährlösungen wahrscheinlich die Entstehung somatischer Embryonen. Es muß beachtet werden, daß die endogene IES-Konzentration bei 0,5 ppm Bor relativ hoch sein kann (s.Tab.21).

In diesem Versuch trat bei den Varianten, die während der Induktionsphase kein 2,4-D bekommen hatten, anstatt Embryogenese in bestimmten Fällen Organogenese auf. Bei diesen Petiolenexplantaten wurden Adventivwurzeln gebildet (mit Ausnahme der Varianten, in deren Nährlösungen während der Induktionsphase Kinetin beigemischt wurde, siehe Tabelle 6.2).

**Tabelle 6.2:** Die Wirkung verschiedener Kombinationen von 2,4-D (5 mg/l), Kinetin (0,01 mg/l) und **Bor (0 bzw. 0,5 mg/l)**, während der **Induktionsphase** (14 Tage Kulturdauer) und die Wirkung von Bor (0 und 0,5 mg/l), während der Realisierungsphase (20 Tage Kulturdauer) der somatischen Embryogenese in Karottenpetiolenexplantaten (6 Petiolen pro Kulturgefäß) auf die Adventivwurzelbildung.

Induktionsphase (14 Tage)																									
B5 (-Bor)																									
+ 2.4-D												- 2.4-D													
Realisierungsphase (20 Tage)	+Kinetin						-Kinetin						+Kinetin						-Kinetin						
	Adventivwurzel						Adventivwurzel						Adventivwurzel						Adventivwurzel						
B5	Anzahl-Embryonen	Petiolen mit Wurzel (%)	Wurzeln pro Petiole	Wurzel-länge (cm)	Neben-wurzelzahl	Neben-wurzel-länge (cm)	Anzahl-Embryonen	Petiolen mit Wurzel (%)	Wurzeln pro Petiole	Wurzel-länge (cm)	Neben-wurzelzahl	Neben-wurzel-länge (cm)	Anzahl-Embryonen	Petiolen mit Wurzel (%)	Wurzeln pro Petiole	Wurzel-länge (cm)	Neben-wurzelzahl	Neben-wurzel-länge (cm)	Anzahl-Embryonen	Petiolen mit Wurzel (%)	Wurzeln pro Petiole	Wurzel-länge (cm)	Neben-wurzelzahl	Neben-wurzel-länge (cm)	
-Bor	9,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	524	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,50	0,74	4,81	9,00	3,09
+Bor	16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	648	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,30	24,91	0,68	7,18	13,00	3,61
B5 (+ 0,5 ppm Bor)																									
-Bor	3,3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	690	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
+Bor	102	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	290	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	0,33	5,7	0,00	0,00

B5 (+B oder -B) = B5-Nährlösung ( mit 0,5 ppm oder ohne Bor)

Aus den Angaben der Tabelle 6.2 ist ersichtlich, daß die Organogenese bzw. die Ausbildung adventiver Wurzeln bei den Varianten vorgekommen ist, die während der Induktionsphase kein 2.4-D bzw. Kinetin bekommen haben. Die Bildung adventiver Wurzeln ist bei den Petiolenkulturen ausgeprägt, die im Laufe der Induktionsphase in Nährlösungen ohne Bor kultiviert waren. Die Darstellung des Zusammenhanges zwischen der Wirkung der Borkonzentration während der Induktions- und Realisierungsphase auf die Bildung von Adventivwurzeln während der Petiolkulturen ist aus der Tabelle 6.2.1 ersichtlich.

**Tabelle 6.2.1:** Korrelationskoeffizient zwischen den gemessenen Faktoren [Borkonzentration während der Induktionsphase (Bor-Induktionsphase), Borkonzentration während der Realisierungsphase (Bor-Realisierungsphase), Petiolen mit Adventivwurzeln, Adventivwurzelanzahl pro Petiole, Adventiv-Haupt-Wurzellänge, Adventiv-Neben-Wurzelanzahl und Adventiv-Neben-Wurzellänge].

	<b>Bor-Induktionsphase</b>	<b>Bor-Realisierungsphase</b>	<b>Petiolen mit Adventivwurzeln</b>	<b>Adventivwurzelanzahl pro Petiole</b>	<b>Adventiv-Haupt-Wurzellänge</b>	<b>Adventiv-Neben-Wurzelanzahl</b>	<b>Adventiv-Neben-Wurzellänge</b>
<b>Bor-Induktionsphase</b>	-						
<b>Bor-Realisierungsphase</b>	0,0000	-					
<b>Petiolen mit Adventivwurzeln</b>	-0,98	0,21	-				
<b>Adventivwurzelanzahl pro Petiole</b>	-0,92	0,23	0,97	-			
<b>Adventiv-Haupt-Wurzellänge</b>	-0,59	0,75	0,75	0,81	-		
<b>Adventiv-Neben-Wurzelanzahl</b>	-0,97	0,18	0,96	0,87	0,64	-	
<b>Adventiv-Neben-Wurzellänge</b>	0,99	0,08	0,98	0,90	0,62	0,99	-

Nach Tabelle 6.2.1 besteht ein negativer Zusammenhang zwischen der Borkonzentration während der Induktionsphase und der Anzahl der Petiolen, die Adventivwurzeln bilden, der Wurzelanzahl pro Petiolen, Wurzellänge und Anzahl der Nebenwurzeln, d.h. die Zugabe von 0.5 ppm Bor hat eine hemmende Wirkung auf die Wurzelbildung allgemein, wohingegen Bor zur Realisierungsphase die Adventivwurzel-Entwicklung leicht fördert. Der Borzusatz (0.5 ppm) während der Realisierungsphase zeigt in jeder Versuchsvariante einen positiven Zusammenhang, besonders mit der Wurzellänge.

Im Falle dieses Versuches wurde die Anthozyan- und Chlorophyll-Konzentration in den Pflanzen jeder Variante der angesetzten Kulturen (somatische Embryonen und Explantate) gemessen. Das Ziel dieser Messung war die Darstellung des Zusammenhanges zwischen der somatischen Embryogenese und der Anthozyankonzentration als ein Produkt des sekundären Metabolismus mit besonderem Bezug auf die Bor-Wirkung (siehe Tabelle 6.3.).

**Tabelle 6. 3:** Die Wirkung verschiedener Kombinationen von 2,4-D (5 mg/l), Kinetin (0,01- mg/l) und Bor (0 und 0,5 mg/l), während der Induktionsphase (14 Tage Kulturdauer) und die Wirkung von Bor (0 und 0,5 mg/l), während der Realisierungsphase (20 Tage Kulturdauer) der somatischen Embryogenese in Karottenpetiolenexplantaten auf die Anthozyan- und Chlorophyllgehalte im Verhältnis zu der totalen Embryonenanzahl

Induktionsphase Bor- und Hormon- Varianten	Realisierung s-phase Bor- Varianten	Anzahl Embryonen	Antho- zyan*	Chloro- phyll-a (mg.l <sup>-1</sup> )	Chloro- phyll-b (mg.l <sup>-1</sup> )
0 <sup>+</sup>	B5 <sup>-</sup> (-B)	524	0,0445	0,32	0,32
0 <sup>+</sup>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	648	0,045	0,62	0,37
0 <sup>-</sup>	B5 <sup>-</sup> (-B)	0	0,067	0,51	0,55
0 <sup>-</sup>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	2,3	0,141	1,49	1,13
0 <sup>+</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (-B)	9,1	0,086	1,33	0,73
0 <sup>+</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	16	0,139	2,32	1,29
0 <sup>-</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (-B)	0	0,043	0,51	0,36
0 <sup>-</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	0	0,041	0,25	0,22
0,5 <sup>+</sup>	B5 <sup>-</sup> (-B)	690	0,032	0,18	0,24
0,5 <sup>+</sup>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	290	0,0425	0,46	0,41
0,5 <sup>-</sup>	B5 <sup>-</sup> (-B)	0	0,007	0,11	0,07
0,5 <sup>-</sup>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	0	0,021	0,34	0,24
0,5 <sup>+</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (-B)	0	0,048	1,29	0,49
0,5 <sup>+</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	0	0,058	1,22	0,71
0,5 <sup>-</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (-B)	0	0,088	0,5249	0,29
0,5 <sup>-</sup> <sub>+k</sub>	B5 <sup>-</sup> (+, 5ppm B)	0	0,312	1,61	0,62

B5<sup>-</sup> (+B oder -B) = B5-Nährlösung ( mit 0,5 ppm oder ohne Bor)

0<sup>+</sup> = B5 (-Bor + 2,4-D -Kinetin) = B5-Nährlösung mit 2,4-D und ohne Kinetin und Bor

0<sup>-</sup> = B5 (-Bor -2,4-D -Kinetin) = B5-Nährlösung ohne 2,4-D, Kinetin und Bor

0<sup>+</sup><sub>+k</sub> = B5(-Bor +2,4-D +Kinetin) = B5-Nährlösung mit 2,4-D und Kinetin und ohne Bor

0<sup>-</sup><sub>+k</sub> = B5(-Bor -2,4-D +Kinetin) = B5-Nährlösung ohne 2,4-D und mit Kinetin und ohne Bor

0,5<sup>-</sup> = B5 (+Bor -2,4-D -Kinetin) = B5-Nährlösung mit Bor und ohne 2,4-D und Kinetin

0,5<sup>+</sup> = B5 (+Bor +2,4-D -Kinetin) = B5-Nährlösung mit Bor, 2,4-D und ohne Kinetin

0,5<sup>+</sup><sub>+k</sub> = B5(+Bor +2,4-D +Kinetin) = B5-Nährlösung mit 2,4-D, Bor und Kinetin

0,5<sup>-</sup><sub>+k</sub> = B5(+Bor -2,4-D +Kinetin) = B5-Nährlösung ohne 2,4-D und mit Bor und Kinetin

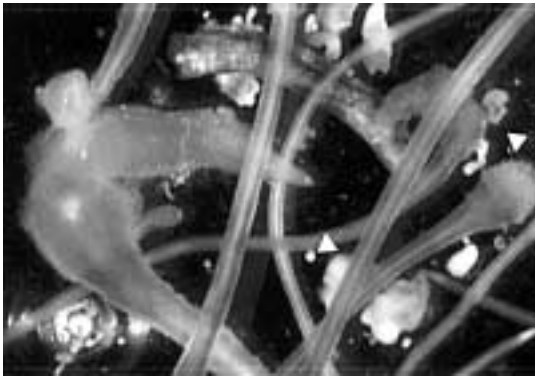
\*(Extinktionen gegen die Extraktionsmedien, s. Kap. 3.13)

Nach Tabelle 6.3 gibt es einen Unterschied im Anthozyangehalt im Verlauf der Realisierungsphase zwischen verschiedenen Kulturen, der aufgrund der Behandlung durch verschiedene Nährlösungen während der Induktionsphase zustande gekommen ist. Die Petiolen der Nährlösungsvarianten, die während der Induktionsphase kein 2,4-D,

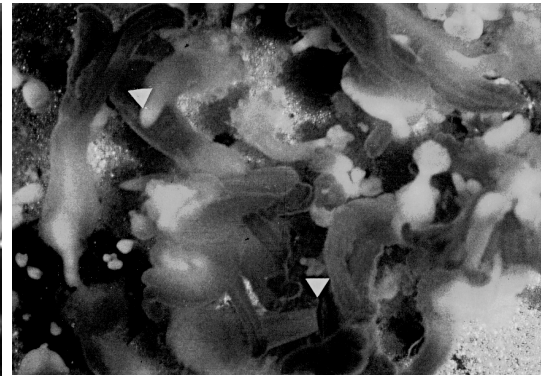
sondern nur Kinetin und Bor erhielten, haben hohe Anthozyangehalte, während die Kulturen mit Bor, jedoch ohne Kinetin bzw. 2.4-D geringe Anthozyangehalte aufweisen. Deshalb kann angenommen werden, daß auch die Induktionsphase die Anthozyan- und Chlorophyllgehalte, während der Realisierungsphase, beeinflusst. Die Anzahl der somatischen Embryonen steht in einem schwach negativen Zusammenhang mit der Anthozyansynthese. Aus den Petiolen mit hoher Anthozyansynthese sind ebenfalls keine somatischen Embryonen entstanden, wie auch aus denen mit einem geringen Anthozyangehalt (s. Tab. 6.3).

Die Daten der Tabelle 6.3 zeigen bei fast jeder Kulturvariante mit höheren Borgehalten in der Nährlösung während der Realisierungsphase eine höhere Anthozyansynthese. Eine höhere Borkonzentration während der Realisierungsphase erhöhte in diesem Versuch auch die Chlorophyllsynthese. Aus der Tabelle 6.3 kann ein positiver Zusammenhang ( $r > 0,6$ ) zwischen der Chlorophyll- und Anthozyan-Konzentration in den somatischen Embryonen abgeleitet werden.

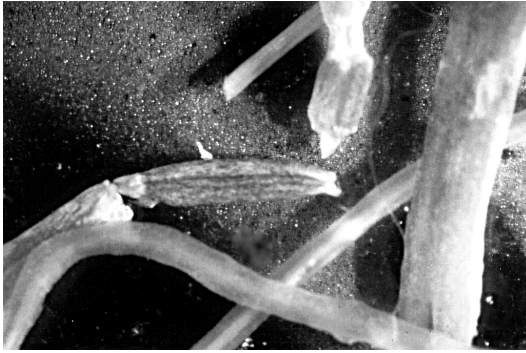
Die folgenden Abbildungen zeigen Bilder der einzelnen Kultur-Varianten dieses Versuches.



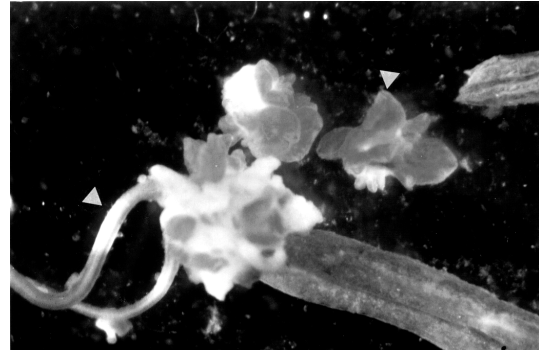
**Abbildung 4.1:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5- Nährmedium, mit (+) 2,4-D, ohne Kinetin und ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) 0ppm- Bor, in Tabelle 6. 3: 0<sup>+</sup> / 0]. Markierungen: Ein stärkeres Wurzel- und geringeres Cotyledonenwachstum sind typische Bormangelerscheinungen bei den entstandenen somatischen Embryonen.



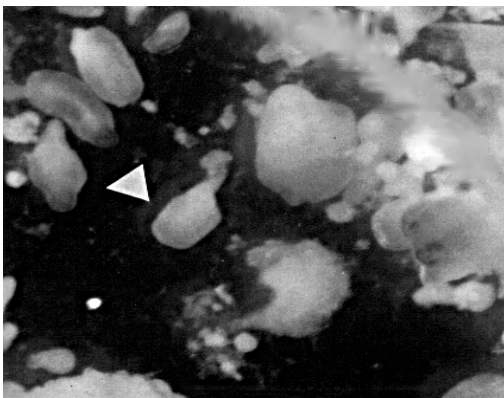
**Abbildung 4.2:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, ohne Kinetin, ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3: 0<sup>+</sup> / 0,5]. Markierungen: Das bessere Cotyledonenwachstum der somatischen Embryonen ist deutlich.



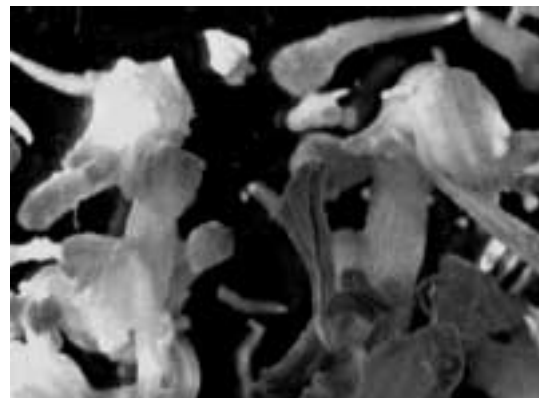
**Abbildung 4.3:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, ohne Kinetin, ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3: 0<sup>-</sup> / 0<sup>-</sup>].



**Abbildung 4.4:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, ohne Kinetin und ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3: 0<sup>-</sup> / 0,5<sup>-</sup>]. Markierung: Hier ist kein somatischer Embryo zu sehen, nur adventive Wurzeln und Sproß.

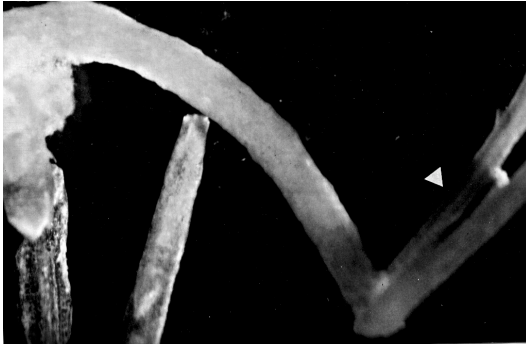


**Abbildung 4.5:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, ohne Kinetin und mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3: 0,5<sup>+</sup> / 0<sup>-</sup>]. Markierung: Ein geringes Cotyledonenwachstum bei den somatischen Embryonen wurde beobachtet, aber eine große Embryonenproduktion.

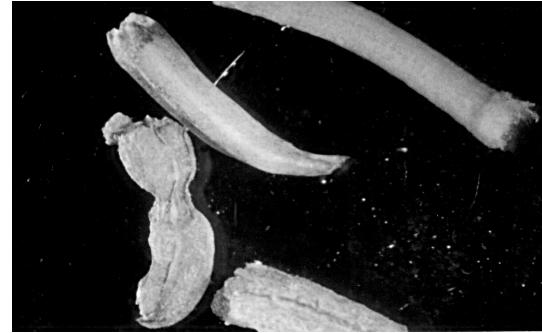


**Abbildung 4.6:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, ohne Kinetin, mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3: 0,5<sup>+</sup> / 0,5<sup>+</sup>]. Die Relation zwischen Embryonencotyledonen und Wurzeln ist normal.

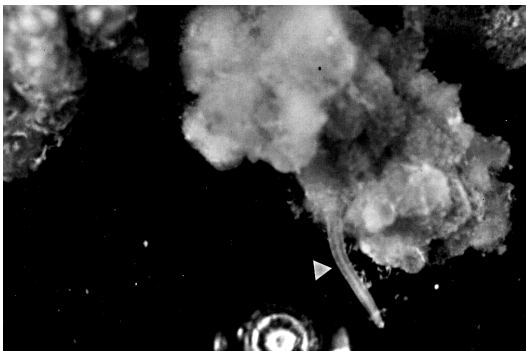




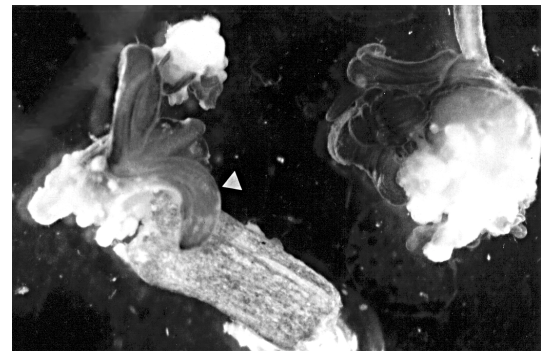
**Abbildung 4.7:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, ohne Kinetin und mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungssphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3: 0,5/0]. Markierung: Bei dieser Variante entstanden Adventivwurzeln, aber kein somatischer Embryo.



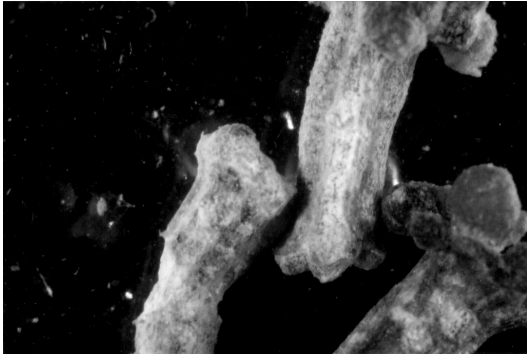
**Abbildung 4.8:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, ohne Kinetin und mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3: 0,5/0,5]. Bei dieser Variante wurde kein somatischer Embryo aus den Petiolen ausgebildet.



**Abbildung 4.9:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, mit (+k) Kinetin, ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3: 0<sup>+</sup>/<sub>+k</sub>0]. Markierung: Bei dieser Variante sind Callus um die Petiolen und teilweise die daraus entstandenen Adventivwurzeln ausgebildet.



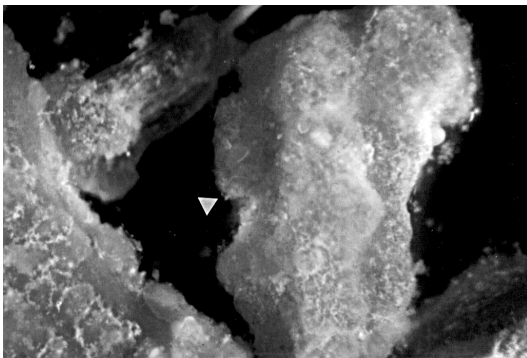
**Abbildung 4.10:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, mit (+k) Kinetin, ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3: 0<sup>+</sup>/<sub>+k</sub>0,5]. Markierung: Bei dieser Variante wurden teilweise nur adventive Sprosse auf Petiolen ausgebildet.



**Abbildung 4.11:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, mit (+k) Kinetin und ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3:  $\underline{0}_{-+k} / \underline{0}_{-}$ ]. Die Petiolen dieser Variante bildeten keinen somatischen Embryo aus.



**Abbildung 4.12:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, mit (+k) Kinetin und ohne (0) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3:  $\underline{0}_{-+k} / \underline{0,5}_{-}$ ]. Bei dieser Variante wurden auch keine somatischen Embryonen ausgebildet.



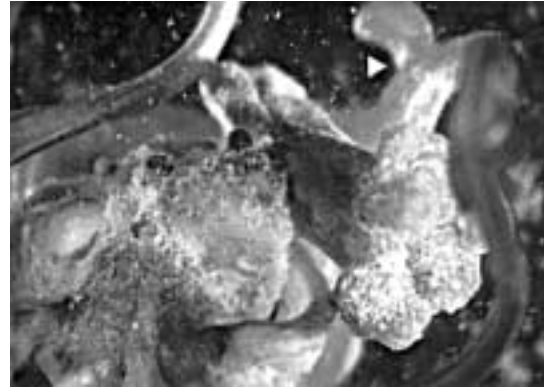
**Abbildung 4.13:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, mit (+k) Kinetin, mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tagen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3:  $\underline{0,5}_{-+k} / \underline{0}_{-}$ ]. Markierung: Bei dieser Variante hatten die Petiolen nur Callusgewebe.



**Abbildung 4.14:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, mit (+) 2,4-D, mit (+k) Kinetin und mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3:  $\underline{0,5}_{-+k} / \underline{0,5}_{-}$ ]. Markierung: Bei dieser Variante sind nur wenige Embryonen entstanden, die verdickte Cotyledonen und starkes Cotyledonenwachstum aufwiesen.



**Abbildung 4.15:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, mit Kinetin (+k) und mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und ohne (0) Bor, in Tabelle 6. 3: 0,5<sup>-</sup><sub>+k</sub> / 0<sup>-</sup>]. Bei dieser Variante wurde kein somatischer Embryo ausgebildet.



**Abbildung 4.16:** Karottenpetiolen während der somatischen Embryogenese [Induktionsphase: 2 Wochen in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D, mit Kinetin (+k) und mit (0,5ppm) Bor und danach Realisierungsphase: 20 Tage in B5-Nährmedium, ohne (-) 2,4-D und mit (0,5ppm) Bor, in Tabelle 6. 3: 0,5<sup>-</sup><sub>+k</sub> / 0,5<sup>-</sup>]. Markierung: Bei dieser Variante wurden teilweise adventive Sproßknospen beobachtet, aber kein somatischer Embryo.

#### 4.4.4 Die Wirkung besonders hoher Borkonzentrationen während der Induktionsphase auf die Induktion somatischer Embryonen

Um die Wirkung hoher Borkonzentrationen auf die somatische Embryogenese während der Induktionsphase untersuchen zu können, wurden die Petiolen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung mit 0, 15 und 30 ppm Bor vorkultiviert und nach 14 Tagen in B5<sup>-</sup>-Nährmedium mit 0,5 ppm Bor umgesetzt (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Einfluß verschiedener Borkonzentrationen während der Induktionsphase (IP) auf die Realisierung (RP) der somatischen Embryogenese in Bezug auf: Embryonen-Anzahl, Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm) und Anzahl großer Embryonen (>800 µm), gemessen in Karotten-Petiolenexplantaten (14 Tage in B5<sup>+</sup>-Nährlösung mit 0, 15 und 30 ppm Bor und 14 Tage in B5<sup>-</sup>-Nährlösung mit 0,5 ppm Bor).

IP B5 <sup>+</sup> Bor (ppm)	RP B5 <sup>-</sup> Bor (ppm)	Embryonen Anzahl	90-425 Anzahl	90-425 (%)	425-800 Anzahl	425-800 (%)	>800 Anzahl	>800 (%)
0,00	0,5	867,4	684,0	78,84	74,7	8,6	109	12,55
15,00	0,5	636,25	428,5	67,34	133,75	21,02	74	11,63
30,00	0,5	685,38	535,5	72,63	124,5	16,88	77,25	10,47

Mittelwerte aus vier Wiederholungen  
Der Einfluß von Bor ist nicht signifikant.

Die Daten der Tabelle 7 zeigen einen Unterschied zwischen den gemessenen Merkmalen bei den verschiedenen Varianten, z.B. die Gesamt-Embryonenanzahl und die Anzahl der Embryonen in jedem embryonalen Stadium, d.h. es gibt einen geringen negativen Zusammenhang zwischen der Borkonzentration während der Induktionsphase und der Anzahl an Embryonen bzw. Anzahl der Embryonen, die kleiner als  $<425 \mu\text{m}$  und größer als  $>800 \mu\text{m}$  sind, während eine schwache positive Korrelation zwischen Borgehalt und Anteil der Embryonen zwischen  $425\text{-}800 \mu\text{m}$  zu beobachten ist. Wie bereits in einem früheren Versuch beschrieben (s. Kap. 4.4.3), wurden auch in diesem Versuch bei Bor-Mangel die größte Anzahl von Embryonen beobachtet.

#### 4.4.5 Der Einfluß steigender Bor-Konzentrationen während der Vermehrungsphase auf den Anthozyan- und Chlorophyllgehalt

Die Daten aus Tabelle 8 zeigen die Gehalte an Anthozyan und Chlorophyll in Karotten-Zellsuspensionen während der Vermehrungsphase bzw. in  $\text{B}_5^+$ -Nährlösung mit verschiedenen Borkonzentrationen.

**Tabelle.8:** Die Wirkung von Bor auf die Anthozyan- und Chlorophyllkonzentration nach 21-tägigem Verlauf der Vermehrungsphase (+ 2,4-D) der somatischen Embryogenese in Karotten-Zellsuspensionen.

Induktionsphase Bor (ppm)	Anthozyan *	Cholorophyll a ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	Cholorophyll b ( $\text{mg.l}^{-1}$ )
0,0	0,059	0,63	0,37
0,5	0,062	0,66	0,44
1,0	0,082	0,80	0,55
4,0	0,045	0,54	0,31
8,0	0,083	0,59	0,51

*\*(Extinktionen gegen die Extraktionsmedien, s. Kap. 2.14).  
Der Einfluß von Bor ist nicht signifikant.*

Obwohl die Wirkung von Bor auf die Anthozyan- und Chlorophyll-Gehalte während der Vermehrungsphase nicht signifikant ist, kann eine leicht erhöhte Anthozyan-Konzentration bei höherer Bor-Applikation festgestellt werden. Ebenso deutet sich in den Chlorophyllgehalten ein leichtes Optimum bei 1 ppm Bor an.

**Tabelle 8.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen der Bor-Applikation und den Gehalten an Anthozyan, Chlorophyll a und b, nach 21-tägigem Verlauf der Vermehrungsphase der somatischen Embryogenese in Karotten-Zellsuspensionen.

	<b>Bor</b>	<b>Anthozyan</b>	<b>Cholorophyll a</b>	<b>Cholorophyll b</b>
<b>Bor</b>	-	0,29	-0,34	0,10
<b>Anthozyan</b>	0,29	-	0,75	0,95

Tabelle 8.1 zeigt einen gering positiven Zusammenhang zwischen den Anthozyan- und der Bor-Applikation. Der Korrelationskoeffizient für den Zusammenhang zwischen Bor und Chlorophyll b ist mit 0,1 sehr gering und daher zu vernachlässigen. Die Korrelation zwischen Chlorophyll a und Bor ist schwach negativ. Bei jeder Variante der Untersuchungen wurde ein stark positiver und signifikanter Zusammenhang zwischen den Anthozyan-Gehalten und den Chlorophyll-Gehalten beobachtet.

#### **4.4.6 Borwirkung auf somatische Embryogenese, Anthozyan- und Chlorophyll-Konzentration während der Realisierungsphase**

Die Daten aus Tabelle 9 zeigen die gemessenen Wachstumsfaktoren bzw. Embryonenstadien und -anzahl, außerdem die Anthozyan- und Chlorophyll-Konzentration im Verlauf der Realisierungsphase in Karotten-Zellsuspensionskulturen mit B5<sup>-</sup>-Nährlösung mit zwei unterschiedlichen Borkonzentrationen.

**Tabelle 9:** Die Wirkung von Bor auf Embryonenanzahl, Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm), Anteil der großen Embryonen (>800 µm), Anthozyan- und Chlorophyll a/b-Gehalt während der **Realisierungsphase** der somatischen Embryogenese in Zellsuspensionsexplantaten (Zellsuspension in B5<sup>+</sup>-Nährmedium ohne Bor und nach 45 Tagen in B5<sup>-</sup>-Nährmedium; Kulturdichte 0.5% des PCV)

Bor (ppm)	Embryonen-Stadien						Anzahl Embry- onen	Gehalte		
	90 - 425 µm		425 - 800 µm		800 > µm			Antho- zyan *	Chlorophyll (mg.l <sup>-1</sup> )	
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)			a	b
<b>0,00</b>	1033	53,2	283	14,50	628	32,30	1944	0,026	1,67	0,59
<b>0,5</b>	339	43,9	100	12,90	333	43,10	772	0,052	2,82	1,02

*Mittelwerte aus vier Wiederholungen*

*\*(Extinktionen gegen die Extraktionsmedien, s. Kap. 2.14).*

Im Falle dieses Versuchs ist die totale Embryonenanzahl in den Nährlösungen mit 0 ppm Bor fast dreimal höher als in 0,5 ppm. Die Embryonen bei den Varianten ohne Bor sind überwiegend im Globulär- und Herzstadium, während bei den Varianten mit 0,5 ppm Bor der Anteil der globular- und herzförmigen Embryonen kleiner ist und Embryonen >800 µm herrschen vor.

Es wurde ein negativer Zusammenhang zwischen der Embryonenzahl und der Anthozyan- bzw. Chlorophyll-Konzentration (Tab. 9) beobachtet, trotzdem konnte ein Einfluß der Embryonenentwicklung und der Anzahl (%) der Embryonen >800 µm auf die Chlorophyll- und Anthozyansynthese registriert werden.

#### **4.4.7 Untersuchung verschiedener, auch höherer Borkonzentrationen während der Realisierungsphase**

Die Untersuchung in Kap. 4.4.6 zeigte den Einfluß von Bor auf die Embryoentwicklung während der Realisierungsphase. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, wie höhere Bor-Konzentrationen im Nährmedium auf die Embryonalentwicklung während der Realisierungsphase einwirken. Deswegen wurde der Versuch mit höheren Borkonzentrationen (bis ca. sechsmal größere Konzentration als im üblichen B5-Medium) bei der somatischen Embryogenese, während der Realisierungsphase, durchgeführt.

**Tabelle 10:** Die Wirkung verschiedener Borkonzentrationen auf die Anzahl an Embryonen, den Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), von Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm) und den Anteil Embryonen >800 µm, sowie den Gehalt an Anthozyan- und Chlorophyll-a/-b, während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese in Karotten-Suspensionskulturen [Explantate aus Zellsuspension in Bor-freiem B5<sup>+</sup>-Nährmedium nach 22 Tagen in B5<sup>-</sup>-Medium bei steigendem Bor-Zusatz].

Realisie- rungsphase Bor (ppm)	Embryonen Anzahl	90 -425 µm		425 - 800 µm		> 800 µm		Antho- zyan <sup>x</sup>	Chlorophyll (mg.l <sup>-1</sup> )	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%		a	b
0	2297	1880	81,80	138	6,00	279	12,14	0,004	0,28	0,11
0,26	1421	1050	73,80	104	7,31	267	18,78	0,007	0,47	0,17
0,53	1782	1260	70,70	163	9,14	359	20,14	0,010	0,59	0,21
2,12	1473	1094	74,27	114	7,73	265	17,99	0,008	0,41	0,18
3,19	1893	1500	79,23	120	6,33	273	14,42	0,012	0,50	0,20

*Mittelwerte aus vier Wiederholungen*

*Der Einfluß von Bor ist nicht signifikant.*

<sup>x</sup> (Extinktionen gegen die Extraktionsmedien, s. Kap. 2.14).

Obwohl in der Nährlösungsvariante ohne Bor mehr somatische Embryonen entstanden sind, hat die Borkonzentration während der Realisierungsphase auf die Embryonenzahl keinen signifikanten Einfluß. Es gibt geringe Unterschiede zwischen den Anteilen der globulär- und herzförmigen Embryonen. Der Anteil der größeren Embryonen (>800 µm) steigt bis zu der Variante mit 0,53 ppm Bor an (s. Tab. 10). Obwohl diese Tendenzen nicht signifikant sind, scheint es sich hierbei um einen Einfluß von Bor auf die Geschwindigkeit des Durchlaufens definierter Embryonalstadien zu handeln.

Wie die Korrelationsanalyse in Tab. 10.1 zeigt, bestehen trotz nicht signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Bor-Stufen relativ enge Beziehungen ( $r > 0,7$ ) zwischen der Bor-Gabe und dem Anthozyangehalt einerseits und eine leichte Korrelation zwischen dem Anthozyangehalt und dem relativen Anteil an Embryonen >425 µm. Dabei weist der Anteil kleinerer Embryonen eine gleich hohe negative Korrelation auf.

Auch in diesem Versuch konnte beobachtet werden, daß bei Bormangelkulturen das Wurzelwachstum der Embryonen besser ist als bei höheren Borkonzentrationen, die Wirkung von Bor führt dagegen zu einer Förderung des Cotyledonenwachstums.

**Tabelle 10.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen der Anthozyan-Konzentration und der Bor-Applikation, der Anzahl an Embryonen und dem Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), von Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm) und dem Anteil großer Embryonen (>800 µm).

	Bor	Embryonen-Anzahl	90-425µm %	425-800µm %	>800µm %	Anthozyan
<b>Anthozyan</b>	0,74	-0,29	-0,34	0,33	0,35	-
<b>Chlorophyll a</b>	0,33	-0,49	-0,74	0,72	0,73	0,86
<b>Chlorophyll b</b>	0,22	-0,43	-0,74	0,72	0,73	0,81

Die Gehalte an Chlorophyll a und b zeigten nur bis zu einer Bor-Applikation von 0,53 ppm einen leichten Anstieg, gefolgt von einem leichten Abfall bei höherer Bor-Applikation. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß bei höherer Bor-Applikation eine Bor-Toxizität eintrat, die mit einer leichten Erhöhung der Anthozyankonzentration einherging. Da nach Tab. 10.1 andererseits auch eine Bor-bedingte Zunahme besser entwickelter (=größerer) Embryonalstadien auf Kosten kleinerer Stadien abzuleiten ist, könnte die Bor-bedingte leichte Zunahme der Anthozyan-Konzentration auch mit einer Bor-bedingten Förderung des Sekundärmetabolismus in Verbindung stehen.

Außer der Bor-Wirkung auf die Embryonenanzahl hat Bor auch einen Effekt auf die Wachstumsweise der Wurzeln und Cotyledonen der entstandenen somatischen Embryonen. Im Folgenden wird der Frage nachgegangen, welchen Einfluß eine Bor-Applikation bis 80 ppm während der Realisierungsphase auf die Embryonalentwicklung und die Bildung von Wurzeln und Cotyledonen ausübt (Tab. 11).

**Tabelle.11:** Einfluß höherer Borkonzentrationen auf die somatische Embryogenese nach fünfwöchigem Verlauf der Realisierungsphase bei Petiolen-Kulturen.

Varianten in ( B5 <sup>-</sup> )	Embryonal-Stadium			Embryonenwachstum	
	Glubolär	herz-förmig	torpedo-förmig	Wurzel	Cotyledonen
<b>0</b>	a	a	a	++	-
<b>40</b>	a	a	a	-	+
<b>80</b>	a	a	b	-	-

*Explantat: Petiolen 12 Wochen in B5<sup>+</sup>- Nährmedium.*

*a = vorhanden*

*b = sehr wenig vorhanden*

*- = schlechtes Wachstum*

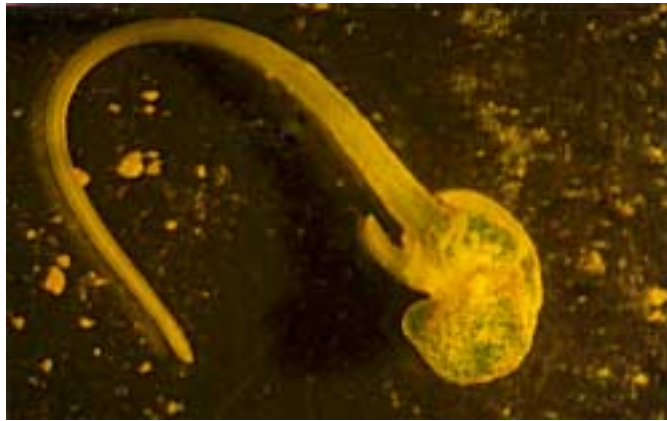
*+ = gutes Wachstum*

*++ = sehr gutes Wachstum*

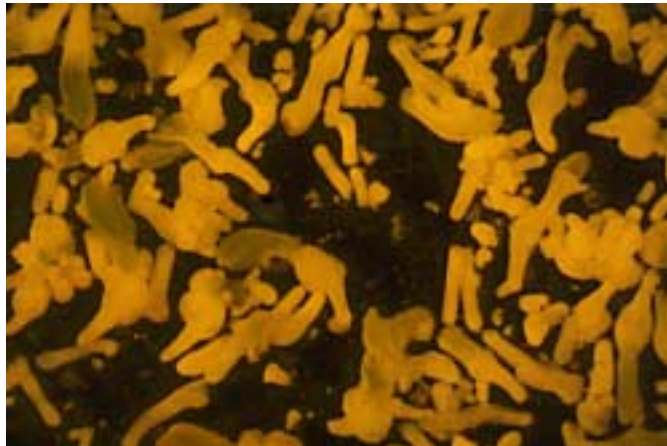


Wenn die Borkonzentration auf  $>40$  ppm steigt, wird die Ausbildung des Torpedostadiums gehemmt. Während dieser Untersuchung wurde wieder die bereits oben gezeigte morphologische Veränderung bei den somatischen Embryonen beobachtet, daß im Falle geringer Borkonzentrationen das Wurzelwachstum der Embryonen im Vergleich zu höherer Bor-Konzentration stärker, war bzw. sie bildeten längere Wurzeln. Die Wirkung höherer Borgehalte ist umgekehrt, das Wurzelwachstum ist gehemmt und das Wachstum der Sproßteile gefördert (Abb. 5.1 bis 5.4).

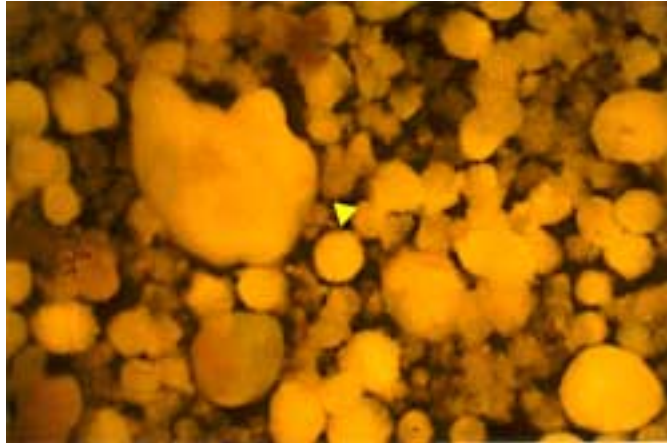
**Abbildung 5.1:** Die somatischen Embryonen von Karotten-Petiolenkulturen in B5-Nähr-lösung mit 0 ppm Bor nach 38 Tagen. Das starke Wurzel- und gehemmte Cotyledonenwachstum ist bei dieser Variante deutlich.



**Abbildung 5.2:** Die somatischen Embryonen von Karotten-Petiolenkulturen in B5-Nähr-lösung mit 40ppm Bor nach 35 Tagen. Bei dieser Variante ist das Wurzelwachstum geringer und das Cotyledonenwachstum stärker.



**Abbildung 5.3:** Die somatischen Embryonen von Karotten-Petiolelkulturen in B<sup>5</sup>-Nährlösung mit 80ppm Bor nach 35 Tagen. Bei dieser Variante ist, wie die Markierung zeigt, eine starke Hemmung der Entwicklung somatischer Embryonen, besonders nach den globulären und herzförmigen Stadien deutlich (Symptome für Bor-Toxizität während der Realisierungsphase).



Im Folgenden soll versucht werden, den Bor-Einfluß auf die Eigenschaften kleiner, intakter Pflänzchen näher zu charakterisieren, die sich aus den größten Embryonen (Embryonalstadium >800 µm) von Karottenwurzelsuspensionskulturen entwickelt haben. Die Daten in Tabelle 12 zeigen die Untersuchungsergebnisse der Borwirkung auf die somatische Embryogenese während der Realisierungsphase. Weil die Wachstumsart der somatischen Embryonen in Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen der Wirkung von Pflanzenhormonen ähnlich ist, wurden Explantate aus Wurzeln junger Karottenpflanzen wegen ihrer Empfindlichkeit für Pflanzenhormone (z.B. Auxin) verwendet. Bei diesem Versuch wurde nur die Anzahl entwickelter Embryonen bzw. intakter kleiner Pflänzchen ermittelt.

**Tabelle 12:** Anzahl an großen somatischen Embryonen (>800µm) und ihre Wurzellänge, kultiviert aus Wurzeln von 6 Wochen alten Karottenpflanzen, angesetzt in B<sup>5</sup>-Nährlösung, mit Kinetin, ohne Bor für 5 Monate und danach für 25 Tage in B<sup>5</sup>-Nährlösung, mit verschiedenen hohen Borkonzentrationen.

<b>Bor (ppm) in B<sup>5</sup>-Nährlösung</b>	<b>Mittelwert der Pflänzchen-Anzahl</b>	<b>Wurzellänge (cm)</b>
<b>0</b>	9,50	2,55
<b>5</b>	37,25	0,55
<b>10</b>	52,25	0,20
<b>20</b>	13,25	0,01
<b>30</b>	39,25	0,10

*Mittelwerte aus vier Wiederholungen*

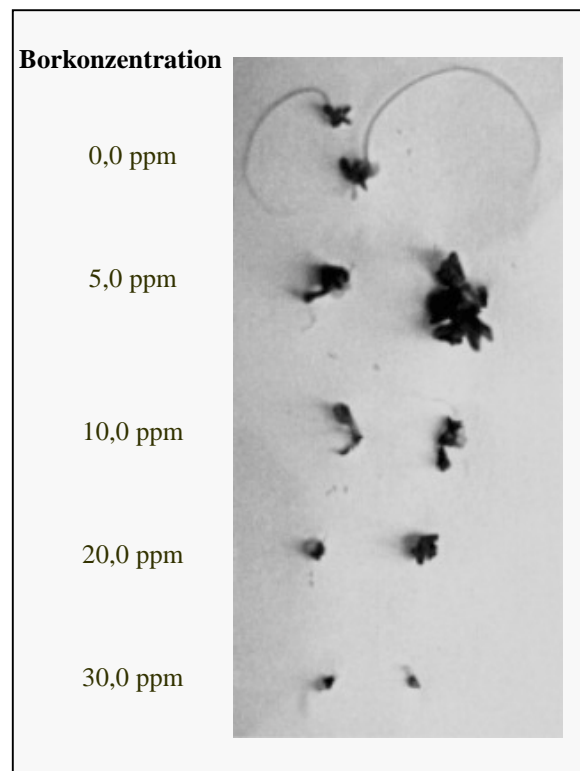
Man kann eine Steigerung der Anzahl intakter Pflänzchen und eine Verminderung ihrer Wurzellänge bis 10 ppm Bor beobachten. Die statistische Analyse (Korrelationskoeffizienten) der Ergebnisse ist in Tabelle 12.1 beschrieben.

**Tabelle.12.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen Bor, Anzahl intakter Pflanzen bzw. großer somatischer Embryonen und deren Wurzellänge

	Anzahl intakter Pflanzen	Wurzellänge
Bor	0,21	-0,71

In Tab. 12 ist eine Erhöhung der Anzahl intakter Pflänzchen bis 10 ppm Bor zu beobachten. Bei 20 und 30 ppm Bor erfolgte eine leichte Reduktion der Pflänzchenzahl, wodurch sich eine nur schwache Korrelation zur Bor-Dosis ergibt (Tab. 12.1). Im Gegensatz dazu weist die Länge der gebildeten Hauptwurzeln einen negativen Zusammenhang (Tab. 12.1 und Abb.6) mit der Bor-Steigerung auf

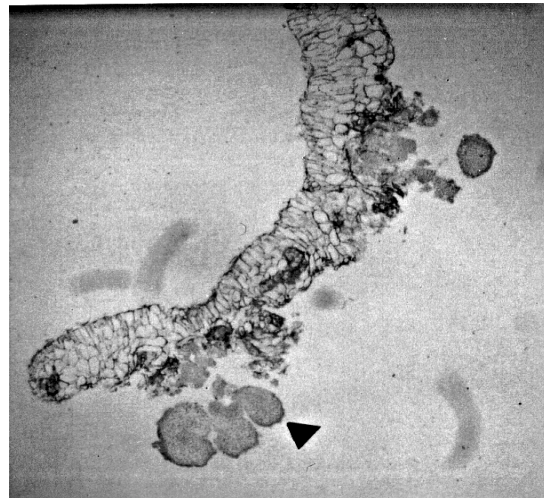
**Abbildung 6:** Somatische Embryonen von Karotten in B5-Nährmedium mit verschiedenen Borkonzentrationen nach 25 Tagen. Es ist eine Hemmung des Wurzelwachstums durch hohe Borkonzentrationen erkennbar.



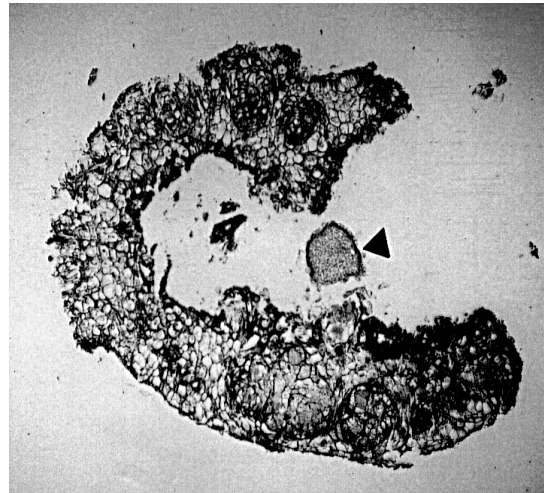
Die histologische Untersuchung der jungen Karottenwurzeln aus den B5-Nährlösungen (in denen unterschiedliche Borgehalte während der somatischen Embryogenese verfügbar waren) sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Im Falle von Kulturen mit

Bormangel kann die Entwicklung der Embryonen oft direkt aus den Explantaten beobachtet werden.

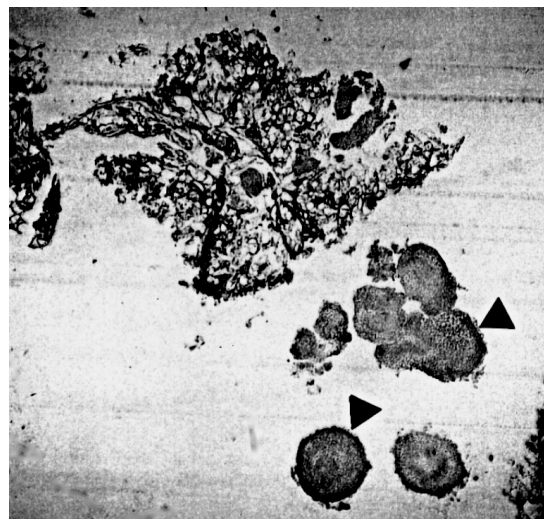
**Abbildung 7.1:** Junge Karottenwurzel-explantate nach 4 Wochen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor und danach 3 Wochen in B5<sup>-</sup>-Nährlösung auch ohne Bor. Hier sind in Wurzelgewebe entstandene, glo-bulär- und herzförmige Embryonen sichtbar (s. Markierung).



**Abbildung 7.2:** Junge Karottenwurzel-explantate nach 4 Wochen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor und danach 3 Wochen in B5<sup>-</sup>-Nährlösung mit 10 ppm Bor. Hier ist das Globulärstadium sichtbar (s. Markierung).



**Abbildung 7.3:** Junge Karottenwurzel-explantate nach 4 Wochen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor und danach 3 Wochen in B5<sup>-</sup>-Nährlösung mit 40 ppm Bor. Hier sind verschiedene Embryonalstadien sichtbar (s. Markierungen).



Die vorherigen Versuche zeigten die Hemmung höherer Borkonzentrationen auf die Entwicklung der Embryonen. Die Ergebnisse in Tabelle 13 stellen den Einfluß

verschiedener, besonders der hohen Borkonzentrationen während der Realisierungsphase auf die somatische Embryogenese zusammenfassend dar.

**Tabelle.13:** Petiolenkulturen nach 6-wöchigem Verlauf der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese. Wirkung verschiedener Borkonzentrationen auf die gemessenen Merkmale Anzahl Embryonen, Anzahl und %-Anteil von Embryonen in verschiedenen Embryonalstadien, Anzahl Pflanzen mit langen Wurzeln, Wurzellänge und Gesamtgewicht der Embryonen.

B5- Bor (ppm)	Anzahl Embry- onen	Embryonal- stadium (90-425µm) Anzahl/(%)		Embryonal- stadium (425-800µm) Anzahl/(%)		Embryonal- stadium (>800µm) Anzahl/(%)		Pflanzen mit langen Wurzeln (Anzahl)	Wurzel- länge (cm)	Gesamt- gewicht der Embryo- nen (g)
		Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)			
0	468	189	40,38 a <sup>§</sup>	81	17,3 ab	198	42,3 a	48 a	1,21 a	2,73
30	339	136	40,10 a	79	23,30 a	124	36,5 ab	0,00 b	0,09 b	1,18
60	250	120	48,00 a	58	23,20 a	72	28,8 bc	0,00 b	0,067 b	0,5
120	48	33	68,80 b	10	20,80 a	5	10,4 c	0,00 b	0,00 b	0,26

Mittelwerte aus vier Wiederholungen

Duncan-Test auf dem Signifikanzniveau von 0,05

§ a, b, c = Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

Die bei diesen Untersuchungen gemessenen Daten (Tab. 13) zeigen eine Verminderung der gesamten Embryonenzahl mit Steigerung der Borkonzentration in der Nährlösung. Der %-Anteil globulärer und herzförmiger Embryonen zeigt bei verschiedenen Borkonzentrationen bis 60 ppm in der Nährlösung keinen signifikanten Unterschied. Die Anzahl an Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm) sinkt mit Steigerung des Borgehaltes, aber es ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten (die statistische Analyse zeigt einen geringen Unterschied zwischen Embryonen in Nährlösungen mit 0 und 30 ppm Bor).

Mit höheren Borkonzentrationen wird der %-Anteil größerer Embryonen (>800 µm) kleiner. Im allgemeinen ist die toxische Wirkung von Bor stärker ab einer Konzentration von 60-80 ppm, und dieser Borgehalt verursacht die Unterdrückung der Weiterentwicklung globulär- und herzförmiger Embryonen, die meisten (ca. 70%) bleiben in diesen Stadien. Bei dieser Untersuchung wurden bei 0 ppm Bor Embryonen mit sehr langen Wurzeln gebildet. Im Gegensatz dazu waren die Embryonenwurzeln in den anderen Varianten sehr viel kürzer oder nicht vorhanden.

Die Verminderung der Anzahl von Embryonen, >800 µm ist nur bei Konzentrationen ab 30 ppm Bor signifikant und es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wurzlängen ab den oben genannten Borkonzentrationen. Deshalb kann die Borhemmung auf das Wurzelwachstum als ein Einfluß auf die Morphologie der Embryonen betrachtet werden.

Das Gesamtgewicht aller Embryonen in den unterschiedlichen Varianten wurde ermittelt. Die Tabelle 13 zeigt die Abnahme dieses Gewichtes von 2,73 g bei 0 ppm Bor bis 0,26 g bei der Variante mit 120 ppm Bor in der Nährlösung. Aber das durchschnittliche Gewicht einzelner Embryonen bei den Varianten mit 0 ppm Bor (0,0058g) und bei den Varianten mit 120 ppm (0,0054g) unterscheidet sich nicht, d.h. die Steigerung der Borkonzentration hat nur auf die Anzahl der Embryonen eine negative Wirkung, nicht aber auf das Embryogewicht.

Die Chlorophyll-Konzentration zeigt eine Steigerung bis 30 ppm Bor, (Tabelle 13.1) bei noch höheren Konzentrationen sinkt sie wieder. Vermutlich hat diese Verminderung der Synthese ab 30 ppm Bor einen Zusammenhang mit der Embryonenentwicklung bzw. der Verminderung der Embryonenanzahl >800 µm.

**Tabelle.13.1:** Anthozyan- [quantitativer Vergleich (Extinktionen gegen die Extraktionsmedien)] und Chlorophyllgehalt (mg l<sup>-1</sup>) in Kulturen mit B5-Nährlösung und verschiedenen Borkonzentrationen.

Realisierungsphase	Anthozyan-Gehalt	Chlorophyll-Gehalt	
Bor (ppm)	(Extinktion)	(mg l <sup>-1</sup> )	
		a	b
0	0,040	0,91	0,81
30	0,043	1,25	1,21
60	0,025	0,53	0,63
120	0.010	0,00	0,2

*Mittelwerte aus vier Wiederholungen*

Die Daten der Tabelle 13.2 zeigen eine stark negative Korrelation zwischen den geprüften Borkonzentrationen und der gesamten Embryonenzahl bzw. dem Anteil Embryonen >800 µm. Die steigende Borkonzentration hat eine positive Wirkung auf den Anteil globulär- und herzförmiger Embryonen (Größe 90-425 µm).

**Tabelle.13.2:** Korrelationskoeffizienten zwischen der Bor Applikation und der gesamten Embryonenzahl, der Anzahl globulärer und herzförmiger Embryonen (90-425µm), der Embryonen im Torpedostadium (425-800 µm) und Anzahl großer Embryonen (>800 µm).

	Embryonal-Stadium						Anzahl-Embryonen
	90-425µm		425-800µm		>800µm		
	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	
<b>Bor</b>	0,96	-0,75	0,34	-0,83	-0,99	-0,77	-0,99

Wenn Explantate von verschiedenen Karottenorganen (z.B. Wurzeln, Petiolen oder Blätter) zur somatischen Embryogenese verwendet werden, zeigen die einzelnen Pflanzenteile eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber den Ernährungsbedingungen im Nährmedium (Grieb, 1992). Daher ist auch in diesem Versuch anzunehmen, daß aus Explantaten von Wurzeln weiter entwickelte Embryonen entstanden als aus Explantaten aus Petiolen oder Blättern, die wegen toxischer Borkonzentrationen spätere Stadien nicht erreichen konnten, d.h. der Ursprung der Explantate hat einen großen Einfluß auf die Wirkung verschiedener Borbehandlungen. Diese Beobachtungen stehen vermutlich in Verbindung mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen (Paasch, 1994) und Sensibilitäten gegenüber Phytohormonkonzentrationen in einzelnen Pflanzenorganen. Die bisher beschriebenen Versuche mit verschiedenen Borkonzentrationen während der Realisierungsphase zeigen, daß eine Erhöhung der Borkonzentration bis ca. 10 ppm (s. Tab. 12) den Anteil größerer Embryonen bzw. intakter Pflänzchen leicht erhöht hat. Außer dem Bor-Effekt auf die Varianten Anzahl an Embryonen und %-Anteil einzelner Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde ein deutlicher Bor-bedingter morphologischer Unterschied im Wachstum von Embryonenwurzeln und Cotyledonen nach der Borbehandlung beobachtet. Die Ergebnisse der Bonitierung von Suspensionskulturen (Tab. 14) zeigen schematisch die allgemeine Tendenz, daß bei geringer Bor-Konzentration das beste Wurzelwachstum erreicht wird, während hohe Borkonzentrationen das Wachstum der Cotyledonen begünstigen.

**Tabelle 14:** Einfluß von Bor auf die Morphologie großer Embryonen während der Realisierungsphase. Kultiviert aus Zellsuspensionen (B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor), umgesetzt in B5<sup>-</sup>-Nährlösung, mit verschiedenen Borkonzentrationen.

Bor (ppm) In B5 <sup>-</sup>	Wurzel-Wachstum	Cotyledonen -Wachstum
0	+++++++	+
0,1	+++++++	++
0,5	+++++++	+++
1	+++++	++++
2	++++	+++++
4	+++	+++++++
8	++	+++++++

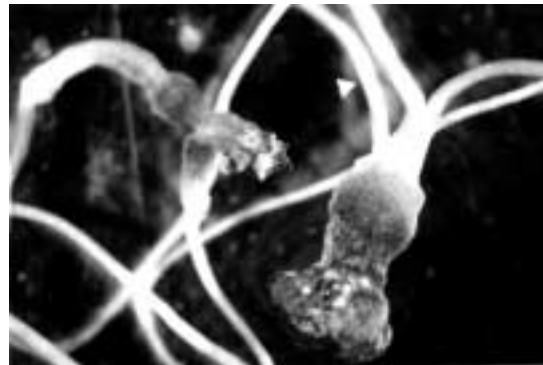
+, ++: *relative Mengenangabe*

+++++++ = *gutes Wachstum*

+ = *schlechtes Wachstum*

Die folgenden Bilder (Abb. 8.1 bis 8.7) zeigen die morphologischen Zustände der somatischen Embryonen bei unterschiedlicher Borkonzentration.

**Abbildung 8.1:** Somatische Embryonen von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5<sup>-</sup>-Nährlösung ohne Bor. Bormangel verursacht ein starkes Wurzel- und ein geringes Cotyledonenwachstum der somatischen Embryonen (s. Markierungen).



**Abbildung 8.2:** Somatische Embryonen von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5<sup>-</sup>-Nährlösung mit 0,1ppm Bor. Durch Bormangel ist auch hier ein besseres Wurzelwachstum zu beobachten, während ein relativ geringes Cotyledonenwachstum vorherrscht (s. Markierungen).

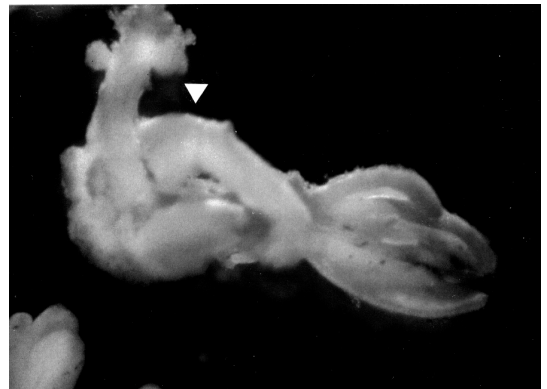




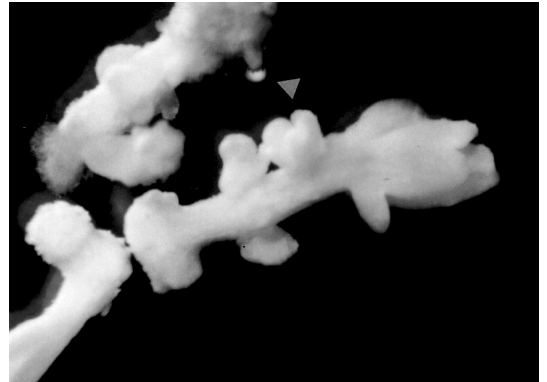
**Abbildung 8.3:** Somatischer Embryo von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5-Nährlösung mit 0,5ppm Bor. Das Cotyledonenwachstum ist bereits deutlich auf Kosten der Wurzelentwicklung gefördert.



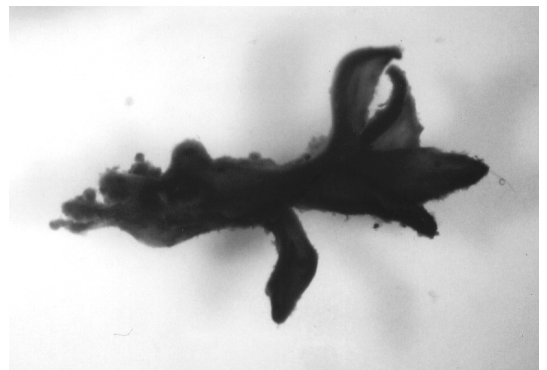
**Abbildung 8.4:** Somatischer Embryo von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5-Nährlösung mit 1ppm Bor. Bei dieser Variante ist das Wurzelwachstum im Vergleich zu Varianten mit niedriger Bor-Applikation deutlich gehemmt und es entstanden teilweise adventive Sproßknospen (s. Markierungen). Das Cotyledonenwachstum ist verbessert.



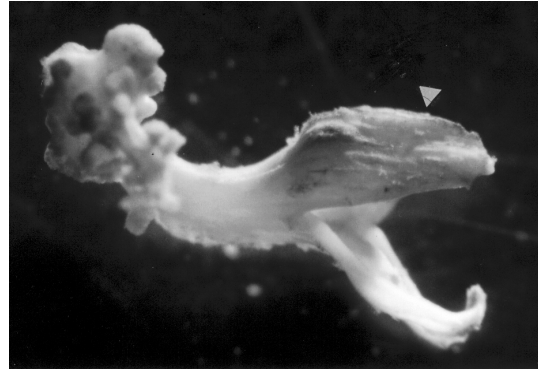
**Abbildung 8.5:** Somatische Embryonen von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5-Nährlösung mit 2ppm Bor. Hier ist die Entstehung adventiver Sproßknospen deutlich (s. Markierungen), ohne daß der Entwicklungszustand der Cotyledonen bei 4 und 8 ppm Bor bereits erreicht ist.



**Abbildung 8.6:** Somatischer Embryo von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5-Nährlösung mit 4ppm Bor. Deutlich sichtbar ist ein nahezu voll entwickeltes Cotyledon bei stark gehemmtem Wurzelwachstum.



**Abbildung 8.7:** Somatischer Embryo von Karottenexplantaten (Zellsuspensionen) nach 20 Tagen in B5-Nährlösung mit 8ppm Bor. Diese Borkonzentration verursacht ein starkes Cotyledonenwachstum (s. Markierungen), das Wurzelwachstum ist fast vollständig eingestellt worden. Im Wurzelbereich sind adventive Sproßknospen sichtbar.



#### 4.5 Der Boreinfluß auf die Organogenese

Die Daten in Tabelle 6.2 zeigten, daß die Petiolen, die in B5 im ganzen Versuch kein 2.4-D bzw. Kinetin bekommen haben, Adventivwurzeln bildeten. Die Bildung von adventiven Wurzeln war bei der Variante mit 0 ppm Bor im Vergleich mit den anderen Borkonzentrationen stärker. Die statistische Analyse zeigt keinen signifikanten Einfluß von Bor während der Realisierungsphase auf die Bildung der Adventivwurzeln. Diese Art der Organogenese wurde während der Induktionsphase von Bor beeinflusst, d.h. die Wurzelprimordien werden während der Induktionsphase gebildet. Andererseits führt die Art und Weise des Embryonenwachstums, des Wachstums der Wurzeln und der Cotyledonen (besonders nach dem torpedoförmigen Stadium) zu der Hypothese, daß Bor die Konzentration endogener Pflanzenhormone beeinflusst (s. Abb. 9). Die in Tabelle 15 aufgeführten Daten zeigen die Ergebnisse der Untersuchung von Petiolenkulturen in NL-Nährmedium.

**Abbildung 9:** Die aus Petiolen entstandenen Adventivwurzeln in NL-Nährmedium mit 0 ppm Bor. Die Krümmung der Wurzelspitzen ist ein Symptom von Auxinüberschuß.



**Tabelle 15:** Einfluß von Bor auf die Organogenese (Adventivwurzelbildung) während der somatischen Embryogenese in NL-Nährlösung mit verschiedenen Borkonzentrationen in Karotten-Petiolenexplantaten (nach 4 Wochen).

Bor (ppm)	Petiolen mit Adventivwurzeln (%) *	Anzahl von Adventivwurzeln pro Petiole	Adventivwurzellänge (cm)
0	35,48	1,98	1,13
0,1	34,48	1,55	1,02
0,5	31	2,40	1,50
2,5	35	1,74	1,50
5,0	19,23	1,20	0,80
10,0	0	0	0

Mittelwerte aus vier Wiederholungen

\* Signifikanter Unterschied mit  $p=5\%$

Im Falle dieser Untersuchung entstanden keine Embryonen aus den Petiolen in den verschiedenen NL-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen, es konnten nur Adventivwurzeln beobachtet werden. Der Anteil der Petiolen mit Adventivwurzeln ist in den Nährlösungen mit bis zu 2.5 ppm Bor konstant, bei höheren Borkonzentrationen entstehen aus den Petiolen weniger Adventivwurzeln. Die Anzahl pro Petiole und Länge des betrachteten Wurzeltyps zeigen auch eine ähnliche Korrelation mit Bor.

Die Korrelationskoeffizienten der gemessenen Faktoren Petiolen mit Wurzeln (%), Länge der Adventivwurzeln sowie Anzahl Adventivwurzeln pro Petiole zur Bor-Applikation sind der Tabelle 15.1 zu entnehmen. Dabei ergibt sich, daß alle diese Merkmale, insbesondere die Anzahl an Petiolen mit Adventivwurzeln (%), durch die Bor-Steigerung eine Senkung erfahren haben.

**Tabelle.15.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen Bor und der Anzahl an Petiolen mit Adventivwurzeln, Anzahl Adventivwurzeln pro Petiole und Adventivwurzellänge.

	BOR	Petiolen mit Adventivwurzeln	Adventivwurzeln pro Petiole	Adventivwurzellänge
BOR	-			
Petiolen mit Adventivwurzeln	-0,96	-		
Adventivwurzeln pro Petiole	-0,90	0,85	-	
Adventivwurzellänge	-0,86	0,91	0,90	-

In einem neuen Versuch mit B5<sup>-</sup>-Nährmedium, bei dem die Petiolen direkt in B5<sup>-</sup>-Nährmedium mit verschiedenen Borkonzentrationen angesetzt wurden, sind ähnlich wie im NL-Medium auch Adventivwurzeln gebildet wurden (Tabelle 16).

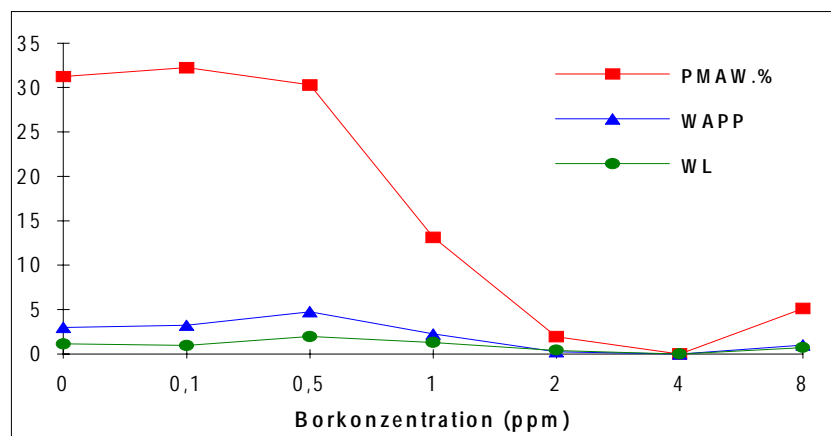
**Tabelle 16:** Einfluß verschiedener Borkonzentrationen in B5<sup>-</sup>-Nährlösung (ohne vorangegangene B5<sup>+</sup>-Nährlösung) auf die Entstehung von Adventivwurzeln in Karotten-Petiolenexplantaten (nach 4 Wochen)

Bor (ppm)	Anzahl Petiolen mit Adventivwurzeln (%) *	Anzahl Adventivwurzeln pro Petiole	Adventivwurzellänge (cm)
0	31,25	3	1,13
0,1	32,25	3,25	0,95
0,5	30,3	4,75	1,97
1,0	13,15	2,25	1,28
2,0	1,96	0,25	0,4
4,0	0	0	0
8,0	5,12	1	0,7

Mittelwerte aus vier Wiederholungen

\* Signifikanter Unterschied mit  $p=5\%$

In der Tabelle 16 und in der Abb.10.1 ist die Verminderung des Anteil der Petiolen mit Adventivwurzeln bei Steigerung der Borkonzentration zu beobachten.



**Abbildung 10.1:** Einfluß von Bor in B5<sup>-</sup>-Nährlösung (ohne vorangegangene B5<sup>+</sup>-Nährlösung) auf Bildung und Wachstum von Adventivwurzeln [Petiolen mit adventiven Wurzeln (PMAW %), Wurzelanzahl pro Petiole (WAPP) und Wurzellänge (WL)] in Karotten-Petiolenexplantaten (4 Wochen Kulturdauer).

Die Abbildung 10.1 zeigt den Einfluß von Bor auf die Entstehung von Adventivwurzeln. Die Abnahme der Petiolen mit Wurzeln erfolgt in Abhängigkeit von der Borkonzentration gleichmäßig, während die Wurzellänge und die Wurzelanzahl pro Petiole bis 0,5 ppm Bor leicht steigen, bei noch höheren Konzentrationen jedoch abnehmen. Die errechneten Korrelationskoeffizienten zwischen Bor und den oben genannten Faktoren sind auch in diesem Versuch negativ (Tabelle 16.1).

**Tabelle 16.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen Bor und Petiolen mit Adventivwurzeln (%) bzw. Adventivwurzelanzahl pro Petiole bzw. Adventivwurzellänge.

	<b>Bor</b>	<b>Petiolen mit Adventivwurzeln</b>	<b>Adventivwurzeln pro Petiole</b>	<b>Adventivwurzellänge</b>
<b>Petiolen mit Adventivwurzeln</b>	-0,70	-		
<b>Adventivwurzeln pro Petiole</b>	-0,62	0,93	-	
<b>Adventivwurzellänge</b>	-0,50	0,75	0,93	-

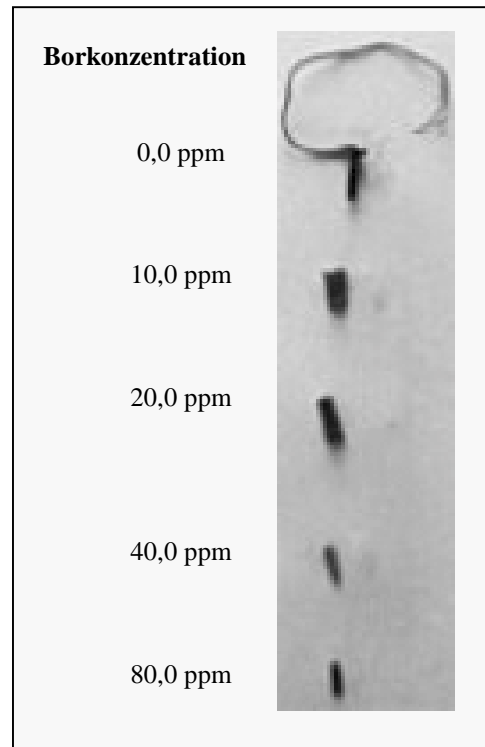
Wenn die B<sup>5-</sup>-Nährlösungen hohe Bor-Konzentrationen enthielten (s. Tabelle 17), haben nur die Petiolen Adventivwurzeln gebildet, in deren Nährmedien 0 ppm Bor vorhanden war. Die Petiolen in Nährmedien mit viel zugesetztem Bor haben offenbar nicht den geeigneten physiologischen Zustand erreicht, um Adventivwurzeln bilden zu können (s. Abb. 10.2).

**Tabelle 17:** Einfluß von verschiedenen sehr hohen Borkonzentrationen in B<sup>5-</sup>-Nährlösung (ohne vorangegangene B<sup>5+</sup>-Nährlösung) auf die Entstehung und das Wachstum von Adventivwurzeln in Karotten-Petiolenexplantaten (nach 4 Wochen).

<b>Bor (ppm)</b>	<b>Petiolen mit Wurzeln (%)</b>	<b>Hauptwurzellänge (cm)</b>	<b>Nebenwurzelanzahl</b>	<b>Nebenwurzellänge (cm)</b>
0	19,04	5,66	1,75	0,7
10	0	0	0	0
20	0	0	0	0
40	0	0	0	0
80	0	0	0	0

*Mittelwerte aus vier Wiederholungen*

**Abbildung 10.2:** Die Entstehung von Adventivwurzeln bei Petiolen in B<sup>5</sup>-Nährlösung mit verschiedenen Borkonzentrationen. Es wurde die Adventivwurzelbildung durch höhere Borkonzentrationen gehemmt.



#### 4.6 Untersuchungen zum Phytohormonsystem der Explantate während der somatischen Embryogenese unter Boreinfluß

##### 4.6.1 Einfluß von Bor auf die Konzentrationen einiger Phytohormone während der Induktions- bzw. Vermehrungsphase der somatischen Embryogenese

Die bisher gezeigte Wachstumsweise der somatischen Embryonen und die Adventivwurzelbildung der Petiolen bei verschiedenen Borkonzentrationen führen zu der Hypothese, daß die Funktion von Bor während der somatischen Embryogenese einer hormonalen Wirkung ähnlich ist. Z.B. zeigen bei hoher Borkonzentration die Cotyledonen ein ähnliches Wachstum wie bei Kinetinbehandlung, und die Varianten ohne Borzusatz zeigen ähnliches Wachstum wie im Falle einer Auxinapplikation. Deshalb wurde eine Untersuchung über das Hormonsystem während der somatischen Embryogenese aufgenommen.

Die Ergebnisse der Hormonbestimmung bei Petiolen von aus Samen angezogenen Karottenpflanzen, die als Kontrolle diente, sind in Tabelle 18 dargestellt. Die Samen der Karottenpflanzen wurden unter sterilen Bedingungen in Agar mit B<sup>5</sup>-Nährlösung (siehe

Material und Methoden), mit 0,1 ppm Borzusatz, ausgesät. Nach vier Wochen wurden die Karottenpflanzen aus den Glasgefäßen entnommen und die Hormongehalte ihrer Petiolen gemessen.

**Tabelle 18:** Phytohormonbestimmung [Zeatin (Z), Zeatinribosid (ZR), Dihydrozeatin (DHZ), Isopentenyladenin (IP), Isopentenyladenosin (IPR), Indol-3-Essigsäure (IES) und Abscisinsäure (ABA)] bei Petiolen von **4 Wochen alten Karottenpflanzen**, gewachsen in Glasgefäßen mit Agar [Karottensamen wurden für 4 Wochen in Agar mit B<sup>5</sup>-Nährlösung (ohne 2,4-D und mit 0,1ppm Bor), kultiviert], (Angaben in ng/g FG).

IES	ABA	IP	IPR	DHZ	Z	ZR	GESAMTCYTOKININE
16,50	3,30	1,035	6,066	1,50	1,25	0,15	10,001

Die oben erwähnten Petiolen wurden in B<sup>5</sup>-Nährlösung während der Induktionsphase kultiviert und nach 22 Tagen in B<sup>5</sup> wurden die kultivierten Petiolenexplantate zur Hormonbestimmung verwendet (Tabelle 19).

**Tabelle.19:** Phytohormonbestimmung [Zeatin (Z), Zeatinribosid (ZR), Dihydrozeatin (DHZ), Isopentenyladenin (IP), Isopentenyladenosin (IPR), Indol-3-Essigsäure (IES) und Abscisinsäure(ABA)] während der **Induktionsphase** der somatischen Embryogenese bei Karottenpetiolen, gewachsen in B<sup>5</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen, **nach 3 Wochen** Kultur (Angaben in ng/g FG).

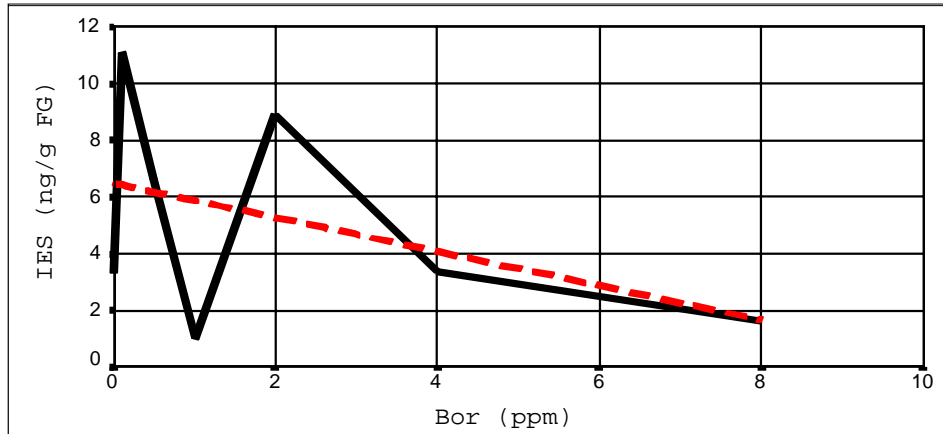
Bor (ppm)	IES	ABA	IP	IPR	DHZ	Z	ZR	GESAMT-CYTOKININE
<b>0,00</b>	3,34d <sup>§</sup>	2,33c <sup>§</sup>	6,62	25,69	0,02	0,24	0,30	32,87ab <sup>§</sup>
<b>0,10</b>	11,09a	2,25cd	2,00	18,60	0,11	0,33	0,64	21,69d
<b>0,50</b>	6,65bc	2,91b	0,05	31,15	0,11	1,27	0,47	32,93a
<b>1,00</b>	1,03d	6,25a	5,09	16,67	0,29	0,38	0,45	22,88d
<b>2,00</b>	8,90ab	2,01de	1,31	10,56	0,12	1,20	0,35	13,54e
<b>4,00</b>	3,38d	0,00f	8,64	25,74	0,18	0,30	0,06	34,92a
<b>8,00</b>	1,64d	0,00f	7,16	18,50	0,14	0,45	2,10	28,34bc

Duncan-Test (Signifikanzniveau 95%)

<sup>§</sup> a, b, c = Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

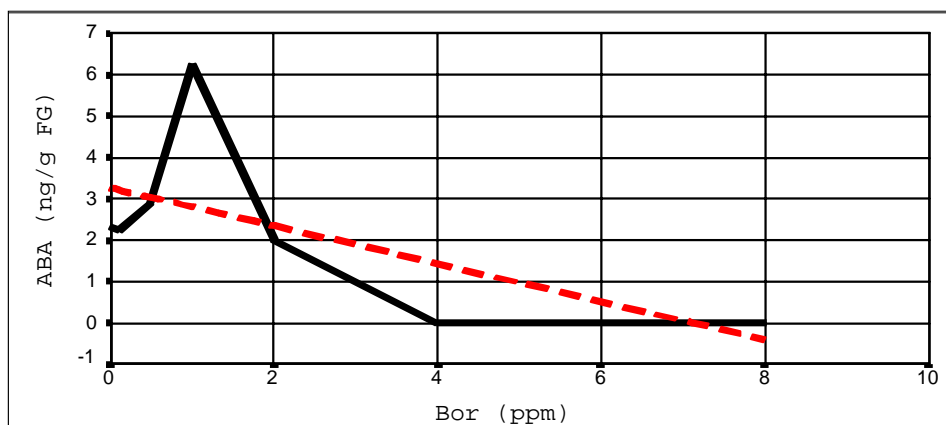
Die Ergebnisse der Hormonanalyse der Petiolen (Tab. 19) zeigen Maxima im IES-Gehalt bei 0,1 ppm Bor, während die Abscisinsäure eine maximale Konzentration bei 1,0 ppm aufweist. Die einzelnen Cytokinine sowie deren Summe lassen keine klare Abhängigkeit von der Bor-Applikation erkennen.

Die Angaben von Abbildung 11.1 zeigen einen eindeutigen Unterschied in der IES-Konzentration nach Borbehandlung. 0,1 ppm Bor verursacht ein Maximum, während bei höheren Borkonzentrationen der Gehalt an IES niedriger ist (die Variante ohne Bor hatte ebenfalls keinen höheren Gehalt an IES als die mit 0,1 ppm Bor).



**Abbildung 11.1:** Einfluß von Bor auf die IES-Konzentration während der **Induktionsphase** der somatischen Embryogenese bei Karottenpetiolen, gewachsen in B5<sup>+</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen (**nach 21 Tagen**) ( $y=6,48-0,60x$ ).

Die Ergebnisse der Hormonanalyse zeigen weiterhin einen Unterschied in der ABA-Konzentrationen in Petiolen bei verschiedenen Borkonzentrationen im Laufe der Induktionsphase. Bei höheren Borkonzentrationen wurde die ABA-Konzentration gesenkt (s. Abb.11.2).

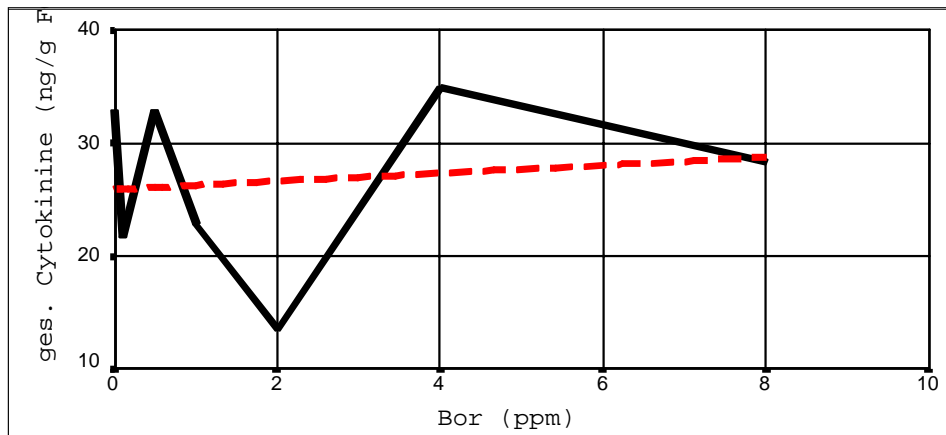


**Abbildung 11.2:** Einfluß von Bor auf die ABA-Konzentration während der **Induktionsphase** der somatischen Embryogenese bei Karottenpetiolen, gewachsen in B5<sup>+</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen (**nach 21 Tagen**) ( $y=3,27-0,45x$ ).

Der Gesamtgehalt der untersuchten Cytokinine (Tab. 19 und Abb. 11.3) zeigt eine Veränderung durch unterschiedliche Borbehandlungen. In Nährmedien mit 4 ppm Bor



wurde das Maximum und in Medien mit 2 ppm Borgehalt wurde das Minimum an Cytokinen beobachtet.



**Abbildung 11.3:** Einfluß von Bor auf die **Gesamtcytokine** (ges. Cytokine) während der **Induktionsphase** der somatischen Embryogenese bei Karottenpetiolen, gewachsen in B<sup>5+</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen (**nach 21Tagen**) ( $y=25,94+0,35x$ ).

**Tabelle 19.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen der Bor-Applikation und den Gehalten an IES, ABA, IP, IPR und den gesamten Cytokinen nach 21-tägigem Verlauf der **Induktionphase** der somatischen Embryogenese.

	<b>BOR</b>	<b>IES</b>	<b>ABA</b>	<b>IP</b>	<b>IPR</b>	<b>GES.- CYTOKININE</b>
<b>BOR</b>	-					
<b>IES</b>	-0,46	-				
<b>ABA</b>	-0,63	-0,10	-			
<b>IP</b>	0,54	-0,75	-0,36	-		
<b>IPR</b>	-0,18	-0,18	-0,15	0,11	-	
<b>GES.- CYTOKININE</b>	0,13	-0,48	-0,30	0,50	0,91	-

In Bezug auf Tabelle 19.1 hat die Borkonzentration einen negativen Einfluß auf den IES- und ABA-Gehalt, während eine Wirkung von Bor auf die Gesamtcytokine in den Petiolen in der Induktionsphase nicht nachzuweisen ist, ist eine positive Wirkung von Bor auf den IP-Gehalt offensichtlich.

Zur Untersuchung endogener Phytohormone in aus Karottenpetiolen stammenden Zellsuspensionen wurden sieben verschiedene B<sup>5+</sup>-Nährlösungen mit unterschiedlichen Borkonzentrationen (s. S. 85) verwendet. 14 Tage nach der Umsetzung der Zellsuspensionen in die oben genannten sieben verschiedenen Nährmedien wurden die Hormonkonzentrationen gemessen (siehe Tabelle 20).

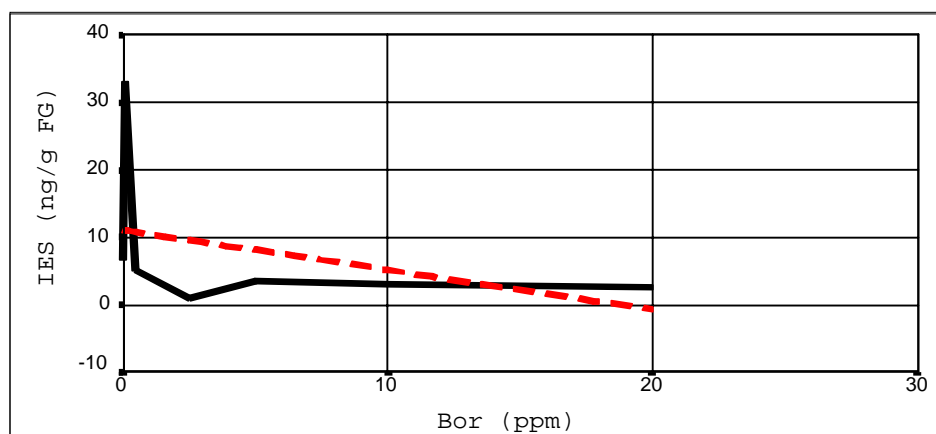
**Tabelle 20:** Phytohormonbestimmung [Zeatin (Z), Zeatinribosid (ZR), Dihydrozeatin (DHZ), Isopentenyladenin (IP), Isopentenyladenosin (IPR), gesamte Cytokinine, Indol-3-Essigsäure (IES) und Abscisinsäure (ABA)] während der **Vermehrungsphase** der somatischen Embryogenese bei Zellsuspensionen, **14 Tage** in B<sup>5+</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen kultiviert wurden (Angaben in ng/g FG).

Bor (ppm)	IES	ABA	IP	IPR	D.H.Z	Z	Z.R	GESAMTE CYTOKININE
0,00	6,75b <sup>§</sup>	7,20de <sup>§</sup>	0,21	3,50	0,95	0,50	0,71	5,86e <sup>§</sup>
0,10	33,00a	10,20b	3,60	5,25	0,00	0,00	0,00	8,85cd
0,50	5,10b	5,40e	2,70	5,40	1,41	0,12	0,17	9,80bc
2,50	1,00b	36,00a	2,10	1,50	0,59	0,32	0,32	4,82e
5,00	3,60b	9,75c	4,50	4,80	0,92	0,41	0,27	10,89bc
10,00	3,15b	8,10cd	4,35	4,80	2,55	0,26	0,00	11,96b
20,00	2,55b	4,80e	4,95	7,50	0,80	0,28	0,01	13,54a

Duncan-Test (Signifikanzniveau 95%)

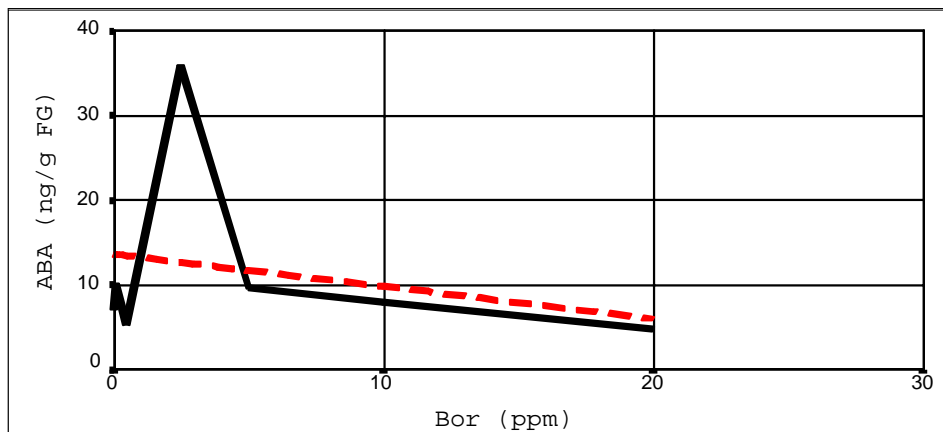
<sup>§</sup> a, b, c = Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

Die Daten der Tabelle 20 und Abbildung 12.1 zeigen die Senkung der IES-Konzentration nach Behandlung mit steigenden Borzusätzen. Die Produktion an IES ist bei der Variante mit 0,1 ppm Bor am höchsten. Die höchste IES-Konzentration wurde auch im Falle der Petiolenkulturen (s. Tab. 19) in B<sup>5+</sup>-Nährmedien bei dieser Borkonzentration erreicht.



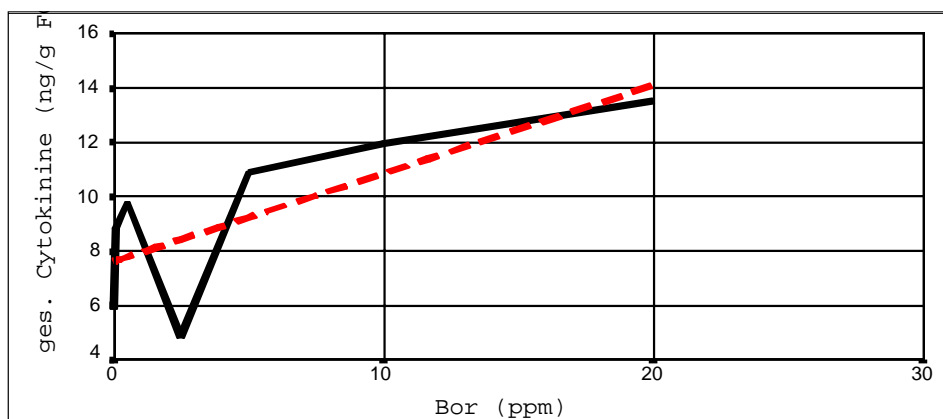
**Abbildung 12.1:** Einfluß von Bor auf die IES-Konzentration während der **Vermehrungsphase** der somatischen Embryogenese bei Zellsuspensionen aus Karottenpetiolen, die **14-Tage** in B<sup>5+</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen kultiviert wurden ( $y=11,09-0,59x$ ).

Die ABA- und IES-Konzentration in diesen Untersuchungen (s. Tab.20, Abb. 12.1 und 12.2) in Zellsuspension (besonders bei Varianten ohne Borzusatz) ist im Vergleich zu den Versuchen mit Petiolenkulturen (s. Tab. 19) während der Induktionsphase höher. Die Abbildung 12.2 zeigt, daß die ABA-Konzentration in den einzelnen Bor-Varianten unterschiedlich ist, wobei ein Trend zu niedrigerer ABA-Konzentration bei höherer Bor-Applikation besteht.



**Abbildung 12.2:** Einfluß von Bor auf die ABA-Konzentration während der **Vermehrungsphase** der somatischen Embryogenese bei Zellsuspensionen aus Karottenpetiolen, die **14-Tage** in B5<sup>+</sup>-Nährlösungen mit verschiedenen Borkonzentrationen kultiviert wurden ( $y=13,71-0,38x$ ).

Der gesamte Cytokinengehalt steigt deutlich mit erhöhten Borkonzentrationen in den Zellsuspensionen. Dieser Anstieg ist auf die bei steigender Bor-Konzentration erhöhten IP- und IPR-Gehalte zurückzuführen, während die niedrigen Gehalte an Z und ZR keinen Boreinfluß aufweisen (s. Tab.20 und Abb.12.3).



**Abbildung 12.3:** Einfluß von Bor auf die **Gesamtcytokinine** während der **Vermehrungsphase** der somatischen Embryogenese bei Zellsuspensionen aus Karottenpetiolen, die **14-Tage** in B5<sup>+</sup>-Nährlösungen, mit verschiedenen Borkonzentrationen kultiviert wurden ( $y=7,62+0,32x$ ).

Bei der Variante mit 2,5 ppm Bor sinkt der Cytokiningehalt bei gleichzeitiger ABA-Erhöhung (s. Abb. 12.2 und 12.3) d.h, es ist eine antagonistische Wirkung zwischen Abscisinsäure und Ges.-Cytokininen vorhanden.

**Tabelle 20.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen der Bor-Applikation und den Gehalten an IES, ABA, IP, IPR und Ges.-Cytokininen während der **Vermehrungsphase** der somatischen Embryogenese.

	<b>Bor</b>	<b>IES</b>	<b>ABA</b>	<b>IP</b>	<b>IPR</b>
<b>Bor</b>	-				
<b>IES</b>	-0,39	-			
<b>ABA</b>	-0,26	-0,16	-		
<b>IP</b>	0,68	0,02	-0,27	-	
<b>IPR</b>	0,63	0,16	-0,81	0,66	-
<b>DHZ</b>	0,26	-0,55	-0,29	0,17	0,10
<b>Z</b>	0,11	-0,68	0,11	-0,35	-0,35
<b>ZR</b>	-0,50	-0,27	0,18	-0,86	-0,59
<b>Ges.-Cytokinine</b>	0,75	-0,09	-0,67	0,87	0,89

Es kann ein Zusammenhang zwischen der Borkonzentration und dem Gehalt an eigenen Pflanzenhormonen der Zellsuspensionen in B5<sup>+</sup> aus Tabelle 20.1 abgeleitet werden. Die Borkonzentration in den Zellsuspensionen während der Vermehrungsphase hat einen schwach negativen Zusammenhang mit der ZR-, IES- und ABA-Konzentration, aber einen stark positiven Zusammenhang mit der IP und der Ges.-Cytokinin-Konzentration. Im diesen Untersuchungen besteht durchweg eine negative Beziehung zwischen dem in Zellsuspensionen gefundenen ABA-Gehalt und den anderen untersuchten Pflanzenhormonen, insbesondere dem Gesamt-Cytokinin-Gehalt.

#### ***4.6.2 Einfluß von Bor auf die Konzentrationen einiger Phytohormone während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.***

Der Gehalt an Pflanzenhormonen während der Realisierungsphase wurde an Karottenpetiolen gemessen, die nach drei Wochen von B5<sup>+</sup> in B5<sup>-</sup>-Nährlösungen, mit verschiedenen Borkonzentrationen umkultiviert worden sind (Tabelle 21). Bei der Beurteilung der Hormonkonzentration in diesem Entwicklungsabschnitt ist zu berücksichtigen, daß die Embryonalentwicklung nicht synchron erfolgte. Bei den Analysen wurden Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien erfaßt, sodaß hier nur Tendenzen durch diese Untersuchungen aufgezeigt werden können.

**Tabelle 21:** Einfluß verschiedener Borkonzentrationen auf die Pflanzenhormone Zeatin (Z), Zeatinribosid (ZR), Dihydrozeatin (DHZ), Isopentenyladenin (IP), Isopentenyladenosin (IPR), Indol-3-Essigsäure (IES) und Abscisinsäure (ABA), **nach 21-tägigem** Verlauf der **Realisierungsphase** der somatischen Embryogenese [mit vorangegangener drei-wöchigen Induktionsphase der Karottenpetiolen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor] (Angaben in ng/g FG).

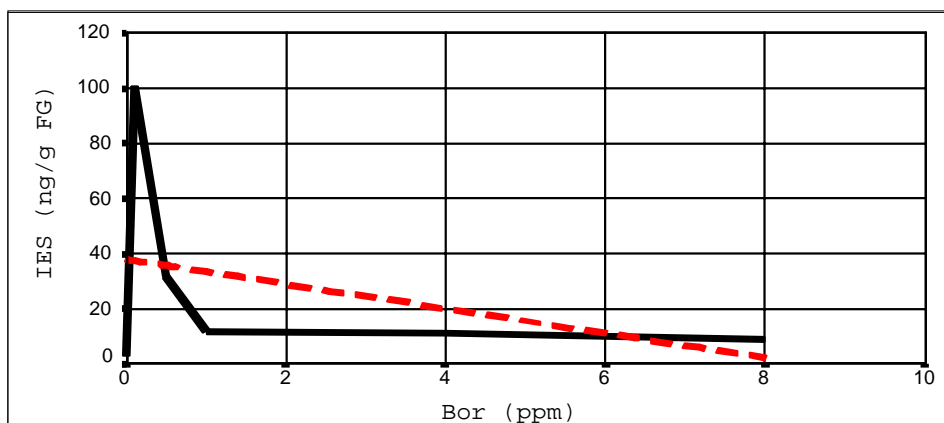
Bor (ppm)	IES	ABA	IP	IPR	DHZ	Z	ZR	GES. - CYTOKININE
0,00	3,01d <sup>s</sup>	87,5a <sub>s</sub>	0,19	0,21	0,3	0,05	-	0,74e <sup>s</sup>
0,10	100,5a	12,15 <sub>c</sub>	0,07	44,68	1,7	0,28	-	46,72a
0,50	31,75b	5,1d	0,04	30,84	0,89	0,18	-	31,96c
1,00	12c	23b	0,04	0,3	0,81	0,07	-	1,21e
4,00	11c	3,58d	0,5	12,85	0,07	0,03	-	13,45d
8,00	9c	6,9d	0,03	39,84	1,15	0,09	-	41,11b

Duncan-Test (Signifikanzniveau 95%)

<sup>s</sup> a, b, c = Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

- = unter der Nachweisgrenze

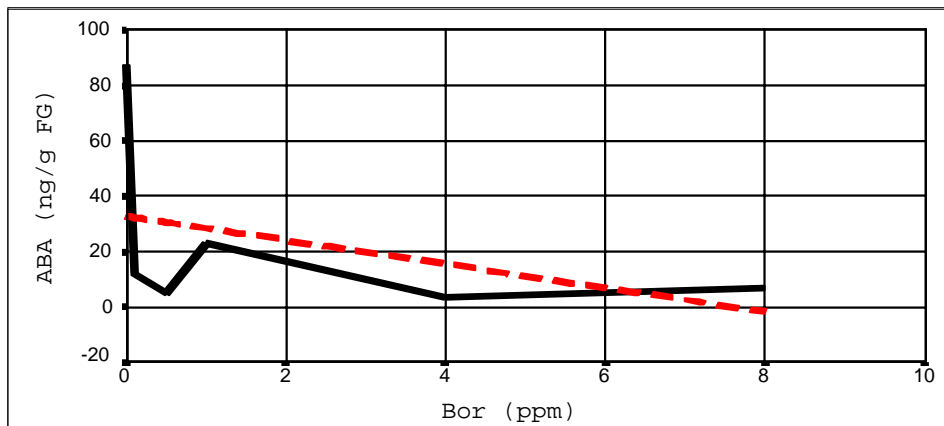
Die Daten in Tabelle 21 und Abbildung 13.1 zeigen eine Senkung des IES-Gehaltes bei Kulturen mit einem Borgehalt >0,1 ppm. In diesem Versuch zeigte sich auch, ähnlich wie in Tab. 20, die Variante mit 0,1 ppm Bor das Maximum der IES-Konzentration, während die Variante ohne Bor das Minimum aufwies. Damit wird deutlich, daß Bor in beiden Phasen der somatischen Embryogenese von Karottenkulturen die Gehalte der untersuchten Hormone ähnlich beeinflusst hat.



**Abbildung 13.1:** Einfluß von **Bor** auf die **IES-Konzentration nach 21-tägigem** Verlauf der **Realisierungsphase** der somatischen Embryogenese [nach vorangegangener Induktionsphase der Karottenpetiolen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor (drei Woche)] ( $y=37,99-4,46x$ ).

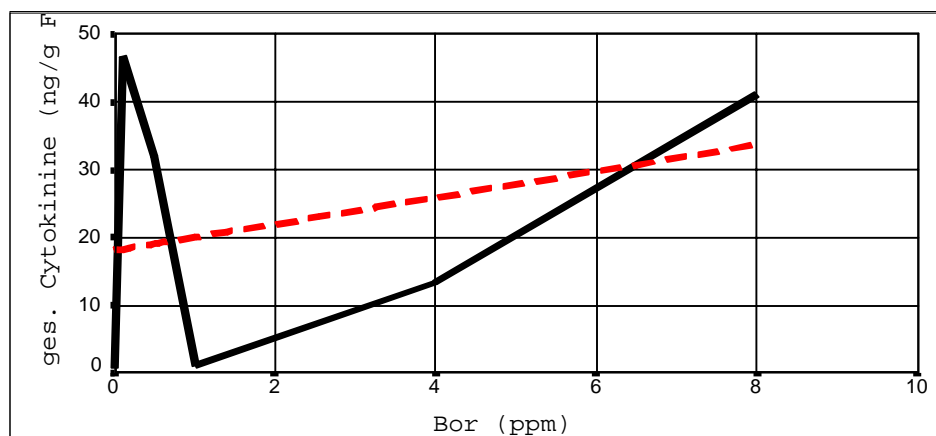
Die ABA-Konzentration sinkt im allgemeinen bei Erhöhung der Borkonzentration. Bei der Variante ohne Bor ist der ABA-Gehalt am größten, was als Indiz für Stress wegen

Bormangels gewertet werden könnte. Bei höheren Borgehalten enthielten die Kulturen geringere ABA-Gehalte ( $r=-0,42$ , s. Tab.21.1). Eine Ausnahme stellt dabei die Variante mit 1 ppm Bor dar.



**Abbildung 13.2:**Einfluß von Bor auf die ABA-Konzentration nach 21-tägigem Verlauf der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese [nach vorangegangener Induktionsphase der Karottenpetiolen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor (drei Woche)] ( $y=32,79-4,30x$ ).

Die Gesamt-Cytokiningehalte zeigen keinen klaren Zusammenhang mit der Borkonzentration. Desweiteren besteht eine negative Beziehung der Gesamt-Cytokin-Gehalte zum ABA-Gehalt ( $r=-0,60$ ). Im Falle dieses Versuchs liegt das Maximum des Ges.-Cytokin-Gehalts bei der Variante mit 0,1 ppm Bor und das Minimum bei der Variante ohne Bor (s. Abb.13.3). Dabei besteht eine leichte Tendenz der Zunahme der Ges.-Cytokin-Gehalte mit steigender Bor-Applikation ( $r=0,31$ , s. Tab. 21.1).



**Abbildung 13.3:**Einfluß von Bor auf die Gesamtcytokinine nach 21-tägigem Verlauf der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese [nach vorangegangener Induktionsphase der Karottenpetiolen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor (drei Woche)] ( $y=18,12+1,94x$ ).

**Tabelle 21.1:** Korrelationskoeffizienten zwischen der Bor-Applikation und den Gehalten an IES, ABA und einzelnen und Ges.-Cytokinen während der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.

	BOR	IES	ABA	IP	IPR
--	-----	-----	-----	----	-----

<b>BOR</b>	-				
<b>IES</b>	-0,39	-			
<b>ABA</b>	-0,42	-0,31	-		
<b>IP</b>	0,12	-0,27	0,019	-	
<b>IPR</b>	0,32	0,66	-0,60	-0,36	-
<b>DHZ</b>	-0,03	0,77	-0,37	-0,74	0,78
<b>Z</b>	-0,37	0,94	-0,33	-0,51	0,75
<b>ZR</b>	-	-	-	-	-
<b>GES.CYTO</b>	0,31	0,67	-0,60	-0,37	0,99

Aus den Daten der Tabelle 21.1 ist ein negativer Zusammenhang zwischen der Bor-Applikation und den gefundenen Gehalten an IES, ABA und Zeatin abzuleiten. Weiterhin ist eine positive Wirkung von Bor auf die IP, IPR und die gesamten Cytokiningehalte erkennbar, während der ABA-Gehalt in den einzelnen Bor-Varianten eine negative Korrelation zum Ges.-Cytokiningehalt und der IES-Konzentration aufweist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Bor auf Suspensionskulturen während der Induktionsphase im B5<sup>+</sup>-Medium (s. Tab. 20) einen ähnlichen Einfluß auf die Gehalte der untersuchten Pflanzenhormone ausübt wie in der Realisierungsphase ohne 2,4-D im Nährmedium. Dabei ist festzustellen, daß bei 2,4-D-Präsenz in der Induktionsphase niedrigere IES- und ABA- Gehalte als in der Realisierungsphase vorliegen. Auch die Gehalte einzelner Cytokinine (besonders IP, Z, ZR und DHZ) weisen stärkere Unterschiede in den beiden Phasen auf. Dabei kann allerdings nicht entschieden werden, ob ein 2,4-D-Einfluß oder ob entwicklungsbedingte Unterschiede vorliegen.

#### **4.7 Einfluß von Bor auf die IES-Oxidaseaktivität während der somatischen Embryogenese**

##### ***4.7.1 Einfluß von Bor auf die IES-Oxidaseaktivität im Verlauf der Vermehrungsphase der somatischen Embryogenese***

Eine der Borfunktionen im Verlauf des Pflanzenwachstums, die von mehreren Forschern beschrieben wurde (z.B. Goldbach, 1990; Bondok, 1996), ist die Wirkung auf den IES-Metabolismus, besonders über die IES-Oxidase.

Die in Tabelle 22 aufgeführten Daten zeigen einen gesicherten Boreinfluß auf die IES-Oxidaseaktivität von Zellsuspensionen während der Vermehrungsphase unter 2,4-D-Einfluß.

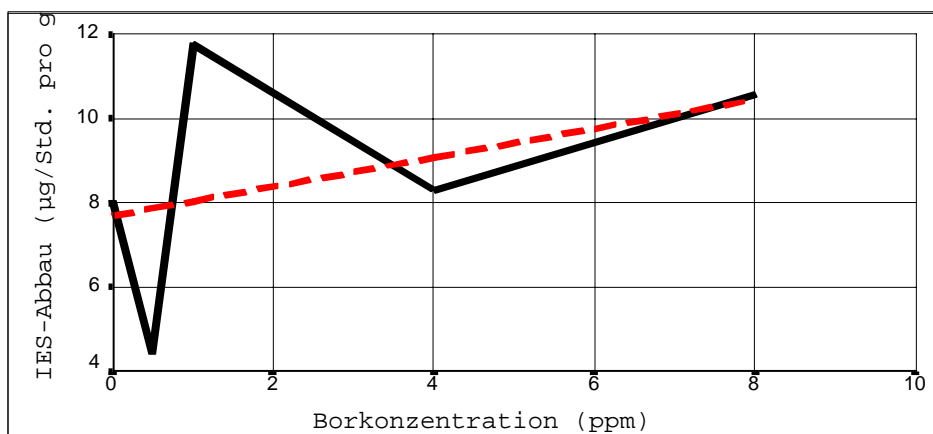
**Tabelle 22:** Einfluß verschiedener Borkonzentrationen auf die **IES-Oxidaseaktivität** (IES-Abbau) während der **Vermehrungsphase** (mit 2,4-D) der somatischen Embryogenese bei Zellsuspensionen, welche **21-Tage** in B5<sup>+</sup>-Nährlösungen, mit verschiedenen Borkonzentrationen, kultiviert wurden.

Bor-Applikation (ppm)	IES-Oxidaseaktivität [IES-Abbau(µg/Std. pro g FG)]
0	8,053 b <sup>§</sup>
0,5	4,437 c
1	11,774 a
4	8,313 b
8	10,587 a

Duncan-Test (Signifikanzniveau 95%)

<sup>§</sup> a, b, c ≅ Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

Die statistische Analyse der Mittelwertvergleiche zeigt einen Unterschied zwischen den Mittelwerten der IES-Oxidaseaktivität. Dabei ist ein leichter Trend zur Zunahme der Aktivität bei steigender Bor-Applikation festzustellen ( $r=0,42$ , s. Abb. 14).



**Abbildung 14:** Korrelation ( $r=0,42$ ;  $y=7,70+0,34x$ ) zwischen verschiedenen Borkonzentrationen und der **IES-Oxidaseaktivität** (IES-Abbau in µg/Stunde pro g FG) in Zellsuspensionen von Karotten während der **Vermehrungsphase** der somatischen Embryogenese (**nach 21 Tagen**).

#### 4.7.2 Einfluß von Bor auf die IES-Oxidaseaktivität im Verlauf der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese

Um den Einfluß von Bor auf die IES-Oxidaseaktivität während der Realisierungsphase zu untersuchen, wurden Zellsuspensionen aus B5<sup>+</sup> in B5<sup>-</sup>-Nährlösungen mit



verschiedenen Borkonzentrationen umgesetzt. Nach einer Kulturdauer von 8 bzw. 20 Tagen wurde die Aktivität der IES-Oxidase gemessen (s. Tabellen 23 und 24). Wie bereits bei den Hormonanalysen angedeutet (s.S. 87), können auch hier nur Tendenzen aufgezeigt werden.

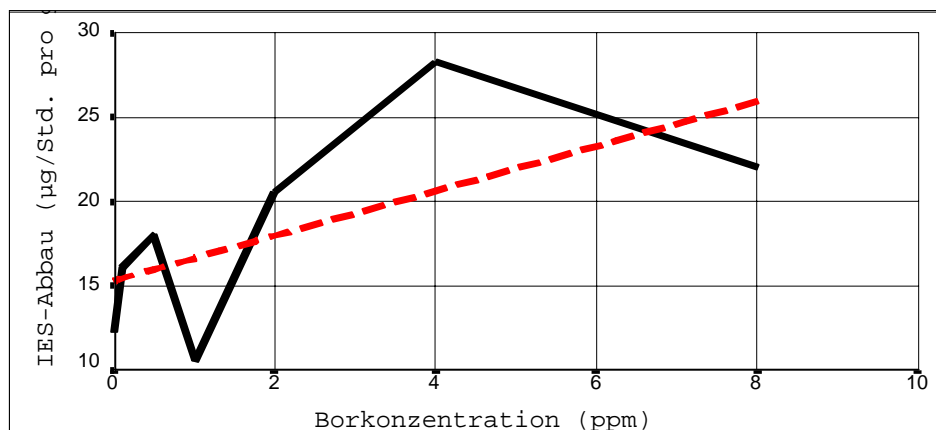
**Tabelle 23:** Einfluß verschiedener Borkonzentrationen auf die **IES-Oxidaseaktivität** (IES-Abbau) während der **Realisierungsphase** der somatischen Embryogenese **nach 8 Tagen** [mit vorangegangener Vermehrungsphase der Karottenzellsuspensionen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung ohne Bor (drei Wochen)].

Bor-Applikation (ppm)	IES-Oxidaseaktivität [IES-Abbau(µg/Std. pro gFG)]
0,00	12,28 d §
0,10	16,14 c
0,50	18,05 bc
1,00	10,60 d
2,00	20,60 b
4,00	28,31 a
8,00	22,08 b

Duncan-Test (Signifikanzniveau 95%)

§ a, b, c ≙ Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

Es ist ein gesicherter Einfluß von Bor auf die IES-Oxidaseaktivität zu beobachten. Der Mittelwert der abgebauten IES-Mengen (in µg pro Stunde pro g Frischgewicht) in den Explantaten zeigt in der Tendenz mit Ausnahme der Bor-Applikation von 1,0 ppm eine Steigerung mit steigender Borkonzentration in den Nährmedien (s. Abb. 15).



**Abbildung 15:** Korrelation ( $r=0,72$ ;  $y=15,34+1,32x$ ) zwischen verschiedenen Borkonzentrationen und der **IES-Oxidaseaktivität** (IES-Abbau in  $\mu\text{g}/\text{Std. pro g FG}$ ) während der **Realisierungsphase** der somatischen Embryogenese (**nach 8 Tagen**).

Es kann eine relativ enge Korrelation zwischen dem Borgehalt in der Nährlösung und der IES-Oxidaseaktivität nach 8 Tagen Kulturverlauf beobachtet werden ( $r=0,72$ , s. Abb. 15).

Die Daten aus Tabelle 24 und Abb. 16 zeigen die Menge der abgebauten IES in  $\mu\text{g}$  pro Stunde pro g Frischgewicht nach 20-tägigem Verlauf der Realisierungsphase der somatischen Embryogenese.

**Tabelle. 24:** Einfluß verschiedener Borkonzentrationen auf die **IES-Konzentration** und die **IES-Oxidaseaktivität** (IES-Abbau) während der **Realisierungsphase** (in B5 ohne 2,4-D) der somatischen Embryogenese **nach 20 Tagen** [mit vorangegangener Vermehrungsphase der Karottenzellsuspensionen in B5<sup>+</sup>-Nährlösung (B5 mit 2,4-D) ohne Bor (drei Wochen)]

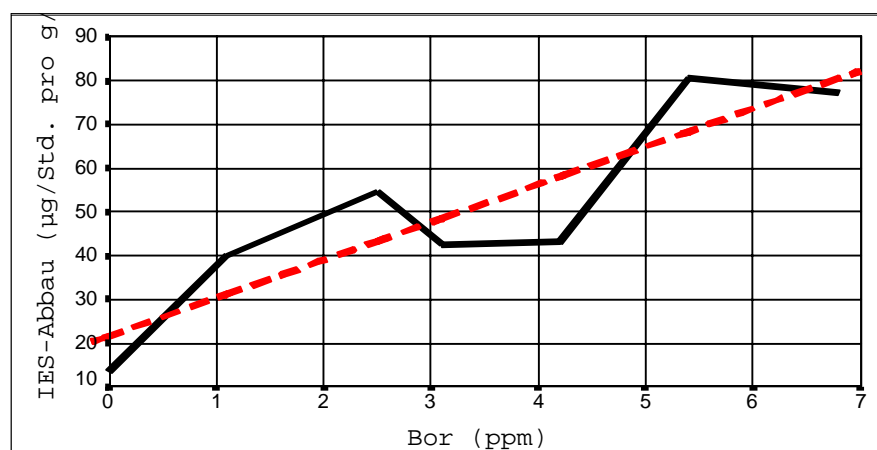
Bor-Applikation (ppm)	IES-Oxidaseaktivität [IES-Abbau( $\mu\text{g}/\text{Std. pro gFG}$ )]	IES (ng/g FG)
0,00	13,54 d <sup>s</sup>	3,01 d <sup>s</sup>
0,10	40,10 c	100,50 a
0,50	54,68 b	31,75 b
1,00	42,64 c	12,00 c
2,00	43,12 c	-
4,00	80,505 a	11,00 c
8,00	77,32 a	9,00 c

Duncan-Test zur (Signifikanzniveau 95%)

<sup>s</sup> a, b, c  $\equiv$  Symbole zur Anzeige eines signifikanten Unterschieds

- = nicht bestimmt

Bei diesen Untersuchungen konnte auch bei verschiedenen Borkonzentrationen ein positiver Zusammenhang mit der IES-Oxidaseaktivität bei den somatischen Embryonen festgestellt werden ( $r=0,88$ , s. Abb. 16).



**Abbildung 16:** Korrelation ( $r=0,88$ ;  $y=21,70+8,65x$ ) zwischen verschiedenen Borkonzentrationen und der **IES-Oxidaseaktivität** (IES-Abbau in  $\mu\text{g}/\text{Std. pro g FG}$ ) während der **Realisierungsphase** der somatischen Embryogenese **nach 20 Tagen**.

Wie Tabelle 24 auch zeigt, besteht nur bis 0,1 ppm Bor ein gleichsinniger Verlauf der IES-Oxidaseaktivität und der in den Embryonen gefundenen IES-Gehalte. Während über 0,1 ppm Bor die IES-Oxidaseaktivität weiter ansteigt, kommt es in den Geweben zu einem nahezu linearen Abfall der IES-Gehalte, was als logische Folge der Borbedingten Zunahme der IES-Oxidaseaktivität zu werten wäre.

Bei einem Vergleich der IES-Oxidaseaktivität in der Induktionsphase (+2,4-D s. Abb. 14) sowie nach 8 und 20 Tagen während der Realisierungsphase (-2,4-D s. Abb.15 und 16) ist eine Zunahme der IES-Oxidaseaktivität zu erkennen, wobei der Bor-Einfluß immer deutlicher hervortritt. Ob dieser Effekt auf die Anwesenheit von 2,4-D zurückzuführen ist, ist fraglich.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Borbestimmungen in Karottenexplantaten und in der Nährlösung sowie die Freisetzung von Bor aus Glas

Anhand des gemessenen Bor-Gehalts wurde ersichtlich, daß aus den verwendeten Kulturgefäße der tatsächliche Borbedarf der Kulturen abgedeckt wird. Das Glas könnte auch durch den Einfluß des pH-Wertes des Mediums und durch erhöhte Temperatur während des Autoclavierens beeinflusst werden und dadurch Bor freisetzen und somit die Versuchsergebnisse verändern (Cousson und Tran Thanh Van, 1981 ). Es mußte eine Maßnahme getroffen werden, um eine Bor-Abgabe aus Glas sowie aus Explantaten und anderen Kontaminationsquellen zu minimieren. Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen, mit Ausnahme des Vorversuchs, im Polycarbon-Kolben durchgeführt. Die benutzten Explantate waren Petiolen-Explantate und zwei bis vier Wochen alte Wurzeln. Jedoch waren es keine Vorrats- bzw. reife Karottenwurzeln, weil diese aufgrund ihres höheren Anteils an gespeicherten Nährstoffen zu völlig anderen Ergebnissen führen könnten. Karotten-Explantate wurden zunächst fünf Monate lang in Polycarbon-Kolben mit  $B_5^+$ -Nährlösung mit 2,4-D und 0 ppm Bor kultiviert. Dadurch wurde der Borgehalt in den Explantaten stark reduziert (s. Tab. 1), wobei aber weiterhin eine sehr geringe Menge an Bor erhalten blieb. Die Karottengewebekultur und die somatische Embryogenese bei Karotten sind gut untersuchte Systeme. Es ist aber nicht ratsam, eine Vorratswurzel oder eine Karottenwurzel mit hoher Mikronährstoffanreicherung zum Zwecke der Untersuchung von Mikronährstoffen in der Gewebekultur als Ausgangsmaterial zu nutzen.

### 5.2 Boreinfluß auf das Wachstum von Karotten-Keimpflanzen

Diverse Karottenpflanzenorgane zeigen unterschiedliche Reaktionen gegenüber verschieden hohen Bor-Konzentrationen. So wird z.B. die Anzahl der Blätter und die

Länge der Hauptwurzeln bei der Verwendung einer höheren Bor-Konzentration stark reduziert. Ähnliche Ergebnisse hat auch Coetzer et al. (1994) über Avocado berichtet. Er hat in Vivo-Versuchen festgestellt, daß sich bei hohen Bor-Konzentrationen das Trockengewicht der vegetativen Teile von Avocados reduzierte. Die Wurzel reagierte im Vergleich mit anderen Organen besonders empfindlich gegenüber hohen Bor-Konzentrationen, zudem war sie als erstes Organ von einer hohen Bor-Konzentration betroffen. Es wird angenommen, daß durch die Hemmung der Wurzelfunktion erst später das Wachstum anderer Organe beeinflusst wird (Coetzer *et al.*, 1994).

Anhand der Empfindlichkeit der Wurzel und ihrer Reaktion gegenüber verschiedenen Bor-Konzentrationen (z.B. El-Sharkawi et al., 1999), wurde eine Methode (bioessay) zur Bestimmung der Bor-Widerstandsfähigkeit bei *Triticum aestivum* von Campbell (1998) vorgestellt. Auch die Arbeit von Bondok (1996) zeigt, daß Bor-beeinflußte endogene Hormone das Wurzelwachstum und den Zuckerertrag bei Zuckerrüben beeinträchtigen.

Die gewonnenen Daten über andere Wachstumsfaktoren in diesem Versuch zeigen, daß die notwendige Konzentration von Bor für das maximale Wachstum von Petiolen, Hypokotylen und das Längenwachstum von Nebenwurzeln ca. zehn mal höher ist als für die Hauptwurzel. Das zeigt, wie oben beschrieben, daß die Wurzeln im Vergleich zu anderen Karottenorganen viel empfindlicher gegenüber Bor sind. Daraus läßt sich ableiten, daß die Bor-Toxizität die Funktionen der Wurzeln schneller beeinflussen kann. Sind die Bor-Konzentrationen höher als für das oben genannte maximale Wachstum, hemmen sie die verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. Blattanzahl oder Petiolenlänge. Man bezeichnet diese Hemmung als toxisch. Die typisch toxischen Bor-Symptome sind Rand- und Spitzen-Chlorose und Nekrose bei erwachsenen Blättern. Die kritische Bor-Konzentration ist für tolerante Pflanzen ungefähr 10 ppm im Bewässerungswasser (Marschner, 1995).

Informationen über die Bor-Toxizität erhält man nur über toxische Symptome (Mengel, 1987; Shiralipour *et al.*, 1993; Marschner, 1995; Swirtlik, 1995). Es gibt wenig Informationen über physiologische Veränderungen durch hohe Nährstoff-Konzentrationen, im Gegensatz zu den zahlreichen Informationen über Nährstoff-Mangel. Die Informationen betreffen meist toxische Symptome, die bei hohen Bor-Konzentrationen auftreten, ohne Berücksichtigung der ihnen zugrunde liegenden physiologischen Veränderungen. Es ist wahrscheinlich, daß bei toxischen Konzentrationen von Nährstoffen [außer ihren untereinander bestehenden antagonistischen Verhältnissen, die ihre Aufnahme regeln (Swietlik, 1995; Goldbach *et al.*, 2000)] zusätzlich die Synthese von einem oder mehreren Hormonen gehemmt wird.

Dadurch ändert sich die ganze Physiologie der Pflanze zugunsten anderer Hormone. So verursachen z.B. nach den hier vorgelegten Befunden hohe Bor-Konzentrationen solche Veränderungen, so daß der IES-Gehalt durch IES-Oxidase verringert wird, während im Gegensatz dazu geringere Bor-Konzentrationen einen entgegengesetzten Einfluß auf den IES-Gehalt, also eine Erhöhung, verursachen.

### **5.3 Einfluß von Bor und Saccharose auf das Wachstum von Pflanzen aus in vitro-Samenkulturen**

Nach den vorliegenden Ergebnissen können Saccharose und Bor unabhängig von einander alle gemessenen Wachstumsfaktoren beeinflussen, wobei auch signifikante Wechselwirkungen entstehen können. Im Hinblick auf die geringe Blattanzahl kann bei der Variante (-) Bor (-) Saccharose, verglichen mit (+)Bor (-) Saccharose, Bor der limitierende Faktor sein. Das kann bedeuten, daß Bor entweder direkt oder indirekt am Metabolismus der Saccharose beteiligt ist. Es wurde auch von Dell und Huang (1997) berichtet, daß ein gehemmtes Blattwachstum durch Bormangel indirekt die photosynthetische Kapazität der Pflanzen verringert, während die Funktion von Bor auf die Photosynthese in Frage gestellt wird. Es ist auch möglich, daß der Nährstoff- oder Zuckertransport durch eine Erhöhung von Cytokininen durch Bor (Mengel und Kirkby 1987), welches einen mobilisierenden Einfluß auf Nährstoffe hat, beeinflußt wird.

Die Interpretation dieser Untersuchungen sind nicht leicht darzustellen, da die Saccharose einerseits im Nährmedium benutzt wurde, welche durch die Wurzeln aufgenommen und acropetal transportiert wird. Andererseits sind die Blätter photosynthetisch aktiv, bilden unter Lichtbedingungen Kohlenhydrate, welche durch das Phloem basipetal transportiert werden.

Bei der Bor-Bestimmung wurde deutlich erkennbar, daß die Samen an sich eine gewisse Menge an Bor beinhalten, die nach der Keimung in andere Organe transportiert wird. Aus diesem Grunde sind die beiden Faktoren komplex zu interpretieren.

Wie bereits von Neumann und Raafat (1973), Kumar et al. (1984), Bender et al. (1987), Groß et al. (1993) berichtet, wurde auch in der hier vorgelegten Untersuchung gefunden, daß die Zugabe von Saccharose eine Hemmung der Chlorophyllsynthese verursacht.

Da ein hoher Anthozyan-Gehalt ein Zeichen für Zuckerüberschuß ist (Zhong und Yoshida, 1995; Ichimura, 1998), wäre zu vermuten, daß bei der Variante (+)Bor (+)Sacch. viel Saccharose aufgenommen und gespeichert wurde. Bei (-)Bor (+) Sacch. wurde vermutlich die Aufnahme von Saccharose und deren Akkumulation geringer. Vergleicht man die Daten der Varianten, bei denen keine Saccharose zugegeben wurde, mit denen, die Saccharose erhielten, kommt man zu unterschiedlichen Ergebnissen, zumal sich die Anthozyansynthese in Wurzeln durch eine Bor-Zugabe vermindert. Die Variante (+)B (-)Sacch. zeigt im Vergleich mit (-)B (-)Sacch. eine geringere Anthozyan-Konzentration in der Wurzel. Es könnte daher angenommen werden, daß bei der Variante (+)Bor (-)Saccharose, die in den Blättern hergestellten Kohlenhydrate nicht zu den Wurzeln transportiert wurden, eine Vermutung, die in weiteren Untersuchungen zu prüfen wäre. Es muß auch erwähnt werden, daß bei diesem Versuch die Wurzeln auch selbst Chlorophyll enthalten haben, was zu einer Beeinflussung des Ergebnisses beigetragen haben könnte.

#### **5.4 Einfluß von Bor während der Induktionsphase**

Petiolen-Kulturen in  $B5^+$ -Nährmedium mit verschiedenen Bor-Konzentrationen haben in allen Fällen in  $B5^-$  somatische Embryonen gebildet. Wie in Tab. 8 bei 0,25 ppm Bor und in Tab. 6.1.1 bei Variante 0 ppm Bor festgestellt werden kann, kann eine somatische Embryogenese mit sehr geringer Bor-Konzentration induziert werden. Somit können keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich der Bor-Konzentration bei der Induktion der somatischen Embryogenese festgestellt werden. Es wäre zu vermuten, daß Bor entweder während der Induktionsphase nicht notwendig oder für den Ablauf der Induktionsphase nur in sehr geringer Menge ausreichend ist. Wie bereits Goldbach (1986) berichtete, kann es bei der Arbeit mit Bor zu einer Bor-Kontaminierung kommen. Nach seiner Auffassung besteht bei allen Versuchen mit Bor eine immer wieder auftretende Schwierigkeit, daß, um die normalen Stoffwechselfunktionen beizubehalten, nur eine sehr geringe Bor-Konzentration notwendig ist. Eine Bor-Konzentration von etwa  $10^{-8}$  M oder weniger ist für den normalen pflanzlichen Stoffwechsel ausreichend. Es ist auch zu beachten, daß, wenn kein Bor in der Nährlösung verwendet wurde, mit einer tatsächlichen Bor-Konzentration von etwa  $10^{-9}$  M gerechnet werden muß (Goldbach, 1987). Anhand der eigenen Ergebnisse bezüglich der Bor-Analyse kann davon

ausgegangen werden, daß, nachdem die Petiolen-Kulturen mehrmals in Nährlösung ohne Bor-Zugabe umgesetzt wurden, es weiterhin noch eine sehr geringe Menge an Bor in den Explantaten gibt, die vermutlich aus den Explantaten oder aus den zum Ansatz des Nährmediums verwendeten Chemikalien stammen könnte. Da nicht auszuschließen ist, daß Bor auch aus Laborglas abgegeben wird, wurden alle Versuche mit Ausnahme des ersten Versuches in Polycarbon-Kolben durchgeführt.

Weil durch Bor Wechselwirkungen mit den Phytohormonen gezeigt werden konnten (Behrendt, 1994), kann angenommen werden, daß die Bor-Funktion während der Induktionsphase durch andere dem Nährmedium beigemischte Stoffe, z.B. Pflanzenhormone, ersetzt wird. Daraufhin wurden weitere Versuche durchgeführt, um festzustellen, ob und in welcher Form sich Bor und unterschiedliche Wachstumsregulatoren gegenseitig beeinflussen und eventuell ersetzen können. Üblicherweise wird die somatische Embryogenese durch 2,4-D-Zusatz zum Kulturmedium induziert. Wie jedoch den Ergebnissen in der Tabelle 7 zu entnehmen ist, wird die Embryonenzahl auch bei Bormangel im Vergleich zu den Varianten mit Bor leicht erhöht. Bormangel könnte demnach, ähnlich wie ein 2,4-D-Zusatz, die Induktion der somatischen Embryogenese auslösen, woraus auf eine Erhöhung der endogenen Auxin-Konzentration bei Bor-Mangel zu schließen wäre.

Weiterhin weisen die Varianten mit Borzusatz und jene, die statt Bor Kinetin appliziert bekamen, eine Verminderung der Anzahl von Embryonen auf. Deshalb ist zu vermuten, daß eventuell durch Bor die endogene Kinetinkonzentration erhöht wird, oder Kinetin einen ähnlichen Einfluß wie Bor hat. Wagner und Michael (1971) haben gefunden, daß sich bei Bormangel die Synthese und der Export von Cytokininen vermindert. Außerdem bemerkten Saftner und Wyse (1984), daß Bor eine starke Erhöhung im Cytokinin-Gehalt in den Wurzeln von Zuckerrüben verursachte.

Die erwähnte Reduzierung der Embryonenanzahl durch Zugabe von Kinetin während der Induktionsphase ist wesentlich stärker als durch Bor. Die gleichzeitige Zugabe von 2,4-D und Kinetin verursacht eine stärkere Hemmung oder Verschiebung der Embryogenese. Eine mögliche Erklärung bieten Bender und Neumann (1978): Kulturen mit Karottenwurzelexplantaten bilden mit exogenen Phytoregulatoren Ethylen. Die gleichzeitige Verwendung von Auxin und Cytokininen erhöht die Ethylensynthese bei Karottenwurzeln in Gewebekulturen. Diese Erhöhung ist so stark, daß sie eine inhibitorische Wirkung ausübt. Kinetin allein hat einen negativen Einfluß auf die Induktionsphase, jedoch erweist sich 2,4-D während der Induktionsphase als notwendige Voraussetzung für die somatische Embryogenese. Anbazhagan und Ganapati (1999)



haben ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von 2,4-D und Kinetin für die somatische Embryogenese bei *Cajanus cajan* dokumentiert.

Petiolen, die während der Induktionsphase kein 2,4-D und kein Kinetin bekommen hatten, bildeten nur Adventivwurzeln (Tab. 6.2). Die Anzahl der Adventivwurzeln zeigte eine negative Korrelation zur Bor-Konzentration. Dieses Phänomen ähnelt der Wirkung von Kinetin, weil die Varianten, die während der Induktionsphase kein 2,4-D sondern Kinetin bekamen, ebenso keine Adventivwurzeln bildeten. Dies sind typische Anzeichen von Störungen im endogenen Hormongleichgewicht. Die Veränderung geschieht durch Borgaben und bewirkt besonders eine endogene Auxinerhöhung. Wie ist diese Wirkung zu erklären?

Man kann sich vorstellen, daß bis zu einer bestimmten Auxinkonzentration die Organogenese (Adventivwurzelbildung) und bei einer höheren Konzentration die Embryogenese induziert wird. Bei der Variante, die kein Bor und kein 2,4-D während der Induktionsphase erhielt, wurde immerhin eine sehr geringe Anzahl von Embryonen gebildet. Das könnte diese Hypothese unterstützen. Auch Neumann (1999) konstatiert, daß der endogene IES-Gehalt bei Karotten-Petiolen und Explantaten während der somatischen Embryogenese gesteigert ist, was jedoch nicht ausreichend für das Wachstum bzw. zur Induktion von somatischen Embryonen ist.

Weiterhin wurde bei den vorliegenden Untersuchungen beobachtet, daß die Anzahl der Embryonen bei der Variante, die während der Induktions- und Realisierungsphase kein Bor erhielt, höher war. Dies könnte so interpretiert werden, daß eine schnelle und kurze Erhöhung von endogenem Auxin durch Bormangel in Zusammenhang mit 2,4-D während der Induktionsphase verursacht wurde. Andererseits könnte mit dem übrig gebliebenen 2,4-D zu Beginn der Realisierungsphase (Meijer *et al.*, 1999) während der kurzen Zeit zwischen dem Ende der Induktionsphase und vor dem Anfang der somatischen Embryodifferenzierung eine Steigerung der Embryonenanzahl verursacht worden sein (Nachinduktion). Bender und Neumann (1978) haben gezeigt, daß im Nährmedium verwendete IES während der ersten 24 Stunden Kultur abgebaut wird. Danach synthetisieren die Explantate selbst IES. Das könnte vielleicht diese Hypothese unterstreichen. Es könnte auch sein, daß Bormangel den Saccharosetransport im Gewebe hemmt. Kohlenbach (1978) hat deutlich gemacht, daß während der Subkultur bei Saccharoseabwesenheit in der Nährlösung eine Steigerung der Embryonenanzahl erreicht wird.

Bei der Induktion der somatischen Embryogenese kann ABA indirekt über die Stärke-Akkumulation in den embryogenen Zellen durch Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität involviert sein (Rajasekaran et al., 1987). Wie Dunlap und Binzel (1996) berichteten, verursacht ein bei Stress erhöhter ABA-Gehalt eine Verminderung im IES-Gehalt bei Tomatenpflanzen. Daß Stress (bei der Variante ohne Bor) und die dadurch bedingte Erhöhung des ABA-Gehalts während der Induktionsphase und am Anfang der Realisierungsphase, bevor die embryonalen Zellen differenziert werden, eine Steigerung der Embryonenanzahl verursacht, ist ebenso möglich wie der oben erwähnte Einfluß von Kältebehandlung während der Induktionsphase bei *Eschscholzia californica* B.M., die auch eine Steigerung der Embryonenanzahl verursacht hat (Kohlenbach, 1978). Eine Hormon-Konzentrations- Differenz mit hohem IES- und ABA-Gehalt bei embryogenen -und niedrigen bei nicht embryogenen Blattsegmenten, stellten Rajasekaran et al. (1987) bei *Pennisetum purpureum* fest. Nach 10-tägiger Kultur weist der von diesen Blattexplantaten gebildete embryogene Kallus einen um 5-20 fach höheren Gehalt an IES auf als der nicht-embryogene Kallus. Der ABA-Gehalt ist um das 3-4 fache erhöht. Dagegen zeigt der nicht-embryogene Kallus eine um den Faktor 2,5 höhere Konzentration an Cytokininen. Es wurde auch berichtet, daß endogenes Äthylen, das u.a. während Stress induziert wird, nicht notwendig für die Induzierung der somatischen Embryogenese bei *Medicago sativa* ist. Jedoch ist endogenes Äthylen für die Embryoreifung während der Realisierungsphase erforderlich (Kepczynski, 1992). Es wurde auch dargestellt, daß die Anzahl von Embryonen in einem positiven Zusammenhang steht mit dem Alter der Explantate (Kohlenbach, 1978). Die Kenntnis, daß die Äthylensynthese sich u.a. auch mit dem Alter des Gewebes erhöht, könnte vermuten lassen, daß die These, Äthylen sei für die Induktion der somatischen Embryogenese nicht notwendig, nicht stichhaltig ist. Bender und Neumann haben im Jahre 1978 berichtet, daß eine endogene Äthylensynthese das Wachstum von Explantaten beeinflussen kann und somit die Induktion von somatischen Embryonen verändert. Deshalb ist es auch möglich, daß bei 0 ppm Bor eine durch Stress verursachte Erhöhung des Äthylen-Gehaltes eine Erhöhung der Embryoanzahl verursacht. Nach Untersuchungen von Bender und Neumann (1978), Grieb *et al.* (1997) und Imani *et al.* (1998) verändern sich endogene Hormone (insbesondere Auxine) hauptsächlich während der ersten Kulturtage oder sogar mit der Tageszeit (Paasch, 1994, Paasch *et al.*, 1997). Der Tatbestand, daß Auxin eine notwendige Voraussetzung für die Induktion der somatischen Embryogenese ist und der Bericht von Bender und Neumann (1978), daß

der Einfluß von Auxin eine Steigerung des Wachstums von Kulturen während der ersten Tage (sogar schon während des Kulturanfangs) bis hin zum 28. Tag beeinflussen kann, sowie das Verhältnis und der Einfluß, welches Auxin auf andere Phytohormone [z.B. Äthylensynthese (Kevers *et al.*, 1996)] hat, weisen auf einen komplexen Zusammenhang zwischen den Faktoren hin, die die Induktion und Realisierung der somatischen Embryogenese beeinflussen. Neumann *et al.* (1978) berichtet, daß es methodisch oft recht schwierig ist, bei der Verwendung ganzer Pflanzen oder selbst einzelner Organe als Versuchssystem bzw. als Gewebekulturen die Bedeutung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für die die Organe der höheren Pflanze aufbauenden Zellen zu erfassen.

Bei diesem Versuch wurden fast in jedem Fall die Explantate, die zur Wirkung von verschiedenen Bor-Konzentrationen in der Realisierungsphase zur somatischen Embryogenese verwendet wurden, während der Induktionsphase in B<sup>5+</sup>-Nährlösungen mit 0 ppm Bor angesetzt. Deshalb waren diese Explantate während der Induktionsphase und in einigen Fällen im Laufe der Realisierungsphase unter Bormangel einem Stress ausgesetzt, der die Vermehrung von Zellen hemmt.

### **5.5 Einfluß von Bor während der Realisierungsphase**

Bei den Versuchen mit verschiedenen Bor-Konzentrationen wurden in diesen Untersuchungen während der Realisierungsphase verschiedene Embryonalstadien sichtbar, d.h., daß bei verschiedenen Bor-Konzentrationen bis zur Differenzierungsphase wenig Unterschiede festzustellen sind. Die geringen Unterschiede (z.B. die Erhöhung der Anzahl an somatischen Embryonen bei Kulturen in Nährlösungen mit 0 ppm Bor) sind dadurch zu erklären, daß bei einer Erhöhung der Bor-Konzentration die Anzahl der Torpedo- und der reifen Embryonen ansteigt, und im Gegensatz zu einer geringen Bor-Konzentration die Anzahl der globulär- und herzförmigen Embryonen ansteigt. Die Realisierungsphase wird aber auch durch Bormangel zeitlich verschoben. Behrendt und Zoglauer (1996) berichten, daß in einer Nährlösung mit weniger als 1mM Bor die Entwicklung von Embryosuspensoren bei *Larix decidua* gehemmt wird, jedoch ohne Verlust der Embryonalkompetenz der Zellkolonien. Eine Bor-Erhöhung über 1mM fördert die Entwicklung von Embryosuspensoren mit einer höheren Geschwindigkeit.

Es gibt einen starken Bor-Einfluß während der Realisierung der Embryogenese bzw. während der Entwicklung der Embryonalstadien, welcher im Laufe der Zeit zunimmt,

d.h., daß weiter entwickelte somatische Embryonen sensibler auf verschiedene Bor-Konzentrationen reagieren. Deshalb zeigt sich die Hauptwirkung von Bor während der Realisierungsphase nach der Differenzierung der Embryonen. Wenn die Karotten-Petiolen oder Suspensionen in den Nährlösungen mit hohen Bor-Konzentrationen inkubiert werden, wachsen die Cotyledonen stark. Bei Bormangel zeigten nur die Wurzeln der Embryonen ein gutes Wachstum. Dieser Wachstumsvorgang gleicht dem der adventiven Wurzelbildung während eines Bormangels. Dies sollte auf eine Veränderung des endogenen Hormongleichgewichts zurückzuführen sein, d.h. also, daß eine geringe Bor-Konzentration eine Steigerung der Auxin-Konzentration zur Folge hat und bei hohen Bor-Konzentrationen der Auxin-Gehalt relativ geringer ist. Durch Bormangel wird bei intakten Pflanzen das Wurzelwachstum gehemmt, was die Folge einer sehr hohen IES-Konzentration im Verhältnis zur Cytokinin-Konzentration ist. Daraus folgt, daß in intakten Pflanzen die Auxin-Konzentration unverhältnismäßig höher ist als die der anderen Pflanzenhormone und die Wurzel damit die physiologische Toleranzschwelle gegen Auxin überschreitet.

Blasser *et al.* (1989) berichten, daß Bor bei der Netto-Protonenausscheidung und bei der Protonenerhöhung bei *Elodea densa* und *Helianthus annuus* sowie bei Suspensionkulturen von *Daucus carota* einen Einfluß hat und stark von einer Auxin-Abwesenheit abhängig ist. Außerdem beeinflusst Bor die Enzyme Peroxidase/IES-Oxidase und reguliert eventuell die zelluläre Auxinverteilung. Vermutlich reguliert Bor auch den Einfluß von Auxin. Wagner und Michael (1971) berichteten, daß durch Bormangel der Blattstoffwechsel und die Zusammensetzung von Blättern indirekt durch die in der Wurzelspitze syntetisierten Cytokinine beeinflusst wird. Goldbach und Amberger (1985) berichteten, daß bei *Daucus carota*-Zellsuspensionskulturen nur geringe Veränderungen in der Konzentration von Zellwand-Polysacchariden durch Bormangel verursacht wurden, so daß Bormangel keine Beeinflussung der Zellwand-Zusammensetzung haben sollte. So könnte wahrscheinlich die Bor-Funktion bei der somatischen Embryogenese einen Einfluß auf endogene Hormone haben, und andere Funktionen, die dem Bor zugeschrieben werden, wurden hier durch den chemisch-physikalischen Zustand des Nährmediums beeinflusst, wie die Untersuchung von Cousson und Tran Thanh Van (1981) zeigte. Es wurde berichtet, daß der chemisch-physikalische Zustand des Kulturmediums (fest oder flüssig) ein entscheidender Faktor ist, und die Ergebnisse von Versuchen ändern kann. Einige der Bor-Funktionen könnten indirekte Einflüsse von endogenen Hormonen sein, die selbst unter Bor-Einfluß sind (Blaser *et al.*, 1989).

Durch die Verwendung von hohen Bor-Konzentrationen während der Realisierungsphase wurde hier eine starke Senkung der Embryonenanzahl beobachtet. Diese Verminderung ist immer durch eine morphologische Veränderung gekennzeichnet (Tab. 14.1 und 16.1), d.h., daß sich die Anzahl der entwickelten Embryonen bis 10 ppm Bor steigert und danach die toxische Bor-Grenze beginnt; bzw. bei höheren Bor-Konzentrationen (>10 ppm) eine proportionale Senkung der Embryonenanzahl beobachtbar ist, wobei sich das Wurzelwachstum von der niedrigsten Bor-Applikation an vermindert. Dieses Phänomen könnte so interpretiert werden, daß der oder die Faktoren, die einen negativen Einfluß auf das Wurzelwachstum haben, bei höheren Bor-Konzentrationen durch einen ähnlichen physiologischen Effekt die Differenzierungsphase beeinflussen können, d.h., daß es hier auch eine Gleichgewichtsänderung zwischen den Faktoren bzw. den Pflanzenhormonen gibt, die die Differenzierung von embryogenen Zellen beeinflussen.

Das Embryonendurchschnittsgewicht ist bei niedrigen und hohen Bor-Konzentrationen bis 120 ppm Bor (trotz Toxizität und Verminderung der Embryonenanzahl) ungefähr gleich. So ist anzunehmen, daß hohe Bor-Konzentrationen nur den physiologischen Zustand beeinflussen, welcher notwendig ist für die Initiierung der Differenzierung von somatischen Embryonen; weiter beeinflußt sie die Morphologie der Embryonen. Deshalb könnte man die Bor-Toxizität auch als eine Veränderung des endogenen Hormonengleichgewichts bezeichnen. Vergleicht man die somatische Embryogenese mit dem Übergang vegetativer Knospen von intakten Pflanzen in generative Knospen, so ist zu beobachten, daß nach Induzierung der generativen Knospen nur diejenigen sich differenzieren, die einen geeigneten physiologischen Zustand aufweisen, die also über ein an die Umweltgegebenheiten angepaßtes endogenes Hormonsystem verfügen. Andernfalls bleibt das induzierte Gewebe im Ruhestand.

## 5.6 Einfluß von Bor auf das Wachstum von Adventivwurzeln in Karottenpetiolen

Von vielen Autoren (z.B. Elmsheuser et al., 1978; Percival and Gerritsen, 1998; Ludvova und Ostrolucka, 1998) wird berichtet, daß bei relativ höheren Auxingehalten eine Wurzelbildung einsetzt. Die Ergebnisse von Grieb *et al.* (1997) und Imani *et al.* (1998) zeigen, wie sich die Konzentration verschiedener Phytohormone (wie z.B. ABA, IES und verschiedene Cytokinine) während der Auslösung der somatischen Embryogenese in Petiolenexplantate der Karotte verändern, so daß bei niedrigem Cytokininkonzentrationsniveau nach sechs Tagen ein Maximum der IES-Konzentration in der Kultur festgestellt werden kann. Außerdem wird durch eine Abnahme der IES-Konzentration in den nächsten Kulturtagen und einen Anstieg der Cytokininkonzentration das Verhältnis der beiden Hormone zueinander verschoben. Geht man von einer hohen ABA-Konzentration bei Kulturbeginn aus, so wird diese während des Kulturverlaufs kontinuierlich reduziert. Da die vorliegenden Ergebnisse eine unterschiedliche Bildung von Adventivwurzeln bei Petiolenkulturen von *Daucus carota* unter dem Einfluß steigender Bor-Gaben gezeigt haben, ist anzunehmen, daß durch Bor-Applikation das endogene Hormonsystem gestört wird.

Petiolen, die in NL-Nährlösung mit verschiedenen Bor-Konzentrationen kultiviert wurden, haben nur adventive Wurzeln gebildet. Die Anzahl der adventiven Wurzeln und die anderen Wachstumsmerkmale weisen ab 0 ppm bis 5 ppm Bor beinahe die gleichen Werte auf, bei höheren Bor-Konzentrationen jedoch verringern sie sich. Wenn die Petiolen direkt in einer B<sup>5-</sup>-Nährlösung mit verschiedenen Bor-Konzentrationen kultiviert werden, beginnt die Abnahme der Zahl an adventiven Wurzeln bereits ab 0,5 ppm Bor. Daher ist zu vermuten, daß die Konzentration an endogenem Auxin in B<sup>5-</sup> bis 0,5 ppm Bor sich so erhöht hatte, daß die notwendige IES-Konzentration zur Bildung adventiver Wurzeln erreicht wird. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen in B<sup>5-</sup>-Medium steht andererseits der Befund, daß die Adventivwurzel-Bildung in NL-Medium mit exogen applizierter IES bis zu 5ppm Bor konstant auf hohem Niveau abläuft und erst danach abfällt. Dies könnte vermutlich darauf beruhen, daß zuzätzlich zur exogenen IES endogen synthetisierte IES einen synergistischen Einfluß bei steigender Bor-Applikation ausübt. Andererseits wäre es auch möglich, daß die Funktion der IES-Oxidase in beiden Nährmedien unter dem Einfluß steigender Bor-Konzentrationen verändert ist und damit unterschiedlich hohe endogene IES-Gehalte vorliegen, die zu dem beobachteten Unterschied in der Adventivwurzel-Bildung beigetragen haben. Bei höheren Bor-Konzentrationen über 0,5 ppm Bor in B<sup>5-</sup>-Medium bzw. über 5 ppm Bor in

NL-Medium mit exogener IES wurden offenbar die endogenen IES-Gehalte kontinuierlich so weit vermindert, daß die Adventivwurzel-Bildung zunehmend geringer wurde. Wie auch die Kultur von *Catasetum* (Orchidaceae) in einem hormonfreien Medium gezeigt hat (Peres und Kerbaudy, 1999), wird das Sproßwachstum auf Kosten des Wurzelwachstums gefördert, wenn sich der endogene Auxingehalt zugunsten des Cytokiningehaltes vermindert.

Zusammenfassend kann somit geschlossen werden, daß Bor auf die somatische Embryogenese durch einen Eingriff in das Gleichgewicht des Hormonsystems bei Karotten-Petiolenkulturen wirkt.

Kohlenhydrate im Gewebe sind ein wichtiger Faktor für die Bildung adventiver Wurzeln (Kristiansen *et al.*, 1999). Aufgrund des vorliegenden Ergebnisses, daß bei der Verwendung einer sehr geringen Bor-Konzentration adventive Wurzeln gebildet wurden, ist zu folgern, daß die Aufnahme und der Transport von Zucker im Gewebe unter Bormangel nicht beeinflusst wurde. Neumann und de Garcia (1974) berichteten, daß während der somatischen Embryogenese in Karotten die Förderung der adventiven Wurzelbildung nur durch Verwendung sehr hoher Saccharosekonzentrationen möglich war. Bei vielen Pflanzenfamilien besteht in Gewebekulturen ein Zusammenhang zwischen einer Polysaccharidanreicherung und einer Organogenese (von Arnold, 1987). Dies bestätigt weiterhin, daß Bormangel keine Wirkung auf den Saccharosetransport zu den Petiolenzellen hat.

### **5.7 Die Gehalte an Phytohormonen während der Induktions- bzw. Vermehrungsphase**

Die Ergebnisse der Hormonanalyse der Petiolen zeigen, daß sich mit Erhöhung der Bor-Konzentration die Gehalte der endogenen IES verringern. Bei der Variante 0 ppm Bor wurden trotz des niedrigen endogenen IES-Gehalts mehrere Embryonen gebildet. Die Ergebnisse der Bestimmung von endogenen Hormonen bei Mais zeigten wie die Explantate, die ein hohes embryogenes Potential besitzen, auch eine relativ niedrigere Konzentration von Auxin und Cytokininen, aber eine hohe Konzentration von ABA (Dolgikh *et al.*, 1999).

Die IES-Bildung bei Zellsuspensionen (Vermehrungsphase) wies nach vierzehn Tagen ebenfalls ein ähnliches Verhalten im Hinblick auf die Konzentration von endogener IES durch die Zugabe verschiedener Bor-Mengen auf. Dies beruht

vermutlich darauf, daß die Senkung des IES-Gehaltes durch Bor verursacht ist. Anhand der eigenen Beobachtungen wird der IES-Gehalt nicht nur durch Bor beeinflusst, sondern es besteht auch eine negative Korrelation zwischen dem IES- und dem ABA-Gehalt. Gleichzeitig besteht auch zwischen dem ABA-Gehalt und der Bor-Applikation ein negativer Zusammenhang.

Die Cytokinin-Konzentrationen zeigten während der Induktionsphase eine ziemlich geringe positive Abhängigkeit von der Bor-Konzentration. Bei den Untersuchungen von Petiolen und Suspensionskulturen zeigten Cytokinine ein besonderes Verhältnis zu ABA. Bei niedriger ABA-Konzentration waren die Cytokinine in hohen Mengen nachzuweisen. Bei einer Erhöhung der ABA-Konzentration zeigten die Cytokinine eine negative Korrelation mit ABA. Daher könnte auf diesem Wege die Induktion der somatischen Embryogenese beeinflusst werden.

## **5.8 Die Gehalte an Phytohormonen während der Realisierungsphase**

Das Verhalten der IES-Konzentration während der Realisierungsphase ist ähnlich wie ihre Veränderung während der Induktionsphase, während der Realisierungsphase liegt aber eine höhere IES-Konzentration vor. Bor bewirkt eine Senkung der IES-Konzentration, ähnlich wie bei der Induktionsphase. Die Morphologie der Embryonen bei 0 ppm und 0,1 ppm Bor waren immerhin ähnlich, bzw. bei beiden Konzentrationen gab es ein starkes Wurzelwachstum mit geringem Wachstum von Hypocotylen. Deshalb muß man bei dem Einfluß von Bor auf die somatische Embryogenese und auf die Embryomorphologie nicht nur die IES-Konzentration beachten, sondern es spielt vielmehr das IES-Verhältnis mit anderen Pflanzenhormonen eine entscheidende Rolle. So verursachte z.B. nicht nur IES alleine, sondern auch sein Verhältnis zu Kinetin, daß bei niedriger Bor-Konzentration das Wurzelwachstum und bei hoher Bor-Konzentration das Kotyledonwachstum gefördert wird.

Der Gehalt von Cytokinin zeigte während der Realisierungsphase im Vergleich zur Induktionsphase eine höhere Korrelation zum ABA-Gehalt. Es ist anzunehmen, daß 2,4-D einen Einfluß auf das antagonistische Verhältnis zwischen Cytokinin und ABA ausübt.



Die ABA kann bei B5<sup>-</sup>-Medium im Vergleich mit der Induktionsphase höhere Konzentrationen und stärkere Veränderungen haben. Deshalb kann die These aufgestellt werden, daß 2,4-D auch die ABA-Synthese direkt oder indirekt beeinflussen könnte. Es existiert hier eine negative Korrelation zwischen ABA und IES sowie eine negative Beziehung zwischen Bor und ABA. Deshalb wurde der IES-Gehalt insbesondere während der Realisierungsphase durch zwei negative Faktoren (Bor und ABA) beeinflusst. Wie Dunlap und Binzel (1996) berichteten, verursacht ein bei Stress erhöhter ABA-Gehalt eine Verminderung im IES-Gehalt bei Tomatenpflanzen.

Der Vergleich zwischen Pflanzenhormonen während der Induktions- und Realisierungsphase zeigt, daß durch die Anwesenheit von 2,4-D die Gehalte an Cytokininen, ABA und Auxin verringert werden. Dieser Einfluß von 2,4-D auf endogenes Auxin kann anhand der Arbeit von Kevers *et al.* (1996) nachvollzogen werden. Er wies nach, daß Zuckerrüben callus auf synthetisches Auxin (2,4-D) reagiert und dadurch eine Verminderung des Cytokinin-Gehalts (IP, Z und ZR) verursacht wird. Ribnicky *et al.* (1996) berichteten, daß exogenes Auxin für das Wachstum von Hypocotylkulturen von *Daucus carota*-Callus notwendig ist, und daß besonders 2,4-D, das in freier Form akkumuliert wird, die endogene IES-Biosynthese nicht verändert hat, obwohl es einen wichtigen Einfluß auf die Konzentration von endogenen IES hat. Die Verwendung von NAA bei aus Petiolen hergestelltem Callus von *Actinidia deliciosa* (Kiwifrucht) zeigte, daß ein Teil von NAA mit Zucker und Asparaginsäure schnell konjugierte. Der andere Teil blieb konstant, während sich die endogene IES nach der zwölften Stunde im Gewebe bis zum Ende des Experiments verminderte (Centeno *et al.*, 1999). Nach Liu *et al.* (1996) verursachte die Verwendung von NAA bei Sojabohnen-Hypokotyl-Stecklingen eine Erhöhung des IES-Gehalts und eine Verminderung der IES-Oxidaseaktivität. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen kein entsprechendes hormonelles Verhalten. Der IES-Gehalt und die IES-Oxidaseaktivität werden sogar durch 2,4-D unterdrückt. Der Bericht von Liu *et al.* (1996) macht unverständlicherweise keine Angaben dazu, daß sich durch eine IES-Erhöhung die IES-Oxidaseaktivität erhöht.

## 5.9 Boreinfluss auf die IES-Oxidase

Eine geringfügige Erhöhung der IES-Oxidaseaktivität in Karottenpetiolen in B<sup>5+</sup>-Nährlösung mit verschiedenen Bor-Konzentrationen zeigte, daß Bor in drei Wochen alten Kulturen in geringer Menge die IES-Oxidaseaktivität bei 2,4-D Anwesenheit erhöhen kann ( $r = 0.42$ ). Im Vergleich dazu ist aus Versuchen mit gleicher Kulturdauer ohne 2,4-D abzuleiten, daß unter dem Einfluß einer Bor-Steigerung die IES-Oxidaseaktivität höher ist ( $r = 0.88$ ). Daher ist anzunehmen, daß 2,4-D einen hemmenden Effekt auf die IES-Oxidaseaktivität ausübt.

In Karotten-Embryonen konnte nach 8 und 20 Tagen in B<sup>5-</sup>-Medium die IES-Oxidaseaktivität durch steigende Borgaben erhöht werden. Dies wiederum steht im Einklang mit Berichten von anderen Forschern, die allerdings intakte Pflanzen untersucht haben. Der Mechanismus des Boreinflusses auf die IES-Oxidase ist bis heute noch nicht geklärt. Ob Bor für die Synthese von IES-Oxidase unentbehrlich ist, bleibt ebenfalls offen. Es besteht eine Hypothese, der zufolge die durch Bor akkumulierten phenolischen Komponenten, wie z.B. Kaffeinsäure, eine inhibitorische Wirkung auf die IES-Oxidase haben (Birnbaum *et al.*, 1977).

Ein Vergleich zwischen der IES-Oxidaseaktivität nach acht und zwanzig Tagen während der Realisierungsphase zeigt, daß die Reaktion auf die Bor-Konzentration umso deutlicher wird, je weiter die Embryonalentwicklung fortgeschritten ist. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Embryonen in Primärstadien unempfindlicher auf exogene Einflüsse reagieren.

Weiterhin war zu beobachten, daß die Aktivität der IES-Oxidase in den Explantaten bis zum 20. Kulturtag anstieg. Eine derartige Erhöhung der IES-Oxidaseaktivität bei zunehmendem Alter der Kultur wurde bereits von Kohlenbach (1978) und Goldbach u. Amberger (1986) gefunden.

Die Konzentration von IES bei B<sup>5+</sup> und B<sup>5-</sup> Varianten, die kein Bor enthielten, war niedrig, obwohl die IES-Oxidaseaktivität bei diesen Varianten bei 0 ppm Bor ebenfalls niedrig war. Es ist daher anzunehmen, daß die IES-Oxidase-Aktivität für den aktuellen endogenen IES-Gehalt nicht immer von Bedeutung ist, sondern daß auch andere Stoffwechselprozesse das hormonelle Gleichgewicht mitbeeinflussen und damit die Auslösung der somatischen Embryogenese steuern können. Damit stellt sich die Frage, für welche Prozesse im pflanzlichen Stoffwechsel Bor erforderlich ist. Krosing (1973) setzte Nukleinsäurebasen zur Nährlösung zu, aber die Nukleinsäurebasen konnten nicht die Aufgabe von Bor übernehmen. Der Einfluß von Bor auf die Nitratreduktaseaktivität

(Ruiz *et al.*, 1998) kann bei der vorliegenden Arbeit kein begrenzender Faktor gewesen sein, da in B5<sup>±</sup>- und NL-Nährlösung auch reduzierter Stickstoff benutzt wird. Deshalb ist zu vermuten, daß sich die IES-Konzentration bei der oben genannten Variante (0 ppm Bor) nicht durch eine durch Bor-Mangel verminderte Aktivität der Nitratreduktase, durch eine bei Bormangel verminderte Synthese von Nukleinsäurebasen oder eine bei Bormangel reduzierte Aktivität der IES-Oxidase vermindert, sondern andere Mechanismen, wie z.B. Stress und die Äthylen- oder ABA-Erhöhung diese Verminderung verursachen könnten. Es kann auch eine andere Hypothese aufgestellt werden, daß sich bei Varianten mit 0 ppm Bor kurz nach Kultivierungsbeginn die IES-Konzentration (bevor in Explantaten oder in der Nährlösung geringe Mengen von Bor benutzt wurden) extrem erhöht, wodurch wahrscheinlich andere IES-Kontrollmechanismen (z.B. IES-Konjugation oder Autoinhibition [Feed Back]) aktiv werden. Eine solche Autoinhibitionshypothese ist für endogene IES bei *Pisum sativum* berichtet worden (Li und Bangerth, 1999).

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Explantate, die kein Bor erhielten, schneller als andere Varianten chlorotisch und nekrotisch, jedoch blieben sie vital. Dieses Phänomen kann durch eine höhere Äthylensynthese aufgrund von Stress oder einer höheren IES-Konzentration verursacht werden. Die Gewebekultur kann man als geschlossenes System bezeichnen, in dem einige Zellen Bor ausscheiden und andere Zellen oder Embryonen wieder Bor aufnehmen. Dadurch können die Explantate mit einem niedrigen Gehalt an Bor wachsen und überleben.

### **5.10 Anthozyane und somatische Embryogenese unter Einfluß von Bor**

Durch eine Erhöhung von Bor hat der Anthozyan-Gehalt der Zellsuspension während der Vermehrungsphase und der Realisierungsphase nur eine geringfügige Steigerung gezeigt. Die Erhöhung des Anthozyanengehalts in der Realisierungsphase war aber stärker als in der Vermehrungsphase. Ozeki und Komamine (1981, 1985) berichteten jedoch im Gegensatz dazu, daß bei Suspensionskulturen von Karotten mit 2,4-D undifferenzierte Zellen kein Anthozyan synthetisieren. Nur, wenn die Zellen in eine Nährlösung ohne 2,4-D umgesetzt werden, stellen sie Anthozyane her. Der Bericht von Ozeki (1996) bestätigt nochmals, daß die Synthese von Anthozyanen durch die Verwendung von 2,4-D verringert wird. Er stellte fest, daß eine Erhöhung von Bor die hemmende Wirkung von 2,4-D auf die Aktivität von PAL (Phenylalanin-Ammonium-

Lyase) und die Aktivität von CHS (Chalconsynthase) vermindert. Es ist berichtet worden, daß die Aktivität von PAL und von CHS während der Verwendung von 2,4-D verringert wird und in dieser Weise einen negativen Einfluß auf die Synthese von Anthozyanen ausübt (Ozeki *et al.*, 1990 und Ozeki, 1996). Die Gibberellinsäure hat auch einen hemmenden Einfluß auf CHS und die Synthese von Anthozyanen (Ilan und Dougall, 1994). Es ist berichtet worden, daß Kaffeinsäure eine inhibitorische Wirkung auf die IES-Oxidase hat, und damit die Auxin-Konzentration erhöht und die Synthese von Anthozyanen reduziert wird. Baker *et al.* (1994) berichteten auf der anderen Seite, daß Kaffeinsäure, das am häufigsten vorkommende Anthozyan, [3-o-(6-o-feruoyl)-beta-D-glucopyranosyl-(1-6) -beta-D-xylopyranosyl-(1-2) -beta-D-galactopyranosylcyanidin], Suspensionskulturen wilder Karotten positiv beeinflusst. Aber es wurde auch angenommen, daß Kaffeinsäure, bevor der Verbrauch für die Anthozyanbiosynthese zustande kommt, methyliert wird (Baker *et al.*, 1994). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse stellt sich die Frage, ob es möglich ist, daß Kaffeinsäure direkt die Steigerung der IES-Konzentration und dadurch eine Abnahme der Anthozyan-Synthese und in methyliertem Zustand eine höhere Aktivität von IES-Oxidase und somit eine Förderung der Anthozyan-Synthese verursacht. Um diese Frage zu beantworten, ist eine weitere detaillierte Forschung erforderlich, um eine mögliche Verbindung zwischen der Anthocyan-Synthese, der IES-Oxidaseaktivität und der Bor-Konzentration bzw. Funktion zu erkennen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte die Induktionsphase die Synthese von Anthozyan und Chlorophyll während der Realisierungsphase beeinflussen. Es gibt keinen allgemeinen Zusammenhang zwischen Anthozyanen und dem Chlorophyll-Gehalt während der Realisierungsphase und der Anzahl von Embryonen, jedoch besteht ein Zusammenhang zwischen dem physiologischen Zustand der Induktionsphase und der Anzahl von Embryonen. Es ist möglich, daß sich durch die Zugabe von Bor der Zustand der Induktionsphase so verändert hat, daß die Synthese von Anthozyanen während der Realisierungsphase beeinflusst war.

Die Stoffwechselwege, die bereits in der Induktionsphase die Synthese von Pflanzenpigmenten in der Realisierungsphase beeinflussen können, sind möglicherweise anders als die Stoffwechselwege, die in der Induktionsphase einen Einfluß auf die Bildung und Anzahl von Embryonen haben.

Es gab während der Realisierungsphase einen positiven Zusammenhang zwischen dem Anthozyan-Gehalt und der Anzahl von Embryonen in der Kultur, die größer als 800 µm waren. Das bedeutet, die Synthese von Anthozyanen als Produkt des sekundären

Stoffwechsels ist im allgemeinen kein Zeichen der Induzierung von somatischen Embryogenesen, vielmehr zeigt sie, wie das induzierte Potential realisiert wird. Wie beobachtet wurde, brachte die Erhöhung der Bor-Konzentration während der Realisierungsphase eine Steigerung der Konzentration von Anthozyanen und der Förderung der Embryonalentwicklung mit sich. Dies bedeutet, eine relativ höhere Bor-Konzentration verursacht einen besser entwickelten Embryo, welcher eine höhere Anthozyan-Konzentration besitzt. Ozeki und Komamine (1981 und 1985) sind desgleichen der Meinung, daß es eine enge Verbindung zwischen einer Anthozyan-Synthese und dem Differenzierungsvorgang und der Embryomorphologie gibt. Ozeki berichtet davon, daß eine höhere Aktivität des Sekundärstoffwechsels von höherem Differenzierungsgrad der Kulturen begleitet wird (Ozeki, 1996). Die Untersuchungen von Ozeki und Komamine (1981 und 1985) zeigen auch, daß die Zugabe von Cytokinin eine Synthese von Anthozyanen fördert. Bei gleichzeitiger Verwendung von Cytokinin und Bor steigt ebenfalls die Anthozyan-Konzentration an. Es wird deutlich, daß die Wirkung von Cytokinin und Bor auf die Anthozyan-Synthese ähnlich sind.

In den vorliegenden Ergebnissen wurde ein enger Zusammenhang zwischen der Chlorophyll- und Anthozyan-Konzentration beobachtet. Wie Kawabata und Kusuhara (1999) konstatieren, besteht einerseits eine enge Beziehung zwischen dem Chlorophyll-Gehalt und der Kohlenhydratproduktion in photosynthetisch aktiven Organen und andererseits zwischen dem Kohlenhydratgehalt und der Anthozyan-Synthese. Somit wird der hier beobachtete Zusammenhang zwischen der Chlorophyll- und der Anthozyan-Konzentration bestätigt.

Während der somatischen Embryogenese könnte die Anthozyan-Konzentration als sekundäres Stoffwechselprodukt durch einen äußeren Faktor (wie z.B. Bor) beeinflusst werden. Durch Zugabe von Bor wird sich das Kulturwachstum beschleunigen und somit die Embryonen und Organe besser entwickeln, die Chlorophyll-Synthese wird gesteigert und damit wird schließlich die Synthese von Kohlenhydraten und von Anthozyanen zunehmen. Deshalb ist die Anthozyan-Konzentration ein indirektes Zeichen für den Entwicklungszustand von Kulturen, die photosynthetisch aktiv sind. Solche Entwicklungsvorgänge unterliegen nach Neumann (1974) einem periodischen Ablauf im Ernährungssystem von Karottengewebekulturen, welcher sich in drei Ernährungsperioden einteilen lässt (1- heterotrophe Periode, 2- mixotrophe Periode, die in Abhängigkeit von der Hormonversorgung mehr oder weniger stark ausgeprägt sind, sowie die 3- autotrophe Periode). Durch Zugabe von Bor könnte der oben erwähnte autotrophe Zustand schneller erreicht werden. Neumann et al. (1978) stellen außerdem

dar, daß "mit Kinetin kultivierte Explantate ein besser entwickeltes photosynthetisches Potential besitzen, welches Relevanz für die intensivere Ausprägung der log-Phase (der Zellteilungsaktivität dieses Versuchsgliedes [Cytokinin]) hat". In *Daucus carota* L. Zellsuspensionskulturen war in Abwesenheit von Auxin und Cytokinin die Synthese von Anthozyanen gefördert (Ozeki und Komamine, 1981). Deshalb kann jeder Faktor, der die Photosynthese bei Explantaten erhöhen kann, auch die Synthese von Anthozyanen steigern, wie z.B. die erhöhte Synthese von Cytokinin durch die Zugabe von Bor.

## 6 Zusammenfassung

Mit der Technik der Gewebekultur wurde untersucht, ob isoliertes Gewebe von Karottenpflanzen unter verschiedenen Borkonzentrationen bzw. unter Bormangelbedingungen somatische Embryonen bilden kann. Dabei wurde die Bildung von adventiven Wurzeln, die Konzentration von Phytohormonen, die Aktivität von IES-Oxidase und die Anthozyan-Konzentration als ein Produkt des sekundären Metabolismus im Verlauf der somatischen Embryogenese untersucht.

Die verschiedenen Versuchsgruppen brachten folgende Ergebnisse:

### *1) Borbestimmungen in Karottenexplantaten und in der Nährlösung sowie die Freisetzung von Bor aus Glas:*

Anhand des gemessenen Bor-Gehalts wurde ersichtlich, daß aus den verwendeten Kulturgläsern der tatsächliche Borbedarf der Kulturen abgedeckt wird. Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen, mit Ausnahme des ersten Versuchs, in Polycarbon-Kolben durchgeführt.

Die benutzten Explantate waren Petiolen-Explantate und zwei bis vier Wochen alte Wurzelexplantate. Karotten-Explantate wurden zunächst fünf Monate lang in Polycarbon-Kolben mit  $B_5^+$ -Nährlösung mit 2,4-D und 0 ppm Bor kultiviert. Dadurch wurde der Borgehalt in der Nährlösung und in den Explantaten stark reduziert, wobei aber weiterhin eine sehr geringe Menge an Bor in beiden erhalten blieb. Es bedeutet, daß Explantate von Karotten Bor in das Gewebekultur-Nährmedium abgeben können und nicht nur die Versuchgefäße (Freisetzung von Bor aus dem Glas) oder andere Kontaminationsquellen (z.B. die verwendeten Chemikalien). Dies kann unkorrekte Interpretationen während der Arbeit mit diesem Mikroelement verursachen. Zudem spielt das Nährstoffpotential der eingesetzten Explantate bei ungewisser Herkunft der hierzu verwendeten Mutterpflanzen eine Rolle.

## **2) Der Einfluß von hohen Borgaben auf das Wachstum von Keimpflanzen aus Karottensamen:**

Die Verwendung hoher Bor-Konzentrationen bei der Kultur von intakten Pflänzchen aus Karottensamen zeigte, daß verschiedene Karottenorgane eine unterschiedliche Toleranz gegenüber Bor-Toxizität aufweisen, daß z.B die Anzahl der Blätter und die Hauptwurzellänge bei hohen Borkonzentrationen unterschiedlich schnell unterdrückt werden. Die anderen Wachstumsfaktoren zeigten, daß die notwendige Konzentration von Bor für ein maximales Wachstum von Petiolen, Hypocotylen und Nebenwurzeln ca. zehn mal höher ist als für das Hauptwurzelwachstum.

Überstieg die Bor-Applikation die für optimales Wachstum erforderliche Konzentration, wurde das Wachstum der genannten Pflanzenorgane gehemmt. Dieser Effekt ist als Bor-Toxizität zu bezeichnen.

## **3) Einfluss von Bor während der Induktionsphase:**

Die in B<sup>5+</sup>-Nährmedium angezogenen Petiolen-Kulturen, denen verschiedene Borkonzentrationen beigemischt waren, haben in allen Fällen somatische Embryonen gebildet, wobei eine leichte, jedoch statistisch nicht zu sichernde Senkung durch steigende Bor-Gaben zu beobachten war.

Die gleichzeitige Anwendung von 2,4-D und Kinetin verursachte eine starke Hemmung oder zeitliche Verschiebung der Embryogenese. Kinetin allein hatte keinen Einfluß auf die Induktionsphase, während sich 2,4-D bei der Induktionsphase als notwendige Voraussetzung für die somatische Embryonenbildung erwies.

Petiolen, die während der Induktionsphase kein 2,4-D und kein Kinetin bekommen hatten, bildeten nur Adventivwurzeln. Bei der Anzahl der Adventivwurzeln zeigte sich eine negative Korrelation zur Borkonzentration. Die Varianten, die während der Induktionsphase kein 2,4-D, jedoch Kinetin bekommen hatten, bildeten keine Adventivwurzeln.

Bei der Variante, die weder 2,4-D noch Bor enthielt, wurden einige Embryonen gebildet. Das könnte ein Beleg für die Hypothese sein, daß bis zu einer gewissen



Auxinkonzentration die Rhizogenese und bei höheren Konzentrationen die Embryogenese induziert werden könnte.

Die Befunde der vorliegenden Untersuchung sind dahingehend zu interpretieren, daß Bormangelstress oder eine Erhöhung von endogenem Auxin durch Bormangel während der Induktionsphase und am Anfang der Realisierungsphase eine Steigerung der Embryonenzahl verursacht, was darauf hindeutet, daß die Anzahl der Embryonen eine hohe Abhängigkeit vom Induzierungszustand hat.

#### ***4) Einfluß von Bor während der Realisierungsphase:***

Bei den Experimenten mit verschiedenen Borkonzentrationen besteht bei kultivierten Karotten-Zellen (Petiolen, Suspensionen u.a.) während der Induktionsphase und zu Beginn der Realisierungsphase offenbar nur ein geringer Boreinfluß. Stärkere Boreinflüsse traten bei der Entwicklung der induzierten Embryonen auf. Diese Unterschiede sind dadurch zu erklären, daß bei einer Erhöhung der Borkonzentration die Anzahl der torpedoformigen und größeren Embryonen und Pflänzchen ansteigt und umgekehrt, daß bei einer geringen Borkonzentration die Anzahl der globulär- und herzförmigen Embryonen ansteigt. Offenbar kommt hier eine Entwicklungshemmung bei niedrigeren Bor-Konzentrationen in der Nährlösung zum Ausdruck. Ein starker Boreffekt ist auch bei der weiteren Entwicklung von Embryonen festzustellen. Wenn Embryonen aus kultivierten Petiolenexplantaten oder Suspensionen nach Erreichen des Torpedostadiums in Nährlösungen bei höheren Borkonzentrationen gehalten werden, ist das Cotyledonenwachstum gut, bei Bormangelbedingungen zeigen nur die Wurzeln der Embryonen ein gutes Wachstum. Dieses Wachstumsverhalten ist genauso wie die Adventivwurzelbildung auf eine Veränderung der endogenen Hormonbalance zurückzuführen, d.h. daß eine geringe Borkonzentration eine Steigerung der Auxinkonzentration zur Folge hat, und daß bei hohen Borkonzentrationen die Auxinkonzentration im Verhältnis zu anderen Phytohormonen erniedrigt sind.

**5) Die Phytohormonbestimmungen während der Induktions-, Vermehrungs- und Realisierungsphase:**

Bor verursacht eine Verringerung der IES-Konzentration. Das Verhalten der IES-Konzentration auf steigende Bor-Applikation ist während der Realisierungsphase ähnlich wie während der Induktionsphase und der Vermehrungsphase, der IES-Gehalt ist aber in der Realisierungsphase höher.

Bor hat eine negative Wirkung auf den ABA-Konzentration, ebenso wie auf den IES-Konzentration.

Während der Realisierungsphase zeigte die Cytokininkonzentration eine stärkere Korrelation zur ABA-Konzentration als in der Induktionsphase.

In B5<sup>-</sup>-Medium (- 2,4-D) ergaben sich bezüglich der ABA-Konzentration höhere Werte bzw. stärkere Veränderungen als in B5<sup>+</sup>-Medium (+ 2,4-D). Dies ist ein Hinweis darauf, daß 2,4-D auch die ABA-Synthese direkt oder indirekt bestimmt. Dies gilt auch für die ermittelte Konzentration von IES und der untersuchten Cytokinine.

**6) Boreinfluß auf die Aktivität von IES-Oxidase während der somatischen Embryogenese:**

Die Aktivität der IES-Oxidase von Zellsuspensionskulturen von *Daucus carota* L. wurde bei 2,4-D-Anwesenheit im B5<sup>+</sup>-Nährmedium während der Vermehrungsphase bei steigender Bor-Konzentration nur geringfügig erhöht. Während der Realisierungsphase in Abwesenheit von 2,4-D bewirkte dagegen eine Bor-Steigerung eine deutliche Erhöhung der IES-Oxidaseaktivität. Dabei trat mit fortschreitender Entwicklung der Embryonen vom 8. bis zum 20. Tag eine stärkere Reaktion der IES-Oxidaseaktivität auf unterschiedliche Bor-Konzentrationen in Erscheinung.

**7) Anthozyan- und Chlorophyll-Konzentrationen im Verlauf der somatischen Embryogenese:**

Ungeachtet der Bor-Wirkung ist zunächst festzustellen, daß kein Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl an somatischen Embryonen von *Daucus carota* L. und den

Gehalten an Anthozyan und Chlorophyll während der Realisierungsphase bestand. Nur die Anzahl großer Embryonen ( $>800\mu\text{m}$ ) zeigte eine positive Korrelation zum Anthozyangehalt. Diese Befunde sind dahingehend zu interpretieren, daß der Gehalt an Anthozyan, einem Produkt des sekundären Stoffwechsels, nur bei Embryonen höher ist, die über einen höheren Differenzierungsgrad und damit auch eine höhere Kohlenhydrat-Synthesekapazität verfügen.

Unter dem Einfluß von Bor wurde die Anzahl von Embryonen  $>800\mu\text{m}$  erhöht, die also weiter entwickelt waren. Es ist demnach verständlich, daß bei steigenden Bor-Gaben höhere Anthozyangehalte vorliegen.

Auch die Applikation von Cytokinin führte zu höheren Anthozyangehalten in Karottenkulturen.

Die für den Anthozyangehalt dargestellten Zusammenhänge gelten in gleicher Weise auch für den Chlorophyllgehalt der Kulturen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrol, Y. P. (1966): Boron deficiency and ribonuclease activity in plants. *Indian J. Biochem.* 3: 263-264.
- Albert, L. S. (1965): Ribonucleic acid content, boron deficiency systems, and elongation of tomato root tips. *Plant Physiol.* 40: 649-652.
- Albert, L. S. (1968): Induction and antagonism of boron-like deficiency symptoms of tomato plants by selected nitrogen bases. *Plant Physiol.* 43, S. 51-4: 15.
- Alfermann, W. und E. Rheinhard (1971): Isolierung anthocyanhaltiger und anthocyanfreier Gewebestämme von *Daucus carota*. Einfluß von Auxinen auf die Anthocyanbildung. *Experientia (Basel)* 27: 353-354.
- Ali, A. H. und B.C. Jarvis (1988): Effect of auxin and boron on nucleic acid metabolism and cell division during adventitious root regeneration. *New Phytol.* 108: 383-391.
- Ammirato, P. V. und F. C. Steward (1971): Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. *Bot. Gaz.* 132: 149-158.
- Ammirato, P. V. (1983): Embryogenesis. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. und Y. Yamada (eds): *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1. MacMillan, New York, 82-123.
- Anbazzhagan, V. R. und A. Ganapati (1999): Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 56 (3): 179-184.
- Asad, A., Bell, R. W., Dell, B. und L. Huang (1997): Development of a boron buffered solution culture system for controlled studies of plant boron nutrition. *Plant and Soil.* 188 (1): 21-32.
- Baker, D. C., Dougall, D. K., Glassgen, W. E., Johnson, S. C., Metzger, J. W., Rose, A. und H. U. Seitz (1994): Effects of supplied cinnamic acid and biosynthetic intermediates on the anthocyanins accumulated by wild carrot suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 39 (1): 79-91.
- Barneix, A. J. und H. F. Causin (1996): The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J. Plant Physiol.* 149 (3-4): 358-362.
- Behrendt, U. (1994): Entwicklungsbiologische Untersuchungen zur somatischen Embryogenese bei der Europäischen Lärche (*Larix decidua* MILL.). Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin. 125 S.

- Behrendt, U. und K. Zoglauer (1996): Boron controls suspensor development in embryogenic cultures of *Larix decidua*. *Physiologia Plantarum*. 97 (2): 321-326.
- Bender, L. und K.-H. Neumann (1977): Ethylen production and growth of carrot root tissue cultures (*Daucus carota* L.) as influenced by  $\beta$ -indole-3-acetic acid and kinetin. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 88.S. 227-234.
- Bender, L. und K.-H. Neumann (1978): Investigation on the influence of pre-culture in IAA- and Kinetin containing media on subsequent growth of cultured carrot explants. *Z.Pflanzenphysiol.* 88, 201-208.
- Bender, L., Pauler, B. und K.-H. Neumann (1987): On carbohydrate metabolism of cultured carrot root explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 8: 135-146.
- Blaser-Grill, J., Knoppik, D., Amberger, A. und H. Goldbach (1989): Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* root and  $H^+$  extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant Physiol*. 90: 280-284.
- Blaser, H. W., Marr, C. und D. Takahashi (1967): Anatomy of boron deficient *Thuja plicata*. *Am. J. Bot.* 59: 1107-1113.
- Blevins, D. G. und K. M. Lukaszewski (1994): Proposed physiologic functions of boron in plants pertinent to animal and human metabolism. *Environmental Health Perspectives*. 102 Suppl. 7: 31-33.
- Blevins, D. G. und K. M. Lukaszewski (1998): Boron in plant structure and function. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 481-500.
- Bohnsack, C. W. und L. S. Albert (1977): Early effects of boron deficiency on indoleacetic acid oxidase levels of squash root tips. *Plant Physiol*: 59, 1047-1050 .
- Bondok, M. A. (1996): The role of boron in regulating growth, yield and hormonal balance in sugar beet (*Beta vulgaris* var. *vulgaris*). *Annals Agric. Sci. Ain Shams Univ., Cairo*. 15-33.
- Bonilla, I., Mergoldvillasenor, C., Campos, M. E., Sanchez, N., Perez, H., Lopez, L., Castrejon, L., Sanchez, F. und G. I. Cassab (1997): The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxy proline/proline-rich proteins. *Plant Physiology*. 115: (4 ): 1329-1340.
- Birnbaum, E. H., Beasley, C. A. und W. M. Dugger (1974): Boron deficiency in unfertilized cotton (*Glossypium hirsutum*) ovules grown *in vitro*. *Plant Physiol*. 54: 931-935.

- Birnbaum, E. H., Dugger, W. M. und C. A. Beasley (1977): Interaction of boron with components of nucleic acid metabolism in cotton ovules cultured in vitro. *Plant Physiol.* 59: 1034-1038.
- Brandenburg, E. (1949): Wo stehen wir heute in der Borfrage? *Z. Pflanzenkrankheiten.* 56: 241.
- Brown, J. C. (1979): Role of calcium in micronutrients stresses of plant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 10, 459-472.
- Brown, P. H., Bellaloui, N., Hu, H. und A. Dandekar (1999): Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency. *Plant Physiology.* 119: 17-20.
- Brown, P. H. und H. N. Hu (1996): Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Ann. Bot.* 77:497-505.
- Brown, P. H. und H. N. Hu (1997): Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants?. *Plant and Soil.* 196 (2): 211-215.
- Brown, P. H. und H. N. Hu (1998): Phloem boron mobility in diverse plant species. *Bot. Acta,* 111:331-335.
- Bussler, W. (1964): Die Bormangelsymptome und ihre Entwicklung. *Z. Pflanzenernähr., Düngg., Bodenkunde.* 105: 113-136.
- Cakmak, I. und V. Römheld (1997): Boron deficiency induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil.* 193 (1-2): 71-83.
- Campbell, W. H. (1988): Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol Plant.* 74: 214-219.
- Campbell, T. A., Rathjen, A.J., Paul, J. G. und A. Islam (1998): Method for screening bread wheat for tolerance to boron. *Euphytica.* 100 (1-3): 131-135.
- Centeno, M. L., Fernandez, B., Feito, I und A. Rodriguez (1999): Uptake, distribution and metabolism of 1-naphthalene acetic acid and indole-3-acetic acid during callus initiation from *Actinidia deliciosa* tissues. *Journal of Plant Growth Regulation.* 18 (2): 81-88.
- Chen, C. H. und D. T. Holden (1973): Differential morphogenetic responses of carrot callus to naphthalene acetic acid, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, and tordon in vitro. *Proc. S. D. Acad. Sci.* 52: 67-71.
- Chen, Y. Z., Smagula, J. M., Litten, W. und S. Dunham (1998): Effect of boron and calcium foliar sprays on pollen germination and development, fruit set, seed development, and berry yield and quality in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait). *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 123 (4): 524-531.

- Coetzer, L. A., Robberts, P. J., Barnard, R. O. und E. Tomer (1994): Uptake and transport of boron in avocado seedlings. Yearbook- South African Avocado Growers Association. 17: 95-98.
- Cohen, M. S. und L. S. Albert (1974): Autoradiographic examination of intact boron deficient squash roots treated with tritiated thymidine. Plant Physiol. 54: 766-768.
- Cottenie, A., Verloo, M., Kiekens, L., Velghe, G. und R. Camerlynck (1982): Chemical Analysis of Plant and Soils. Laboratory of Analytical and Agrochemistry State University Ghent-Belgium.
- Cousson, A. und K. Tran Thanh Van (1981): In vitro control of de novo flower differentiation from tobacco thin cell layers cultured on a liquid medium. Physiologia Plantarum. 51: 77-84.
- Crawford, N. M. (1995): Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell. 7:859-868.
- Dahiya, S. S., Joon, M. S. und B. S. Daulta (1993): Effect of foliar application of micronutrients on yield and quality of guava (*Psidium guajava* L.) cv. L-49. Int. J. Trop. Agric. 11 (4): 284-286.
- Dave, I. C. und S. Kannan (1980): Boron deficiency and its associated enhancement of RNase activity in bean plants. Z. Pflanzenphysiol. 97, 261-264.
- Dell, B. und Malajczuk, N. (1994): Boron deficiency in eucalypt plantations in China. Canadian Journal of Forest Research Revue. 24 (12): 2409-2416.
- Dell, B. und Huang, L. B. (1997): Physiological response of plants to low boron. Plant and Soil. 193 (1-2): 103-120.
- Dixon, R. K., Garret, H. E. und G. S. Cox (1989): Boron fertilization, vesicular arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Citrus jambhiri* Lush. J. Plant Nutr. 12:687-700.
- Dolgikh, Y. I., Pustovoitova, T. N. und N. E. Zhdanova (1999): The balance of endogenous phytohormones in immature embryos of maize lines competent and incompetent to somatic embryogenesis. Russian Journal of Plant Physiology. 46(6): 754-757.
- Dougall, D. K., Johnson, J. M. und G. H. Whitten (1980): A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. Planta. 149: 292-297.
- Dugger, W. M., Humphreys, T. E. und B. Calhoun (1957): The influence of boron on starch phosphorylase and its significance in translocations of sugars in plants. Plant Physiol. 32: 364-370.

- Dugger, W. M. (1983): Boron in plant metabolism. In 'Encyclopedia of plant physiology, new series (A. Läuchli and R. L. Bielecki, eds.), Vol. 15B, pp. 626-650. Springer-Verlag, Berlin.
- Dugger, W. M. und R. L. Palmer (1985): Effect of boron on the incorporation of glucose by cotton fibers grown in vitro. *J. Plant Nutr.* 8: 311-325.
- Dunlap, J. R. und M. L. Binzel (1996): NaCl reduces indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiology.* 112(1):379-384.
- Dyar, I. I. und K. L. Webb (1961): A relationship between boron and auxin in C-14-translocation in bean plants. *Plant Physiol.* 36: 672-676.
- Elmsheuser, C. Lein, C. und K.-H. Neumann (1978): Untersuchungen über Beziehungen zwischen Hormongehalt und Wachstumsleistung von Explantaten verschiedener *Brassica*-Arten in Gewebekultur. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 88. 25-31.
- El-Sharkawi, H. M., Farghali, K. A. und S. A. Sayed (1999): Growth characteristics of *Triticum aestivum* L. roots under different treatment combinations of boron, matric water potential and temperature. *Seed Science and Technology.* 27 (1): 239-249.
- Ferrol, N., Belver, A., Roldan, M., Rodriguez-Rosales, M. P. und J. P. Donaire (1993): Effect of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes. *Plant Physiol.* 103:763-769.
- Findeklee, P. und H. E. Goldbach (1996): Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Cucurbita pepo* roots. *Botanica Acta.* 109 (6): 463-465.
- Fleischer, A., Titel, C. und R. Ehwald (1998): The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiology.* 117 (4): 1401-1410.
- Fort, D. J., Storer, E. L. und F. J. Murray (1999): Effect of boron deprivation on reproductive parameters in *Xenopus laevis*. *Journal of Trace Elements.* In *Experimental Medicine.* 12(3): 187-204.
- Fujimura, T. und A. Komamine (1975): Effect of various regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Lett.* 5: 359-364.
- Galston, A. W. und L. Y. Dalbert (1954): The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic oxidase. *American Journal of Botany.* 41: 285-372.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. und K. Ojima (1968): Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.



- Garcia-Gonzalez, M., Mateo, P. und I. Bonilla (1991): Boron requirement for envelope structure and function in *Anabaena* PCC 7119 heterocysts. *J. Exp. Bot.* 42:925-929.
- Gärtel, W. (1974): Die Mikronährstoffe - ihre Bedeutung für die Rebenernährung unter besonderer Berücksichtigung der Mangel und Überschußerscheinungen. *Weinberg u. Keller.* 21: 435-507.
- Gauch, H. G. und W. M. Dugger (1953): The role of boron in the translocation of sucrose. *Plant Physiol.* 28: 457-466.
- Gerlach, D. (1977): *Botanische Mikrotechnik.* Thieme, Stuttgart.
- Goldbach, H. (1985): Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of  $^{32}\text{P}$  and  $^{14}\text{C}$ -glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.* 118: 431-438.
- Goldbach, H. und A. Amberger (1986): Influence of boron deficiency on  $^3\text{H}$  indolyl-acetic acid uptake and efflux in cell cultures of *Daucus carota* L. *Plant Growth Regulation.* 4: 81-86.
- Goldbach, H. und A. Amberger (1986): Influence of boron nutrition on cell wall polysaccharides in cell cultures of *Daucus carota* L. *J. Plant Physiol.* 123: 263-269.
- Goldbach, H. E. (1997): A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: Suggestions for further research and methodological requirements. *Journal of Trace and Microprobe Techniques.* 15 (1): 51-91.
- Goldbach, H., Wimmer, M. A. und P. Findekle (2000): Discussion Paper: Boron - How can the Critical Level be Defined?. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163: 115-121.
- Grieb, B. (1992): Untersuchungen zur Induction der Kompetenz zur somatischen Embryogenese in Karotten-Petiolenexplantaten (*Daucus carota* L.), Histologie und Proteinsynthesemuster. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Grieb, B., Schäfer, F., Imani, J., Nezamabadi-Mashayekhi, K., Arnholdt-Schmitt, B. und K.-H. Neumann (1997): Changes in soluble proteins and phytohormone concentrations of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota* L.). *J. Appl. Bot.* 71: 94-103.
- Groß, U., Gilles, F., Bender, L., Berghöfer, P. und K.- H. Neumann (1993): The influence of sucrose and an elevated  $\text{CO}_2$  concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell cultures. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 33: 143-150.
- Halperin, W. und D. F. Wetherell (1964): Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot (*Daucus carota*). *Am. J. Bot.* 51:274-283.

- Hanson, E. J. (1991): (a). Movement of boron out of fruit tree leaves. *Hortscience*. 26: 271-273.
- Hanson, E. J. (1991): (b). Sour cherry trees respond to foliar boron applications. *Hortscience*. 26: 1142-1145.
- Hirsch, A. M. und J. G. Torrey (1980): Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Can. J. Bot.* 58: 856-866.
- Hu, H., Brown, P. H. und Labavitch J. M. (1996): Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany*. 47 (295): 227-232.
- Hu, H., Penn, S. G., Lebrilla, C. B. und P. H. Brown (1997): Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.* 113: 649-655.
- Huber, S. C., Bachmann, M. und J. L. Huber (1996): Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca<sup>2+</sup> and proteins. *Trends Plant Sci.* 1: 432-438.
- Hundt, I., Schilling, G., Fischer, F. und W. Bergmann (1970): Untersuchungen über den Einfluß des Mikronährstoffes Bor auf den Nucleinsäurestoffwechsel und die Gewebestruktur von *Helianthus annuus* L. *Albrecht Thaer Archiv*. 14: 725-737.
- Hundt, I. und P. Neubert (1971): Weitere Untersuchungen über den Einfluß des Bors auf den Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel von *Helianthus annuus* L.. *Arch. Acker- u. Pflanzenbau und Bodenk.* 15: 989-998.
- Hutchinson, M. J., Murch, S. J. und P. K. Saxena (1996): Morphoregulatory role of thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium hortorum* Balley). *Journal of Plant Physiology*. 149 (5): 573-579.
- Ibrahim, R. K., Thakur, M. L. und B. Permanand (1971): Formation of anthocyanins in callus tissue cultures. *Loydia*. 34: 175-182.
- Ichimura, K. (1998): Improvement of postharvest life in several cut flowers by the addition of sucrose. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 32 (4): 275-280.
- Ilan, A. und D. K. Dougal (1994): Effects of gibberellic acid and uniconazol on activities of some enzymes of anthocyanin biosynthesis in carrot cell - cultures. *Journal of Plant Growth Regulation*. 13 (4): 213-219.
- Imani, J., Schäfer, F. und K.-H. Neumann (1998): In situ-Nachweis der Auxinverteilung während der Induction der somatischen Embryogenese in kultivierten Petiolenexplantaten von transgenen Karottenpflanzen. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 42: 179-180.

- Iwata, M., Konishj, T. und T. Susa (1969): Boron deficiency and excess in cruciferous vegetables. C.A. 70 No 11 Abs. No 46466.
- Jaweed, M. M. and E. G. Scott (1967): Effect of boron on ribonucleic acid and indole acetic acid metabolism in the apical meristems of sunflower plants. Proc. West Va. Acad. Sci. 39: 186-193.
- Johnson, D. L. and L. S. Albert (1967): Effect of selected nitrogen-bases and boron on the ribonucleic acid content, elongation, and the visible deficiency symptoms of tomato root tips. Plant Physiol. 42: 1307-1309.
- Kamali, A. R. and N. F. Childers (1967): Effect of boron nutrition on peach anatomy. Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. 90: 33-38.
- Kamble, A. B., Desai, U. T. und S. M. Choudhari (1994): Effect of micronutrients on fruit set, fruit retention and yield of Ber (*Zizyphus mauritiana* Lamk). Annals of Arid Zone. 33 (1): 53-55.
- Kastori, R., Plesinicar, M., Pankovic, D und Z. Sakac (1995): Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. Journal of Plant Nutrition. 18 (9): 1751-1763.
- Kastori, R. und N. Petrovic (1989): Effect of boron on nitrate reductases in tobacco leaves and root. Mol. Gen. Genet. 236: 203-208.
- Kato, H. (1968): The serial observations of the adventive embryogenesis in the microculture of carrot tissue. Sci. Jap. Cell Gen. Edn. Univ. Tokyo. 18: 191-197.
- Kawabata, S., Kusuhara, Y., Li, Y. H. und R. Sakiyama (1999): The regulation of anthocyanin biosynthesis in *Eustoma grandiflorum* under low light conditions. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 68 (3): 519-526.
- Keerati-Kasikorn, P., Bell, R. W., Panya, P., Gilour, R. F. und J. F. Loneregan (1993): Comparison of seed yield and quality of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars in low fertility soils and their response to boron and complete fertilizer. Plant Soil Sci. 54 (Plant Nutrition): 409-412 .
- Kepczynski, J., McKersie, B. D. und D. C. W. Brown (1992): Requirement of ethylene for growth of callus and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. J. Experimental Botany. 43: 1199-1202.
- Kevers, C., Filali, M., Petitpaly, G., Hagege, D., Rideau, M. und T. Gaspar (1996): Habituation of plant cells does not mean insensitivity to plant growth regulators. In-Vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 32 (3): 204-209.

- Kinnersley, A. M. und D. K. Dougal (1981): Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. *Planta*. 149: 200-204.
- Kissimon, J., Tantos, A., Meszaros, A., Jambor-Benczur, E. und G. Horvath (1999): Stress alteration in growth parameters, pigment content and photosynthetic functions of in vitro cultured plants. *Journal of Biosciences*. 54 (9-10): 834-839.
- Kohlenbach, H. W. (1978): Comparative somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (ed): *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Proc. 4th int. Cong. Plant Tissue & Cell Cult., Calgary, 59-66.
- Kohlenbach, H. W. (1984): Somatische Embryogenese: System zur Untersuchung der Induktion. *Mitteilungsband Deutsche Bot. Ges., Botaniker-Tagung, Wien*, 605.
- Kouchi, H. und K. Kumazawa (1976): Anatomical responses of root tip to boron deficiency. III. Effect of boron deficiency on sub-cellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. *Soil Sci. Plant Nutr. (Tokyo)* 22: 53-71.
- Kristiansen, K., Ornatrup, H. und K. Brandt (1999): In vitro PPF and media composition affect both in and ex vitro performance of *Alstroemeria* Butterfly-hybrids. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 56 (3): 145-153.
- Krosing, M. (1973): Wirkung von Bormangel auf Gewebe und Zellen intakter Pflanzen und auf isoliert wachsendes Gewebe. *Diss. Technische Univ. Berlin*. 87 S.
- Kumar, A., Bender, L. und K.-H. Neumann (1984): Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 3: 11-28.
- LeNoble, M. E., Blevins, D. G., Sharp, R. E. und B. G. Cumbie (1996): Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron .1. Maintenance of root elongation and cellular structure. *Plant-Cell-and-Environment*. 19 (10): 1132-1142.
- Lee, G. S. und S. Aronoff (1966): Investigation on the role of boron in plants. 3. Anatomical observations. *Plant Physiol*. 41: 1570-1577.
- Li, C. J. und F. Bangerth (1999): Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoots of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. *Physiol. Plant*. 106 (4): 415-420.
- Li, T. und K.-H. Neumann (1985): Embryogenesis and endogenous hormone content of cell cultures of some carrot varieties (*Daucus carota* L.). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 98: 227-235.

- Lillo, C. (1994): Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol Plant.* 90: 616-620.
- Liu , Z. H., Hsiao, I. C. und Y. W. Pan (1996): Effect of naphthalene acetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyl cuttings of soybean during root formation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 37 (4): 247-253.
- Loomis, W. D. und R. W. Durst (1991): Boron and cell walls. Pages 149-178. In D. D. Randall, D. G. Blevins, C. D. Miles, (eds): *Current topics in plant biochemistry and physiology.* Vol: 10. University of Missouri, Columbia.
- Loomis, W. D. und R. W. Durst (1992): Chemistry and biology of boron . *Biofactors.* 3: 229-239.
- Loria, L.G., Jimenez, R., Badilla, M., Lhuissier, F., Goldbach, H. und M. Thellier (1999): Neutron-capture-radiography study of the distribution of boron in the leaves of coffee plants grown in the field. *Journal of Trace and Microprobe Techniques.* 17 (1): 91-99.
- Ludvova, A. und M. G. Ostrolucka (1998): Morphogenic processes in callus tissue cultures and de novo regeneration of plants in *Actinidia chinensis* Planch.. *Acta-Societatis-Botanicorum-Poloniae.* 67 (3-4): 217-222.
- Lukaszewski, K. M. und D. G. Blevins (1996): Root growth inhibition in boron deficient or aluminum stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiology.* 112 (3): 1135-1140.
- Mackown, C. T., Sutton, T. G. und L. P. Bush (1990): Nitrogen compositional changes in xylem exudate and leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 30: 133-138.
- Marschner, H. (1995): *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press. 889 pp.
- Mateo, P., Bonilla, I., Fernandez-Valienta, E. und E. Sanchez-Maseo (1986): Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119. *Plant Physiol.* 81: 430-433.
- Matoh, T. (1997): Boron in plant cell walls. *Plant and Soil.* 193 (1-2): 59-70.
- Matoh, T. und M. Kobayashi (1998): Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *Journal of Plant Research.* 111 (1101) : 179-190.
- Meijer, E. A., de Vries, S. C. und A. P. Mordhorst (1999): Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high 2,4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Plant Cell Reports.* 18 (7-8): 656-663.
- Mengel, K. und E. A. Kirkby (1987): *Principles of plant nutrition.* International Potash Institute, Bern, Switzerland. 687 pp.

- Mengel, K. (1991): Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. Gustav Fischer Verlag Jena. 466 pp.
- Migge, A. und T. W. Becker (1996): In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 665-671.
- Mitchell, R. J., Garrett, H. E. Cox, G. S. und A. Atalay (1986): Boron and ectomycorrhizal influences on indole-3-acetic acid levels and indole-3-acetic acid oxidase and peroxidase activities of *Pinus echinata* Mill. roots. *Tree Physiol.* 1: 1-8.
- Mochioka, R., Yamaguchi, M., Horiuchi, S., Matsui, H. und H. Kurooka (1995): Chemotaxonomic classification of native wild Japanese grapes by anthocyanins in berry skin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.* 64 (3): 463-470.
- Mohr, H. und P. Sitte (1971): Molekulare Grundlagen der Entwicklung. Bayerischer Landwirtschafts - Verlag, München.
- Mohr, H. und P. Schopfer (1992): Pflanzenphysiologie. 4. Auflage, Springer, Berlin.
- Naghii, M. R. und S. Samman (1993): The role of boron in nutrition and metabolism. *Prog. Food Nutr. Sci.* 17 (4): 331-349.
- Neales, T. F. (1959): The boron requirement of Flax roots grown in sterile culture. *J. Exp. Bot.* 10: 426-436.
- Neumann, K.-H. (1962): Untersuchungen über den Einfluß essentieller Schwermetalle auf das Wachstum und den Proteinstoffwechsel von Karottengewebekulturen. Diss. Univ. Giessen.
- Neumann, K.-H. und A. Raafat (1973): Further studies on photosynthesis of carrot tissue cultures. *Plant Physiol.* 51: 685- 690.
- Neumann, K.-H. und H. de Garcia (1974): Über den Einfluß der Saccharosekonzentration auf die Entwicklung von Embryonen aus Zellsuspensionen von *Daucus carota* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 74: 85-90.
- Neumann, K.-H., Pertzsch, Ch., Moos, M. und G. Krömmelbein (1978): Untersuchungen zur Charakterisierung des Ernährungssystems von Karottengewebekulturen: Photosynthese, Kohlenstoff und Stickstoffernährung, Mineralstoffverbrauch. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 141: 299-311.
- Neumann, K.-H. und B. Grieb (1992): Somatische Embryogenese bei höheren Pflanzen. Grundlagen und praktische Anwendung. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Uni. zu Berlin, R. Mathematik/Naturwissen.* 41: 63-80.
- Neumann, K.-H. (1995): Pflanzliche Zell und Gewebekulturen. Verlag Eugen Ulmer, 304 S.

- Neumann, K.-H. (1999): Some physiological aspects in the development of plant cell and tissue culture. *Haberlandt Symposium Abstracts*. 159-161.
- Newnham, R. E. (1991): Agricultural practices affect arthritis. *Nutr. Health*. 7 (2): 89-100.
- Nielsen, F. H. (1990): Studies on the relationship between boron and magnesium which possibly affects the formation and maintenance of bones. *Magnes. Trace Elem.* 9 (2): 61-69.
- Nielsen, F. H. und T. R. Shuler (1992): Studies of the interaction between boron and calcium and its modification by magnesium and potassium, in Rats (ed.): *Effect on growth, blood variables and boneminerale composition*. *Biol. Trace Elem. Res.* 35 (3): 225-237
- Nielsen, F. H. (1993): Ultra trace elements of possible importance for human health: an update. *Prog. Clin. Biol. Res.* 380: 355-376.
- Nielsen, F. H. (1994): Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environ. Health Perspect.* 102 (7): 59-63.
- Nomura, K. und A. Komamine (1985): Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988-991.
- Nowak, G. A. und J. Czapla (1995): Response of soybean to gibberellin A3 application under conditions of high boron availability. *Journal of Plant Nutrition*. 18 (10): 2179- 2190.
- Nyomora, A. M. S., Brown, P. H. und M. Freeman (1997): Fall foliar applied boron increases tissue boron concentration and nut set of almond. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 122 (3): 405-410.
- Obermeyer, G., Kriechbaumer, R., Strasser, D., Maschessnig, A. und F.W. Bentrup (1996): Boric acid stimulates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiologia Plantarum*. 98 (2): 281-290.
- O'Kelley, J. C. (1957): Boron effects on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germinating pollen. *Amer. J. Bot.* 44: 239-244.
- Oertli, J. J. und W. F. Richardson (1970): The mechanism of boron immobility in plants. *Physiologia Plantarum*. 23: 108-116.
- Ozeki, Y. und A. Komamine (1981): Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiologia Plantarum*. 53: 570-577.

- Ozeki, Y. und A. Komamine (1985): Changes in activities of enzymes involved in general phenylpropanoid metabolism during the induction and reduction of anthocyanin synthesis in a carrot suspension culture as regulated by 2,4-D. *Plant Cell Physiol.* 26: 903-911.
- Ozeki, Y. und A. Komamine (1986): Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in a carrot suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 27: 1361-1368.
- Ozeki, Y., Komamine, A. und Y. Tanaka (1990): Induction and repression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzyme proteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures regulated by 2,4 -D. *Physiologia Plantarum.* 78: 400-408.
- Ozeki, Y. (1996): Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells. *J. Plant Res.* 109: 343-351.
- Paasch, K. (1994): Untersuchungen zum tagesperiodischen Verlauf von Phytohormonkonzentrationen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Paasch, K., Lein, C., Nessiem, M. und K.-H. Neumann (1997): Changes in the concentration of phytohormones in cultured root explants and in intact carrot plants (*Daucus carota* L.) during the day. *J. Appl. Bot.* 71: 85-89.
- Padgett, P. E. und R. T. Leonard (1996): Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 47: 871-883.
- Pagel, H., Enzmann, J. und H. Mutscher (1982): Pflanzennährstoffe in tropischen Böden - ihre Bestimmung und Bewertung. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin.
- Palser, B. F. und W. J. McIlrath (1956): Response of tomato, turnip and cotton to variation in boron nutrition. II. Anatomical responses. *Bot. Gaz.* 118: 53-71.
- Parmar, A. S. und H. D. Hammond (1971): The effect of boron and gibberellic acid on the senescence of leaf discs from *Lycopersicon esculentum* CV. Rutgers. *Physiologia Plantarum.* 25: 169-177.
- Penland, J.G. (1998): The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biol. Trace Elem. Res.* 66 (1-3): 299-317.
- Percival, G. und J. Gerritsen (1998): The influence of plant growth regulators on root and shoot growth of containerized trees following root removal. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 73 (3): 353-359.
- Peres, L. E. P. und G. B. Kerbauy (1999): High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). *Plant Cell Reports.* 18 (12): 1002-1006.



- Picchioni, G. A., Weinbaum, S. A. und P. H. Brown (1995): Retention and the kinetics of uptake and export of foliage-applied, labelled boron by apple, pear, prune, and sweet cherry leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 28-35.
- Pilbeam, D. J. and E. A. Kirkby (1983): The physiological role of boron in plants. *J. of Plant Nutrition.* 6 (7): 563-582.
- Raghavan, V. (1986): Embryogenesis in angiosperms. A developmental and experimental study. Cambridge University Press, Cambridge. 131-132.
- Rajaratnam, J. A. und J. B. Lowry (1974): The role of boron in the oil-palm (*Elaeis guineensis*). *Ann. Bot. (London) N. S.* 38: 193-200.
- Rajasekaran, K., Hein, M. B., Davis, G. C., Carnes, M. G. und I. K. Vasil (1987): Endogenous plant growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *J. Plant Physiol.* 130: 13-25.
- Ramirez, R. und J. C. Linares (1995): Boron deficiency symptoms and dry matter production of sesame under greenhouse conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 26 (17-18): 3043-3049.
- Ramon, A. M., Carpena-Ruiz, R. O. und A. Garate (1989): In vitro stabilization and distribution of nitrate reductase in tomato plants: Incidence of boron deficiency. *J. Plant Physiol.* 135: 126-128.
- Ramon, A. M., Carpena-Ruiz, R. O. und A. Garate (1990): The effects of short-term deficiency of boron on potassium, calcium and magnesium distribution in leaves and roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. In: *Plant nutrition physiology and application* (M.L. Van Beusichem, ed. ), pp. 287-290. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Rashid, A., Rafique, E. und N. Bughio (1994): Diagnosing boron deficiency in rapeseed and mustard by plant analysis and soil testing. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25, 17, 18: 2883-2897.
- Raven, J. A. (1980): Short and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.* 84: 231-249.
- Reinert, J. (1958): Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwiss.* 45: 34-345.
- Reinert, J. (1959): Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta.* 53: 318-333.
- Rekasem, B., Bell, R. W., Lodkaew, S. und J. F. Loneragan (1997): Relationship of seed boron concentration to germination and growth of soybean (*Glycine max*). *Nutrient Cycling in Agroecosystems.* 48 (3): 217-223.

- Ribnicky, D. M., Llic, N., Cohen, J. D. und T. J. Cooke (1996): The effect of exogenous auxin on endogenous indole-3-acetic acid metabolism - the implications for carrot somatic embryogenesis. *Plant Physiology*. 112 (2): 549-558.
- Richter, G. (1996): *Biochemie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart, New York. 494 pp.
- Robertson, G. A. und Loughman, B. C. (1974): Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. *New Phytol.* 73: 291-298.
- Roth-Bejerano, N. und C. Irai (1981): Effect of boron on stomatal opening of epidermal strips of *Commelina communis*. *Physiol. Plant.* 52: 302-304.
- Ruiz, J. M., Baghour, M., Bretones, G., Belakbir, A. und L. Romero (1998): Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): role of boron as a possible regulatory factor. *J. Plant Sci.* 159 (1): 121-126.
- Saftner, R. A. und R. E. Wyse (1984): Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugar beet root tissue discs. *Plant Physiol.* 74: 951-955.
- Schäfer, F., Grieb, B. und K.-H. Neumann (1988): Morphogenetic and histological events during somatic embryogenesis in intact carrot plantlets (*Daucus carota* L.) in various nutrient media. *Bot. Acta* 101: 362-365.
- Schilling, G. (2000): *Pflanzenernährung und Düngung*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 464 S.
- Schmitz, M. und U. Seitz. (1972): Hemmung der Anthocyan-Synthese durch Gibberrellinsäure A3 bei Kalluskulturen von *Daucus carota*. *Z. Pflanzenphysiol.* 68: 259-265.
- Schmucker, T. (1935): Über den Einfluß von Borsäure auf Pflanzen, insbesondere keimende Pollenkörner. *Planta.* 22: 264-283.
- Schon, M. K., Novacky, A. und D. G. Blevis (1990): Boron induces hyperpolarization on sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K<sup>+</sup>. *Plant Physiol.* 93: 566-571.
- Schopfer, P. (1970): *Experimente zur Pflanzenphysiologie*. Rombach, Freiburg, 418 S.
- Shelp, B. J. (1988): Boron mobility and nutrition in broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica). *Ann. Bot.* 61: 83-91.
- Shelp, B. J. (1990): The influence of boron nutrition on nitrogen partitioning in broccoli plants. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 21, 49.
- Shelp, B. J. (1993): Physiology and biochemistry of boron in plants. In: *Boron and its role in crop production* (U. C. Gupta, ed ), pp. 53-85. CRC press, Boca Raton, F. L.

- Shelp, B. J., Marentes, E., Kitheka, A.M. und P. Vivekanandan (1995): Boron mobility in plants. *Physiologia Plantarum*. 94 (2): 356-361.
- Shiralipour, A., McConnell, D. B. und W. H. Smith (1993): Applying compost to crops. *Bio Cycle*. 34 (6): 70-72.
- Shkolnik, M. J. A. Trotiskaya, E. A. und A. Maevskaya (1965): Reproduction with the acid 8-azaguanin of morphological alterations in sunflower characteristic of boron deficiency. *Fiziol. Rasten*. 12: 876-887.
- Shorrocks, V. M. (1997): The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant and Soil*. 193 (1-2): 121-148.
- Sivasankar, S. und A. Oaks (1996): Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem*. 34: 609-620.
- Skok, J. (1968): Relation of boron to gibberellic acid induced proliferation in debudded tobacco plants. *Plant Physiol*. 43: 384-388.
- Slack, R. und L. Coke (1966): Further studies on the role of boron in plant nutrition. *Soil Ferts*. 29: 467-473.
- Smith, S. M. und H.E. Street (1974): The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann. Bot*. 38: 223-241.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. und K. Mears (1958): Growth and organized development of cultured cell. II. Organization in culture grown freely suspended cells. *Am. J. Bot*. 45: 705-708.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., Kent, A. E. und R. D. Holsten (1964): Growth and development of cultured plant cells. *Science*. 143: 20-27.
- Steward, F. C., Ammirato, P. V. und M. O. Mapes (1970): Growth and development of totipotent cells. Some problems, procedures, and perspectives. *Ann. Bot*. 34: 761-787.
- Sugano, N. und K. Hayashi (1976): Dynamic interrelation of cellular ingredient relevant to the biosynthesis of anthocyanin during tissue culture of Carrot. *Bot. Mag. Tokyo*. 80: 440-449.
- Swietlik, D. (1995): Interaction between zinc deficiency and boron toxicity on growth and mineral nutrition of sour orange seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 18 (6): 1191- 1207.
- Tanada, T. (1978): Boron-key element in the action of phytochrome and gravity. *Planta*. 143: 109-111.
- Tanada, T. (1982): Role of boron in the far-red delay of nyctinastic closure of *Albizia-pinnules*. *Plant Physiol*. 70: 320-321.

- Tanada, T. (1983): Localization of boron in membranes. *J. Plant Nutr.* 6: 743-749.
- Tanada, T. (1995): Boron as a transducer in some physiological processes of plants. *Journal of Plant Nutrition.* 18 (9): 1743-1750.
- Tang, P. M. und De La Fuente R. K. (1986) The transport of indole-3-acetic acid in boron- and calcium-deficient sunflower. *Plant Physiol.* 81: 651-655.
- Timashov, N. D. (1969): Effect of boron on the RNA level, its nucleotide composition and ribonuclease activity of cytoplasmic structures of the sunflower. *C.A. List 70 No. 1 Abs No. 2830.*
- Tisserat, B., Esan, E. B. und T. Murashige (1979): Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 1-78.
- Tran Thi, Le (2000): Untersuchungen zur Bedeutung der Abscisinsäure (ABA) für die somatische Embryogenese verschiedener *Daucus*arten unter Einbeziehung transgener Stämme. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Vasil, I. K. (1964): Studies of pollen germination of certain Solanaceae. *Bull. Torrey Bot. Club* 91: 370-377
- Venter, H. A., Van, D. E. und H.B. Curries (1977). The effect of boron deficiency on callose formation and  $^{14}\text{C}$  translocation in bean (*Phaseolus vulgaris*) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Am. J. Bot.* 64: 861-865.
- Von Arnold, S. (1987): Effect of sucrose on starch accumulation in and adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Ann. Bot.* 59:15-22.
- Wagner, H. und G. Michael (1971): Effect of a varied nitrogen supply on the synthesis of cytokinins in roots of sunflower. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)* 162: 147-158
- Wake, H., Umetsu, H. und T. Matsunaga (1995). Somatic embryogenesis and artificial seed in carrot (*Daucus carota* L. ). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II* (ed. by Y. P. S. Bajaj ), *Biotechnology in agriculture and forestry.* 31: 170-181.
- Wakhloo, J. L. und A. Staudt (1988): Development of nitrate reductase activity in expanding leaves of *Nicotiana tabacum* in relation to the concentration of nitrate and potassium. *Plant Physiol.* 87: 258-263.
- Wang, Z. Y., Tang, Y. L., Zhang, F. S., und H. Wang (1999): Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. *Journal of Plant Nutrition.* 22 (3): 543-550.
- Warington, K. (1923): The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot. (London).* 37: 629-672.
- Wimmer, M. A. und H. E. Goldbach (1999): Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH on the stability of different boron fraction in intact roots of *Vicia faba* L. *Plant Biol.* 1: 632-637.

- Whittington, W. J. (1957): The role of boron on plant growth. I The effect on general growth, seed production and cytological behaviour. *J. Exper. Bot.* 8: 353-367.
- Yamagishi, M. und Y. Yamamoto (1994): Effect of boron on nodule development and symbiotic nitrogen fixation in soybean plants. *Soil Sci.Plant Nutr.(Tokyo)* 40 (2): 265-274.
- Yih, R. Y. and H. E. Clark (1965): Carbohydrate and protein content of boron deficient tomato root tip in relation to anatomy and growth. *Plant Physiol.* 40: 312-315.
- Yun, M. S., Kim, Y. S. und C. S. Ahn (1995): The method of controlled pollination to facilitate seed set and embryo development in the Chinese jujube, *Zizyphus jujuba* Mill. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science.* 36 (3): 377-383.
- Zhang, W., Seki, M. und S. Furusaki (1997): Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Science.* 127 (2): 207-214.
- Zhong, J. J. und T. Yoshida (1995): High density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme and Microbial Technology.* 17 (12): 1073-1079.

## 8 SUMMARY

Through using tissue culture methods it was investigated, what role boron plays during induction and realization of carrot somatic embryogenesis. During this period the concentration of anthocyanin as a secondary metabolite has been monitored. The following results were obtained:

### **1- Boron concentration of explants and nutrient medium in relation to release of boron from glass:**

Determination of boron in the nutrition medium and explants indicated, that the boron requirement during tissue culture may be dressed by the release of boron from the used glass. Therefore in this study polycarbon Erlenmeyer were used.

The explants in this study are from petioles and 2-weeks young carrot root. The explants were cultured for about 5 months in polycarbon Erlenmeyer with B5<sup>+</sup>-nutrient with 0 ppm boron. By this method the amount of boron in the explants should be very low, but a small amount of boron still was observed. This means, that not only the release of boron from the used glassware into the nutrient medium is very important, but also some contamination sources by the explants themselves or by chemicals added to the nutrient medium.

### **2- Germination of carrot seeds when treated with high concentrations of boron:**

Different organs of carrot show different reactions against boron toxicity. For example maximum boron tolerance of petioles, hypocotyls and lateral roots is 10 times higher than those of the leaves and main roots, which are more susceptible to higher boron concentrations. An increase in concentration of boron higher than these limits leads to a decrease of growth of the above mentioned organs.

### **3- Boron and its influence during the induction phase of somatic embryogenesis:**

During the induction phase petioles were treated with different boron concentrations and all produced somatic embryos. Treatments with high concentrations of boron or kinetin supplementation without boron led to a decrease of embryonal bodies. A simultaneous use of kinetin and 2,4-D inhibited or delayed the process of somatic embryogenesis. Kinetin had no influence on the induction phase, whereas 2,4-D was necessary for the induction of carrot somatic embryogenesis.

Petioles, which were not treated with 2,4-D and kinetin, produced only adventive roots. There was a negative correlation between boron concentration and number of adventive roots. In treatments in which petioles were treated only with kinetin no adventive roots were observed.

In the treatment without 2,4-D and boron a few embryos were observed. In general it has been stated that boron deficiency leads to an increase of endogenous auxin. Boron deficiency during induction phase and initial phase of realization leads to an increase of number of embryos. Apparently the number of embryonal bodies depends strongly on the induction situation.

### **4- Boron and its influence during the realization phase:**

Treatments with different boron concentrations during realization phase lead to all stages of embryonal development. During differentiation phase boron concentration shows hardly any effect on the embryo development. Through increase of boron concentration the number of torpedoed and plantlets increases whereas under boron deficiency or its lower concentrations the number of globular and heart forms remains higher (delayed development).

The main function of boron during the realization phase appears to influence differentiation of embryos to plantlets. Under high boron concentrations in cell suspension and petiole culture cotyledons grow well, but under boron deficiency however the roots are the organs which proliferate. Growth, development and termination of adventive roots are the result of variations in plant endogenous hormones. It means, low concentrations of boron lead to increase of endogenous auxin concentration and high concentration of boron leads to decrease of its concentration.

Through application of high concentration of boron during the realization phase a strong reduction of numbers of embryonal bodies have been observed.

#### **5- Determination of endogenous plant hormones during the induction and the realization phase:**

Behavior of IAA during the induction phase resembles its change during the realization stage. The concentration of IAA during the realization stage is higher than during the induction stage. Increase in boron concentration leads to a decrease of IAA content of plant cells. Treatment with 0 ppm and 0.1 ppm boron, however, remains an exception. Morphological changes of embryos due to boron application was not different in both treatments. Roots developed well and no hypocotyl and cotyledon growth could be observed.

Boron has a negative influence on ABA concentration and ABA has a negative influence on IAA synthesis, so IAA synthesis during the realization phase is influenced negatively by both boron and ABA concentration.

Cytokinin concentration of explants during the realization phase in comparison to its content during the induction phase depends mainly on ABA concentration. The ABA concentration during realization phase is higher than during the induction phase, so it can be postulated that 2,4-D influences ABA synthesis. In this way 2,4-D can influence endogenous hormone synthesis.

#### **6- Boron and its influence on IES-oxidase during somatic embryogenesis:**

During the induction phase low boron concentrations lead to an increase of IAA-oxidase activity, however, during realization phase this activity was higher.

A comparison between activity of IAA-oxidase after 8 and 21 days of culture shows that the positive correlation between IAA oxidase activity and development of embryonal bodies increased.



## **7- Synthesis of anthocyanin and chlorophyll during somatic embryogenesis treated with different concentrations of boron:**

There is hardly any relation between anthocyanin, chlorophyll and number of embryonal bodies during induction and realization of somatic embryogenesis, but there is a relation between the number of >800  $\mu\text{m}$  large embryos and anthocyanin concentration during the realization phase. It means that anthocyanin as a secondary product is not an indication of induction of somatic embryogenesis, but it rather indicates how embryonal bodies develop.

Cytokinins increase anthocyanins concentration. Application of boron increases the concentration of anthocyanins. This effect resembles the effect of kinetin on anthocyanins concentration. There is a strong positive correlation between anthocyanin and chlorophyll concentration.

## **Danksagung**

Mein erster, ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-H. Neumann für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich für die jederzeit gewährte Bereitschaft zur intensiven Diskussion und die bestandene Möglichkeit eigene Forschungsvorstellungen zu verwirklichen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. B. Pauler für die geduldige und sorgfältige Korrektur dieser Arbeit bedanken. Durch seine statistischen Auswertungen und seine fachliche, methodische und persönliche Beratung war er mir eine große Hilfe.

Frau C. Lein danke ich für die Einführung in die Methoden der Gewebekultur, ihre große Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit in all den Jahren.

Gedankt sei den MitarbeiterInnen der Abteilung Gewebekultur des Institutes, insbesondere Herrn Dr. J. Imani für die gute Zusammenarbeit und fachliche und methodische Beratung sowie Frau J. Korb-Müller für ihre tatkräftige Unterstützung.

Meinen Freunden, von denen mich jeder auf seine Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat, gebührt Dank.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter und meiner Familie bedanken, die mich während all der Jahre in Deutschland geduldig begleitet und unterstützt haben.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die ich anderen Untersuchungen dem Wortlauf oder Sinn nach entnommen habe, sind durch die entsprechenden Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gießen, im Mai, 2001